



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS (ICAP)

MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

**“Extracción y caracterización de colágeno ovino tipo I
por medio de ultrasonido”**

TESIS QUE

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

EDHER ARMANDO GONZÁLEZ VARGAS

DIRECTOR:

DR. GABRIEL AGUIRRE ÁLVAREZ

CO-DIRECTOR

DR. RAFAEL GERMÁN CAMPOS MONTIEL



Tulancingo de Bravo Hidalgo, Agosto 2016



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo



Instituto de Ciencias Agropecuarias

Coordinación de Investigación y Posgrado del ICAP

Acta de la reunión del comité de Tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis titulada como; “Extracción y caracterización de colágeno ovino tipo I por medio de ultrasonido”, que desarrollo el estudiante: Ing. Agroindustrial Edher Armando González Vargas.

Asistentes:

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez
Dr. Rafael Germán Campos Montiel
Dr. Rubén Jiménez Alvarado
Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

A. Revisión del trabajo de tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicándole oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo de investigación y poder continuar con el proceso titulación para obtener el grado de Maestro en Ciencia de los Alimentos. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 07 de Septiembre del 2016

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez



Av. Universidad km.1, Rancho Universitario
C.P. 43600. Tulancingo, Hidalgo. México
Tel. +52 771 7172000 Ext. 2421

DEDICATORIA

En honor a todos los investigadores que contribuyeron en la generación de conocimiento a partir del método científico aplicado al estudio general de la biomolécula de colágeno. A mis padres; Armando Luciano González Sánchez y Noemí Vargas Islas, por el simple hecho de haberme dado la oportunidad de estudiar. A mi tía; Raquel Vargas Islas, quién nunca perdió la confianza en mí a pesar de las distintas circunstancias. A quien corresponda; te dedico este trabajo de investigación, espero que te sea útil.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al doctor Gabriel Aguirre Álvarez por el conocimiento compartido, la formación intelectual y su confianza. Así mismo, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico sin el cual no hubiera sido posible terminar el presente trabajo de investigación. También quiero agradecer a mi novia Adriana Abril Rodríguez Lozano por su apoyo incondicional, comprensión y paciencia hacia mí. Finalmente, dar las gracias a todas esas personas que marcaron mi vida con su sabiduría generando un gran impacto en mi forma de pensar y actitud.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1 MARCO TEÓRICO	3
1.1 Piel	3
1.2 Proteínas.....	4
1.3 Colágeno	5
1.3.1 Revisión histórica	7
1.4 Fibrilogénesis <i>in vivo</i>	8
1.4.1 Entrecruzamiento natural.....	11
1.5 Conformación estructural.....	12
1.6 Familia del colágeno	14
1.7 Función del colágeno	14
1.8 Punto isoeléctrico del colágeno	15
1.9 Hinchamiento del colágeno.....	16
1.10 Ultrasonido.....	19
1.10.1 Fundamento teórico	19
1.10.2 Fenómeno de cavitación	21
1.10.3 Transferencia de energía.....	25
1.10.4 Ondas de presión	26

1.10.5	Propagación longitudinal.....	27
1.10.6	Parámetros de onda simple.....	28
1.10.7	Generación de ultrasonido.....	30
1.10.8	Fenómeno piezoeléctrico.....	31
1.11	Antecedentes sobre la extracción de colágeno por medio de ultrasonido.....	32
2	JUSTIFICACIÓN.....	34
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo general.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	HIPÓTESIS.....	37
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
5.1	Materiales.....	38
5.2	Preparación de la piel de borrego.....	38
5.3	Cinética de hinchamiento.....	39
5.4	Extracción de colágeno.....	39
5.4.1	Proceso de extracción enzimática convencional (EC).....	39
5.4.2	Proceso de extracción enzimática asistido por ultrasonido de alta intensidad en piel rasurada (E-U-PR).....	40
5.4.3	Proceso de extracción enzimática asistido por ultrasonido de alta intensidad en una piel con proceso de pelambre (E-U-PA).....	41
5.5	Diálisis de colágeno.....	41
5.6	Liofilización del colágeno.....	41
5.7	Calorimetría de barrido diferencial (DSC).....	42
5.8	Determinación del punto isoeléctrico (pI).....	43
5.9	Determinación del peso molecular SDS-PAGE.....	44
5.10	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	44

5.11	Determinación de viscosidad	45
5.12	Determinación del rendimiento de extracción	45
6	RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
6.1	Cinética de hinchamiento.....	46
6.2	Calorimetría de barrido diferencial (DSC)	49
6.3	Determinación del punto isoeléctrico (pI)	54
6.4	Determinación del peso molecular por SDS-PAGE	56
6.5	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.....	58
6.6	Determinación de la viscosidad	63
6.7	Determinación del rendimiento de extracción	67
7	CONCLUSIONES.....	69
8	PERSPECTIVAS.....	70
9	REFERENCIAS	71
10	Anexos	78
10.1	AMIDIQ.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ilustración de la estructura general de la piel. La capa o región denominada como dermis, está constituida principalmente por una red fibrosa de colágeno tipo I (Bieńkiewicz 1983).....	4
Figura 2 Eventos intracelulares durante la biosíntesis del colágeno (Bentley 1976).	9
Figura 3 Micro y ultra estructura del colágeno. (A) Secreción de procolágeno a partir de osteoblastos en la matriz extracelular. (B) Modelo de apilamiento escalonado de un cuarto de longitud. (C) Imagen de las fibrillas de colágeno <i>in-situ</i> de un tendón, obtenida por microscopia de fuerza atómica y en la cual se muestra la periodicidad anular de bandas D (Abou Neel, Bozec et al. 2013).	10
Figura 4 Jerarquía estructural del colágeno. 1) La estructura primaria con la secuencia repetitiva Gly-X-Y, donde X es comúnmente prolina e Y es a menudo hidroxiprolina. 2) Una hélice levógira se forma en la estructura secundaria. 3) La unión de tres hélices forman una súper triple hélice con una longitud de 300 nm, llamada molécula de colágeno, con residuos de glicina en el centro. 4 a) Varias moléculas de colágeno se acumulan para dar origen a microfibrillas que a su vez forman una fibrilla (4 b). El conjunto de las fibrillas da origen a una fibra. Estas pueden ser de varios tamaños, que van desde un micrón a un tamaño evidente para el ojo (Johansson 2013).	13
Figura 5 Ilustración gráfica del grado de hinchamiento que experimentan varios materiales orgánicos en función del pH (Gustavson 1956).	18
Figura 6 Representación esquemática de la clasificación de las ondas sonoras a diferentes frecuencias (Kentish and Ashokkumar 2011).	20
Figura 7 Formación, desarrollo y colapso de la cavidad o burbuja que se genera en el medio irradiado por ultrasonido de alta intensidad (Soria and Villamiel 2010).	23
Figura 8 Ilustración esquemática de las zonas de reacción producidas durante el proceso de cavitación (Sillanpää, Pham et al. 2011).	24
Figura 9 Ilustración de las variaciones de presión en la propagación de ultrasonido. Las líneas representan el grado de compresión y descompresión de las partículas del medio (Tole 2005).	27
Figura 10 Representación de la dirección de propagación de las ondas en función de la orientación de la fuente vibratoria. (Tole 2005).	28

Figura 11 Representación del comportamiento que sufren las partículas del medio al someterse en la dirección de la onda ultrasónica, la cual se representa como una curva sinusoidal (Tole 2005).	29
Figura 12 Deformación de un material piezoeléctrico debido a la aplicación de diferentes intensidades de corriente eléctrica. Estas deformaciones generan la vibración (Tole 2005).	31
Figura 13 Cinética de hinchamiento a partir de los trozos de piel con pre-tratamiento alcalino (a) y previamente rasurados (b). Letras diferentes representan valores significativamente diferentes ($P < 0.05$).	47
Figura 14 Termogramas de las muestras secas (EC, E-U-PR y E-U-PA) con un contenido de humedad del 0.7% en base seca corridas en un intervalo de temperatura que va de los 25°C a 200°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.	51
Figura 15 Ampliación de los termogramas de DSC obtenidos a partir de las muestras rehidratadas (EC, E-U-PR y E-U-PA). Escaneadas de 25°C a 60°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.	53
Figura 16 Determinación del punto isoelectrico a partir de la obtención del potencial Z en función del pH. Todas las muestras fueron sometidas a un intervalo de pH inicial de 3.5 y llevadas a un pH final de 9.5. Las letras representan las diferencias significativamente ($P < 0.05$) del promedio de tres repeticiones.	55
Figura 18 Determinación del peso molecular a partir de los tratamientos (extracción convencional (EC), extracción asistida por ultrasonido a partir de la piel de borrego rasurada (E-U-PR) y extracción asistida pro ultrasonido a partir de la piel de borrego con tratamiento alcalino (E-U-PA)).	57
Figura 17 Espectros infrarrojos de las muestras de colágeno ovino tipo I previamente dializadas y liofilizadas, obtenidos por medio de la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.	62
Figura 19 Determinación de la viscosidad a partir de las diferentes muestras de colágeno ovino tipo I. Las letras representan las diferencias significativamente ($P < 0.05$) del promedio de tres repeticiones.	64
Figura 20 Correlación entre el peso molecular y la viscosidad en el colágeno ovino tipo I. Ambos parámetros fueron determinados a través de técnicas diferentes.	66

