

UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ

FACULTAD CIENCIAS DEL MAR

**PROYECTO DE TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE BIOQUÍMICA EN ACTIVIDADES PESQUERAS**

Tema:

**UTILIZACIÓN DE MEDIO ÁCIDO PARA LA
EXTRACCIÓN DE COLÁGENO DE LA PIEL DEL DORADO
(*Coryphaena hippurus*).**

AUTORES:

**GARCÍA INTRIAGO JENNIFER ALEXANDRA
LUCAS PILLIGUA MARÍA MAGDALENA**

TUTOR: ING. EDMUNDO MATUTE ZEAS

Manta, Junio 2013

DERECHOS DE AUTORÍA

Jennifer Alexandra García Intriago y María Magdalena Lucas Pilligua, declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedemos los derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la Facultad de “Ciencias del Mar”, de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

JENNIFER A. GARCÍA INTRIAGO

MARÍA M. LUCAS PILLIGUA

CERTIFICACIÓN DE TUTORÍA

Edmundo Matute certifica haber tutelado la tesis titulada **“UTILIZACIÓN DE MEDIO ÁCIDO PARA LA EXTRACCIÓN DE COLÁGENO DE LA PIEL DEL DORADO (*Coryphaena hippurus*).”** que ha sido desarrollada por Jennifer Alexandra García Intriago y María Magdalena Lucas Pilligua, previa a la obtención del título de Bioquímica en Actividades Pesqueras, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí. U.L.E.A.M.

Mg. A EDMUNDO MATUTE ZEAS
TUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han **APROBADO** la tesis **“UTILIZACIÓN DE MEDIO ÁCIDO PARA LA EXTRACCIÓN DE COLÁGENO DE LA PIEL DEL DORADO (*Coryphaena hippurus*)”**, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Jennifer Alexandra García Intriago y María Magdalena Lucas Pilligua, previa la obtención del título de **Bioquímica en Actividades Pesqueras**, de acuerdo al **REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL** de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí. U.L.E.A.M.

.....
Luis Ayala Castro PhD.
DECANO

.....
Ing. Edmundo Matute Zeas Mg.A
DIRECTOR DE TESIS

.....
Ing. Miguel Zambrano Reyes
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
Dr. David Villarreal de la Torre
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

Dejo en constancia mis más sinceros agradecimientos primero a Dios, por dotarme de tiempo e inteligencia para culminar mi aspiración, por permitirle a mis padres impartirme a diario sus enseñanzas y buenos valores, permitiéndome aprender, mejorar y crecer como persona de bien, a mi madre por su apoyo incondicional y por su fortaleza que a pesar de las adversidades no decayó y siempre ha estado a mi lado.

Gracias a los docentes de la Facultad Ciencias del Mar quienes impartieron con sabiduría sus conocimientos; a todos y cada una de las personas que me han ayudado y alentado en mi investigación y en especial a nuestro Director de Tesis Ing. Edmundo Matute Zeas quien con su guía, dedicación y paciencia ha hecho posible terminar nuestra tesis, y así alcanzar una meta más, como es la de profesionalizarme en nuestra especialidad para después difundir nuestros conocimientos.

.....

MARÍA M. LUCAS PILLIGUA

AGRADECIMIENTOS

“LA GRATITUD ES UN VALOR QUE DEBE FOMENTARSE CADA DIA EN NUESTROS CORAZONES”

Es **MI** motivo de dicha y satisfacción culminar una etapa más de formación estudiantil y consigo la tesis, así dejar latente en esta página los profundos cordiales y más sinceros agradecimientos.

En primer lugar:

A **DIOS** por darnos salud, paciencia, entendimiento y así poder culminar nuestra tesis.

En segundo lugar:

A la prestigiosa institución **UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABÍ** por brindarnos su infraestructura para recibir nuestras clases.

En tercer lugar:

A nuestro docente y director de tesis **ING. EDMUNDO MATUTE ZEAS** por su ayuda y colaboración para la elaboración de nuestra tesis

En cuarto lugar:

A todos **LOS DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**, por sus conocimientos impartidos cada día de nuestra etapa estudiantil.

En quinto lugar:

A LA FAMILIA GARCIA INTRIAGO Y MOREIRA GUADAMUD por darme su apoyo, ayuda con mis chiquillos y por pensar en un mejor futuro para mi familia **MOREIRA GARCIA.**

En sexto lugar:

A nuestros amigos de toda nuestra etapa universitaria por cada instante que pasaron junto a nosotras en los buenos y malos momentos.

- ✓ Marita
- ✓ Alexandra
- ✓ Monserrate
- ✓ Elina
- ✓ Dennys
- ✓ Víctor
- ✓ Javier
- ✓ Erick
- ✓ Jesús

En octavo lugar:

A nosotras JENNIFER Y MARITA ya que pusimos mucho esfuerzo, dedicación y amor a esta tesis de la cual nos quedan recuerdos de una excelente experiencia.

¡MUCHAS GRACIAS!

.....
JENNIFER A. GARCÍA INTRIAGO

DEDICATORIA

A mis Padres dedicó este triunfo de mi vida; por sus esfuerzos y apoyo incondicional, por no rendirse en la lucha y estar con conmigo en los momentos que más los he necesitado; pues ellos han sido el factor preponderante y el aliento diario para labrarme una profesión con logros positivos y de éxitos con una moral y espíritu que ellos supieron imprimir en mi vida.

A toda mi familia que han sido los impulsores de mi futuro al que me he propuesto alcanzar y así convertirme en el eslabón portentoso, procedente del distinguido y modesto hogar al que pertenezco.

.....

MARÍA M. LUCAS PILLIGUA

DEDICATORIA

**“EL UNICO AMOR PERFECTO DE ESTE MUNDO ES AQUEL DE UNA MADRE
POR SUS HIJOS”**

Por ello este trabajo realizado con tanto amor y esfuerzo, lo dedico a las personas que más amo en la vida.

Mis dos hijos: **LUIS JENNER MOREIRA GARCIA Y YANDRY KEYNNER MOREIRA GARCIA**; estas dos lucecitas que llegaron a iluminar mi vida y que guían día a día mi camino; que son mi verdad, salud, fortaleza y los dos pilares fundamentales que no me dejaron caer, ni vencer en los momentos más cruciales de mi vida.

A mi amor: **LUIS MIGUEL MOREIRA GUADAMUD** quien a pesar de mis estudios estuvo siempre apoyándome siendo así la base primordial de mi vida, mi guía incondicional.

TE AMO...

A mi madre: **Sra. MARGARITA INTRIAGO SORNOZA** quien ha estado siempre a mi lado brindándome todo su apoyo moral y sin el cual no hubiera podido culminar esta importante etapa de mi vida.

Gracias a todos por estar a mi lado.

“TRIUNFE PORQUE USTEDES SIEMPRE CREYERON EN MI”

.....
JENNIFER A. GARCÍA INTRIAGO

CONTENIDO GENERAL

Sección 1

Carátula

Derechos de autoría

Certificación de tutoría

Aprobación del tribunal

Agradecimientos

Dedicatoria

Contenido general

Contenido de cuadros y figuras

Resumen

Summary

Introducción

Sección 2

I. ANTECEDENTES

- 1.1. Planteamiento y formulación del problema
- 1.2. Justificación
- 1.3. Objetivos
 - 1.3.1. Objetivo general
 - 1.3.2. Objetivos específicos
- 1.4. Hipótesis, premisas y/o ideas a defender

II. MARCO TEÓRICO

III. DISEÑO METODOLÓGICO

- 3.1. Ubicación
- 3.2. Duración del trabajo
- 3.3. Factores en estudio
- 3.4. Variables en estudio
 - 3.4.1. Variable independiente
 - 3.4.2. Variables dependientes
- 3.5. Cuadro de variantes
- 3.6. Unidad experimental
- 3.7. Diseño experimental
- 3.8. Manejo del experimento
- 3.9. Diagrama de flujo para extracción de colágeno a partir de la piel de pescado

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 5.1 Conclusiones
- 5.2 Recomendaciones

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

Tabla 1: Contenido de aminoácidos del colágeno tipo I de piel humana y de pescado.

Tabla 2: Características organolépticas evaluadas a las pieles frescas.

Tabla 3: Características de algunos tipos de colágeno

Figura 1: Estructura de las fibras de colágeno.

Figura 2: Mapa Geográfico

Figura 3: Coordenadas $0^{\circ}57'01.47''S$ $80^{\circ}42'31.75''O$

Figura 4: El dorado en Playita Mía.

Figura 5: Recolección de la piel de Dorado.

Figura 6: Lavado de las pieles del Dorado.

Figura 7: Limpieza de las pieles del Dorado.

Figura 8: Corte de las pieles del Dorado.

Figura 9: Cuchillos.

Figura 10: Tablones de madera.

Figura 11: Balanza analítica

Figura 12: Vaso y filtro de seda

Figura 13: Pipeta

Figura 14: Probeta

Figura 15: Recipientes de vidrio.

Figura 16: Ácido Láctico

Figura 17: Nipagina

Figura 18: Cloruro de sodio NaCl (sal) pesada en balanza analítica.

Figura 19: Solución de Cloruro de Sodio (NaCl).

Figura 20: Introducción de las pieles del Dorado en la solución de Cloruro de Sodio (NaCl).

Figura 21: Solución del Ácido Láctico.

Figura 22: Introducción de las pieles del Dorado en la solución de Ácido Láctico.

Figura 23: obtención del colágeno a través de las pieles del dorado.

Figura 24: Filtración del colágeno.

Figura 25: Peso en gramo del colágeno.

Figura 26: Medición del volumen del colágeno obtenido.

Figura 27: Cultivo en caldo Selenito

Figura 28: Esquema del trabajo

Figura 29: Cultivo en caja petri para prueba confirmativa de coliformes.

Figura 30: Confirmación de que no existe coliformes.

Figura 31: Cámara bacteriológica

Figura 32: Incubadora

Figura 33: Resultados del análisis microbiológico.

Gráfico 1: Colágeno obtenido a una temperatura de 18°C, en sus tres concentraciones.

Gráfico 2: Colágeno obtenido a una temperatura de 20°C, en sus tres concentraciones.

Gráfico 3: Colágeno obtenido a una temperatura de 23°C, en sus tres concentraciones.

Gráfico 4: Kg de colágeno obtenido a diferentes temperaturas.

RESUMEN

Se realizó un proceso de extracción utilizando medio ácido en tres concentraciones (1%, 1.5% y 2%) para la obtención de colágeno a base de la piel del Dorado (*Coryphaena hippurus*). Los análisis estadístico indicaron que el rendimiento de colágeno de Tipo I, obtenido en ácido láctico a una temperatura de 23°C se obtuvo 270Kg es decir mayor cantidad de colágeno con un pH de 5.5 y sus olores neutro (ni a pescado, ni ácido); el cual reveló que el colágeno obtenido de pieles de Dorado es de mejor calidad a comparación de las pieles sometidas a 18°C por su olor característico de pescado. El proceso de colágeno obtenido de piel del Dorado (*Coryphaena hippurus*) en sus tres repeticiones se lo realizó a temperatura de 18°C, 20°C y 23°C.

Una vez que obtuvimos el colágeno en las tres concentraciones le realizamos análisis microbiano de coliformes y hongos; en la cual se obtuvieron coliformes: negativo, y hongos: negativo con presencia de levadura spp.

SUMMARY

We performed an extraction process using an acid medium at three concentrations (1%, 1.5% and 2%) to obtain a collagen skin base (*Coryphaena hippurus*). The statistical analysis indicated that the performance of Type I collagen, obtained from lactic acid at a temperature of 23 ° C was obtained 270kg is greater amount of collagen having a pH of 5.5 and the smells neutral (or fish, or acid), the which revealed that the collagen obtained Dorado fur is of better quality as compared to those skins subjected to 18 ° C by its characteristic odor of fish. The process of skin collagen obtained from Dorado (*Coryphaena hippurus*) in three replicates was performed at a temperature of 18 ° C, 20 ° C and 23 ° C.

Once we had the collagen in the three concentrations will perform microbial analysis of coliforms and fungi in which was obtained coliform: negative, and fungi: yeast negative presence spp.

KEY

Collagen

Isolation

FishSkin

Coryphaena Hippurus

INTRODUCCIÓN

El colágeno es la proteína más abundante de origen animal, que constituye aproximadamente el 25 - 30% de todas las proteínas de los organismos animales, es un componente importante de todos los tejidos conectivos del cuerpo (músculos, dientes, huesos y piel), pero se concentra especialmente en los tejidos asociados a la piel y los huesos y también se encuentra en el tejido intersticial de prácticamente todos los órganos, donde pueden contribuir a la estabilidad de los tejidos y órganos, y mantener su estructura e integridad. El colágeno se caracteriza por tener una estructura interna de triple hélice, por lo cual su alta resistencia y propiedades de retención de humedad. La principal función del colágeno es mantener la estructura de los tejidos animales y mejorar la fuerza, resistencia y flexibilidad de los tejidos. Finalmente se tienen las conclusiones y las recomendaciones para futuros trabajos en el tema de extracción de colágeno a partir de pieles de pescado.

Este proyecto fue realizado en Manta en el lugar de Playita Mía donde obtuvimos la materia prima; para la extracción de colágeno a través de las pieles de Dorado (*Coryphaena hippurus*). Se desarrollo con el apoyo de las instalaciones del Laboratorio de Bioquímica en la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El colágeno obtenido de la piel de pescado representa, sin discusión alguna, un gran descubrimiento de la ciencia polaca. (González Tuero, 2004)

El colágeno obtenido de las pieles de pescado se clasifica como fuentes de proteínas fibrosas que forman el tejido conectivo, y que en los mamíferos y aves constituye una proporción muy importante de las proteínas totales (Proteios, 2009).

El colágeno humano 'se desprende' de su cadena ínter espiral a una temperatura de 42°C y entonces muere junto con el resto del organismo. El colágeno de pescado se diferencia muy poco del colágeno humano.

La obtención de colágeno a partir de la piel de Dorado "*Coryphaena hippurus*" es una alternativa que promueve a realizar nuevos estudios con el fin de determinar la temperatura adecuada en la que podemos obtener mayor cantidad de colágeno.

Entre las etapas de la extracción de colágeno desde la limpieza de la piel de pescado hacia la hidratación en NaCl "cloruro de sodio" hasta sumergir la piel en la solución de ácido, existen factores que pueden alterar o provocar que no se obtenga un buen colágeno, como es el caso de limpiar adecuadamente la piel y lavar con abundante agua, para evitar la alteración microbiana, colocar la cantidad adecuada de NaCl para su respectiva hidratación y utilizar la cantidad necesaria del ácido para evitar que no se pueda extraer el colágeno de la piel..

