

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Extracción de colágeno tipo I de piel de tilapia
(*Oreochromis niloticus*) por los métodos acuoso y
enzimático**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
BIÓLOGO

AUTOR: Br. Reátegui Pinedo, Nataly Yahayra

ASESOR: Dra. Prieto Lara, Zulita Adriana

TRUJILLO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A DIOS, por iluminar siempre mi camino, por permitirme conocer a personas maravillosas en el transcurso de mi carrera profesional, y darme las fuerzas necesarias para cumplir con mis sueños.

A MIS PADRES, Betsy Pinedo y Wilson Reátegui, quienes con su amor y apoyo incondicional siempre me motivaron para luchar por mis sueños, y son las personas que siempre confían en mí. Cada logro alcanzado en mi vida será dedicado a ustedes. Los amo con todo mi ser.

*A mi **Hermana** Marilyn, por su apoyo, amor y consejos que son muy valiosos para mí. Por ser mi ejemplo a seguir y mi guía hacia el futuro. Te amo*

*A mis **HERMANITOS**, Ángel y Narcizo quienes son el motivo para superarme cada día y así poder ser su guía en sus caminos. Los amo.*

*A mi **SOBRINITO**, Diego Ignacio, por traer felicidad a la familia, y ser luz de mi vida. Te amo*

*A mi **FAMILIA DE CORAZÓN**, Mi Ada madrina, Victor (adopadrino) y mi hermana Laudelina, por su apoyo, y por acogerme en su hermosa familia, que con amor y buenos ejemplos me ayudaron siempre a lo largo de mi carrera universitaria y en vida personal. Los amo.*

*A mi **ABUELITA** Olinda y mi **TÍA** Doris quienes con sus oraciones y sus buenos deseos siempre estuvieron apoyándome para que todo me vaya bien en mi camino.*

*A las **PERSONAS** importantes en mi vida, que siempre estuvieron listos para brindarme su apoyo, en el camino de mi vida y de mi vida universitaria, gracias: Juan Carlos, Zoila, Janet, Marco y Sergio.*

*A mi querida **PROFESORA** la Dr. Zulita Prieto por sus enseñanzas, consejos y apoyo brindado, la cual me lleno de aún más fuerzas para seguir en mi carrera. Gracias por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente. Usted es mi inspiración, Dios la bendiga siempre.*

*A mis **MAESTROS**, gracias por sus enseñanzas a lo largo de mi carrera, y los buenos consejos brindados, en especial a los profesores, Ms.C. Carlos, Dr. José Antonio, Dr. José y la profesora Ms.C. Aida. Dios les bendiga siempre.*

JURADO DICTAMINADOR

Los profesores que suscriben, miembros del jurado dictaminador, declaran que el presente informe de ha cumplido con los requisitos formales y fundamentales, siendo aprobado con mención honrosa.



Dr. José Antonio Saldaña Jiménez

PRESIDENTE



M.Sc. Carlos Heli Quijano Jara

SECRETARIO



Dra. Zulita Adriana Prieto Lara

AGRADECIMIENTO

Agradecer a Dios por guiarme durante todo este camino y que a pesar de los obstáculos que se presentaron en el transcurso de mi vida él me protegió y me ayudó a salir adelante. Gracias, gracias, gracias.

A mi madre por enseñarme a valorar la vida y ser la luz de mis ojos, quien me enseñó a nunca rendirme y luchar hasta el último instante de mi vida, ella quien confía tanto en mí y a quien amo con todo mi ser. Gracias por ser mi motor y motivo. Te amo mamá.

A mi padre por su apoyo y amor incondicional a pesar de la distancia, y gracias por hacer siempre una pausa a todo para poder estar a mi lado y enseñarme que la familia es lo más importante. Te amo.

A mi asesora Dra. Zulita Prieto Lara, por su apoyo en la realización de la presente tesis, por sus consejos, por la oportunidad brindada para seguir creciendo profesionalmente y personalmente.

A mis compañeros y amigos que a la vez son miembros del Centro Experimental de Genética de la Universidad Nacional de Trujillo: Blg. David, Blg. Mónica y Luz Argomedo por su apoyo en la realización de los procesos realizados en la presente tesis.

A mi compañera y amiga que a la vez miembro del Laboratorio de Genética y Biología Molecular: Blg. Linda Sánchez por su apoyo constante y su tiempo brindado para la realización de los procesos realizados en la presente tesis.

INDICE

Paginas

DEDICATORIA.....	ii
JURADO DICTAMINADOR.....	iv
DEDICATORIA.....	v
INDICE	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS.....	ix
PRESENTACIÓN.....	x
DEL ASESOR	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIAL Y METODOS	9
III. RESULTADOS	18
IV. DISCUSIÓN.....	29
V. CONCLUSIONES.....	34
VI. RECONOCIMIENTO.....	34
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35

ANEXOS

TABLA DE CONTENIDO

Tabla 1. Peso corporal total y peso de piel de *Oreochromis niloticus*.

Tabla 2. Cantidad de proteínas totales según los métodos de extracción de colágeno soluble en ácido (ASC) con pretratamiento con y sin NaOH y colágeno soluble en pepsina (PSC) con NaOH como pretratamiento.

Tabla 1. Anexo. Métodos aplicados para la obtención del colágeno.

Tabla 2. Anexo. Descripción de equipos y materiales.

Tabla 3. Anexo. Descripción de materiales.

Tabla 4. Anexo. Otros materiales.

Tabla 5. Anexo. Descripción de reactivos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Relación del peso corporal total con el peso de piel de *Oreochromis niloticus*.
- Figura 2. Peso de colágeno liofilizado de piel de *Oreochromis niloticus*, tilapia, obtenido por los métodos de extracción de colágeno acuoso (ASC) y colágeno soluble con pepsina (PSC), en ambos métodos con el pretratamiento con NaOH.
- Figura 3. Variación de la cantidad de proteínas totales (mg/ml) en función de las concentraciones de colágeno liofilizado de piel de *Oreochromis niloticus*, tilapia, obtenido por los métodos de extracción acuosa y enzimático.
- Figura 4. Cantidad de proteínas totales (mg/ml) según los métodos de extracción de colágeno soluble de piel de *Oreochromis niloticus*, tilapia. 1. (ASC) Proteínas solubles totales sin el pretratamiento con NaOH, 2. ASC con NaOH y 3. Colágeno soluble en pepsina (PSC)- pretratamiento con NaOH.
- Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE de colágeno de piel de tilapia extraído por los métodos acuoso (ASC) y enzimático (PSC). 1 ASC con β -mercaptoetanol (β -Me), 2.ASC sin β -Me, 3. PSC con β -Me, 4. PSC sin β -Me, 5. Colágeno tipo I de bovino (Sigma).
- Figura 6. Curvas de desnaturalización térmica del colágeno de la piel de *Oreochromis niloticus*, tilapia, obtenidos por los métodos de extracción acuoso y enzimático.

Figura 7. Estructura del colágeno vista al microscopio óptico 40X, barra 200 μm .

A. Colágeno extraído por el método acuoso. B. Colágeno extraído por el método enzimático.

Figura 1. Anexo. Toma de datos, de longitud y peso de los peces *Oreochromis niloticus* “tilapia”.

Figura 2. Anexo. Esquema del proceso para la obtención de la piel para la extracción del colágeno.

Figura 3. Anexo. A. Piel de *Oreochromis niloticus* en medio ácido acético con pepsina (método enzimático). B. Muestras en Thermo. Shaker por el método enzimático. C. Piel de *Oreochromis niloticus* en medio ácido acético (método acuoso).

Figura 4. Anexo. A. Proceso de filtrado del colágeno soluble al vacío. B. Colágeno filtrado. C. Colágeno en proceso de liofilización. D. Colágeno liofilizado.

Figura 5. Anexo. Pesado de colágeno liofilizado para la toma de datos y las caracterizaciones.

Figura 6. Anexo. A. Colocación de las muestras para el corrido electroforético. B. Proceso de electroforesis.

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En el cumplimiento con las disposiciones establecidos en el régimen de Grados y Títulos de la Escuela Académica Profesional de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Trujillo, someto a vuestra consideración y criterio la presente tesis titulado: “Extracción de colágeno tipo I de piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*) por los métodos acuoso y enzimático”, para su evaluación.

Trujillo, diciembre del 2019

Br. Reátegui Pinedo, Nataly Yahayra

DEL ASESOR

La que suscribe Dra. Prieto Lara, Zulita Adriana, profesora principal a dedicación exclusiva del Departamento Académico de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológica, asesora de la tesis: “Extracción de colágeno tipo I de piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*) por los métodos acuoso y enzimático”, deja constancia que la presente, ha sido desarrollado de conformidad con los criterios y disposiciones propuestos por la Universidad Nacional de Trujillo, tomando en cuenta las orientaciones brindadas al investigador y acogiendo las sugerencias pertinentes.

Dr. Prieto Lara, Zulita Adriana

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar las características biológicas del colágeno extraído de la piel de *Oreochromis niloticus*, tilapia, referido al rendimiento, cuantificación de proteínas totales, electroforesis SDS-PAGE, estabilidad térmica, morfología de la estructura superficial por microscopía óptica y la cantidad de colágeno tipo I obtenido por los métodos colágeno soluble acuoso (ASC) y por, colágeno soluble con pepsina (PSC). El material biológico, tilapia, fue obtenido en el Centro Experimental de Genética de la Universidad Nacional de Trujillo. Se registraron los pesos de los individuos y se extrajo la piel de los peces y luego de registrar el peso de piel de cada individuo se procedió con la extracción de colágeno. Por el ASC se realizó un pretratamiento con y sin hidróxido de sodio 0.1M/24h, seguido de la aplicación de butanol al 10% y la extracción en ácido acético 0,5M/24h y por el PSC, el pretratamiento con hidróxido de sodio 0,1M/24h seguido del tratamiento con butanol al 10% y la extracción en pepsina al 0,1% en ácido acético al 0,5M/48h. Luego de la liofilización, las muestras fueron pesadas y caracterizadas. El perfil de bandas obtenidos por electroforesis SDS-PAGE, reveló el mismo para los tres tipos de tratamientos y para el colágeno tipo I de bovino certificado (Sigma), fueron visibles las bandas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y la banda β . El rendimiento de ASC fue el 20,43% mientras que en PSC fue 22,47%, las proteínas totales se cuantificaron en mayor cantidad en ASC sin NaOH y en similares cantidades en ASC con NaOH y PSC, en relación a la estructura superficial del colágeno fueron evidentes las diferencias, las microfibrillas más conservadas en el ASC. Se confirmó la presencia de colágeno tipo I de la piel de tilapia (*O. niloticus*) y en cantidad de colágeno ligeramente mayor con el método PSC.

Palabras claves: *Oreochromis niloticus*, piel de tilapia, colágeno tipo I, métodos de extracción de colágeno, pepsina, ácido acético, hidróxido de sodio.