Figura 21 Rendimiento de extracción de colágeno ovino tipo I a partir de los distintos tratamientos (EC y E-U-PR y E-U-PA)..... 68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Temperatura de fusión (T_m) y entalpía (ΔH) de las diferentes muestras secas (EC, E-U-PR y E-U-PA) de colágeno ovino tipo I.....	52
Tabla 2 Números de onda (cm^{-1}) obtenidos a partir de las diferentes bandas amida registradas por cada espectro infrarrojo de las diferentes muestras de colágeno ovino tipo I.....	60

RESUMEN

En este estudio se investigó el efecto que tiene el ultrasonido de alta intensidad sobre las características singulares de la molécula de colágeno tipo I asilada a partir de la piel de borrego. Se trabajó con tres tratamientos de extracción; extracción convencional (EC), extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad a partir de una piel de borrego rasurada (E-U-PR) y extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad a partir de una piel de borrego sometida previamente a un proceso alcalino (E-U-PA) con el objetivo de eliminar el pelo y la epidermis. La irradiación ultrasónica fue aplicada a una frecuencia de 20 kHz con una amplitud del 80% por periodos de 50 segundos de trabajo y 10 segundos de descanso durante 40 minutos. Previo al proceso de extracción, la piel de borrego fue sometida a un proceso de hinchamiento en solución de ácido acético al 0.5 M en una relación 1:30 (p/v). Los rendimientos de extracción por parte de las muestras EC, E-U-PR y E-U-PA fue de 20.25%, 26.73% y 16.99% con base al peso seco, respectivamente, tal incremento en el rendimiento de extracción por parte de la muestra E-U-PR fue atribuido al mejoramiento de la acción enzimática debido a que las ondas de choque producidas por el ultrasonido abrieron las fibrillas de colágeno facilitando la proteólisis limitada. De acuerdo con las técnicas de FT-IR y SDS-PAGE se demostró que la estructura de triple hélice del colágeno ovino tipo I permaneció intacta incluso después de haber recibido ultrasonido de alta intensidad.

ABSTRACT

In this study the effect of high intensity ultrasound on the unique characteristics of the type I collagen molecule isolated from sheepskin was investigated. There were three treatments extraction; conventional extraction (EC), assisted extraction high intensity ultrasound from shaved skin (E-U-PR) and assisted extraction high intensity ultrasound from a sheepskin with previous alkaline process with the goal of eliminating hair and epidermis. The ultrasonic irradiation was applied at a frequency of 20 kHz with amplitude of 80% for periods of 50 seconds of work and 10 seconds rest for 40 minutes. Prior to the extraction process, the sheepskin was subjected to a swelling process in acetic acid solution to 0.5 M in a ratio 1:30 (w/v). The extraction yields from samples EC, E-U-PR and E-U-PA were 20.25%, 26.73% and 16.99% based on the dry weight respectively. This increase in the extraction yield from the E-U-PR sample was attributed to the improvement of the enzymatic action because the shock waves produced by ultrasound opening up collagen fibrils facilitating proteolysis. According to FT-IR techniques and SDS-PAGE, they demonstrated that the triple helix structure of collagen type I sheep remained intact even after receiving high intensity ultrasound.

1. INTRODUCCIÓN

El colágeno es la principal proteína estructural en vertebrados (Liu, Wei et al. 2015), constituye alrededor de una tercera parte del contenido total de proteína en el cuerpo animal (Huang, Kuo et al. 2016, Mohammadi, Mohammadifar et al. 2016). Hasta el día de hoy, se han identificado 29 tipos de colágeno (tipo I-XXIX) que difieren en su secuencia de aminoácidos, estructura molecular y función (Yu, Chi et al. 2014, Liu, Zhang et al. 2015). Siendo el colágeno tipo I el más abundante y mejor estudiado, constituye más del 90% de la masa orgánica en hueso y es el componente dominante en piel, tendón, ligamentos, córnea entre otros tejidos intersticiales donde asiste con la arquitectura molecular y propiedades mecánicas (Ran and Wang 2014, Kozłowska, Sionkowska et al. 2015). La estructura molecular del colágeno tipo I consiste de dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ entrelazadas entre sí para formar una triple hélice. Cada cadena alfa (α) está conformada por una ininterrumpida secuencia de tres aminoácidos (Glicina-X-Y), donde la prolina frecuentemente ocupa la posición X y la hidroxiprolina casi siempre la posición Y (Abou Neel, Bozec et al. 2013).

Las condiciones de pre-tratamiento, método de extracción, proceso de diálisis, así también como la materia prima, son factores que repercuten en las características singulares del colágeno tipo I, tales como; distribución del peso molecular, composición y conformación estructural (Prestes 2013, Skopinska-Wisniewska, Olszewski et al. 2014). El incremento en el uso del colágeno tipo I por parte de la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y biomédica se atribuye a su alto contenido de proteína y propiedades funcionales como; la capacidad de absorción de agua, formación de gel y la habilidad para estabilizar emulsiones (Huang, Kuo et al. 2016, Schmidt, Dornelles et al. 2016). El colágeno tipo I se obtiene a partir de la piel y huesos de vacas y cerdos. Sin embargo, debido a los brotes de encefalopatía espongiiforme bovina, encefalopatía espongiiforme transmisible y fiebre aftosa porcina, se ha generado incertidumbre en el consumo de colágeno proveniente de estos orígenes por razones de salud y religiosas.

Las metodologías de extracción de colágeno incluyen el uso de ácidos orgánicos (ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico), registrándose bajos rendimientos a comparación de los obtenidos por el método de extracción enzimático (Liu, Wei et al. 2015, Liu, Zhang et al. 2015). Sin embargo, la irradiación ultrasónica se ha utilizado para mejorar el rendimiento de extracción del colágeno debido a que esta tecnología mejora la transferencia de masa en el medio de extracción y disminuye el tiempo de procesamiento (Kim, Kim et al. 2012, Kim, Kim et al. 2013, Ran and Wang 2014). La irradiación ultrasónica es el proceso en el cual, las ondas de sonido generadas a una frecuencia no mayor a los 100 kHz, se propagan a través de un material (Soria and Villamiel 2010) produciendo un fenómeno conocido como cavitación (Salazar, Chávez et al. 2010, Chemat, Zill e et al. 2011). La cavitación es el evento físico, muy complejo, al cual se le atribuyen los efectos térmicos, mecánicos y químicos (Li, Mu et al. 2009). El objetivo de este trabajo fue asilar y caracterizar el colágeno tipo I a partir de la piel de borrego por medio de una extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Piel

La piel es un órgano de sensación, secreción y excreción que da protección al cuerpo animal contra la infección bacteriana. Cuando la piel es sometida a una exposición prolongada a los rayos del sol, desarrolla filtros de color para la protección de los tejidos subyacentes debido a la acción destructiva de los rayos ultravioletas. Adicionalmente, la piel se encarga de mantener la temperatura corporal constante, evitando la pérdida de calor a partir de la excreción de un material aceitoso (sebo) y acelerando la pérdida de calor por medio de la evaporación del agua (transpiración) (Gustavson 1956).

Por otro parte, la piel está dividida en tres capas distintas; una capa externa relativamente delgada llamada epidermis, seguida de una capa mucho más gruesa conocida como dermis y finalmente tenemos al tejido subcutáneo, que consiste de tejido adiposo y une el estrato de la piel con el cuerpo. Durante la preparación de la piel para el proceso de curtido, la epidermis y el tejido adiposo deben ser removidos, dejando a la dermis sola para ser curtida. Esta capa consiste principalmente de haces fibrilares de colágeno, entretejidos en todas direcciones. En la Figura 1 se muestra la estructura general de la piel con ayuda de una representación esquemática. Se observa que la epidermis está representada por una línea delgada y oscura la cual marca el límite superior de la piel. Así mismo, la epidermis se construye a partir de queratina, mientras que el constituyente principal de la dermis es el colágeno (Gustavson 1956).

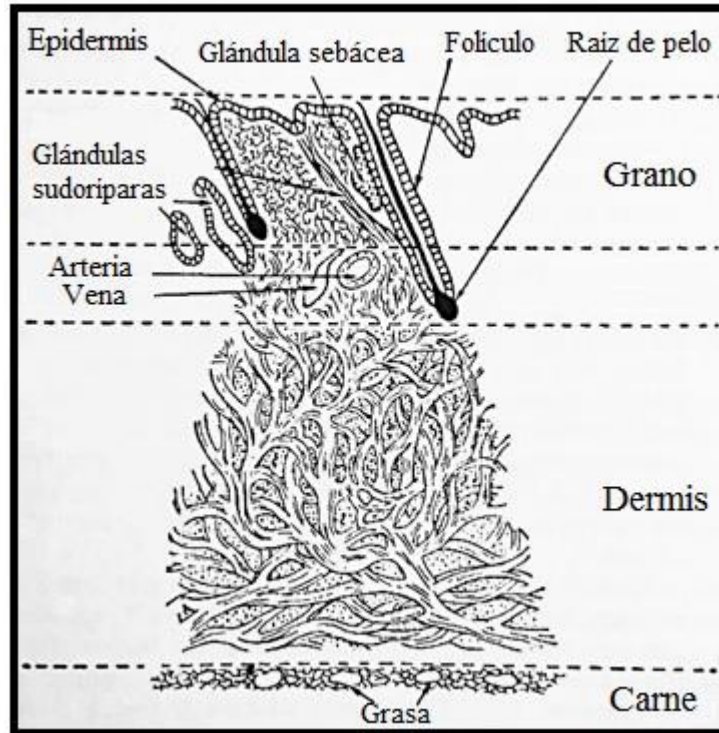


Figura 1 Ilustración de la estructura general de la piel. La capa o región denominada como dermis, está constituida principalmente por una red fibrosa de colágeno tipo I (Bieńkiewicz 1983).

