



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL  
COLÁGENO EXTRAÍDO EN MEDIO ÁCIDO DE LA PIEL DE LA COLA DE  
ATÚN (*Thunnus atlanticus*)**

**ANA MAIGUALIDA CHACÓN MARTÍNEZ**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE *MAGISTER SCIENTIARIUM* EN QUÍMICA**

**CUMANÁ, 2018**

**EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL  
COLÁGENO EXTRAÍDO EN MEDIO ÁCIDO DE LA PIEL DE LA COLA DE  
ATÚN (*Thunnus atlanticus*)**

**APROBADO POR:**

Shailini M. Moreno M.  
**Tutor**

  
**Jurado Principal**

  
**Jurado Principal**

## INDICE

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
LISTA DE FIGURAS .....	IV
RESUMEN .....	VII
INTRODUCCIÓN .....	1
Proteínas.....	1
Colágeno .....	5
Síntesis de Colágeno .....	8
Clases y familias de colágeno .....	9
Usos y aplicaciones.....	12
Fuentes de obtención .....	14
Atunes: Recursos pesqueros .....	15
METODOLOGÍA .....	17
Tratamiento de Muestra .....	17
Extracción .....	17
Purificación .....	18
Hidrólisis del colágeno .....	18
CARACTERIZACIÓN.....	18
Determinación de humedad .....	18
Determinación de pH.....	18
Cromatografía de papel.....	19
Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN- <sup>1</sup> H).....	19

Espectrometría de emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES)	20
Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF)	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
Extracción de colágeno de la piel de la cola de atún ( <i>Thunnus atlanticus</i> ) en medio ácido	22
Determinación de humedad	25
Análisis de algunos elementos presentes en el colágeno cualitativo por Espectroscopía de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES)	26
Análisis cuantitativo de plomo (Pb) por ICP-OES	33
Determinación de pH	34
Análisis de RMN- <sup>1</sup> H	35
Análisis por Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF)	45
Cromatografía de papel	55
CONCLUSIONES	57
RECOMENDACIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	60
HOJAS DE METADATOS	67

## DEDICATORIA

**A:**

*MI MADRE, MARÍA MARTÍNEZ Y  
HERMANO, CARLOS CHACÓN.*

## AGRADECIMIENTOS

A:

Dios, por guiarme cada día y hacerme ver que en las dificultades no hay oscuridad sino claridad.

Mis hijos **VICTOR DAVID** y **CARLOS SAMUEL**, por darme la fuerza para levantarme y no dejarme vencer, son la luz de mi vida.

Toda la familia **CHACÓN**, mi fuente de energía permanente.

Departamento de Química y la Coordinación del Postgrado de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, por tan valiosa oportunidad.

Las asesoras Dras. MajMostue y Shailili Moreno por depositar su confianza en mí y darme los lineamientos para llevar a cabo con éxito este proyecto de investigación.

La profesora Dra. Blanca Rojas y al Dr. José L. Prin del IIBCA, por su apoyo en la realización de los análisis de Infrarrojo e ICP-OES.

Licenciada Ligia Llovera, *M. Sc.* por su colaboración para obtener los espectros de RMN y al profesor Willian Henríquez, *Sc.D.*, por su ayuda en el análisis de los mismos.

Todas aquellas personas que de una u otra forma estuvieron a mi lado y contribuyeron a alcanzar este logro, Dios les premie con muchas bendiciones.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de Aminoácidos (Whitford, 2005).....	2
Tabla 2. Tipos de colágeno .....	10
Tabla 3. Determinación del porcentaje de humedad y de materia seca del colágeno de la piel de la cola <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 1,5% v/v. ....	25
Tabla 4. Determinación del porcentaje de humedad y de materia seca de colágeno de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 5,0% v/v.....	26
Tabla 5. Análisis cualitativo de varios elementos del colágeno de la piel de la cola de atún ( <i>T. atlanticus</i> ) en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v por ICP-OES. ....	28
Tabla 6. Análisis cuantitativo de plomo por ICP-OES en los extractos colagénicos solubles en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v .....	33
Tabla 7. pH de los extractos colagénicos de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> solubles en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v .....	35
Tabla 8. Regiones estándar del espectro infrarrojo de colágeno de la piel en peces ..... (Barraza, <i>et al.</i> , 2013 y Lee <i>et al.</i> , 2016) .....	46
Tabla 9. Efecto de la temperatura y el contenido de humedad del colágeno soluble en ácido acético 1,5% v/v .....	54
Tabla 10. Comparación de los R <sub>f</sub> de los aminoácidos patrones y de los colágenos .....	56

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a) Glicina; b) Lisina, aminoácido básico y c) Cisteína, aminoácido con azufre.	3
Figura 2. Niveles de organización estructural de las proteínas (Mathews y Van Holden, 2002).	4
Figura 3. Interacciones de hidrógeno de la $\alpha$ -hélice (Gelse & Pöschl, 2003).	5
Figura 4. Estructura del colágeno. a). Estructura secundaria helicoidal levógira con tres residuos por vuelta. Secuencia repetitiva Gly-Pro-Hyp. b y c). Tres hélices se enrollan entre sí de forma dextrógira (tropocolágeno). d y e). Separación entre las moléculas de colágeno. f). fibrillas (Murray <i>et al.</i> , 1998).	6
Figura 5. Transformación de prolina a hidroxiprolina (Elaine, 2008).	7
Figura 6. Enlaces covalente entre residuos de Lisina de una fibra colagénica (Cox y Nelson, 2007).	7
Figura 7. Síntesis del colágeno (Mathews y Van Holden, 2002).	8
Figura 8. a). Micrografía del colágeno de la piel (tipo I); b). Micrografía del Colágeno del tejido hialino (tipo II).	11
Figura 9. Diferentes usos del colágeno: a). Cápsulas blandas b) Mascarilla de colágeno y c) Colágeno hidrolizado.	13
Figura 10. Atún ( <i>Thunnus atlanticus</i> ).	16
Figura 11. Curva de calibración de Pb por ICP-OES	21
Figura 12. Piel de atún ( <i>Thunnus atlanticus</i> ) en solución de ácido acético.	22
Figura 13. Extracto de colágeno de la piel de atún ( <i>Thunnus atlanticus</i> ) en solución de ácido acético.	23
Figura 14. Colágeno de la piel de atún ( <i>Thunnus atlanticus</i> ) precipitado con cloruro de sodio 2,0 mol/l	24
Figura 15. Reacción de prolina a hidroxiprolina promovida por $Fe^{+2}$ , que cumple similitud con la reacción de la lisina a hidroxilisina.	29
Figura 16. Estructura de un hidrato de carbono unido al colágeno.	30

Figura 17. Distribución de los elementos encontrados en las muestras de colágeno de la piel de <i>T. atlanticus</i> a 1,5% y 5,0% v/v en ácido acético. ....	31
Figura 18. Estructura molecular de un fragmento de un polipéptido e indicación de los protones significativos en un espectro de RMN. ....	36
Figura 19. Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) estándar de protones de los aminoácidos de un polipéptido (Luo <i>et al.</i> , 2015) .....	37
Figura 20. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de colágeno de origen bovino (Luo <i>et al.</i> , 2015) .....	37
Figura 21. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, D <sub>2</sub> O) del extracto colagénico de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 1,5% v/v, T=25 °C. ....	38
Figura 22. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, D <sub>2</sub> O) del extracto colagénico de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 1,5% v/v, T=35 °C. ....	39
Figura 23. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, D <sub>2</sub> O) del extracto colagénico de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 1,5% v/v, T=45 °C. ....	39
Figura 24. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, D <sub>2</sub> O) del extracto colagénico de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 1,5% v/v, T=55 °C. ....	40
Figura 25. Superposición de los espectros de RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, D <sub>2</sub> O) del extracto colagénico de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 1,5% v/v.....	41
Figura 26. Ampliación de las regiones de interés (0,8-4,0 y 8,2-8,6 ppm) del espectro de RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz, D <sub>2</sub> O) del extracto colagénico de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 5,0% v/v, T=25 °C.....	41
Figura 27. Ampliación de las regiones de interés ( $\delta$ 0,9-4,5 y 8,2-8,5 ppm) del espectro de RMN- <sup>1</sup> H (300MHz, D <sub>2</sub> O) del extracto colagénico de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 5,0% v/v, T=35 °C.....	43
Figura 28. Ampliación de las regiones de interés ( $\delta$ 1,0-4,2 y $\delta$ 8,4-8,8 ppm) del espectro de RMN- <sup>1</sup> H (300MHz, D <sub>2</sub> O) del extracto colagénico de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 5,0% v/v, T=45 °C.....	43
Figura 29. Ampliación de las regiones de interés ( $\delta$ 1,1-4,5 y 8,3-9,0 ppm) del espectro del RMN- <sup>1</sup> H del extracto colagénico de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 5,0% v/v, T=55 °C .....	44

Figura 30. Superposición de los espectros d del extracto colagénico de la piel de la cola de <i>T.atlanticus</i> soluble en ácido acético 5,0% v/v. ....	45
Figura 31. Espectro de Infrarrojo de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 1,5% v/v a T=30°C. ....	47
Figura 32. IR-TF del colágeno de la piel de <i>Sapiella inermis</i> soluble en ácido acético (Shanmugam <i>et al.</i> , 2012).....	49
Figura 33. IR-TF del colágeno de la piel de <i>T. albacares</i> soluble en ácido acético .....	49
Figura 34. Espectro de Infrarrojo del colágeno de la piel de la cola de <i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 1,5% v/v a T=40°C .....	51
Figura 35. Espectro de Infrarrojo del colágeno de la piel de la cola de.....	52
<i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 1,5% v/v a T=50°C. ....	52
Figura 36. Espectro de Infrarrojo del colágeno de la piel de la cola de.....	53
<i>T. atlanticus</i> soluble en ácido acético 1,5% v/v a T=60°C. ....	53
(Mancha amarilla). A: colágeno soluble en ácido acético 1,5% v/v; B: colágeno soluble en ácido acético 5,0% v/v. ....	56

## RESUMEN

Se optimizaron los parámetros del método extracción de Bryan y Bailey (1978) para obtener el colágeno de la piel de la cola de atún (*Thunnus atlanticus*) soluble en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v, utilizando esta parte del pescado la cual puede conformar los residuos de la industria pesquera. Se midieron parámetros fisicoquímicos como porcentaje de humedad, residuos sólidos y pH, encontrando que la muestra en ácido acético 1,5% v/v cumplió con el pH establecido por las normas (Normas Técnicas Colombianas, NTC 3750, Productos para la Industria Cosmética) para ser usado como producto cosmetológico. Por otra parte, el % de humedad de las muestras a 1,5 y 5,0% v/v fue 90,050 y 90,97% respectivamente, resultando menores al valor de los estándares, mientras que los datos de residuos sólidos (9,683 % para el colágeno al 1,5% v/v) están por encima de éstos. El análisis cualitativo de varios elementos por ICP-OES mostró la presencia de Co, Pb, Cd, Ni, Si, Mn, Fe, Cr, Cu, y ausencia de Hg, Zn y Al. Algunos de estos metales (Fe y Mn) funcionan como cofactores en diversas reacciones químicas propias del colágeno; mientras que el Si podría formar parte de la estructura molecular de la piel de *T. atlanticus*. Con esta técnica se determinó cuantitativamente el Pb, destacando que los colágenos analizados contienen concentraciones muy bajas de dicho metal, lo que sugirió una mínima toxicidad y, en consecuencia, este colágeno podría ser usado en la industria cosmetológica o farmacéutica. Los análisis de RMN-<sup>1</sup>H demostraron que la estructura química base del colágeno se degrada con el aumento de la concentración de ácido acético de 1,5 a 5,0% v/v, observando en los espectros mayor cantidad de señales y ensanchamiento de las bandas, en comparación con los espectros de la muestra de colágeno 1,5%. Por otro lado, el análisis por IR-TF, en el colágeno 1,5% v/v de ácido acético se reportaron las bandas representativas de un esqueleto polipeptídico, identificadas como amida: A; B; I; II Y III, marcas sensitivas de un colágeno tipo I. Además, esta técnica permitió determinar el rango de temperaturas de desnaturalización del colágeno la cual estuvo entre 50 y 60 °C, al observarse que no aparecieron algunas bandas características en el espectro, específicamente a T=60 °C, debido a la pérdida de agua en el colágeno. También se identificaron los aminoácidos glicina y prolina por cromatografía de papel en ambas muestras analizadas. Esta investigación es un aporte importante, al estudio de las características químicas del colágeno de la piel de la cola de la especie marina *T. atlanticus*, ya pesar de la presencia de metales en el colágeno, como por ejemplo, plomo los niveles de este, no representaron toxicidad. Además, si los pasivos ambientales (aletas, piel, escamas y vísceras) provenientes de las empresas pesqueras pudieran ser utilizados en la producción de colágeno o de hidrolizados colágenicos (gelatina) con mayor valor agregado, esto podría contribuir a disminuir la contaminación ambiental en las zonas costeras de la ciudad de Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.

## INTRODUCCIÓN

Todas las sustancias químicas que se encuentran en el organismo están incluidas dentro de las macromoléculas orgánicas y las moléculas inorgánicas, o ambas inclusive. La clase de compuesto está determinada por la presencia o ausencia de carbono. En general, las sustancias inorgánicas no tienen carbono y tienden a ser pequeñas y sencillas, como por ejemplo, el agua y las sales. Mientras que los compuestos orgánicos contienen carbono y entre los más importantes del organismo podemos nombrar: carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. La mayoría de los compuestos orgánicos son macromoléculas unidos por enlaces covalentes (Elaine, 2008).

### **Proteínas**

Todas las proteínas son macromoléculas que desempeñan una amplia gama de funciones, con un papel energético mucho menos importante que los lípidos y carbohidratos. Los constituyentes principales de las proteínas son los  $\alpha$ -aminoácidos, los cuales representan a los monómeros, que se combinan para formarlas. De los 20 aminoácidos que las constituyen (tabla 1), nueve de ellos son esenciales para el hombre, debiendo ser suministrados por la dieta, ya que la velocidad con que son sintetizados es insuficiente para los requerimientos del individuo (Cox y Nelson, 2007). La deficiencia dietaria de un solo aminoácido esencial disminuye la síntesis proteica, aumenta el catabolismo de los aminoácidos restantes, y determina un balance nitrogenado negativo para el organismo (nitrógeno eliminado mayor que el ingerido) (Elaine, 2008).

Todos los aminoácidos tienen un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ), que les confiere propiedades básicas, y un grupo ácido ( $\text{COOH}$ ), que les permite actuar como ácidos. De hecho, todos los aminoácidos son idénticos excepto en un solo grupo de átomos llamado grupo R. Así, son las diferencias en los grupos R lo que hace a cada aminoácido químicamente único (Whitford, 2005). Por ejemplo, un grupo amino extra ( $\text{NH}_2$ ) en el grupo R hace que el aminoácido sea más básico (figura 1).

Tabla 1. Tipos de Aminoácidos (Whitford, 2005)

	<b>Aminoácidos (Abreviaturas)</b>
<b>No esenciales</b>	<p>Alanila (Ala-A)</p> <p>Arginina (Arg-R)</p> <p>Aspartato (Asp-D)</p> <p>Asparragina (Asn-N)</p> <p>Cisteína (Cys-C)</p> <p>Glutamina (Gln-Q)</p> <p>Glutamato (Glu-E)</p> <p>Glicina (Gly-G)</p> <p>Prolina (Pro-P)</p> <p>Serina (Ser-Sr)</p> <p>Tirosina (Tyr-Y)</p>
<b>Esenciales</b>	<p>Histidina (His-H)</p> <p>Meteonina (Met-M)</p> <p>Treonina (Thr-T)</p> <p>Valina (Val-V)</p> <p>Leucina (Leu-L)</p> <p>Isoleucina (Ile-I)</p> <p>Fenilalanina (Phe-F)</p> <p>Triptofano (Trp-W)</p> <p>Lisina (Lis-K)</p>

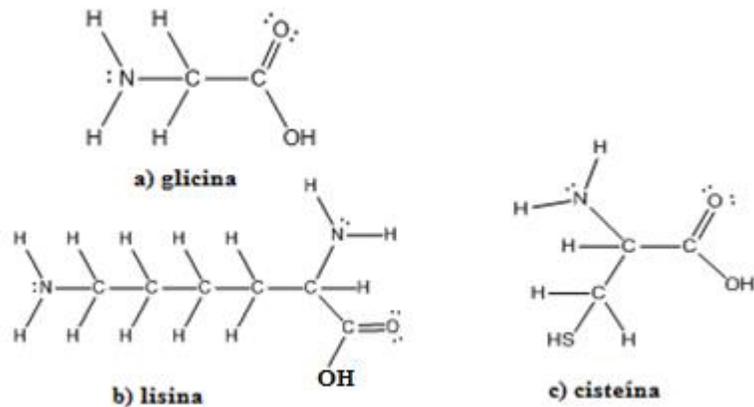


Figura 1. a) Glicina; b) Lisina, aminoácido básico y c) Cisteína, aminoácido con azufre.

Los aminoácidos están unidos en cadenas para formar moléculas de proteínas grandes y complejas, que contienen desde 50 hasta miles de aminoácidos. Las cadenas de aminoácidos que contienen menos de 50 aminoácidos se llaman polipéptidos (Cox y Nelson, 2007).

Las moléculas proteicas poseen cuatro niveles de organización estructural (figura 2): primaria (secuencia), secundaria (plegado local), terciaria (plegado global) y cuaternaria (asociación de varias cadenas). En el primer nivel de organización, la secuencia de aminoácidos, viene dada por la secuencia de Ácido Desoxirribonucleico (DNA, siglas en inglés) del gen para cada proteína.

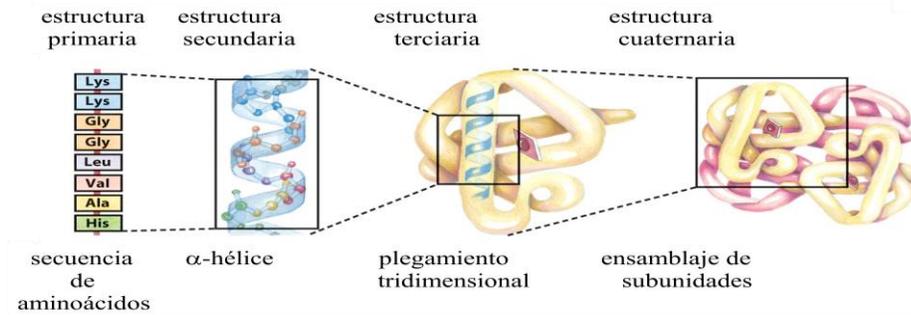


Figura 2. Niveles de organización estructural de las proteínas(Mathewsy Van Holden, 2002).

La estructura primaria es fundamental para la forma tridimensional que tendrá la proteína. Cualquier modificación en la secuencia de aminoácidos podría ocasionar un cambio en la estructura tridimensional, y afectará la función biológica de la proteína. A medida que la cadena de aminoácidos se va ensamblando, empiezan a tener lugar interacciones entre los diversos aminoácidos de la cadena. Pueden formarse interacciones de hidrógeno entre el hidrógeno del amino de un aminoácido y el oxígeno del carboxilo de otro. A causa de estas uniones la cadena polipeptídica se pliega, adoptando dos posibles configuraciones espaciales, que constituyen lo que se conoce como estructura secundaria de una proteína. Estas dos configuraciones son las llamadas  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -hoja plegada (Conn, 1998).

La  $\alpha$ -hélice, se caracteriza por formar una estructura geométrica en espiral, muy uniforme, en la que cada vuelta está constituida por 3,6 aminoácidos. Esta hélice se mantiene mediante interacciones de hidrógeno, entre el hidrógeno del grupo amino del enlace peptídico de un aminoácido y el oxígeno del grupo carboxilo del cuarto residuo de la hélice (figura 3). Dentro de este grupo se pueden mencionar proteínas estructurales como el colágeno, la queratina y la elastina (MathewsyVan Holden, 2002). Las proteínas más abundantes en la matriz extracelular son aquellas que pertenecen a la familia del colágeno (Gelse&Pöschl, 2003).