ABSTRACT

The objective of the investigation was to determine the biological characteristics of the skin's collagen in *Oreochromis niloticus* "tilapia", referred to performance, quantification of total proteins, electrophoresis SDS-PAGE, thermal stability, morphology of the surface structure by optical microscopy and the amount of collagen type I obtained by the methods of aqueous soluble collagen (ASC) and by pepsin soluble collagen (PSC). The biological material, tilapia, was obtained at the Experimental Center of Genetics of the National University of Trujillo. The weights of the individuals were recorded and the skin of the fish was extracted and after registering the skin weight of each individual, the collagen was extracted. By the ASC, a pretreatment was carried out with and without sodium hydroxide 0.1M/24h, followed by the application of butanol to 10 % and extraction in acetic acid 0.5M / 24h, and by the PSC, pretreatment with 0.1M / 24h sodium hydroxide followed by treatment with butanol at 10% and extraction in pepsina at 0.1% in acetic acid 0.5M / 48h. After lyophilization, the samples were weighed and characterized. The profile of bands obtained by electrophoresis SDS-PAGE revealed the same for all three types of treatments and for collagen type I of certified cattle (Sigma), the α_1 and α_2 bands and the β band were visible. The yield of ASC was 20.43% while in PSC it was 22.47%, the total proteins were quantified in greater quantity in ASC without NaOH and in similar amounts in ASC with NaOH and PSC, in relation to the surface structure of the the differences were evident, the most conserved microfibrils in the ASC. The PSC method confirmed the presence of type I collagen in the skin of tilapia (*O. niloticus*) and in a slightly larger amount of collagen.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, tilapia skin, type I collagen, collagen extraction methods, pepsin, acetic acid, sodium hydroxide.

I. INTRODUCCIÓN

La matriz extracelular está compuesta principalmente por proteínas, siendo la proteína estructural más abundante el colágeno, ésta a la vez representa el 25 al 30% de proteína corporal en los vertebrados (Mienaltowski y Birk, 2014). Estas proteínas colágenas están compuestas por tres cadenas de polipéptidos, que contienen la secuencia Gly-X-Y, donde X e Y usualmente es prolina e hidroxiprolina, respectivamente (Silver, 2018; Bhuijbar *et al.*, 2019) siendo las más comunes entre los 1000 aminoácidos de cada cadena de polipéptidos (Gómez-Guillén *et al.*, 2002).

Estas proteínas colágenas por las características estructural que presentan, brindar estabilidad, elasticidad y resistencia a los tejidos conectivos, por ello en la actualidad se utiliza para aplicaciones en el campo de los materiales biomédicos que son diseñados, sintetizados y procesados para ser utilizados para las quemaduras entre otras afecciones (Saenz, 2017; Holguin, *et al.*, 2015); en el área cosmética, para el tratamiento y prevención de arrugas, curación de las heridas cutáneas (Torra, *et al.*, 2000; Beltrán, 2011).

La principal fuente de obtención de colágeno a nivel industrial es de porcino y bovino (De Moraes y Cunha, 2013), sin embargo existe rechazo de la sociedad por las creencias religiosas y los riesgos por brotes de enfermedades que son transmisibles a los humanos, como encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) y fiebre aftosa (FA), lo cual ha conllevado a los científicos a realizar diferentes estudios en búsqueda de nuevas fuentes de colágenos, pruebas que se centraron en los desechos producidos por la industria pesquera, tales como huesos, escama y piel, aplicándose técnicas de extracción para la obtención del colágeno (Zhang *et al.*, 2009; Pati *et al.*, 2010;

Quintero y Zapata, 2017), considerando una fuente más segura en comparación de otros animales.

Los estudios indican que se obtiene colágeno tipo I a partir de la piel, huesos, aletas y escamas, donde cada año en la industria pesquera se generan desechos del 50 al 70%, siendo ello de gran potencial para la extracción de colágeno, así diversificando sus posibles usos industriales, químicos farmacéuticos y como material biomédico (Solari y Córdova, 2015; Llerén y Rodríguez, 2017). Todo ello conlleva a los investigadores a realizar estudios de caracterización en diversas especies de peces, como de aguas continentales y marinas, donde la especie *Oreochromis niloticus* “tilapia” tiene mayor resistencia a la variación de temperatura comparado a otras especies de peces (Serrano, 2011; Ikoma *et al.*, 2013; González y Vidal, 2018).

Para la extracción de colágeno de piel de *O. niloticus*, “tilapia”, se trabajan en medio ácido (ASC) (Sun *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018; Bi *et al.*, 2019) y soluble en pepsina (PSC) (Sun *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018). Metodologías que precisan adaptaciones en las condiciones de laboratorio de Genética de la Universidad Nacional de Trujillo. La existencia de equipos e instrumentos pueden producir variaciones debido a marcas o condiciones de temperatura ambiental, aun cuando se trate de replicar con las condiciones indicadas en las publicaciones científicas.

1.1. Realidad problemática

El colágeno comercial se obtiene, principalmente, de los desechos de pieles, tendones, cartílago, huesos, córneas y órganos de ovinos, porcinos, vacunos y aves, y para contar con un producto saludable es necesario que las especies de

mamíferos y aves estén libres de enfermedades infecciosas transmisibles al hombre. De allí la importancia de utilizar con materia prima la piel de peces y como mejor alternativa, una especie cultivable, como la tilapia. Por otro lado, el colágeno de peces puede ser aceptado por diferentes creencias religiosas.

Existe varios métodos de extracción de colágenos en la cual se citan, el método acuoso y el método enzimático, de acuerdo al tipo de método aplicado se muestran variaciones. Se requieren tener en cuenta el tiempo del tratamiento, las temperaturas, los productos químicos y la aplicación para lo cual se trabaja, la conservación de la materia prima (piel) y la especificidad del colágeno obtenido por los distintos métodos.

1.2. Justificación y relevancia

La piel de los peces constituye una fuente alta en colágeno tipo I de acuerdo a los estudios realizados por los investigadores, en el país la producción de *O. niloticus*, “tilapia”, a nivel de la industria acuícola cada año se va elevando en productividad, ello conllevando a generar desechos de aproximadamente un 60%, generan impacto al medio ambiente. Estos subproductos están constituidos por la piel, huesos y escamas, para disminuir el impacto ambiental, se aprovecha la piel para la obtención de colágeno que nos brinda y a la vez siendo benéfico para el ser humano.

A nivel industrial los subproductos generados por la acuicultura no son explotados, pudiendo tener impacto a nivel industrial con el uso de la metodología aplicada en este trabajo de investigación, para ello en relación a las técnicas de extracción

de colágeno existen diferencias en las propuestas de los investigadores, para la obtención del colágeno tipo I a partir de la piel de “tilapia”, donde requiere contar con métodos de extracción estandarizados.

Se reportan los métodos acuosos y enzimáticos, sin embargo, no hay trabajos que reporten el tipo de usos específicos que se puede dar y la cantidad que se puede obtener del colágeno por estos métodos. Lo que se quiere lograr en el laboratorio de Genética es la estandarización de estos métodos para la productividad del colágeno con fines específicos y la cantidad que se pueda obtener de acuerdo al método que se use, mediante la comparación, trabajándolo de forma paralela, por lo que fue necesario, realizar ensayos que fueron propuesta por ambos métodos, para obtener un procedimiento que facilite la extracción de colágeno tipo I en mayor cantidad y calidad.

A la vez en la Universidad Nacional de Trujillo contamos con el Centro Experimental de Genética de la facultad de Ciencias Biológicas, siendo un centro de producción de linajes de tilapia, donde se da la crianza y producción de tilapia línea F1, la cual está libre que hormonas teniendo un nivel de crecimiento y resistencia mayor a los otros linajes como la tilapia gris y roja, por ende, se obtiene mayor producción de peces para el mercado en menor tiempo, contando con la garantía del material biológico (piel).

1.3. Marco teórico conceptual

El colágeno es una proteína que se encuentra en altos porcentajes en la matriz extracelular, encontrándose en vertebrados (Serrano, 2011; Shi *et al.*, 2019). Estas proteínas de colágeno han recibido designaciones numéricas de acuerdo al orden de descubrimiento, el tipo de colágeno se designa con números romanos de acuerdo a las funciones que puedan cumplir, como por ejemplo el colágeno del grupo I, II, III, son formadores de fibras (Miennaltowski y Birk., 2013; Minh *et al.*, 2014), siendo el del tipo I el más abundante y expresándose en casi todos los tejidos conectivos, caracterizándose por su presencia en huesos, piel, ligamento, esclerótica, cornea y vasos sanguíneos (Seal *et al.*, 2001; Henriksen y Karsdal, 2016), constituyendo aproximadamente el 25 % de la masa total de la proteína de los animales (Gómez-Lizárraga *et al.*, 2011).

El colágeno tipo I es una molécula heterotrímica, en la mayoría de los casos, componiéndose de una cadena $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, existiendo también un homotrímero $\alpha 1$ en menor proporción, donde cada cadena está compuesta por 1000 aminoácidos, donde la glicina en cada tercera posición es importante para la estructura helicoidal, donde la parte no helicoidal conocida como telopeptido correspondiente a los extremos terminales de la cadena (N-terminal y C-terminal) (Henriksen y Karsdal, 2016; Gómez-Lizárraga *et al.*, 2011).

De acuerdo a los estudios realizados que confirman que existe colágeno tipo I en animales acuáticos (Bea *et al.*, 2008), como peces, siendo de relevancia el colágeno proveniente de la piel de *O. niloticus*, “tilapia”, ya que es un pez que se popularizó en la acuicultura volviéndose el más importante a nivel mundial,

debido a su fácil adaptación a distintas gamas de condiciones ambientales, teniendo un crecimiento rápido y de reproducción en cautiverio (Bi *et al.*, 2019). Con la alta demanda del filete de Tilapia, se tiene aproximadamente un 50 a 70 % de desechos, incluyendo resto de carne, piel, huesos, escamas y vísceras (Serrano, 2011; Quintero y Zapata, 2017; Bi *et al.*, 2019).

De acuerdo a los estudios realizados por distintos investigadores para la obtención de colágeno, existen dos principales métodos de extracción, el método acuoso y el enzimático. En el método Acuoso para la extracción del colágeno encontramos tratamientos en medio ácido usando ácido acético, tratamientos por agua caliente en la cual se trabaja a temperaturas de 80 °C y tratamientos en medio alcalino usando hidróxido de sodio y en el método Enzimático usando tratamiento en medio ácido con de la pepsina y en un medio alcalino la proteasa. El tratamiento del ácido acético tiene menos efecto sobre la estructura de triple hélice de los colágenos a diferencia del tratamiento por agua caliente este actúa desnaturaliza los colágenos, en el tratamiento por hidróxido de sodio comúnmente destruye las estructuras de aminoácidos de los colágenos. El tratamiento de la pepsina, esta enzima se introduce en los productos finales de colágeno, la cual fragmenta a la estructura de triple hélice al igual que la enzima proteasa (Serrano, 2011; Li *et al.*, 2018; Bi *et al.*, 2019).

