



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas **05/marzo/2020**

OPICIO No. DEPI- 304/2020

**C. RODRIGO GUTIÉRREZ SANTIAGO
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ
PRESENTE.**

Habiendo recibido la comunicación, por parte de los CC. DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO, DR. MIGUEL ABUD ARCHILA, MC. JOSÉ HUMBERTO CASTAÑÓN GONZÁLEZ. En el sentido, de que se encuentra satisfactorio el contenido de la tesis denominada "PELÍCULAS BIODEGRADABLES A PARTIR DE COLÁGENO DE PIEL DE PEZ DIABLO (*Pterygoplichthys pardalis*), elaborada por usted, como prueba escrita para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica, AUTORIZAMOS a que se proceda a la impresión de la misma.

Sin otro particular, le envié un cordial saludo.

ATENTAMENTE.

**JUAN JOSÉ VILLALOBOS MALDONADO
JEFE DE LA DIVISION DE POSGRADO E INVESTIGACION.**



Vo. Bo.

**JOSÉ MANUEL ROSADO PÉREZ
DIRECTOR.**

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

**PELÍCULAS BIODEGRADABLES A PARTIR DE COLÁGENO
DE PIEL DE PEZ DIABLO (*Pterygoplichthys pardalis*)**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

I.B.Q. RODRIGO GUTIÉRREZ SANTIAGO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.

MARZO 2020

AGRADECIMIENTOS

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él”

Louis Pasteur

En primer lugar, agradezco a Dios por la vida, por todo lo que en ella he recibido, por todo aquello por lo que he tenido que luchar y esforzarme, agradecido por aquellas cosas que has mandado a mi vida y aquellas que no... porque todo me ha llevado a este punto en mi vida.

Agradezco a CONACYT (becario #700741) y al ICTI las becas otorgadas para la realización, desarrollo y culminación del presente proyecto. A mis padres y mi hermano, quienes han tratado de formarme como ser humano, guiando con el ejemplo, espero ser hoy una mejor persona que quién fui el día de ayer y este logro es posible en gran medida gracias a ustedes, los amo con todo mi corazón.

A mi directora de tesis, a mi comité tutorial y a todos los doctores, maestros y catedráticos que me instruyeron con sus enseñanzas durante el proceso de formación a lo largo de estos estudios de posgrado, espero poder honrarles en mi persona a ustedes y los conocimientos transmitidos por parte de cada uno de ustedes como un excelente profesionista.

A mi equipo de trabajo, de manera especial a Paola, Maritza y Amet, su calidad como profesionistas e investigadores solo puede ser superada por su calidad humana, gracias por ser compañeros, guías, consejeros, pero, sobre todo, amigos.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, de manera concreta a la facultad de ciencias químicas, a la Dra. Alicia Grajales Lagunes, al Dr. Miguel Ruiz Cabrera y a la I. en A. Cecilia Rivera Bautista por una grata y provechosa estancia, por los conocimientos nuevos adquiridos en el tiempo que pase en esa casa de estudios.

Por último, a mi alma mater y a todas aquellas personas que conocí a lo largo de este tiempo y que de una u otra manera me apoyaron en el desarrollo y culminación de esta meta. A todos ustedes, mi eterno agradecimiento.

RESUMEN

El colágeno es la proteína más abundante de origen animal, presente en una amplia gama de tejidos, representando aproximadamente casi el 30% de las proteínas totales. Es un biomaterial versátil debido a su alta biocompatibilidad, lo que permite emplearlo con otros polímeros con la finalidad de elaborar materiales como biocircuitos, parches con principios activos y películas biodegradables. Al día de hoy se han realizado trabajos con la finalidad de extraer colágeno mediante el método ácido a partir de la piel del pez diablo (*Pterygoplichthys pardalis*), sin embargo, no se han determinado las mejores condiciones de operación que permitan maximizar el rendimiento de extracción. El objetivo de esta investigación fue maximizar el rendimiento de extracción de colágeno mediante el método de colágeno soluble en ácido (CSA) de piel de *Pterygoplichthys pardalis*, evaluando el efecto de la relación materia prima:solución de extracción (p/v) y el tiempo sobre el rendimiento de extracción, empleando un diseño factorial 2^2 . Así mismo, se caracterizó el colágeno mediante electroforesis SDS-PAGE, espectroscopía IR y UV-Vis. Posteriormente se elaboraron y caracterizaron películas de colágeno y glicerol adicionadas con goma arábiga, empleando un diseño factorial $2^2 +$ estrella teniendo como factores a la concentración de colágeno (1 y 2%) y glicerol (10 y 20%). Se determinaron parámetros como la fuerza de corte (N), elongación a la ruptura (%) y módulo de Young (MPa) a cada uno de los tratamientos. De igual forma, se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) las temperaturas de transición vítrea (T_g) y de desnaturalización (T_m) de las películas. Además, se determinó la biodegradabilidad de las mismas mediante el índice de biodegradabilidad.

Se identificó al colágeno extraído como colágeno tipo I y se maximizó el rendimiento de extracción mediante el método ácido, obteniendo un rendimiento del 54% con respecto al peso seco, empleando un tamaño de partícula de 600 μm , una relación p/v 1:20 y un tiempo de extracción de 24 horas. Las películas de colágeno presentaron una fuerza de 25.25 ± 1.17 N, elongación a la ruptura de $15.99 \pm 0.07\%$, módulo de Young de 78.178 ± 7.078 MPa, rangos de T_g de -13 °C y -17 °C, rangos de T_m de 140 °C a los 158 °C, además de un índice de biodegradabilidad del $77.74 \pm 6.76\%$. Los resultados sugieren que el pez diablo (*Pterygoplichthys pardalis*) es una fuente viable y una alternativa para la extracción de colágeno, además que la especie tiene potencial como generadora de nuevos biomateriales biodegradables.

ABSTRACT

Collagen is the most abundant protein of animal origin, present in a wide range of tissues present in animals, where it represents almost 30% of total proteins. It is a versatile biomaterial due to its high biocompatibility, which allows it to be used with other polymers in order to make materials such as biocircuits, patches with active ingredients and biodegradable films. To this day, work has been carried out with the purpose of extracting collagen by means of the acid method from the skin of the devil fish (*Pterygoplichthys pardalis*), however, the best operating conditions that will obtain the maximum possible extraction performance have not been determined. The objective of this research was to maximize the yield of collagen extraction using the acid-soluble collagen method (ASC) of *Pterygoplichthys pardalis*'s skin, evaluating the effect of the raw material:extraction solution (w/v) ratio and time on the extraction yield using a factorial design 2^2 . Likewise, the collagen was characterized through SDS-PAGE electrophoresis, IR and UV-Vis spectroscopy. Subsequently, collagen and glycerol films added with gum arabic were elaborated and characterized, using a factorial design $2^2 + \text{star}$, having as factors the concentration of collagen (1 and 2%) and glycerol (10 and 20%). Parameters such as shear force (N), elongation at break (%) and Young's modulus (MPa) were determined for each of the treatments. The glass transition (T_g) and denaturation (T_m) temperatures of the films were determined through differential scanning calorimetry (DSC). In addition, the biodegradability was determined by means of the biodegradability index.

The extracted collagen was identified as type I collagen and the extraction yield was maximized through the acid method, obtaining a yield of 54% on dry weight basis, using a particle size of 600 μm , a 1:20 p/v ratio and an extraction time of 24 hours. The collagen films presented a force of 25.25 ± 1.17 N, elongation at break of $15.99 \pm 0.07\%$, Young's modulus of 78.178 ± 7.078 MPa, T_g ranges of -13°C to -17°C , T_m ranges of 140°C to 158°C , in addition to a biodegradability index of $77.74 \pm 6.76\%$.

The results suggest that the devil fish (*Pterygoplichthys pardalis*) is a viable and an alternative source for collagen extraction, and that the species has potential as a generator of new biodegradable biomaterials.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 El colágeno	3
2.2 Extracción del colágeno en peces	5
2.3 Usos del colágeno	7
2.4 Pez diablo	8
2.5 Elaboración de películas de colágeno	10
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVOS	15
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos	15
5. METODOLOGÍA	16
5.1 Extracción de colágeno soluble en ácido (CSA)	16
5.1.1 Evaluación del efecto del tamaño de partícula sobre el rendimiento de extracción de colágeno	17
5.2 Caracterización del colágeno	17
5.2.1 Perfil de peso molecular del colágeno	17
5.2.2 Espectroscopía infrarroja	18
5.2.3 Espectroscopía UV	18
5.2.4 Cuantificación de contenido proteico	18

5.3 Formulación y preparación de las películas	18
5.4 Análisis de las películas	19
5.4.1 Textura	19
5.4.2 Calorimetría diferencial de barrido	19
5.4.3 Solubilidad	20
5.4.4 Color	20
5.4.5 Prueba de biodegradabilidad	20
5.4.6 Análisis estadístico	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1 Extracción de colágeno	22
6.1.1 Efecto del tamaño de partícula sobre la extracción de colágeno	22
6.1.2 Maximización de la extracción de colágeno mediante el método ácido	22
6.1.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	25
6.1.4 Caracterización espectroscópica	27
6.2 Elaboración de películas de colágeno	30
6.2.1 Textura	31
6.2.2 Calorimetría diferencial de barrido	36
6.2.3 Solubilidad	38
6.2.4 Color	38
6.2.5 Biodegradabilidad	40
7. CONCLUSIONES	43
9. BIBLIOGRAFÍA	45
10. ANEXOS	57
Anexo 1: Curva patrón para la cuantificación de proteínas por el método Lowry empleando albúmina de suero bovino	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tipos de colágeno en vertebrados (Lizarbe, 2002)	3
Cuadro 2. Metodología, especie y rendimientos de extracción de colágeno en peces (Ovando <i>et al.</i>, 2018)	6
Cuadro 3. Ventajas y desventajas del uso de colágeno como biomaterial (Lee <i>et al.</i>, 2001)	7
Cuadro 4. Clasificación taxonómica de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	8
Cuadro 5. Concentraciones para la elaboración del gel de poliacrilamida	18
Cuadro 6. Rendimientos de extracción de colágeno soluble en ácido a partir de piel de pez diablo (<i>Pterygoplichthys pardalis</i>)	22
Cuadro 7. Asignación de señales obtenidas en el espectro IR de colágeno proveniente de piel de <i>P. pardalis</i>	28
Cuadro 8. Formulaciones evaluadas en la elaboración de películas de colágeno obtenido de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	30
Cuadro 9. Criterios de biodegradabilidad según la relación entre demanda química y bioquímica de oxígeno (Ardila <i>et al.</i>, 2012)	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de un segmento de la triple hélice de colágeno (McCance <i>et al.</i>, 2010)	4
Figura 2. <i>Pterygoplichthys pardalis</i> (Mendoza <i>et al.</i>, 2007)	8
Figura 3. Texturómetro Stable Micro Systems modelo TA.XT.plus	19
Figura 4. Calorímetro diferencial de barrido Q-2000	20
Figura 5. Gráfico de medias del efecto del tamaño de partícula sobre el rendimiento de extracción de colágeno	22
Figura 6. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de extracción de colágeno soluble en ácido (CSA) extraído de piel de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	23
Figura 7. Mecanismo de acción del ácido acético durante la extracción de colágeno por el método ácido adaptado de Yang <i>et al.</i> (2018)	24
Figura 8. Patrón electroforético de colágeno extraído de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>. M = Marcador molecular; E = Estándar de colágeno tipo I y CSA = Colágeno extraído mediante método de CSA	26
Figura 9. Patrón electroforético de colágeno presente en piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i> (Nurubhasha <i>et al.</i>, 2019).M = Marcador molecular, E = Estándar de colágeno tipo I y CSA = Colágeno extraído mediante método de CSA	27
Figura 10. Espectro IR de colágeno de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i> empleando H₂O como blanco	28

Figura 11. Espectro IR de colágeno tipo I extraído a partir de <i>Pelodiscus sinensis</i> (Zou <i>et al.</i>, 2017). Donde ASC: Colágeno soluble en ácido; UASC: Colágeno soluble en ácido asistido por ultrasonido	29
Figura 12. Espectro UV-Vis de colágeno extraído de piel de pez diablo (<i>Pterygoplichthys pardalis</i>)	30
Figura 13. Efecto del colágeno y el glicerol sobre la formación de películas de colágeno obtenido a partir de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	31
Figura 14. Efecto del colágeno y glicerol sobre la fuerza de corte de las películas de colágeno obtenidas a partir de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	32
Figura 15. Componentes del colágeno obtenidos por medio de extracción ácida	33
Figura 16. Efecto del colágeno y glicerol sobre la elongación a la ruptura de películas de colágeno obtenidas a partir de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	34
Figura 17. Efecto del colágeno y glicerol sobre el módulo de Young de películas de colágeno obtenidas a partir de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	35
Figura 18. Temperatura de transición vítrea y de desnaturalización en el termograma de película de colágeno extraído a partir de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i> (Tratamiento 7, Cuadro 8). Donde: Tg = Temperatura de transición vítrea; Tm = Temperatura de desnaturalización	36
Figura 19. Efecto del colágeno y glicerol sobre el parámetro “L” de películas de colágeno obtenidas a partir de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	39
Figura 20. Efecto del colágeno y glicerol sobre el parámetro “b” de películas de colágeno obtenidas a partir de piel de <i>Pterygoplichthys pardalis</i>	39

1. INTRODUCCIÓN

Las industrias que producen materiales para envolturas y empaques son comunes en todo el mundo. Para poder satisfacer la demanda, las industrias están optando por utilizar métodos modernos y seguros de empaquetamiento para sus productos como las películas biodegradables. Las películas biodegradables pueden producirse a partir de materiales con capacidad de formación de película (Pavli *et al.*, 2018). Se pueden elaborar a partir de biopolímeros que tengan la propiedad de formar películas como los polisacáridos, proteínas y lípidos. Actualmente se están desarrollando nuevas tecnologías en materiales de empaque como una respuesta a las tendencias de comercialización global que permitan una mayor distribución de alimentos. Razón por la cual, se ha incrementado el interés en las películas biodegradables para que cumplan con algunos requerimientos que ayuden a controlar y mitiguen las causas de deterioro de los alimentos (Montalvo *et al.*, 2012).

El colágeno es la proteína extracelular más abundante de origen animal, en los seres humanos es el principal constituyente en una variedad amplia de tejidos, como la piel, tendones y ligamentos, córnea, cartílago, pulmones e hígado, y su principal función es mantener la estructura de los tejidos y mejorar la fuerza, resistencia y flexibilidad de éstos. Por sus características, además, el colágeno es de gran importancia en la industria siendo sus aplicaciones más importantes en el campo de los biomateriales, ingeniería de tejidos demostrándose que las esponjas de colágeno permiten la adhesión celular y la proliferación de células. En el sector cosmético se ha utilizado para la prevención y tratamiento de arrugas, en el sector salud, ha sido empleado en la producción de parches para heridas y en el desarrollo de medicamentos con liberación de los principios activos (Fratzl, 2008; El-Rashidy *et al.*, 2015; Hashim *et al.*, 2015).

Actualmente, el colágeno se obtiene principalmente de residuos de origen porcino y bovino, sin embargo, se buscan nuevas fuentes de extracción de la proteína debido al rechazo generado por las enfermedades que estos animales sufren, como encefalopatía esponjiforme bovina (enfermedad de las vacas locas) que se puede transmitir a través del consumo de partes de animales infectados, sobre todo tejidos nerviosos (Serrano Gaona, 2011). Una fuente que actualmente se estudia son los peces, específicamente residuos del proceso de fileteo,

considerado como desecho dándole a este valor agregado. Chen *et al.* (2016) reportan mayor rendimiento de colágeno a partir de peces comparado con bovinos y porcinos.