El desarrollo de esta investigación está basado en utilizar medios ácidos para la extracción del colágeno de la piel del dorado.

1.2.JUSTIFICACIÓN

Las proteínas más abundantes en la matriz extracelular son aquellas que pertenecen a la familia del colágeno (Gelse, 2003). El colágeno es la proteína más abundante de origen animal (Muyonga, 2004), que constituye aproximadamente el 25 - 30% de todas las proteínas de los organismos animales (Bae, 2008), es un componente importante de todos los tejidos conectivos del cuerpo como músculos, dientes, huesos y piel (Potaros, 2009), pero se concentra especialmente en los tejidos asociados a la piel y los huesos (Woo, 2008) y también se encuentra en el tejido intersticial de prácticamente todos los órganos, donde pueden contribuir a la estabilidad de los tejidos y órganos, y mantener su estructura e integridad (Gelse, 2003).

El colágeno se caracteriza por tener una estructura interna de triple hélice, por lo cual su alta resistencia y propiedades de retención de humedad. La principal función del colágeno es mantener la estructura de los tejidos animales y mejorar la fuerza, resistencia y flexibilidad de los tejidos.

Gracias a estas características, el colágeno es de gran importancia en el campo de los materiales biomédicos y biomateriales y en la industria farmacéutica y cosmética. En el campo de los biomateriales, el colágeno resalta por su aplicabilidad en la Ingeniería de Tejidos demostrándose mediante estudios que las esponjas de colágeno permiten la adhesión celular y la proliferación de células específicas (Lu, 2004).

En lo social justificamos que debido a la creciente demanda de colágeno, es importante que se estudie un proceso de extracción de colágeno a partir de piel de Dorado, el cual permitiría suplir las necesidades del mercado nacional, consiguiendo así un aumento en las cifras de empleos.

Numerosos estudios de los últimos años revelan que muchas de las enfermedades importantes en salud pública, incluyendo a la industria farmacéutica y cosmética que tienen gran importancia en la aplicación de colágeno, gracias a las bondades que esta proteína tiene. 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 (González Tuero, 2004).

Inicialmente, el colágeno se obtiene principalmente de origen porcino y bovino, pero la comunidad científica busca nuevas fuentes de extracción de la proteína debido al rechazo generado por las enfermedades bovinas que pueden pasar a los humanos y las creencias de carácter religioso. Una fuente que actualmente se estudia es la piel de pescado, producto del proceso de fileteo.

En el ámbito económico justificamos que con el desarrollo de las aplicaciones enunciadas, por su alta demanda en diferentes sectores se obtendría un producto de calidad y mejor precio obteniendo así mayor ganancia en los sectores productivos del país.

En la justificación técnica afirmamos que sí existen los materiales y equipos necesarios para lograr la extracción de colágeno de la piel de pescado por medio ácido.

En virtud a los beneficios que brinda esta proteína fibrosa, se desea extraer colágeno de la especie Dorado "*Coryphaena hippurus*" dando así una nueva alternativa sobre la utilización de las pieles de pescado como un producto aceptable para el consumo humano.

La caracterización del producto obtenido permitió determinar si el producto presenta las tres cadenas polipeptídicas características del colágeno y conocer propiedades físico-químicas y microbiológicas generales, que permiten al producto cumplir con los lineamientos de la Norma Técnica Colombiana para colágeno tipo I, NTC 3750 (ICONTEC, 1995).

¿El colágeno extraído de la piel de Dorado tiene las características adecuadas para ser utilizado como producto alimenticio?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Extracción de colágeno con temperatura y medio ácido de la piel del dorado en el Laboratorio de Bioquímica de la facultad Ciencias del Mar de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Determinar si de la piel del Dorado se puede obtener colágeno.
- * Determinar la concentración ácida requerida para la extracción de colágeno en la piel de pescado.
- * Establecer a que temperatura se obtiene mayor cantidad de colágeno.

.

1.4. HIPÓTESIS

¿La aplicación de temperatura y la concentración del medio ácido son los adecuados para obtener colágeno de la piel del pescado?

CAPÍTULO II

2.MARCO TEÓRICO

Peces.- Animal vertebrado acuático de cuerpo alargado y generalmente protegido por escamas, con las extremidades en forma de aletas, que respira por branquias y se reproduce por huevos: el esqueleto de los peces cartilagosos, como el tiburón o la manta, está compuesto de cartílago, mientras que el de la mayoría de los peces es óseo (Larousse, 2007).

2.1. HISTOLOGÍA GENERAL DE LA PIEL DE LOS PECES

La piel de todos los peces, al igual que los vertebrados, está compuesta también por dos capas importantes: la epidermis y la dermis. La epidermis derivada del ectodermo embrionario y está compuesta, al igual que los mamíferos por un epitelio pluriestratificado.

El número de estratos celulares no varía tan solo de una especie a otra, sino que también en diferentes regiones del pez. Las células epiteliales están estrechamente unidas entre sí por un segmento viscoso intercelular o matriz (Pasos & Prado, 2004).

El estrato más interno del epitelio se denomina estrato germinativo, el cual regenera rápidamente supliendo a las células de la superficie epitelial que poseen una corta vida. La epidermis descansa sobre la dermis, nutriéndola ya que esta región posee vasos sanguíneos donde las sustancias alcanzan a las células epiteliales por difusión a través del segmento.

Los vertebrados terrestres poseen un estrato corneo en la dermis, formada como bien es sabido por la queratina. En los peces en cambio, no ocurre tal cornificación. En el caso de los ciclóstomos, la dermis secreta una delgada

película no celular denominada CUTÍCULA y que más adelante se tratara de ella (Pasos & Prado, 2004).

La dermis se origina del mesodermo embrionario y está compuesta por tejido conjuntivo fibroelástico relativamente pobre en células. En los ciclóstomos forma una capa compacta. En los peces en general, la dermis consiste en una relativamente delgada capa superior de tejido difuso, zona denominada estrato compacto. Esta zona es rica en fibras de colágeno las cuales están dispuestas en forma paralela a la flor y entrecruzadas entre sí en láminas, no formando redes entrecruzadas como en el caso de los mamíferos.

Finalmente se encuentra el tejido subcutáneo o hipodermis, caracterizado por poseer tejido conjuntivo desorganizado, adipocito y sostiene a la dermis a través de musculatura (Pasos & Prado, 2004).

Los estratos celulares de la epidermis contienen células mucosas que producen mucina, la cual es una glicoproteína que forma el muco, una delgada secreción lubricante. Las células mucosas derivan de la membrana basal de la epidermis y cuando alcanzan la superficie forman un lumen a través del cual se libera su contenido.

Las células mucosas difieren en número y tamaño dependiendo de la especie. En los ciclóstomos las secreciones provienen de un tipo de glándulas mucosas modificadas que secretan un coloide mucoso el cual puede ser excretado alcanzando considerables distancias (Pasos & Prado, 2004).

La función del mucus es comparable a la queratina de mamíferos. En primer lugar reducen la fricción del pez con el agua permitiéndole alcanzar mayores velocidades con un gasto menor de energía, por otro lado, protege a la piel de colonizaciones de parásitos y hongos. Es bien sabido que si remueve una sección de esta capa mucosa el pez puede morir por una infección de hongos o bacterias o por alguna interferencia que impida el proceso normal de ósmosis entre la piel y el medio.

Una vez muerto el animal, el mucus deja de ser efectivo ya que, después de un cierto tiempo, se coloniza por bacterias que usan el nitrógeno del mucus como nutriente produciendo la destrucción de la epidermis (Pasos & Prado, 2004).

Una característica importante de los peces es su característica pigmentación que se debe a un tipo de células llamadas CROMATÓFOROS. Son células modificadas de la dermis. Estas células contienen pigmentos y de varios tipos que son distinguidos por su color y naturaleza, pueden ser negros MELANÓFOROS, amarillos XANTÓFOROS, rojos o naranjas ERITRÓFOROS o blancos GUANÓFOROS (Pasos & Prado, 2004).

El dorado, lampuga, dorado-delfín, perico o, en inglés, *mahi-mahi* "palabras de origen hawaiano", es la especie *Coryphaena hippurus*, un pez marino de la familia corifaénidos o peces-delfín, distribuido cosmopolita por todos los océanos del mundo, en aguas tanto tropicales como subtropicales (B.J., 1982).

El Dorado es la variedad más representativa de la llamada Pesca Blanca en el Ecuador. Pertenece a la familia *Coryphaenidae*. Se lo conoce comercialmente como Mahi-mahi. En la pesca artesanal se capturan ejemplares desde 42 cm. hasta 180cm.de largo. Los Puertos principales de desembarque son: Esmeraldas, Manta, San Mateo, Puerto López, Santa Rosa y Anconcito.

La temporada de pesca es de Diciembre a Marzo de cada año "estación lluviosa". Cuando existe un evento "El Niño Oscilación del Sur" su disponibilidad se prolonga durante todo el año. El desembarque promedio anual en la pesca artesanal es de 12071 toneladas.

Producto de consumo masivo a nivel local. Su carne cruda es de color blanquecino tendiendo a rosada, de excelente calidad. Su piel sirve para la fabricación de cuero, con el cual se pueden elaborar carteras, correas, billeteras, monederos, llaveros y similares (Espol, 2006).

2.2. ANATOMÍA

Aunque se han descrito capturas de más del doble la longitud máxima que alcanzan es de unos 100 cm. No presenta espinas ni en la aleta anal ni en la dorsal, ambas con muchos radios blandos, la dorsal se extiende desde encima del ojo hasta casi la aleta caudal mientras que la anal, con una característica forma cóncava, se extiende desde el ano hasta casi la aleta caudal también; las aletas pectorales son muy largas (Collette, 1984).

Los dientes son pequeños y ovales; los machos maduros poseen un bulto prominente óseo en la frente de la cabeza; el color del cuerpo es muy llamativo, con reflejos de oro en los laterales, azul y verde metalizado en la parte superior y lateral alta, mientras que es blanca o amarilla en las partes inferiores; los ejemplares juveniles pueden presentar manchas en forma de barras verticales a los lados del cuerpo (B.J., 1982).

2.2.1. HÁBITAT Y BIOLOGÍA

Es una especie oceanódroma marina, que viven cerca de la superficie normalmente entre 5 y 10 m de profundidad, llevando a cabo larguísimas migraciones (Gasparini, 2001).

Suelen estar en aguas abiertas en alta mar formando cardumen, aunque también se les puede encontrar en la costa. Se alimentan de casi todo tipo de peces y zooplancton, aunque también suelen capturar crustáceos y calamares (Eschmeyer, 1983).

Alcanzan la madurez sexual a los 4 o 5 meses, reproduciéndose en mar abierto, para después aproximarse a la costa cuando suben las temperaturas, permaneciendo los huevos y las larvas como pelágicos (Hureau, 1986).

2.3. PESCA DEL DORADO EN PLENA TEMPORADA

Con el invierno la producción del dorado aumentó y con ello han mejorado las condiciones económicas de cientos de pescadores de la ciudad de Esmeraldas, que en su mayoría habitan en los sectores de la ribera del Esmeraldas, Codesa y en el Valle de San Rafael (Hora, 2006).

El precio del pescado va de acuerdo con la demanda entre cincuenta centavos y un dólar la libra, lo que sirve significativamente a los pescadores que debido a que en la temporada atrapan hasta mil 500 libras y les toca hasta 70 dólares como pago para cada pescador (Hora, 2006).

2.3.1. OPERACIÓN

Los costos de operación que realiza cada lancha van desde 250 a 300 dólares por faena, que puede durar hasta 48 horas, eso incluye 10 canecas o pomos de gasolina, 12 marquetas de hielo y 50 dólares en alimentación. Los pescadores reconocen que no es una profesión fácil, pues, este tipo de pescado se lo captura con espínel “conjunto de anzuelos colgados de una cuerda madre a diez metros de distancias cada uno” a 30 millas náuticas.

2.3.2. MERCADOS

Entre los mercados internacionales están Europa y Estados Unidos. La pesca que entra por Esmeraldas es llevada a Manta, Quito y Guayaquil para luego ser exportada.

El mercado interno es abastecido con el producto que no califica para la exportación y es enviado a los mercados de Santo Domingo de los Colorados, Quevedo, Quito y otras ciudades del país, incluida Esmeraldas (Hora, 2006).

2.3.3. PRODUCCIÓN

La exportación de Pesca Blanca en el Ecuador, representa una buena fuente de ingreso económico para las zonas costeras, tales como Manta, Esmeraldas, San Mateo, Puerto López, Santa Rosa y Anconcito. Actualmente, el Dorado ocupa el segundo lugar en las exportaciones de pesca blanca. Desde el punto de vista artesanal, el Dorado es el recurso más importante, por los volúmenes que se capturan y porque su pesca es ampliamente conocida. Al nivel Industrial o para las Empacadoras de pesca blanca, es difícil definir la importancia del Dorado o de cualquier otra especie, pero si se puede afirmar que el Dorado representa al menos el 50% de libras totales exportadas en el año (Hora, 2006).

2.3.4. POBLACIÓN MICROBIANA DEL DORADO FRESCO

Las causas de la alteración del pescado fresco pueden ser de dos tipos: microbiológica y no microbiológica. La pérdida inicial de frescura de las especies de pescado magras “Dorado” en su estado natural, con o sin refrigeración se debe a cambios autolíticos, mientras que el deterioro se debe principalmente a la acción bacteriana (Hora, 2006).

Los microorganismos son los agentes más importantes en la alteración del pescado fresco ya que son los que originan los sabores particularmente indeseables ligados a la alteración. Por lo tanto, el control de la alteración es en gran parte, el control de: Cambios inducidos por enzimas propias del animal como la reducción de OTMA $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ “óxido de trimetilamina” en DMAC $2\text{H}_7\text{N}$ “dimetilamina” y FA CH_2O “formaldehído”. Puede ser la principal causa de algunas especies en almacenamiento refrigerado (Hora, 2006).

La acción continuada de los microorganismos afecta también a la apariencia y a las propiedades físicas. Las viscosidades existentes sobre la piel que originalmente son claras y acuosas, se transforman en oscuras y grumosas. La piel pierde su apariencia brillante, la tersura, tornándose débil, pálida y desagradable al tacto (Hora, 2006).

Los microorganismos encontrados pertenecen a los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*. También son frecuentes algunos géneros de las y *Aeromonadaceae* algunos microorganismos Gram positivos se encuentran en proporciones variables: *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Vibrio* y spp., *Photobacterium*".