De acuerdo a ello, en este trabajo, se eligieron los tratamientos utilizados por Bi *et al.*, 2019 en su trabajo, aplicado en piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*) utilizo el método acuso en un medio ácido y por el método enzimático con pepsina Li *et al.*, 2018, en la cual se trabajó en medio ácido con pepsina (enzima digestiva).

1.4. Marco empírico

Se realizaron distintos estudios sobre las propiedades histológicas y químicas de la piel de *O. niloticus*, para futuras aplicaciones. La piel de tilapia se utiliza como vendaje biológico temporal en quemaduras. Lima-Junior *et al.*, 2017 trabajaron con la piel de tilapia, en heridas inducidas a quemaduras en ratas, en la cual mostró buena adherencia y curación. En la actualidad, Dias *et al.*, 2019, están realizando aplicaciones de la piel de tilapia como un nuevo injerto biológico en pacientes con el síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser” con muy buenos resultados.

Según Negreiros *et al.*, 2015, la piel de tilapia está constituido por filamentos de colágeno compactados, con predominancia del Tipo I y las características microscópicas y estructuras histológicas son semejantes a la piel humana en resistencia a la rotura y en la extensión.

1.5. Problema

¿Cuáles son las características del colágeno tipo I de la piel de tilapia (*O. niloticus*) obtenidos por los métodos acuoso y enzimático?

1.6. Objetivos

a. General.

Determinar y comparar las características, referido a la cuantificación de proteínas totales, perfil de bandas por electroforesis SDS-PAGE, estabilidad térmica, morfología de la estructura superficial por microscopía óptica y la cantidad de colágeno tipo I de la piel de tilapia obtenida por los métodos acuoso y enzimático.

b. Específicos.

- 1) Extracción de colágeno tipo I por los métodos acuoso y enzimático.
- 2) Caracterizar el colágeno tipo I obtenido mediante electroforesis de proteínas, por microscopía óptica y lectura de proteínas totales en el espectrofotómetro.
- 3) Comparar la cantidad de colágeno tipo I obtenida por los métodos acuoso (ASC) y enzimático (PSC).

1.7. Hipótesis

Se obtiene colágeno tipo I de la piel de tilapia por los métodos ASC y PSC con características que difieren entre sí.

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1. Tipo de investigación

- a) Por la finalidad: Básico.
- b) Por el diseño de investigación: Experimental.

2.2. Población y muestra

La población de estudio fueron los peces *Oreochromis niloticus*, “tilapia”, F1, del cruce del linaje rojo YY con hembras gris, disponibles en el Centro Experimental de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, La Libertad.

Para obtener los individuos de la muestra se tuvo los criterios de inclusión y exclusión.

2.3. Criterio de inclusión

- Peces de la línea F1 que proviene del cruce de machos YY de linaje rojo y hembras de linaje gris.
- Peces machos de edad mayor a 2 años.
- Peces estén saludables.
- Peces con menos manchas.

2.4. Criterios de exclusión

- Peces con síntomas de enfermedad.
- Peces menores de 2 años.

- Peces de linaje gris y rojo.
- Peces con manchas numerosas.

2.5. Unidad de análisis

La piel de cada individuo, la piel (2,5g) de un mismo individuo fue distribuido para todos los tratamientos.

2.6. Instrumentos

Los equipos y materiales que se utilizó en la presente tesis se especifican a detalle en los anexos identificados en tabla 2, anexo, tabla 3 anexo, tabla 4 anexo y tabla 5 anexo.

2.7. Control de calidad de los datos: prueba de valides y confiabilidad

Para la validación y confiabilidad se realizaron tres replicas y tres repeticiones, las pruebas para la caracterización de proteínas se tuvo el patrón de referencia albumina de suero bovino (Sigma), para la determinación de colágeno tipo I, se tuvo como referencia el colágeno tipo I de bovino (Sigma) y el marcador de peso molecular de 15 a 600 kDa (Sigma). Cada análisis fue repetido entre tres a 5 veces para determinar la precisión de las medidas, con un error estándar tendiente a cero.

2.8. Definición de variables

2.8.1. Variable independiente

Métodos para la obtención de colágeno: colágeno soluble acuoso (ASC) con y sin pretratamiento con hidróxido de sodio y colágeno soluble con pepsina (PSC) - pretratamiento con hidróxido de sodio.

2.8.2 . Variables dependientes

- Peso de piel de cada individuo.
- Peso de colágeno liofilizado en gramos.
- Porcentaje de rendimiento del colágeno en los distintos tratamientos.
- Cantidad de proteínas totales, mg/ml, de los extractos de colágeno obtenidos.
- Perfiles de bandas del colágeno liofilizado con y sin β -mercaptoetanol.
- Viscosidad fraccional en función de la variación de temperatura.
- Morfología de la estructura superficial del colágeno por microscopía óptica.

2.9. Procedimiento

La piel de *Oreochromis niloticus* “tilapia”, se trabajó en estado fresco, extraído en el momento, teniendo las siguientes características en cuenta: el olor de pescado fresco, color rojizo con algunas manchas grises, brillante, y con una textura firme y resistente.

De la piel de un mismo individuo fue distribuido en cantidad de 2,5 g para cada tratamiento, teniendo en cuenta tres repeticiones. Se realizaron tres replicas, se considera réplica a la piel de cada individuo.

Se trabajó con la misma cantidad de piel de tilapia y la misma línea genética para cada método.

2.9.1. Extracción de la piel y procesamiento de la piel

Para la extracción de la piel, los peces fueron expuestos a shock térmico a 50 °C, para causar una muerte no dolorosa, esto duró aproximadamente 30 minutos, luego se separó las pieles por el método del corte en L, y fueron lavadas con agua potable por 30 minutos hasta eliminar los residuos que se encontraron, como escamas y resto de carne. La piel fue cortada en cuadros de aproximadamente de 1 x 1 cm, y distribuida para la aplicación de los métodos de extracción considerados (Figura 2 Anexo).

2.9.2. Extracción del colágeno

Método acuoso con pre- tratamiento sin Hidróxido de sodio (ASC sin NaOH)

Para el proceso de extracción del colágeno por el método acuoso sin NaOH, se realizó según el método que menciona Bi *et al.*, 2019. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente (22-24°C) (Tabla 1 Anexo).

Pre-tratamiento: Las pieles se expusieron en butanol al 10% durante 24 horas, en una relación de 1:20 (p/v), se procedió a lavar con agua destilada estéril y finalmente se escurrió.

Extracción: Las pieles pre-tratadas se solubilizó en ácido acético al 0.5M por 24 horas en una relación de 1:20 (p/v). Luego se procedió a filtrar la solución al vacío con papel Whatman N°4 (Figura 3 Anexo, Figura 4 Anexo).

Método acuoso con pre- tratamiento con Hidróxido de sodio (ASC con NaOH)

Para el proceso de extracción del colágeno por el método acuoso con NaOH, se realizó según el método que menciona Li *et al.*, 2018. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente (22-24°C) y el tiempo de extracción fue de 24 horas (Tabla 1 Anexo).

Pre-tratamiento: Las pieles se expusieron en una solución de hidróxido de sodio al 0.1M durante 24 horas y en una relación de 1:20 (p/v), se procedió a lavar con agua destilada estéril y finalmente se escurrió.

Extracción: Las pieles pre-tratadas se solubilizó en ácido acético al 0.5M por 24 horas en una relación de 1:20 (p/v). Luego se procedió a filtrar la solución al vacío con papel Whatman N°4 (Figura 3 Anexo, Figura 4 Anexo).

Método enzimático con pre-tratamiento con Hidróxido de sodio (ASC con NaOH)

Para el proceso de extracción del colágeno por el método enzimático con NaOH, se realizó según el método que menciona Li *et al.*, 2018. Todo el proceso se realizó a 4°C y en agitación constante a 600 RPM (Tabla 1 Anexo).

Pre-tratamiento: Las pieles se expusieron en una solución de hidróxido de sodio al 0.1M durante 24 horas y en una relación de 1:20 (p/v), se procedió a lavar con agua destilada estéril y finalmente se escurrió.

Luego se expuso la piel en butanol al 10% durante 24 horas, en una relación de 1:20 (p/v), se procedió a lavar con agua destilada estéril y finalmente se escurrió.

Extracción: Las pieles pre-tratadas se solubilizó en ácido acético al 0.5M con pepsina al 0.1% por 48 horas en una relación de piel: solución de 1:20 (p/v). Luego se procedió a filtrar la solución al vacío con papel Whatman N°4 (Figura 3 Anexo, Figura 4 Anexo).

2.9.3. Secado

Se aplicó la técnica de secado por liofilización, donde el colágeno soluble obtenido por cada método, se colocó en frascos de vidrio la cual son parte del equipo de liofilización y se colocó al congelador a -80°C , por un tiempo de 30 min, tiempo que duró en congelarse. Una vez congelado se colocó en el equipo de liofilización, durando 8 horas para el secado total de las muestras.

2.9.4. Envasado

El colágeno liofilizado se envaso en frascos de vidrio de color ámbar y se almaceno a 4°C , ello con la finalidad de conservar las características y la calidad del colágeno por un tiempo más prolongado.

2.9.5. Procesos de caracterización

Peso de los individuos: la toma de datos del peso de los individuos se realizó con la ayuda de la balanza digital (AND EK-6100i).

Peso de la piel: la piel de cada individuo se pesó en la balanza digital (AND EK-6100i) y fue distribuido por igual para cada tratamiento.

Peso del colágeno: se pesó el colágeno liofilizado obtenido por cada tratamiento aplicado en la balanza analítica digital (OHAUS®).

Rendimiento: para los procesos de caracterización del colágeno extraído, se realizó el cálculo utilizando la ecuación propuesta por Shyni *et al.*, 2014.

Donde:

$$\text{Rendimiento en BH(\%)} = \left(\frac{\text{Peso del colágeno seco}}{\text{peso humedo de las pieles frescas}} \right) \times 100$$

BH= Base Húmeda.

Prueba de Electroforesis SDS – PAGE

Se realizó con un equipo para corrido de electroforesis Mini-PROTEAM Tetra cell (Bio-Rad) según el método de Liu *et al.*, 2014, en la cual se utilizó un gel concentrador de 4% y un gel de resolución de 7.5% , donde las muestras de colágeno liofilizados por el método acuoso y enzimático fueron diluidos en un medio alcalino con SDS al 1% (p/v) para tener una concentración final de 2mg/ml, luego se mezcló con un volumen igual de tampón de muestra (en el tampón de muestra se trabajó con β -

mercaptoetanol y sin β -mercaptoetanol en ambas muestras), para la muestra de colágeno patrón tipo I de diluyo 1mg en 1ml de ácido acético al 0.1 M, y la proteína estándar fue diluido a 30mg en 1ml de agua destilada, luego se cargaron 20 μ l de muestra en cada pocillo. Para el corrido de las bandas se trabajó con un voltaje de 65 V por 12 horas, cumplido el tiempo los geles se tiñeron con azul brillante de Cromassie G 250 al 0.1% (p/v) por 5 horas y luego se destiñe con una solución decolorante (a base a etanol de pureza de 96% y ácido acético de pureza al 99.8%) por 6 horas en agitación suave (Figura 6 Anexo).