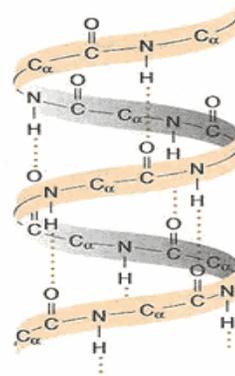


Figura 3. Interacciones de hidrógeno de la  $\alpha$ -hélice (Gelse&Pöschl, 2003).

### Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante de origen animal (Muyonga *et al.*, 2004), que constituye aproximadamente de 25 a 30% de todas las proteínas de los organismos animales, representando un componente importante de todos los tejidos conectivos del cuerpo (músculos, dientes, huesos y piel), pero concentrándose especialmente en los últimos dos tejidos nombrados anteriormente, y también se encuentra en el intersticio de prácticamente todos los órganos, donde pueden contribuir a la estabilidad de los tejidos y órganos, ya mantener su estructura e integridad (Gelse&Pöschl, 2003).

La molécula de tropocolágeno es la unidad básica de la fibra de colágeno, es una hélice de tres cadenas polipeptídicas, cada una con aproximadamente 1000 residuos. Las cadenas individuales son hélices orientadas a la izquierda, con aproximadamente 3,3 residuos/vuelta. Tres de estas cadenas se enrollan, unas alrededor de las otras hacia la derecha, con enlaces de hidrógeno que se extienden entre ellas (Lehninger *et al.*, 1995) (figura 4).

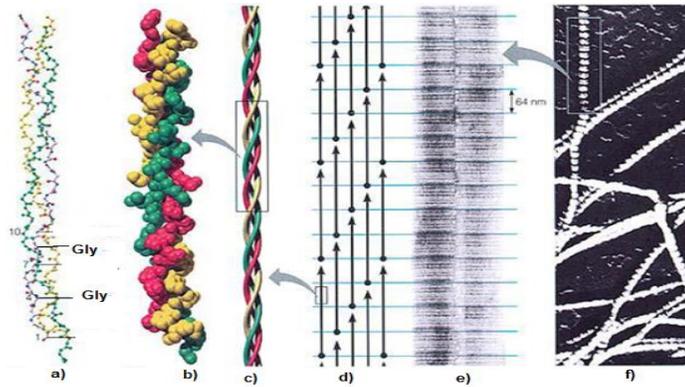


Figura 4. Estructura del colágeno. a). Estructura secundaria helicoidal levógira con tres residuos por vuelta. Secuencia repetitiva Gly-Pro-Hyp. b y c). Tres hélices se enrollan entre sí de forma dextrógira (tropocolágeno). d y e). Separación entre las moléculas de colágeno. f). fibrillas (Murray *et al.*, 1998).

El examen del modelo revela que cada tercer residuo, que debe encontrarse cerca del centro de la hélice triple, solo puede ser glicina (Gly). Cualquier cadena lateral distinta de Gly sería demasiado voluminosa. La formación de las hélices individuales del tipo colágeno también resulta favorecida por la presencia de prolina (Pro) e hidroxiprolina (HyP) en la molécula de tropocolágeno. Un conjunto que se repite en la secuencia es la forma Gly-X-Y, donde X suele ser Pro e Y, Pro y/o HyP/ hidroxilisina (HyL) (Murray *et al.*, 1998).

Para realizar adecuadamente sus múltiples funciones, el colágeno presenta un gran número de variantes genéticas en los organismos superiores. Esta macromolécula es excepcional en su extensa modificación de prolina a hidroxiprolina. La mayoría de los enlaces de hidrógeno entre las cadenas en la hélice triple se establecen entre protones amidas y oxígenos carbonilo, aunque los grupos -OH de la hidroxiprolina también parecen participar en la estabilización de la estructura (Figura 5). Las moléculas individuales de tropocolágeno se empaquetan juntas formando una fibra de colágeno de una manera específica. Cada molécula tiene una longitud de aproximadamente 300 nanómetro (nm) y se solapa con su vecina en aproximadamente 64 nm, produciendo el aspecto característico de bandas de las fibras (Cox y Nelson, 2007).

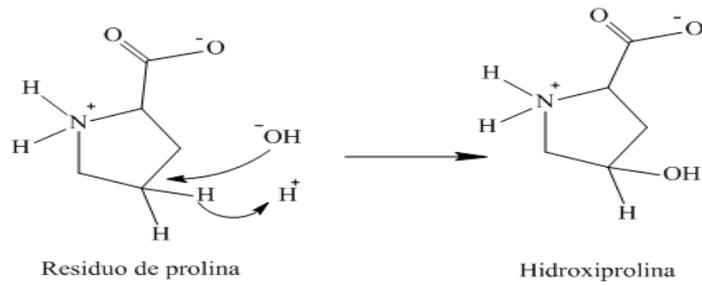


Figura 5. Transformación de prolina a hidroxiprolina(Elaine, 2008).

Esta estructura proporciona una resistencia notable: las fibras de colágeno de los tendones tienen una resistencia comparable a la del cable de cobre de alta resistencia (Whitford, 2005). Parte de la dureza del colágeno se debe al entrecruzamiento de las moléculas de tropocolágeno, mediante una reacción que utiliza las cadenas laterales de la lisina (Lys). Algunas de las cadenas laterales de la lisina se oxidan para dar lugar a derivados aldehídos, que, a continuación, pueden reaccionar con un residuo de lisina o bien unos con otros mediante una condensación aldólica y deshidratación, para dar lugar a un entrecruzamiento (Figura 6).

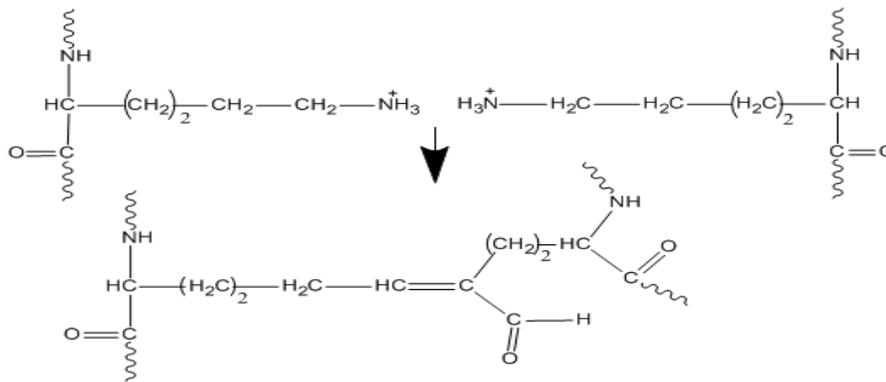


Figura 6. Enlaces covalente entre residuos de Lisina de una fibra colagénica (Cox y Nelson, 2007)

Este proceso sigue a lo largo de la vida, y los entrecruzamientos que se acumulan hacen que el colágeno sea cada vez menos elástico y más quebradizo (Cox y Nelson, 2007). La principal función del colágeno es mantener la estructura de los tejidos animales y mejorar la fuerza, resistencia y flexibilidad de los tejidos.

Cuando se va perdiendo la calidad y cantidad de esta proteína, la piel va disminuyendo su elasticidad, también se presenta fragilidad en uñas, pérdida de elasticidad del cabello, aparición de manchas tipo lunar en brazos y manos, endurecimiento de los tejidos y las válvulas cardíacas, fragilidad de los discos intervertebrales y desgaste de meniscos (Zurita,2009).

### Síntesis de Colágeno

Cuando una célula se divide para formar dos, se sintetizan todo tipo de macromoléculas portadoras de información, entre ellas las proteínas. Los procesos moleculares que subyacen bajo este flujo genético de información pueden dividirse en tres etapas, que se ilustra continuación(Figura 7).

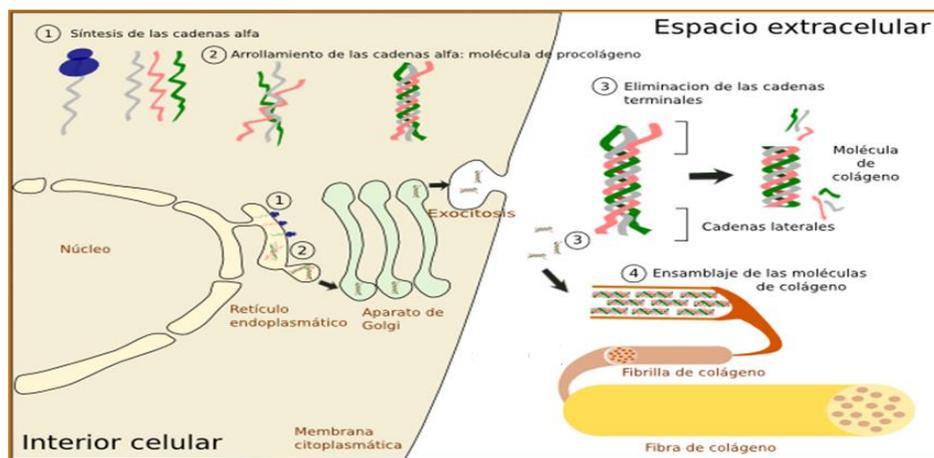


Figura 7. Síntesis del colágeno (MathewsyVan Holden, 2002).

Cada proceso numerado corresponde a la siguiente descripción:

1. Replicación: es la copia de las dos cadenas de una molécula de DNA,
2. Transcripción: es el proceso por el que se copia una cadena de DNA en una molécula de RNA (Ácido ribonucleico, siglas en inglés) complementaria.
3. Transducción: es cuando una secuencia de RNA dicta una secuencia proteica.

Luego de la traducción las proteínas sufren modificaciones, y el colágeno es un importante ejemplo de ello. En primer lugar el polipéptido recién traducido se hidroxila y, a continuación, se unen los azúcares para dar procolágeno. Este contiene alrededor de 1500 residuos, de los cuales aproximadamente 500 están en las regiones N-terminal y C-terminal, que no tienen la secuencia característica de la fibra de colágeno descrita previamente. Tres moléculas de procolágeno enrollan sus regiones centrales formando una hélice triple, mientras que las regiones N-terminal y C-terminal se pliegan formando estructuras globulares. Las hélices triples de procolágeno se exportan a continuación al espacio extracelular; en este punto las regiones terminales se separan mediante enzimas específicas, dejando sólo la hélice triple de tropocolágeno. A continuación, estas moléculas se ensamblan dando lugar a las formaciones escalonadas. Finalmente, los entrecruzamientos juntan a las moléculas formando una fibra dura de colágeno (Potaros & Raksakulthai, 2009).

### **Clases y familias de colágeno**

Científicamente, se conocen 19 clases de colágeno que están designadas como tipo I al tipo XIX, aunque en otros artículos se habla de 26 tipos de colágeno genéticamente distintos, que varían considerablemente en su complejidad y la diversidad de su estructura (tabla 2) (Bae & Osatomi, 2008 y Woo & Yu., 2008). Cada uno de estos tipos de colágeno se encuentra en lugares diferentes del cuerpo y con características específicas.

El colágeno tipo I es el más abundante y estudiado, forma alrededor del 90% de la masa orgánica de los huesos, y es el principal en la piel, los tendones, ligamentos, la córnea, como también muchos tejidos conectivos (Figura 8-a). Su función es la de proporcionar rigidez a los tendones y en los huesos; esto define las propiedades biomecánicas de carga, rigidez torsional y resistencia a la tracción (Gelse & Pöschl, 2003).

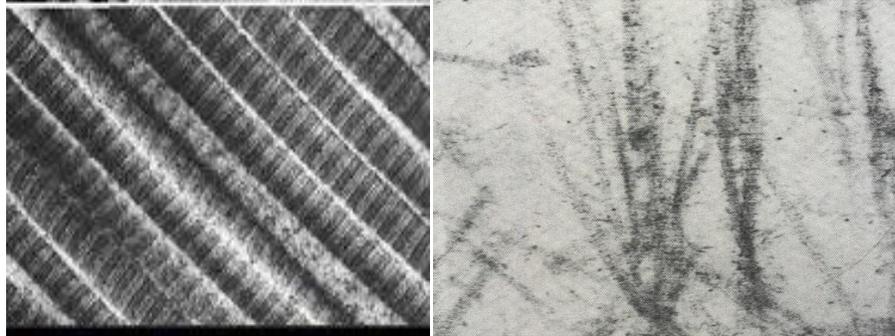
Tabla 2. Tipos de colágeno

<b>Tipo</b>	<b>Distribución tisular</b>	<b>Forma molecular</b>	<b>Características</b>
<b>I</b>	Huesos, tendones, piel, dentina, ligamentos, arterias y útero	$[\alpha_1(\text{I})_2] \alpha_2$	Forma predominante en los organismos maduros; se compone de dos tipos de cadenas, contiene poca hidroxilisina e hidroxilisinaglucolisada.
<b>II</b>	Cartílagos hialinos	$[\alpha_1(\text{II})]_2$	Contenido relativamente alto de hidroxilisina e hidroxilisinaglucolisada.
<b>III</b>	Piel, cartílagos y útero	$[\alpha_1(\text{III})]_2$	Contenido relativamente alto de hidroxiprolina, contiene enlaces disulfuros entre cadenas.
<b>IV</b>	Membranas basilares	$[\alpha_1(\text{IV})]_2$	Contenido alto de hidroxilisina e hidroxilisinaglucolisada, contiene enlaces disulfuros entre cadenas y presenta importantes zonas globulares.

El colágeno tipo II se encuentra especialmente en el cartílago, cuerpo vítreo y núcleo pulposo; es el componente predominante del cartílagohialino (Figura 8-b), y además define propiedades biomecánicas como el colágeno tipo I.

El colágeno tipo III es el constituyente más importante de las fibras reticulares en los tejidos intersticiales de los pulmones, el hígado, la dermis y el bazo. Mientras que, los tipos V y XI se consideran una subfamilia del colágeno fibrilar, pues se mezclan con los tipos mencionados anteriormente y forman condiciones específicas, es el caso de la unión del colágeno tipo V con el tipo I y III, contribuyendo a la matriz orgánica del hueso, la

matriz intersticial de los músculos, el hígado, los pulmones, la placenta y en la córnea (Ricard-Blum&Ruggiero, 2005).



(a) (b)  
Figura 8. a). Micrografía del colágeno de la piel (tipo I); b). Micrografía del Colágeno del tejido hialino (tipo II).

El colágeno tipo III es el constituyente más importante de las fibras reticulares en los tejidos intersticiales de los pulmones, el hígado, la dermis y el bazo. Mientras que, los tipos V y XI se consideran una subfamilia del colágeno fibrilar, pues se mezclan con los tipos mencionados anteriormente y forman condiciones específicas, es el caso de la unión del colágeno tipo V con el tipo I y III, contribuyendo a la matriz orgánica del hueso, la matriz intersticial de los músculos, el hígado, los pulmones, la placenta y en la córnea (Ricard-Blum&Ruggiero, 2005).

Por su parte, el colágeno tipo II y el tipo XI se distribuyen en el cartílago articular, proveyendo estabilidad de torsión y fuerza de tracción a sus tejidos (Riesleet *al.*, 1998).

Otra familia del colágeno está comprendida por los tipos IX, XII, XIV, XIX, XX y XXI, los cuales se distribuyen especialmente en el cartílago, córnea y humor vítreo (IX); ligamentos y tendones (XII), la dermis, pared del vaso, placenta, pulmones e hígado (XIV); epitelio de la córnea, piel embrionaria, cartílago esternal y tendón (XX); pared de los vasos sanguíneos (XXI). Existen otros tipos de colágeno como el VI, llamado micro

fibrilar, que se encuentra en la dermis, cartílago, placenta, los pulmones, la pared del vaso y en el disco intervertebral. (Bitar&Salih, 2007).

### **Usos y aplicaciones**

Gracias a sus características químicas únicas, el colágeno se ha utilizado en diversos campos de la industria, con aplicaciones en materiales biomédicos, en la industria farmacéutica, cosmética y en alimentos (Potaros & Raksakulthai., 2009).

Actualmente el colágeno tiene aplicaciones muy importantes en el campo de los materiales biomédicos y biomateriales. Un biomaterial es una sustancia, elemento o combinación de estos, ya sean sintéticos o naturales, que pueden utilizarse para reemplazar parcial o definitivamente una función que desempeña alguna parte del cuerpo humano, también se ha definido como un elemento capaz de adaptarse al cuerpo humano y desarrollar una función específica. Los biomateriales más usados son las aleaciones metálicas, polímeros, cerámicos y sustancias biológicas. Entre las sustancias biológicas, el colágeno ha sido uno de los más empleados y comerciales. Los biomateriales han tenido gran importancia para la ingeniería de tejidos, ya que este campo se basa en la utilización de estos materiales y al respecto se han realizado diferentes estudios para demostrar la aplicabilidad del colágeno (Villela, 2004 y Zamora *et al.*, 2010).

Uno de los principales usos del colágeno es en la elaboración de cápsulas duras y blandas para contener medicamentos. El colágeno se hidroliza hasta la formación de gelatinas que son tratadas para fabricar miles de cápsulas (Figura 9-a). Sin embargo, el colágeno ha tenido mayor utilidad en aplicaciones cosméticas desde hace mucho tiempo, ya que se ha evidenciado que tienen resultados positivos en la prevención del deterioro de la piel y por tanto se han fabricado cremas, mascarillas y toda clase de cosméticos (Figura 9-b). Desde hace pocos años se ha empezado a introducir en el mercado de los complementos nutricionales de uso oral (Figura 9-c) (Pomares, 2010).



Figura 9. Diferentes usos del colágeno: a). Cápsulas blandas b) Mascarilla de colágeno y c) Colágeno hidrolizado

Esta aplicación tiene ventajas frente al uso de cremas y lociones, ya que el complemento alimenticio penetra hasta las capas más profundas de la piel, gracias a que los aminoácidos que componen el colágeno son absorbidos y utilizados para la regeneración del tejido conjuntivo, en el desarrollo de este producto se ha sustituido el colágeno bovino por el de origen marino por su mayor disponibilidad en contraposición con el colágeno tradicional de origen bovino.

Respecto al colágeno para el tratamiento de heridas, se han desarrollado productos como parches y apósitos o gasas, los cuales tienen grandes beneficios al momento de la cicatrización. Se ha evidenciado que la fuerza tensil de las cicatrices se aumenta en un 40% y también que acelera la reparación tisular, disminución de la respuesta inflamatoria local, beneficia la capacidad para reducir la carga bacteriana e incentiva la formación de tejido conectivo (González y Rodríguez, 2004).

Lo anteriormente expuesto hace evidente la importancia que tiene la producción de colágeno, ya que es una materia prima óptima para diferentes productos cosméticos y farmacéuticos, y también es un componente principal de productos de mayor valor agregado, como los que son aplicados en la ingeniería de tejidos y el tratamiento de heridas. Para estas aplicaciones tradicionalmente se ha empleado el colágeno de origen bovino y porcino, pero ya se han realizado diferentes análisis de la utilización de fuentes diferentes como la piel de pescado, lo cual ha resultado satisfactorio.

## **Fuentes de obtención**

La principal fuente de extracción de colágeno ha sido hasta el momento de los residuos del beneficio de especies bovinas y de la piel, huesos y cartílagos de cerdo (Wang & An, 2008). Estas fuentes tradicionales de colágeno presentan dificultades y son inapropiadas para muchos grupos religiosos y étnicos, debido a limitaciones socio-culturales. En el caso del judaísmo y el Islam se prohíbe el consumo de productos relacionados con el cerdo, y para los hindúes el consumo de productos relacionados con las reses (Karim & Bhat, 2009), y también se ven restricciones en su consumo por condiciones de salud, ya que, se teme ante enfermedades como la encefalopatía espongiiforme bovina y la fiebre aftosa (Asher, 1999 y Wilesmith *et al.*, 1991). Otro tipo de limitación son los costos de obtención de colágeno de bovinos, ya que se ve afectado por el alto valor que tiene el levante de este tipo de animales y de la baja productividad en colágeno.

Debido a la problemática anterior, la comunidad científica se ha propuesto investigar y encontrar fuentes alternativas de materia prima para la obtención de colágeno; estudiando aquellas que provienen del medio acuático y a los residuos que generan las empresas procesadoras de pescados, tales como pieles, huesos, vísceras y escamas (Senaratne & Park, 2006).