Hasta ahora se puede extraer que hay una variedad muy amplia y diferente número de microorganismos en el pescado. Resulta de gran interés saber la importancia de éstos en el deterioro del Dorado y determinar cómo puede controlarse mediante tecnologías de conservación no convencionales "Tecnología de Barreras". Puesto que los microorganismos presentes en el pescado deteriorado no tienen un efecto directo en la degradación, es importante conocer cuáles son realmente las bacterias específicas del deterioro. Huss presentó un resumen de las bacterias deteriorantes que prevalecían en la pesca blanca fresca cuando se conservaba en condiciones aerobias, al vacío a 0 y 5°C y cuando se almacenaba en condiciones aeróbicas a temperatura ambiente (Hora, 2006).

El principal y más específico microorganismo responsable del deterioro del Dorado procedente de aguas templadas, conservado con hielo en condiciones aeróbicas, es *Shewanella putrefaciens*.

Las alteraciones no microbianas son de dos clases: enzimáticas y no enzimáticas. Existen también enzimas alterantes del sabor (Hora, 2006).

Los componentes responsables de los sabores característicos del pescado se ven alterados por la acción enzimática que en primera instancia produce compuestos de sabor neutro, presentando el pescado un sabor insípido y en lo posterior sustanciasdegradativas como la hipoxantina que produce un sabor amargo característico del pescado descompuesto.

De las alteraciones no enzimáticas la más significativa es el enranciamiento no enzimático. Esta alteración se debe a la oxidación de las superficies lipídicas con ácidos grasos insaturados que existen en la carne y otros tejidos, produciendo olores y sabores desagradables. Sin embargo, el pescado blanco, como el Dorado, tiene un contenido de lípidos muy bajo, por lo que si se desarrolla

oxidación lipídica no es fácilmente detectable en las piezas frescas debido a que se enmascara con otros sabores y olores que aparecen durante la alteración (Hora, 2006).

2.3.4. IMPORTANCIA PARA EL HOMBRE

Es capturado en la pesca para alimentación humana, para la que resulta muy comercial con un alto valor en el mercado. También ha sido cultivado en acuicultura, además de ser una pieza codiciada en la pesca deportiva por el gran tamaño de algunos ejemplares (U.R., 2007).

2.3.5. APROVECHAMIENTO DE LA PIEL:

Las pieles de pescado, desde el interior hacia el exterior, presentan una capa lista, con una moderada pigmentación, en la cual las escamas se encuentran firmes a la piel y son de forma ovalada.

Por ser una piel pequeña comparada con una de vacuno, es importante un aprovechamiento al máximo. Las pieles deben de ser clasificadas por su especie, tamaño y pigmentación (Pasos & Prado, 2004).

En general las pieles de peces que se utilizan deben cumplir con tres requisitos importantes:

- a. Piel que no contenga carne.
- b. Sin rotura por un mal fileteado o descarnado.
- c. Lo más grande y entera posible.

2.4. COLÁGENO: PROTEÍNA ESTRUCTURAL

La molécula de tropo colágeno es la unidad básica de la fibra de colágeno, es una hélice triple de tres cadenas polipeptídicas, cada una de ellas con aproximadamente 1000 residuos. Esta estructura helicoidal triple, es característica del colágeno. 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 hidrogeno que se extienden entre ellas. El examen del modelo revela que cada tercer residuo, que debe encontrarse cerca del centro de la hélice triple, solo puede ser glicina. 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 o hidroxiprolina en la molécula de tropo colágeno. Un conjunto que se repite en la secuencia es la forma Gly-X-Y, donde X suele ser prolina e Y, prolina o hidroxiprolina. Para realizar adecuadamente sus múltiples funciones, el colágeno presenta un gran número de variantes genéticas en los organismos superiores (Mathews, 2002).

El colágeno 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. Las moléculas individuales de tropocolágeno se empaquetan juntas formando una fibra de colágeno de una manera específica. Cada molécula tiene una longitud de aproximadamente 300nm y se solapa con su vecina en aproximadamente 64nm, produciendo el aspecto característico de bandas.

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. 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. 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. 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 (Mathews, 2002).

El colágeno tiene algunas variantes genéticas que identifican los 26 tipos de colágeno (Sato, 2002) designados como tipo I-tipo XXVI. Los diferentes tipos de colágenos se caracterizan por diferencias en sus propiedades físicas, debidas a sus diferencias en la secuencia de aminoácidos. En el Anexo A se encuentra información recolectada sobre características de algunos tipos de colágeno (Mathews, 2002).

2.4.1. SÍNTESIS DEL 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 describen a continuación:

1. Replicación: es la copia de las dos cadenas de un DNA de doble cadena.
2. Transcripción: es el proceso por el que se copia una cadena de DNA en una molécula de RNA complementaria.
3. Traducción: 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. El procolágeno 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 pegan juntas a las moléculas formando una fibra dura de colágeno.

2.4.2. EL COLÁGENO Y SUS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

El Colágeno es una proteína estructural primaria. Es la proteína más abundante del reino animal, incluido el ser humano. Constituye la mayor parte de los tejidos conectivos que son la piel, huesos, cartílagos, tendones, ligamentos, vasos sanguíneos, etc. (Proteios, 2009).

El colágeno biológicamente activo pasa al fluido extracelular, alrededor de todos los tejidos y órganos, desde donde es captada como una proteína del tejido conjuntivo, regenerando la función de la estructura del tejido conjuntivo de los órganos, sustituyendo la proteína estructural usada.

Durante toda la vida de los vertebrados se produce un recambio del colágeno, de un modo similar al de otras proteínas. La fuente de todo colágeno es animal, no existe colágeno vegetal (Proteios, 2009).

Es la principal proteína fibrosa de los animales superiores y se encuentran en el tejido conjuntivo: es la más abundante de todas las proteínas de los vertebrados superiores y constituye alrededor de un tercio, o más de la proteína total del cuerpo. Cuanto mayor y más pesado es el animal tanto es mayor la fricción del colágeno que contribuye a las proteínas totales. Se ha dicho muy

adecuadamente, que una vaca por ejemplo, se mantiene en forma tal principalmente gracias a las fibrillas de colágeno de su pellejo, tendones y otros tejidos conjuntivos (Proteios, 2009).

En el pellejo de la vaca las fibrillas de colágeno forman una red entrecruzada en láminas, quedando porciones de ella en dirección perpendicular a la flor. Desde el punto de vista de su estructura primaria, el aminoácido constituyente más abundante es la glicina. Schneider considera a la molécula de colágeno formadas por periodos de 8Aas de glicina más 4Aas de prolina más 2Aas de hidroxiprolina más 1Aas de arginina o lisina más 4Aa de ya sea tiroxina, aspártico, glutámico e histidina, que se van repitiendo hasta constituir las cadenas polipeptídicas que por uniones laterales entre sí dan la molécula de colágeno (Proteios, 2009).

Aunque los colágenos de diferentes especies difieren algo en la secuencia de Aas, la mayor parte contienen alrededor de 35% de glicina, 12% de prolina y un 9% de hidroxiprolina, un Aa que se encuentra raramente en proteínas distintas al colágeno.

La prolina como la hidroxiprolina se diferencia de todos los demás Aas en que su grupo R es un sustituyente en el grupo amino. Con respecto a la estructura secundaria, se ha deducido que es una triple de cadenas polipeptídicas arrolladas hacia la izquierda las cuales se mantienen unidas mediante enlaces de hidrogeno (Proteios, 2009).

Los grupos de hidrógeno se forman entre un grupo carbonilo de una cadena polipeptídica y un grupo amino de otra cadena adyacente. Los puentes de hidrógeno son muy comunes en la configuración de proteínas y es la base química fundamental que el curtido debe tener clara para comprender el complejo comportamiento del colágeno frente al pH, temperatura y otras variables fisicoquímicas (Proteios, 2009).

Por otro lado, el hecho de que las cadenas polipeptídicas del colágeno, contengan el AahidroxiprolinaAa que raramente se encuentra en otras proteínas, ocurra la formación de otro tipo de puente de hidrógeno por la unión de un grupo

carbonilo de una cadena con el grupo Hidróxido OH situado en el anillo pirrólico de la hidroxiprolina en una cadena adyacente, dando con ello una mayor estabilidad a la estructura secundaria en comparación con otras proteínas. Cabe agregar la importancia de la temperatura en la estabilización de los puentes de H. El aumento de la temperatura desestabiliza estos enlaces y por lo tanto la estructura secundaria, en general puede decirse que a mayor número de puentes de H, más temperatura se requiere para su desestabilización (Proteios, 2009).

2.4.3. PRINCIPALES TIPOS DE COLÁGENO

2.4.3.1. COLÁGENO TIPO I: Se encuentra abundantemente en la dermis de la piel, el hueso, el tendón y la córnea. Su función principal es la de resistencia al estiramiento. Constituye el colágeno más importante y abundante desde el punto de vista estructural.

2.4.3.2. COLÁGENO TIPO II: Se encuentra sobre todo en el cartílago, pero también se presenta en la córnea embrionaria y en la notocorda, en el núcleo pulposo y en el humor vítreo del ojo. Su función principal es la resistencia a la presión intermitente.

2.4.3.3. COLÁGENO TIPO III: Abunda en el tejido conjuntivo laxo, en las paredes de los vasos sanguíneos, la dermis de la piel y el estroma de varias glándulas. Su función es la de sostén de los órganos expandibles.

2.4.3.4 COLÁGENO TIPO IV: Es el colágeno que forma la lámina basal que subyace a los epitelios. Su función principal es la de sostén y filtración (Proteios, 2009).

2.4.4. 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, 2008).

Estas fuentes tradicionales de colágeno presentan dificultades y son inapropiados 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 se prohíbe el consumo de productos relacionados con las vacas (Karim, 2009) y también se ven restricciones en su consumo por condiciones de salud ya que se teme ante enfermedades como la de la encefalopatía espongiiforme bovina y la fiebre aftosa (Potaros, 2009). También existen otro tipo de limitaciones como 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 ha sido de gran importancia encontrar fuentes alternativas de materia prima para la obtención de colágeno, entre las estudiadas se encuentran las que se pueden obtener del medio acuático (Senaratne, 2006) como son la piel, huesos y escamas de pescado.

Con la búsqueda de nuevas fuentes de colágeno se han realizado diferentes estudios para evaluar las propiedades funcionales del colágeno de origen de pescado, analizando las pieles de pescados de agua dulce y agua salada (Woo, 2008), por ejemplo: bacalao común (Sadowska, 2003), perca común (Muyonga, 2004), carpa gris (Zhang Y. W., 2007), tiburón bambú (Kittiphattanabawon, 2010), carpa plateada (Zhang J. R., 2009) y tilapia nilótica (Zeng, 2009). Estos artículos se han concentrado en analizar el colágeno obtenido y en proponer procesos de obtención de colágeno a partir de las pieles de estas especies.

2.4.5. USOS Y APLICACIONES DEL COLÁGENO

Gracias a sus características químicas únicas, el colágeno se ha utilizado en diversos campos de la industria (Bae, 2008), tiene aplicaciones en materiales biomédicos, en la industria farmacéutica, cosmética y en alimentos (Potaros, 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 (Villela, 2004). 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 más comerciales.

Los biomateriales han tenido gran importancia para la Ingeniería de Tejidos, ya que este campo se basa en la utilización de estos materiales. Al respecto se han realizado diferentes estudios para demostrar la aplicabilidad del colágeno como biomaterial en la ingeniería de tejidos. Se han demostrado aplicaciones en la ingeniería de tejidos cardiovascular con el desarrollo de un “scaffold”¹ de colágeno, que tiene la función de permitir la adhesión celular y la proliferación de las células específicas del tejido a tratar (Lu, 2004).

También las esponjas de colágeno son usadas comúnmente como biomaterial biodegradable, las cuales se han empleado en implantes de tejido conectivo del hueso, prótesis para la regeneración del nervio y apósitos para heridas (Schoof, 2001). Se ha aplicado en la ingeniería de tejido de cartílago (Riesle, 1998) y en la ingeniería de tejido óseo (Bitar, 2007).

En la industria farmacéutica y cosmética tiene gran importancia la aplicación de colágeno, gracias a las bondades que esta proteína tiene. 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. 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. Como se mencionó anteriormente dicha proteína 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.

Pero el colágeno no solo se ha utilizado en aplicaciones cosméticas; desde hace pocos años se ha empezado a introducir en el mercado de los complementos nutricionales de uso oral. 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 utilizado el colágeno marino por su mayor disponibilidad en contraposición con el colágeno tradicional.

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 aumentó 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 Tuero, 2004).

2.4.6. BENEFICIOS DEL COLÁGENO

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.

Entre los 20 y los 30 años de edad, la producción natural de colágeno comienza a reducirse progresivamente. Cerca de los 60 años su producción ha disminuido cerca de un 35 %.

Al añadir colágeno hidrolizado Proteicos en su producto, obtiene los siguientes beneficios:

- Proporciona el aporte de proteínas como complemento en formulaciones de alto rendimiento, además de contribuir a disminuir los dolores de articulaciones causados por el esfuerzo.
- Aporta una mayor sensación de saciedad que los carbohidratos y las grasas. Una ingesta elevada de proteínas minimiza el consumo total de alimentos. Contribuye a disminuir los dolores en articulaciones causados por el sobrepeso.
- La ingesta de colágeno hidrolizado da lugar a un incremento significativo de la masa ósea.
- Ayuda a detener la degradación del tejido de articulaciones y estimula la producción de nuevas células cartilaginosas para compensar los tejidos degradados.
- Contribuye a disminuir dolores articulares y óseos causados por artritis, reumatismo u osteoartritis.
- Proporciona tersura y lozanía a la piel, mejorando también el aspecto del cabello y uñas.

- Ayuda a disminuir y evitar la formación de estrías.

El colágeno marino tiene una seguridad más alta: Sus materias primas son pieles enteras no tratadas de los pescados, mientras tanto las pieles de pescado de agua de alta mar o dulce, son menos contaminadas (Calvo & Miguel, 1989).

El calentamiento del colágeno produce su desnaturalización, cuya primera consecuencia es un enorme acortamiento de las fibras, acortamiento que se produce a una temperatura característica para el colágeno de cada especie animal.

También se destruye la estructura de triple hélice La temperatura a la que se desnaturaliza el colágeno depende del contenido de prolina e hidroxiprolina: A mayor contenido, mayor es la temperatura necesaria.

En este sentido, existe una gran diferencia en contenido de prolina y en la temperatura de desnaturalización entre el colágeno de los animales de sangre caliente y el de los peces, ambas bastante más pequeñas en los segundos.