Observación al microscopio Óptico

El colágeno liofilizado extraído por el método acuoso fue colocado 0.0001g de muestra en una lámina porta objeto y observado en microscopio (Olimpos) a40X, al igual que la muestra de colágeno liofilizado extraído por el método enzimático.

Prueba de proteínas totales

Las muestras de colágeno liofilizado extraídos por el método acuoso y enzimáticos fueron diluidos en ácido acético al 1M, en concentraciones de 1, 2.5, 5, 7.5 y 10% respectivamente, y se utilizó como referencia el colágeno patrón tipo I de piel de ternera a una concentración al 1%, la lectura se realizó en espectrofotómetro (Thermo scientific).

Viscosidad fraccional con variaciones de temperatura

Se determinó a partir de los cambios de viscosidad usando un viscosímetro (Digital Viscometer), las muestras liofilizadas extraídas por el método acuoso y enzimáticos se diluyeron 50mg (Figura 5 Anexo) en 50ml de ácido acético al 0.1M, obteniendo una concentración de las muestras al 0.1% de colágeno, estas muestras fueron preparadas a 5°C. Las muestras se trabajaron a: 5, 10, 20, 30, 40 y 50 °C, la temperatura se elevó progresivamente, en velocidad creciente y se mantuvo por 10 minutos en cada temperatura deseada para realizar la toma de datos. Se trabajó con un usillo N°1 y a una velocidad de 60 RPM.

Comparación de peso de colágeno liofilizado

Las muestras de colágeno liofilizados, fueron pesados y los datos recolectados se analizaron estadísticamente.

Análisis estadístico: los datos fueron expresados en valores promedios y desviación estándar, se aplicó el análisis de varianza para la comparación de promedios y la prueba Tukey en la contrastación de promedios. Tanto los análisis estadísticos y los gráficos fueron realizados utilizando el software Origin Pro 2020. Para las comparaciones estadísticas se tuvo en cuenta el nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

2.10. Consideraciones éticas y de rigor

El proyecto de tesis fue aprobado de acuerdo al cumplimiento con Constancia N° 04-2019-Unidad de Investigacion-FAC.CC.BB-ESC.CC.BB., e Informe N°030-2019/CE del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas.

III. RESULTADOS

Los peces de “tilapia” de peso corporal total (wt) en promedio fue $1084,41 \pm 265,23$ g, y el peso de piel en promedio fue $39,34 \pm 11,04$ g (Tabla 1). Se estableció la relación directa del peso de piel en función al peso corporal total, coeficiente de correlación en 95,16 y coeficiente de regresión en $\beta = 0,04 \pm 0,004$ g (Figura 1) y el peso promedio de colágeno liofilizado por el método acuoso fue $0,52 \pm 0,05$ g por 2,5 g de piel y por, el enzimático se obtuvo $0,57 \pm 0,05$ g por 2,5 g de piel (Figura 2), valores que al ser expresados en rendimiento corresponden al $20,43 \pm 1,84$ % para el colágeno soluble acuoso y el rendimiento de colágeno soluble con pepsina fue de $22,47 \pm 2,02$ %.

La cuantificación de proteínas totales de las muestras liofilizadas reveló una relación directa a la cantidad de proteínas totales en función de la concentración de colágeno, en los métodos ASC con pretratamiento con NaOH y ASC sin NaOH, así mismo con el método PSC con tratamiento con NaOH, en muestras liofilizadas de colágeno en concentraciones de 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 para cada método de extracción (Figura 3). La cantidad de proteínas totales en las muestras extraídas sin liofilizar, en el ASC sin NaOH fue de $3,24 \pm 0,24$ mg/ml, en el ASC con NaOH, $1,89 \pm 0,15$ mg/ml y en el PSC con NaOH fue $2,06 \pm 0,45$ mg/ml, diferencias significativas ($p < 0,005$) de la cantidad de proteínas con el método ASC sin NaOH comparada por los métodos ASC sin NaOH y PSC (Tabla 2, figura 4).

Las muestras liofilizadas fueron analizadas por electroforesis SDS-PAGE y los perfiles de bandas fueron similares en los métodos de extracción ASC y PSC y concordantes al colágeno tipo I de piel de ternera (Sigma), adquirido como patrón

referencial. Se observaron bandas típicas a las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, la cadena $\alpha 2$ en cantidad aproximada al doble de la cadena $\alpha 1$, así mismo fue evidente la cadena β (Figura 5).

Se evaluó la estabilidad térmica del colágeno de la piel de tilapia, calculándose mediante las curvas de desnaturalización térmica y la determinación de la viscosidad fraccional, siendo las máximas de desnaturalización a las temperaturas de 26,48°C para el colágeno obtenido por el método ASC y 21,01°C para el colágeno obtenido por PSC (Figura 6).

La estructura del colágeno vista al microscopio óptico reveló diferencias morfológicas entre el colágeno obtenido por el método ASC y el obtenido PSC. En el ASC se observó una textura fibrosa, con las microfibrillas más definidas que el PSC (Figura 7).

Tabla 1. Peso corporal total y peso de piel de *Oreochromis niloticus*

Individuos	Edad	Peso cuerpo	Peso piel
1	2	1017,30	39,50
2	2	1389,40	55,40
3	2	1221,50	49,30
4	2	758,90	25,90
5	2	803,40	26,80
6	2	756,90	25,30
7	2	1453,50	47,50
8	2	1180,60	42,80
9	2	1178,20	41,50
PROMEDIO		1084,41	39,33
DESVIACION ESTANDAR		265,23	11,04
COF.DE.CORREL			0,95

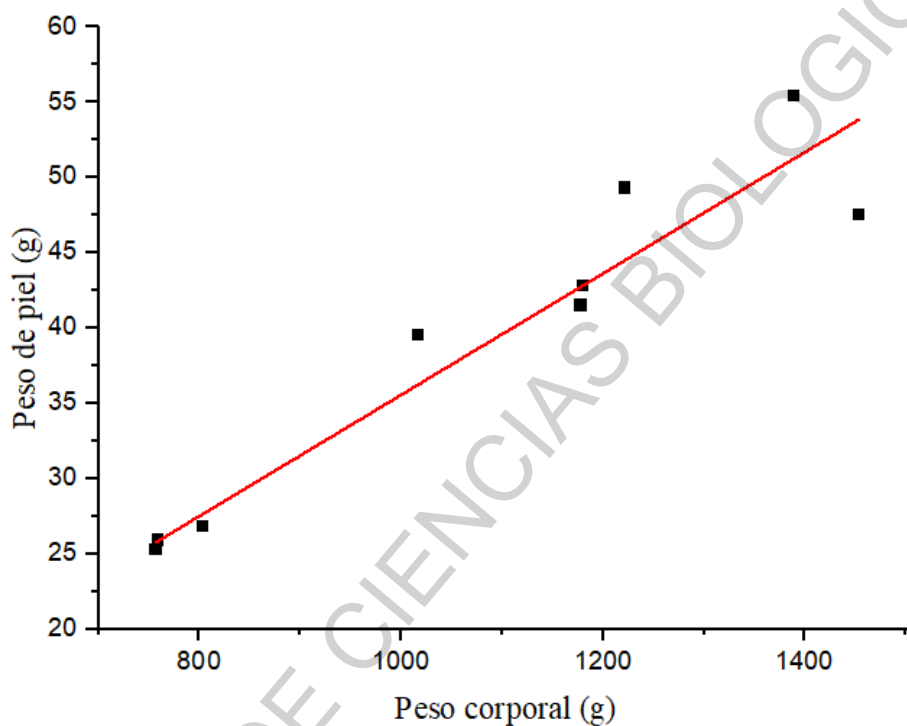


Figura 1. Relación del peso corporal total con el peso de piel de *Oreochromis niloticus*.

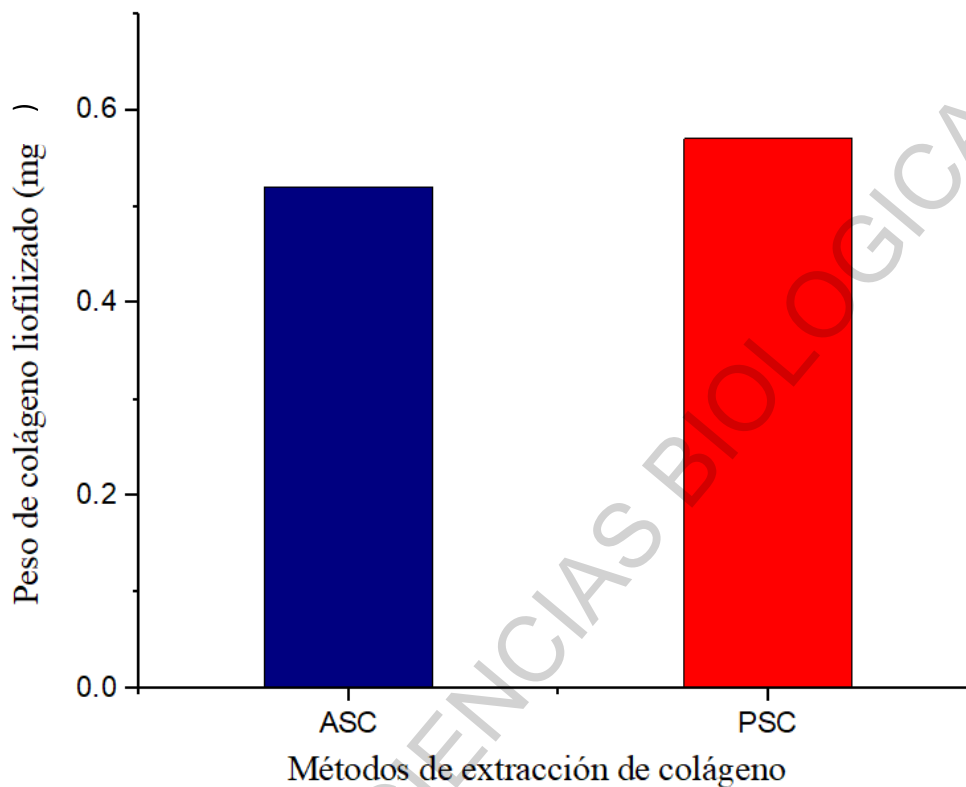


Figura 2. Peso de colágeno liofilizado de piel de *Oreochromis niloticus*, tilapia, obtenido por los métodos de extracción de colágeno acuoso (ASC) y colágeno soluble con pepsina (PSC), en ambos métodos el pretratamiento fue con NaOH.