1.2 Proteínas

Las proteínas son biomoléculas fundamentales del organismo que se encargan de realizar los procesos de la vida y su sustento, ellas proporcionan la materia prima para las necesidades diarias. Las proteínas solubles en agua, presentes en sangre y órganos, muestran gran versatilidad en sus diversas funciones a nivel celular y están íntimamente conectadas con los procesos vitales. Ellas funcionan como los constituyentes esenciales de la multiplicación celular, como enzimas y hormonas del cuerpo, anticuerpos y toxinas. Sin embargo, las proteínas solubles en agua son bastante lábiles químicamente y están plegadas estructuralmente de tal modo que forman partículas esféricas, por lo que son conocidas como “proteínas globulares” (Gustavson 1956).

Por otra parte, las proteínas fibrosas sirven de apoyo y dan protección a los órganos, formando estructuras más estables y resistentes. A diferencia de las proteínas globulares, las proteínas fibrosas son insolubles en agua. Particularmente, el colágeno es un claro ejemplo de este grupo de proteínas (Gustavson 1956).

1.3 Colágeno

La palabra colágeno deriva del griego “Kolla” y “genos” que significan pegamento y formación, respectivamente (Muralidharan, Jeya Shakila et al. 2013). En contraste a las proteínas globulares esféricas, el colágeno se compone de estructuras lineales de tipo fibroso (Schrieber and Gareis 2007). Es un importante componente estructural de la matriz extracelular, ya que mantiene la integridad del tejido conectivo y lo provee de las cualidades mecánicas específicas, es decir, le proporciona al tendón esa resistencia que lo caracteriza, la compresibilidad al cartílago y la flexibilidad tanto de los vasos sanguíneos como de la piel (Brodsky, Werkmeister et al. 2005).

Adicionalmente, el colágeno es el principal constituyente de la piel, ya que un 90-95% de la dermis está constituida de esta proteína fibrosa (Gustavson 1956). Así mismo, el colágeno representa alrededor de un 30% del contenido total de proteína en el cuerpo animal, siendo la proteína estructural predominante en piel y hueso (Li, Wang et al. 2013). Dentro de la matriz extracelular, las moléculas de colágeno están alineadas de cabeza a cola en una disposición escalonada, lo que favorece la formación de enlaces cruzados entre las regiones telopeptídicas de cada molécula de colágeno. El grado de entrecruzamiento entre moléculas de colágeno generalmente aumentan con la edad (Liu, Wei et al. 2015).

Respecto a la solubilización del colágeno, este es casi insoluble en soluciones alcalinas, sin embargo, este tipo de soluciones son utilizadas para remover proteínas no colágenas. Por otra parte, las soluciones de ácidos orgánicos no solo pueden solubilizar el colágeno no entrecruzado, sino que también pueden romper algunos enlaces cruzados entre cadenas de colágeno, conduciendo a una mayor solubilización durante el proceso de extracción. Los ácidos orgánicos tales como; ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico, pueden ser utilizados en la extracción de colágeno. Respecto a los ácidos inorgánicos (por ejemplo, el ácido clorhídrico), pueden ser empleados en la extracción, sin embargo, su eficiencia de extracción es baja en comparación a los ácidos orgánicos (Liu, Wei et al. 2015).

Siendo el ácido acético el solvente orgánico más utilizado y común para la obtención de colágeno tipo I debido a la alta capacidad de extracción en comparación a los demás ácidos orgánicos. La concentración de ácido acético determina el valor de pH del medio de extracción, por lo que regula la densidad de carga de la molécula de colágeno, afectando la interacción electrostática y estructura de la misma, determinando la solubilidad y capacidad de extracción a partir del tejido animal (Liu, Wei et al. 2015). Sin embargo, el rendimiento de extracción puede ser mayor con la aplicación de una digestión enzimática (pepsina) limitada. La pepsina, obtenida de la mucosa gástrica porcina, es una enzima específica que escinde la región telopeptídica de las moléculas de colágeno, dejando a estas susceptibles a la solubilización por parte del ácido acético. El bajo rendimiento atribuido al uso individual del ácido acético en el proceso de extracción, es debido a la presencia de enlaces cruzados covalentes formados a través de la reacción de grupos aldehído (RCHO) con los aminoácidos lisina e hidroxilisina en los sitios helicoidales de los telopéptidos (Li, Wang et al. 2013, Yu, Chi et al. 2014).

1.3.1 Revisión histórica

El colágeno ha sido un material útil para la humanidad por milenios. No está claro, cuando se conoció por primera vez que las pieles podrían ser preservadas contra el deterioro y putrefacción a través del curtido del colágeno. Mientras materiales como el cabello, probablemente, lo primero en ser utilizado como suturas médicas hace 5,000 años, las suturas “catgut” de colágeno (término traducido como cuerda de tripa) también se utilizaron para el cierre de heridas. Pero la química y otras aplicaciones del colágeno se desarrollaron durante los últimos 200 años (Brodsky, Werkmeister et al. 2005).

Durante el año de 1,820 se realizaron estudios de productos hidrolizados obtenidos a partir de sustancias naturales, posteriormente llamados proteínas. Después, se aplicaron tratamientos con ácido hirviendo (H_2SO_4 y HCl) en gelatina y otras proteínas, lo que llevo en el año 1,900 a la obtención de 13 aminoácidos y consecuente a ello, al concepto de que las proteínas son polímeros de aminoácidos. Estudios posteriores de la gelatina, llevaron al descubrimiento de la hidroxiprolina (Hyp) e hidroxilisina (Hyl). Sin embargo, se consideró que estos aminoácidos se formaron por modificaciones secundarias (Brodsky, Werkmeister et al. 2005). Por lo que, gracias a los resultados sobre el estudio de la gelatina, se abrió la línea de estudio del colágeno.

Por otra parte, los primeros histólogos ya habían extraído colágeno al tratar tejidos en un medio ácido, por ejemplo, se observó que el tendón se hinchaba y disolvía en ácido acético diluido. Posteriormente, el comienzo de los estudios químicos sobre el colágeno soluble se atribuye a Nageotte (Bentley 1976). El encontró colágeno soluble en los extractos de ácido acético a partir de varios tejidos, además, se dio cuenta de que este podría ser precipitado por sal y re-agregado en fibrillas por medio de una diálisis con agua. Más estudios sobre la solubilidad del colágeno bajo diferentes condiciones, llegaron a ser la base de su purificación (Brodsky, Werkmeister et al. 2005). A mediados del año 1950, la comprensión de la secuencia característica de aminoácidos en el colágeno, junto con los estudios de difracción por rayos X de la fibra de colágeno, condujeron a la primer propuesta estructural de triple hélice comprendida por tres cadenas helicoidales levógiras enrolladas entre sí por una torsión en el sentido de las manecillas del reloj (Bentley 1976).

1.4 Fibrilogénesis *in vivo*

Todos los colágenos fibrilares están formados por cadenas alfa que consisten de una secuencia ininterrumpida de alrededor de 300 tripletes (Gly – X – Y). Debido a la repulsión estérica entre la prolina e hidroxiprolina presentes en las posiciones X e Y respectivamente, las cadenas alfa se doblan en una hélice levógira. La presencia del aminoácido glicina es esencial para la formación de la triple hélice, toda la glicina es empaquetada ordenadamente dentro de la espiral mientras que otros aminoácidos son acomodados en el exterior. Dependiendo del tejido y tipo de colágeno, las triples hélices pueden ser tanto homotrímeras como heterotrímeras (Abou Neel, Bozec et al. 2013).

El colágeno tipo I, es una triple hélice heterotrímera porque consiste de dos cadenas alfa 1 y una cadena alfa 2 (Figura 2). Esta estructura tiene forma de varilla y presenta un diámetro y longitud de aproximadamente 1.5 nm y 300 nm respectivamente. Flanqueada por dominios terminales no helicoidales (N- y C- propéptidos) llamados telopéptidos. La presencia del C- propéptido, se especula que es esencial para la formación de la triple hélice e impide la formación intracelular de fibrillas de colágeno durante la síntesis y el transporte, mientras que el N- propéptido, se piensa que está involucrado en el control del diámetro de las fibrillas (Abou Neel, Bozec et al. 2013).