En algunos peces de aguas frías, el colágeno se desnaturaliza a menos de 20°C. En el cocinado de los alimentos, parte del colágeno se solubiliza y forma la "gelatina" (Calvo & Miguel, 1989).

El colágeno es un componente abundante en piel, tendones, sistema vascular y otros materiales de desecho, de donde se puede obtener la gelatina comercial, que es un producto de degradación parcial del colágeno, extraída por calentamiento tras un tratamiento en medio ácido o alcalino.

Dependiendo del tipo de tratamiento, se obtiene un tipo de gelatina distinto.

Punto de vista nutricional, el colágeno es una proteína muy desequilibrada en cuanto a su composición de aminoácidos. El colágeno es muy deficiente en triptófano, ya que el poco que existía se suele destruir en su preparación. La facilidad con la que se proteoliza depende mucho de su estado. El colágeno nativo es bastante resistente a la proteólisis por parte de la mayoría de las

proteinasas, mientras que el colágeno desnaturalizado se hidroliza fácilmente (Calvo & Miguel, 1989).

2.5. ESTADO DE LA INVESTIGACIÓN

2.5.1. PROCESO DE EXTRACCIÓN

La primera investigación realizada en Japón (Nagai, 1999) tuvo como objetivo describir la preparación de colágeno a partir de piel, hueso y aletas de pescado y estudiar las propiedades térmicas de este colágeno. En esta investigación reportan la extracción de colágeno de pieles de varias especies de peces, entre las que se encuentran: perca japonesa "*Lateolabraxjaponicus*", caballa "*scomberjaponicus*" y tiburón toro japonés "*Heterodontusjaponicus*".

Los procesos de extracción y purificación de colágeno a partir de piel de pescado propuestos por los investigadores constan de 8 etapas: eliminación de la grasa con alcohol, solubilización en medio ácido y procesos de centrifugación, precipitación salina, centrifugación, redisolución de la proteína, diálisis en medio ácido y por último liofilización. Luego de obtener el producto cuantificaron el colágeno presente en la muestra, mediante la técnica colorimétrica de cuantificación de hidroxiprolina, con el fin de calcular el rendimiento obtenido en el proceso, para el caso de la perca japonesa se obtuvo 51,4 %, la caballa 49,8 % y para el tiburón toro japonés 50,1 %, porcentajes en base del peso seco liofilizado.

Por último el autor caracterizó el producto obtenido, determinando si es colágeno tipo I mediante la técnica de electroforesis, realizando una comparación del peso molecular de las cadenas α y β de colágeno con un patrón de pesos moleculares. Una propiedad muy importante es la estabilidad térmica de la proteína, por lo que se determinó la temperatura de desnaturalización midiendo la viscosidad a diferentes temperaturas.

La temperatura de desnaturalización para el colágeno obtenido de piel de la perca japonesa es 26,5°C, de la caballa es 25,6°C y del tiburón toro japonés es 25,0°C. Estos valores están 10°C por debajo de la temperatura encontrada para el colágeno de piel de porcinos. “Así mismo, el colágeno derivado de especies de pescado que habitan en ambientes fríos tiene un menor contenido de hidroxiprolina y muestran una menor estabilidad térmica que aquellos que viven en ambientes cálidos. Esto se debe a que la hidroxiprolina es envuelta en enlaces hidrogeno, lo cual estabiliza la estructura de la triple hélice del colágeno” (Muyonga, 2004).

2.6. FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos están presentes en el ambiente vital del hombre “agua, suelo, aire, etc.”, en el propio hombre y en todos los seres vivos, plantas o animales. La contaminación de alimentos se produce desde cualquiera de estas fuentes, más tarde las operaciones de procesado y distribución proporcionan nuevas posibilidades de contaminación (Saludalia, 2006).

Cuando las bacterias se extienden sobre un medio con agar en una placa de Petri y se dejan durante la noche con una temperatura adecuada, como 37°C comienzan a multiplicarse. Mediante la división de una célula en dos cada 15-30 minutos se forma un pequeño acúmulo de bacterias, consistente en millones de células, que es llamado una colonia. Cada clase de bacterias produce colonias con una forma típica; el tamaño, forma, color y consistencia de estas colonias en determinados medios de cultivo ayudan a su identificación (Hobbs & Roberts, 1993).

Las bacterias vivirán y se multiplicarán en muchos alimentos; algunas veces el tipo de alimento, y la temperatura y humedad de la cocina proporcionan unas condiciones similares a las usadas para el cultivo en laboratorio. Las carnes de

mamíferos y aves son ejemplos, y las bacterias se multiplicarán en ellas cuando se mantienen sin refrigeración en tiendas o cocinas (Hobbs & Roberts, 1993).

2.6.1. TEMPERATURA.

La mayoría de las personas reconocemos la relación inversa que hay entre la estabilidad de los alimentos y la temperatura. A mayores temperaturas, más rápidamente se deterioran los alimentos. La calidad del alimento puede ser conservada por largos períodos de tiempo a bajas temperaturas (Saludalia, 2006).

A temperaturas bajas la actividad bacteriana disminuye notablemente a temperaturas de refrigeración y es prácticamente imperceptible a temperaturas de congelación. La refrigeración y congelación son métodos bien conocidos en la preservación de alimentos (Jawetz E. M., 1997).

Los microorganismos que provocan alteración de los alimentos y que son capaces de multiplicarse en ambientes fríos son llamados psicrófilos; su temperatura de crecimiento va desde -10°C o más baja y la máxima de 20°C o inferior. Las formas mesofílicas crecen entre 20-40°C estos abundan en alimentos que han permanecido a temperatura ambiente y cuando se ha roto la cadena de frío, mientras que las termofílicas crecen entre 50-65°C, se caracterizan por tener una tasa de crecimiento elevado. La mayoría de los organismos son mesofílicos; 30°C es la temperatura óptima para la mayoría de las bacterias de vida libre y 37°C para los parásitos de los animales (Saludalia, 2006) (Jawetz E. M., 1997).

El frío intenso no destruirá a la totalidad de las bacterias, aunque evitará que se multipliquen y por esta razón los alimentos que permiten el crecimiento bacteriano serán conservados a bajas temperaturas. Los refrigeradores domésticos no solamente retrasan la alteración de los alimentos sino que también evitan la multiplicación de bacterias nocivas. La congelación mata a una proporción de células (Hobbs & Roberts, 1993).

Deberán evitarse las fluctuaciones de temperatura durante el almacenamiento ya que se incrementará la tasa de crecimiento según aumente la temperatura (Hobbs & Roberts, 1993).

2.6.2. ACTIVIDAD DE AGUA

El agua de un alimento, su situación y disponibilidad, es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de los microorganismos en general las bacterias necesitan disponer de más agua que las levaduras y mohos (Amerling, 2001).

La necesidad de agua de los microorganismos se expresa como A_w , que se define como la relación que existe entre la presión de vapor de una solución y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. Las bacterias crecen a valores de A_w comprendidos entre 1,0 y 0,75 y las levaduras y mohos pueden crecer lentamente a valores de A_w de 0,62 como mínimo (Amerling, 2001).

A_w mínima aproximada para el crecimiento de microorganismos

Bacterias. 0.91

Levaduras. 0.88

Mohos. 0.80

Bacterias halófilas. 0.75

Mohos xerófilos 0.65

Levaduras osmófilas 0.60 (Amerling, 2001).

La actividad de agua de la carne fresca por lo general se encuentra cerca de 0.99 por lo que la hace susceptible a la alteración por microorganismos, de ahí la importancia de disminuir la A_w con el fin de inhibir (Amerling, 2001).

2.6.3. PH

Cada microorganismo tiene pH de crecimiento óptimo, mínimo y máximo. La mayoría de las bacterias crecen mejor en un pH casi neutro y algunas se ven favorecidas por los medios ácidos “acidófilas” y otras crecen bien en medios débilmente ácidos o alcalinos. Los mohos y las levaduras ven favorecido su crecimiento en pH ácidos con valores de 4.5 como mínimo comprendido entre 4,5 y 5,5 (Amerling, 2001).

El pH post-mortem de la carne fresca es muy importante en lo referente al crecimiento de los microorganismos, ya que va a ser un factor determinante en la vida útil de esta. Ese pH final depende de la cantidad de ácido láctico producido. Es por esto que en animales sometidos a fatiga, ayuno y stress antes del sacrificio, la cantidad de ácido láctico producido es poco, su pH será bajo, por lo que la carne será susceptible al ataque de microorganismos, lo que disminuye su vida útil (Amerling, 2001).

El pH de la carne de bovino varía entre 5.1 y 6.2, los microorganismos que comúnmente alteran la carne, crecen mejor en condiciones de pH próximo a 7,0 o ligeramente alcalinos. Cuando se alcanza valores de pH ácidos, como por ejemplo 5,0 cualquier disminución en el pH aunque sea pequeña, determinara una disminución de la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Amerling, 2001).

2.6.4. AMBIENTALES

La contaminación de la carne se puede producir indirectamente por las heces, polvo o plumas que se diseminan durante las operaciones de la captura. Alternativamente técnicas deficientes en la manipulación pueden permitir la contaminación directa de la carne, o de las instalaciones (Varnam & Sutherland, 1995).

Se debe considerar siempre la posibilidad de que las instalaciones o los equipos de procesado permitan la supervivencia a largo plazo de patógenos y de este modo actúen como un foco puntual de contaminación (Varnam & Sutherland, 1995).

El aire no constituye un hábitat bacteriano; las bacterias existen en el aire únicamente como contaminantes accidentales. Sin embargo, muchas bacterias patógenas son transportadas a través de aire sobre partículas de polvo o sobre residuos secos de partículas de saliva (Jawetz E. , 1996).

2.6.5. HUMANOS

El cuerpo humano es portador habitual de microorganismos saprófitos y temporal de patógenos, y constituye la fuente y la vía más frecuente de contaminación de los alimentos. La boca, nariz, orejas, pelo, uñas e intestino, contienen microorganismos que pueden alcanzar los alimentos por contacto directo de las manos durante la manipulación o por la microgotículas expulsadas vía oral o nasal. Esto obliga a que los manipuladores deben mantener unas estrictas condiciones higiénicas corporales y no padecer enfermedades infectocontagiosas (Mataix, sin fecha).

2.7. HONGOS

En biología, el término Fungi;latín, literalmente "hongos" designa a un grupo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas. Se clasifican en un reino distinto al de las plantas, animales y bacterias. Esta diferenciación se debe, entre otras cosas, a que poseen paredes celulares compuestas por quitina, a diferencia de las plantas, que contienen celulosa y debido a que algunos crecen y/o actúan como parásitos de otras especies. Actualmente se consideran como un grupo heterogéneo, polifilético, formado por organismos pertenecientes por lo menos a tres líneas evolutivas independientes (Duiops, 1997-2009).

2.7.1. REPRODUCCIÓN

Los hongos se reproducen sobre todo por medio de esporas, las cuales se dispersan en un estado latente, que se interrumpe sólo cuando se hallan condiciones favorables para su germinación. Cuando estas condiciones se dan, la espora germina, surgiendo de ella una primera hifa, por cuya extensión y ramificación se va constituyendo un micelio. La velocidad de crecimiento de las hifas de un hongo es verdaderamente espectacular: en un hongo tropical llega hasta los 5 mm por minuto. Se puede decir, sin exagerar, que algunos hongos se pueden ver crecer bajo los propios ojos (Keller NP, Tumer G, & JW., 2005).

2.7.2. ORDEN DE CARACTERES PARA LA IDENTIFICACIÓN EN HONGOS

- Aspecto macroscópico de la colonia
- Tipo de hifa
- Colocación del o los esporóforos
- Presencia de esterigmatas o conidióforo y el orden que presentan
- Forma tamaño y distribución de las esporas
- Presencia o no de rizoides. Sólo se presentan en hongos de hifa no septada. Por ejemplo: *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia*
- Practicar pruebas de identificación bioquímica.

2.8. COLIFORMES

La denominación genérica coliformes designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos (Vargas de Mayo C., 1983).

2.8.1. HÁBITAT DEL GRUPO COLIFORME

Las bacterias de este género se encuentran principalmente en el intestino de los humanos y de los animales de sangre caliente, es decir, homeotermos, pero también ampliamente distribuidas en la naturaleza, especialmente en suelos, semillas y vegetales.

Los coliformes se introducen en gran número al medio ambiente por las heces de humanos y animales. Por tal motivo suele deducirse que la mayoría de los coliformes que se encuentran en el ambiente son de origen fecal. Sin embargo, existen muchos coliformes de vida libre (Vargas de Mayo C., 1983).

2.8.2. COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES

No todos los coliformes son de origen fecal, por lo que se hizo necesario desarrollar pruebas para diferenciarlos a efectos de emplearlos como indicadores de contaminación. Se distinguen, por lo tanto, los coliformes totales que comprende la totalidad del grupo y los *coliformes fecales* aquellos de origen intestinal.

Desde el punto de vista de la salud pública esta diferenciación es importante puesto que permite asegurar con alto grado de certeza que la contaminación que presenta el agua es de origen fecal (Vargas de Mayo C., 1983).

2.8.3. COLIFORMES E HIGIENE DE ALIMENTOS

En la higiene de alimentos los coliformes no se consideran indicadores de contaminación fecal sino solamente indicadores de calidad.

Los *coliformes totales* se usan para evaluar la calidad de la leche pasteurizada, leche en polvo, helados, pastas frescas, fórmulas para lactantes, fideos y cereales para el desayuno.

Los *coliformes fecales* se usan para evaluar los mariscos frescos.

Por último, la *E. coli* se usa como indicador en quesos frescos, quesillos, cereales, masas con relleno, alimentos infantiles, cecinas cocidas y verduras frescas (Vargas de Mayo C., 1983).

2.9. IMPORTANCIA DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS

La mayor parte de los alimentos se convierten potencialmente patógenos para el consumidor después que han sido violados los principios de higiene, limpieza y desinfección durante el proceso de elaboración transporte y conservación. El control microbiológico de los alimentos es importante desde el punto de vista sanitario si los alimentos han estado sometidos a condiciones que pudieran haber permitido la llegada a los mismos y/o la multiplicación de agentes infecciosos puede constituir un vehículo de transmisión de enfermedades, tales como salmonelosis (ECU, sin fecha).

2.9.1. MUESTREO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

El estudio microbiológico de muestras de alimentos y superficies de contacto o manipulación corporal permite establecer el diagnóstico etiológico de diferentes enfermedades infecciosas. Por tal motivo es importante garantizar la calidad en la obtención de la muestra y la información que debe acompañarla durante el

proceso que comienza en la fase previa al análisis, que incluye la preparación, la obtención y el transporte, lo cual concluye en el análisis de la muestra.