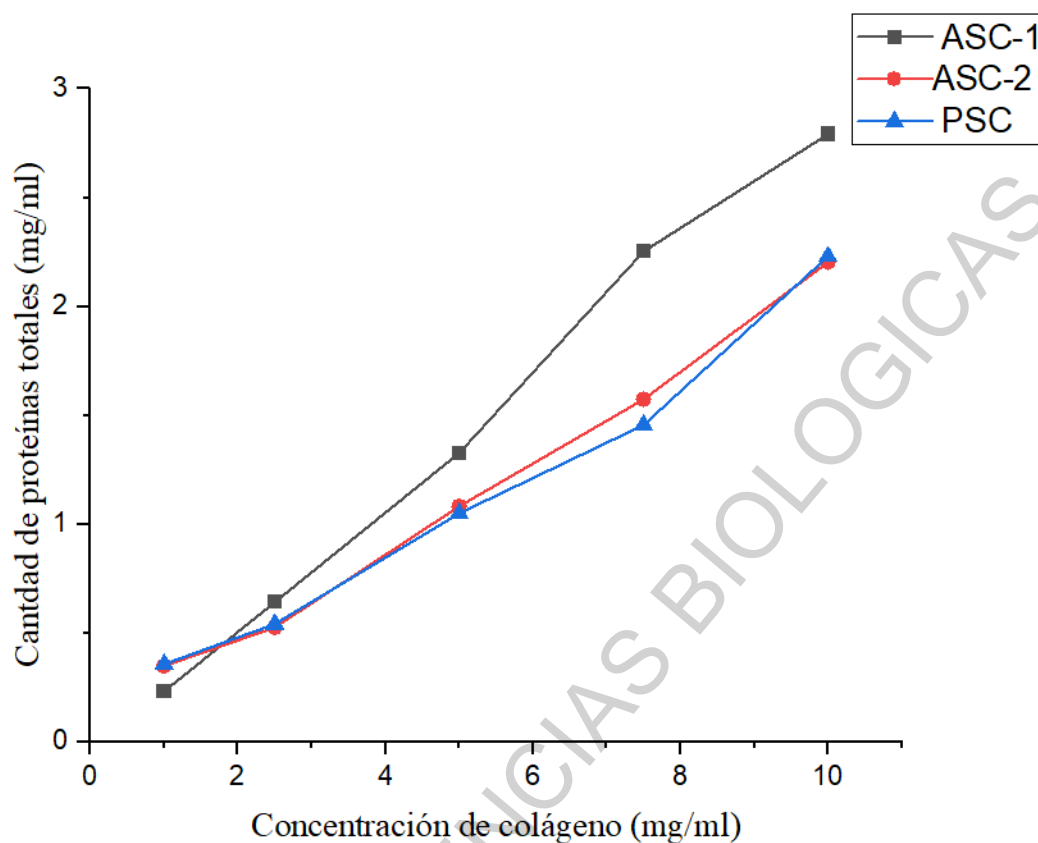


Figura 3. Variación de la cantidad de proteínas totales (mg/ml) en función de las concentraciones de colágeno liofilizado de piel de *Oreochromis niloticus*, tilapia, obtenido por los métodos de extracción acuosa y enzimática. ASC-1 con NaOH, ASC-2. Sin NaOH, PSC enzimático con NaOH.

Tabla 2. Cantidad de proteínas totales según los métodos de extracción de colágeno soluble en ácido (ASC) con pretratamiento con y sin NaOH y colágeno soluble en pepsina (PSC) con NaOH como pretratamiento.

Replicas	Métodos de extracción		
	ASC sin NaOH mg/ml	ASC con NaOH mg/ml	PSC con NaOH mg/ml
1	3,21	1,89	2,57
2	3,02	1,73	1,87
3	3,50	2,04	1,72
Promedio	3,24*	1,89	2,06
Desviación estándar	0,24	0,15	0,45

* $p < 0.005$, Diferencias significativas

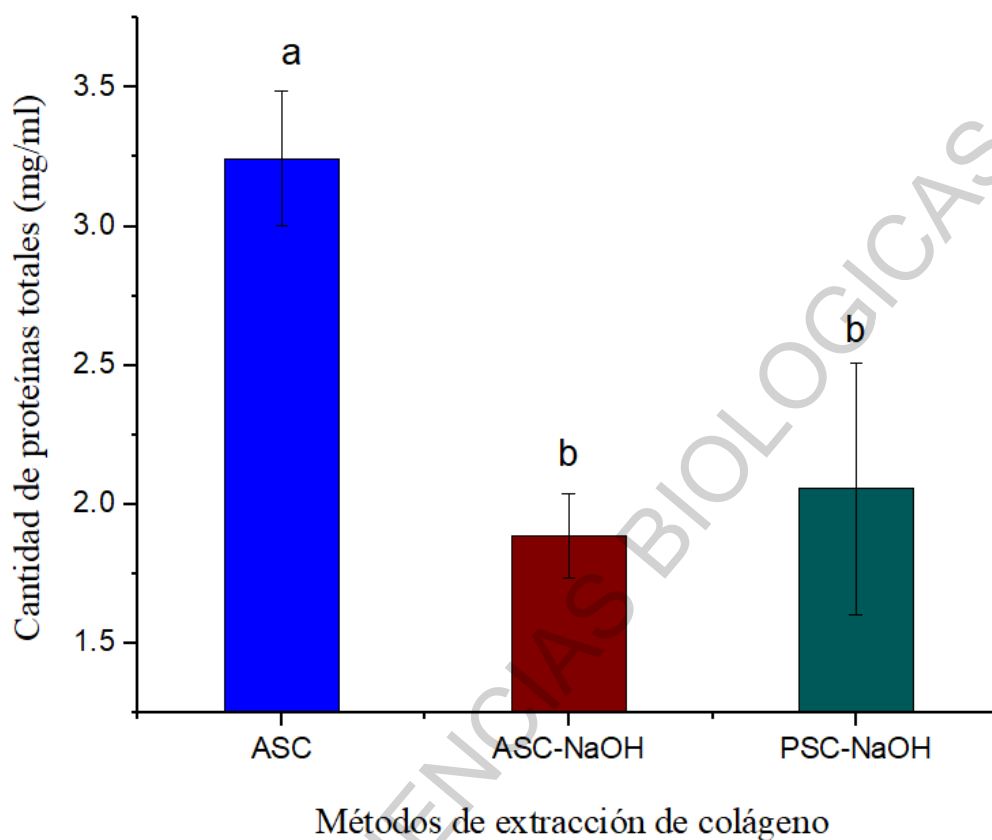


Figura 4. Cantidad de proteínas totales (mg/ml) según los métodos de extracción de colágeno soluble de piel de *Oreochromis niloticus*, tilapia. 1. (ASC) Proteínas totales sin el pretratamiento con NaOH, 2. ASC-NaOH pretratamiento con NaOH y 3. Colágeno soluble en pepsina (PSC)- pretratamiento con NaOH.

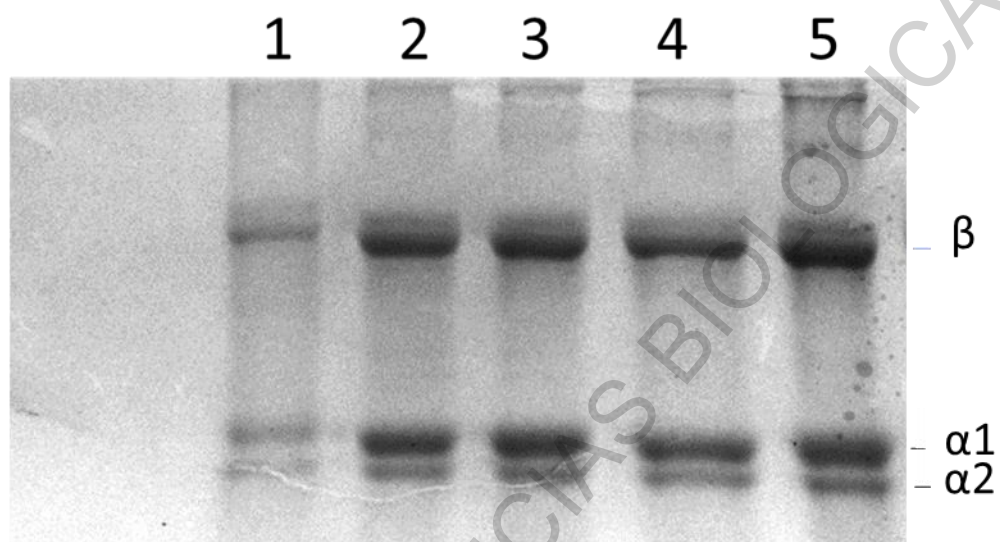


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE de colágeno de piel de tilapia extraído por los métodos acuoso (ASC) y enzimático (PSC). 1 ASC con β -mercaptoetanol (β -Me), 2. ASC sin β -Me, 3. PSC con β -Me, 4. PSC sin β -Me, 5. Colágeno tipo I de bovino (Sigma).

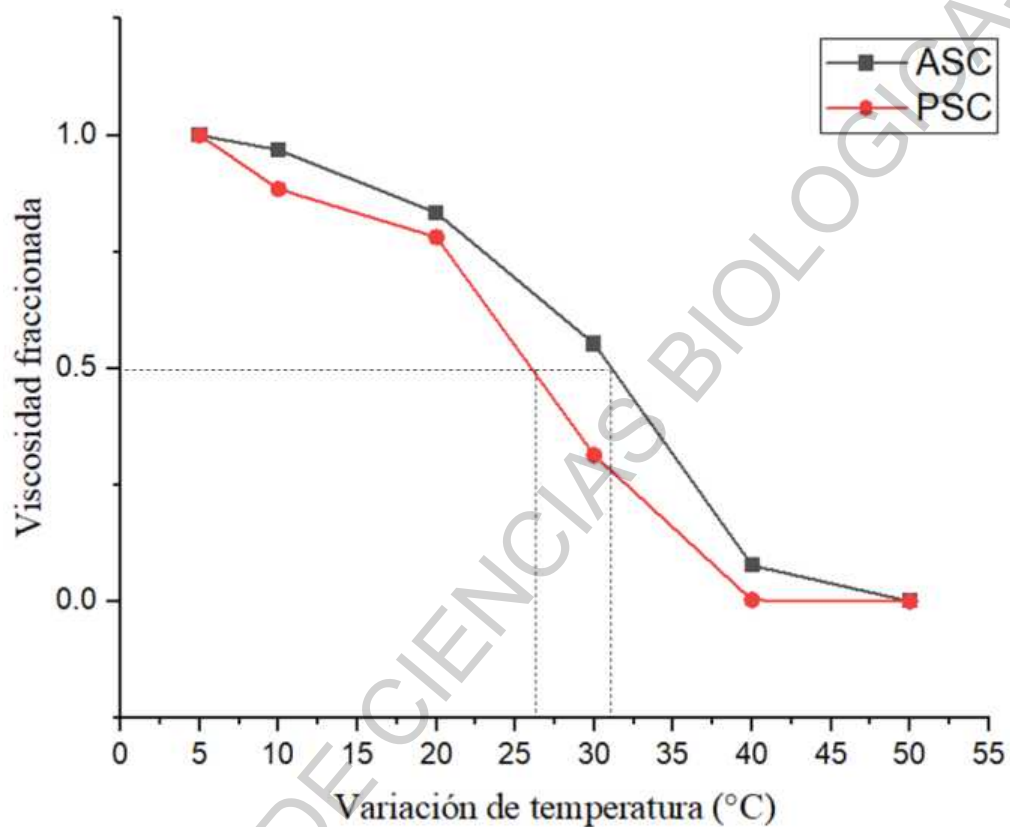


Figura 6. Curvas de desnaturalización térmica del colágeno de la piel de *Oreochromis niloticus*, tilapia, obtenidos por los métodos de extracción acuoso y enzimático.