Con respecto a la búsqueda de nuevas fuentes de colágeno, se han realizado diferentes estudios para evaluar las propiedades funcionales y químicas del colágeno de las pieles de varias especies de peces, de agua dulce y salada (Woo & Yu, 2008). Entre los peces estudiados se encuentran: el bacalao común (Sadowska & Kolodziejska, 2003), perca común (Muyonga *et al.*, 2004), carpa gris (Zhang & Liu, 2007), tiburón bambú (Kittiphattanabawon & Benjakul, 2010) y carpa plateada (Zhang *et al.*, 2009). Una de las primeras investigaciones realizada en Japón (Nagai & Suzuki, 1999) tuvo como objetivo describir la extracción y estudiar las propiedades térmicas del colágeno a partir de piel, hueso y aletas de: la perca japonesa (*Lateolabrax japonicus*), caballa (*Scomber japonicus*) y el tiburón toro japonés (*Heterodontus japonicus*).

El colágeno de piel de pescado ha tomado mucha importancia y, a la vez, se ha convertido en una solución al problema ambiental de las empresas de procesamiento de pescado. En la producción de filete, se generan diferentes residuos, como son la piel, los huesos, escamas, vísceras y cabeza, los que constituyen entre un 50-70% del peso total de la materia prima. Al aumentar la producción de filete es evidente que también habrá un aumento en la generación de residuos(Serrano, 2011).

Estos desperdicios han generado grandes problemas ambientales para las plantas de procesamiento, las que no han tenido un manejo adecuado y han causado contaminaciones principalmente en las fuentes de agua. En la mayoría de las plantas que se dedican al procesamiento de pescado, los residuos son enterrados o vertidos a los cuerpos de agua sin ningún tratamiento. Las plantas procesadoras de mayor tamaño los utilizan en la elaboración de harina de pescado y productos de consumo animal. En términos generales, por falta de procesadoras con adecuadas normas ambientales y procesos estandarizados, los residuos son considerados sin ningún valor y manipulados inadecuadamente. Entre los desperdicios, la piel es el de mayor importancia y potencial, ya que constituye aproximadamente el 30% y además es considerada rica en colágeno, por lo cual llama la atención como fuente de esta proteína (Kittiphattanabawon&Benjakul, 2010).

### **Atunes: Recursos pesqueros**

La flota Pesquera nacional venezolana captura 200000 toneladas métricas de pescado anual. El estado Sucre es el primer productor con un promedio de 43000 toneladas métricas por año, de las cuales el 20-30 % es de atún. En este estado están instaladas las principales empresas enlatadoras del país, las cuales exportan productos de alta calidad a los mercados internacionales más exigentes (Guararima y Cadenas, 2012).

El atún es una especie que se encuentra distribuida en todos los mares del mundo. Son peces con características morfológicas que les permiten ser buenos nadadores; tienen

cuerpo fusiforme, cabeza pronunciada en forma de pirámide triangular, y su piel está lubricada con un "mucus" que reduce la fricción con el agua. El *Thunnus atlanticus* (Figura 10), es una especie de atún cuya clasificación científica lo ubica en el reino: Animalia; filo: Chordata; clase: Actinopterygii; orden: Perciformes; familia: Scombridae; Género: *Thunnus* y especie: *atlanticus* (Cervigón, 1998).



Figura 10. Atún (*Thunnus atlanticus*)

Con base en esto, se realizó un estudio del colágeno soluble en ácido acético en la piel de la cola de atún (*Thunnus atlanticus*), especie marina que habita en el océano Atlántico y es procesada en las industrias pesqueras asentadas en la ciudad de Cumaná, estado Sucre y el estudio de su colágeno permitió evaluar las características químicas de esta proteína, lo cual propiciará su uso en la industria como un material tecno-funcional. En el estado Sucre, existen empresas procesadoras de pescado (atún y sardinas) que proveen pescado para consumo humano y generan gran cantidad de residuos; de allí la posibilidad de evaluar el colágeno, para darle valor agregado a estos residuos mediante la obtención de productos como el colágeno o los hidrolizados colagénicos y de esta manera impulsar un desarrollo sustentable y redituable, en un futuro cercano, de estos desechos que representan hasta ahora un pasivo ambiental en el estado.

# METODOLOGÍA

## **Tratamiento de Muestra**

El atún que se utilizó se compró en el mercado municipal de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Los ejemplares se seleccionaron de edad adulta con una longitud entre 70 y 90 cm de longitud (medidos desde la boca hasta la aleta caudal). Para la extracción del colágeno se procesaron las pieles de tres colas, parte posterior del cuerpo del pescado. Estas se cortaron y se separaron de los residuos de tejido muscular raspándolas con un cuchillo, luego fueron cortadas y lavadas con varias porciones de agua destilada, finalmente se guardaron bajo refrigeración hasta el momento de la extracción del colágeno.

## **Extracción**

La técnica de Bryan y Bailey (1978) se utilizó para la extracción del colágeno soluble con ácido acético a 1,5 y 5,0 % v/v. Todos los reactivos líquidos fueron refrigerados para mantener el proceso de extracción a temperaturas por debajo de la ambiental. Se tomaron 6 muestras de piel de 3,0 g c/u y se lavaron con dos porciones de 20 ml de solución de NaCl 0,15 mol/l, tres de estas muestras se suspendieron c/u en 30 ml de ácido acético 1,5 % v/v, mientras que las otras 3 muestras se suspendieron en el mismo volumen de solución de ácido acético pero de concentración 5,0 % v/v, y se refrigeraron a 5 °C por 48 horas. Todas las soluciones se filtraron y los residuos insolubles se extrajeron secuencialmente (máximo 4 veces) por 24 horas con sus respectivos solventes. Se reunieron los filtrados y el colágeno se precipitó con solución de NaCl 2,0 mol/l. La separación del colágeno soluble en ácido se realizó por centrifugación (centrifuga Eppendorf, modelo 5702R, refrigerada), programando la centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos, cuya temperatura osciló entre 20 °C y 5 °C. De esta forma se obtuvo el colágeno nativo, manteniéndose bajo refrigeración hasta su purificación.

### **Purificación**

Los diferentes extractos colagénicos se dializaron utilizando papel celofán incoloro sumergido en agua destilada fría, utilizandoun sistema de mezclado continuo con agitador magnético durante 4 horas, y cambiando el agua cada hora; se monitoreó el contenido salino del agua del lavado al hacerse reaccionar con  $\text{AgNO}_3$ . De esta manera se obtuvieron las muestras purificadas, las cuales se guardaron bajo refrigeración para los análisis posteriores.

### **Hidrólisis del colágeno**

El colágeno se hidrolizó mediante reflujo por una hora a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , con una solución de  $\text{HCl}$  19,0 % v/v. El hidrolizado se refrigeró para realizar análisis de aminoácidos por cromatografía de papel.

## **CARACTERIZACIÓN**

### **Determinación de humedad**

Inicialmente se lavaron, secaron y pesaron las cápsulas o crisoles de porcelana a usar en el análisis. Luego se pesaron 6muestras de 1,0 g de cada colágeno extraído con ácido acético 1,5 y 5,0% v/v y fueron colocadas en una estufa modelo J.P. Selecta, a una temperatura de  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , por 3 horas. Transcurrido este tiempo las cápsulas se colocaron en un desecador por 20 minutos y se pesaron. Luego se repitió el procedimiento por una hora hasta alcanzar un peso constante. Se determinó el porcentaje de humedad para cada una de las muestras de colágeno.

### **Determinación de pH**

Se colocaron 2,0 ml de cada muestra de colágeno líquido en un beaker de 100 mly se les midió el pH con un pHmetro, marca Denver modelo Ultra Basic.

### **Cromatografía de papel**

Este método reproduce excelentes resultados en la determinación de los aminoácidos que caracterizan al colágeno, entre estos, se encuentran prolina y glicina. Éstos son fácilmente identificables debido al color de cada uno, en comparación al resto de los aminoácidos.

En la cromatografía de papel, para identificar los aminoácidos de los hidrolizados colagénicos se utilizó una comparación de los factores de retención ( $R_f$ , siglas en inglés) experimentales con los teóricos. Se emplearon patrones de glicina y de gelatina comercial, la cual contiene todos los aminoácidos. La fase móvil fue una mezcla de solventes: n-butanol: agua: ácido acético (4:1:1) y como revelador se utilizó una solución de ninhidrina 0,2% m/v en etanol. Las muestras de colágeno soluble en ácido acético 1,5 y 5,0 % v/v y los patrones se colocaron por separado con un capilar en el extremo de un papel de filtro whatman n° 2. Este se introdujo en un tanque cromatográfico conteniendo la mezcla de solventes. Una vez, alcanzada la altura apropiada del solvente. El papel se secó a temperatura ambiente y luego se reveló con ninhidrina colocándolo en la estufa. Se midieron las distancias recorridas tanto de las muestras de colágeno como del patrón y se calcularon los  $R_f$  de cada aminoácido.

### **Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN-<sup>1</sup>H)**

Los espectros de RMN de protones a temperatura variable se obtuvieron en el laboratorio de RMN del Centro de Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (CQ-IVIC), haciendo uso de un espectrómetro Bruker Advance de 300 MHz. Las muestras de cada colágeno se secaron previamente a 50 °C y se disolvieron en agua deuterada para su análisis, los espectros se obtuvieron a las temperaturas de 25, 35, 45 y 55 °C.

## **Espectrometría de emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES)**

Los análisis se realizaron en el IBCA-UDO, con un Espectrómetro de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES, siglas en inglés), marca Perkin Elmer modelo Optima 5300 DV. Se utilizó 1,0 g de cada muestra de colágeno (1,5 y 5,0% v/v en ácido acético) y se disolvieron con 5,0 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado, se calentaron por 20 minutos a 60° C, luego se enrasaron hasta 10 ml con agua desionizada. Se determinaron las concentraciones de plomo (Pb) y además se realizó un análisis cualitativo de los siguientes elementos químicos: Zinc (Zn), Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Níquel (Ni), Cobalto (Co), Manganeso (Mn), Cromo (Cr), Plomo (Pb), Mercurio (Hg), Aluminio (Al), Hierro (Fe) y Silicio (Si) de las soluciones. Se aplicó el control de calidad de las medidas, curva de calibración, límite de detección, precisión y exactitud en el ICP-OES, como sigue:

- Verificación correcta de la presión en los cilindros de argón y nitrógeno gaseoso.
- Correcto funcionamiento del nebulizador.
- Comprobación de que la cámara de nebulización este limpia y en buen estado.
- Verificación de que el drenaje esté en posición correcta.
- Evitar las condensaciones en el tubo de transferencia a la antorcha.
- Verificación de la posición correcta de la antorcha.
- Alineación de la óptica con respecto a la antorcha.
- Comprobación de la correcta disposición de las zonas del plasma.
- Aseguramiento de un tiempo de lavado adecuado con una disolución ácida (1% v/v de HNO<sub>3</sub>).
- Verificación de los patrones de plomo (Pb) que estén preparados correctamente.
- Seleccionar las líneas de emisión: sensibilidad e interferencias de manera adecuada.

A continuación se presenta la curva de calibración que se utilizó para determinar los niveles de plomo en los extractos colagénicos:



Figura 11. Curva de calibración de Pb por ICP-OES

### **Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF)**

Los grupos funcionales de las muestras extraídas en medio ácido de la piel de la cola de *T. atlanticus*, se identificaron mediante los análisis por espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF) usando un equipo IR-TF modelo Frontier, marca Perkin Elmer, el cual se encuentra ubicado en las instalaciones del IIBCA-UDO. Para los análisis, las muestras se secaron a temperaturas de: 30, 40, 50 y 60 °C, luego se trituraron y mezclaron con KBr en un mortero de cuarzo. La mezcla se usó para preparar los comprimidos y ser finalmente analizados en el equipo previamente calibrado con poliestireno (PS). Los espectros infrarrojos (IR) de las muestras estudiadas se obtuvieron después de acumular 24 barridos con una resolución de  $2\text{ cm}^{-1}$  en un rango entre  $400$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Extracción de colágeno de la piel de la cola de atún (*Thunnus atlanticus*) en medio ácido.**

En el proceso empleado para obtener los extractos colagénicos, solubles en ácido acético a 1,5 y 5,0% v/v, fue necesario tener en cuenta varias consideraciones. Los métodos utilizados habitualmente para la separación de proteínas puras se basan en su distinta solubilidad a determinadas condiciones: concentración de reactivos, temperatura, pH próximo o alejado de su punto isoeléctrico y la fuerza iónica del medio, de modo que, por regla general se favorece la eliminación de materiales no colagenosos que pueden interferir en el proceso. En este estudio los residuos no colagenosos fueron removidos de la materia prima con lavados de solución de hidróxido de sodio 0,1 mo/l, previo a la extracción de la muestra. Otros trabajos de investigación han reportado lavados con las mismas soluciones variando el tiempo de exposición (Wang & An., 2008).

En este sentido, la piel se extrajo bajo dos concentraciones diferentes de acidez y se realizaron 4 extracciones sucesivas (una por 48 h y las otras cada una por 24 h). Durante las primeras 48 horas del proceso se pudo observar el hinchamiento de la piel, causado por la separación entre el colágeno y el resto del tejido de la piel, con las soluciones de ácido acético (Figura 11).



Figura 12. Piel de atún (*Thunnus atlanticus*) en solución de ácido acético.

Los solventes ácidos diluidos son usados en la metodología de Bryan & Bailey (1978), siendo el acético, clorhídrico o la solución amortiguadora de citrato, los más utilizados para disolver la mayor parte del colágeno nativo, aunque se limita a la porción de colágeno no entrecruzado, con excepción de las fibras entrecruzadas, que pueden estar prevalentes debido a su labilidad frente al pH del solvente (3,0), el cual disocia a dichos enlaces y por efectos de las fuerzas repulsivas de las cadenas de la triple hélice, causan el hinchamiento de las estructuras fibrilares (Fratzl, 2008). En esta investigación se logró extraer el colágeno nativo de la piel de atún en soluciones de ácido acético diluido de concentraciones 1,5 y 5,0% v/v (Figura 12). Por lo tanto, se solubilizó el colágeno con ácido acético 1,5% v/v y de modo contrario con concentraciones más altas, 5,0% v/v se debilitaron las uniones hidrófobas dentro de la triple hélice o tropocolágeno, ya que estas interacciones entrecruzadas son menos lábiles que aquellas encontradas en el exterior de estas fibras y quedaron sujetas a la alta concentración del solvente de extracción. Con base en esto, se puede inferir que el extracto colagénico con mayor porcentaje de colágeno nativo fue el extraído con el ácido acético diluido a 1,5% v/v.



Figura 13. Extracto de colágeno de la piel de atún (*Thunnus atlanticus*) en solución de ácido acético.

El colágeno es habitualmente precipitado utilizando concentraciones de soluciones conocidas de cloruro de sodio (Figura 13), el cual constituye uno de los métodos mayormente sugeridos. En solución neutral fría de cloruro de sodio 2,2; 4,4 y 1,5 mol/l precipitan los colágenos tipo I, II y III respectivamente (Devlin, 2004).



Figura 14. Colágeno de la piel de atún (*Thunnus atlanticus*) precipitado con cloruro de sodio 2,0 mol/l

De este proceso de optimización se logró la precipitación adecuada de la piel de la cola de atún con solución de NaCl 2,0 mol/l a pH 3,0, ya que a concentraciones mayores no se logró precipitar.

Investigaciones recientes reportan que los colágenos tipo I, II y III (Leal, 2001) de la aleta dorsal y caudal del cazón chino (*Rhizoprionodon porosus*) se obtuvieron usando soluciones de NaCl: 0,8; 1,2 y 2,0 mol/l respectivamente a pH menores de 5,0. Mientras que, el colágeno de las pieles de: la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) precipitaron con NaCl 0,9 mol/l (Potaros *et al.*, 2009), y la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) con NaCl 1,5 mol/l (Zhang *et al.*, 2009). De manera, que la precipitación del colágeno depende de cada tejido y especie.

Se observó algo muy particular con el extracto colagénico obtenido con ácido acético al 5,0% v/v, en primer lugar, se precipitó menor cantidad con respecto al colágeno extraído a 1,5% v/v y se solubilizó en agua a temperatura ambiente formando un gel con mucha facilidad; esto podría deberse a que al aumentarla concentración de ácido se originó una posible desnaturalización parcial del colágeno. Cuando este proceso ocurre, la triple hélice  $\alpha$  pierde su estructura helicoidal por la disociación de los enlaces de hidrógeno entre las cadenas polipeptídicas (Cho *et al.*, 2005).

### Determinación de humedad

La determinación del contenido de agua, analíticamente llamado humedad, es uno de los análisis más importantes, utilizados en el proceso y control de alimentos para su comercialización, debido a que se garantiza su estabilidad. El análisis de humedad se determina por la pérdida de la masa que sufre el alimento cuando se somete a una combinación de tiempo y temperatura adecuada, y el material que se obtiene se conoce como residuo sólido. El porcentaje de humedad varía entre un 60 y 95% en los alimentos naturales (Tirado *et al.*, 2015).

El promedio del porcentaje de humedad obtenido para los extractos colagénicos de 1,5 y 5,0% v/v en ácido acético fue de 90,053 y 90,971% respectivamente (Tabla 3 y 4), estos resultados coinciden con los reportados para diferentes tipos de alimentos naturales (Tirado *et al.*, 2015 y García *et al.*, 2012).

Existe mayor porcentaje de humedad en el producto que se extrajo a concentración de ácido 5,0% v/v y esto implica que contiene menor cantidad de residuos sólidos (9,029%), mientras que el colágeno que se solubilizó en ácido con menor concentración presentó mayor porcentaje de materia seca (9,937%) y menor porcentaje de humedad.

Tabla 3. Determinación del porcentaje de humedad y de materia seca del colágeno de la piel de la cola *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v.

Masa(g) +/- 0,0001	% de Humedad	% de residuos sólidos
0,7968	92,420	7,58
1,0657	88,480	11,52
1,0190	89,260	10,74
Promedio	90,053	9,937

De las referencias científicas revisadas sobre trabajos similares a este, no se encontró análisis de porcentaje de humedad en el colágeno. La Norma Técnica Colombiana, NTC 3750, 1995, reportó un valor de 5,0% como el contenido máximo de residuos

sólidos. Tomando en cuenta esta norma, entonces el porcentaje de humedad se puede estimar por diferencia de este valor contra el cien por ciento

Tabla 4. Determinación del porcentaje de humedad y de materia seca de colágeno de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 5,0% v/v.

Masa(g) +/- 0,0001	% de Humedad	% de residuos sólidos
0,5361	89,330	10,670
0,5968	91,150	8,850
0,1652	92,433	7,567
Promedio	90,971	9,029

De allí que se toma como parámetro de referencia el 95,0 % para contenido de humedad en colágeno, que resulta estar por encima de los valores obtenidos en esta investigación.

#### **Análisis de algunos elementos presentes en el colágeno cualitativo por Espectroscopía de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES)**

Se realizaron análisis cualitativos de metaloides (Al), metales (Zn, Pb, Co, Cd, Cr, Hg, Ni, Fe, Cu, Mn) y no metales (Si) en el colágeno de la piel del atún (*T. atlanticus*) extraídas con ácido acético 1,5 y 5,0% v/v. El término “metal pesado” se refiere a aquellos metales de la tabla periódica cuya masa específica es superior o igual a 5,0 g/cm<sup>3</sup> cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20, excluyendo generalmente a los metales alcalinos y alcalino-térreos (Tiller, 1989). El término resulta impreciso si se tiene en cuenta las propiedades físico-químicas de los elementos, especialmente las propiedades iónicas que definen la capacidad de acomplejamiento y las propiedades biológicas. De acuerdo con Tiller (1989), la denominación de metal pesado puede ser utilizada para referirse de forma global a cualquier metal que sea contaminante ambiental. Junto a estos, hay otros elementos químicos que, aunque son metaloides, se suelen clasificar como metales pesados por

presentar orígenes y comportamientos asociados, como el caso del astato(As) y antimonio(Sb).

En los seres vivos, se diferencian dos grupos de metales pesados: los esenciales y no esenciales, aunque el límite entre ambos grupos no está claramente delimitado y la lista de elementos biológicamente importantes aumenta con el tiempo (Diez, 2009). Se reconocen como elementos esenciales al: Fe, Mn, Zn, Cu, Co y Mo, como elementos beneficiosos al Ni y Cr, y se consideran que no tienen ninguna función biológica elementos como: Cd, Hg, As y Pb (Brady&Weil,2002). Los metales pesados, ya sean esenciales o no, pueden llegar a ser tóxicos cuando su aporte es excesivo y afectan negativamente el crecimiento y reproducción de los organismos, pudiendo causarles incluso la muerte (Moncayo *et al.*, 2010).