El pez diablo (*Pterygoplichthys pardalis*) es considerado una especie invasiva, y representa una de las mayores amenazas para la biodiversidad de los ecosistemas acuáticos continentales y para las pesquerías de agua dulce en México. Fueron detectados por primera vez en México en el año de 1995 en el río Mezcala, en el estado de Guerrero, en la cuenca del río Balsas. Posteriormente, se han registrado en Tecpatán, Chiapas, en la cuenca del río Grijalva (Mendoza *et al.*, 2007). Debido a la morfología y fisiología que presenta este pez, no se ha aprovechado su carne para consumo humano por lo que se buscan alternativas para dar valor agregado a esta especie.

Los procesos de extracción de colágeno a partir de cualquier materia prima, consisten en la solubilización con un ácido ligeramente polar; filtración convencional, precipitación salina en presencia de un buffer neutro y extracción con enzimas, el colágeno obtenido se purifica mediante técnicas bioquímicas y fisicoquímicas (Singh *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2012).

Por todo lo mencionado anteriormente, en este proyecto se optimizó la extracción de colágeno a partir de piel de pez diablo *Pterygoplichthys pardalis*, mediante extracción química ácida, se caracterizó, y fue utilizado para evaluar su efecto en las propiedades mecánicas de biopelículas colagénicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 El colágeno

El colágeno se encuentra entre las proteínas fibrosas más abundantes y cumple una variedad de funciones mecánicas, particularmente en mamíferos. Es un tipo de proteína producida de forma natural que confiere estabilidad mecánica, resistencia y dureza a una variedad amplia de tejidos, desde tendones y ligamentos hasta piel, córnea, hueso y dentina. Engloba a un conjunto de proteínas compuestas por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadenas α y pueden ser moléculas tanto homo como heterotriméricas. Estas proteínas pueden ser agrupadas en un conjunto de subfamilias (Cuadro 1) y, desde un punto de vista bioquímico, los colágenos fibrilares son los de mayor interés, donde se encuentra el colágeno tipo I, el cual es el más abundante en mamíferos (Fratzl, 2008).

Cuadro 1. Tipos de colágeno en vertebrados (Lizarbe, 2002).

Subfamilia	Miembros
Fibrilares	Tipo I, II, III, V, XI
Asociados a fibras (FACITs)	Tipo IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX
Forman redes y estructuras microfibrilares	Tipo IV, VI, VII, VIII, X
Multiplexinas	Tipo XV, XVIII
Asociados a membrana (MACITs)	Tipo XIII, XVII

En 1994, Bella *et al.* reportaron a través de cristalografía de alta resolución la estructura de la triple hélice del colágeno. Dicha estructura confirmó la existencia de un conjunto de aminoácidos que se repiten de manera secuencial con la fórmula Gly-X-Y los cuales se conocen como dominios colagenosos (COL) siendo aminoácidos como la prolina (Pro) y la hidroxiprolina (Hyp) los que se ubican en las posiciones X e Y del triplete (McCance *et al.*, 2010).

Así, una tercera parte de los residuos son glicinas, que al igual que otras proteínas que se secretan y se glicosilan en la célula, antes de su secreción al espacio extracelular. La estabilidad de la estructura depende de la localización de los residuos, teniendo a la glicina (Gly) como primer aminoácido del triplete. Para que las tres cadenas α se aproximen lo suficiente para formar la triple hélice, en su interior sólo puede acomodarse la Gly al ser el aminoácido más pequeño para evitar impedimento estérico, quedando los residuos de los aminoácidos de las posiciones X e Y del triplete localizadas hacia el exterior.

Las tres cadenas α polipeptídicas forman una hélice triple denominada tropocolágeno, la cual es la unidad básica de la fibra de colágeno, cada una de las cadenas posee aproximadamente 1000 residuos. Esta estructura helicoidal triple, es característica del colágeno. Las cadenas individuales son hélices levógiras. Estas cadenas se enrollan entre sí para formar una triple hélice dextrógira, con interacciones débiles (puentes de hidrógeno) que se extienden a lo largo de la cadena y le dan rigidez (Figura 1) (Mathews *et al.*, 2012).

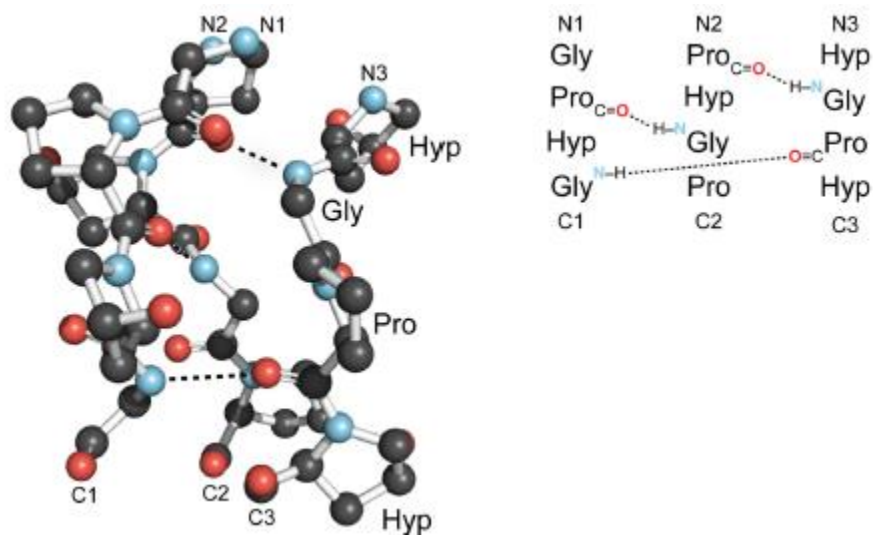


Figura 1. Estructura de un segmento de la triple hélice de colágeno (McCance *et al.*, 2010).

Las fuentes más abundantes de la gelatina (colágeno hidrolizado) son piel de cerdo (46%), piel bovina (29,4%) y huesos de cerdo y ganado (23,1%). El colágeno proveniente de pescado representó menos del 1.5% de la producción de gelatina total en 2007, pero este

porcentaje fue el doble que el generado en 2002, indicando que la producción de colágeno de especies de animales no mamíferos ha crecido en importancia (Gómez-Guillén *et al.*, 2009). Esto debido principalmente a que, en años recientes, con la propagación de enfermedades (enfermedad de las vacas locas, fiebre aftosa, reacciones autoinmunes y alérgicas alrededor del mundo), han generado tanto el rechazo como algunas restricciones sobre el colágeno proveniente de mamíferos, con lo cual se está poniendo énfasis en la obtención en fuentes alternativas (Weng *et al.*, 2014; Hashim *et al.*, 2015).

Además de los aspectos socioculturales y sanitarios bien conocidos, el creciente interés en la elaboración de subproductos de la industria del pescado y el buen uso de sus residuos es una de las razones de porqué explorar diferentes especies y la optimización de la extracción de colágeno de los pescados ha atraído la atención de los investigadores en la última década (Karim y Bhat, 2009; Gómez-Guillén *et al.*, 2011). La desventaja principal es que geles basados en ellos tienden a ser menos estables y tienen peores propiedades reológicas que las de mamíferos terrestres, limitando su campo de aplicación. Esto es cierto en el caso de especies de peces de agua fría, como el bacalao, salmón, abadejo de Alaska, etcétera. Sin embargo, estudios recientes han señalado que el colágeno de especies tropicales y subtropicales (tilapia, bagre y perca del Nilo) podría tener propiedades reológicas similares y de termoestabilidad que el obtenido a partir de mamíferos, dependiendo de la especie, tipo de materia prima y condiciones de procesamiento (Gilsenan y Ross-Murphy, 2000; Jamilah y Harvinder, 2002; Muyonga *et al.*, 2004; Gómez-Guillén *et al.*, 2009; Karim y Bhat, 2009; Rawdkuen *et al.*, 2010).

2.2 Extracción del colágeno en peces

Los principales métodos utilizados para la extracción de colágeno se pueden clasificar en químico y enzimático (Benjakul *et al.*, 2011). En estos dos métodos se ha reportado la extracción de colágeno tipo I exclusivamente, además se menciona también, que los rendimientos de extracción obtenidos son variados, dependiendo de la especie (Cuadro 2).

Cuadro 2. Metodología, especie y rendimientos de extracción de colágeno en peces (Ovando *et al.*, 2018).

Autor	Especie	Metodología	Resultados
Duan <i>et al.</i>, 2009	Carpa <i>Cyprinus carpio</i>	Extracción de colágeno en piel (CIS) y (CSA)	Rendimiento de extracción de colágeno tipo I en piel del 32%
Zelechowska <i>et al.</i>, 2010	Bacalao del Báltico <i>Gadus morhua</i>	Extracción de colágeno en huesos (CSA) y (CIS)	Extracción de colágeno tipo I Rendimientos: (CSA) 43% (CIS) 20%
Benjakul <i>et al.</i>, 2011	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	Extracción de colágeno en piel (CSA) y (CIS)	Extracción de colágeno tipo I Rendimientos: (CSA) 7.7% (CIS) 5.1%
Zeng <i>et al.</i>, 2012	<i>Rachycentron canadum</i>	Extracción de colágeno en piel (CSA) Y (CSP)	Extracción de colágeno tipo I Rendimientos: (CSA) 43.8% (CSP) 23.2%
Muralidharan <i>et al.</i>, 2013	Pez ballesta <i>Odonus niger</i>	Extracción de colágeno en piel huesos y aletas (CSA) y (CSP)	Extracción de colágeno tipo I Rendimientos: Piel (CSA) 46% (CSP) 50% Huesos (CSA) 30% (CSP) 38%
Kozłowska <i>et al.</i>, 2015	<i>Esox lucius</i>	Extracción de colágeno en piel (CSA) y (CSP)	Extracción de colágeno tipo I Rendimientos: (CSA) 12.5% (CSP) 6.5%
Tang <i>et al.</i>, 2015	Tilapia del Nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	Extracción de colágeno en piel (CSA)	Extracción de colágeno tipo I Rendimiento: 27.2%
Ovando <i>et al.</i>, 2018	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	Extracción de colágeno en piel y hueso (CSA), (CIS) y (CSP)	Extracción de colágeno tipo I Rendimientos: (CSA) 31.15%, (CIS) 21%, (CSP) 8.5%
Nurubhasha <i>et al.</i>, 2019	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	Extracción de colágeno en piel (CSA)	Rendimiento de extracción de colágeno tipo I del 19.6%

CSA: Colágeno soluble en ácido.

CSP: Colágeno soluble en pepsina.

CIS: Colágeno insoluble en sal.

En el cuadro 2 se puede observar que las especies son variadas y que los métodos de extracción generan colágeno soluble en ácido (CSA), colágeno insoluble en sal (CIS) y colágeno soluble en pepsina (CSP), notándose, además, que los rendimientos de extracción van de 5 a 50%.

2.3 Usos del colágeno

La literatura científica sobre diferentes alternativas y nuevas funcionalidades del colágeno ha experimentado un auge en los últimos 10-15 años, en parte debido al creciente interés en la valorización económica de los subproductos industriales (de la carne y la industria de los pescados), la gestión ambiental de residuos industriales y la búsqueda de condiciones de procesamiento innovadoras, así como posibles aplicaciones novedosas. Muchas de estas propiedades funcionales mejoradas se basan en gran medida en la reticulación inducida por procesos químicos y enzimáticos, así como la mezcla con otros biopolímeros.

El uso de colágeno en alimentos, aplicaciones fotográficas, cosméticos y farmacéuticos se basa principalmente en sus propiedades de gelificación y viscoelásticas. En la industria alimentaria, se han encontrado un número creciente de nuevas aplicaciones en productos tales como emulsionantes, espumantes, estabilizadores coloides, agentes, materiales de empaque biodegradables y micro-encapsulado, agentes de clarificación, siguiendo la tendencia creciente a reemplazar a agentes sintéticos con naturales. Por otra parte, en muchos casos, estos estudios están dedicados al uso de colágeno proveniente de fuentes alternativas a los animales terrestres. Algunas ventajas y desventajas de su uso como biomaterial se describen en el cuadro 3.

Cuadro 3. Ventajas y desventajas del uso de colágeno como biomaterial (Lee *et al.*, 2001).

Ventajas	Desventajas
Disponible en abundancia y fácilmente purificable a partir de organismos vivos	Alto costo de purificación
No antigénico	
Biodegradable y biorreabsorbible	Variabilidad de tipo de colágeno aislado
No tóxico y biocompatible	
Posee sinergia con componentes bioactivos	Es un compuesto hidrofílico
Promueve la coagulación de la sangre	
Compatibilidad con polímeros sintéticos	Propiedades de manejo complejas

En la industria farmacéutica y cosmética tiene gran importancia la aplicación de colágeno, se ha utilizado para la prevención y tratamiento de arrugas, inyecciones subcutáneas, en la producción de esponjas y parches para el tratamiento de heridas, en el desarrollo de medicamentos con liberación de los principios activos, además de ser empleado en la elaboración de productos como shampoo, acondicionadores y tratamientos capilares a base de colágeno (Serrano Gaona, 2011).

2.4 Pez diablo

El pez diablo (*Pterygoplichthys pardalis*) tiene la siguiente clasificación taxonómica (NCBI, 2018).

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de *Pterygoplichthys pardalis*.

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Siluriformes
Familia	Loricariidae
Género	Pterygoplichthys
Especie	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>

Tiene una pigmentación con manchas oscuras de tamaño inconstante en el vientre como leopardo, con un modelo geométrico en la cabeza. El número de escudos a lo largo de la línea lateral es de 29 a 30. La aleta dorsal tiene una espina y 11 radios; la aleta pectoral tiene una espina y 6 radios; la aleta pélvica tiene una espina y 5 radios (Armbruster, 2004).



Figura 2. *Pterygoplichthys pardalis* (Mendoza *et al.*, 2007).

P. pardalis presenta un alto potencial biótico y poseen una alta tasa reproductiva. Los peces diablo son adaptables, algunos son tolerantes a la salinidad y su gran estómago vascularizado funciona como pulmón, permitiéndoles respirar aire atmosférico en condiciones de hipoxia y resistir la desecación durante varios días (Hoover *et al.*, 2004; Mendoza *et al.*, 2007).

El pez diablo es nativo del río Amazonas de Brasil y Perú (Fuller *et al.*, 1999; Armbruster y Page, 2006; Wakida-Kusunoki *et al.*, 2007). Sin embargo, el primer registro documentado del pez diablo fue registrado en el año de 1995, en el río Mezcala en el Estado de Guerrero, y en Tabasco en 1997 en la cuenca Grijalva-Usumacinta; durante los últimos tres años, se han expandido con rapidez y, actualmente es común encontrarlos en varias de las cuencas hidrológicas más grandes del país. El porcentaje de abundancia de *P. pardalis* se ha duplicado en 5 años generando problemas de desabasto de las especies comestibles. Este problema se ha presentado en el sur del país, principalmente en los estados de Veracruz, Oaxaca, Tabasco y Chiapas (Mendoza *et al.*, 2007).

Los cuerpos de agua afectados en el estado de Chiapas son las lagunas de Catazajá y de Medellín, el Río Chacamax y la Libertad (Capps *et al.*, 2011; Capps y Flecker, 2013; Liénart, 2013); en el estado de Tabasco en numerosos lugares de los ríos Usumacinta y Grijalva (Wakida-Kusunoki *et al.*, 2007), Balancán (Cano-Salgado *et al.*, 2012; Amador *et al.*, 2014), Pantanos de Centla (Mendoza-Carranza *et al.*, 2010; Capps *et al.*, 2011) y la Laguna de las Ilusiones (Hernández-Santos, 2015).