El procolágeno es secretado a partir de las células, principalmente por fibroblastos y osteoblastos en el espacio extracelular (Figura 3). Respecto a la sección (A) de la Figura 3, el procolágeno es convertido en tropocolágeno por medio de proteasas que escinden los N- y C- telopéptidos; este último tiene la capacidad de ensamblarse espontáneamente en microfibrillas. La sección (B), nos muestra los enlaces cruzados intra-microfibrilares inmaduros que unen dos moléculas de colágeno de la cabeza a la cola, sin embargo, los enlaces cruzados inter-microfibrilares maduros unen dos enlaces cruzados inmaduros relacionando dos microfibrillas. Todas las microfibrillas de colágeno siguen el “modelo de apilamiento escalonado de un cuarto de longitud”, donde cinco moléculas de tropocolágeno están escalonadas con un desplazamiento de $D = 67$ nm, una brecha de $0.6 D$ y una superposición de $0.4 D$ (Abou Neel, Bozec et al. 2013, Liu, Wei et al. 2015).

Traducción del ARN mensajero por polisomas

Hidroxilación de las cadenas de protocógeno a partir de la prolil y lisil hidroxilasas

Liberación de las nuevas cadenas formadas (glicosiladas)

Alineación de las cadenas

Formación de la hélice y de los enlaces cruzados disulfuro por parte de los péptidos de la región C terminal

Secreción

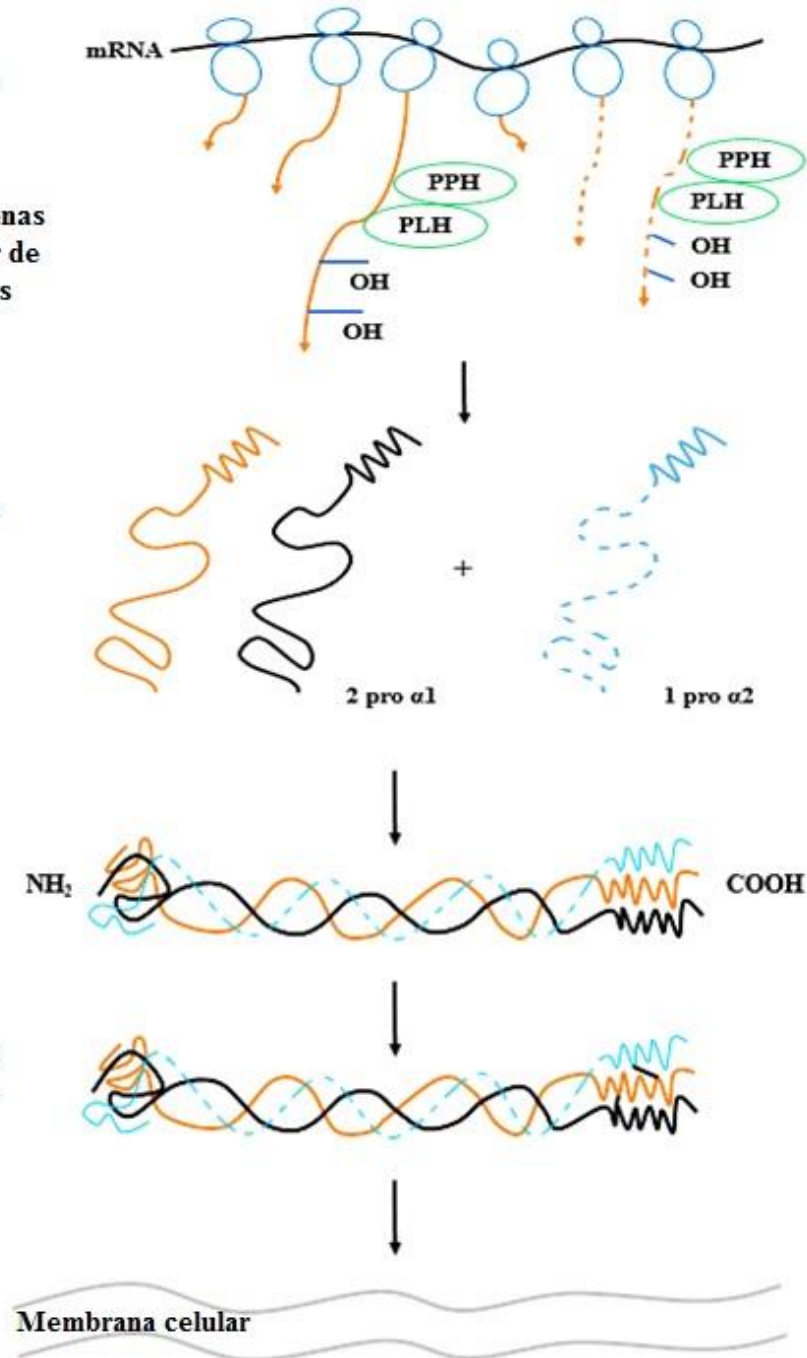


Figura 2 Eventos intracelulares durante la biosíntesis del colágeno (Bentley 1976).

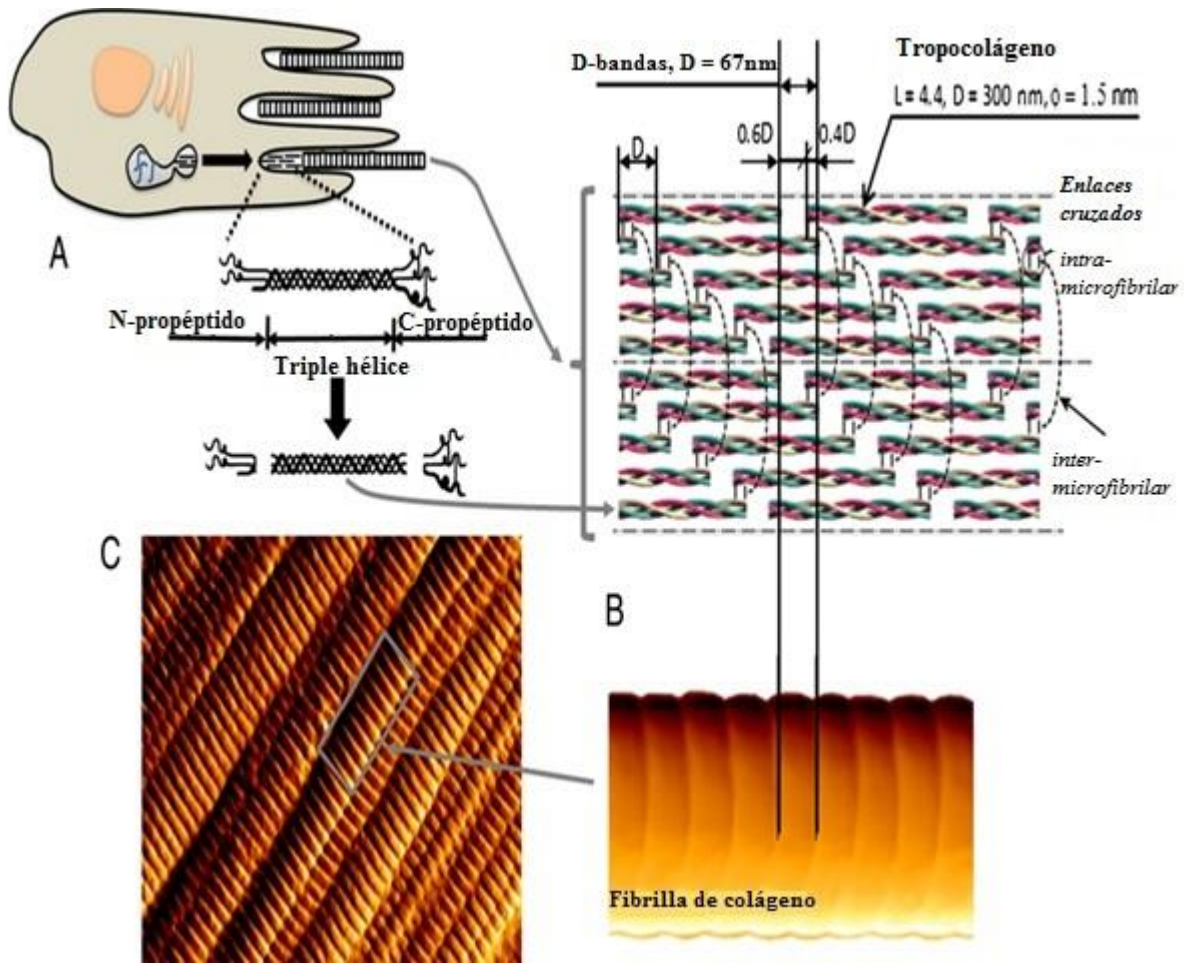


Figura 3 Micro y ultra estructura del colágeno. (A) Secreción de procolágeno a partir de osteoblastos en la matriz extracelular. (B) Modelo de apilamiento escalonado de un cuarto de longitud. (C) Imagen de las fibrillas de colágeno *in-situ* de un tendón, obtenida por microscopia de fuerza atómica y en la cual se muestra la periodicidad anular de bandas D (Abou Neel, Bozec et al. 2013).