ASC. Colágeno soluble en ácido, PSC. Colágeno soluble en pepsina.

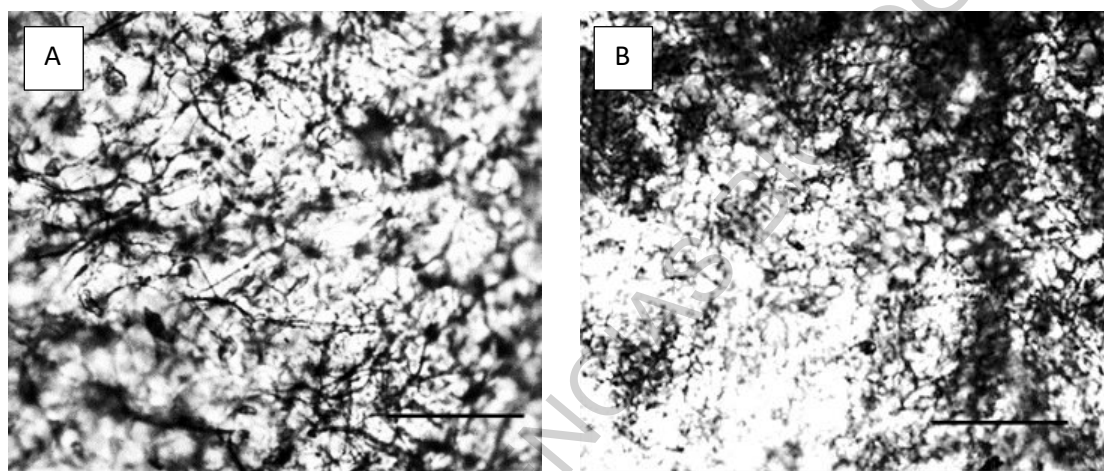


Figura 7. Estructura del colágeno vista al microscopio óptico 40X, barra 200 μm . A. Colágeno extraído por el método acuoso. B. Colágeno extraído por el método enzimático.

IV. DISCUSIÓN

En la presente investigación se ha tenido como materia prima la piel de *Oreochromis niloticus* “tilapia”, F1, del cruce de la línea roja con una línea gris, de individuos con el peso corporal promedio en 1084.41 g se obtuvo 39,34 g de piel y estableciendo la relación con la cantidad de colágeno obtenida a partir de 2,5 g de piel, se obtiene 9,94 g de colágeno liofilizado, con un rendimiento relativo de $20,43 \pm 1,84\%$, ligeramente menor que el rendimiento relativo al método PSC ($22,47 \pm 2,02\%$).

Valores similares fueron registrados por Li *et al.*, 2018 para tilapia, quienes reportaron 19,80% y 20,03% para el ASC y PSC, respectivamente, y valores menores (27,2 g/100 g) a lo reportado por Chen *et al.*, 2016. Según Zhang *et al.*, 2016, los porcentajes de rendimiento en esta investigación se encuentra en el rango del 22% al 29% para tilapia. Estas diferencias pueden deberse a las líneas genéticas distintas de los peces y/o a la suplementación de nutrientes particular en cada centro de crianza de tilapia. Así, por ejemplo, Shaw *et al.*, 2016, sostienen que la suplementación del ácido ascórbico produce estimulación en la síntesis de colágeno.

Investigaciones del rendimiento de colágeno en otras especies de peces, se cita el rendimiento de colágeno deshidratado en 7,11% de la piel de paiche (*Arapaima gigas*) (Barrenechea, 2019). En la anchoveta (*Engraulis ringens*) el rendimiento de colágeno fue reportado en 1% (Solari y Córdova, 2015). El rendimiento de colágeno soluble en ácido y solubilizados en pepsina se reportaron en 10,7% y 44,7% de la piel del pez globo ocelado (*Takifugu rubripes*), respectivamente (Nagai *et al.*,

2002). Matmaroh *et al.*, 2011, obtuvieron colágeno en rendimiento de 0,46 y 1,20 % por los métodos ASC y PSC de escamas del pez cabrito dorado (*Parupeneu sheptacanthus*), con aumento del rendimiento en 2,61 veces por el método PSC comparada con el método ASC. Entre otras publicaciones, se cita también mayor rendimiento de colágeno extraído por el método PSC que con el ASC, el rendimiento de colágeno extraído de la piel del pez *Mystus macropterus* fue de 16,8% y 28.0% por los métodos ASC y PSC (Zhang *et al.*, 2009).

Las pruebas metodológicas en la extracción de colágeno con los pretratamientos con y sin NaOH, dan cuenta de la variación de proteínas totales, esto es concordante con lo esperado, debido a la eliminación de proteínas no colágenas por acción de NaOH a concentraciones relativamente bajas (Liu *et al.*, 2014), por ser el NaOH un agente irritante y al entrar en contacto con las proteínas de los tejidos produce rompimiento por hidrolisis los enlaces peptídicos generando moléculas más pequeñas, y siendo las proteínas colágenas más resistentes, las proteínas hidrolizadas serían las no colágenas (Zeng *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014). Con el pretratamiento sin NaOH 0,1 M, se obtuvo de 3,24 mg/ml de proteínas totales y con NaOH en el pretratamiento, el resultado fue 1,89 mg/ml de proteínas totales, lo que significa que proteínas no colágenas aproximadamente, estaría en 1,35 mg/ml.

La presencia de dos bandas en el perfil SDS-PAGE de las muestras de colágeno extraído por los métodos acuoso y enzimático (pepsina) revela la presencia de colágeno de tipo I, concordante con el perfil de bandas del patrón referencial de colágeno tipo I de bovino (adquirido de Sigma). En las muestras de colágeno de “tilapia” se observó la banda de la cadena β , resultados concordantes con Sun *et al.*,

2017, la cadena $\alpha 1$ en doble cantidad que la cadena $\alpha 2$, siendo las bandas principales, cadenas β , $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Los tratamientos con y sin β -mercaptoetanol, no generan diferencias entre las muestras, lo que significa la baja cantidad de puentes disulfuro entre las cadenas α y β (Zhang *et al.*, 2009). Kimura y Ohno (1987) reportaron para los teleósteos, incluido tilapia, la presencia de una tercera cadena $\alpha 3$, sin embargo, en la investigación se manifiesta solo las bandas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, resultados similares a las investigaciones recientes (Chen *et al.*, 2016).

La acción enzimática con pepsina es liberar la región telopéptida de las cadenas de colágeno y debido a las concentraciones bajas de pepsina no afecta a la integridad de la estructura helicoidal triple (Shayegan *et al.*, 2016), por lo que, se asume que el papel de los telopéptidos tendría un papel predominantemente catalítico, más que en la formación estructural de fibrillas (Kuznetsova y Leikin 1999). Zhang *et al.*, 2016, revelaron la presencia de bandas menores en los geles SDS-PAGE en el tratamiento enzimático con pepsina.

En la presente investigación, la muestra fue diluida en ácido acético y SDS, que crean diferencias en la presencia de bandas menores, no obstante, aun cuando se presentan bandas menores en las muestras diluidas en ácido acético, no diferencia de los métodos de extracción ASC o PSC. Nalinanon *et al.*, 2007, observaron intensidades ligeramente inferiores de las bandas de las cadenas β y α del colágeno extraído utilizando pepsina que, en el colágeno solubilizado en ácido, lo que sostuvieron la escisión de pequeñas porciones de péptidos, que explicaría el rendimiento mayor de colágeno en el tratamiento con pepsina. Será necesario

mayores investigaciones al respecto, variando las concentraciones de pepsina durante el proceso extractivo de colágeno en tilapia u otras especies.

Los métodos de extracción definitivamente crean diferencias en la cantidad y calidad de colágeno, esto manifiesto por las diferencias en la morfología de la estructura de la superficie del colágeno liofilizado, observado al microscopio óptico. En la extracción acuosa, la apariencia del entramado de microfibrillas es evidentemente más definido. La digestión enzimática con pepsina, además de la eliminación de telopéptidos, debe haber generado péptidos de bajo tamaño, entremezclados con microfibrillas no digeridas. Las imágenes vistas al microscopio electrónico de barrido, de muestras de colágeno liofilizadas de *O. niloticus*, mostraron una apariencia compleja de malla fibrosa y porosa con mayor definición en la extracción acuosa que en el enzimático (Sun *et al.*, 2017).

Entre las aplicaciones del colágeno de tilapia, Li *et al.*, 2018, construyeron andamios de matriz de colágeno extraído por pepsina y se compararon con los andamios de colágeno bovino y las observaciones a microscopía electrónica de barrido, el andamio auto ensamblado con colágeno de “tilapia” presentó una estructura porosa compuesta de redes de láminas de tamaños regulares y definidas en comparación con la presencia de redes pequeñas en las muestras de colágeno de bovino. Preparaciones de electrohilado de microestructuras de colágenos de tilapia a diferentes concentraciones mostraron variaciones en el diámetro de microfibrillas, evaluadas al microscopio óptico, variaciones, que dependerá en gran medida de los métodos de extracción de colágeno (Bi *et al.*, 2019).

El grado de estabilidad del colágeno por efecto de las variaciones de temperatura es determinado a través de las mediciones de la viscosidad de la solución acuosa, considerando la temperatura de desnaturalización cuando los cambios de viscosidad fraccional alcanzaron el valor 0,5 (Li *et al.*, 2018). La estabilidad térmica es una de las propiedades importantes para las aplicaciones en productos naturales, que probablemente tiene relación la estabilidad térmica con la cantidad de hidroxiprolina (Radmed y Klein, 2006; Ahmed *et al.*, 2019). La desnaturalización del colágeno por el ASC se encontró en 32,18°C, superior a la obtenido por el PSC. Esta tendencia fue encontrada también por Li *et al.*, 2018 para “tilapia” (*O. niloticus*), pero en los valores de 34,5°C para ASC y 30,0°C para PSC. Los valores de desnaturalización en otras especies de peces se reportaron en 32,1 °C en *Mystus macropterus* (Zhang *et al.*, 2009), en 30 °C en el colágeno de piel de caballa (*Acomber japonicus*) (Asaduzzaman *et al.*, 2019).

El colágeno de la piel de tilapia está en ventaja comparada con el colágeno de otras especies de peces, debido a que se puede cultivar en condiciones limpias, libre de hormonas, al utilizar la tecnología YY para obtener poblaciones genéticamente machos y con la aplicación de las buenas prácticas de cultivo y a gran escala, y por la resistencia a los cambios climáticos. Por lo que, el colágeno de la piel de tilapia constituye un potencial para aplicaciones biomédicas, elaboración de productos farmacéuticos y cosméticos.