En el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez ya se tiene un antecedente acerca de la extracción de colágeno a partir de piel y hueso de pez diablo (*Pterygoplichthys pardalis*), caracterizando el colágeno extraído como tipo I, utilizando electroforesis SDS PAGE (Ovando *et al.*, 2018). Ovando *et al.* (2018) reportaron el empleo de 3 diferentes métodos de extracción de colágeno, siendo el método de colágeno soluble en ácido (CSA) el que tuvo el mejor desempeño. Nurubhasha *et al.* (2019) reportaron la extracción de colágeno a partir de la piel mediante el método ácido, sin embargo, no se ha encontrado información donde se hayan determinado los parámetros que permitan obtener el mejor rendimiento posible al emplear dicho método de extracción.

2.5 Elaboración de películas de colágeno

Las películas elaboradas a partir de biopolímeros han sido objeto de estudio en los últimos años, debido a las preocupaciones sobre los recursos naturales limitados como materia prima y los impactos ambientales causados por el empleo de materiales no biodegradables (Ramos *et al.*, 2013). Por lo tanto, se han llevado a cabo investigaciones empleando polímeros de fuentes renovables (polisacáridos, proteínas, lípidos, derivados de materias primas vegetales y animales) para el desarrollo de materiales biodegradables y no tóxicos que puedan reemplazar a los polímeros sintéticos (Williams y Phillips, 2009; Ramos *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2016; Thakur y Thakur, 2016).

Un enfoque reciente de la tecnología de películas biodegradables implica la producción de películas compuestas, combinando diferentes polisacáridos, proteínas y lípidos para mejorar sus propiedades. Las películas compuestas tienen como finalidad lograr un efecto sinérgico de las características combinadas de los componentes empleados en su elaboración, aunque, como sucede con los polímeros sintéticos, las propiedades mecánicas y de barrera de las películas compuestas dependen en gran medida de las características de los polímeros y su compatibilidad (Galus y Lenart, 2013).

Existe una importante tendencia a favor de la utilización de películas biodegradables a partir de biopolímeros comestibles de fuentes renovables, las películas deben poseer propiedades mecánicas y de barrera apropiadas y las propiedades de barrera desde su elaboración del producto hasta el uso final del producto (Wang *et al.*, 2017).

La naturaleza altamente higroscópica del colágeno es su principal inconveniente cuando se considera su uso como barrera protectora porque tienden a hincharse o se disuelven en contacto con la superficie de los productos alimenticios con alto contenido de humedad, por lo que la tendencia actual en el diseño de materiales biodegradables basados en colágeno para envases de alimentos o aplicaciones biomédicas se centra en el desarrollo de películas con mejores características mecánicas, de resistencia y de hidratación combinando colágeno con biopolímeros con diferentes características (Harper *et al.*, 2012; Hashim *et al.*, 2015).

El efecto del colágeno sobre las propiedades de las películas biodegradables, especialmente colágeno proveniente de peces, fue revisado recientemente por Gómez-Guillén *et al.*, (2009). La distribución de peso molecular y la composición de aminoácidos, que son los principales factores que influyen en las propiedades físicas y estructurales, juegan

un papel clave en la mecánica y las propiedades de barrera de las películas resultantes. Películas más débiles y deformables se obtienen normalmente cuando fragmentos de bajo peso molecular predominan dependiendo esto de la especie de la cual se extrae y del método de extracción.

También se debe prestar atención a la composición de aminoácidos, especialmente de los aminoácidos glicina (Gly), prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp). Un estudio reciente describió que las películas de colágeno de piel de atún con 185 residuos de Hyp, presentaron valores de deformación aproximadamente 10 veces mayor en comparación con las películas de colágeno de piel bovina (210 residuos de Hyp) (Gómez-Guillén *et al.*, 2009). Los anillos de pirrolidina de la Hyp pueden imponer restricciones conformacionales e impartir cierto grado de rigidez molecular que puede afectar la deformación de la película. Además de la deformación, la diferencia de concentración de Hyp en películas elaboradas con especies de peces de aguas templadas, como la perca del Nilo o el bagre de canal, han exhibido propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua comparables a las de las películas de colágeno de mamíferos (Muyonga *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007).

Avena-Bustillos *et al.* (2006) observaron que la permeabilidad del vapor de agua (PVA) de películas de colágeno de pescado de agua fría fue significativamente más baja que el de películas de colágeno de peces de aguas templadas o mamíferos y los autores explican que la diferencia se debe al contenido de aminoácidos hidrofóbicos y bajos niveles de hidroxiprolina en peces de agua fría. Nurubhasha *et al.*, (2019) reporta un contenido mayor de hidroxiprolina (16.3%) que de prolina (14.6%) en *Pterygoplichthys pardalis*, siendo el contenido de hidroxiprolina superior al reportado en fuentes como pollo (9.5%) (Zhou *et al.*, 2016) y peces como *Pangasianodon hypophthalmus* (2.9%) (Benjakul *et al.*, 2011), *Esox lucius* (6.6%) (Kozłowska *et al.*, 2015) o *Probarbus jullieni* (Moula *et al.*, 2017) . Por lo tanto, se espera que el colágeno extraído de piel de *Pterygoplichthys pardalis* proporcione mejores propiedades mecánicas a las películas elaboradas.

Uno de los métodos efectivos para mejorar las propiedades físicas, funcionales y de barrera de las películas a base de colágeno es a través de la combinación con otros polisacáridos o proteínas derivadas de recursos renovables (Ocak, 2018). Actualmente, se están empleando compuestos capaces de formar entrecruzamientos con el colágeno para

mejorar las propiedades de las películas, como glutaraldehído, carbodiimida y acil azidas, compuestos que se caracterizan por ser tóxicos (Shi et al., 2019).

La goma arábica es una goma natural biocompatible, no tóxica, soluble en agua, obtenida del árbol de acacia. Es un polisacárido económico empleado ampliamente como agente estabilizador, emulsificante y espesante en la industria alimentaria (Sarika *et al.*, 2014) y ha sido reportada como un biomaterial con potencial. Sarika *et al.* (2014) reportan la obtención de una red polimérica no tóxica, empleando goma arábica y colágeno con buena compatibilidad entre ambas moléculas.

Se ha descrito además la adición de plastificantes, como polietilenglicol o glicerol, para mejorar la flexibilidad de la red de proteínas, mientras que la permeabilidad del agua se puede superar añadiendo materiales hidrofóbicos tales como cera de abeja o aceites como el aceite oleico, que pueden afectar a las propiedades de las películas tales como cristalinidad, hidrofobicidad y tamaño molecular, mejorando las características de las películas y su aplicación (Hong *et al.*, 2009; Sánchez-Ortega *et al.*, 2014). Said *et al.* (2016) mencionan que la combinación entre colágeno y glicerol permite mejorar las propiedades de la película. Esto se hace a través del proceso de interacciones entre las cadenas de polímeros que conforman a la proteína y al agente plastificante. La adición de glicerol es muy importante, ya que presente moléculas volátiles muy pequeñas en su estructura y, cuando se agrega al material polimérico, formará una fuerza de atracción intermolecular aumentando el volumen de interacciones.

Por todo lo anterior, este proyecto planteó la optimización de la extracción de colágeno soluble en ácido, proveniente de piel de *Pterygoplichthys pardalis*, la elaboración de películas basadas en este biomaterial adicionadas con glicerol y goma arábica y la caracterización de las biopelículas resultantes.

3. JUSTIFICACIÓN

Numerosos estudios han demostrado la importancia que presenta el colágeno como una biomolécula debido a sus propiedades, entre ellas su biocompatibilidad con compuestos orgánicos y sintéticos, su biodegradabilidad y nula toxicidad (Lee *et al.*, 2001). En estudios realizados en la última década se ha demostrado el empleo de colágeno como un biomaterial en sectores como el farmacéutico, cosmético y alimentario (Thakur y Thakur, 2016; Blanco *et al.*, 2019). Actualmente la aplicación de colágeno extraído a partir de mamíferos se encuentra limitada por el riesgo de transmisión de enfermedades como la encefalopatía esponjiforme bovina o por motivos religiosos (Serrano Gaona, 2011; Yoshitaka *et al.*, 2011). Razón por la cual las investigaciones se han centrado en la extracción de colágeno a partir de fuentes marinas como *Esox lucius* (Kozłowska *et al.*, 2015), *Oreochromis niloticus* (Chen *et al.*, 2016), *Misgurnus anguillicaudatus* (Wang *et al.*, 2018) y *Pterygoplichthys pardalis* (Ovando *et al.*, 2018; Nurubhasha *et al.*, 2019).

Pterygoplichthys pardalis es una especie endémica de la región del Amazonas, catalogada como una especie invasiva en el sureste mexicano, caracterizada por poseer un alto potencial biótico y una alta tasa reproductiva. Trabajos como los realizados por Ovando *et al.* (2018) y Nurubhasha *et al.* (2019), tuvieron como objetivo la extracción de colágeno a partir de *P. pardalis* a partir de la piel del pez mediante el método ácido. Sin embargo, no evalúan las condiciones de operación que pueden afectar al proceso de extracción y hasta la fecha no se han reportado las condiciones que permitan obtener el mayor rendimiento de extracción posible.

En años recientes, las investigaciones han centrado sus estudios en la elaboración de películas compuestas, mediante la combinación de diferentes biomoléculas (Galus y Lenart, 2013), particularmente en películas formuladas a partir de polisacáridos o proteínas, empleando plastificantes como el glicerol (Pavli *et al.*, 2018). Sarika *et al.* (2014) reportan el empleo de goma arábiga como una molécula no tóxica, biocompatible con el colágeno, capaz de formar entrecruzamientos y una red polimérica. Se ha reportado que el colágeno presente en *P. pardalis* posee un alto contenido de hidroxiprolina (Nurubhasha *et al.*, 2019) y se espera que el empleo de colágeno extraído a partir de la piel de esta especie, en conjunto con goma arábiga y glicerol, permita obtener películas con propiedades mecánicas y térmicas mejores a las reportadas, además de presentar alto índice de biodegradabilidad.

La presente investigación permitirá no sólo mostrar las condiciones de extracción que permitan maximizar el rendimiento, sino conocer el efecto que tienen los componentes de las películas sobre las propiedades de las mismas. El biomaterial generado con esta investigación, daría valor agregado a esta especie haciéndola atractiva como generadora de nuevos materiales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de glicerol y goma arábica en la elaboración de películas a partir de colágeno de piel de pez diablo (*Pterygoplichthys pardalis*).

4.2 Objetivos específicos

Determinar las mejores condiciones de extracción de colágeno soluble en ácido mediante un diseño experimental factorial 2^2 , teniendo como factores la relación materia prima:solución de extracción y el tiempo de extracción.

Evaluar el efecto de la concentración de colágeno y glicerol, sobre las propiedades de estabilidad térmica y mecánicas de las películas, mediante un diseño factorial $2^2 +$ estrella.

Determinar la biodegradabilidad de las películas con base en la norma OCDE 301F.

5. METODOLOGÍA

5.1 Extracción de colágeno soluble en ácido (CSA)

Pterygoplichthys pardalis fue obtenido en la Presa Malpaso, en el municipio de Ostuacán, Chiapas (Latitud: 17.483, Longitud: -93.487), los cuales fueron colocados y transportados en hieleras a una temperatura de refrigeración. Se separó manualmente la piel, y se dejaron secar a 60 °C. Posteriormente se trituraron con una licuadora industrial TAPISA MODELO TVP12L, se tamizaron a un tamaño de partícula de 0.6 mm y se almacenaron en bolsas de polietileno a 4 °C hasta su utilización.

Con la finalidad de eliminar las proteínas no colágenas en la piel, se pesaron 100 g de materia prima (piel) y se disolvieron en NaOH 0.1 M durante 6 h en proporción 1:10 (p/v), con un cambio de solución a las 3 h con el fin de eliminar las proteínas no colágenas y pigmento de piel. Posteriormente se lavaron con agua destilada hasta alcanzar pH neutro o ligeramente básico (Benjakul *et al.*, 2011).

Las muestras de piel fueron posteriormente desengrasadas con butanol al 10% en una proporción 1:10 (p/v) durante 24 h y posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada (Benjakul *et al.*, 2011).

Para la extracción de colágeno soluble en ácido (CSA), se utilizó un diseño de experimentos factorial 2², se evaluó el efecto de los factores: relación peso/volumen de la materia prima/solución de extracción (1:10, 1:20) y el tiempo de extracción (24, 72 h). La variable de respuesta evaluada fue el rendimiento de extracción de colágeno. El procedimiento que se siguió se describe a continuación:

Para la extracción del colágeno, las muestras pretratadas (sin proteína no colagenosa ni grasa) se solubilizaron en ácido acético 0.5 M en diferentes relaciones materia prima:solución de ácido (p/v) y tiempos de extracción. La mezcla se filtró y el filtrado fue neutralizado empleando NaOH 0.1 M con la finalidad de precipitar el ácido acético como acetato de sodio hasta la obtención de un pH neutro. Después, la mezcla se centrifugó con una centrífuga Eppendorf modelo 5810R a 4000 rpm a 4 °C durante 20 min recuperando el

sobrenadante. Posteriormente, el sobrenadante se liofilizó en una liofilizadora Labconco 0.520 mBar y se almacenó a 4 °C hasta su uso (Zeng *et al.*, 2012).

5.1.1 Evaluación del efecto del tamaño de partícula sobre el rendimiento de extracción de colágeno

Previo a la realización del diseño experimental para determinar las mejores condiciones que garantizaran el máximo rendimiento de extracción posible de la proteína de interés se decidió evaluar el posible efecto que podría tener el tamaño de partícula sobre el proceso de extracción por el método ácido. Para ello, se consideró evaluar 3 diferentes tamaños de partícula a partir de un proceso de molienda y tamizado.

Se evaluó el tamaño de las partículas obtenidas en malla 20 (850 μm), malla 30 (600 μm) y malla 100 (150 μm). Una vez obtenidas, se procedió con el pretratamiento con NaOH para eliminar pigmentos y proteínas que no eran de interés para posteriormente realizar el pretratamiento con butanol y remover grasas.

5.2 Caracterización del colágeno

5.2.1 Perfil de peso molecular del colágeno

Los pesos moleculares de las hélices α presentes en el colágeno extraído se determinaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli (1970), con ligeras modificaciones. El gel de separación se preparó al 8% y el de apilamiento al 5% de acuerdo con el cuadro 5. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis mini Protean (Biorad, USA). El gel fue teñido con Azul de Coomassie al 1%. Las condiciones de electroforesis fueron 80 V, 20 min y 120 V, 50 min, utilizando buffer 1X (Tris/Glicina/SDS), usando como estándar colágeno tipo 1 extraído de cola de rata (Sigma-Aldrich, EUA).

Cuadro 5. Concentraciones para la elaboración del gel de poliacrilamida.

	Gel de separación 8%	Gel de apilamiento 5%
Acrilamida:Bisacrilamida 30:80	1.33 mL	400 µL
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	1.25 mL	0.775 mL
SDS 10%	50 µL	31 µL
Persulfato de amonio	250 µL	0.56 µL
H₂O	2.5 mL	1.76 mL
TEMED	5 µL	3 µL

5.2.2 Espectroscopía infrarroja

La obtención de los espectros de infrarrojo de los extractos proteicos se realizó con un espectrofotómetro de IR marca Thermo modelo Nicolet en el intervalo de 650-4000 cm^{-1} realizando 40 barridos con una resolución de 16 cm^{-1} . La muestra se solubilizó en agua y se tomó un fondo con agua destilada.