1.4.1 Entrecruzamiento natural

El empaquetamiento del colágeno es estabilizado a partir de puentes de hidrógeno, así como por fuertes enlaces cruzados inter-moleculares que son los responsables de la estabilidad estructural necesaria para la formación del tejido e insolubilidad en el agua (Abou Neel, Bozec et al. 2013). Por otra parte, ha sido reportado que los anillos de pirrolidina de los aminoácidos prolina e hidroxiprolina imponen restricciones en la conformación de la cadena polipeptídica (estructura secundaria) ayudado a fortalecer la estabilidad térmica de la triple hélice (Huang, Shiau et al. 2011). El colágeno es único a diferencia de otras proteínas de origen animal debido a que presenta un alto contenido de hidroxiprolina (Brodsky and Ramshaw 1997). Así mismo, Li y colaboradores (2013) mencionan que la hidroxiprolina, hidroxilisina y prolina son aminoácidos únicos, encontrados en el colágeno. Por otra parte, Liu y colaboradores (2015) nos dicen que la hidroxiprolina es un marcador único para el colágeno, pero no es único del colágeno ya que este aminoácido forma parte de la elastina, sin embargo, la cantidad de elastina en la piel es mucho menor que la del colágeno.

De los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, este último tiene la capacidad de formar un puente de hidrógeno adicional a los dos ya existentes por cada tres aminoácidos que conforman la triple hélice, debido a su grupo hidroxilo (Ramachandran 1988, Li, Wang et al. 2013, Yu, Chi et al. 2014). La hidroxiprolina solo se produce en la tercera posición (Y) de la secuencia repetitiva característica (Gly-X-Y-), es del tipo 4-trans. El grupo funcional (OH) de este aminoácido permite la formación de interconexiones vía puentes de hidrógeno dentro de la estructura de triple hélice, contribuyendo de esta manera a su estabilidad (Kiew and Mashitah 2013). Sin embargo, también contribuye a la formación de interconexiones vía puentes de hidrógeno con estructuras de triple hélice vecinas (Ramachandran 1988). Por lo tanto, la hidroxiprolina no solo es importante en la estabilidad interna de una molécula de colágeno sino también en la formación de fuertes vínculos entre moléculas de colágeno vecinas.

Se cree que la estabilización inicial de las microfibrillas de colágeno es a través de la acción de la lisil oxidasa que cataliza aldehídos a partir de la lisina e hidroxilisina en los dominios N- y C- terminal, esta acción representa a casi todos los enlaces en los tejidos jóvenes. Los aldehídos catalizados son altamente reactivos, por lo tanto, reaccionan químicamente y espontáneamente con residuos de lisina modificada o no modificada de otras cadenas dentro de la misma molécula o de moléculas adyacentes, uniendo dos moléculas por la cabeza y la cola a través de entrecruzamientos intra-microfibrilares inmaduros. Otro proceso de entrecruzamiento se basa en la reacción con glucosa o sus metabolitos, y es conocido como glicación. No se produce enzimáticamente y en última instancia puede resultar en enlaces cruzados inter-moleculares, pero este proceso todavía está sujeto a debate. (Abou Neel, Bozec et al. 2013).

1.5 Conformación estructural

El colágeno tipo I está compuesto de tres cadenas alfa, dos son idénticas ($\alpha 1$) y una difiere ligeramente ($\alpha 2$) (estructura primaria). Cada cadena alfa comprende algunos 1014 aminoácidos y tienen un peso molecular de 100 kDa. Además, cada cadena alfa es enrollada en una hélice levógira con alrededor de tres aminoácidos por vuelta (estructura secundaria) debido a que la prolina e hidroxiprolina limitan la rotación del esqueleto polipeptídico contribuyendo a la estabilidad de la triple hélice. Posteriormente, tres cadenas alfa son torcidas alrededor de una a la otra en el sentido de las manecillas del reloj para formar una súper triple hélice (estructura terciaria). Debido a la distribución de carga, estas estructuras básicas están escalonadas por alrededor de un cuarto de su longitud (estructura cuaternaria, Figura 4). Por otra parte, muy poca metionina está presente en la molécula de colágeno y el triptófano está completamente ausente (Schrieber and Gareis 2007).

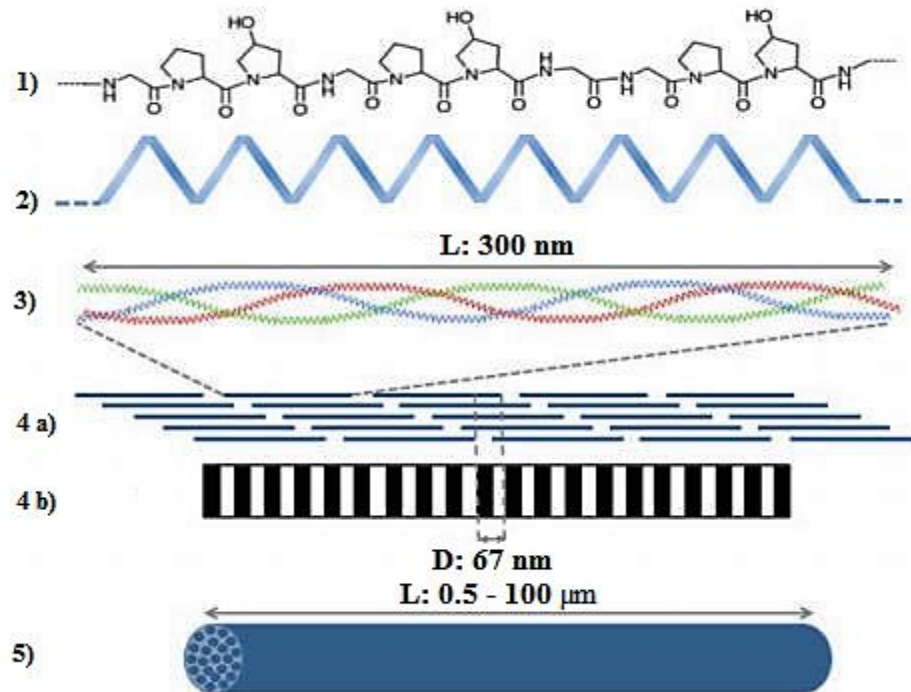


Figura 4 Jerarquía estructural del colágeno. 1) La estructura primaria con la secuencia repetitiva Gly-X-Y, donde X es comúnmente prolina e Y es a menudo hidroxiprolina. 2) Una hélice levógira se forma en la estructura secundaria. 3) La unión de tres hélices forman una súper triple hélice con una longitud de 300 nm, llamada molécula de colágeno, con residuos de glicina en el centro. 4 a) Varias moléculas de colágeno se acumulan para dar origen a microfibrillas que a su vez forman una fibrilla (4 b). El conjunto de las fibrillas da origen a una fibra. Estas pueden ser de varios tamaños, que van desde un micrón a un tamaño evidente para el ojo (Johansson 2013).

1.6 Familia del colágeno

Más de 28 tipos de colágeno, genéticamente distintos, son identificados por su secuencia polipeptídica y clasificados según su función. La mayoría pertenece a los formadores de fibrillas, el colágeno tipo I es el más sobresaliente (Abou Neel, Bozec et al. 2013). Según Schrieber y Gareis (2007), el colágeno tipo I es el más abundante ya que conforma más del 90% de la masa orgánica de los huesos y es el principal en el tejido conectivo, es decir, piel, tendón, ligamentos, entre otros. El tipo II se produce prácticamente y exclusivamente en el tejido cartilaginoso. El tipo III depende de la edad: piel muy joven puede presentar hasta un 50%, pero con el transcurso del tiempo se reduce a un 10% o 5%. El tipo V y XI son considerados una subfamilia del colágeno fibrilar pues se mezclan con los tipos de colágeno mencionados anteriormente en condiciones específicas. Los otros tipos de colágeno están presentes en cantidades muy bajas y la mayoría en órganos específicos.

1.7 Función del colágeno

El colágeno está asociado con la funcionalidad de tejidos tales como tendones y ligamentos, donde la principal función es transmitir la fuerza entre el hueso y los músculos vecinos al igual que almacenar el exceso de energía. Sin esta interconexión entre el hueso y los músculos por el colágeno, sería imposible el movimiento del esqueleto. Además, el colágeno está presente en tejidos mineralizados tales como dientes y huesos, en este caso, la función del colágeno es conferir cierto grado de flexibilidad y proporcionarle resistencia a la fractura. Otros tejidos en los que el colágeno juega un papel clave son: cartílago, piel, vasos sanguíneos e incluso los músculos, donde la flexibilidad del colágeno garantiza que cada tipo de tejido pueda cumplir con sus funciones específicas. Por otra parte, el colágeno también está presente en la córnea, pero esta vez, su alto grado de alineación y ordenamiento son claves para conferir propiedades ópticas específicas además de aportar una estabilidad mecánica (Abou Neel, Bozec et al. 2013).

1.8 Punto isoelectrico del colágeno

El punto isoelectrico (pI) de una proteína es el valor de pH en el que esta biomolécula no migra a un campo eléctrico, es decir, la carga neta es cero. Por otra parte, la determinación del valor de pI a partir de un polvo de piel que recibió diferentes tratamientos de extracción, se estableció a un valor de pH cercano a 5, valor que es ligeramente mayor al de la gelatina, la cual recibió un proceso alcalino. Posteriormente, a comienzos del año 1920, se encontraron dos valores de pI tanto en el colágeno como en la gelatina (a pH de 5 y 7.6) al tratar de localizar el valor de pH en el cual se obtuviera el mínimo hinchamiento. La existencia de dos puntos isoelectricos en una proteína fue un descubrimiento muy marcado, y se llegó a pensar en la posibilidad de que la gelatina es una mezcla de dos proteínas con pI de pH 5 y 7.8, pero se llegó a la conclusión de que los dos pI corresponden a la composición y no a la presencia de dos proteínas (Gustavson 1956).