Se midieron las intensidades (cuentas por segundos, cps) con el ICP-OES, de cada elemento de las dos muestras de colágeno extraída y se encontró presencia de Co, Pb,Cd, Ni, Si, Mn, Fe, Cr y Cu y ausencia de los elementos Hg, Zn y Al (tabla 5).

El hierro es un elemento esencial para el funcionamiento de órganos y tejidos de animales superiores, incluyendo peces, debido a su papel importante en el transporte de oxígeno y la respiración celular. Los peces pueden absorber hierro soluble del agua por la membrana branquial y la mucosa intestinal (Lim, y Kleisus, 2000). Sin embargo, el alimento es considerado como la mayor fuente de hierro para los peces debido a las bajas concentraciones de hierro soluble en aguas naturales (NationalResearch Council NRC, 1993).

La presencia de hierro en las muestras de colágeno puede corresponder a los residuos de vasos capilares, que quedaron adheridos a la piel durante el proceso de limpieza. El hierro, también tiene una función de mayor importancia en la síntesis del colágeno. En otras proteínas raramente se encuentran residuos de los aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina, pero si se hallan en el colágeno.

Tabla 5. Análisis cualitativo de varios elementos del colágeno de la piel de la cola de atún (*T. atlanticus*) en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v por ICP-OES.

Elemento	Intensidad (cps)	Intensidad (cps)
	Colágeno soluble	Colágeno soluble
	1,5% v/v	5,0% v/v
Zn	-1317,5	-1770,2
Pb	47,8	21,2
Co	1,2	17,7
Cd	4,6	8,2
Ni	91,8	90,7
Fe	8425,4	4935,1
Si	6823,6	6203,1
Hg	-255,8	-144,2
Mn	1890,4	1842,6
Cr	123,9	64,0
Cu	850,3	659,7
Al	-87,0	-105,7

Los valores negativos significan que los elementos no se encontraron presente.

Se ha demostrado que estos aminoácidos especiales no se incorporan al colágeno durante la síntesis proteica, sino que se producen por acción de la prolilhidroxilasa en presencia de  $\alpha$ -cetoglutarato,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{O}_2$  y ácido ascórbico (Figura 14). El carbono  $\delta$  de un residuo de lisina puede ser hidroxilado en una reacción catalizada por la lisilhidroxilasa, dando un residuo hidroxilisina en una reacción muy similar a la hidroxilación de la prolina. Esto es necesario para que tenga lugar el extenso entrecruzamiento que se producen en las fibras de colágeno mientras se ensamblan en el espacio extracelular. La hidroxilisina se encuentra tanto en la región helicoidal como en las pequeñas zonas no helicoidales terminales, donde tiene un importante papel en la formación de interacciones cruzadas intermoleculares (De Paz, 2006).

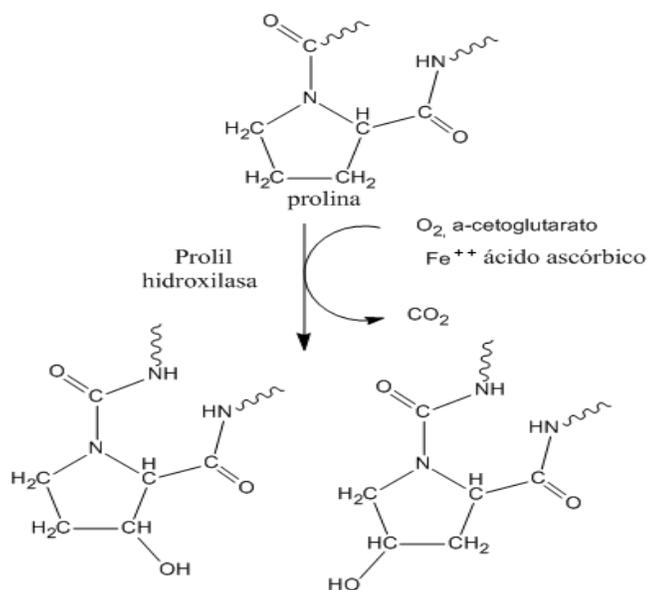


Figura 15. Reacción de prolina a hidroxiprolina promovida por  $\text{Fe}^{+2}$ , que cumple similitud con la reacción de la lisina a hidroxilisina.

Con respecto al silicio (Si), este es el segundo elemento más abundante en la corteza terrestre. La evidencia de éste en diferentes estudios de tejidos sugiere que el silicio es importante en la formación de los huesos de los animales. Además, las investigaciones veterinarias y con animales de laboratorio, han arrojado como resultado que este elemento es necesario para la síntesis del colágeno, pero se desconoce aún el mecanismo por el cual lo efectúa, ya que no existe hasta ahora interés en este sentido (Raya y Aguirre, 2012). La presencia del silicio en la piel del *T. atlanticus* es un indicio de la importancia que debe tener este elemento en la estructura molecular del tejido en estudio.

Algunos organismos como por ejemplo la esponja *Tethya aurantia*, son llamadas esponjas silíceas, ya que depositan sílice en espículas que le dan soporte y la defienden contra depredadores; por ello se podría inferir que el *T. atlanticus* también podría contener en su estructura de su piel silicio unido al colágeno para producir un polímero parecido a los polisiloxanos, comercialmente conocidos como siliconas, este tipo de polímero está formado por oxígeno, silicio y como grupos laterales, radicales orgánicos diversos. Los

enlaces silicio-oxígeno son fuertes y la cadena que forman es muy flexible lo que explicaría en buena medida las propiedades de estos polímeros (Raya y Aguirre, 2012). El colágeno es una proteína con características especiales que sirve de soporte, protección y fuerza a los tejidos donde se encuentra. La piel es el tejido de mayor longitud que se encuentra en el *T. atlanticus* y sus características físicas varían dependiendo de la zona corporal del pez, por ejemplo, el área de la cola es densa en comparación con la del estómago por lo tanto, tendrán funciones distintas en este organismo (Nagai & Suzuki 2000).

El Mn es uno de los metales que también se encontró en las muestras de colágeno. Su presencia es muy importante en la síntesis del mismo. Es el cofactor metálico que junto a las enzimas glucosil y galactosiltransferasas producen los enlaces entre los restos de hidroxilisina, con una unidad de un disacárido formado por un residuo de glucosa que está unido por un enlace (1 $\alpha$ →2) a un residuo de galactosa. La galactosa, a su vez, está acoplada a un grupo hidroxilo de la hidroxilisina por un enlace glucosídico 1- $\beta$  (Figura 15). Aunque la acción de estos disacáridos en la molécula de colágeno es todavía desconocida, se cree que interviene dirigiendo la ordenación de las fibrillas (De Paz, 2009).

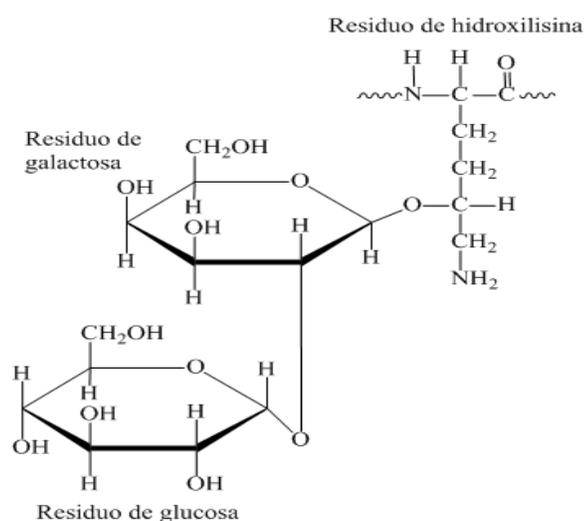


Figura 16. Estructura de un hidrato de carbono unido al colágeno.

Entre los metales pesados que generarían mayores problemas de toxicidad se encuentran: Cd, Cr, Pb, Hg, Ni y Zn. Estos elementos pesados a nivel de los peces, pasan al agua, son absorbidos por los microorganismos del plancton o las algas y de ahí a los peces pequeños, y así al de mayor tamaño que se comen a los pequeños. Cuando consumimos pescados contaminados los metales que contienen llegan de este modo a nuestro organismo (Mustafa, 2003).

En el análisis de ICP de ambos extractos colagénicos se observó que el mercurio, cinc y aluminio (intensidades negativas) no se encontraron presentes. Es muy importante esta observación debido a que el Zn y el Hg, generarían toxicidad al estar presentes en altas proporciones. En la figura 16, se aprecia mejor la distribución de todos los elementos localizados en las muestras analizadas. El Co, se considera un elemento esencial y es importante porque cumple varias funciones biológicas, mientras que el Pb y Cr, son elementos no esenciales, por lo tanto, su toxicidad dependerá de su evaluación cuantitativa.

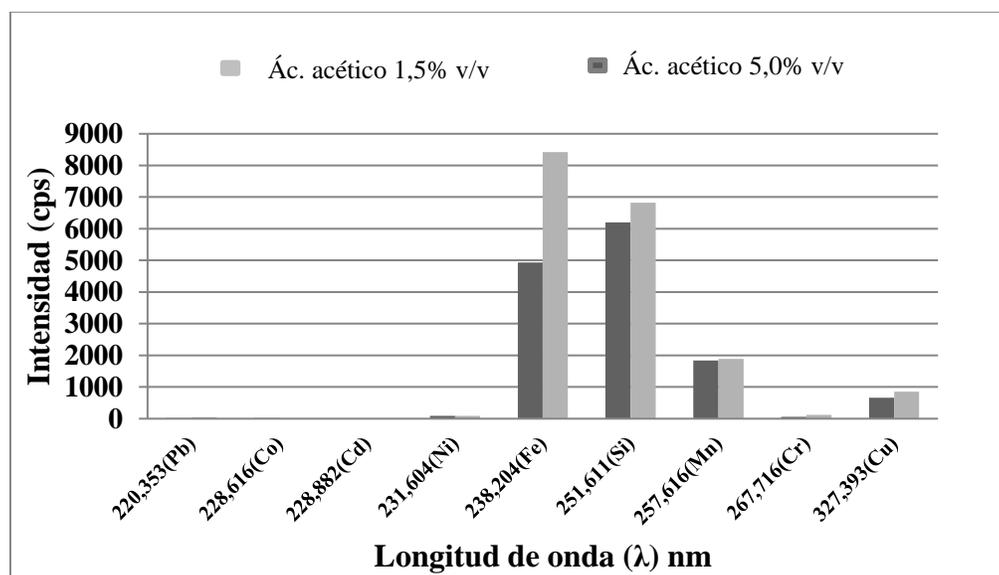


Figura 17. Distribución de los elementos encontrados en las muestras de colágeno de la piel de *T. atlanticus* a 1,5% y 5,0% v/v en ácido acético.

Se han realizado estudios de elementos sobre organismos de aguas internacionales, analizando diferentes tejidos de varias especies acuáticas (Hussein and Khaled, 2014). En la India, se estudió el riñón, hígado y piel por medio de Espectroscopia de Fluorescencia Atómica (FAS, siglas en inglés) del *Cyprinus carpio*, encontrándose Cr, Ni, Cd y Pb (Vinodhini & Narayanan, 2007). Mientras que en el Lago Beymelek (Turquía) se estudiaron: el músculo, la piel y las branquias de varias especies por ICP-OES. Estos estudios reportaron Cu, Mn, Fe, Zn, Mg, Ni, Cr, Co y B (Kazim et al., 2008). En Venezuela, también se han realizado investigaciones para determinar elementos en aguas (marinas, salobres, dulces) y sedimentos, así como en distintos organismos. Mago (2009) analizó la materia suspendida de las aguas superficiales de la zona costera adyacente a la ciudad de Cumaná, hallando que la mayor proporción de metales biodisponibles fueron Cd, Mn, Pb, Fe y Cu, Cr, Ni y Zn. Con relación a este trabajo de investigación y los otros, nombrados anteriormente, se puede señalar que la piel y por ende el colágeno del *T. atlanticus* contiene casi en su totalidad los elementos químicos reportados. El atún es pez que crece de gran tamaño por lo que al consumir peces pequeños que habitan en aguas que contienen elementos químicos, esto ocasionaría la bioacumulación de los mismos por efecto de su magnificación.

Cuando los metales son captados a través del agua, los órganos que principalmente tienden a acumularlos en mayor proporción son las branquias, en cambio, si la vía de captación es a través de la alimentación, el hígado y el riñón son los órganos que van a acumular mayor concentración de metales (Ranaldi & Gagnon, 2010). A pesar de esta teoría, en los trabajos de investigación mencionados se reportó que la piel de los organismos acuáticos también tiene tendencia a acumular los elementos tóxicos o no.

E igualmente, en esta investigación se demuestra, que a través de la extracción del colágeno se puede deducir que la piel contiene los elementos determinados y que fueron solubilizados durante el proceso de extracción con ácido acético 1,5 y 5,0% v/v. No se puede referir el grado de toxicidad sólo con este análisis cualitativo, ya que sería necesario cuantificar estos metales y compararlo con los estándares permitidos por las normas nacionales e internacionales para metales pesados. No se encontraron referencias

bibliográficas sobre determinación de elementos en colágeno de organismos acuáticos para comparar estos resultados.

### **Análisis cuantitativo de plomo (Pb) por ICP-OES**

En Venezuela, y a efectos del consumo humano, el contenido de metales en peces se encuentra regulado por normas nacionales COVENIN: 1087 Sardinias en Conserva, y 1766 Atún en Conserva. Entre los organismos internacionales que regulan estos parámetros en peces se encuentra el *Codex Alimentarius*, según Alinorm 93/18.

En la tabla 6, se encuentran los niveles de plomo determinados por ICP-OES, en los extractos colagénicos obtenidos en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v.

Tabla 6. Análisis cuantitativo de plomo por ICP-OES en los extractos colagénicos solubles en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v

Longitud de onda Pb( 220,353 nm)	
µg/kg de colágeno	
Ácido acético 1,5% v/v	Ácido acético 5,0% v/v
0,0851+/- 0,0001	0,1058+/- 0,0001

Estos resultados representan el promedio de tres mediciones por muestra  
Límite de detección del equipo 1,0-10,0 ppb

Según la FAO/OMS del *Codex Alimentarius Comisión* el nivel límite de Pb es de 0,1 mg/kg en tejido muscular de atún, mientras que el de la Unión Europea (Reglamento, CE N° 1881/2006 modificado por el CE N°629/2008) es de 0,3mg/kg y de 0,5 mg/kg, adoptado por la mayoría de los países para el consumo humano. Estos límites no se pueden comparar con los que se obtuvieron en este estudio, ya que los valores de plomo están reportados en función de los Kg de colágeno y no del tejido. A pesar que no existen referencias bibliográficas científicas, con respecto a los niveles de plomo en el colágeno de piel de peces, al hacer la comparación con los niveles de Pb del tejido muscular según todas las normas mencionadas anteriormente, se pudo observar que en ambas muestras estudiadas (1,5 y 5,0% v/v) los valores fueron 0,0851 y 0,1

$\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente, los cuales estuvieron muy por debajo de los límites reportados, esto quiere decir, que a pesar de que el plomo es extraído desde la piel hacia el colágeno, no representa un potencial problema de toxicidad y este material podría ser utilizado como un producto a nivel farmacológico, cosmetológico o en cualquier otra área clínica que se ha venido evaluando.

### **Determinación de pH**

El pH y la fuerza iónica son factores muy importantes que pueden afectar la solubilidad del colágeno, es decir, se debe tener en cuenta que la solubilidad del colágeno es generalmente mínima a pH isoelectrico (6,6) y aumenta en torno a este punto al aumentar o disminuir el pH del medio. Por otro lado, esta proteína es soluble a fuerza iónica baja, mientras que precipita a fuerza iónica elevada (Luisot, 1977).

La tabla 7 muestra los valores de pH de los extractos colagénicos en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v. Entre los requisitos fisicoquímicos del colágeno según la Norma Técnica Colombiana, NTC 3750 (1995) para uso cosmético, el pH requiere valores de 3-4, por lo que el colágeno extraído con ácido acético 1,5% v/v de la piel de cola del *T. atlanticus* satisface esta norma, que es la mínima que debe cumplirse para aplicarse en productos cosméticos. El pH del colágeno extraído con ácido acético a 1,5% v/v fue 3,39 y el 5,0% v/v de 2,55, el primero presentó insolubilidad en agua y el segundo fue parcialmente hidrosoluble. Esta condición se debe a que el colágeno obtenido a 5,0% v/v se encontró más alejado del pH isoelectrico (Luisot, 1977).

En la industria farmacéutica y cosmética tiene gran importancia la aplicación de colágeno, gracias a las bondades que tiene esta proteína. Se ha utilizado para la prevención y tratamiento de arrugas, en la producción de parches para heridas y en el desarrollo de medicamentos con liberación de los principios activos.

Tabla 7. pH de los extractos colagénicos de la piel de la cola de *T. atlanticus* solubles en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v

pH	
Ácido acético 1,5% v/v	Ácido acético 5,0% v/v
3,39 +/- 0,01	2,55 +/- 0,01

Estos resultados representan el promedio de tres muestras

A partir de los 25 años de edad se va perdiendo colágeno del organismo humano, lo que va produciendo señales de envejecimiento. Para disminuir este efecto, se han desarrollado diferentes productos a base de colágeno, que permitan detener en cierta medida este proceso o por lo menos retrasarlo. Es así como se han creado productos como cremas, geles, lociones y mascarillas, además de inyecciones subcutáneas para aplicarse directamente en la piel; además, la proteína colagénica se encuentra extendida en gran parte del organismo por lo que también hace parte de la salud del cabello, por esto se han desarrollado productos como shampoo, acondicionadores y tratamientos capilares a base de colágeno, que eviten la aparición de signos de debilitamiento como la horquilla (González y Rodríguez, 2004 y Serrano, 2011).

### **Análisis de RMN-<sup>1</sup>H**

Se realizaron análisis de RMN-<sup>1</sup>H a las muestras de colágenos, con el fin de proporcionar información sobre la posición relativa de los átomos de hidrógeno en el esqueleto polipeptídico (Figura 17).

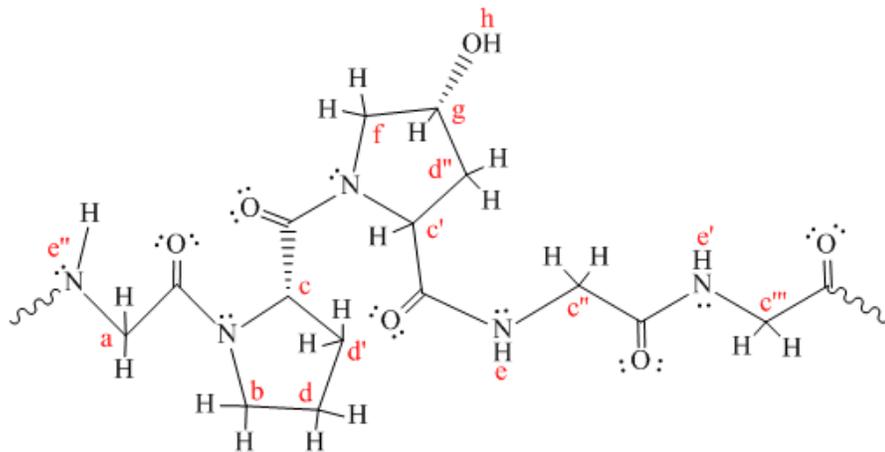


Figura 18. Estructura molecular de un fragmento de un polipéptido e indicación de los protones significativos en un espectro de RMN.

Los espectros obtenidos constituyen una fuente de información valiosa para la caracterización de este polímero de origen natural. Debido a la poca información reportada sobre RMN-<sup>1</sup>H de colágeno en piel de peces, se realizaron comparaciones con los sistemas de spin que forman los aminoácidos individuales en la proteína (Figura 18) (Tamilmozhi, 2013).