5.2.3 Espectroscopía UV

Las muestras de extracto proteico se disolvieron en una solución de ácido acético 0.5 M en una relación 1:100 (p/v). Posteriormente, las soluciones se colocaron en una celda de cuarzo de 1 cm y se realizó un barrido espectral de 190-1100 nm para identificar la longitud de onda de máxima absorción con un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 5000.

5.2.4 Cuantificación de contenido proteico

Para determinar la concentración de proteína por el método Lowry (1951), se realizó una curva patrón utilizando BSA (albúmina de suero bovino). Posteriormente se colocaron 2 mL de muestra, 5mL de reactivo de Lowry y se leyó en un espectrofotómetro marca HACH modelo DR 5000, a 500 nm.

5.3 Formulación y preparación de las películas

Las formulaciones se prepararon siguiendo un diseño experimental compuesto central $2^2 +$ estrella, con 2 puntos centrales, teniendo a la concentración de colágeno y glicerol como factores, cada uno con 2 niveles. Los niveles para las concentraciones de colágeno en las formulaciones fueron 1 y 2% para colágeno, y concentraciones de 10 y 20% para glicerol, las formulaciones fueron preparadas con respecto a 100 mL de agua destilada, añadiendo

1.5% de goma arábiga a cada formulación. El diseño contó con 2 puntos axiales y se realizó por triplicado.

Las soluciones se dejaron hidratar durante 24 h, posteriormente se calentaron a 70 °C y fueron agitadas durante 15 min. 40 mL de suspensión se depositaron en moldes de aluminio recubiertos con teflón de 5 cm de diámetro y se secaron a 23 °C por 24 h para obtener un espesor uniforme mediante el empleo de un desecador (Galus y Lenart, 2013). Se tomaron como variables de respuesta la fuerza (N), elongación (%) y el módulo de Young (MPa).

5.4 Análisis de las películas

5.4.1 Textura

Se evaluó la fuerza de corte, elongación y módulo de Young de las diferentes películas empleando un texturómetro Stable Micro Systems modelo TA.XT.plus (Figura 3) con una apertura de 20 mm, velocidad de 5 mm/min y deformación del 80%, las películas fueron cortadas en tiras de 50 x 10 mm. Se colocó cinta adhesiva en ambos extremos para garantizar que, una vez aseguradas al equipo, la ruptura de la película se llevara a cabo en el centro de la misma. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.



Figura 3. Texturómetro Stable Micro Systems modelo TA.XT.plus.

5.4.2 Calorimetría diferencial de barrido

Se realizó el análisis calorimétrico para determinar las propiedades térmicas utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro diferencial de barrido de la marca TA Instruments, modelo Q-2000 (Figura 4). Muestras de aproximadamente 10 mg (± 0.002 mg) se depositaron en charolas de aluminio con purga de

nitrógeno seco (50 mL/min). Las películas se enfriaron rápidamente a 0 °C y se hizo un barrido de -80 a 200 °C a una velocidad de calentamiento de 20 °C/min. Se determinaron las temperaturas de transición vítrea T_g (°C) y la temperatura de desnaturalización T_m (°C) (Tang *et al.*, 2015).



Figura 4. Calorímetro diferencial de barrido Q-2000.

5.4.3 Solubilidad

Fragmentos de película de 1 cm² se colocaron en la superficie de un vaso de precipitados con 500 mL de agua tomando el tiempo en que la película se solubilizó (Wang *et al.*, 2005).

5.4.4 Color

El color de las películas fue medido en la superficie utilizando un colorímetro portátil Konica minolta modelo CM-2500d, por triplicado, según la escala CIE-Lab donde L es la luminosidad que va de 0% (negro) a 100% (blanco), a que va de rojo (+) a verde (-) y b que va de amarillo (+) a azul (-), siendo 0 neutral en ambos casos.

5.4.5 Prueba de biodegradabilidad

La biodegradabilidad se determinó con la relación existente entre los parámetros de la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), expresada como el índice de biodegradabilidad.

Para la determinación de la DQO se siguió la metodología de micrométodo de reflujo cerrado, digstando la muestra a 150 °C por 2 h establecida en la NMX-AA-028-SCFI-2001 con modificaciones, se preparó una dilución de las películas de colágeno 1:10000 (p/v)

debido a la naturaleza del material y al alto contenido de materia orgánica en estas. Después de la digestión, la muestra se colocó en una celda de cuarzo y se empleó un espectrofotómetro HACH DR-5000 a una longitud de onda de 620 nm.

Se determinó la demanda bioquímica de oxígeno (DBO o DBO₅) mediante el equipo DBO respirométrico DBOTrak I. La prueba se llevó a cabo mediante la cuantificación de la diferencia entre la concentración de oxígeno disuelto inicial y la concentración después de cinco días de incubación a 20 ± 1 °C empleando un inóculo de cultivo para DBO PolySeed®.

Para determinar el índice de biodegradabilidad (IB) de las películas se utilizó la relación entre los parámetros de DQO Y DBO₅ de acuerdo con la siguiente fórmula, expresando el resultado de manera porcentual:

$$IB = \frac{DBO}{DQO} \times 100$$

Donde: IB = Índice de biodegradabilidad; DBO = Demanda bioquímica de oxígeno; DQO = Demanda química de oxígeno.

5.4.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó un análisis de varianza unidireccional. La diferencia de medias se evaluó sobre la base de intervalos de confianza mediante la prueba de Tukey. El nivel de significancia se estableció con un valor $p < 0.05$. Se empleó el programa estadístico Statgraphics versión XV.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción de colágeno

6.1.1 Efecto del tamaño de partícula sobre la extracción de colágeno

Los resultados del análisis del efecto de los diferentes tamaños de partícula sobre la extracción de colágeno por el método ácido se muestran en la Figura 5.

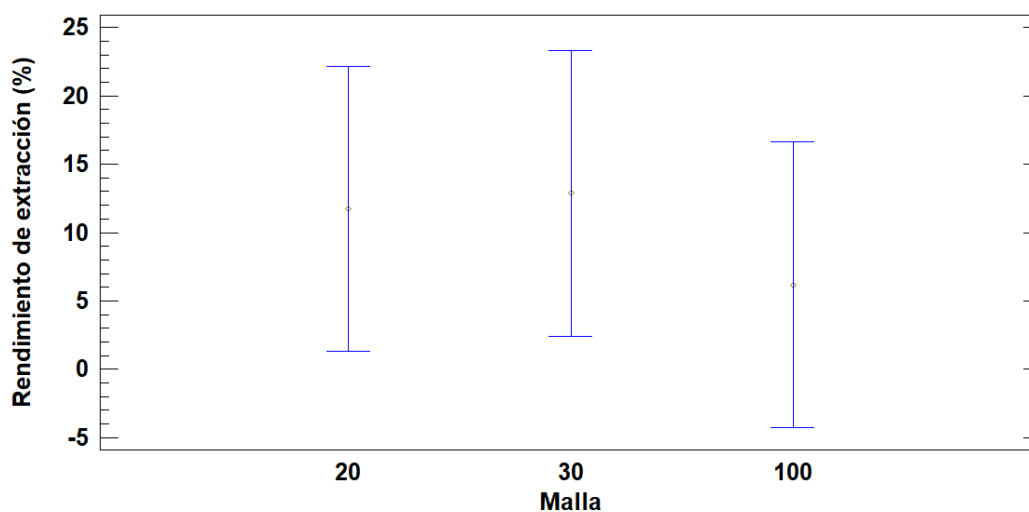


Figura 5. Gráfico de medias del efecto del tamaño de partícula sobre el rendimiento de extracción de colágeno.

De acuerdo con lo que se aprecia en el gráfico anterior, se logró determinar que el tamaño de partícula no tuvo efecto estadístico significativo ($p < 0.05$) sobre el rendimiento de extracción. Así mismo, después del proceso de molienda y tamizado, el tamaño de partícula predominante era el obtenido en malla 30 (600 μm), por lo que se decidió emplear dicho tamaño de partícula en la realización del diseño experimental.

6.1.2 Maximización de la extracción de colágeno mediante el método ácido

En el cuadro 6 se presentan los resultados de la extracción de colágeno a partir de piel de pez diablo (*Pterygoplichthys pardalis*).

Cuadro 6. Rendimientos de extracción de colágeno soluble en ácido a partir de piel de pez diablo (*Pterygoplichthys pardalis*).

Relación p/v (g/mL)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)	DMS
1:10	24	37.40d	
1:20	24	57.05a	
1:10	72	41.16c	3.68
1:20	72	51.88b	

Letras diferentes en la misma columna corresponden a tratamientos estadísticamente diferentes. ($p < 0.05$).

Para el análisis de los datos de extracción de colágeno se realizó un análisis de varianza en el cual se observó que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, siendo el mejor tratamiento en donde se empleó una relación materia prima:solución de extracción de 1:20 (p/v) y un tiempo de extracción de 24 horas ya que se logró extraer mayor cantidad de proteína.

Al realizar el análisis del efecto de los factores, se determinó que el factor relación materia prima:solución de extracción tuvo un efecto estadístico significativo (de carácter positivo) sobre el rendimiento de extracción, no así con el factor tiempo, mientras que la interacción de los dos factores sí tuvo un efecto significativo sobre la variable de respuesta (de carácter negativo), como se muestra en el diagrama de Pareto de la figura 6.

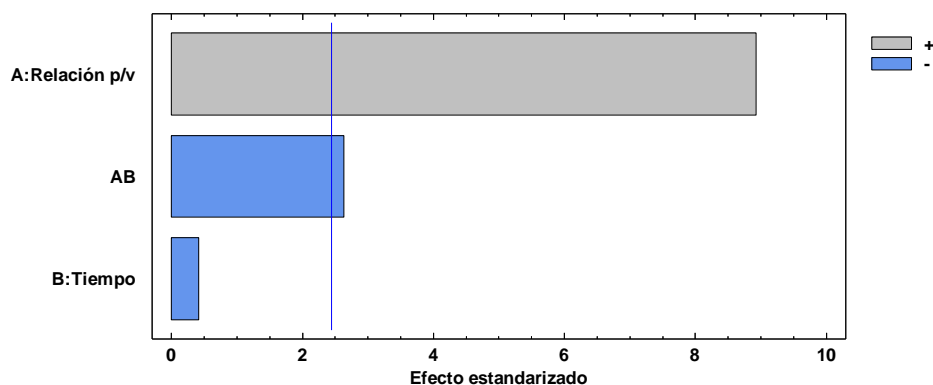


Figura 6. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de extracción de colágeno soluble en ácido (CSA) extraído de piel de piel de *Pterygoplichthys pardalis*.

El efecto positivo de la relación materia prima/solución de extracción se puede explicar si se tiene en cuenta la teoría de las colisiones propuesta por Lewis (1918), la cual establece que para que una reacción se lleve a cabo es necesario facilitar choques efectivos entre los componentes de la reacción.

Existen varias maneras de propiciar choques efectivos como el incremento de temperatura o en este caso, el aumento en la cantidad de solvente, puesto que un aumento en la concentración de solvente permite que interactúe de una manera más eficiente con el soluto beneficiando los procesos de transferencia de materia, reflejándose en un mejor rendimiento de extracción de colágeno. Sin embargo, es importante mencionar la existencia de una concentración crítica a partir de la cual, los incrementos en la relación p/v ya no beneficiarán

el proceso ni el rendimiento de extracción. Por otra parte, no se apreció efecto estadístico del tiempo en el proceso de extracción y esto puede deberse al hecho de que en los niveles evaluados no se aprecia un efecto, sin embargo es probable que al incrementar los tiempos de extracción pueda evidenciarse un efecto sobre el rendimiento, por lo que se asume que podría observarse un efecto si se evalúan niveles más allá de los considerados en este proyecto y descritos en la literatura (Chen *et al.*, 2016; Schmidt *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Nurubhasha *et al.*, 2019).

La razón del porqué la interacción de los dos factores tuvo un efecto estadístico significativo debe tomar en cuenta el mecanismo de acción del ácido orgánico durante el proceso de extracción de la proteína (Figura 7).

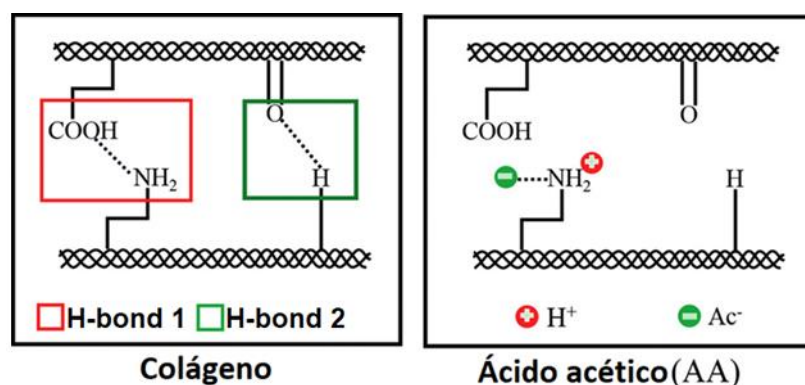


Figura 7. Mecanismo de acción del ácido acético durante la extracción de colágeno por el método ácido adaptado de Yang *et al.* (2018).

El ácido acético interactúa directamente con los puentes de hidrógeno presentes en la triple hélice del colágeno, rompiendo las interacciones débiles que mantenían la unión de las tres alfa hélices, separándolas y generando como consecuencia, la solubilización de la proteína en el medio. Esto es muy importante ya que el colágeno, al ser una proteína fibrosa en un inicio, es una proteína insoluble (a diferencia de las proteínas globulares).

Considerando lo mencionado anteriormente, se asume que el efecto estadístico negativo de la interacción de los factores relación p/v y tiempo, se puede deber a que cuando se presentan incrementos en la concentración del solvente empleado y aumento en el tiempo de extracción, se propicia la desnaturalización de la proteína afectando su funcionalidad (Kiew y Mat Don, 2013; Surasani *et al.*, 2019). Como se mencionó anteriormente, se asume

la existencia de una concentración crítica a partir de la cual el aumento en la concentración de solvente no beneficia al proceso de extracción de la proteína, y aunado a lo anterior, si se incrementan los tiempos de extracción, se propicia una mayor interacción entre el solvente y las moléculas de colágeno. Esto podría originar una desprotonación de grupos funcionales que no sean exclusivamente aquellos presentes en los entrecruzamientos establecidos entre las alfa hélices (Tan y Chang, 2018).

Mediante el análisis estadístico de los resultados, se determinó que, bajo las mejores condiciones de operación el rendimiento teórico de extracción de colágeno sería del 57% empleando una relación materia prima:solución de extracción (p/v) 1:20 y un tiempo de extracción de 24 horas.

Se replicó el proceso de extracción bajo dichas condiciones y se obtuvo un rendimiento de extracción del 54%, inferior al rendimiento teórico del 57%. El error de la predicción entre el rendimiento experimental y el rendimiento teórico fue del 5.26%.

Una vez realizada la extracción de colágeno bajo las mejores condiciones, se cuantificó la concentración de proteína mediante el método de Lowry realizando una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) con una $R^2 = 0.9925$ (Anexo 1). La concentración de colágeno en el extracto obtenido a partir de la extracción por el método ácido fue de 0.55 ± 0.03 mg/mL.

6.1.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Con la finalidad de determinar el peso molecular del colágeno se llevó a cabo una electroforesis en gel al 7.5% de acrilamida, de 9 cm de largo y teñido con azul de Coomassie al 1%. La desnaturalización de las proteínas previo a la corrida del gel se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Ovando *et al.* (2018).