Por lo que el valor de pI de la gelatina que fue obtenida a partir de una piel de cerdo tratada con ácido y sin recibir previamente un encalado (tratamiento alcalino), corresponde a valores de pH entre 7 y 8. No obstante, el valor de pI de la gelatina obtenida a partir de una piel de cerdo previamente encalada y sin recibir ningún tratamiento ácido, corresponde a un valor de pH de 5. Entonces, el desplazamiento del pI hacía el intervalo de pH ácido es debido a la deaminación que tiene lugar en el encalado (tratamiento alcalino), el cual afecta particularmente el contenido total de nitrógeno y se produce fácilmente a un grado de alcalinidad que corresponde a un pH de 12 o 13. Además, este fenómeno está acompañado por un incremento en el número de grupos carboxilo libres debido a que los aminoácidos asparagina y glutamina pasan a ser ácido aspártico y glutámico, respectivamente, por lo que aumentan la carga negativa del medio favoreciendo el desplazamiento del pI hacía el intervalo de pH ácido (Gustavson 1956, Piez 1967, Schrieber and Gareis 2007).

1.9 Hinchamiento del colágeno

El hinchamiento de la piel es la etapa principal en la extracción del colágeno y comienza con el proceso de remojo, el cual tiene como propósito recuperar las condiciones de la piel después de la separación de la canal. Una vez recuperada la blandura en la piel, es más fácil introducir en la piel sustancias pequeñas a nivel molecular. En la literatura, Gustavson (1956) nos dice que el hinchamiento que sufre el colágeno, el cual posee una estructura altamente ordenada, es considerado en base a una diferencia de volumen (cantidad de solución absorbida por el sustrato) y a la determinación de los cambios que sufre la fibra del colágeno respecto a su longitud y espesor, debido a la modificación de las condiciones electrostáticas de los grupos iónicos que constituyen a la proteína.

Por otra parte, Bieńkiewicz (1983) hace mención de un sistema conformado por un polímero en estado seco y un solvente hidratante, la interacción entre ellos permite el hinchamiento del polímero hasta que el mismo sistema alcanza un equilibrio electrostático. Sin embargo, si hay perturbaciones en el sistema por parte del polímero, por ejemplo, enlaces de entrecruzamiento entre las cadenas que constituyen al polímero, el hinchamiento llega a ser limitado. En base a lo anterior, el grado de hinchamiento por parte de la proteína en el sistema, es inversamente proporcional al número de enlaces cruzados que forman parte de la estabilización estructural de la misma.

Lo anterior fue demostrado a nivel experimental con ayuda de una gráfica (Figura 5), en ella se muestra el grado de hinchamiento de varios sustratos con respecto a la capacidad de absorción de agua contra un intervalo de pH. A modo de comparación, se anexo una curva de hinchamiento que pertenece a un gel de gelatina (12%). Entonces, la fibroína que es un componente estructural de la seda, está estrechamente empaquetada por fuertes puentes de hidrógeno y prácticamente carece de grupos ácidos y básicos, por otra parte, la estructura de la queratina es extremadamente estable, ya que es estabilizada por medio de enlaces covalentes disulfuro y fuertes puentes de hidrógeno. Estas dos proteínas (fibroína y queratina), prácticamente no son afectadas por la acción de los iones hidrógeno e hidroxilo en un intervalo de pH que va del 1 hasta el 12 (Gustavson 1956).

Además, el bajo contenido de grupos iónicos presentes en la fibroína no permite una interacción tanto con ácidos como bases, sin embargo, debido al poder de unión que presenta la queratina, tanto con ácidos como con bases, se puede observar un incremento en su hinchamiento a comparación de la fibroína. No obstante, en el caso del colágeno, el cual carece de enlaces covalentes entre cadenas y no es internamente estable como la queratina, pero contiene una alta cantidad de grupos iónicos fuertes, comparable al de la queratina, es más susceptible al hinchamiento por la acción de ácidos y bases que la queratina. Por otra parte, las proteínas del musculo, las cuales presentan una cohesión interna menos desarrollada, tiende a ser más susceptible a un gran hinchamiento a ciertos valores de pH en comparación a las demás proteínas con excepción de la gelatina, la cual no presenta una estructural definida característica por lo que hincha enormemente (Gustavson 1956). Finalmente, Bienkiewicz (1983) menciona que el hinchamiento del colágeno es dependiente tanto de un factor osmótico como liotrópico.

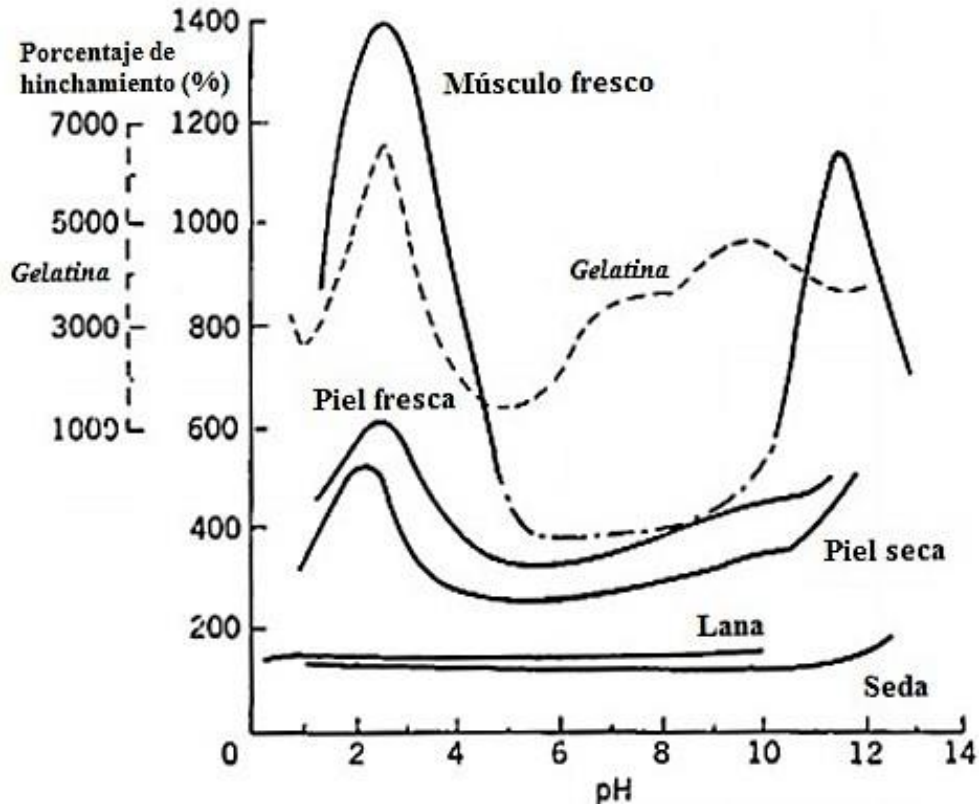


Figura 5 Ilustración gráfica del grado de hinchamiento que experimentan varios materiales orgánicos en función del pH (Gustavson 1956).

1.10 Ultrasonido

1.10.1 Fundamento teórico

El Sonido es una forma de energía mecánica, el cual es generado a través de una fuente vibratoria. El número de vibraciones por unidad de tiempo, conocido como frecuencia de vibración, es expresado en Hertz (Hz). Un Hertz equivale a una vibración por segundo (1/s) (Tole 2005). Entonces, cuando una cuerda de violín se hace vibrar por el arco, una onda de presión es generada, esta viaja a través de un medio material (en este caso aire) hasta llegar al oído humano donde es percibida como una sensación (Pineda, Bernal et al. 2009). Todas las ondas de sonido se caracterizan por ser ondas de presión longitudinales que viajan a través del grosor o superficie de un material a una velocidad que es característica de la naturaleza de la onda y del material a través del cual son propagadas (líquido, sólido y gas) (Soria and Villamiel 2010).

Por otra parte, las ondas sonoras se clasifican de acuerdo a su frecuencia (Figura 6), es decir, por debajo de una frecuencia de 20 Hz se encuentra la zona del infrasonido, este tipo de ondas son utilizadas por ballenas y dispositivos de sonar submarino. No obstante, la zona del ultrasonido comprende frecuencias por encima de los 20 kHz, por lo que es inaudible para el oído humano (Mason, Riera et al. 2005, Raichel 2006, Salazar, Chávez et al. 2010, Kentish and Ashokkumar 2011, Awad, Moharram et al. 2012, Pingret, Fabiano-Tixier et al. 2013).