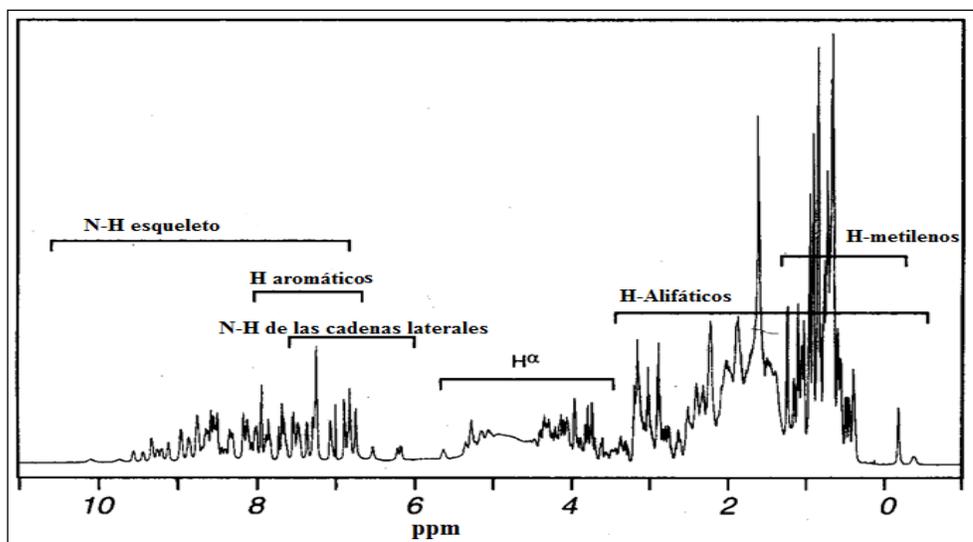


Figura 19. Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) estándar de protones de los aminoácidos de un polipéptido (Luo *et al.*, 2015)

Cuando los polipéptidos se disuelven en agua deuterada ( $D_2O$ ) los protones lábiles se intercambian por Deuterio, y los espectros contienen sólo líneas de resonancia de los átomos de H no lábiles unidos a átomos de carbono (Wüthrich, 1986). Es decir, que los protones que se pueden observar en un espectro RMN de proteínas, son protones localizados en el interior de la misma, donde la accesibilidad del disolvente es restringida (protones de las cadenas laterales de los aminoácidos), mientras que los protones que están situados en la superficie de la proteína, se intercambian extremadamente rápido con el agua deuterada para poder ser observados (Del Río, 2002).

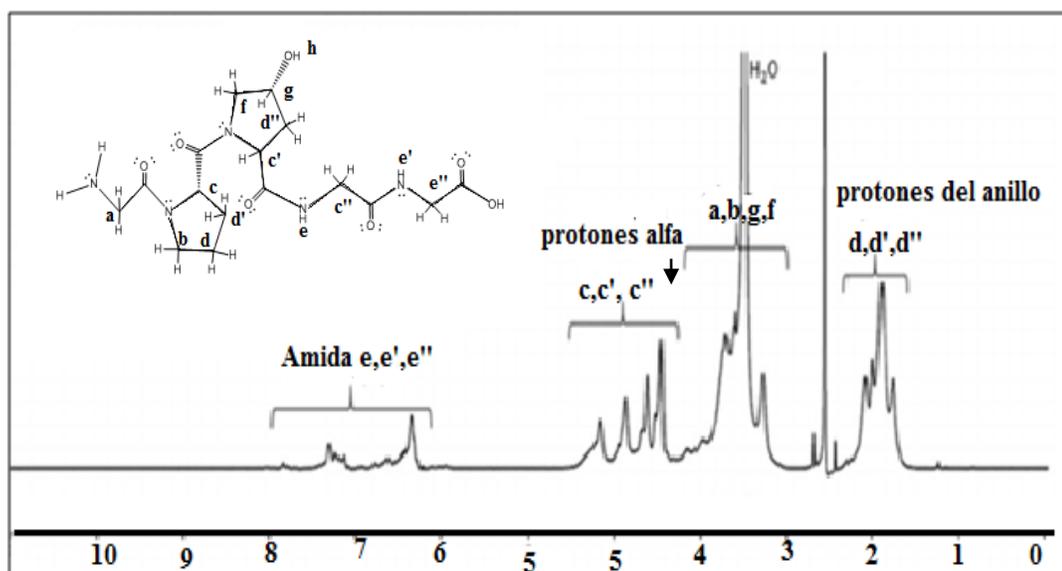


Figura 20. Espectro de RMN- $^1H$  de colágeno de origen bovino (Luo *et al.*, 2015)

Los RMN- $^1H$  de las muestras de colágeno soluble en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v fueron realizados usando muestras deshidratada a 50 °C, y cada una fue analizada a temperatura variable (25, 35, 45, y 55 °C). La figura 20, muestra el espectro de RMN- $^1H$  del extracto colagénico (1,5% v/v en ácido acético) a 25 °C, y en este se indican las regiones típicas de interés de un esqueleto polipeptídico con los enlaces de hidrógeno respectivos (Cai *et al.*, 2014).

La señal a desplazamiento químico  $\delta$  7,2 aproximadamente, representa la región del enlace (N-H) en las amidas (CONHR y CONH<sub>2</sub>), cuyos H están etiquetados como e, e', e'' en la estructura del fragmento polipeptídico. Luego, aparecen los protones  $\alpha$  (c, c' y c'') provenientes de los residuos de los amino ácidos (AA) de la secuencia peptídica, los cuales están ubicados en los desplazamientos  $\delta$  3,1 a 4,2 ppm y los protones de los metilenos (d, d' y d'') del anillo de la pirrolidina, cuyos desplazamientos fueron  $\delta$  0,5-1,7 ppm. Finalmente, se observan los protones alifáticos, a, b, f, g, h, con  $\delta$  1,8 a 2,8 ppm aproximadamente. Estas regiones que especifican a los protones en un polipéptido de las proteínas también fueron reportadas por Del Rio, 2002, Lula *et al.*, 2011 y Lou *et al.*, 2015.

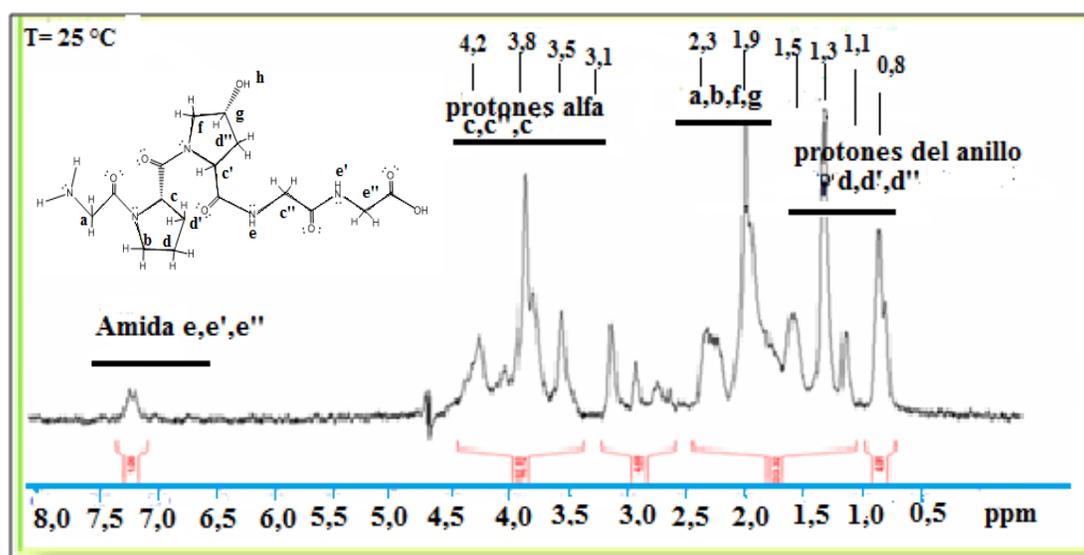


Figura 21. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v, T=25 °C.

A continuación se presentan los RMN-<sup>1</sup>H del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v tomados a temperaturas 35, 45 y 55 °C, figuras 21, 22 y 23.

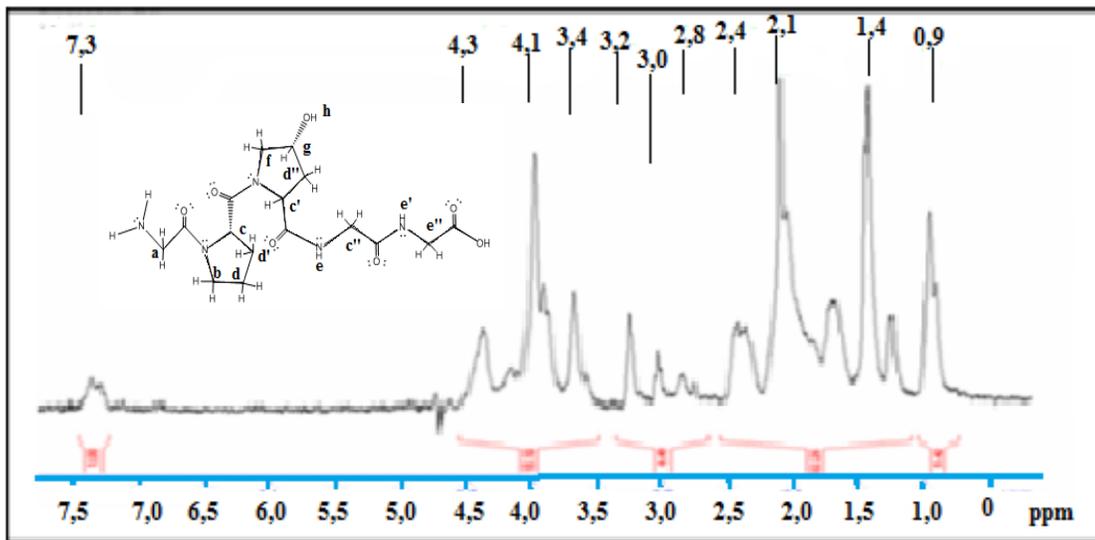


Figura 22. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v,  $T=35^\circ\text{C}$ .

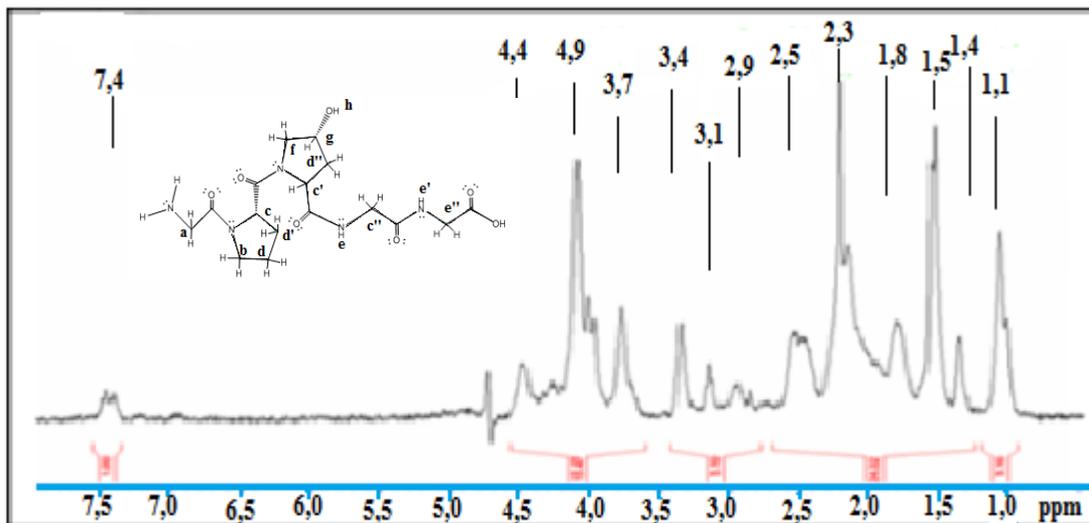


Figura 23. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v,  $T=45^\circ\text{C}$ .

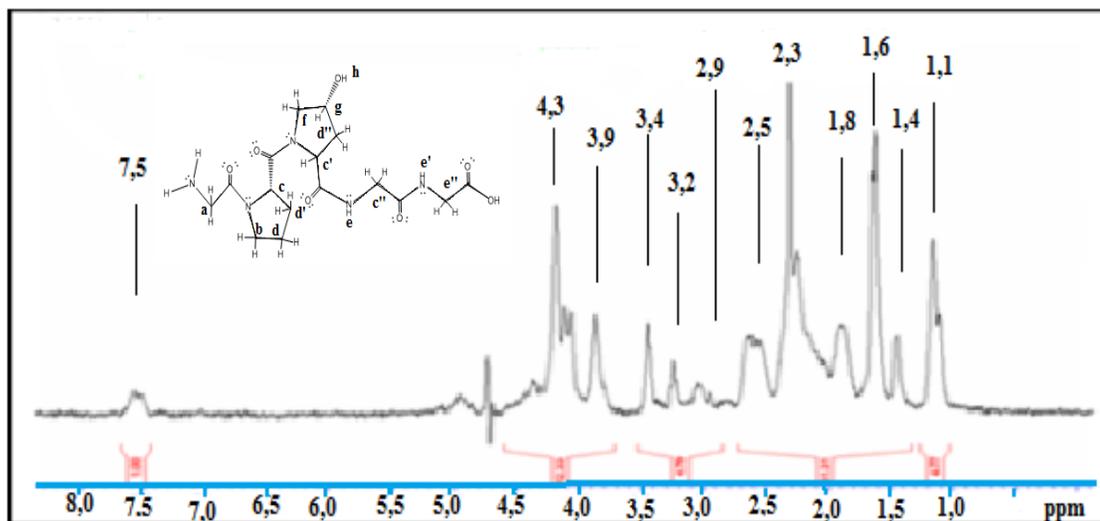


Figura 24. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v,  $T=55^\circ\text{C}$ .

Todos los espectros presentaron las mismas regiones de desplazamiento de los H de los aminoácidos que puede contener una secuencia proteica (figura 18), ubicadas entre 1,0-4,0 y 7,0-8,0 ppm aproximadamente. Las diferentes señales de protones en las zonas correspondientes de los espectros son coincidentes con las del espectro del colágeno de origen bovino (Figura 19). Estos resultados podrían indicar que el uso de ácido acético a 1,5% v/v en la extracción no afectó la estructura base del colágeno del *T. atlanticus*. Por otro lado, se observó una diferencia entre los espectros, determinada por pequeños cambios en los desplazamientos de los H hacia campo bajo, al aumentar la temperatura de análisis (figura 24). Los monómeros de tropocolágeno se organizan en fibras de cinco bandas y subsecuentemente en fibras mayores, y esta estructura se mantiene unida por interacciones hidrófobas y electrostáticas, debido al aumento gradual de la temperatura pueden ocurrir disociaciones parciales de las interacciones de hidrógeno entre las fibras colagénicas y las moléculas de agua, lo que conlleva a un desapantallamiento de los núcleos de protones haciendo que las desplazamientos de las señales aparezcan a campos ligeramente bajos (De Paz, 2006). Estas disociaciones no son lo suficientemente grandes en número para desnaturalizar la estructura molecular del colágeno, por lo que la misma se mantiene.

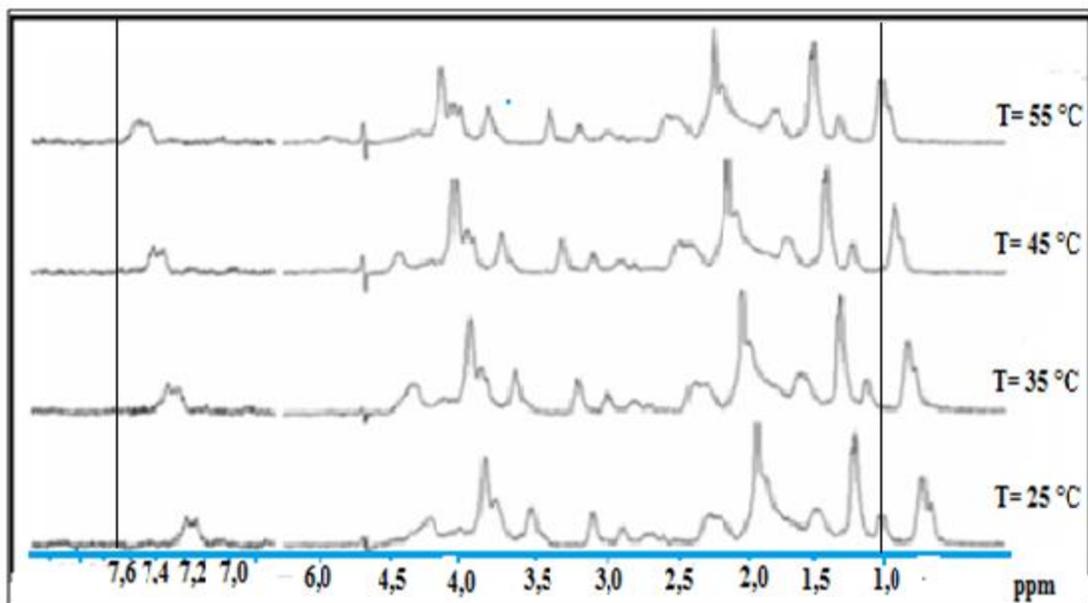


Figura 25. Superposición de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, D<sub>2</sub>O) del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v.

De la misma forma se realizaron análisis de RMN-<sup>1</sup>H para la muestra del extracto colagénico en ácido acético 5,0% v/v. La figura 25, muestra el espectro a 25 °C (300 MHz, D<sub>2</sub>O).

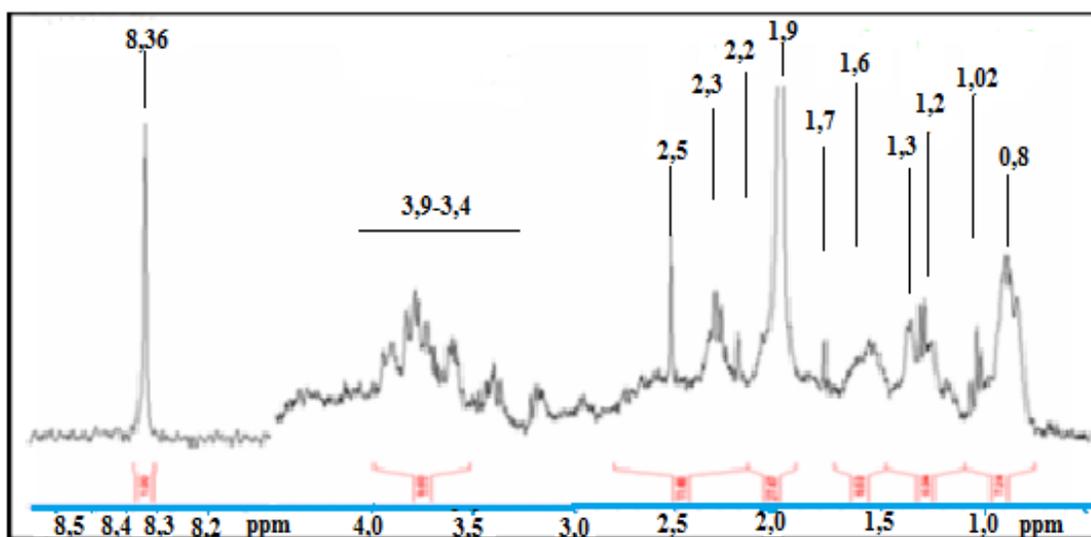


Figura 26. Ampliación de las regiones de interés (0,8-4,0 y 8,2-8,6 ppm) del espectro de RMN-<sup>1</sup>H(300 MHz, D<sub>2</sub>O) del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 5,0% v/v, T=25 °C.

En este espectro la señal de los protones del enlace (N-H) de las amidas se encontró en el desplazamiento químico  $\delta$  8,36 ppm, a campos más bajos en correlación con la muestra de colágeno a 1,5% v/v (7,2 ppm). Se han reportado desplazamientos para este tipo de protones en un rango de  $\delta$  7,0-8,6 ppm aproximadamente (Lula, 2011). Lo que hace suponer la existencia de enlaces peptídicos y, por consiguiente, estructura de proteínas o polipéptidos en la muestra analizada. Las señales de los protones (c, c', c'') pertenecientes a los residuos de los AA de los carbonos  $\alpha$  de ambos colágenos 5,0% y 1,5% fueron muy parecidos  $\delta$  3,4-4,0 y  $\delta$  3,1-4,2 ppm respectivamente. En cuanto a los protones metílicos de los anillos de la pirrolidina marcados como d, d' y d'', en el fragmento de la secuencia peptídica, se observó en el rango  $\delta$  0,8-1,7 ppm y, finalmente, los protones alifáticos etiquetados como: a, b, f, g y h correspondieron al  $\delta$  1,0-2,8 ppm, los valores de los desplazamientos de estas dos últimas regiones de protones estuvieron cercanas a la muestra de colágeno 1,5% v/v.