De acuerdo con lo observado en el gel de la electroforesis SDS-PAGE (Figura 8), se identificaron las bandas que corresponden a los pesos moleculares de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$, con peso molecular aproximado de 122 y 110 kDa, respectivamente, las cuales son las unidades conformadoras de la triple hélice del colágeno, el cual tiene un peso molecular de alrededor de 300 kDa y se encuentra conformado por 2 hélices $\alpha 1$ y una hélice $\alpha 2$

(Sinthusamran *et al.*, 2013). Se tuvo presencia de la hélice β , con un peso molecular de 243 kDa, lo cual indica la presencia de 2 alfa hélices aún entrecruzadas mediante puentes de hidrógeno.

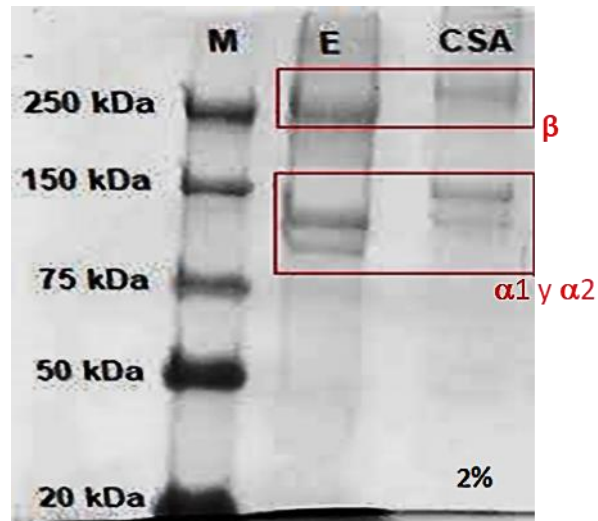


Figura 8. Patrón electroforético de colágeno extraído de piel de *Pterygoplichthys pardalis*. M = Marcador molecular; E = Estándar de colágeno tipo I y CSA = Colágeno extraído mediante método de CSA.

Existen diferentes investigaciones en donde se ha logrado identificar la presencia de colágeno tipo I en piel a partir de peces, como en los trabajos de Matmaroh *et al.* (2011), quienes extrajeron CSA de escamas de pez dorado *Coryphaena hippurus* observando bandas correspondientes a la hélice $\alpha 1$ (117 KDa) y $\alpha 2$ (108 KDa). El-Rashidy *et al.* (2015) identificó también al colágeno extraído de escamas de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) como colágeno tipo I.

Estos resultados, además, concuerdan con lo reportado por Nurubhasha *et al.* (2019) (Figura 9) quienes extrajeron colágeno tipo I a partir de la piel de pez diablo empleando el método de extracción ácida, reportando pesos moleculares correspondientes a las hélices $\alpha 1$ (116 kDa), $\alpha 2$ (110 kDa) y hélice β (205 kDa).

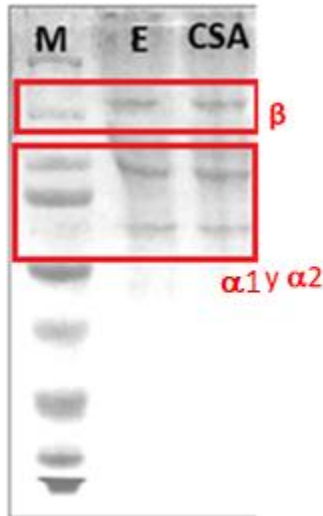


Figura 9. Patrón electroforético de colágeno presente en piel de *Pterygoplichthys pardalis* (Nurubhasha *et al.*, 2019). M = Marcador molecular, E = Estándar de colágeno tipo I y CSA = Colágeno extraído mediante método de CSA.

Con los resultados de la electroforesis y los antecedentes mencionados, se confirma la presencia de colágeno del tipo I en el extracto proteico obtenido a partir de la piel de *Pterygoplichthys pardalis*.

6.1.4 Caracterización espectroscópica

6.1.4.1 Espectroscopía infrarroja

El espectro IR exhibió las señales que corresponden a los grupos funcionales de los aminoácidos que conforman al colágeno (Figura 10).

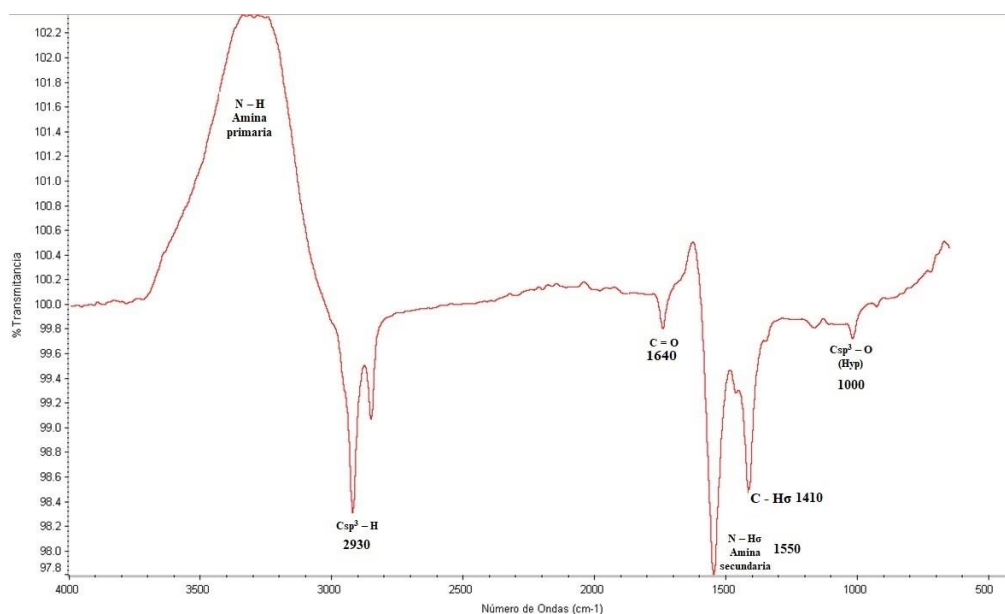


Figura 10. Espectro IR de colágeno de piel de *Pterygoplichthys pardalis* empleando H₂O como blanco.

En el cuadro 7, se muestran los desplazamientos de las bandas identificadas en el espectro IR como la correspondiente al estiramiento asimétrico del enlace Csp³-H (Amina secundaria) (Moula Ali *et al.*, 2017), o las bandas C=O (Amina I), N-Hσ (Amina II) y Csp³-H (Amina terciaria), las cuales son responsables del grado de orden molecular en el colágeno y están involucradas en la formación de la estructura de triple hélice (Chen *et al.*, 2016). Además, fue posible identificar la banda Csp³-O, siendo esta una señal característica de la hidroxiprolina (Ovando *et al.*, 2018). Sin embargo, no fue posible apreciar la banda que corresponde al enlace N-H_v, debido a que la muestra de colágeno extraído fue solubilizada en agua y al hacer el barrido de control con el disolvente la señal del enlace N-H no se aprecia, ya que coincide con la del enlace O-H del agua (3600 a los 3200 cm⁻¹).

Cuadro 7. Asignación de señales obtenidas en el espectro IR de colágeno proveniente de piel de *P. pardalis*.

Grupo funcional	Rango (cm ⁻¹)	Desplazamiento (cm ⁻¹)
Csp ³ - Hv	2850 - 2950	2930
C = Ov	1600 - 1650	1640
N - Hσ	1550 - 1650	1550
Csp ³ - Hσ	1350 - 1480	1410
Csp ³ - O (Hyp)	1000 - 1300	1000

Las señales que exhibe el espectro IR fueron similares a las reportadas en la literatura para colágeno extraído a partir de *P. pardalis* (Nurubhasha *et al.*, 2019) y de otras especies de animales y peces (Benjakul *et al.*, 2011; Matmaroh *et al.*, 2011; El-Rashidy *et al.*, 2015; Sionkowska *et al.*, 2015) (Figura 11).

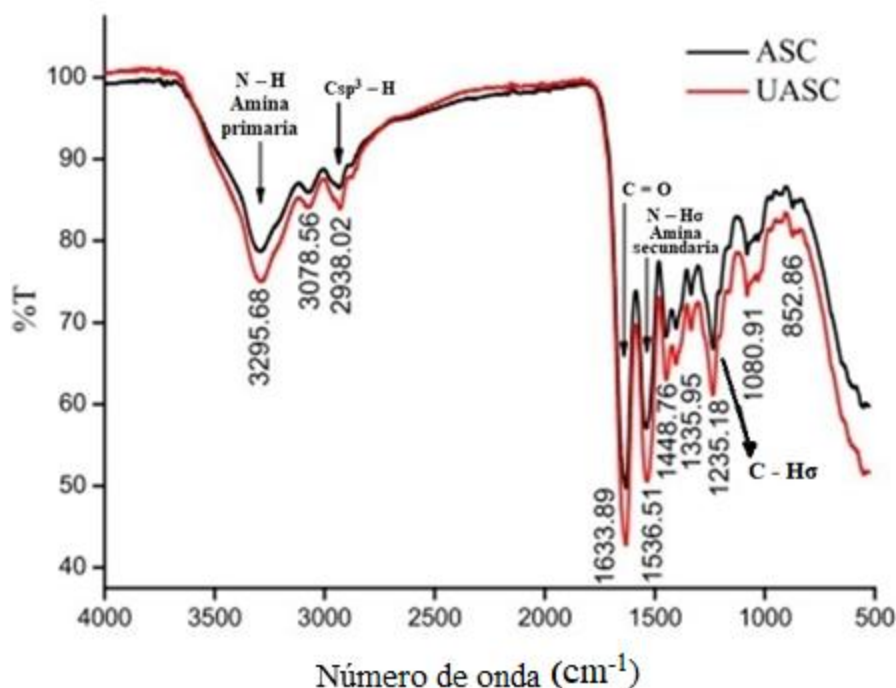


Figura 11. Espectro IR de colágeno tipo I extraído a partir de *Pelodiscus sinensis* (Zou *et al.*, 2017). Donde ASC: Colágeno soluble en ácido; UASC: Colágeno soluble en ácido asistido por ultrasonido.

6.1.4.2 Espectroscopía UV

Con la finalidad de obtener el espectro UV-Vis del extracto proteico se llevó a cabo un barrido espectral desde los 190 hasta los 1100 nanómetros y se encontró la longitud de onda de máxima absorbancia a los 220 nm. Por lo general, la longitud de onda de máxima absorbancia de las proteínas en la región ultravioleta es cercana a los 280 nm. Esta señal corresponde a la absorbancia de aminoácidos aromáticos como el triptófano, tirosina y fenilalanina (Duan *et al.*, 2009). Debido a que el colágeno de peces presenta un contenido bajo en estos aminoácidos, la longitud de onda de máxima absorbancia del CSA es menor. Trabajos realizados demostraron que el colágeno tiene una λ_{\max} de 210 a 240 nm (Wang *et al.*, 2018). Los datos de absorción de colágeno se muestran en la figura 12 donde se aprecia

que el espectro obtenido presentó una $\lambda_{\max} = 220$ nm que corresponde a la transición electrónica del orbital $n_o \rightarrow \pi^*$ (C-O). Hallazgos similares fueron reportados en otras especies de peces (Duan *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

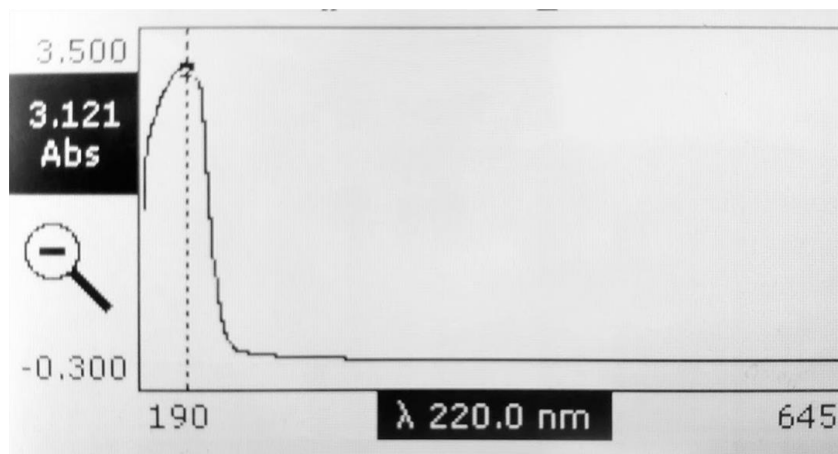


Figura 12. Espectro UV-Vis de colágeno extraído de piel de pez diablo (*Pterygoplichthys pardalis*).

6.2 Elaboración de películas de colágeno

En primer lugar, se pudo apreciar que el contenido de colágeno y de sólidos afectaba la capacidad de formación de película de las soluciones elaboradas. Sin embargo, algunas de las formulaciones (Cuadro 8), generaron películas frágiles y quebradizas de tal forma que no se pudieron formar.

Cuadro 8. Formulaciones evaluadas en la elaboración de películas de colágeno obtenido de piel de *Pterygoplichthys pardalis*.

Tratamiento	Colágeno (%)	Glicerol (%)	Formación de película
1	1.5	15	SI
2	1	10	SI
3	2	10	NO
4	1	20	SI
5	2	20	NO
6	0.792893	15	NO
7	2.20711	15	NO
8	1.5	7.92893	SI
9	1.5	22.0711	SI
10	1.5	15	SI

Los resultados permitieron identificar que la concentración de colágeno afectaba la capacidad de formación de película de las formulaciones, ya que aquellas películas donde la concentración de colágeno fue igual o mayor que el 2%, fueron las que presentaron fragilidad.

El diagrama de Pareto (Figura 13) muestra que el colágeno tiene un efecto estadísticamente significativo negativo sobre la formación de las películas. Esto puede deberse a la gran capacidad de hidratación del colágeno, lo que hacía que se adhiriera a prácticamente cualquier superficie y se dificultara su manejo, en comparación con aquellas con menor contenido de colágeno.

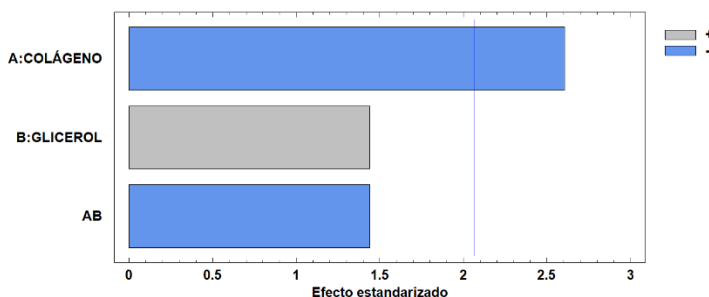


Figura 13. Efecto del colágeno y el glicerol sobre la formación de películas de colágeno obtenido a partir de piel de *Pterygoplichthys pardalis*.

6.2.1 Textura

Las propiedades mecánicas de las películas de proteínas proporcionan una predicción de la integridad esperada de la película en condiciones de estrés que pueden ocurrir durante el procesamiento, la manipulación y el almacenamiento (Gennadios, 2002).

Mediante el empleo de un texturómetro, se determinaron los parámetros que fueron considerados como variables de respuesta del diseño experimental de la elaboración de las películas biodegradables de colágeno. Los resultados de estas determinaciones se presentan a continuación.

6.2.1.1 Fuerza de corte

La figura 14 muestra el efecto estadístico negativo del colágeno sobre la fuerza necesaria para cortar las películas, esto significa, que, a medida que la concentración de colágeno aumenta, es necesario aplicar menor fuerza de corte.