Errores en cualquiera de las fases llevan a pérdidas económicas y temporales, mala utilización de recursos y, lo más grave, a errores diagnósticos de gran impacto en el pronóstico y la seguridad en la determinación de una contaminación bacteriana (Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, 2008).

2.9.2. LA TOMA DE MUESTRA

Para el éxito de la determinación microbiológica es esencial la comunicación entre todo el equipo de trabajo. El estudio se solicita con una orientación clara de acuerdo con la situación problemática (Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, 2008).

2.9.3. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS

Toda muestra debe ser etiquetada con los siguientes datos básicos:

1. Nombre
2. Fecha y hora de recolección. FIGURA # 15 (Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, 2008).

2.10. CONDICIONES GENERALES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

El tiempo de transporte de los especímenes obtenidos para estudio debe ser corto y de acuerdo con la viabilidad del organismo sospechado y el recipiente donde se colectó.

- Las muestras para cultivo de bacterias no deben ser almacenadas por más de 24 horas, independientemente del medio y la temperatura de almacenamiento (Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, 2008).

2.10.1. PRECAUCIONES DE BIOSEGURIDAD

La manipulación inapropiada puede convertirse en una fuente de contaminación biológica para las muestras que están en contacto o para el medio ambiente. Utilizar los elementos de protección personal necesarios para evitar contaminación, de acuerdo con la fuente de la muestra.

- Protección ocular: gafas o mascarilla con visera.
- Mascarilla.
- Guantes.
- Bata.
- Contenedores para especímenes, a prueba de fugas y de fácil sellamiento (Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, 2008).

2.10.2. PREPARACIÓN DE ELEMENTOS

Se debe preparar el equipo necesario para la obtención, la conservación y el transporte correctos de la muestra. Las propiedades biológicas de esta pueden ser alteradas por variables medioambientales como: tiempo, contenedor, contaminación externa (Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, 2008).

2.11. MÉTODOS PARA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS

2.11.1. PREPARACIÓN DE DILUCIONES

- Para realizar una dilución 1/10 (10^{-1}), se pipetea asépticamente 1 ml de muestra en un tubo con 9 ml de solución tamponada estéril y se agita.
- Para realizar una dilución 1/100 (10^{-2}), se pipetea 1 ml de la dilución 1/10 en otro tubo con 9 ml de solución tamponada estéril y se agita.
- Así sucesivamente se van haciendo las diluciones hasta llegar a la disolución del tubo 5 (1/100000 (10^{-5})) (Tecnología, 1990).

2.11.2. TOMA DE MUESTRA

La técnica de muestreo depende del lugar donde se realiza dicho muestreo

2.11.3. MATERIAL Y EQUIPO

- Membranas filtrantes de 0,45 μm de tamaño de poro
- Soporte del filtro con embudo
- Sistema de vacío
- Pipetas estériles de 10 y 1 ml.
- Estufa de cultivo
- Asa de siembra
- Pinzas estériles

2.12. MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO PARA COLIFORMES TOTALES: CALDO ENDO, MF

Se utiliza el Caldo Endo para el recuento de coliformes totales. Este es un medio para el aislamiento selectivo de los coliformes totales pues lleva inhibidores para el resto de microorganismos. El lauril sulfato y desoxicolato que forman parte de la fórmula del medio permite crecer a los coliformes lactosa positivo pero inhibe el crecimiento del resto de bacterias acompañantes. Las colonias lactosa positiva se colorean de rojo por la liberación de fucsina del sulfato de fucsina. Las colonias de *E. coli* y de los coliformes muestran generalmente un brillo metálico (Tecnología, 1990).

2.12.1. AGAR

Se utiliza este medio para la identificación y recuento de coliformes en agua, leche y otros líquidos mediante filtración sobre membrana y está incluido en las recomendaciones de la APHA. "American Water Works Association and Water Pollution Control Federation: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2004".

2.12.2. FORMA DE ACTUACIÓN

En este medio todos los coliformes crecen formando colonias de color rojo oscuro con el característico brillo metálico de *Escherichia coli* de color verde-azulado aunque en los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* es tan intenso como en *Escherichia* y puede pasar desapercibido. El verde brillante, la bilis de buey y la elevada concentración de tiosulfato y de citrato inhiben considerablemente la flora acompañante. Con el tiosulfato e iones de hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias. Las colonias de Coliformes quedan señaladas por la demostración de la degradación de lactosa a ácido, a cargo del indicador de pH rojo neutro. Los resultados se expresan en UFC/100 ml.

2.12.3. COMPOSICIÓN (g/litro)

Peptonas 10,0; lactosa 10,0; bilis de buey, desecada 8,5; citrato sódico 10,0; tiosulfato sódico 8,5; citrato de amonio y hierro (III) 1,0; verde brillante 0,0003; rojo neutro 0,025; agar- agar 12,0.

2.12.4. PREPARACIÓN

Disolver 60 g/litro y verter en placas

¡No esterilizar en autoclave! pH: 7,0 +- 0,1

Las placas con el medio de cultivo son claras y parduscas.

2.12.5. EMPLEO E INTERPRETACIÓN

Sembrar, por estría, la superficie del medio de cultivo con el material de muestra o con el procedente de un cultivo de enriquecimiento previo.

Incubación: 18-24 horas 37°C

Las colonias de gérmenes lactosa-negativas son incoloras, y las de gérmenes lactosa-positiva son rosadas hasta rojas. Las colonias de microorganismos formadores de H₂S presentan un centro negro (*Manual de medios de cultivo. 1994.*).

2.12.6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Cuando se obtienen recuentos de más de 200 colonias sobre una misma membrana pueden dar resultados erróneos debido a la superpoblación, ya que lo que aparece como una colonia puede ser originado por varias bacterias bajo condiciones de hacinamiento. En estos casos debemos volver a muestrear el agua y analizar muestras más diluidas.

Por otra parte, un número de colonias inferior a 10 ó 20 por membrana es poco fiable como base para establecer cuantitativamente la concentración bacteriana de la muestra. Por ejemplo, la obtención de 2 colonias a partir del análisis de 1 ml de un agua, no nos permite afirmar que esa agua contenía 200 colonias en 100 ml. En este caso conviene repetir el análisis filtrando un volumen de muestra mayor. Cuando el recuento de colonias está entre 20-200, los resultados se expresan:

- Si hemos analizado una muestra sin diluir:

Recuento de colonias = UFC / volumen de muestra filtrada.

- Si hemos analizado una muestra diluida:

Recuento de colonias x Factor de dilución = UFC/ volumen de muestra filtrada.

2.13. MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO PARA DETERMINACIÓN DE HONGOS EN CAJA PETRI PDA

- 1) Preparar de 5 tubos con 9 ml de agua destilada, o bien, solución salina isotónica, esterilizar y numerar del 1 al 5.
- 2) Se suspende en el tubo 1, un gramo de muestra a analizar “colágeno”.
- 3) Homogenizar perfectamente la prueba.
- 4) Con ayuda de una pipeta estéril, tomar 1 ml del tubo 1 y traspasarlo al tubo 2 y mezclar; con otra pipeta estéril, se toma una alícuota de 1 ml y se lleva al tubo 3; así sucesivamente hasta llegar al tubo 5.
- 5) Del último tubo, tomar 1 ml y depositarla en la placa de Petri estéril y vacía.

- 6) Adicionar aproximadamente 20 ml del medio Papa dextrosa o Sabouraud Dextrosa estéril, fundido y enfriado a 45°C.
- 7) Abrir la placa y exponerla al aire en cualquier sitio por espacio de media hora y colocar de nuevo la tapa en su sitio.
- 8) Incubar por 48-72 horas o más a temperatura ambiente.
- 9) Observar la presencia de colonias filamentosas de diversos tipos y colores.
- 10) Describir las observaciones hechas.
- 11) Observación de las estructuras de los hongos las colonias de hongos, tomar nota de sus características: Forma, aspecto del micelio algodonoso, ater "ciopelado u otro", pigmentación, elevación, consistencia, etc."

CAPÍTULO III

3.DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN

La presente investigación se realizó en la ciudad de Manta en la playa de Tarqui en el sitio Playita Mía “Con las coordenadas: 0°57’01.47”S 80° 42’ 31. 75 “O”la extracción del colágeno se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad Ciencias Del Mar en la Universidad Eloy Alfaro de Manabí y los análisis microbiológicos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología en la Universidad Politécnica Agropecuaria de Manabí.

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Los tipos de investigación a realizar en el proyecto de tesis son: experimental y bibliográfico: experimental ya que se hará en condiciones rigurosas y bajo las buenas práctica de manufactura y controlando las variables en estudio.

3.3. FACTORES EN ESTUDIO

3.3.1. FACTORES

Los factores que se estudiarán son:

- ✓ **FACTOR A:**Tiempo de inmersión en el producto ácido.
- ✓ **FACTOR B:**Concentración del ácido.

3.4. VARIABLES EN ESTUDIO

3.4.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Tiempo de inmersión en el producto ácido

Concentración de ácido

3.4.2. VARIABLES DEPENDIENTE

Cantidad de materia prima

Tipo de ácido

Calidad del agua

Temperatura ambiente

3.5. CUADRO DE VARIANTES

3 muestras 3 repeticiones

1=a

2=b

3=c

Muestra	Concentración de ácido láctico	Temperatura	Tiempo
A	1%	18°C	48hr
	1%	20°C	48hr
	1%	23°C	48hr
B	1.5%	18°C	48hr
	1.5%	20°C	48hr
	1.5%	23°C	48hr
C	2%	18°C	48hr
	2%	20°C	48hr
	2%	23°C	48hr

Elaborado por: Autoras de la investigación.

3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL

PIEL DE PESCADO	CONCENTRACIÓN	CLORURO DE SODIO 1M (NaCl)	AGUA DESTILADA	ÁCIDO LÁCTICO (C ₃ H ₆ O ₃)	NIPAGINA 4%
1 KG	1%	59 gr NaCl	20 Litros	100 ml	400 gr
1 KG	1.5%	59 gr NaCl	20 Litros	150 ml	400 gr
1 KG	2%	59 gr NaCl	20 Litros	200 ml	400 gr

Elaborado por: Autoras de la investigación.

3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Regresión lineal.

Dadas dos variables (Y: variable dependiente; X: independiente) se trata de encontrar una función simple (lineal) de X que nos permita aproximar Y mediante:

$$Y = bx + a$$

Donde: b: pendiente; a: intercepto; R²: coeficiente de regresión

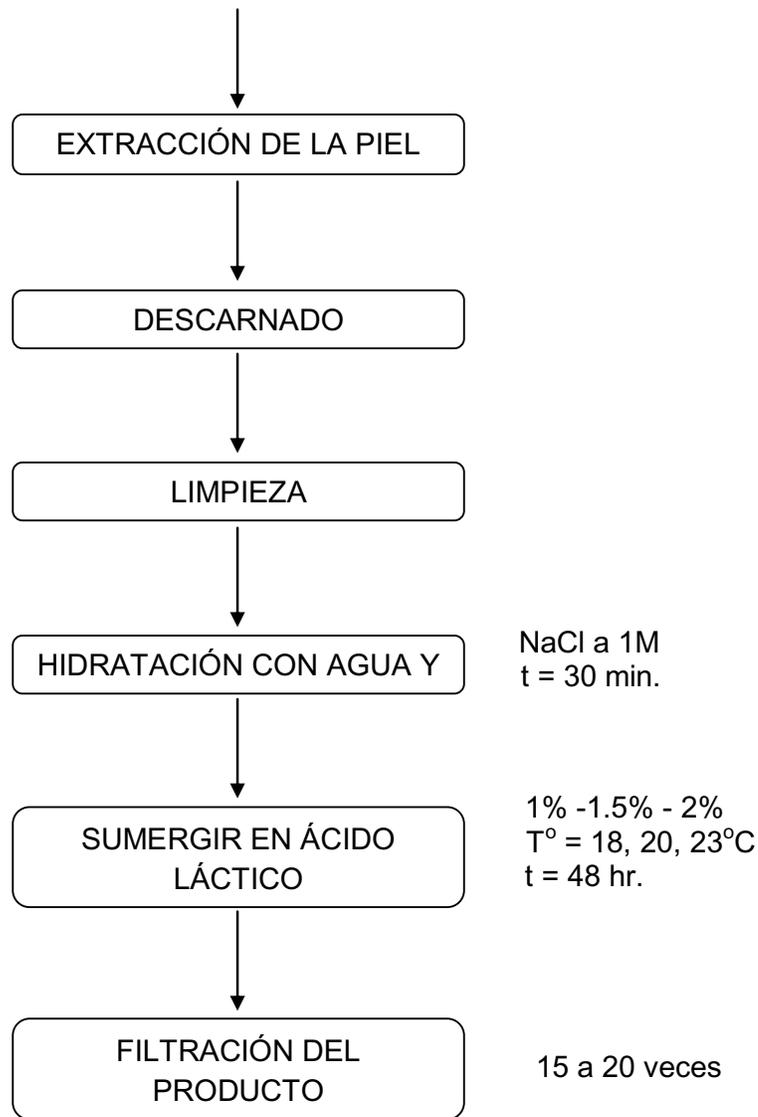
$$Y = \frac{\text{kg de colágeno}}{\% \text{ de Ac. Láctico}}$$

3.8. MANEJO DEL EXPERIMENTO

Con el fin de determinar la influencia de las pieles de pescado en la obtención de colágeno, se aplicará el siguiente diagrama de flujo, donde posteriormente se describe, el procedimiento de obtención de la fuente de proteína fibrosa.

3.9. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EXTRACCIÓN DE COLÁGENO A PARTIR DE LA PIEL DE PESCADO

MATERIA PRIMA



(Utilización de medio ácido para la extracción de colágeno en la estructura del pescado)

Elaborado por: Autoras de la investigación.

3.10. MUESTREO DE PIELES DEL DORADO

En el muestreo se aplicaron pruebas sensoriales que permitieron evaluar de manera sencilla la calidad de las pieles de pescado para la producción de colágeno. Se realizó un muestreo simple por atributos.

A la semana obtuvimos aproximadamente 50 pieles de la especie de pescado Dorado, equivalentes a 3 kilogramos. Estas fueron congeladas y almacenadas en bolsas de polietileno, cada una con 1kg de piel.

3.11. EXTRACCIÓN DE LA PIEL

3.11.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y LIMPIEZA DE LA PIEL.

3.11.1.1. EXTRACCIÓN: Para lograr una buena conservación de las pieles es necesario que estas se contaminen el mínimo posible durante el fileteado y su posterior transporte a la sección de conservación.