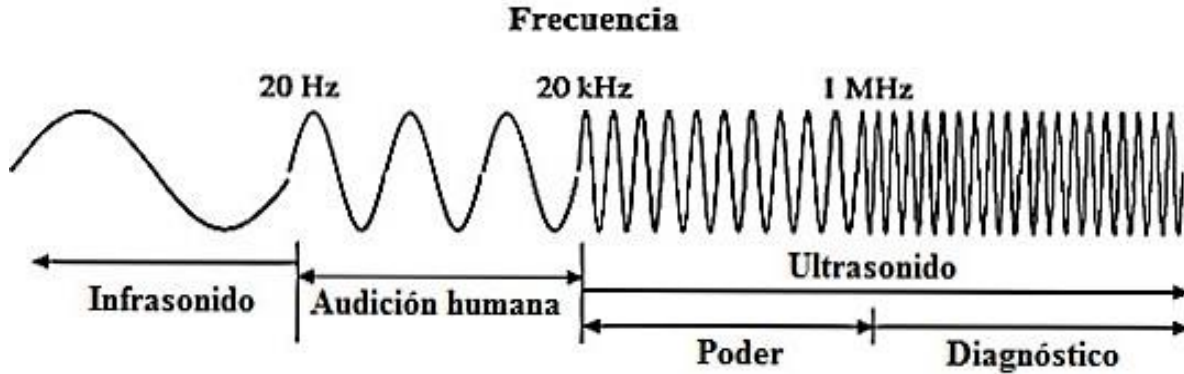


Figura 6 Representación esquemática de la clasificación de las ondas sonoras a diferentes frecuencias (Kentish and Ashokkumar 2011).

Tanto Sillanpää y colaboradores (2011) como Soria y Villamiel (2010), mencionan que el intervalo de frecuencia ultrasónica comienza en los 16 kHz y solo Sillanpää y colaboradores mencionan como límite superior los 500 MHz, sin embargo, Salazar y colaboradores (2010) nos dice que el límite superior de la audición humana puede variar de persona a persona, es decir, algunas personas perciben ondas de sonido con una frecuencia superior a los 16 kHz y otras personas no las pueden percibir. De igual manera, remarcan que el intervalo de frecuencia ultrasónica es considerado por encima de los 20 kHz y el límite superior del ultrasonido está gobernado por la capacidad de generar ondas ultrasónicas. El espectro ultrasónico está dividido en dos importantes zonas: alta y baja frecuencia, también denominadas como ultrasonido diagnóstico y ultrasonido de poder, respectivamente (Mason, Riera et al. 2005, Raichel 2006, Soria and Villamiel 2010).

En la industria de los alimentos, la aplicación del ultrasonido diagnóstico se caracteriza, principalmente, por mantener una frecuencia >100 kHz, intensidad $< 1\text{W}/\text{cm}^2$ y no generar cambios significativos sobre el medio en el cual es aplicado, contrariamente, el ultrasonido de poder que utiliza una frecuencia < 100 kHz e intensidad $> 10\text{ W}/\text{cm}^2$ si genera cambios significativos debido a la producción de una intensa cavitación en el medio de aplicación. Adicionalmente, el ultrasonido de poder es una herramienta auxiliar utilizada en áreas de investigación específicas, como son: emulsificación, extracción, rompimiento de células biológicas, entre otras (Salazar, Chávez et al. 2010). Además, esta tecnología ofrece una ventaja en términos de productividad, rendimiento, disminución en el tiempo de procesamiento y mejoramiento de la calidad del producto (Salazar, Chávez et al. 2010, Awad, Moharram et al. 2012).

1.10.2 Fenómeno de cavitación

Varios efectos pueden ser generados por el ultrasonido de poder o ultrasonido de alta intensidad, tales como; calentamiento, turbulencia, agitación, fricción, inestabilidad superficial, entre otros. Aunque no todos los efectos involucrados en el ultrasonido de poder son conocidos o bien entendidos, en la industria alimentaria, la mayoría de ellos se atribuyen a un fenómeno muy complejo conocido como cavitación (Salazar, Chávez et al. 2010). La cavitación, es un fenómeno físico importante que implica una formación, crecimiento e implosión de una cavidad o burbuja en el líquido. Entonces, cuando a un líquido se le aplica ultrasonido de alta intensidad, está sujeto a ondas de sonido que se propagan a través del mismo, comprimiendo y expandiendo las moléculas presentes. Los ciclos de compresión empujan a las moléculas una a la otra para acercarlas lo más posible, mientras que los ciclos de expansión las separan. A un nivel de poder lo suficientemente alto, los ciclos de expansión pueden llegar a exceder las fuerzas de atracción entre las moléculas del líquido, formando una burbuja o cavidad (Sillanpää, Pham et al. 2011).

Tales burbujas crecen por un proceso conocido como difusión rectificada, es decir, pequeñas cantidades de vapor o gas presentes en el medio, entran a la burbuja durante el ciclo de expansión, pero no todo el vapor o gas es expulsado por completo durante el ciclo de compresión, por lo que el tamaño de la burbuja aumenta por cada ciclo de compresión y expansión que sufre. Las burbujas, distribuidas por todo el líquido, crecen en el período de unos pocos ciclos hasta alcanzar un tamaño crítico que les permite estar en equilibrio con la frecuencia ultrasónica aplicada, es decir, los ciclos de expansión generados a esta frecuencia llegan a un punto en el cual no tienen la energía suficiente para seguir excediendo las fuerzas de atracción entre las moléculas del líquido. Si las burbujas están sujetas a una frecuencia ultrasónica uniforme, estas permanecen oscilantes, sin embargo, la frecuencia que influye en una burbuja entre las miles generados no es uniforme, por lo que la burbuja de cavitación se vuelve inestable bajo las variaciones de energía aplicada por los ciclos de compresión y expansión, por lo que colapsa (Figura 7) (Mason, Riera et al. 2005).

Según Soria y Villamiel (2010) el colapso de la burbuja, denominado como hot spot, es capaz de acumular energía que puede generar temperaturas de $4,727^{\circ}\text{C}$ y una presión de 1,000 atmosferas. Condiciones que producen fuertes corrientes de micro-transmisión y ondas de cizalla en la zona de cavitación, alterando las características del medio. Sin embargo, Salazar y colaboradores (2010) mencionan que el calor generado es transiente y muy localizado, es decir, el aumento de la temperatura es relativamente bajo, de alrededor de 5°C . En la literatura, Sillanpää y colaboradores (2011) reportaron que el modelo hot spot comprende tres regiones (Figura 8): (1) un núcleo gaseoso caliente, (2) una región interfacial y (3) una solución madre a temperatura ambiente. Reacciones que implican a radicales libres pueden producirse dentro de la burbuja colapsada, en la interface de la burbuja y en el líquido circundante.

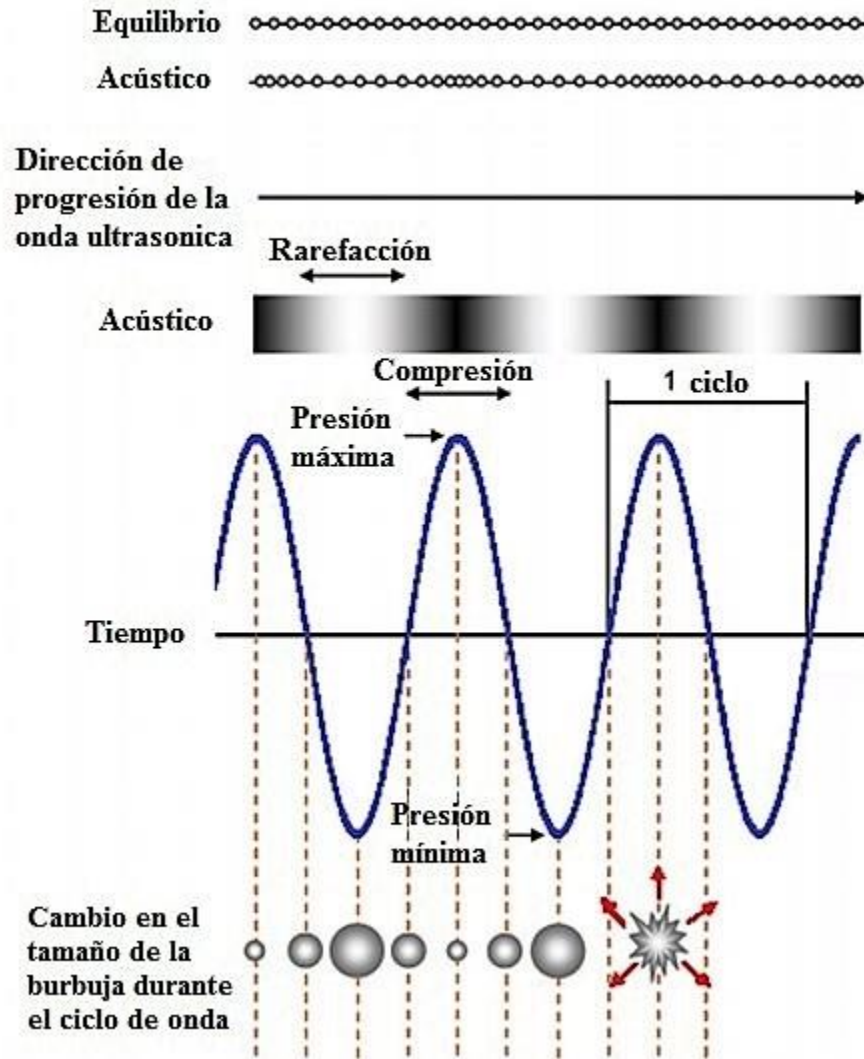


Figura 7 Formación, desarrollo y colapso de la cavidad o burbuja que se genera en el medio irradiado por ultrasonido de alta intensidad (Soria and Villamiel 2010).