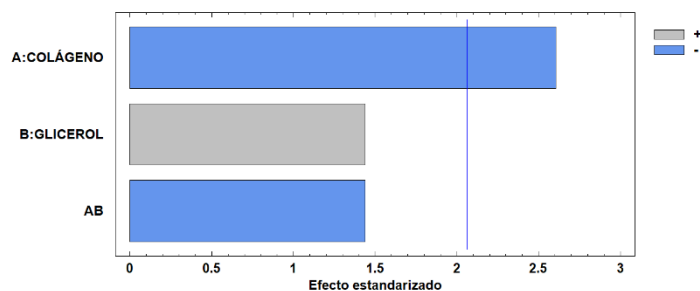


Figura 14. Efecto del colágeno y glicerol sobre la fuerza de corte de las películas de colágeno obtenidas a partir de piel de *Pterygoplichthys pardalis*.

Este efecto puede estar relacionado con la abundancia de grupos hidroxilo del colágeno, ya que se tiene reportado que la abundancia de grupos hidroxilo de la estructura de la proteína está íntimamente relacionada con el tipo de tejido del cual se extrajo, así como del animal (Suderman *et al.*, 2018). Las diferencias en las propiedades mecánicas en películas de colágeno están ligadas a las propiedades fisicoquímicas de éste, especialmente con la composición de los aminoácidos (Gómez-Guillén *et al.*, 2009). El colágeno extraído a partir de pez diablo posee un alto contenido de Hyp (Nurubhasha *et al.*, 2019), aminoácido que presenta un grupo hidroxilo en su estructura, por lo que se asume que el aumento en la concentración de colágeno tiene como resultado que la proteína forme preferentemente enlaces intramoleculares que intermoleculares con los otros biopolímeros empleados en las formulaciones, repercutiendo en la formación de una red polimérica débilmente unida mediante puentes de hidrógeno (Gómez-Guillén *et al.*, 2009; Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Además, se tiene reportado que la triple hélice del colágeno, pierde la fuerza mecánica que le caracteriza después del proceso de extracción por el método ácido (Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2012; Slimane y Sadok, 2018) (Figura 15).

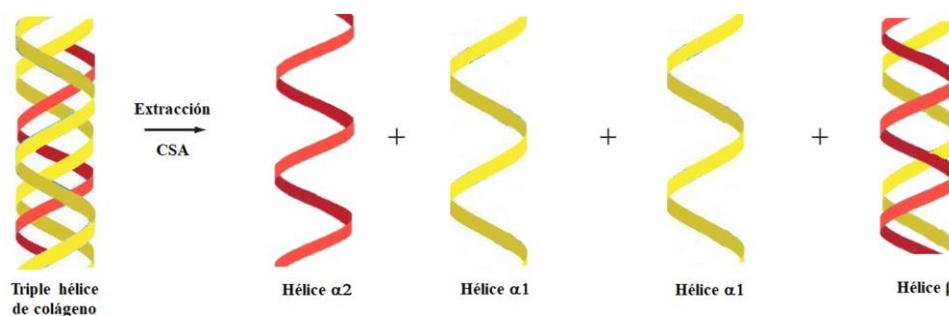


Figura 15. Componentes del colágeno obtenidos por medio de extracción ácida.

Las películas mostraron una fuerza a la ruptura de 25.25 ± 1.17 N, estos resultados son similares a los reportados por Suderman *et al.* (2018), quienes obtuvieron valores de fuerza de 29.06 ± 0.06 N empleando colágeno de piel de pollo como materia prima, los cuales a su vez fueron superiores a los de películas elaboradas con colágeno de bovinos (18.03 ± 0.09 N) y porcinos (16.55 ± 0.11 N) y a lo reportado por Gómez-Guillén *et al.* (2009) quienes elaboraron películas de colágeno a partir de piel de atún encontrando valores de fuerza de 8.5 ± 1.6 N.

Es importante señalar que tanto en los trabajos desarrollados por Suderman *et al.* (2018) y Gómez-Guillén *et al.* (2009), las formulaciones empleadas para la elaboración de las películas de colágeno, incorporaban únicamente glicerol, a diferencia de las preparadas en este proyecto, en las cuales se incorporó goma arábica en las formulaciones. Si bien no se varió la concentración de goma arábica, es probable que la incorporación de la goma arábica podría estar influyendo en el entrecruzamiento con los otros componentes (colágeno y glicerol), originando un aumento entre las fuerzas intermoleculares de la red polimérica resultando valores más altos de fuerza de corte (Gennadios, 2002).

6.2.1.2 Elongación a la ruptura

La elongación es un parámetro de interés que señala el cociente de la variación de la longitud alcanzada por la película con respecto a la longitud inicial de la misma, es un factor importante en las películas biodegradables ya que describe la capacidad de las mismas para resistir cambios de forma sin la formación de grietas (Suderman *et al.*, 2018), reportada de manera convencional en unidades de porcentaje.

Los resultados de la elongación mostraron que no hubo efecto estadístico significativo de los factores ni de la interacción de ambos sobre este parámetro (Figura 16).

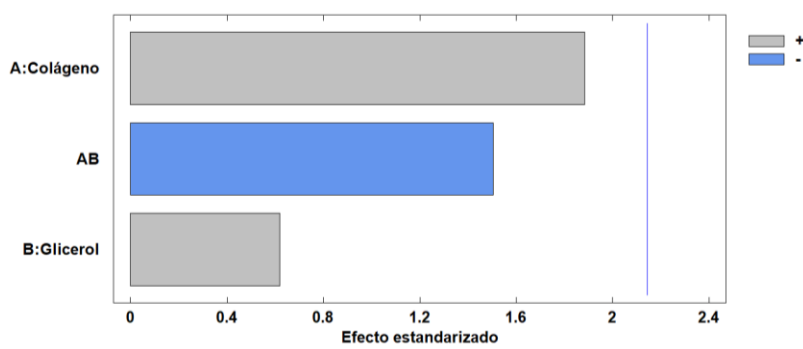


Figura 16. Efecto del colágeno y glicerol sobre la elongación a la ruptura de películas de colágeno obtenidas a partir de piel de *Pterygoplichthys pardalis*.

Los valores de elongación a la ruptura que se obtuvieron fueron de $15.99 \pm 0.07\%$, siendo estos resultados semejantes a los obtenidos por Krkić *et al.* (2012) quienes evaluaron la elongación a la ruptura de una película de colágeno comercial reportando valores de $18.4 \pm 2.7\%$ y Weng *et al.* (2014), quienes elaboraron películas de colágeno de tilapia (*Tilapia zillii*) empleando glicerol al 20% como plastificante, obteniendo valores de elongación de $17.83 \pm 8.01\%$. Estos resultados fueron superiores a los reportados por Slimane y Sadok (2018), quienes emplearon colágeno y quitosano en sus formulaciones, obteniendo valores de $4.25 \pm 0.63\%$.

Harper *et al.* (2013) reportan que la adición de proteínas en películas parece no tener influencia sobre este parámetro. Además, Silva *et al.* (2009) reportan que los agentes plastificantes como el glicerol ayudan a incrementar la elongación a la ruptura de las películas. El motivo por el cual los valores de elongación fueron mayores a los reportados por Slimane y Sadok (2018) se debe probablemente a que la acetilación del grupo N-acetil presente en el quitosano influye negativamente por impedimento estérico, en las interacciones entre las cadenas de polisacáridos, impidiendo que hayan interacciones entre las moléculas que pueden formar puentes de hidrógeno, lo que repercute finalmente en la menor elongación a la ruptura del material (Gennadios, 2002).

6.2.1.3 Módulo de Young

El módulo de Young “*E*” (también denominado módulo de elasticidad), es un parámetro que indica la relación existente entre los incrementos de tensión aplicados y los incrementos de elongación del material evaluado (Britannica, 2019). Para dicho parámetro, mediante el análisis de los datos, se pudo apreciar un efecto estadístico significativo por parte de los dos factores, tanto de la concentración de colágeno como de la concentración de glicerol, como lo demuestra el diagrama de Pareto en la figura 17, reportando un módulo de Young de 78.178 ± 7.078 MPa.

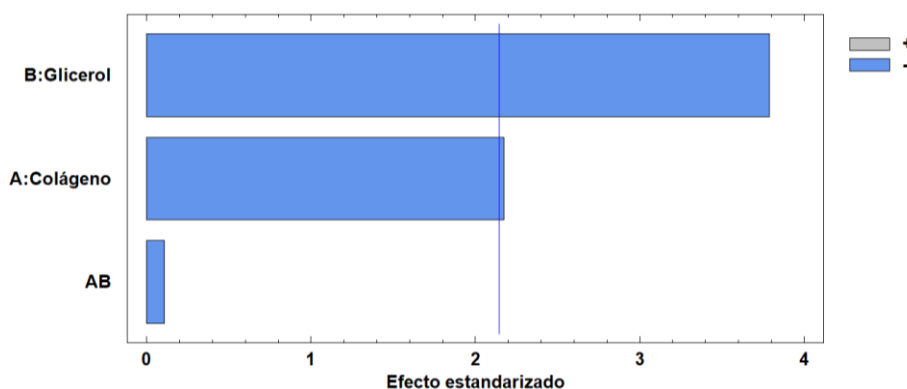


Figura 17. Efecto del colágeno y glicerol sobre el módulo de Young de películas de colágeno obtenidas a partir de piel de *Pterygoplichthys pardalis*.

El glicerol es uno de los plastificantes más empleados en la elaboración de películas empleando proteínas como materia prima (Jongjareonrak *et al.*, 2006; Deiber *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2011; Montalvo *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2017). Como se mencionó anteriormente, este factor tuvo efecto negativo sobre el módulo de Young, lo cual puede atribuirse a que los incrementos en la concentración de glicerol originan un efecto de segregación, es decir, la formación de zonas en la estructura de las películas con una concentración mayor de glicerol en comparación con los otros componentes, donde dichas zonas tendrán propiedades mecánicas diferentes a las del resto de la película (Gao *et al.*, 2017).

Debido a que no se ha reportado anteriormente que la concentración de colágeno tenga un efecto negativo sobre el módulo de Young, atribuimos que dicho efecto puede estar

siendo ocasionado debido a la presencia de la hélice β en el extracto empleado en las soluciones formadoras de película. Recordemos que el colágeno empleado en la realización de las películas es el mismo que se obtuvo del proceso de extracción por el método ácido y, como se mencionó anteriormente, en el extracto hay presencia de α hélices, pero también de β hélices (la cual se encuentra conformada por dos α hélices aún entrelazadas por puentes de hidrógeno en su estructura) y, asumimos que la hélice β no interactúa tan eficientemente con los demás componentes de la película como lo hace la hélice α debido a que no tiene tantos grupos funcionales disponibles para establecer nuevas interacciones en la formación de la red polimérica.

6.2.2 Calorimetría diferencial de barrido

Las películas se sometieron a calorimetría diferencial de barrido (DSC), encontrando en todas las películas un comportamiento parecido en los termogramas (Figura 18).

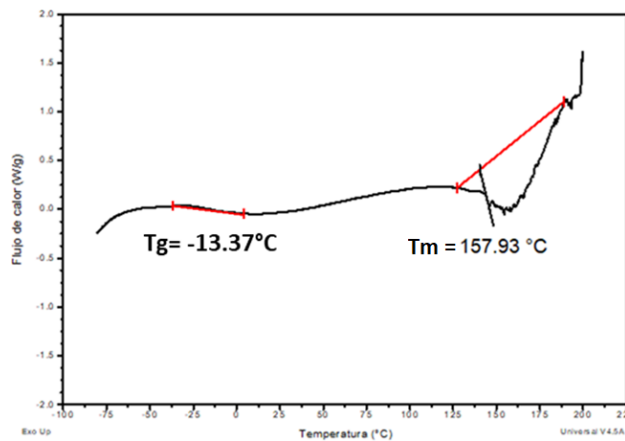


Figura 18. Temperatura de transición vítrea y de desnaturalización en el termograma de película de colágeno extraído a partir de piel de *Pterygoplichthys pardalis* (Tratamiento 7, Cuadro 8). Donde: Tg = Temperatura de transición vítrea; Tm = Temperatura de desnaturalización.

Los rangos de la temperatura de transición vítrea (Tg) oscilan entre los -13°C y -17°C . Ahmad *et al.* (2016) reportan que la temperatura de transición vítrea (Tg) se rige por las características estructurales del material polimérico, como el peso molecular, la ramificación de la cadena y el grado de entrecruzamiento entre los diferentes componentes empleados en las formulaciones. El colágeno consiste de 3 alfa hélices, donde cada alfa hélice

está conformada por una cadena de aminoácidos de alrededor de 1000 residuos (siendo los más predominantes glicina, prolina e hidroxiprolina debido a la presencia del triplete GLY-X-Y) (McCance *et al.*, 2010). Al ser tanto el colágeno como la goma arábiga moléculas con un alto peso molecular, las cuales, en trabajos recientes han reportado un alto grado de entrecruzamiento (Sarika *et al.*, 2015), se asume que el alto grado de entrecruzamiento entre estos dos carbohidratos, en conjunto con el glicerol (el cual actúa como agente plastificante uniéndose al colágeno y la goma arábiga) durante la formación de la red polimérica podrían estar generando la disminución de la temperatura de transición vítrea con respecto a lo reportado en la literatura, donde la T_g se encuentra alrededor de los 100 °C como en el trabajo de Tang *et al.* (2015) quienes encontraron rangos de temperatura entre los 103 °C a los 107 °C.

Además, en el termograma no se aprecia la presencia de una señal térmica que indique la presencia de agua libre, por lo tanto, los componentes incorporaron al agua en la red polimérica, dejando al agua presente como agua ligada, la presencia de la hélice beta del colágeno que no se encuentra entrelazada como las alfa hélices de colágeno en la red polimérica podrían también estar teniendo un efecto directo sobre la temperatura de transición vítrea, haciendo que esta sea mucho más baja.

Los rangos de la temperatura de desnaturalización (T_m) oscilan entre los 140 °C a los 158 °C, estos resultados son semejantes a los reportados por Tang *et al.* (2015), quienes reportaron rangos de T_m entre los 140 °C y los 144 °C.

La temperatura de desnaturalización (T_m), en películas de colágeno, depende directamente de la estabilidad de la estructura y ruptura de la estructura molecular tan ordenada que caracteriza a la triple hélice de colágeno (Ahmad *et al.*, 2016; Suderman *et al.*, 2018). La cantidad de prolina e hidroxiprolina en la estructura de la proteína de colágeno determina directamente la temperatura de desnaturalización (T_m) de las películas de colágeno (Ahmad *et al.*, 2016).

Gennadios (2002) reportó que las diferencias entre los valores de T_g y T_m se deben a los factores, como las condiciones de medición y tratamiento de las muestras o el contenido de humedad, reportando que el contenido de agua en películas de colágeno disminuye el valor de T_g hasta 5 °C por cada 1% de agua (p/p) y que la eliminación de humedad, tiene como

consecuencia la formación de entrecruzamientos covalentes, lo que incrementa los valores de Tg. Por lo tanto, asumimos que las películas elaboradas poseen agua ligada en su estructura ya que no se observó una señal térmica indicando la presencia de agua libre en el termograma, lo que generó el rango amplio de Tg observado.

Con base en lo anterior, podemos asumir que los componentes empleados formaron una red polimérica donde el entrecruzamiento se llevó de manera eficiente, además de que, permitieron obtener un valor de Tg bajo y un amplio rango de aplicación en el estado gomoso, sin comprometer la Tm y sin el riesgo de sufrir una posible desnaturalización de la película durante su uso.

6.2.3 Solubilidad

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización de solubilidad de las películas, permitieron observar que todas las películas presentaron tiempos de solubilización de 74.11 ± 6.43 segundos.