Todas las zonas de protones identificadas tienen concordancia con las identificadas en el colágeno de origen bovino (Figura 19). La diferencia entre este espectro y los de la muestra de colágeno 1,5 % fue la gran cantidad de señales en cada una de las regiones de protones, esto puede ser consecuencia del aumento en la concentración de ácido acético durante el proceso de extracción, que posiblemente genera algunas disociaciones de las interacciones de hidrógeno y/o enlaces covalentes más lábiles de la molécula de colágeno (Tamilmozhi *et al.*, 2013). Por tal motivo, existirá un número significativo de núcleos de hidrógenos expuestos a la radiación electromagnética y, de esta forma, se observarán en el espectro mayor cantidad de señales por cada zona de protones. Uno de los factores que afecta la degradación o desnaturalización de las proteínas es la concentración del ácido (Del Rio, 2002, Lula *et al.*, 2011 y Lou *et al.*, 2015), y en esta investigación se logró evidenciar la influencia del aumento de la concentración del ácido acético (1,5 a 5,0% v/v) y por ende un aumento de pH (3,8 a 2,5 respectivamente) lo que contribuyó a la desnaturalización parcial del colágeno analizado.

A continuación se presentan los RMN-<sup>1</sup>H del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 5,0% v/v tomados a temperaturas 35, 45 y 55 °C, figuras 26, 27 y 28.

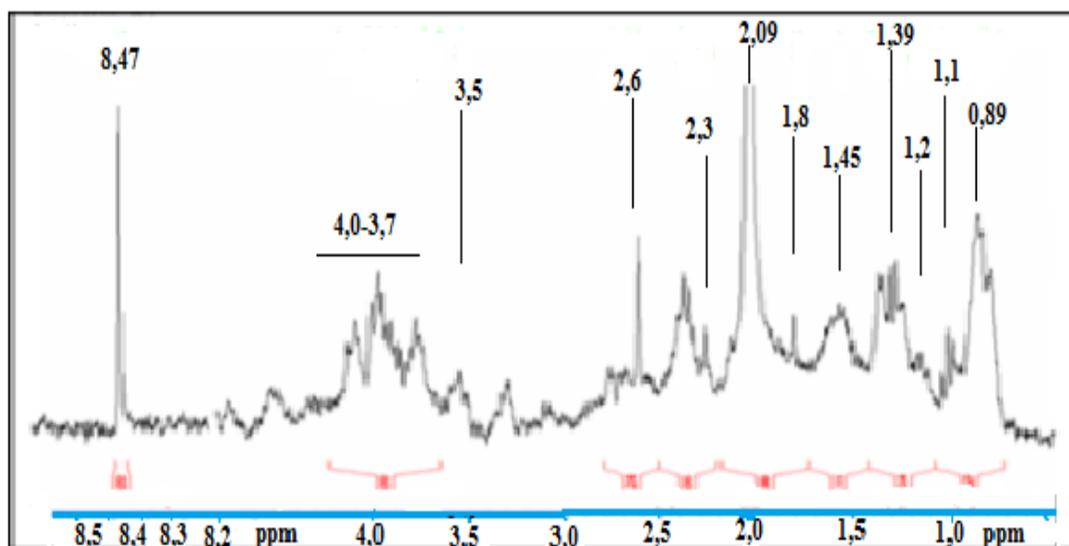


Figura 27. Ampliación de las regiones de interés ( $\delta$  0,9-4,5 y 8,2-8,5 ppm) del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300MHz, D<sub>2</sub>O) del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 5,0% v/v, T=35 °C.

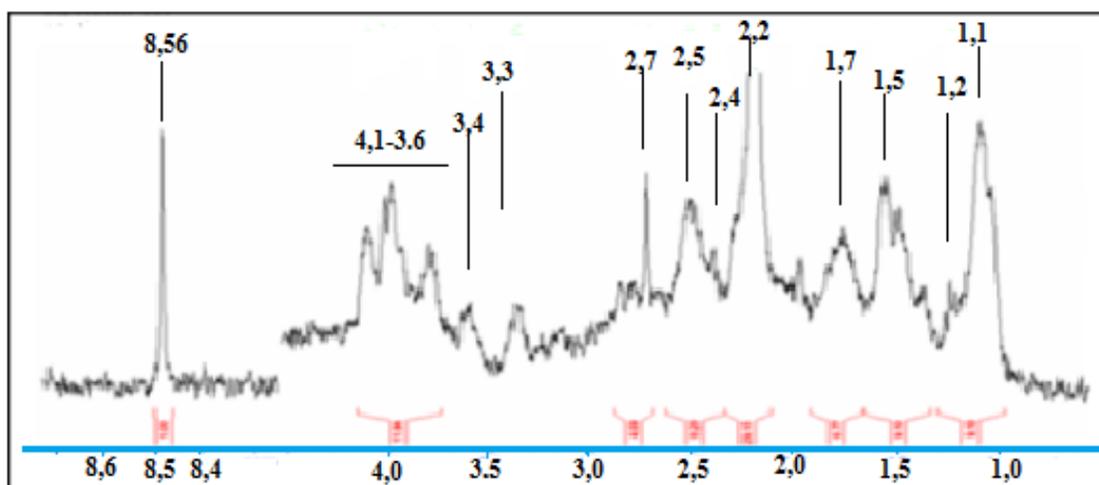


Figura 28. Ampliación de las regiones de interés ( $\delta$  1,0-4,2 y  $\delta$  8,4-8,8 ppm) del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300MHz, D<sub>2</sub>O) del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 5,0% v/v, T=45 °C.

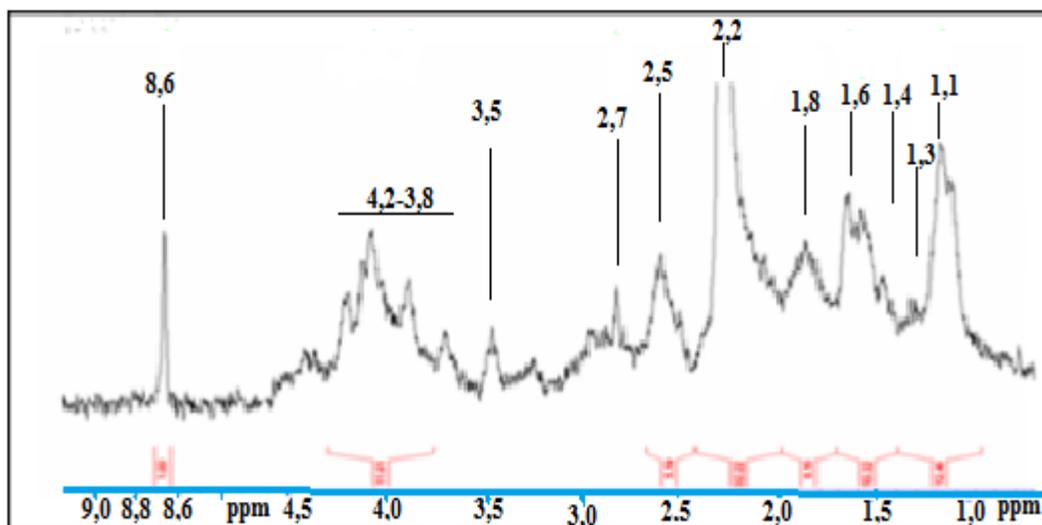


Figura 29. Ampliación de las regiones de interés ( $\delta$  1,1-4,5 y 8,3-9,0 ppm) del espectro del RMN- $^1\text{H}$  del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 5,0% v/v,  $T=55\text{ }^\circ\text{C}$

Estos tres espectros mostraron las mismas señales de las regiones de los protones de una secuencia peptídica localizadas en el colágeno de origen bovino. También se observa que, todas las señales presentaron un ligero desplazamiento a campo bajo con respecto al espectro de RMN a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , pero este desplazamiento también se presentó en los espectros de la muestra de colágeno extraída con ácido acético 1,5% v/v. Con la superposición de los espectros de la muestra de colágeno a 5% v/v (figura 29) se pudo observar este desplazamiento con el aumento de la temperatura, cada  $10\text{ }^\circ\text{C}$ . Tal efecto puede deberse a la disociación de algunas interacciones de hidrógeno por pérdida de humedad, lo cual conllevaría a un apantallamiento de los núcleos de protones, haciendo que las señales aparezcan a campo más bajo con el aumento de la temperatura (Lula *et al.*, 2011).

Por otro lado, bajo estas mismas condiciones de temperatura, también se observó una disminución de la intensidad de la señal de los protones del enlace N-H de las amidas, cuyo desplazamiento se encontró en un rango de  $\delta$  8,0-8,6 ppm. Esto sugirió una posible disminución de las señales emitidas por los protones de las interacciones de hidrógeno, y como consecuencia de la menor cantidad de núcleos formando este tipo de interacción, al quedar disociados de las moléculas de agua y/o enlaces covalentes más

lábil de la estructura colagénica, producto del aumento en la concentración del ácido acético.

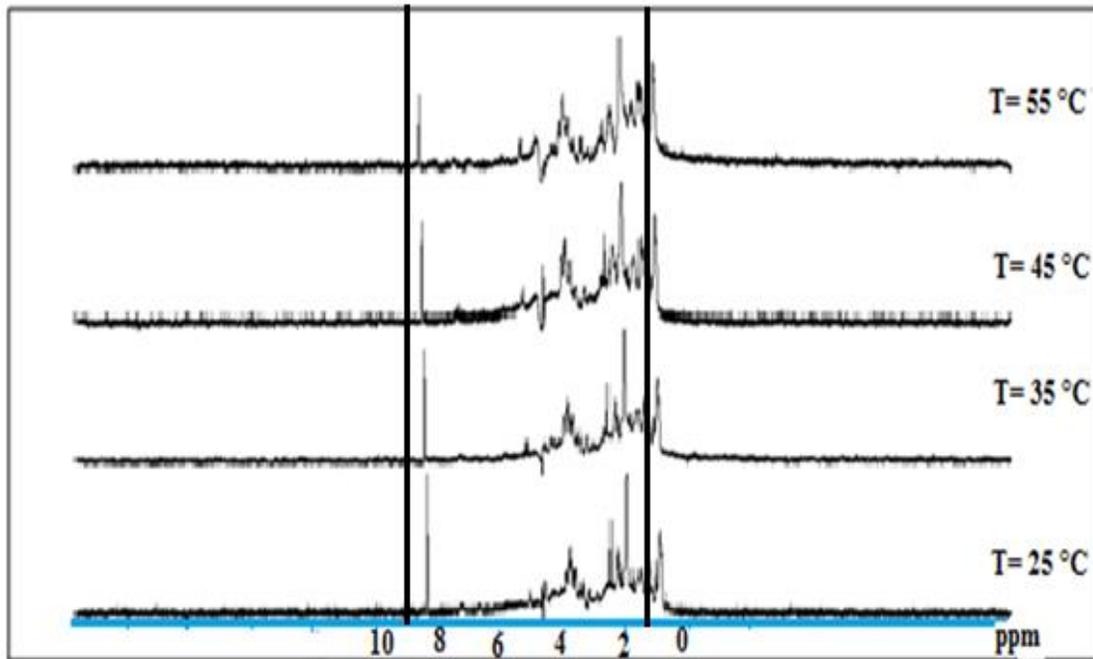


Figura 30. Superposición de los espectros de RMN de 1H del extracto colagénico de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 5,0% v/v.

Al aumentar el pH en la solución colagénica se promueve la desnaturalización parcial de esta proteína, y puede observarse en la gran cantidad de picos y el ensanchamiento en todas las regiones de los protones observados en los espectros de RMN de la muestra al 5,0% v/v. La desnaturalización total o parcial de una proteína se refiere a la ruptura de los enlaces que mantenían sus estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria, conservándose solamente la primaria, uno de los principales efectos de este fenómeno es la pérdida de la actividad biológica (Scopes, 1993 y Lou *et al.*, 2015).

#### **Análisis por Espectroscopia Infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF).**

En los espectros de IR-TF se pudieron analizar e identificar los grupos funcionales característicos del esqueleto polipeptídico y su estructura molecular. Las bandas significativas son: amida A y B, I, II y III. Cada una de estas bandas se encuentra ubicada

en un rango desplazamiento químico específico (tabla 8). En la figura 30, se representa el espectro de infrarrojo de la piel de la cola de atún ácido acético 1,5% v/v a temperatura de 30°C.

Tabla 8. Regiones estándar del espectro infrarrojo de colágeno de la piel en peces (Barraza,*et al.*, 2013 y Lee*et al.*,2016)

Región	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Observaciones
Amida A	3300	Vibración por estiramiento del enlace N-H
Amida B	2925	Vibración por estiramiento asimétrico del enlace CH <sub>2</sub>
Amida B	2850	Vibración por estiramiento simétrico del enlace CH <sub>2</sub>
Amida I	1640-1670	Vibración por estiramiento del enlace C=O
Amida II	1530-1590	Vibración por deformación del enlace N-H
AmidaII	1450	Vibración por estiramiento del N-H
Amida III	1260	Vibración por estiramiento del enlace C-N

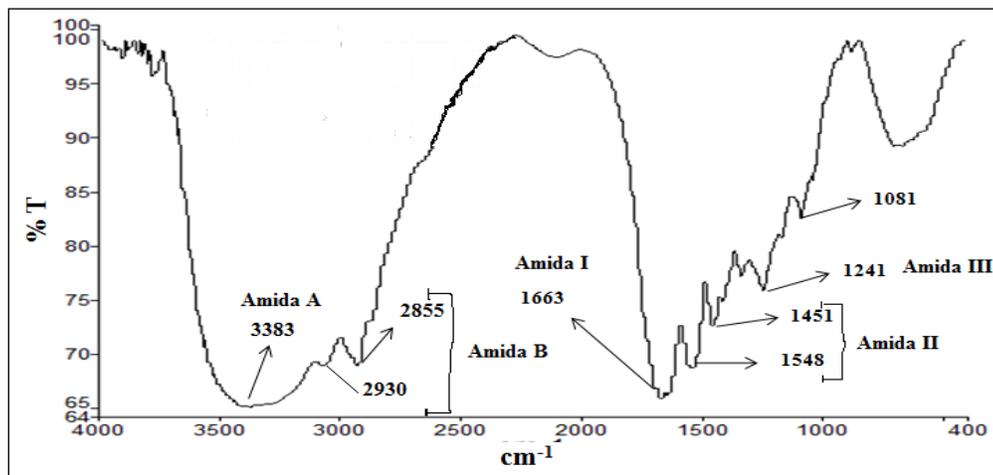


Figura 31. Espectro de Infrarrojo de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v a  $T=30^{\circ}\text{C}$ .

En este espectro se localizaron varias bandas, la de la amida A fue detectada a  $3383\text{ cm}^{-1}$  y se asoció con la vibración de estiramiento N-H. Es importante notar el ensanchamiento de esta banda por la presencia de grupos O-H que se solapan con la absorción del grupo N-H. Esto indica la presencia de enlaces de hidrógeno en la muestra de colágeno. Es sabido que se produce estiramiento (stretching) de N-H libre en el intervalo  $3400\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$  y cuando este grupo es de un polipéptido está involucrado en las interacciones de hidrógeno, por lo que la posición de la banda se desplaza a frecuencias más bajas (Sasmal y Begam, 2014). En síntesis, se observa que los grupos N-H del colágeno soluble en ácido de la piel de *T. atlanticus*, están relacionados con las interacciones de hidrógeno, implicando que la muestra tiene suficiente humedad para mantener este tipo de interacciones.

Investigaciones previas muestran que, en la piel de *Sapiellainermis* (Shanmugamet al., 2012) y de la piel dorsal de *Thunnusalbacares* (Wooet al., 2008) solubles en ácido acético, estas bandas se encontraron a  $3444$  y  $3427\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Se puede observar que estos valores están dentro de los parámetros indicados cuando el polipéptido contiene menos interacciones de hidrógeno del grupo N-H que la del colágeno de este trabajo de investigación.

Las bandas siguientes son las de la amida B, las cuales están relacionadas con el estiramiento simétrico ( $2920\text{ cm}^{-1}$ ) y asimétrico ( $2853\text{ cm}^{-1}$ ) del grupo  $\text{CH}_2$  (Sasmal y Begam, 2014). En la piel del *T. atlanticus* se detectó la banda a frecuencias de  $2930$  y  $2855\text{ cm}^{-1}$  y en la *S. inermis* estas señales se ubicaron a  $2923$  y  $2843\text{ cm}^{-1}$ , ambas especies presentan casi las mismas frecuencias de absorción para este grupo funcional, mientras que en el *T. albacares* no se identificaron tales bandas. La banda de la amida I se encuentra a frecuencias de  $1600$ - $1700\text{ cm}^{-1}$  asociadas principalmente a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) a lo largo del esqueleto polipeptídico, siendo un marcador sensible de la estructura secundaria del polipéptido (Payne & Veis, 1988 y Sarver & Krueger 1991). Para los colágenos del *T. atlanticus* la frecuencia fue de  $1663\text{ cm}^{-1}$  y los de *S. inermis* y *T. albacares*  $1646$  y  $1651\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, lo cual coincide con los valores para esta banda. Tal observación significa que el colágeno del *T. atlanticus* mantiene su estructura secundaria durante el proceso de extracción con ácido acético y al secarlo a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ .

Además, las señales de la amida II, en el colágeno de la muestra analizada se encontraron a  $1548$  y  $1451\text{ cm}^{-1}$ , comparables a la *S. inermis* ( $1542$  y  $1458\text{ cm}^{-1}$ ) y *T. albacares* ( $1544\text{ cm}^{-1}$ ). Se han reportado estas bandas para el colágeno en pieles de peces a frecuencias estándar de  $1537$  y  $1450\text{ cm}^{-1}$  (Nagai et al., 2010), la amida II es la banda que pertenece a las vibraciones de flexión (bending) del enlace N-H acoplado con el estiramiento C-N y la vibración de flexión del  $\text{CH}_2$ . Esta amida II es sumamente importante en el espectro IR debido a que es la que caracteriza a los arreglos helicoidales en el colágeno, por lo tanto estamos frente a un colágeno con su estructura base, la hélice  $\alpha$  o tropocolágeno, conservada durante el proceso de extracción.

La amida III es compleja, y se deriva de absorciones que se originan por el movimiento vibracional del estiramiento del grupo C-H del esqueleto polipeptídico con residuos de glicina y prolina en sus cadenas laterales (Nagai et al., 2015). En el colágeno del *T. atlanticus* se determinó una frecuencia de  $1241\text{ cm}^{-1}$ , similar al valor reportado para el *S. inermis* ( $1249\text{ cm}^{-1}$ ) y en *T. albacares* ( $1240\text{ cm}^{-1}$ ) (Figuras 31 y 32).