Para ello se recomienda que al sacar la piel del animal se recoja directamente en recipientes limpios y adecuados para que no se ensucien con los restos de carne producida por el fileteado, que en mayor o menor cantidad pueden encontrarse en el suelo (Pasos & Prado, 2004).

3.11.1.2. DESCARNADO: Este proceso es muy importante ya que de esto depende una buena conservación. Una vez efectuado la recolección de las pieles estas pasa a la sección de conservación. Ahí se extienden sobre una mesa limpia con el lado carne hacia arriba para efectuar un descarnado total y un pequeño recortado. Consiste en quitar en lo posible toda la carne de la piel con un cuchillo bien afilado y teniendo el cuidado de no hacer agujeros, ya que esto le haría perder su valor comercial, en esta operación deberá eliminarse de la piel todas aquellas partes que no sirvan para la obtención de cuero, tales como colas, partes

de espinas, ya que estos restos por su propia naturaleza y grosor son difíciles de secar adecuadamente o que la sal de conservación llegue a penetrar y que perjudica la conservación (Pasos & Prado, 2004).

3.11.1.3. LIMPIEZA: Consiste en un lavado el cual tiene por objeto, limpiar las pieles, y eliminar las impurezas presentes. La abundante agua coopera con una mejor humectación de la piel y elimina parcialmente las grasas naturales que en conjunto con bactericidas dejan las pieles en tripa limpias de suciedad (Pasos & Prado, 2004).

3.11.1.4. LAVADO CON AGUA Y SAL: Consiste en sumergir las pieles en NaCl "cloruro de sodio" a 1M durante 30 minutos. Este proceso tiene como objeto que las pieles saladas adquieran una flexibilidad similar a la que tenía cuando se separó del animal (Pasos & Prado, 2004).

3.11.1.5. HIDRATACIÓN EN ÁCIDO LÁCTICO: Las pieles se introducen en la solución de ácido láctico al 1% -1,5% - 2%. La hidratación se realiza en envases de cristal a las temperaturas de 18, 20 y 23 grados C durante a 48 horas manteniendo un control visual del proceso (Pasos & Prado, 2004).

3.11.1.6. FILTRACIÓN: La filtración se realiza aproximadamente de 15 a 20 veces a través de los filtros de seda natural, que elimina de la superficie del colágeno los pigmentos, los restos de las células, mientras retiene el ácido láctico hidratado no unido (Pasos & Prado, 2004).

3.12. MATERIALES Y REACTIVOS

3.12.1. REACTIVOS

* Agua destilada

* Sal

*Ácido láctico

* Nipagina

3.12.2. MATERIALES

*Recipientes de cristal

* Tablones de madera

* Cuchillos

* Balanza analítica

* Probeta

* Pipeta

* Filtros de seda natural

3.13. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PARA LA EXTRACCIÓN DE COLÁGENO

1. Se prepara una solución al 2% mediante la adición de 200 ml de ácido láctico más el 4% (400 gr) de nipagina hasta 10 litros de agua. 1kg de piel se introducen cuidadosamente en recipientes de cristal de 12 litros (Pasos & Prado, 2004).
2. Se prepara una solución al 1,5% mediante una adición de 150 ml de ácido láctico más el 4% (400 gr) de nipagina hasta 10 litros de agua. 1kg de piel se introducen cuidadosamente en recipientes de cristal de 12 litros (Pasos & Prado, 2004).
3. Se prepara una solución al 1% mediante una adición de 100 ml de ácido láctico más el 4% (400 gr) de nipagina hasta 10 litros de agua. 1kg de piel se introducen cuidadosamente en recipientes de cristal de 12 litros (Pasos & Prado, 2004).

3.14. EXTRACCIÓN DEL COLÁGENO

El procedimiento consiste, en la limpieza manual de las pieles con la ayuda de instrumentos hechos de materiales naturales, tales como cristal o madera, para eliminar las escamas, las branquias y la carne.

Las pieles preparadas de este modo se sumergen en NaCl "cloruro de sodio" a 1M durante 30 minutos. Este proceso tiene como objeto que las pieles saladas adquieran una flexibilidad similar a la que tenía cuando se separó del animal (Pasos & Prado, 2004).

Luego se introducen en una solución de ácido láctico al 1% -1,5% - 2%, con lo que se obtiene la hidratación del colágeno contenido en las pieles.

La hidratación se realiza en envases de cristal a las temperaturas de 18, 20 y 23 grados C durante a 48 horas manteniendo un control visual del proceso.

A continuación, viene la filtración usando tejido de seda natural de densidad creciente, múltiples tensiones causan la separación del colágeno puro de los elementos de las células, pigmentos y los restos de la solución de ácido.

Los filtros de seda natural tienen una estructura similar a la estructura del colágeno, que previene el daño de la estructura del colágeno (Przybylki & Jozef, 2010).

La filtración se realiza aproximadamente de 15 a 20 veces a través de los filtros de seda natural, que elimina de la superficie del colágeno los pigmentos, los restos de las células, mientras retiene el ácido láctico hidratado no unido. El colágeno obtenido tiene una textura de gelatina blanca (Przybylki & Jozef, 2010).

El colágeno está desprovisto del olor característico, mientras que la actividad biológica permanece intacta. El producto obtenido mediante la invención se usa por vía transdérmica, contiene su actividad biológica que es característica únicamente de una proteína extracelular de la triple hélice (Przybylki & Jozef, 2010).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los meses de agosto y septiembre recolectamos en Playita Mía ubicada en la ciudad de Manta, vía Puerto aeropuerto; aproximadamente 50 pieles de la especie de pescado Dorado, equivalentes a 3 kilogramos.

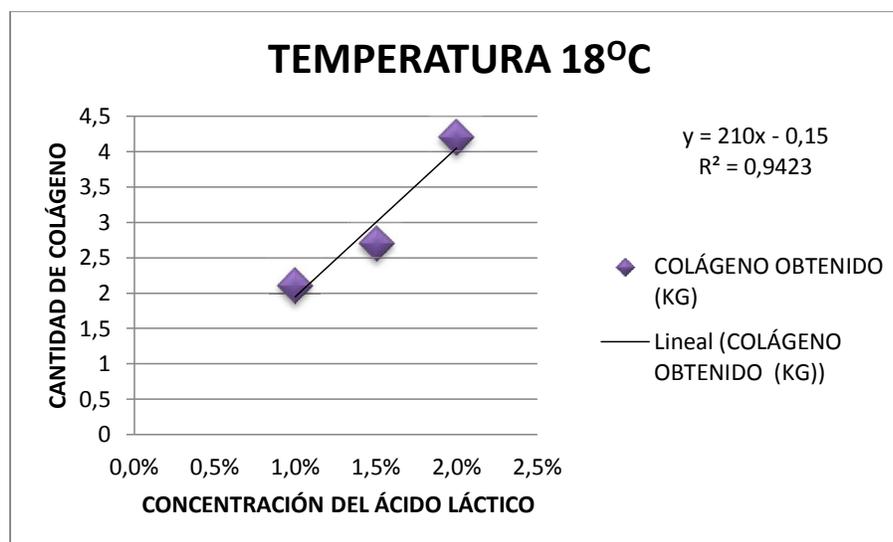
Con respecto a la obtención del colágeno obtuvimos un resultado semejante, en las 3 concentraciones de ácido láctico utilizado; las cuales fueron favorables, en las 3 repeticiones obtuvimos un colágeno libre de microorganismos como coliformes y hongos.

Los análisis de coliformes y hongos realizados en el laboratorio durante la fase experimental, fueron tomadas de acuerdo al **MANUAL DE TOMAS DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO** de la **Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D. C**, considerando que son muestras que deben ser tratadas con la mayor precaución posible en temperatura, tiempo y manipulación por esto para evitar su contaminación o alteración el producto obtenidose colocó en recipientes de vidrioselladas debidamente etiquetadas en una hielera con hielo para ser transportadas al laboratorio de microbiología de la facultad de Pecuaria de la ESPAM.

La extracción de colágeno en las diferentes concentraciones (1%, 1.5%, 2%) a temperatura ambiente (18, 20, 23°C) nos permitió conocer que la calidad del colágeno es óptima ya que está libre de microorganismos tales como hongos y coliformes totales; dando como resultado en las gráficas de regresión lineal que a temperatura de 18°C se obtuvo 210 Kg de colágeno donde hubo mayor dispersión con un coeficiente de regresión R^2 de 0.942; a 20°C se obtuvo 260 Kg de colágeno que es la que menos dispersión presenta con un coeficiente de regresión R^2 0.992 que es la que más se aproxima a 1y a una temperatura de 23°C se obtuvo 270 Kg con mayor cantidad de colágeno con un coeficiente de regresión R^2 0.978. A continuación describimos los gráficos para un mejor entendimiento de las mismas:

GRÁFICO 1: COLÁGENO OBTENIDO A UNA TEMPERATURA DE 18°C, EN SUS TRES CONCENTRACIONES

COLÁGENO OBTENIDO EN LAS TRES CONCENTRACIONES		
TEMPERATURA	CONCENTRACIÓN (%)	COLÁGENO OBTENIDO (KG)
18°C	1%	2,1
18°C	1,5%	2,7
18°C	2%	4,2



En este gráfico podemos observar que existe mayor dispersión lo que indica poca concurrencia entre los valores obtenidos por cada concentración y que a una temperatura de 18°C se obtuvo 210 Kg de colágeno / porcentaje de ácido láctico.

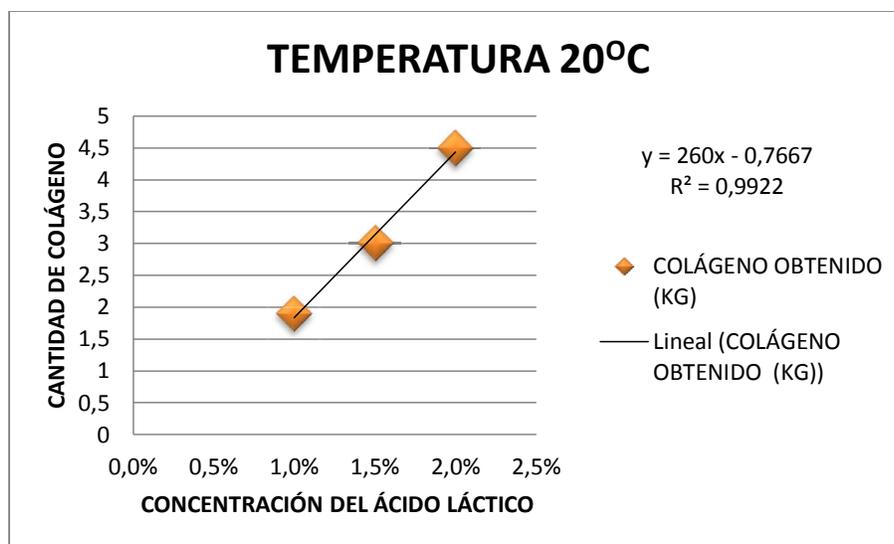
$$Y = \frac{\text{kg de Colágeno}}{\% \text{ de Ac. Láctico}}$$

$$Y = 210x - 0,15$$

$$R^2 = 0,942$$

GRÁFICO 2: COLÁGENO OBTENIDO A UNA TEMPERATURA DE 20°C, EN SUS TRES CONCENTRACIONES

COLÁGENO OBTENIDO EN LAS TRES CONCENTRACIONES		
TEMPERATURA	CONCENTRACIÓN	COLÁGENO OBTENIDO (KG)
20°C	1%	1,9
20°C	1,5%	3,0
20°C	2%	4,5



En este gráfico observamos que a una temperatura de 20°C hubo menor dispersión entre los valores obtenidos en el cual hay una mayor aproximación a $R^2 = 1$ lo que indica más concurrencia entre los valores obtenidos por cada concentración y se obtuvo 260 Kg de colágeno / porcentaje de ácido láctico.

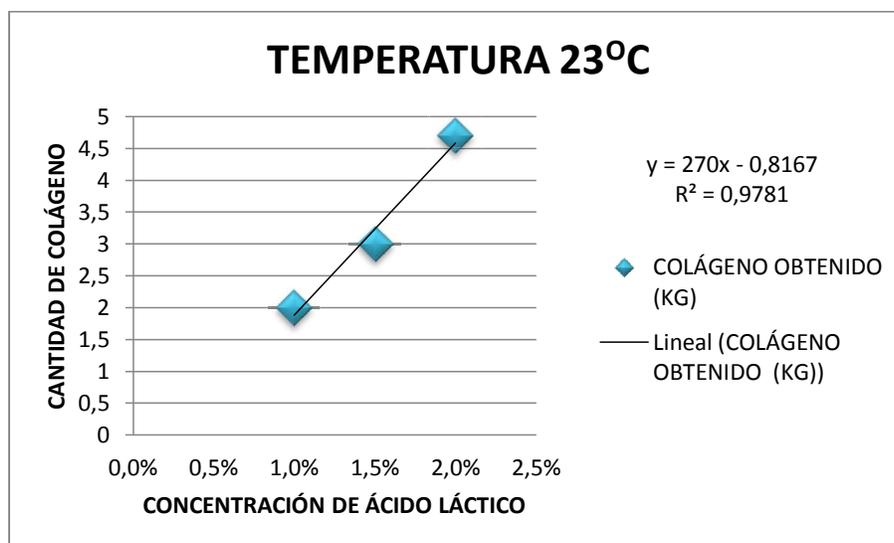
$$Y = \frac{\text{kg de Colágeno}}{\% \text{ de Ac. Láctico}}$$

$$Y = 260x - 0,7667$$

$$R^2 = 0,9922$$

GRÁFICO 3: COLÁGENO OBTENIDO A UNA TEMPERATURA DE 23°C, EN SUS TRES CONCENTRACIONES

COLÁGENO OBTENIDO EN LAS TRES CONCENTRACIONES		
TEMPERATURA	CONCENTRACIÓN	COLÁGENO OBTENIDO (KG)
23°C	1%	2
23°C	1,5%	3,0
23°C	2%	4,7



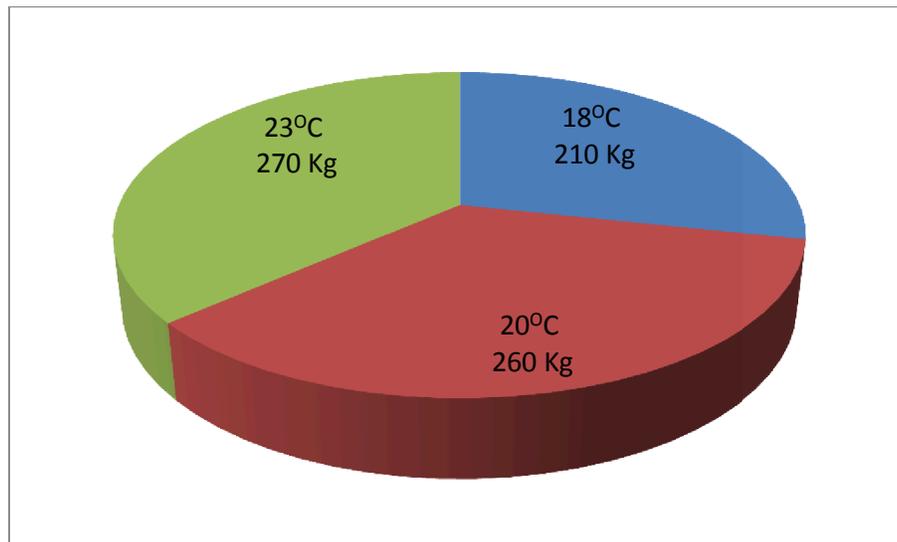
En este gráfico observamos que existe poca dispersión lo que indica poca concurrencia entre los valores obtenidos por cada concentración y que a una temperatura de 23°C se obtuvo 270 Kg de colágeno / porcentaje de ácido láctico lo que demuestra que a esta temperatura se obtiene mayor cantidad de colágeno.