De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que las películas elaboradas son películas altamente solubles, debido a la naturaleza higroscópica de los componentes empleados. Colágeno, glicerol y goma arábiga son moléculas que se caracterizan por poseer una gran cantidad de grupos hidroxilo a lo largo de su estructura, siendo los grupos hidroxilos los responsables de llevar a cabo interacciones con las moléculas de agua, aumentando la solubilidad de las películas (Wang *et al.*, 2005).

6.2.4 Color

Las películas obtenidas presentaron una superficie ligeramente rugosa y opaca debido a la migración del agua libre durante el proceso de secado, mientras que la cara que mantenía contacto con el molde poseía una superficie lisa y brillante. Todas las películas poseían una apariencia homogénea, lo que permite suponer que se llevó a cabo una mezcla homogénea entre los componentes.

Con respecto a la luminosidad (L), al realizar el análisis de varianza, se observó que los dos factores y la interacción de ambos tuvieron un efecto estadísticamente significativo, como se puede apreciar en el diagrama de Pareto (Figura 19).

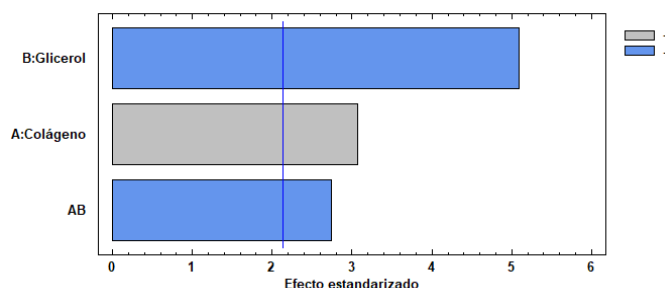


Figura 19. Efecto del colágeno y glicerol sobre el parámetro “L” de películas de colágeno obtenidas a partir de piel de *Pterygoplichthys pardalis*.

El efecto del aumento de la concentración de glicerol es de carácter negativo, lo mismo ocurre cuando se aumenta la relación colágeno-glicerol, mientras que al incrementar la concentración de colágeno también lo hace la luminosidad.

En lo referente a la evaluación de los resultados obtenidos sobre el parámetro “a”, no se encontró un efecto estadísticamente significativo, reportando valores para “a” dentro de un rango entre los -5.99 hasta los -2.17, localizándose en la región del color verde. De igual manera, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

Con respecto al valor del parámetro “b”, el diagrama de Pareto (Figura 20), se evidenció que la concentración de colágeno tanto como la interacción de los dos factores tuvieron un efecto estadístico sobre este valor, siendo de carácter positivo en ambos casos.

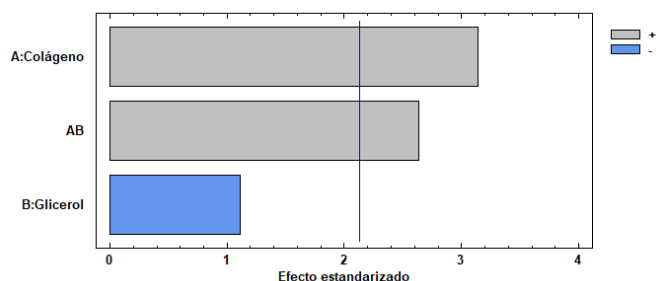


Figura 20. Efecto del colágeno y glicerol sobre el parámetro “b” de películas de colágeno obtenidas a partir de piel de *Pterygoplichthys pardalis*.

Los valores para “b” oscilaban en un rango entre los -2.18 hasta los 15.99 y se observó que, a medida que se incrementaba la concentración de colágeno, así como la relación colágeno–glicerol, había un incremento del color amarillo (b+). El glicerol no tuvo un efecto estadístico significativo sobre este parámetro.

Todas las películas presentaron una coloración café, la cual según la literatura es generada por la goma arábiga en las formulaciones de las soluciones formadoras de película. (Williams y Phillips, 2009) debido a la presencia de taninos (Burdock, 1997).

Por lo anterior, podemos concluir que las películas podrán presentar variaciones de coloración dependiendo de las concentraciones de colágeno y glicerol empleadas en la formulación, pudiendo obtener películas con alta o baja luminosidad y diferentes intensidades de color amarillo.

Este parámetro es importante, ya que existen diferentes aplicaciones para películas en las que se requiere una característica visual del producto (Thakur y Thakur, 2016).

6.2.5 Biodegradabilidad

6.2.5.1 Demanda química de oxígeno

Se elaboró una curva patrón con biftalato de potasio de acuerdo a lo establecido en la NMX-aa-028-scfi-2001 a fin de determinar la concentración (mg de O₂/L) de la muestra problema (Anexo 2).

Tomando en cuenta los factores de dilución de la muestra se encontraron valores de DQO de $1.203 \times 10^6 \pm 3.682 \times 10^4$ mg de O₂/L.

6.2.5.2 Demanda bioquímica de oxígeno

Posterior a la digestión de la muestra durante un periodo de 5 días, el valor de DBO obtenido en los resultados de esta determinación fue de $9.354 \times 10^5 \pm 5.310 \times 10^4$ mg de O₂/L.

6.2.5.3 Índice de biodegradabilidad

Las películas de colágeno presentaron un índice de biodegradabilidad del $77.74 \pm 6.76\%$, lo que permite clasificarlas como un material biodegradable de acuerdo a la clasificación propuesta por Ardila *et al.* (2012) (Cuadro 9).

Cuadro 9. Criterios de biodegradabilidad según la relación entre demanda química y bioquímica de oxígeno (Ardila *et al.*, 2012).

DBO ₅ */DQO**	Carácter
> 80%	Muy biodegradable
70 – 80%	Biodegradable
30 – 70%	Poco biodegradable
< 30%	No biodegradable

*Demanda bioquímica de oxígeno transcurridos cinco días después de la reacción; **Demanda bioquímica de oxígeno.

Los resultados obtenidos a partir de las determinaciones de DQO, DBO e índice de biodegradabilidad obtenidos en este proyecto son de vital importancia, debido a que en trabajos realizados sobre la elaboración de películas de colágeno no se reportan estudios donde determinaron la biodegradabilidad de las mismas (Gomez-Guillen *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2015; Atarés y Chiralt, 2016; Suderman *et al.*, 2018). Los autores atribuyen que sus películas son biodegradables únicamente por la naturaleza orgánica y biológica de los componentes empleados en la formulación de las mismas.

Sin embargo, existen trabajos como el realizado por Gawande *et al.* (2016) quienes elaboraron un polímero a base de glucosa y sorbitol, determinando la biodegradabilidad mediante la relación DBO/DQO, reportando índices de biodegradabilidad del 41.27% a los 4 días y del 49.81% a los 6 días. Tai *et al.* (2019), determinaron la biodegradabilidad de películas compuestas de almidón-poliuretano mediante la cuantificación de dióxido de carbono, comparando la cantidad de CO₂ liberado durante la degradación microbiana, con respecto al valor teórico de CO₂ de la oxidación completa del carbono presente en las películas evaluadas, reportando una biodegradabilidad del 86% transcurridos 180 días, en películas con 80% de almidón y 20% de plastificante (glicerol) en sus formulaciones. Tai *et al.* (2019) reportan que, aunque el almidón y el glicerol son compuestos biodegradables, no

se alcanzó un 100% de biodegradabilidad, observando la conversión de una fracción de los componentes de la película por los microorganismos en disacáridos, monosacáridos y moléculas pequeñas que contenían grupos carbonilo en su estructura. Tai *et al.* (2019) reportan que la biodegradabilidad se ve afectada por el carácter hidrofóbico de los componentes de la película. En las formulaciones que contenían poliuretano observaron un alto grado de reticulación química en la estructura y la formación de una barrera impermeable ante la acción microbiana al momento de la degradación.

Con base en lo mencionado anteriormente, se puede asumir que algunas de las razones del porqué las películas elaboradas en este proyecto tuvieron una biodegradabilidad del 77% en un plazo de 5 días puede deberse al carácter hidrofílico del colágeno (Lee *et al.*, 2001) y el glicerol (Vieira *et al.*, 2011), a la formación de una red polimérica mediante interacciones débiles (puentes de hidrógeno) entre ambos componentes en las películas, y a la excelente biodegradabilidad que presentan ambas moléculas en la naturaleza (Vieira *et al.*, 2011; Moula Ali *et al.*, 2017).

Con base en lo anterior, se puede afirmar que las películas elaboradas con colágeno extraído por método ácido de piel de *P. pardalis*, glicerol y goma arábiga son biodegradables ya que la mayor parte de la materia orgánica e inorgánica presente en ellas se puede oxidar bioquímicamente.

7. CONCLUSIONES

Se determinaron las mejores condiciones de operación (tamaño de partícula malla 30, relación materia prima:solución de extracción 1:20 y 24 horas de tiempo de extracción) para llevar a cabo la extracción de colágeno empleando la piel de pez diablo (*Pterygoplichthys pardalis*) como materia prima.

El empleo de colágeno, goma arábiga y glicerol permitió la formación de películas biodegradables. Se encontró que estas películas poseen propiedades mecánicas como elongación a la ruptura o fuerza de corte, semejantes a las de películas elaboradas con otros polímeros. Además, las películas elaboradas en este proyecto poseen una temperatura de transición vítrea menor a 0 °C y una temperatura de desnaturalización por encima de 140 °C, lo que les permite tener un rango de temperaturas amplio de aplicación sin que la película sufra algún cambio de fase o desnaturalización.

Las películas de colágeno presentaron un índice de biodegradabilidad del 77%, lo que permite considerarlas como un material biodegradable, siendo este dato de vital importancia ya que se puede hacer un uso de las películas sin que representen un desecho con un alto impacto ambiental.

Estos resultados demuestran que la piel de *Pterygoplichthys pardalis* es una fuente opcional para la extracción de colágeno y una alternativa al colágeno extraído de mamíferos como porcinos y bovinos, además, se demostró que el colágeno extraído puede ser empleado para la creación de nuevos materiales como películas biodegradables.

8. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

A partir del estudio y análisis de los resultados obtenidos en el desarrollo del proyecto, se logró la extracción de colágeno a partir de piel de *P. pardalis*, sin embargo, en la composición del extracto obtenido aproximadamente el 50% era colágeno. Se sugiere evaluar diferentes métodos de purificación, como puede ser el acoplamiento de un proceso de dializado posterior a la extracción de colágeno por el método ácido, esperando con ello una mejora sobre el porcentaje de colágeno puro en el producto de la extracción.

Para la evaluación de las películas, se llevaron a cabo algunas caracterizaciones que sirvieron de base para determinar parámetros importantes como el módulo de Young o el índice de biodegradabilidad de las muestras, no obstante, existen otros parámetros que no se evaluaron en esta tesis, que podrían proporcionar más información sobre la forma en la que los componentes presentes en las películas están interactuando y el efecto que estos tienen en las propiedades del producto. Se espera que en futuros experimentos se realicen análisis termogravimétricos, permeabilidad al vapor de agua, transmisión de luz y contenido de humedad, caracterizaciones que no formaron parte de los objetivos de este proyecto, pero que podrán enriquecer el acervo científico generado a partir de los procedimientos llevados a cabo durante el presente proyecto.

Se espera poder evaluar la aplicación de las películas de colágeno elaboradas, siendo su uso en la salud algo que no se ha evaluado, esperando poder desempeñarse como un material que pueda ayudar a mejorar la salud de personas que han sido víctimas de quemaduras debido al origen orgánico y biológico de los componentes empleados para la obtención de las películas.

De igual manera, se espera que este proyecto pueda servir para una posible aplicación industrial del pez diablo, específicamente la piel, ya que se trata de un desperdicio no aprovechado.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, M., Nirmal, N. P., Danish, M., Chuprom, J., y Jafarzedeh, S. (2016). Characterisation of composite films fabricated from collagen/chitosan and collagen/soy protein isolate for food packaging applications. *RSC Advances*, 6(85), 82191–82204. <https://doi.org/10.1039/c6ra13043g>
- Amador del Ángel L. E., E. del C. Guevara Carrió, R. B. P. y E. E. H. (2014). Aspectos biológicos e impacto socio-económico de los peces del género *Pterygoplichthys* y dos cíclidos no nativos en el sistema fluvio lagunar deltaico Río Palizada, en el Área Natural Protegida Laguna de Términos, Campeche, 21.
- Ardila, A., Reyes, J., Arriola, E., y Alfredo, J. (2012). Remoción fotocatalítica de DQO, DBO₅ y COT de efluentes de la industria farmacéutica. *Revista Politécnica*, 9–17. <https://doi.org/10.33571/rpolitec>
- Armbruster, J. W. (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141(1), 1–80. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2004.00109.x>
- Armbruster, J. W., y Page, L. M. (2006). Redescription of *Pterygoplichthys punctatus* and description of a new species of *Pterygoplichthys* (Siluriformes: Loricariidae). *Neotropical Ichthyology*, 4(4), 401–409. <https://doi.org/10.1590/s1679-62252006000400003>
- Atarés, L., y Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.001>
- Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C. W., Olson, D. A., Chiou, B., Yee, E., Bechtel, P. J., y McHugh, T. H. (2006). Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. *Journal of Food Science*, 71(4), 202–207. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00016.x>

- Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B., y Berman, H. (1994). Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science*, 266(5182), 75–81. <https://doi.org/10.1126/science.7695699>
- Benjakul, S., Singh, P., Maqsood, S., y Kishimura, H. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, 124(1), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.111>
- Blanco, M., Vázquez, J. A., Pérez-Martín, R. I., y Sotelo, C. G. (2019). Collagen Extraction Optimization from the Skin of the Small-Spotted Catshark (*S. canicula*) by Response Surface Methodology. *Marine Drugs*, 17(1), 40. <https://doi.org/10.3390/md17010040>
- Britannica, E. (2019). *Young's modulus*. (T. E. of E. Britannica, Ed.). Encyclopædia Britannica, inc. Retrieved from <https://www.britannica.com/science/Youngs-modulus>
- Burdock, G. (1997). *Encyclopedia of food and color additives*. Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781498711081>
- Cano Salgado, M. P., Baltazar, E. B., y Barba-Macías, E. (2012). Innovación social y capacidad de organización de las cooperativas pesqueras. *Estudios Sociales*, 20(39), 65–97.
- Capps, K. A., y Flecker, A. S. (2013). Invasive Fishes Generate Biogeochemical Hotspots in a Nutrient-Limited System. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054093>
- Capps, K. A., Nico, L. G., Mendoza-Carranza, M., Arévalo-Frías, W., Ropicki, A. J., Heilpern, S. A., y Rodiles-Hernández, R. (2011). Salinity tolerance of non-native suckermouth armoured catfish (Loricariidae: Pterygoplichthys) in south-eastern Mexico: Implications for invasion and dispersal. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 21(6), 528–540. <https://doi.org/10.1002/aqc.1210>
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., y Hong, B. (2016). Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT - Food Science and Technology*, 66, 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>
- Deiber, J. A., Peirotti, M. B., y Ottone, M. L. (2011). Rheological characterization of edible

- films made from collagen colloidal particle suspensions. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1382–1392. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.002>
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., y Konno, K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*, 112(3), 702–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.020>
- El-Rashidy, A. A., Gad, A., Abu-Hussein, A. E. H. G., Habib, S. I., Badr, N. A., y Hashem, A. A. (2015). Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticas*) fish scale collagen. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.019>
- Fratzl, P. (2008). *Collagen: Structure and Mechanics*. (P. Fratzl, Ed.), *Collagen: Structure and Mechanics*. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-73906-9>
- Fuller, Pam L.; Nico, Leo G.; Williams, J. D. (1999). *Nonindigenous Fishes Introduced into Inland Waters of the United States*. *American Fisheries Society Special Publication Number 27* (Vol. 27). Retrieved from <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.2307/1468388>
- Galus, S., y Lenart, A. (2013). Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.006>
- Gao, C., Pollet, E., y Avérous, L. (2017). Properties of glycerol-plasticized alginate films obtained by thermo-mechanical mixing. *Food Hydrocolloids*, 63, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.023>
- Gawande, P., Yenkie, M., Gogte, B., y Kharadbhaje, V. (2016). Biodegradability study of synthesised polymer based on glucose and sorbitol. *International journal of engineering sciences and research technology*, 5(12), 1019–1024. <https://doi.org/10.5281/zenodo.225412>
- Gennadios, A. (2002). Protein-Based Films And Coatings. In *Edible Food Packaging* (pp. 445–454). CRC Press. Retrieved from <https://www.taylorfrancis.com/books/9781482234220/chapters/10.1201/b19468-3>

- Gilsenan, P. M., y Ross-Murphy, S. B. (2000). Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14(3), 191–195. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00050-8)
- Gómez-Guillén, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E., y Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813–1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gómez-Guillén, M. C., Gómez-Estaca, J., Montero, P., y Fernández-Martín, F. (2009). Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: A comparative study. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.022>
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., y Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, 20(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.10.002>
- Harper, B. A., Barbut, S., Lim, L. T., y Marcone, M. F. (2012). Microstructural and textural investigation of various manufactured collagen sausage casings. *Food Research International*, 49(1), 494–500. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.043>
- Harper, B. A., Barbut, S., Lim, L. T., y Marcone, M. F. (2013). Characterization of “wet” alginate and composite films containing gelatin, whey or soy protein. *Food Research International*, 52(2), 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.041>
- Hashim, P., Mohd Ridzwan, M. S., Bakar, J., y Mat Hashim, D. (2015). Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*, 22(1), 1–8. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/281911258_Collagen_in_food_and_beverage_industries
- Hernández-Santos, M. (2015). Aspectos reproductivos del lorcarido *Pterygoplichthys pardalis* (Castelnau, 1855) en la laguna de las ilusiones, Tabasco, México, (October), 0–64.