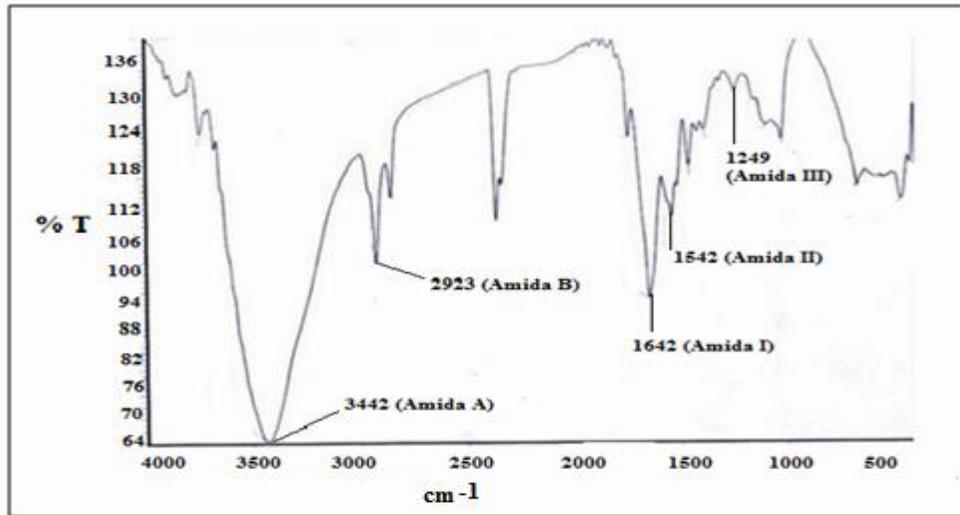


Figura 32. IR-TF del colágeno de la piel de *Sapiellainermis* soluble en ácido acético (Shanmugamet *al.*, 2012)

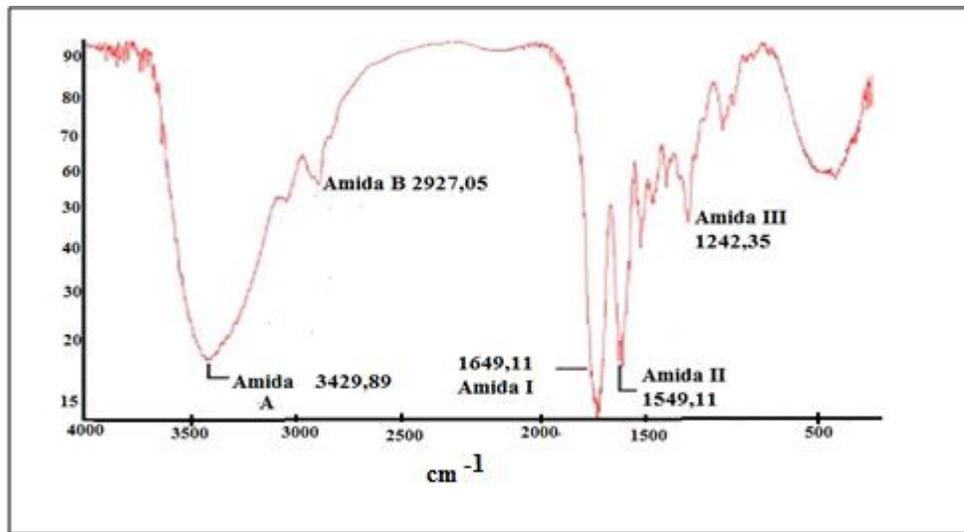


Figura 33. IR-TF del colágeno de la piel de *T. albacares* soluble en ácido acético (Woo & Yu, 2008)

En el colágeno del *T. atlanticus* se determinó una frecuencia de  $1241\text{cm}^{-1}$ , en el *S. inermis* ( $1249\text{cm}^{-1}$ ) y *T. albacares* ( $1240\text{cm}^{-1}$ ), por lo tanto, se asume la presencia de aminoácidos como glicina y prolina, los cuales son representativos de estructura base del colágeno. Por último se observa una banda  $1080\text{cm}^{-1}$  en el colágeno del *T. atlanticus*,

que se originó por la vibración del estiramiento del enlace C-OH. Esta absorción es proveniente de los enlaces de los carbohidratos con los proteínas (Petiboiset *al.*, 2006). El resultado en esta investigación sugiere que existen enlaces covalentes fuertes entre el colágeno y un carbohidrato. Los cuales se originan de los residuos de hidroxilisina de la cadena polipeptídica por un enlace O-glicosídico. Se ha reportado la presencia de 2-O- $\alpha$ -D-glucosil-O- $\beta$ -D-galactosil-hidroxilisina y de O- $\beta$ -D-galactosil-hidroxilisina. La glucosilgalactosil-hidroxilisina fue encontrada en el cucumbermarino (*Stichopus japonicus*) (Saito *et al.*, 2002).

En la figura 33 se presenta el espectro IR de la muestra de colágeno extraída en ácido acético 1,5% v/v y deshidratada a 40 °C. Este espectro es semejante al anterior, ya que se encontraron las bandas que identifican al esqueleto polipeptídico, las cuales son: amida A, B, I, II y III, representativas de un colágeno con su estructura helicoidal sin desnaturalización. La diferencia entre este espectro y el anterior es que al estar deshidratada a 40 °C presenta menor proporción de agua o humedad, y esto provoca que las bandas tengan mejor definición, como por ejemplo la de la amida A ( $3301\text{ cm}^{-1}$ ) ya que, hay menos solapamiento por la banda del grupo O-H proveniente del H<sub>2</sub>O.

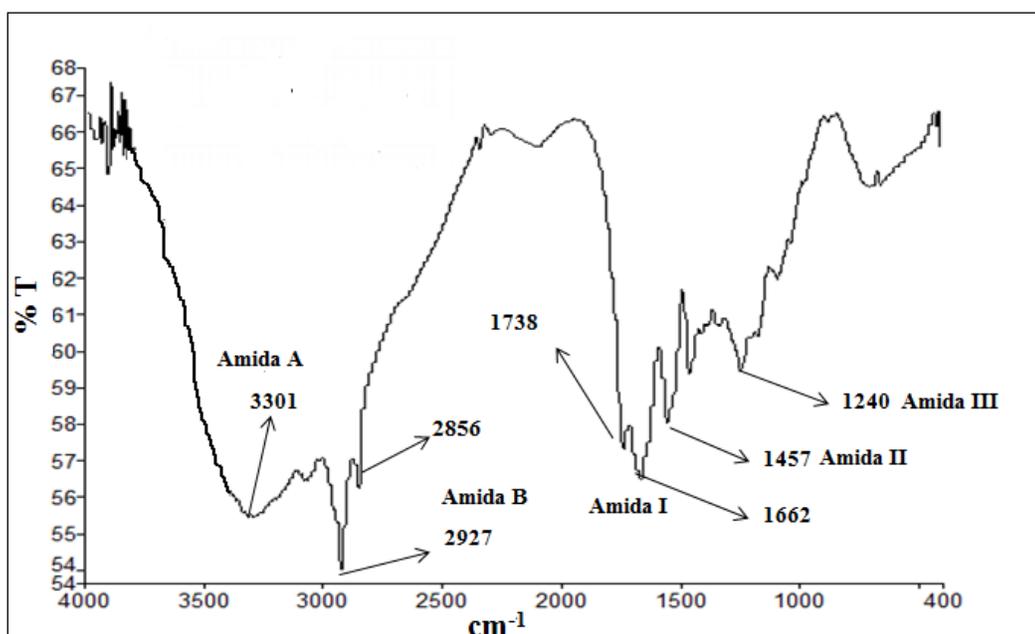


Figura 34. Espectro de Infrarrojo del colágeno de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v a T=40°C

Por el desplazamiento experimentado de esta banda ( $3301\text{ cm}^{-1}$ ), se infiere que todavía existen interacciones de hidrógeno. Además, en este espectro la banda de la amida I se encuentra dobleteada y es atribuida a un grupo C=O de tipo imino, involucrado en interacciones de hidrógeno con agua ( $1662\text{ cm}^{-1}$ ) y una banda de COOH a  $1738\text{ cm}^{-1}$  (Sasmal&Began, 2014), esta última banda no se encontró en la muestra anterior.

Análogamente, en la figura 34 se presentan las bandas encontradas en el espectro de IR del colágeno en ácido acético 1,5% v/v a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A pesar que el colágeno fue deshidratado a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  todavía se pueden observar todas las bandas características de un polipéptido (Amidas: A, B, I, II y III) con su estructura molecular conservada.

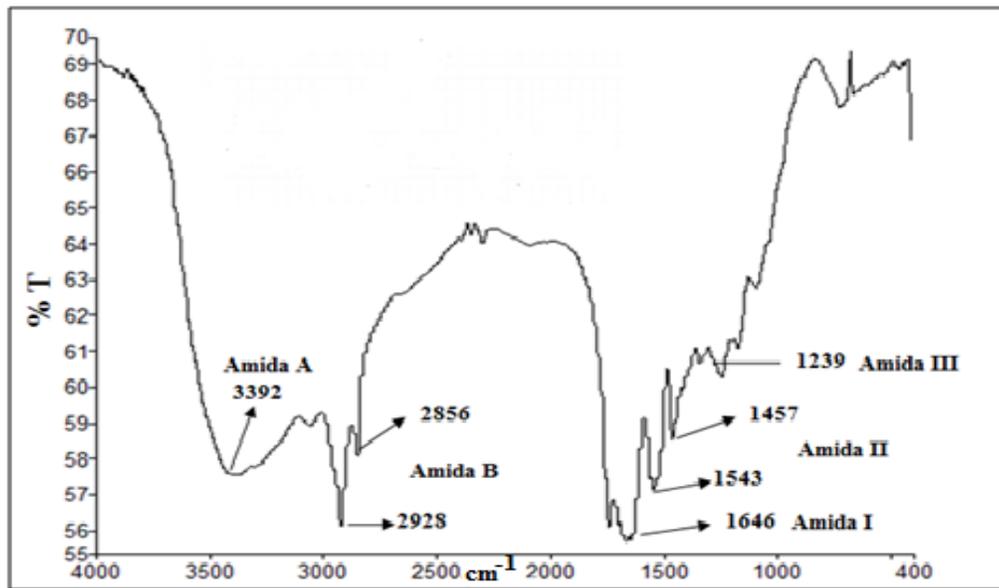


Figura 35. Espectro de Infrarrojo del colágeno de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v a T=50°C.

La banda de amida I aparece con sus dos picos pero con desplazamientos hacia frecuencias más bajas  $1646\text{ cm}^{-1}$ , con respecto a los espectros anteriores; indicando que el colágeno va perdiendo su estructura de triple hélice debido a la disociación de las interacciones de hidrógeno por la deshidratación al aumentar la temperatura.

A continuación se presenta el espectro IR del colágeno a 1,5% v/v en ácido acético, deshidratado a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 35). Este IR no presentó varias de las bandas especificadas para la estructura de un polipéptido como son: la amida A, I, y III. Además se observaron una serie de bandas en un rango de  $3913\text{ a }3455\text{ cm}^{-1}$ , esta región espectral es la de las vibraciones de extensión del enlace X-H, es decir, O-H, N-H, C-H.

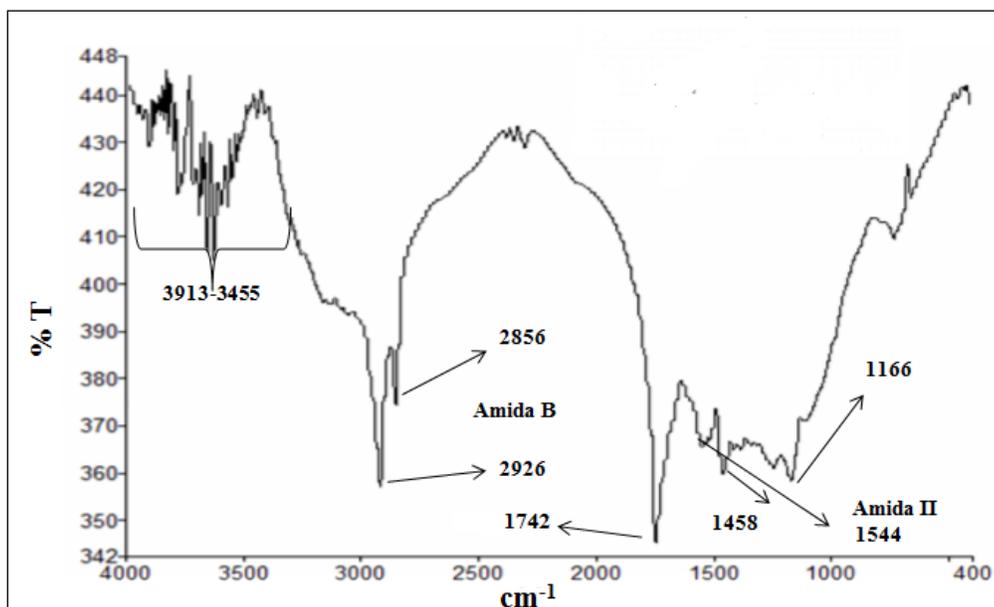


Figura 36. Espectro de Infrarrojo del colágeno de la piel de la cola de *T. atlanticus* soluble en ácido acético 1,5% v/v a  $T=60^{\circ}\text{C}$ .

Tal observación indicó que los H de las fibras colagénicas se encontraban disociadas de las interacciones de hidrógeno con las moléculas de agua, por lo tanto pudieron absorber mayor cantidad de energía durante el análisis. En el caso, de la ausencia de la amida I que es una de las bandas más importante porque es la marca sensitiva de la triple hélice  $\alpha$ , es indicativo de la pérdida de la estructura del tropocolágeno. La presencia de la banda a  $1742\text{ cm}^{-1}$  representa del grupo COOH terminal. Mientras que, sigue existiendo la banda a  $1166\text{ cm}^{-1}$  la cual es la de los carbohidratos unidos al colágeno. De acuerdo a lo observado en este espectro, a  $T=60^{\circ}\text{C}$  ocurre la desnaturalización del colágeno a medida que se deshidrata. De allí que al aumentar la temperatura, cercano a este valor, hace que el colágeno pierda humedad y parte de su estructura original. Los espectros IR demostraron que la estructura química básica del colágeno sufre transformación por pérdida de agua, entre  $50$  y  $60^{\circ}\text{C}$ .

A continuación muestra el contenido de humedad, la temperatura y el tiempo al que se sometió el colágeno soluble en ácido acético 1,5% v/v, para deshidratarlo. Encontrándose que a  $60^{\circ}\text{C}$  (80 min) la proporción de humedad perdida fue la más alta (17 mg) mientras

que a 30, 40, y 50 °C fueron de 10,2 mg (720 min); 13,0 mg (250 min); 14,0 mg (160 min) respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de la temperatura y el contenido de humedad del colágeno soluble en ácido acético 1,5% v/v

Temperatura (°C)	Tiempo(min)	Humedad perdida(mg)
		+/- 0,1
30	720	10,2
40	250	13,0
50	160	14,0
60	80	17,0

Algunos estudios reportaron que, el colágeno de la piel de peces y otros organismos acuáticos alcanzadiferentes temperaturas de desnaturalización, o pierden su estructura base por aumento de la temperatura. Las técnicas usadas fueron generalmente: Calorimetría Diferencial de Barrido y por medio de catalizadores enzimáticos. La temperatura máxima de desnaturalización de colágenos de la piel del unicornio fue similar a la del pargo rojo y de la raya marrón (30,5 °C) (Jongjareonraket *al.*, 2005). Sin embargo, era más bajo que los de los colágenos de la piel del pargo patudo (32,5 °C) (Nalinanonet *al.*, 2007), bagre de canal (32,5 °C) (Liu *et al.*, 2007). Mientras que, la perca del Nilo (36,0 °C), anguila rayo (34,1 °C) (Bae *et al.*, 2008), tambor negro (34,2 °C), dorado (34,0 °C)(Ogawa *et al.*, 2003). Las temperaturas de desnaturalización más bajas de colágeno de la piel de peces de aguas frías y templadas fueron: carpas (28,0 °C) y bacalao(15,0 °C) (Duan *et al.*, 2009). Como se puede observar todas estas especies no superan 40 °C la temperatura de desnaturalización. Sin embargo, el colágeno en la aleta, manto y tentáculo del calamar gigante mostraron una alta resistencia térmica (entre 115-120 °C) siendo la más alta la del área del tentáculo (Torres *et al.*, 2008).

Las diferencias en la temperatura de desnaturalización del colágeno en varios organismos está relacionada con las cantidades de los iminoácidos (prolina e hidroxiprolina)

presentes en el tejido. El contenido de éstos ha demostrado una relación directa con la estabilidad térmica de la proteína, a través de las interacciones de hidrógeno de los grupos hidroxilo de la hidroxiprolina (Jongjareonrak et al., 2005; Sikorski et al., 1984 y Zhang et al., 2007). La prolina estabiliza la triple hélice evitando la rotación del enlace N-C. Sin embargo, el contenido de iminoácidos del colágeno en peces, y la estabilidad térmica, estará finalmente relacionado con la temperatura del agua y su hábitat normal (Foegeding et al., 1996). En esta investigación, el colágeno extraído de la piel de la cola de atún, con ácido acético a 1,5% v/v mostró una temperatura de desnaturalización entre 50 y 60 °C, la cual fue inferior a la presentada por el tentáculo del calamar gigante (120 °C) y superior a la temperatura del colágeno de la piel de varias especies acuáticas nombradas anteriormente, como por ejemplo; el pargo patudo (32,5°C). Lo que infiere que el colágeno del atún de este estudio puede presentar cantidades significativas de los iminoácidos, prolina e hidroxiprolina que estabilizan la triple hélice de esta proteína tan importante en la piel de este organismo y así preservar su existencia en el hábitat donde vive.

### **Cromatografía de papel**

En la cromatografía radial sobre papel de filtro realizada a las dos fracciones de colágeno (1,5 y 5,0% v/v en ácido acético), se observaron dos manchas significativas, una de color rosado-lila intensa, y la otra de color amarillo pálido.

La primera mancha identificada corresponde a la glicina, por ser éste el aminoácido que se encuentra en mayor cantidad en el colágeno y que es determinante en la caracterización de la proteína. Así mismo, la mancha de color amarillo corresponde a la prolina, evidenciando que posiblemente en la secuencia repetitiva de la cadena polipeptídica G-X-Y (Devlin, 2004 y Cox y Nelson, 2007) aminoácido X puede ser la prolina (figura 36).

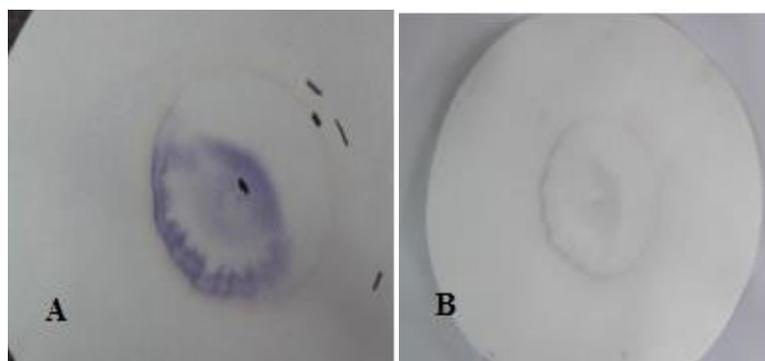


Figura 37. Cromatografía radial de papel, Glicina (Mancha intensa color lila), prolina (Mancha amarilla). A:colágeno soluble en ácido acético 1,5% v/v; B: colágeno soluble en ácido acético 5,0% v/v.

La tabla 10 muestra los  $R_f$  de los aminoácidos patrones y de los colágenos analizados. Los dos componentes que se separaron en la cromatografía radial de papel se observan ligeramente sobrepuestos al ser eluidos por el solvente, debido a que sus  $R_f$  tienen magnitudes relativamente próximas. Los  $R_f$  de la glicina en los colágenos solubles en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v, fueron 0,30 y 0,28 respectivamente, mientras que el  $R_f$  del patrón fue de 0,28 al igual que el reportado para el colágeno de la piel del atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) (Lopez, 2007).

Tabla 10. Comparación de los  $R_f$  de los aminoácidos patrones y de los colágenos

Aminoácidos	$R_f$ patrones	$R_f$ colágeno 1,5% v/v	$R_f$ colágeno 5,0% v/v
Glicina	0,38	0,30	0,28
Prolina	0,50	0,48	0,41

Los  $R_f$  de la prolina fueron: 0,5; 0,48 y 0,41 para: el patrón, colágeno soluble en ácido acético 1,5% y colágeno soluble en ácido acético 5,0% v/v, respectivamente, los cuales tuvieron una pequeña diferencia en comparación al encontrado para el *T. albacares* (López, 2008),  $R_f$  0,30. El colágeno de los tejidos tienen diferentes comportamientos en el medio, por lo tanto un componente puede tener mayor o menor polaridad con el solvente dependiendo de la pureza del colágeno (Scopes, 1993).

## CONCLUSIONES

Se optimizó el proceso de extracción del colágeno de la piel de la cola de atún (*T. atlanticus*), observándose que las mejores propiedades fisicoquímicas del colágeno se obtienen, usando para la extracción ácido acético al 1,5% v/v y la precipitación NaCl al 2,0 mol/l, en lugar del uso de ácido acético 5,0% v/v.