V. CONCLUSIONES

- Los colágenos obtenidos por ambos métodos son colágeno tipo I, de acuerdo al análisis realizado por electroforesis SDS-PAGE se revelaron dos bandas α indicando la presencia de colágeno de tipo I, concordante con el perfil de bandas del patrón referencial de colágeno tipo I de bovino.
- El rendimiento de colágeno tipo I obtenido fue ligeramente mayor con el método de extracción enzimático con pepsina (PSC) que con el acuoso (ASC), sin diferencias significativas.
- De acuerdo a los pretratamientos con y sin NaOH, se observó la variación de proteínas totales, debido a la eliminación de proteínas no colágenas por acción de NaOH en el ASC.
- De acuerdo a los métodos de extracción se presentan diferencias en la calidad de colágeno, mayor estabilidad en el ASC y mayor conservación del tamaño y estructura de microfilamentos del colágeno, que tendrían aplicaciones probablemente distintas en la industria farmacéutica.

VI. RECONOCIMIENTO

El trabajo de investigación fue financiado por el proyecto: Contrato 123-FONDECYT-BM-IADT/AV – Universidad Nacional de Trujillo, bajo la responsabilidad de la docente de la UNT: Zulita Adriana Prieto Lara, en calidad de investigador principal.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahmed, R., Haq, M., Chun, B.S. (2019). Characterization of marine derived collagen extracted from the by-products of bigeye tuna (*Thunnusobesus*). International Journal of Biological Macromolecules. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.213
- Asaduzzaman, A. K. M., Tilahun Getachew, A., Cho, Y.J., Park, J.S., Haq, M., Chun, B.S. (2019). Characterization of pepsin-solubilised collagen recovered from mackerel (*Scomberjaponicus*) bone and skin using subcritical water hydrolysis. International Journal of Biological Macromolecules. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.104
- Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A., Hara, K. (2008). Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. Food Chemistry, 108(1): 49–54.
- Barrenechea, C. E. J. (2019). “Aprovechamiento de la piel de paiche (*Arapaima gigas*) para la obtención de colágeno”. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Beltrán, R. J. (2011). Valoración de la innovación tecnológica del proceso de obtención de colágeno a partir de piel de tilapia (*Oreochromis sp*) para su aplicación en el mercado cosmético (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Bhuimbar, M. V., Bhagwat, P. K., Dandge, P. B. (2019). Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film. Journal of Environmental Chemical Engineering. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102983>

- Bi, I., Li, X., Xin, Q., Ha, W., Shi, C., Guo, R., Shi, W., Qiao, R. Wang, X., Zhong, J. (2019). Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(2):234-240.
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., Hong, B. (2016). Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT - Food Science and Technology*, 66: 453–459.
- De Moraes, M.C, Cunha, R. L. (2013). Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperatura and ph values. *Food Research International*, 50(1): 213-223.
- Dias, M. T. P. M., Bilhar, A. P. M., Rios, L. C., Costa, B. A., Júnior, E. M. L., Alves, A. P. N. N., Bruno, Z. V., Filho, M. O. M., Bezerra, L. R. P. S. (2019). Neovaginoplasty using Nile Tilapia Fish Skin as a new biological graft in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*.Doi.org/10.1016/j.jmig.2019.09.779
- Gómez-Guillén, M., Turnay, J., Fernández-Díaz, M., Ulmo, N., Lizarbe, M., Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16(1): 25–34.
- Gómez-Lizárraga K., Piña-Barba C., Rodríguez-Fuentes N. (2011). Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. *Superficies y Vacío*, 24(4): 137-140.
- González, S. R., Vidal, del R. M. M. (2018). Piel de cíclidos en las quemaduras: perspectivas en la Medicina. *UNIANDES CiencSalud*, 1(1):38-52.

- Henriksen, K., Karsdal, M. A. (2016). Type I Collagen. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*, 1–11.
- Holguín, P. P. M., Tristancho, R. J. L., Peña, B. D. Y. (2015). Determinación de la resistencia a la corrosión de los biomateriales Ti6Al4V y 316L, mediante análisis gravimétrico. *Scientia et Technica*, 20(2): 113-118.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32(3-5): 199–204.
- Kimura, S., Ohno, Y. (1987). Fish type I collagen: tissue-specific existence of two molecular forms, and $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 3$, in Alaska pollack. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 88(2): 409–413.
- Kuznetsova, N., Leikin, S. (1999). Does the Triple Helical Domain of Type I Collagen Encode Molecular Recognition and Fiber Assembly while Telopeptides Serve as Catalytic Domains? *Journal of Biological Chemistry*, 274(51): 36083–36088.
- Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S., Wu, W. (2018). Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry*, 74: 156-163.
- Lima-Junior E.M., Sarto P. N., Borges de M. M.J., Correia R.W.L., Negreiros N., Ferreira, Parente, MoraesF. (2017). Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. *Bras Queimaduras*, 16(1):10-7.

- Liu, D., Wei, G., Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J. M., Zhou, P. (2014). Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharynx godonidella*) skin. *Food Chemistry*, 172: 836–843.
- Liu, H., Huang, K., (2014). Structural Characteristics of Extracted Collagen from Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Bone: Effects of Ethylenediaminetetraacetic Acid Solution and Hydrochloric Acid Treatment. *International Journal of Food Properties*, 19(1): 63–75.
- Lleren, D. T. E., Rodríguez, T. W. P. (2017). Obtención y caracterización de un hidrolizado de colágeno purificado producido mediante el uso de la enzima delvolase. *Anales Científicos*, 78 (2): 251 -259.
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A. B., Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129(3): 1179–1186.
- Mienaltowski, M. J., Birk, D. E. (2013). Structure, Physiology, and Biochemistry of Collagens. *Progress in Heritable Soft Connective Tissue. Diseases, Advances in Experimental Medica and Biology*, Editorial Springer, Dordrecht, 5–29.
- Minh Thuy, L. T., Okazaki, E., Osako, K. (2014). Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chemistry*, 149: 264–270.
- Nagai, T., Araki, Y., Suzuki, N. (2002). Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifuguru bripes*). *Food Chemistry*, 78(2): 173–177.

- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. (2007). Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104(2):593–601
- Negreiros, N. A. A. P., Quezado, L.V. M. E., Ferreira, J. E. C., Barros S. V. P. F., PinheiroF. V.,Lima, J. E. M., Borges de M. M. J., De Moraes F. M. (2015). Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. *Bras Queimaduras*,14(3):203-10.
- Pati, F., Adhikari, B., Dhara, S. (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 101(10): 3737–3742
- Quintero, J., Zapata, J. E. (2017). Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta. *Optimización de la Extracción*, 28(1):109-120.
- Radmer, R. J., Klein, T. E. (2006). Triple Helical Structure and Stabilization of Collagen-like Molecules with 4(R)-Hydroxyproline in the Xaa Position. *Biophysical Journal*, 90(2): 578–588.
- Saenz, S. N. (2017). Obtención de material colagenoso de escamas de pescado y su esterilización con radiación gamma (Tesis de Pregrado). Universidad Autonoma del Estado de Mexico. Mexico.
- Seal, B. L., Otero, T. C., Painitch, A. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 34(4-5): 147–230.

- Serrano, G. J. C. (2011). Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis* sp) y cachama (*Piaractus brachypomus*) (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Shaw, G., Lee-Barthel, A., Ross, M. L., Wang, B., Baar, K. (2016). Vitamin C-enriched gelatin supplementation before intermittent activity augments collagen synthesis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(1): 136–143.
- Shayegan, M., Altindal, T., Kiefl, E., Forde, N. R. (2016). Intact Telopeptides Enhance Interactions between Collagens. *Biophysical Journal*, 111(11): 2404–2416.
- Shi, C., Bi, C., Ding, M., Xie, J., Xu, C., Qiao, R., Zhong, J. (2019). Polymorphism and stability of nanostructures of three types of collagens from bovine flexor tendon, rat tail, and tilapia skin. *Food Hydrocolloids*, 93: 253-260.
- Shyni, K., Hema, G. S., Ninan, G., Mathew, S., Joshy, C. G., Lakshmanan, P. T. (2014). Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeorohita*). *Food Hydrocolloids*, 39: 68–76.
- Silver, F.H., Jaffe, M., Shah, R.G. (2018). Structure and behavior of collagen fibers. *Handbook of Properties of Textile and Technical Fibres*, 345-365.
- Solari, A., Córdova J. S. (2015). Extracción de colágeno proveniente de residuos del procesamiento de *Engraulis ringens* “anchoveta”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Ciencia e Investigación* 2015, 18(2): 65-68.

- Sun, L., Hou, H., Li, B., Zhang, Y., (2017). Characterization of acid- and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). International Journal of Biological Macromolecules, 99:8–14.
- Torra, JE., Casaroli, RP, Martines, F., Reina, M., Soldevilla, J. y Vilaró, S. (2000). El uso del colágeno en la cicatrización de las heridas. RolEnf, 23(10): 715-722.
- Zeng, S., Zhang, C., Lin, H., Yang, P., Hong, P., Jiang, Z. (2009). Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Food Chemistry, 116(4): 879–883.
- Zhang, J., Duan, R., Tian, Y., Konno, K. (2009). Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Food Chemistry, 116(1): 318–322.
- Zhang, M., Liu, W., Li, G. (2009). Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefinlongbarbel catfish (*Mystus macropterus*). Food Chemistry, 115(3): 826–831.
- Zhang, J., Jeevithan, E., Bao, B., Wang, S., Gao, K., Zhang, C., Wu, W. (2016). Structural characterization, in-vivo acute systemic toxicity assessment and in-vitro intestinal absorption properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin acid and pepsin solublilized type I collagen. Process Biochemistry, 51(12): 2017–202

ANEXO



Figura 1. Anexo. Toma de datos, de longitud y peso de los peces *Oreochromis niloticus* “tilapia”



Figura 2. Anexo. Esquema del proceso para la obtención de la piel para la extracción del colágeno.