$Y = \frac{\text{kg de Colágeno}}{\% \text{ de Ac. Láctico}}$

$Y = 270x - 0,816$
 $R^2 = 0,9781$

GRÁFICO 4: KG DE COLÁGENO OBTENIDO A DIFERENTES TEMPERATURAS

TEMPERATURA	CANTIDAD DE COLÁGENO
18 ^o C	210 Kg
20 ^o C	260 Kg
23 ^o C	270 Kg



En este gráfico podemos observar que se obtuvo más cantidad de colágeno a una temperatura de 23°C por cada porcentaje de ácido láctico.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Para la obtención del colágeno a través de las pieles de pescado del dorado se realizó una serie de procedimientos: en primer lugar las pieles fueron recogidas del sector Playita Mía tal como se ve en la figura #4; en segundo lugar las pieles fueron lavadas con abundante agua para su limpieza figura # 6; en tercer lugar fueron descarnadas y descamadas figura # 7; en cuarto lugar una vez estando limpias fueron cortadas en pedazos pequeños figura # 8. Para luego ser sumergidas en una solución de cloruro de sodio figura # 13y luego sumergidas en la solución de ácido láctico en diferentes concentraciones figura # 15; con este procedimiento logramos obtener el colágeno esperado como se muestra en la figura # 16.
- Una vez realizado el respectivo procedimiento para la extracción de colágeno comprobamos que si se puede obtener colágeno a partir de las pieles de Dorado. El colágeno obtenido es de tipo I.
- Los datos obtenidos nos demuestran que a una temperatura de 20°C existe poca dispersión por lo tanto se aproxima a 1; mejor correlación.
- Además podemos darnos cuenta que a una temperatura de 23°C en las distintas concentraciones se obtuvo mayor cantidad de colágeno teniendo así 270 Kg.
- Después de la extracción del colágeno se le realizaron pruebas de coliformes y hongos a las tres concentraciones (1%; 1.5%; 2%), para asegurarnos que no existe ni un tipo de contaminación bacteriana.
- El colágeno obtenido a través de las pieles de pescado; es mucho mas beneficioso ya que no representa ni un peligro para el uso humano.

- El estudio del manejo de esta especie con relación a la carga bacteriana que significa la calidad final del producto y el valor comercial del mismo queda establecido que las buenas prácticas de manipulación son un factor determinante en la calidad final de todo producto.

5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio del proceso de extracción sometiendo a las pieles de Dorado a temperaturas mayores con el fin de revisar el rendimiento del proceso.
- Para la etapa de hidratación se requiere el estudio de mayores concentraciones de cloruro de sodio manteniendo el pH constante para obtener mayores recuperaciones de colágeno.
- Un factor importante a recomendar es utilizar un anti-bacterial como es el caso de la Nipagina; que no permite la proliferación de bacterias en el producto obtenido.
- Debemos tener presente siempre las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para obtener un producto libre de contaminación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amerling, C. (2001). Antología Tecnología de los peces. San José: Euned p. 29, 30.
2. B., T. (2005). Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*: pp. 597-611.
3. B.J., G. B. (1982). Synopsis of the biological data on dolphin-fishes, *Coryphaena hippurus*. Palko.
4. Bae, I. K. (2008). "Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes."
5. Baldauf, S., & Palmer, J. (1993). Animals and fungi are each others closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. USA: National Acad Sciences: pp. 11558.
6. Bitar, M. V. (2007). "Effect of multiple unconfined compression on cellular dense collagen scaffolds for bone tissue engineering." *J Mater Sci: Mater Med*18:237-244.
7. Bowman SM, F. S. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28 (8): pp. 799-808.
8. Calvo, & Miguel. (1989). *BIOQUIMICA DE LOS ALIMENTOS*.
9. Carrillo, & Leonor. (2009). *Mohos y micotoxinas*.
10. Collette, B. (1984). *Coryphaenidae*.
11. Devlin, T. (2004). *Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas*. Barcelona: Reverté S.A.

12. Duan, R. (2010). FUNCIONALIDADES DE ALIMENTOS DE COLAGENO. CHINA.
13. ECU. (sin fecha). Microbiología de los alimentos. Recuperado el 01 de septiembre de 2012, de
14. Eschmeyer, W. E. (1983). A field guide to pacific coast fishes of North Merica. Boston, EE.UU.
15. Espol. (2006). El Dorado.
16. Gasparini, J. y. (2001). The shore fishes of Trindade Island, Western South Atlantic.
17. Gelse, K. E. (2003). "Collagens - structure, function, and biosynthesis.". *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:1531 - 1546.
18. González Tuero, J. R. (4 de abril de 2004). "Heridas. Métodos de tratamiento". Obtenido de http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol8_1_04/san07104.htm.
19. Hobbs, B., & Roberts, D. (1993). Higiene y Toxicología de los alimentos. España: Trad. por Pedro Ducar Maluenda. 3 ed. Acribia. p 275.
20. Hora, L. (2006). Generalidades del Dorado. Ecuador.
21. Hureau, J. N. (1986). Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean, Volumen 2. Paris.
22. ICONTEC. (1995). Productos para la industria cosmética: Colágeno soluble. NTC 3750. Bogotá D.C.
23. Jawetz, E. M. (1997). Manual de microbiología médica. 7 ed. México: El manual moderno. p, 99, 243, 244.
24. Jawetz, E. (1996). Microbiología Médica 15 ed. México: Manual moderno. p 807.

25. Karim, A. A. (2009). "Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins.". *Food Hydrocolloids*23:563-576.
26. Keller NP, Tumer G, & JW., B. (2005). Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*3: pp. 937-47.
27. Kenneth, M. . (2004). *Biología*. Massachusetts: Prentice Hall. pp. p.538.
28. Kittiphattanabawon, P. S. (2010). "Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark.". *Food Chemistry*119(41519-1526).
29. L, W. R. (1973). Academic Press.
30. Larousse. (2007). *Diccionario Manual de Sinónimos y Antónimos de la Lengua Española*. S.L.
31. Lu, Q. K. (2004). "Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering.". *Biomaterials*25: 5227-5237.
32. Mataix, J. (sin fecha). *Nutrición y alimentación Humana 1*. Barcelona, ES. : MMV Oceano. p 451.
33. Mathews, C. K. (2002). *Bioquímica*. Madrid: Pearson Educación, S.A.
34. Mihail JD, B. J. (2005). Foraging behaviour of armillariahizomorph systems. *Mycologica research*109: pp. 1195-207.
35. Mims., & Blackwell. (1996). Alexopoulos. pp. 30.
36. Morimura. (2002). *PIEL Y HUESOS DE PESCADO*.
37. Muyonga, J. H. (2004). "Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch.". *Food Chemistry*.85:81-89.
38. Nagai, T. a. (1999). "Isolation of collagen from fish waste material: (skin, bone and fins)". *Food Chemistry*68:277-281.

39. Potaros, T. N. (2009). "Characteristics of collagen from Nile Tilapia Skin isolated by two different methods." *Kasetsart Journal*43:584-593.
40. Proteios, S. D. (2009). Empresa Productora de Colágeno. México.
41. Przybylki, & Jozef. (2010). OBTENCION DE COLAGENO A TRAVES DE PIELES DE PESCADO.EUROPA.
42. Ricard-Blum, S. a. (2005). "The collagen superfamily:from the extracellular matrix to the cell membrane." *Pathologie biologie*53:430 - 442.
43. Riesle, J. A. (1998). "Collagen in Tissue-Engineered Cartilage: Types, Structure, and Crosslinks." *Journal of cellular Biochemistry*71:313-327.
44. Sadowska, M. K. (2003). "Isolation of collagen from the skins of Baltic cod." *Food Chemistry*81(2):257-262.
45. Saludalia. (2006). Higiene alimentaria. (En línea). MAD. ESP. Recuperado el 1 de septiembre de 2012, de <http://www.saludalia.com/nutricion/higiene-alimentaria>
46. Sanofi, B.-I. (1988). GELATINA. PARIS.
47. Sanofi, B.-O. (1988). ENSAYO. PARIS.
48. Sato, K. K. (2002). "Type XXVI collagen, a new Member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary." *The journal of biological chemistry*277(4):37678-37684.
49. Schoof, H. J. (2001). "Control of Pore Structure and Size in Freeze-Dried Collagen Sponges." *Journal of Biomedical Materials Research*58(4):352-357.
50. Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, D. (2008). Manual para la toma de muestras para análisis microbiológico. Bogotá: Linotipia Bolívar y Cía. S en C. p 5, 7, 8, 9, 10.

51. Senaratne, L. P. (2006). "Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish skin.". *Bioresource technology*97:191-197.
52. Shahidi. (1994). COLAGENO DE PIEL Y HUESO DE PESCADO.
53. Tecnología, L. d. (1990). Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.
54. U.R., A. M. (2007). A global ex-vessel fish price database: construction and applications. Sumaila.
55. Utilización de medio ácido para la extracción de colágeno en la estructura del pescado. (s.f.). Obtenido de
56. Vargas de Mayo C., C. (1983). coliformes. Lima, Perú.
57. Varnam, A., & Sutherland, J. (1995). Tecnología, química y microbiología. España.
58. Villela, I. J. (2004). Evaluación a la Microestructura y a las Propiedades Mecánicas del Acero Inoxidable 316LS y del Titanio Ti-6Al-4V como Biomateriales.
59. Wang, L. X. (2008). "Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea readfish". *Food Chemistry*108(2):616-623.
60. Wiley, J., & Sons. (1996). Mycology.
61. Woo, J. W. (2008). "Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna dorsal skin.". *Food Hydrocolloids*22(5):879-887.
62. Wu S, S. M. (2007). Redirection of cytosolic or plastidicisoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nature Biotechnology*24: pp. 1441-47.
63. Zeng, S. C. (2009). "Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia.". *Food Chemistry*116(2):879-883.

64. Zhang, J. R. (2009). "Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp.". *Food Chemistry*2009:318-322.
65. Zhang, M. W. (2009). "Isolation and characterisation of collagens from the skin of lagefin longbarbel catfish.". *Food Chemistry*115:826-831.
66. Zhang, Y. W. (2007). "Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp.". *Food Chemistry*103:906-912.

PÁGINAS ELECTRÓNICAS

1. Duiops. (1997-2009). Hongos. Recuperado el 25 de Febrero de 2013, de <http://www.duiops.net>
2. http://www.ecured.cu/index.php/Microbiolog%C3%ADa_de_los_alimentos
3. Pasos, & Prado, L. A. (2004). PIEL DE PESCADO. Obtenido de <http://www.cueronet.com/exoticas/pescado.htm>
4. Uprp. (1997). Primera Patente de Colágeno. Obtenido de <http://www.uprp.pl.com>
5. <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:nOe8e10ilwMJ:es.scrib.com/doc/55382222/presentación4->

ANEXOS

Tabla 1: Contenido de aminoácidos del colágeno tipo I de piel humana y de pescado.

Aminoácido	% aminoácido en colágeno Tipo I (piel humana) (Devlin, 2004)	% aminoácido en colágeno Tipo I (piel de pescado) (Zhang M. W., 2009)
Alanina	11	11,9
Arginina	5	5,8
Asparagina	5	4,2
Glutamina	7	6,9
Glicina	33	35,6
Histidina	0,5	0,6
Isoleucina	1	0,8
Leucina	2	2,0
Lisina	2	2,0
Metionina	0,6	0,5
Fenilalanina	1	1,3
Prolina	13	12,8
Serina	4	3,2
Treonina	2	2,2
Triptófano	2	0
Tirosina	0,3	0,3
Valina	2	1,7
4 - hidroxiprolina	8,6	8,2
TOTAL	100	100

Como se puede observar en la Tabla 1 las diferencias en el contenido de aminoácidos presentes en el colágeno de piel humana y de pescado son pequeñas, en el caso más notable la diferencia en el porcentaje de glicina es igual a 2,6 %. Esto indicaría que el colágeno obtenido de pieles de pescado puede ser empleado en la formulación de productos cosméticos o implantes a base de colágeno para seres humanos sin que generen respuesta inmune por parte del paciente (Devlin, 2004)(Zhang M. W., 2009).

Tabla 2: Características organolépticas evaluadas a las pieles frescas.

Parámetro	Estándar de calidad	Cumple	
		Si	No
Apariencia	Brillante	X	
Color	No decolorada	X	
Textura	Firme y elástica	X	
Olor	Característico a pescado fresco	X	

Fuente: el autor

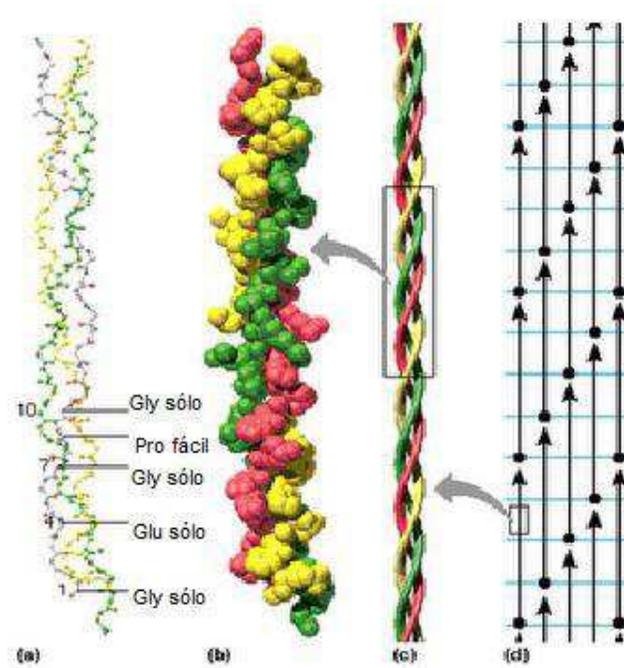
Todas las pieles incorporadas al presente estudio debieron cumplir con los parámetros de calidad mencionados en la Tabla 2.