El colágeno soluble en ácido acético 1,5% v/v presentó menor porcentaje de humedad y mayor contenido de residuos sólidos, así como también un pH apropiado para ser usado como producto cosmetológico según las NTC.

El análisis cualitativo de elementos encontrados por ICP-OES (Fe, Mn, y Si), muestra que pueden estar acumulados en la piel para realizar algunas funciones básicas propias del colágeno. Mientras que el contenido de plomo no presentó valores que indicaran toxicidad, según los estándares de calidad.

A través de la RMN-<sup>1</sup>H se identificaron las regiones de los protones de un esqueleto polipeptídico para los colágenos soluble en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v, evidenciándose diferencia en los espectros del colágeno al 5% v/v los cuales presentaron gran cantidad y ensanchamiento de las señales, indicando que el colágeno pudo estar parcialmente desnaturalizado a expensa de las disociaciones de las interacciones de hidrógeno de la cadena polipeptídica, ocasionado por el aumento de la concentración del ácido acético.

Los espectros IR del colágeno soluble en ácido acético 1,5% v/v que el colágeno conserva la estructura helicoidal en las muestras deshidratadas hasta menos de 50 °C. Mediante el estudio de los espectros IR se pudo identificar que el colágeno estudiado fue de tipo I, por sus marcas sensitivas de los grupos funcionales principales para un fragmento polipeptídico, las cuales son denominadas: amidas A, B, I, II III. También a

través de ésta técnica se pudo inferir que la estructura molecular del colágeno se puede desnaturalizar entre 50 y 60 °C.

Con base en la cromatografía radial de papel se identifican los aminoácidos glicina y prolina en ambas muestras analizadas lo que indica que se extrajo colágeno en la piel del *T. atlanticus* y con posible secuencia repetitiva de los aminoácidos Gly-Pr-Y, en la estructura base del colágeno.

Finalmente, la obtención de colágeno a partir de residuos (cabezas, escamas, vísceras, pieles y huesos) provenientes del procesamiento del pescado, puede ser aprovechado para beneficiar a la industria de alimentos, cosmetológica y aquellas dedicadas a la elaboración de materiales biomédicos, de esta manera los pasivos ambientales derivados de las empresas enlatadoras podrían originar productos de mayor valor agregado y a la vez, solucionar un problema de contaminación.

## **RECOMENDACIONES**

Para futuras investigaciones, se recomienda realizar análisis de microscopía electrónica de transmisión y de barrido (MET Y MEB) al material colagénico obtenido, así como también aplicar la técnica de electroforesis para complementar la caracterización de la proteína, y potenciar sus posibles aplicaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

Asher, D. 1999. The transmissible spongiform encephalopathy agents: concerns and responses of the United States regulatory agencies in maintaining the safety of biologics. *Developments in Biological Standardization*.100: 103–118.

Bae, I., and Osatomi, K. 2008. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilized fishes. *FoodChemistry*. 108: 48-59.

Barraza, G.; De la Rosa, L.; Martínez, A., Castillo, H.; Cotte, M. y Álvarez, .E. 2013. La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista. Latinoamericana de Química*. V. 41 (3). México.

Bitar, M. and Salih, V. 2007.Effect of multiple unconfined compressions on cellular dense collagen scaffolds for bone tissue engineering.*J. Mater Sci: Mater Med*. 18: 237–244.

Brady, N. and Weil, R. 2002. The nature and properties of soils.13th ed. Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, NY.

Bryan, C. and Bailey, A. 1978.Molecular weight heterogeneity of the alpha-chain sub-units of collagen.*Biochemical and Biophysical Research Communications*. 43 (2): 231-234.

Cai, H.; Chen, Y.; Cui, X.; Cai, S. andChen, Z. 2014. High-Resolution <sup>1</sup>H-NMR.Spectroscopy of fish muscle, eggs and small whole fish via Hadamard-Encoded Intermolecular Multiple-Quantum Coherence.PlosOne. 9: 1.

Cervigón, F. 1998. Los peces marinos de Venezuela. Fundación Científica Los Roques. Segunda edición. Vol. II. Caracas. Venezuela.

Cho, S.;Gu, M. and Kim, S. 2005. Extraction optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnusalbacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *FoodHydrocolloid*. 19, 221–229.

Codex Alimentarius, Alinorm 93/18. Disponible en:<http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?year=93>.

Conn,E. 1998. *Bioquímica Fundamental*. Editorial Limusa, S.A de CV y Grupo Noriega, México.

Cox, M. y Nelson, D. 2007. *Principios de Bioquímica*. Quinta Edición. Ediciones Omega. Barcelona.

De Paz, P. 2009. Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España.

Del Río, F. 2002. Análisis estructural de proteínas por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Premio Nobel de la Química.

Devlin, T. 2004. *Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínica*. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España.

Diez, J. 2009. Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas. Comisión de doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela.

Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X. and Konno, K. 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*. 112: 702-706.

Elaine, M. 2008. *Anatomía y Fisiología Humana*. Novena edición Editorial Pearson. Madrid, España.

Foegeding, E.; Laneir, T. and Hultin, H. 1996. Characteristics of edible muscle tissues. In: O. R. Fennema (Ed). *Food Chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York. pp. 902-906.

Fratz, P. 2008. Collagen structure and mechanics. *Science Business Media*, LLC. New York.

García, C.; Saul, S. and Gutierrez, N. 2012. Oven microwave use in the determination of moisture content water content: cassava, and am and plantain. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial V* (10): 60-66.

Gelse, K. and Pöschl, E. 2003. Collagens structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55: 1531-1546.

González, J. y Rodríguez R. 2004. Heridas: métodos de tratamiento. Retrieved 4 de abril, 2011. [http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol8\\_1\\_04/san07104.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol8_1_04/san07104.htm).

Guararima, L. y Cadenas R. 2012. La gestión Pesquera y Acuícola en Venezuela: Nuevos paradigmas gerenciales para la sostenibilidad del sector. UCV. Facultad de Farmacia. Caracas-Venezuela.

Hussein, A. and Khaled, A. 2014. Determination of metals in tuna species and bivalves from Alexandria, Egypt. *National Institute of Oceanography and Fisheries*. V.40 (1): 9-17.

Jongjareonrak, A.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Nagai, T. and Tanaka, M. 2005. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanusvitta*). *Food Chemistry*. 93: 475-484.

Karim, A. and Bhat, R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*. 23: 563-576.

Kazim, U.; Yılmaz, E. and Esengül, K. 2008. The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey), *Revista: Microchemical Journal*, 90 (1):67-70.

Kittiphattanabawon, P. and Benjakul, B. 2010. Isolation and characterization of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*. 119: 41519-1526.

Lee, J.; Kang, S.; Kim, Y.; Kim, M.; Heu, M.; Choi, B. and Kim, J. 2016. Comparison of collagen characteristics of sea- and freshwater-rainbow trout skin. *Food Science and Biotechnology*. 25: 131-136.

Lehninger, A.; Nelson, D. y Cox, M. 1995. *Principios de Bioquímica*. Segunda edición. Editorial Omega. Barcelona, España.

Lim, C. y Kleisus, P. 2000. El papel de los minerales traza en la salud de los peces. pp 270-281.

Liu, H.; Li, D. and Guo, S. 2007. Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Chemistry*. 101: 621-625.

López, K. 2007. Aplicación del colágeno extraído del ojo de atún (*Thunnus albacares*) y el esqueleto de lenguado (*Solea vulgaris*) como medio de cultivo. Tesis. Cumaná, Venezuela.

Louisot, P. 1977. *Bioquímica estructural*. Editorial, A.C.; Madrid, España

Lula, L.; De Sousa; F.; Denadai A.; Ianzer, D.; De Camargo, A.; Santos, R. and Sinisterra, R. 2011. Study of the BPP7a peptide and its  $\beta$ -cyclodextrin complex: physicochemical characterization and complete sequence specific NMR assignments.

Luo, T.; He, L., Theato, P. and Kiick, K. 2015. Thermoresponsive self-assembly of nanostructures from a collagen-like Peptide-Containing diblock copolymer. *Macromol. Biosci*. 5: 111-123.

Mathews, C. y Van Holden, K. 2002. *Bioquímica*. Pearson Education, S. A.

Moncayo, D.; Trejos, R.; Maridueña, A. and Castro, R. 2010. Levels of mercury, cadmium and lead in fisheries products of exportation. Instituto Nacional de Pesca. *Revista de Ciencias del Mar y Limnología*. V 4 (1): 65-75.

Murray, R.; Kennely, P.; Benden D.; Rodwel, V.; Bothan, K. y Weil, A. 1998. *Bioquímica de Harper*. Editorial El manual Moderno, S.A., Caracas, Venezuela.

Mustafa, G. 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Rev. Environmental Pollution*. 121: 129–136.

Muyonga J.; Cole C. and Duodu, K. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Latesniloticus*). *Food Chemistry*. 86: 325–332.

Nagai, T. and Suzuki, N. 1999. Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. *Food Chemistry*. 68: 277–281.

Nagai, T.; Suzuki, N.; Tanque, V.; Kai, N. and Agashima, T. 2010. Characterization of acid soluble collagen from skins of surf smelt (*Hypomesus pretiosus japonicus*, Brevoort). *Food and Nutrition Sciences*. V. 1: 59-66.

Nagai, T.; Tanoue, Y.; Kai, N. and Suzuki, N. 2015. Characterization of collagen from emu (*Dromaius novaehollandiae*) skins. *J. Food Sci. Technol.* V. 52 (4): 2344–2351.

Nalinanon, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W. and Kishimura, H. 2007. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*. 104: 593-601.

Norma Técnica Colombiana, NTC 3750, Productos para la Industria Cosmética. (Colágeno Soluble. ICONTEC 1995).

Norma venezolana COVENIN 1087, Sardinias en conserva. 5ta revisión 1998. Disponible en: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/action/normas-find>.

Norma venezolana COVENIN 1766, Atún en conserva. 3ra revisión 1995. Disponible en: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/action/normas-find>.

National Research Council (NRC), 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press. Washington, DC.

Ogawa, M.; Moody, M.; Portier, R.; Bell, J.; Schexnayder, M. and Losso, J. 2003. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *Journal of Agricultural, Food Chemistry*. 51: 8088-8092.

Payne, W. and Veis, N. 1988. Fourier Transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of amide I band for conformational studies. *Biopolymers*. V. 27 (11): 1749-1760.

Petibois, C.; Gouspillou, G.; Wehbe, K.; Delage, J. and Déléris, G. 2006. Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386: 1961-1966.

Pomares E. 2010. El colágeno marino, ahora en dietética. Link: <http://www.nutritecna.com/2010/05/el-colageno-marino-ahora-en-dietetica>.

Potaros, T. and Raksakulthai, N. 2009. Characteristics of collagen from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods. *Journal of Agricultural, Food Chemistry*. 43: 584-593.

Ranaldi, M. and Gagnon, R. 2010. Trace metal incorporation in otoliths of pink snapper (*Pagrus auratus*) as an environmental monitor. *Comparative Biochemistry and Physiology*.

Raya, J. y Aguirre M. 2012. El papel del Silicio en los organismos y ecosistemas. *Conciencia Tecnológica*. 93.

Reglamento, CE N° 1881/2006 (modificado por el CE N° 629/2008).

Richard-Blum, S. and Ruggiero, F. 2005. The collagen super family: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie Biologie*. 53: 430-442.

Riesle, J.; Hollander, A.; Langer, R.; Freed, L. and Vunjak-Novakovic, G. 1998. Collagen in Tissue-Engineered Cartilage.

Sadowska, M. and Kolodziejska, I. 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*. 81(2): 257-262.

Saito, M.; Kunisaki, N.; Urano, N. and Kimura, S. 2002. Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Journal of Food Science*. 67: 1319-1322.

Sarver, R. and Krueger, W. 1991. Protein secondary structure from Fourier Transform IR Spectroscopy: A Data Base Analysis. *Analytical Biochemistry*. V. 194 (1): 89-100.

Sasmal, P. and Begam, H. 2014. Extraction of type I collagen from sea fish synthesis of Hap/collagen composite. *Procedia Materials Science*. V. (5): 1136-1140.

Scopes, R. 1993. Protein Purification. *Principales and practice*. 3era edition. Australia.  
Senaratne, L. and Park, P. 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource technology*. 97: 191-197.

Serrano, J. 2011. Standardization of a process for extracting collagen from filleting waste from tilapia (*Oreochromis*) and cachama (*Piaractus brachypomus*). National University of Colombia. Bogotá-Colombia.

Shanmugam, V.; Ramasamy, P.; Subhapradha, N.; Sudharsan, S.; Seedeivi, P.; Moovendhan, M.; Krishnamoorthy, J.; Shanmugam, A. and Srinivasan, A. 2012. Extraction, structural and physical characterization of type I collagen from the outer skin of *Sepiellainermis* (Orbigny, 1848). *African Journal of Biotechnology*. V. 11 (78): 14326-14337.

Sikorski, Z.; Scott, D. and Buisson, D. 1984. The role of collagen in the quality and processing of fish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 20: 301-343.

Tamilmozhi, S.; Veeruraj, A. and Amugem, M. 2013. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 30: 202-223.

Tiller, K. 1989. Heavy metals in soils and their environmental significance. *Advances in soil Science*. V. 9. Springer-Verlag, New York.

Tirado, D.; Montero, P. y Acevedo, D. 2015. Estudio comparativo de los métodos empleados para la determinación de humedad de varias matrices alimentarias, *Información Tecnológica*. Vol. 26 (2): 3-10.

Torres, W.; Pacheco, R.; Sotelo, R.; Rouzaud, O. and Ezquerra, J. 2008. Partial characterization of collagen from mantle, fin, and arms of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Cienc. Technol. Aliment.* 6(2):101-108.

Villela, I. 2004. Evaluación a la Microestructura y a las propiedades mecánicas del acero inoxidable 316LS y del Titanio Ti-6Al-4V como biomateriales. Departamento de Ingeniería Mecánica, Escuela de Ingeniería. Universidad de las Américas. Puebla-México.

Vinodhini, R. and Narayanan, M. 2007. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *Rev.: Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 5 (2): 179-182.

Wang, L and An, X. 2008. Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry*. 108(2): 616-623.  
Whitford, D. 2005. *Proteins, structure and function*. John Wiley & Sons Ltd (ed.). England.

Wilesmith, J.; Ryan, J. and Atkinson, M. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Veterinary Record*. 128: 199-203.

Woo, J. and Yu, S. 2008. Extraction, optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. *Food Hydrocolloids*. 22 (5): 879-887.

Wüthrich, K. 1986. *NMR of proteins and nucleic acids*. A. Wiley-Interscience Publication. J. Wiley and Sons Inc., New York.

Zamora, V.; Sibaja, M. y Vega-Baudrit, J. 2010. Diseño de un biofilm a partir de colágeno de pieles de tilapia y de quitosano de camarón como soporte para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*.

Zhang, Y. and Liu, W. 2007. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*. 103: 906-912.

Zhang, Z.; Li, G. and Shi, B. 2009. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation. *Journal Food Science*. 74.

Zurita, M. 2009. Procartil-Colágeno Restauración de meniscos y discos intervertebrales. Link: <http://www.drzurita.com/colageno.pdf>.

.

## HOJAS DE METADATOS

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	<b>EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DEL COLÁGENO EXTRAÍDO EN MEDIO ÁCIDO DE LA PIEL DE LA COLA DE ATÚN (<i>Thunnusatlanticus</i>)</b>
<b>Subtítulo</b>	

Autor(es)

<b>Apellidos y Nombres</b>	<b>Código CVLAC / e-mail</b>	
<b>Ana Maigualida Chacón Martínez</b>	<b>CVLAC</b>	<b>8640520</b>
	<b>e-mail</b>	<b>Ana_chacon2009@hotmail.com</b>
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>CVLAC</b>	
	<b>e-mail</b>	
	<b>e-mail</b>	

Palabras o frases claves:

<b>Colágeno, atún, <i>Thunnusatlanticus</i>, IR, RMN</b>

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sub-líneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Química

Resumen (abstract):

Se optimizaron los parámetros del método extracción de Bryan y Bailey (1978) para obtener el colágeno de la piel de la cola de atún (*Thunnus atlanticus*) soluble en ácido acético 1,5 y 5,0% v/v, utilizando esta parte del pescado la cual puede conformar los residuos de la industria pesquera. Se midieron parámetros fisicoquímicos como porcentaje de humedad, residuos sólidos y pH, encontrando que la muestra en ácido acético 1,5% v/v cumplió con el pH establecido por las normas (Normas Técnicas Colombianas, NTC 3750, Productos para la Industria Cosmética) para ser usado como producto cosmetológico. Por otra parte, el % de humedad de las muestras a 1,5 y 5,0% v/v fue 90,050 y 90,97% respectivamente, resultando menores al valor de los estándares, mientras que los datos de residuos sólidos (9,683 % para el colágeno al 1,5% v/v) están por encima de éstos. El análisis cualitativo de varios elementos por ICP-OES mostró la presencia de Co, Pb, Cd, Ni, Si, Mn, Fe, Cr, Cu, y ausencia de Hg, Zn y Al. Algunos de estos metales (Fe y Mn) funcionan como cofactores en diversas reacciones químicas propias del colágeno; mientras que el Si podría formar parte de la estructura molecular de la piel de *T. atlanticus*. Con esta técnica se determinó cuantitativamente el Pb, destacando que los colágenos analizados contienen concentraciones muy bajas de dicho metal, lo que sugirió una mínima toxicidad y, en consecuencia, este colágeno podría ser usado en la industria cosmetológica o farmacéutica. Los análisis de RMN-<sup>1</sup>H demostraron que la estructura química base del colágeno se degrada con el aumento de la concentración de ácido acético de 1,5 a 5,0% v/v, observando en los espectros mayor cantidad de señales y ensanchamiento de las bandas, en comparación con los espectros de la muestra de colágeno 1,5%. Por otro lado, el análisis por IR-TF, en el colágeno 1,5% v/v de ácido acético se reportaron las bandas representativas de un esqueleto polipeptídico, identificadas como amida: A; B; I; II Y III, marcas sensitivas de un colágeno tipo I. Además, esta técnica permitió determinar el rango de temperaturas de desnaturalización del colágeno la cual estuvo entre 50 y 60 °C, al observarse que no aparecieron algunas bandas características en el espectro, específicamente a T=60 °C, debido a la pérdida de agua en el colágeno. También se identificaron los aminoácidos glicina y prolina por cromatografía de papel en ambas muestras analizadas. Esta investigación es un aporte importante, al estudio de las características químicas del colágeno de la piel de la cola de la especie marina *T. atlanticus*, y a pesar de la presencia de metales en el colágeno, como por ejemplo, plomo los niveles de este, no representaron toxicidad. Además, sí los pasivos ambientales (aletas, piel, escamas y vísceras) provenientes de las empresas pesqueras pudieran ser utilizados en la producción de colágeno o de hidrolizados colágenicos (gelatina) con mayor valor agregado, esto podría contribuir a disminuir la contaminación ambiental en las zonas costeras de la ciudad de Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
<b>Shailili Moreno</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>14285141</b>
	e-mail	<b>shaililiko@yahoo.com</b>
	e-mail	
<b>Sheyla Aranda</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>18933679</b>
	e-mail	<b>Sheyla.aranda@gmail.com</b>
	e-mail	
<b>Edgar Zapata</b>	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	<b>12269219</b>
	e-mail	<b>ezapata@udo.edu.ve</b>
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

**Año Mes Día**

2018	07	16
------	----	----

Lenguaje: **SPA**

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
P.G-chacóna.doc	Application/word

Alcance:

Espacial: \_\_\_\_\_ (Opcional)

Temporal: \_\_\_\_\_ (Opcional)

**Título o Grado asociado con el trabajo:**

Msc. en Química

---

Nivel Asociado con el Trabajo: Msc.

---

**Área de Estudio:**

Química

---

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

---

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
SISTEMA DE BIBLIOTECA  
RECIBIDO POR *[Firma]*  
FECHA 05/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

*[Firma]*  
**JUAN A. BOLANOS CUMPELE**  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

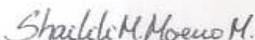
JABC/YGC/manuja

**Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6**

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) :** “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



**ANA M. CHACÓN M.  
AUTOR**



**DRA. SHAILILI MORENO  
TUTORA**