Tabla 1. Anexo. Métodos aplicados para la obtención del colágeno

PROCESO	ACUOSO	ACUOSO	ENZIMATICO
Tipo de piel de tilapia (Oreochromis niloticus)	F1 (Híbrida)	F1 (Híbrida)	F1 (Híbrida)
Edad de los peces	2 años	2 años	2 años
Pretratamiento	Piel fresca y cortada a $1 \pm 0,2$ cm	Piel fresca y cortada a $1 \pm 0,2$ cm	Piel fresca y cortada a $1 \pm 0,2$ cm
	NaOH 0,1M, 24h 1;20 (p/v)	NaOH 0,1M, 24h 1;20 (p/v)
	Butanol 10%, 24 h	Butanol 10%, 24 h	Butanol 10%, 24 h
Tratamiento de extracción	Ácido acético 0,5M, 24h 1:20(p/v)	Ácido acético 0,5M, 24h 1:20(p/v)	Ácido acético 0,5M, 24h 1:20(p/v) + pepsina al 0,1% (p/v) 48h
Filtrado	Al vacío con papel Whatman N°4	Al vacío con papel Whatman N°4	Al vacío con papel Whatman N°4
Secado	Liofilización	Liofilización	Liofilización
Almacenaje	En frasco de vidrio ambar	En frasco de vidrio ambar	En frasco de vidrio ambar

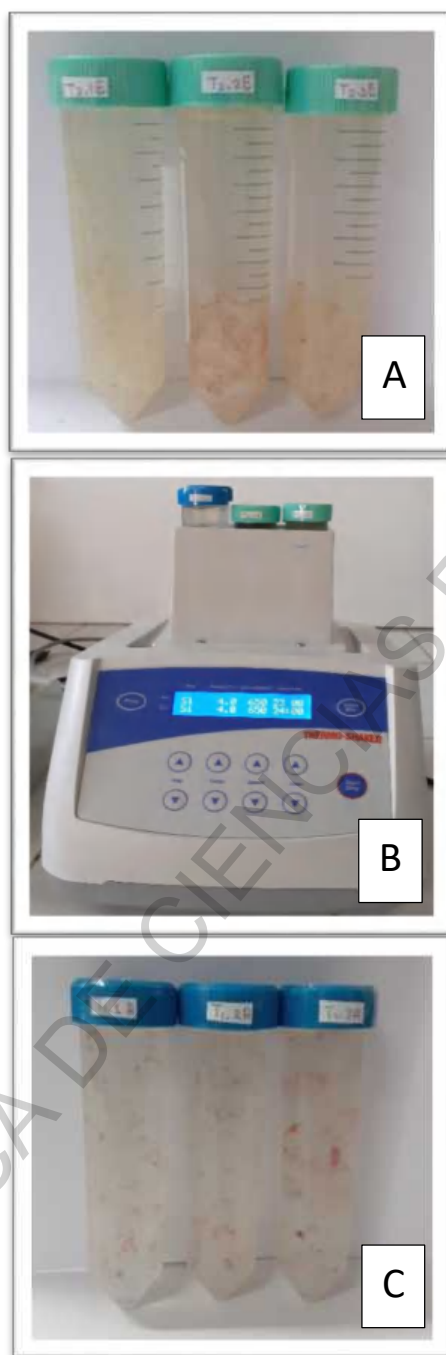


Figura 3. Anexo. A. Piel de *Oreochromis niloticus* en medio ácido acético con pepsina (método enzimático). B. Muestras en Thermo Shaker por el método enzimático. C. Piel de *Oreochromis niloticus* en medio ácido acético (método acuso).



Figura 4. Anexo. A. Proceso de filtrado del colágeno soluble al vacío. B. Colágeno filtrado. C. Colágeno en proceso de liofilización. D. Colágeno liofilizado.



Figura 5. Anexo. Pesado de colágeno liofilizado para la toma de datos y las caracterizaciones.

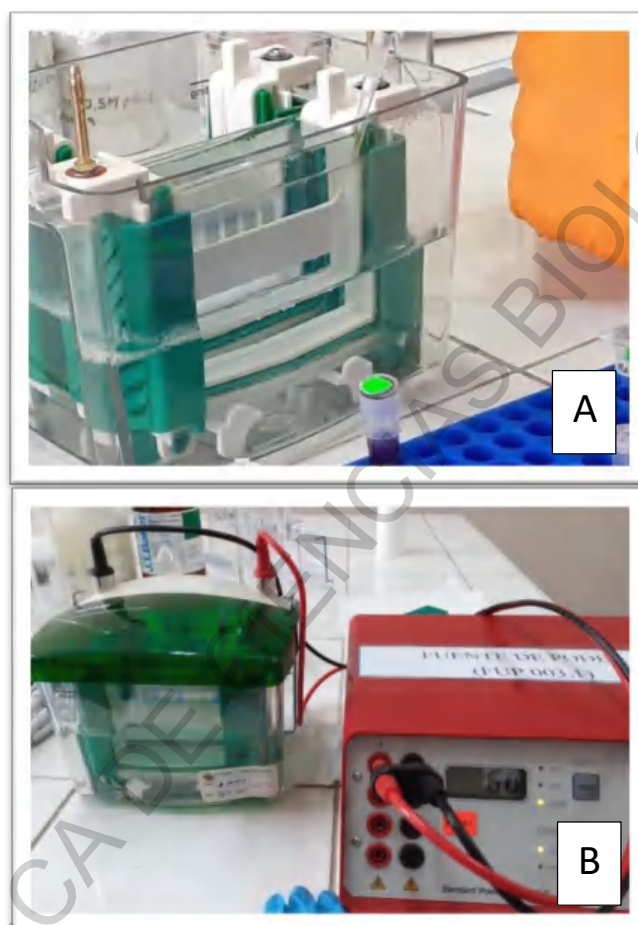


Figura 6. Anexo. A. Colocación de las muestras para el corrido electroforético. B.

Proceso de electroforesis.

Tabla 2. Anexo. Descripción de equipos y materiales

Equipos		Característica
THERMO-SHAKER	TSI-100	Calibración a temperatura de 4°C, y en agitación de 600 RPM
Liofilizador	LABCONDO	-----
Microscopio óptico	Olimpus	-----
Balanza analítica digital	OHAUS	-----
Balanza digital	AND EK-6100i	-----
Nanodrop	Thermo scientific	Tipo de prueba BSA
Refrigeradora	Samsung	A T° de 4°C
Refrigeradora	ARCTIKO	A T° de -80°C
pH- Metro	Thermo scientific	-----
Equipo al vacío	MILLIPORE	-----
Viscosímetro	Digital Viscosímetro	-----
Fuente madre	Biometra	Calibración a 60 RPM y usillo n° 1
Equipo de electroforesis	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	A 120V

Tabla 3. Anexo. Descripción de materiales

Materiales de vidrio	Marca
Probetas (10, 100, 500 y 1000 ml)	BRANDETERNA
Fiola 100 ml	PIREX ®
Placas de vidrio Petri	PIREX ®
Vasos de precipitación (50, 100, 500, 1000ml)	PIREX ®
Lamina porta objeto	SLIDES
Lamina cubre objeto	Deckgläser
Matraz Erlenmeyer de 250ml	PIREX ®
Frascos de vidrio (100, 200, 250 y 300ml)	T.C.W.C.O
Micro-pipetas	AXYPET

Tabla 4. Anexo. Otros materiales

Materiales	
Papel Watman N° 4	Tablas de picar
Tubos de centrifugación	Tubos Falkon
Bisturí	Bolsas herméticas
Papel toalla	Bolsas de basura
Cuchillo fileteador	Tijeras
Secadores de cocina	Tinas de plástico
Guantes	Mascarilla
Plumón marcador artesco	Parafil
Colador	Gorro
Mandil plastificado	Guardapolvo
Botas de plástico	Red de pescar
Gradillas	Chinchorro

Tabla 5. Anexo. Descripción de reactivos

Reactivos	Marca
Hidróxido de sodio	MERCK
Butanol	MERCK
Ácido acético	SIGMA
Tris Base, Molecular Biology Grade	Promega
SodiumDodecyl Sulfate SDS	Invitrogen™
CromassieBrilliant blue G 250	Merck
2-Mercapto-ethanol	MERCK
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	MERCK
Ammonium peroxodisulfate	MERCK
Acrylamide	MERCK
Glycerol, Anhydrous	SIGMA
Glycine	SIGMA
N.N'- Methylene-diacrylamide	SIGMA
Bromophenol Blue	SIGMA
Pepsinfromporcinegastric mucosa	SIGMA
Collagen from calf skin, TYPE I	SIGMA
BovineSerumAlbumin	SIGMA
Protein Standard	



RECTORADO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

DECLARACIÓN JURADA

Los AUTORES suscritos en el presente documento DECLARAMOS BAJO JURAMENTO que somos los responsables legales de la calidad y originalidad del contenido del Proyecto de Investigación Científica, así como, del Informe de la Investigación Científica realizado.

TITULO: Extracción de colágeno tipo I de piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*) por los métodos ácidos y enzimático.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA		INFORME FINAL DE INVESTIGACION CIENTÍFICA	
PROY DE TRABAJO DE INVESTIGACION (PREGRADO)	()	TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (PREGRADO)	(X)
PROYECTO DE TESIS PREGRADO	()	TESIS PREGRADO	()
PROYECTO DE TESIS MAESTRIA	()	TESIS MAESTRÍA	()
PROYECTO DE TESIS DOCTORADO	()	TESIS DOCTORADO	()

Equipo Investigador Integrado por:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES	FACULTAD	DEP. ACADÉMICO	CATEGORIA DOCENTE ASESOR	CÓDIGO Docente asesor Numero Matricula del estudiante	Auto. Coautor asesor
1	Reátegui Priado, Nataly Yohayra	CC-BB	CC-BB	Tesisista	1050402113	Auto
2	Piñelo Lara, Zulita Stéfania	CC-BB	CC-BB	Asesor	2332	Asesor

Trujillo 23 de diciembre de 2019.

FIRMA

DNI

FIRMA

DNI

FIRMA

DNI

FIRMA

DNI

Este formato debe ser llenado, firmado, adjuntado al final del documento del PIC, del Informe de Tesis, Trabajo de Investigación respectivamente





RECTORADO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN REPOSITORIO DIGITAL RENATI-SUNEDU

Trujillo 27 de diciembre de 2019

Los autores suscritos del INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Titulado: Extracción de Colágeno tipo I a partir de tilapia (*Oreochromis niloticus*) por los métodos acuosos y enzimático.

AUTORIZAMOS SU PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL, REPOSITORIO RENATI-SUNEDU, ALICIA-CONCYTEC, CON EL SIGUIENTE TIPO DE ACCESO:

- A. Acceso Abierto:
- B. Acceso Restringido (datos del autor y resumen del trabajo)
- C. No autorizo su Publicación

Si eligió la opción restringido o NO autoriza su publicación sírvase justificar: Se publicará en una revista científica

ESTUDIANTES DE PREGRADO: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN TESIS
 ESTUDIANTES DE POSTGRADO: TESIS MAESTRÍA TESIS DOCTORADO
 DOCENTES: INFORME DE INVESTIGACIÓN OTROS
 El equipo investigador Integrado por:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES	FACULTAD	CONDICIÓN (NOMBRADO, CONTRATADO, EMÉRITO, estudiante, OTROS)	CÓDIGO Docente (Número Matricula del estudiante)	Autor Coautor asesor
1	Pedro Pinedo, Malah Yampira	CC-GB	CC-GB	103040213	Autor
2	Prieto Lara, Zulio Adriana	CC-GB	CC-GB	2332	Asesor

FIRMA

DNI 72756659

FIRMA

DNI 17898937

FIRMA

DNI

FIRMA

DNI

*Este formato debe ser llenado, firmado y adjuntado en el Informe de Tesis y/o Trabajo de Investigación respectivamente
 *Este formato en el caso de Informe de investigación científica docente debe ser llenado, firmado, escaneado y adjuntado en el sistema de www.picfedu.untriu.edu.pe