- Hong, Y.-H., Lim, G.-O., y Song, K. B. (2009). Physical Properties of *Gelidium corneum* - Gelatin Blend Films Containing Grapefruit Seed Extract or Green Tea Extract and Its Application in the Packaging of Pork Loins. *Journal of Food Science*, 74(1), C6–C10. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00987.x>
- Hoover, J. J., Killgore, K. J., y Cofrancesco, A. F. (2004). Suckermouth catfishes: threats to aquatic ecosystems of the United States? *Aquatic Nuisance Species Research Bulletin*, 4(January 2004), 1–9.
- Jamilah, B., y Harvinder, K. G. (2002). Properties of gelatins from skins of fish - Black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77(1), 81–84. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00328-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00328-4)
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Prodpran, T., y Tanaka, M. (2006). Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. *Food Hydrocolloids*, 20(4), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.04.007>
- Karim, A. A., y Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 563–576. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>
- Kiew, P. L., y Mat Don, M. (2013). Screening of significant factors in collagen extraction from hybrid clarias sp. using a statistical tool. *International Food Research Journal*, 20(4), 1913–1920.
- Kozłowska, J., Sionkowska, A., Skopinska-Wisniewska, J., y Piechowicz, K. (2015). Northern pike (*Esox lucius*) collagen: Extraction, characterization and potential application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.002>
- Krkić, N., Lazić, V., Petrović, L., Gvozdenović, J., y Pejić, D. (2012). Properties of chitosan-laminated collagen film. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 483–489.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lee, C. H., Singla, A., y Lee, Y. (2001). Review: Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 221, 1–22.
- Lee, S. B., Kwon, J. S., Lee, Y. K., Kim, K. M., y Kim, K. N. (2012). Bioactivity and mechanical properties of collagen composite membranes reinforced by chitosan and β -tricalcium phosphate. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 100 B(7), 1935–1942. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32760>
- Lewis, W. C. M. (1918). Studies in catalysis. Part ix. The calculation in absolute measure of velocity constants and equilibrium constants in gaseous systems. In m. H. Back and L. J. Laidler (Eds.), *Selected Readings in Chemical Kinetics* (pp. 36–40). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-012344-8.50006-4>
- Liénart, G.-D. H. (2013). Biología reproductiva de la especie exótica invasora *Pterygoplichthys pardalis* (Siluriformes: Loricariidae) en los humedales de La Libertad (sitio RAMSAR No. 79), río Usumacinta, Chiapas, México, (79), 103. <https://doi.org/10.1167/iavs.09-5050>
- Lizarbe, I. M. A. (2002). El colágeno, ¿un cemento biológico que mantiene la arquitectura y plasticidad tisular? *Horizontes Culturales. Las Fronteras de La Ciencia*, 119–138.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89160-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89160-4)
- Man, P. Van. (2018). Effect of carboxyl methyl cellulose and gum arabic based. *Annals. Food Science and Technology*, 19(1). <https://doi.org/https://www.researchgate.net/publication/325854923>
- Mathews, C. K., van Holde, K. E., Appling, D. R., y Anthony-Cahill, S. J. (2012). *Biochemistry*. Pearson Education. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=GZ1KBAAAQBAJ>
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A. B., y Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129(3), 1179–

1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.099>

McCance, K. L., Huether, S. E., Geneser, F., Shoulders, M. D., Raines, R. T., Genovese, F., ... Mauer, S. M. (2010). Collagen structure and stability. *PLoS ONE*, 78(3), 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.COLLAGEN>

Mendoza-Carranza, M., Hoeinghaus, D. J., Garcia, A. M., y Romero-Rodriguez, Á. (2010). Aquatic food webs in mangrove and seagrass habitats of Centla Wetland, a Biosphere reserve in Southeastern Mexico. *Neotropical Ichthyology*, 8(1), 171–178. <https://doi.org/10.1590/s1679-62252010000100020>

Mendoza, R., Contreras, S., Ramírez, C., Koleff, P., Alvarez, P., y Aguilar, V. (2007). Los peces diablo. *Biodiversitas*, 70(1870–1760), 1–5.

Montalvo, C., López Malo, A., y Palou, E. (2012). Películas comestibles de proteína: características, propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.04.042>

Moula Ali, A. M., Benjakul, S., y Kishimura, H. (2017). Molecular characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the scales of golden carp (*Probarbus jullieni*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(6), 450–457. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-09-1316>

Muralidharan, N., Jeya Shakila, R., Sukumar, D., y Jeyasekaran, G. (2013). Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization. *Journal of Food Science and Technology*, 50(6), 1106–1113. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0440-y>

Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., y Duodu, K. G. (2004). Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 85(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.006>

NCBI. (2018). National Center for Biotechnology Information. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nurubhasha, R., Sampath Kumar, N. S., Thirumalasetti, S. K., Simhachalam, G., y Dirisala, V. R. (2019). Extraction and characterization of collagen from the skin of

Pterygoplichthys pardalis and its potential application in food industries. *Food Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00601-z>

- Ocak, B. (2018). Film-forming ability of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes with chitosan. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(5), 4643–4655. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0843-z>
- Ovando, J., Meza, R., Valdiviezo, V., y Enciso, S. (2018). Evaluación del colágeno extraído a partir de huesos y piel de pez diablo (*Hypostomus plecostomus*).
- Pavli, F., Tassou, C., Nychas, G. J. E., y Chorianopoulos, N. (2018). Probiotic incorporation in edible films and coatings: Bioactive solution for functional foods. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010150>
- Ramos, Ó. L., Reinas, I., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Cerqueira, M. A., Pereira, R. N., ... Malcata, F. X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.001>
- Rawdkuen, S., Sai-Ut, S., y Benjakul, S. (2010). Properties of gelatin films from giant catfish skin and bovine bone: A comparative study. *European Food Research and Technology*, 231(6), 907–916. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1340-5>
- Said, M. I., Erwanto, Y., y Abustam, E. (2016). Properties of edible film produced using combination of collagen extracts of bligon goatskin with glycerol. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 11(4), 151–159. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2016.151.159>
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. E., y Regalado, C. (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/248935>
- Sarika, P. R., Cinthya, K., Jayakrishnan, A., Anilkumar, P. R., y James, N. R. (2014). Modified gum arabic cross-linked gelatin scaffold for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*, 43, 272–279.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.042>

- Sarika, P. R., Pavithran, A., y James, N. R. (2015). Cationized gelatin/gum arabic polyelectrolyte complex: Study of electrostatic interactions. *Food Hydrocolloids*, 49, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.039>
- Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R., Kubota, E. H., Mazutti, M., Kempka, A., y Demiate, I. (2016). *Collagen extraction process* (Vol. 23).
- Serrano Gaona, J. C. (2011). Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*), 85. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/4880/>
- Shi, D., Liu, F., Yu, Z., Chang, B., Goff, H. D., y Zhong, F. (2019). Effect of aging treatment on the physicochemical properties of collagen films. *Food Hydrocolloids*, 87(May 2018), 436–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.016>
- Silva, M., Bierhalz, A., y Kiechbusch, T. (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 736–742. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.014>
- Sinthusamran, S., Benjakul, S., y Kishimura, H. (2013). Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chemistry*, 138(4), 2435–2441. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.136>
- Sionkowska, A., Kozłowska, J., Skorupska, M., y Michalska, M. (2015). Isolation and characterization of collagen from the skin of *Brama australis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 605–609. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.032>
- Slimane, E. Ben, y Sadok, S. (2018). Collagen from cartilaginous fish by-products for a potential application in bioactive film composite. *Marine Drugs*, 16(6). <https://doi.org/10.3390/md16060211>
- Suderman, N., Isa, M. I. N., y Sarbon, N. M. (2018). Characterization on the mechanical and physical properties of chicken skin gelatin films in comparison to mammalian gelatin

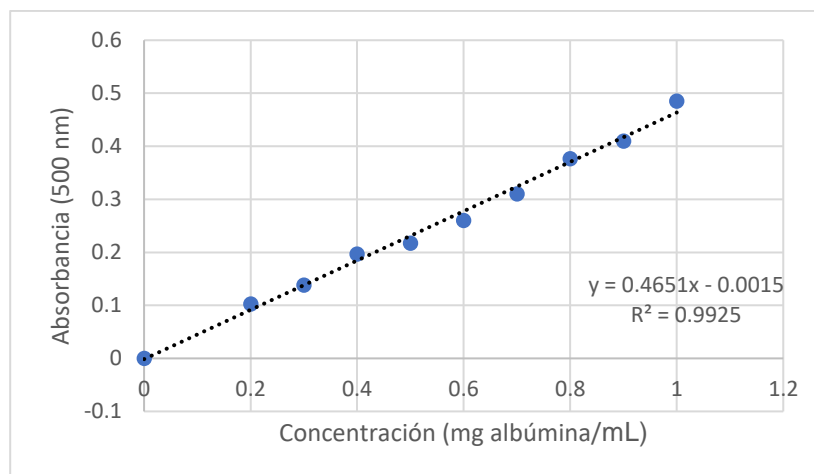
- films. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 440(1).
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/440/1/012033>
- Sun, L., Li, B., Song, W., Si, L., y Hou, H. (2017). Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible biomedical material. *Process Biochemistry*, 63(July), 229–235.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.08.003>
- Surasani, V. K. R., Raju, C. V., Chandra, M. V., Shafiq, U., y Lakshmisha, I. P. (2019). Effect of organic acid on recovery yields and characteristics of rohu (*Labeo rohita*) protein isolates extracted using pH shift processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6546–6551. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9935>
- Tai, N. L., Adhikari, R., Shanks, R., y Adhikari, B. (2019). Aerobic biodegradation of starch–polyurethane flexible films under soil burial condition: Changes in physical structure and chemical composition. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 145(April), 104793. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104793>
- Tan, Y., y Chang, S. K. C. (2018). Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food Chemistry*, 242(March 2017), 147–155.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.013>
- Tang, L., Chen, S., Su, W., Weng, W., Osako, K., y Tanaka, M. (2015). Physicochemical properties and film-forming ability of fish skin collagen extracted from different freshwater species. *Process Biochemistry*, 50(1), 148–155.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.015>
- Thakur, V. K., y Thakur, M. K. (2016). *Handbook of sustainable polymers: Structure and chemistry*. *Handbook of Sustainable Polymers: Structure and Chemistry*.
<https://doi.org/10.4032/9789814613569>
- Vieira, M. G. A., Da Silva, M. A., Dos Santos, L. O., y Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
- Wakida-Kusunoki, A. T., Ruiz-Carus, R., y Amador-del-Angel, E. (2007). Amazon Sailfin

- Catfish, *Pterygoplichthys Pardalis* (Castelnaud, 1855) (Loricariidae), Another Exotic Species Established in Southeastern Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 52(1), 141–144. [https://doi.org/10.1894/0038-4909\(2007\)52\[141:ascppc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1894/0038-4909(2007)52[141:ascppc]2.0.co;2)
- Wang, J., Pei, X., Liu, H., y Zhou, D. (2018). Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 544–550. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.046>
- Wang, L. P., Wang, Y. P., y Zhang, F. A. (2005). Preparation and characterization of Ni²⁺-montmorillonite/ polyvinyl alcohol water-soluble nanocomposite film. *Polymers and Polymer Composites*, 13(8), 839–846.
- Wang, Z., Hu, S., y Wang, H. (2017). Scale-Up Preparation and Characterization of Collagen/Sodium Alginate Blend Films. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4954259>
- Weng, W., Zheng, H., y Su, W. (2014). Characterization of edible films based on tilapia (*Tilapia zillii*) scale gelatin with different extraction pH. *Food Hydrocolloids*, 41, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.026>
- Williams, P. A., y Phillips, G. O. (2009). *Handbook of Hydrocolloids. Handbook of hydrocolloids*. <https://doi.org/doi:10.1094/1891127381.toc>
- Yang, H., Li, Q., Liu, S., y Li, G. (2018). Acetic acid/1-ethyl-3-methylimidazolium acetate as a biphasic solvent system for altering the aggregation behavior of collagen molecules. *Journal of Molecular Liquids*, 262, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.04.076>
- Yoshitaka, M., Kanae, I., Yoshifumi, Y., Ken, Y., Tamotsu, S., Tomoko, K., y Takatoshi, Y. (2011). The usefulness of the collagen and elastin sponge derived from salmon as an artificial dermis and scaffold for tissue engineering. *Biomedical Research*, 32(1), 29–36. <https://doi.org/10.2220/biomedres.32.29>
- Zelechowska, E., Sadowska, M., y Turk, M. (2010). Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Hydrocolloids*, 24(4), 325–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.010>

- Zeng, S., Yin, J., Yang, S., Zhang, C., Yang, P., y Wu, W. (2012). Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). *Food Chemistry*, 135(3), 1975–1984. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.086>
- Zhang, S., Wang, Y., Herring, J. L., y Oh, J. H. (2007). Characterization of edible film fabricated with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatin extract using selected pretreatment methods. *Journal of Food Science*, 72(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00515.x>
- Zhou, C., Li, Y., Yu, X., Yang, H., Ma, H., Yagoub, A. E. G. A., y Otu, P. N. Y. (2016). Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.024>
- Zou, Y., Wang, L., Cai, P., Li, P., Zhang, M., Sun, Z., y Wang, D. (2017). Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1602–1610. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.011>

10. ANEXOS

Anexo 1: Curva patrón para la cuantificación de proteínas por el método Lowry empleando albúmina de suero bovino



Anexo 2: Curva patrón para la cuantificación de consumo de oxígeno