Tabla 3: Características de algunos tipos de colágeno (Gelse, 2003) (Ricard-Blum, 2005) (Sato, 2002).

Tipo	Organización molecular	Distribución tisular	Detalles estructurales
I	$[\alpha 1(I)]_2 [\alpha(I)]$	Dermis – Hueso – Tendón – Ligamentos – Cornea	fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras de colágeno mayores
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Cartílago – Núcleo pulposo y el humor vítreo del ojo	fibrillas finas de 10 a 20 nanómetros, pero en otros microambientes puede formar fibrillas más grandes, indistinguibles morfológicamente del colágeno tipo I
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Tejido conjuntivo laxo - Vasos sanguíneos – Dermis	constituyente importante de las fibras de 50 nanómetros que se han llamado tradicionalmente <i>fibras reticulares</i>

IV	[α 1(IV)] ₂ [α 2(IV)]	Membrana basal - placas anclaje	No se polimeriza en fibrillas, sino que forma un fieltro de moléculas orientadas al azar, asociadas a proteoglicanos y con las proteínas estructurales laminas y fibronectina
V	[α 1(V)] [α 2(V)] [α 3(V)]	Cornea – Hueso – pulmón	Se asocia con el tipo I
VI	[α 1(VI)] [α 2(VI)] [α 3(VI)]	Dermis – cartílago – placenta – discos intervertebrales	Sirve de anclaje de las células en su entorno. Se asocia con el tipo I
VII	[α 1 (VII)] ₃	Piel – mucosa oral – cérvix	
VIII	[α 1(VIII)] ₂ [α 2(VIII)]	Células endoteliales	
IX	[α 1 (IX)] [α 2 (IX)] [α 3 (IX)]	Cartílago - cornea	Interactúa con el tipo II
X	[α 1 (X)] ₃	Cartílago hipertrófico y mineralizado	
XI	[α 1 (XI)] [α 2 (XI)] [α 3 (XI)]	Cartílago	Interactúa con los tipos II y IX.
XII	[α 1 (XII)] ₃	Tendones - ligamentos	Interactúa con los tipos I y III.
XIII	[α 1 (XIII)] ₃	Intestinos – Epidermis – folículo piloso	Interactúa con los tipos I y III.
XIV	[α 1 (XIV)] ₃	Dermis – tendón – vasos sanguíneos	
XV	[α 1 (XV)] ₃	Fibroblastos – células de músculos lisos	
XVI	[α 1 (XVI)] ₃	Fibroblastos - queratinocitos	
XVII	[α 1 (XVII)] ₃	Uniones dermis – epidermis	
XVIII	[α 1 (XVIII)] ₃	Pulmón	
XIX	[α 1 (XIX)] ₃	Miosarcoma humano	
XX	[α 1 (XX)] ₃	Epitelio corneal – piel del embrión	
XXI	[α 1 (XXI)] ₃	Paredes de vasos sanguíneos	
XXVI		Testículo y Ovario de adultos	

Figura1: Estructura de las fibras de colágeno.



Tomado de: (Mathews, 2002)

Figura 2: Mapa Geográfico

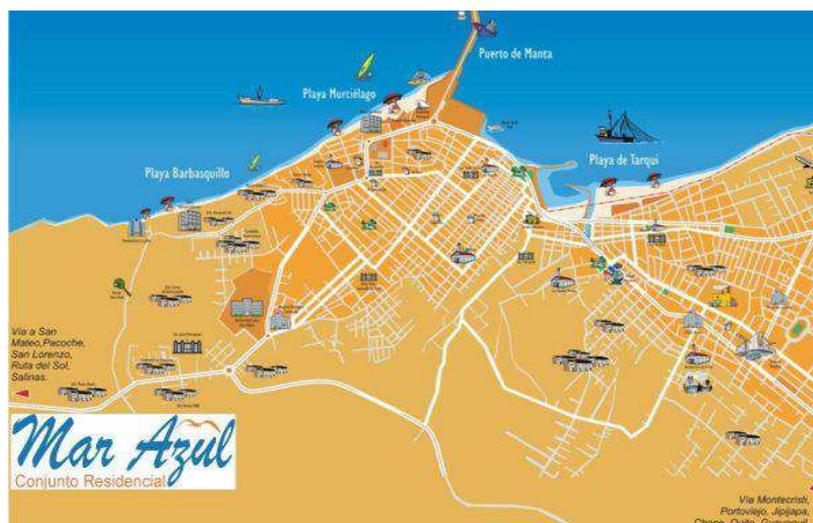


Figura 3: Coordenadas $0^{\circ}57'01.47''S$ $80^{\circ}42'31.75''O$



Figura 4: El dorado en Playita Mía.



Figura 5: Recolección de la piel de Dorado.



Figura 6: Lavado de las pieles del Dorado.



Figura 7: Limpieza de las pieles del Dorado.





Figura 8: Corte de las pieles del Dorado.



Materiales utilizados

Figura 9: Cuchillos.



Figura 10: Tablones de madera.



Figura 11: Balanza analítica

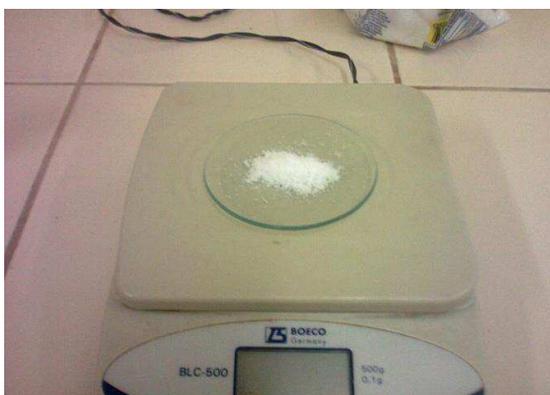


Figura 12: Vaso y filtro de seda



Figura 13: Pipeta



Figura 14: Probeta



Figura 15: Recipientes de vidrio.



Reactivos utilizados

Figura 16: Ácido Láctico



Figura 17: Nipagina



Figura 18: Cloruro de sodio NaCl (sal) pesada en balanza analítica.

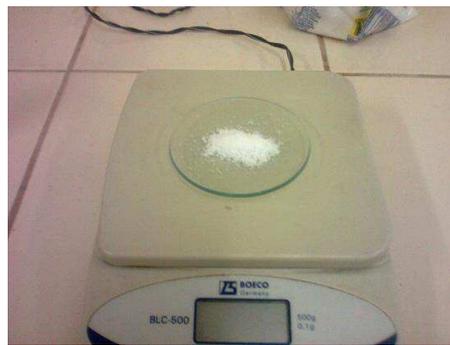


Figura19: Solución de Cloruro de Sodio (NaCl).



Figura 20: Introducción de las pieles del Dorado en la solución de Cloruro de Sodio (NaCl).



Figura 21: Solución del Ácido Láctico.



Figura 22: Introducción de las pieles del Dorado en la solución de Ácido Láctico.



Figura 23: Obtención del colágeno a través de las pieles del dorado.



Figura24: Filtración del colágeno.



Figura 25: Peso en gramo del colágeno.



Figura 26: Medición del volumen del colágeno obtenido.

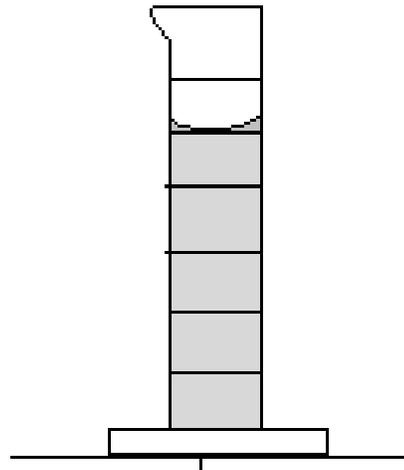


Figura 27: Cultivo en caldo Selenito



Figura 28: Esquema del trabajo.

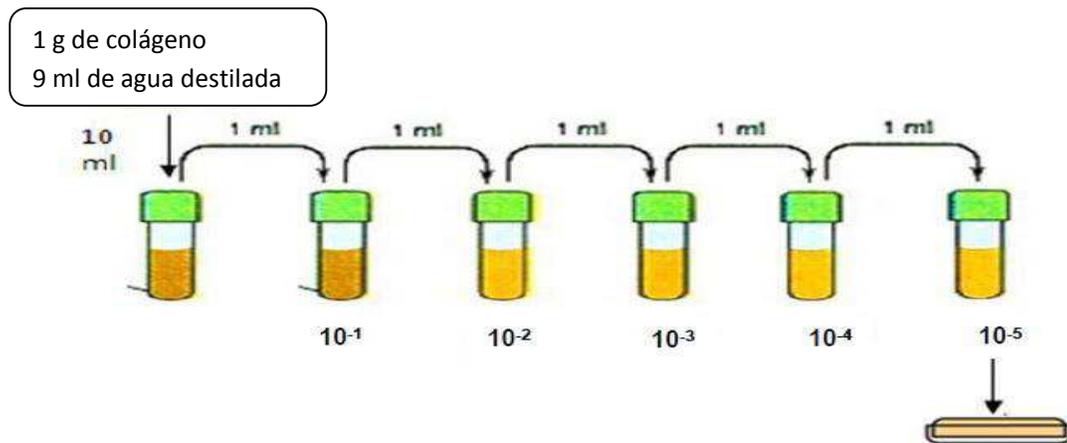


Figura 29: Cultivo en caja petri para prueba confirmativa de coliformes.



Figura 30: Confirmación de que no existe coliformes.

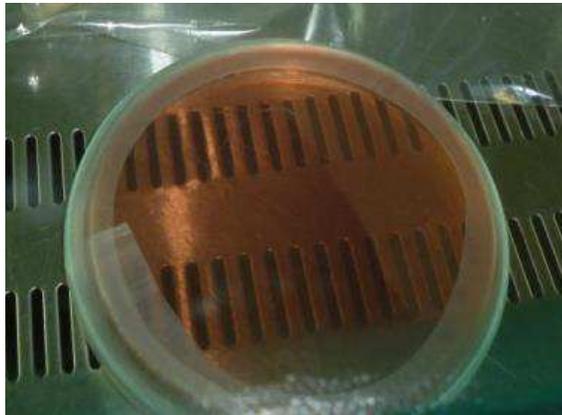


Figura 31: Cámara bacteriológica



Figura 32: Incubadora.



Figura 33: Resultados del análisis microbiológico.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**


ESPAM MFL

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA		
SEÑORITA: JENIFFER ALEXANDRA GARCIA INTRIAGO	REGISTRO: 006	
DIRECCIÓN: MANTA	TELF:	FAX:
FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: 19 DE FEBRERO DEL 2013		
FECHA DE ENTREGA DE LA MUESTRA: 22 DE FEBRERO DEL 2013		
MUESTRA RECIBIDAS: 3 COLAGENOS AL 1% ,1.5% Y 2% .		
EXAMEN (S) SOLICITADO (S): 3 Det. De <i>Coliformes</i> , y 3 Det. De <i>Hongos</i> .		
OBSERVACIONES: EL LABORATORIO NO SE RESPONSABILIZA POR LA TOMA Y TRASLADO DE LAS MUESTRA.		

RESULTADOS

COLAGENO AL 1%

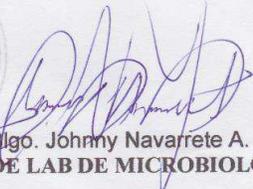
Determinación De <i>Coliformes</i> = Negativo
Determinación De <i>Hongos</i> = Negativo Presencia de <i>Levadura spp</i>

COLAGENO AL 1.5%

Determinación De <i>Coliformes</i> = Negativo
Determinación De <i>Hongos</i> = Negativo Presencia de <i>Levadura spp</i>

COLAGENO AL 2%

Determinación De <i>Coliformes</i> = Negativo
Determinación De <i>Hongos</i> = Negativo Presencia de <i>Levadura spp</i>



Bigo. Johnny Navarrete A.
JEFE DE LAB DE MICROBIOLOGÍA

Dirección: Av.10 de AGOSTO N° 82 y GRANDA CENTENO. Telefaxes 593-052 685 134/156/035/048
CALCETA - ECUADOR

WWW.ESPAM.EDU.EC

Manta, Junio 18 del 2013

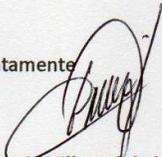
Doctor.
Luis Ayala Castro Ph.D
DECANO DE LA FACULTAD CIENCIAS DEL MAR "U.L.E.A.M"
Presente.-

De mis consideraciones:

Por medio de la presente, pongo a su consideración una vez realizada las correcciones debidas y revisada la tesis, certifico que las egresadas: García Intriago Jennifer Alexandra, Lucas Pilligua María Magdalena, cuyo tema "Utilización de medio acido para la Extracción de Colágeno de la piel del dorado (*Coryphaena Hippurus*)" pueda continuar con el trámite respectivo

Sin otro particular por el momento, me suscribo de usted.

Atentamente


Dr. David Villareal de la Torre
MIEMBRO DEL TRIBUNAL PRINCIPAL

Recibido: 18/6/2013

Manta, Junio 14 del 2013

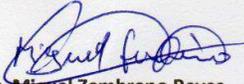
Doctor.
Luis Ayala Castro Ph.D
DECANO DE LA FACULTAD CIENCIAS DEL MAR "U.L.E.A.M"
Presente.-

De mis consideraciones:

Por medio de la presente, pongo a su consideración una vez realizada las correcciones debidas y revisada la tesis, certifico que las egresadas: García Intriago Jennifer Alexandra, Lucas Pilligua María Magdalena, cuyo tema "Utilización de Medio acido para la extracción de Colágeno de la pile del Dorado Coryphaena hippurus" pueda continuar con el tramite respectivo

Sin otro particular por el momento, me suscribo de usted.

Atentamente


Ing. Miguel Zambrano Reyes
MIEMBRO DEL TRIBUNAL PRINCIPAL

Recibí: 14/6/2013
Dona Fresco c.