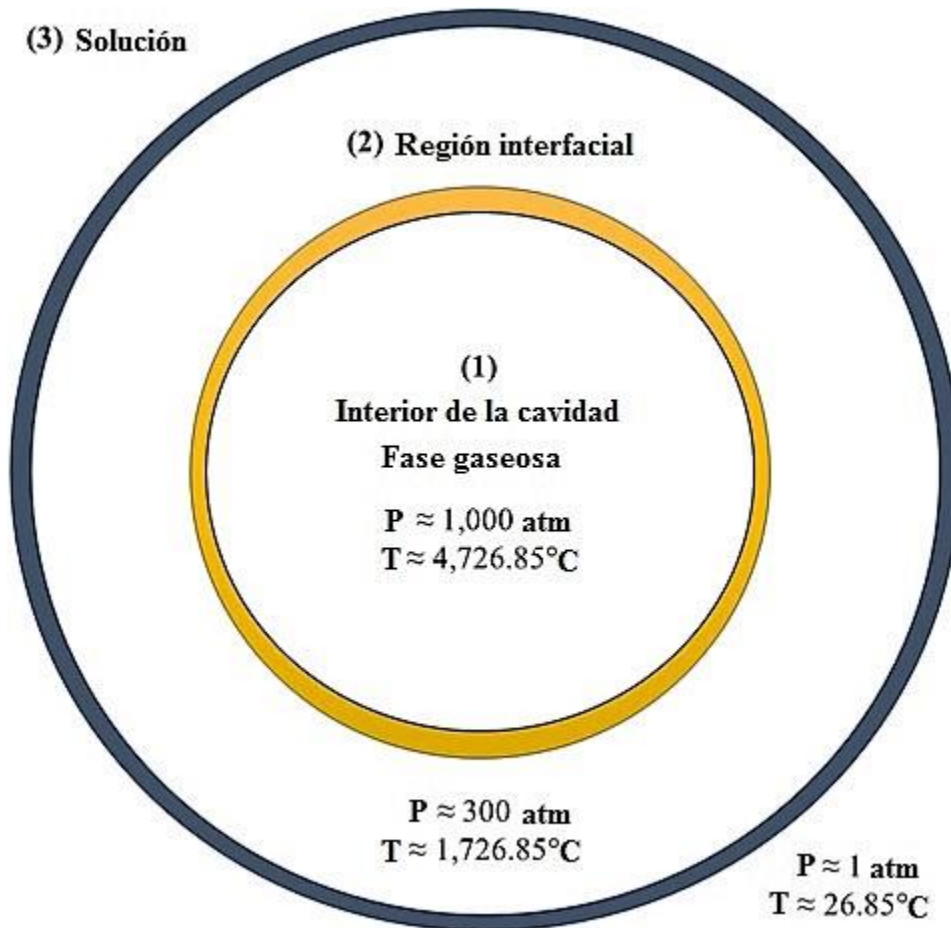


Figura 8 Ilustración esquemática de las zonas de reacción producidas durante el proceso de cavitación (Sillanpää, Pham et al. 2011).

En el centro de la burbuja, altas temperaturas y presiones generadas durante el crecimiento de la burbuja de cavitación, proporcionan la energía de activación requerida para la ruptura de enlaces, disociación de solventes y vapores (o gases), conduciendo a la formación de radicales libres o especies excitadas. Los radicales libres generados pueden reaccionar entre sí para formar nuevas moléculas y radicales o difundirse en el líquido madre para servir como oxidantes. El segundo sitio de reacción tiene lugar en el líquido que rodea la cavidad colapsada, en la cual se ha estimado una temperatura de aproximadamente 1,727°C durante la implosión de la cavidad. En esta capa de solvente que rodea la burbuja caliente, se producen reacciones de combustión y radicales libres (iones hidroxilo son generados a partir de la descomposición del agua (Soria and Villamiel 2010)). Estas reacciones son comparables a las reacciones de pirólisis, las cuales son predominantes en la región interfacial a concentraciones altas de soluto, por el contrario, reacciones de radicales libres son comúnmente predominantes. Ha sido demostrado que la mayoría de la degradación tiene lugar en la interface de la burbuja madre (Sillanpää, Pham et al. 2011).

1.10.3 Transferencia de energía

La propagación de la energía ultrasónica requiere un medio material, no puede tener lugar en el espacio vacío. Una fuente de ultrasonido en contacto con un medio, transfiere la perturbación mecánica al medio, iniciando vibraciones en las partículas del medio. Una partícula puede ser conceptualizada como la representación de un volumen muy pequeño de la materia dentro del medio, en el que todos los átomos contenidos en ese volumen responden al estímulo físico. Una partícula que vibra, lleva a cabo un movimiento de vaivén microscópico alrededor de su posición media dentro del medio (Tole 2005).

A través de estos pequeños movimientos de vibración, partículas vecinas se ven afectadas de manera similar, poniéndose en marcha por la transferencia directa de la energía de una partícula a otra. Ya que cada partícula vibratoria transfiere energía a sus vecinos inmediatos, la mayor parte del medio es impregnado rápidamente por las vibraciones mecánicas. En efecto, la energía ultrasónica es propagada a través del medio. Esto es importante para entender que la propagación de la energía ultrasónica no implica la migración real de partículas a través del medio: las partículas simplemente oscilan alrededor de sus posiciones medias (Tole 2005).

1.10.4 Ondas de presión

Los movimientos mecánicos de una fuente de ultrasonido pueden ser comparados con la acción de un pistón moviéndose rápidamente en un espacio confinado. En dirección hacia adelante, el pistón comprime el medio de partículas frente a él, aumentando en el medio la concentración de partículas por unidad de volumen, por lo tanto, la creación de una presión mayor. Esto se conoce como la fase de compresión, algunas veces también llamada como la fase de condensación. Cuando el pistón se mueve en la dirección contraria, el medio de partículas es descomprimido, dando lugar a una fase de baja presión, conocida como rarefacción. Por lo tanto, el movimiento periódico del pistón crea ondas de presión frente a él, alternando entre alta y baja presión. Similarmente, las vibraciones mecánicas de una fuente de ultrasonido crean fases alternadas de compresión y rarefacción en las partículas del medio con el que se está en contacto. Estas variaciones de presión se propagan a través del medio de transmisión (Figura 9), donde las líneas apretadas representan la fase de compresión, mientras que las regiones de una línea representan la rarefacción (Tole 2005).

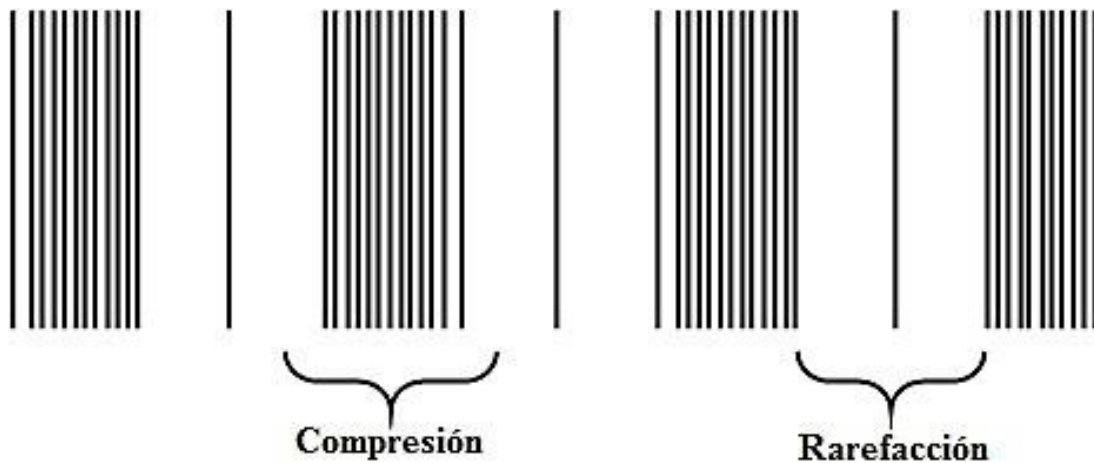


Figura 9 Ilustración de las variaciones de presión en la propagación de ultrasonido. Las líneas representan el grado de compresión y descompresión de las partículas del medio (Tole 2005).

1.10.5 Propagación longitudinal

En la propagación del ultrasonido, la dirección del desplazamiento de las partículas del medio, usualmente, es la misma que la dirección de la fuente de ultrasonido. Por lo tanto, podemos decir que la onda ultrasónica se propaga en la misma dirección que la perturbación. Tales ondas son llamadas ondas longitudinales (Figura 10). Cuando la propagación de la onda se lleva a cabo en una dirección que es perpendicular a la de la perturbación, entonces la onda es referida como una onda transversal. Aunque el ultrasonido es usualmente propagado como ondas longitudinales (Tole 2005).

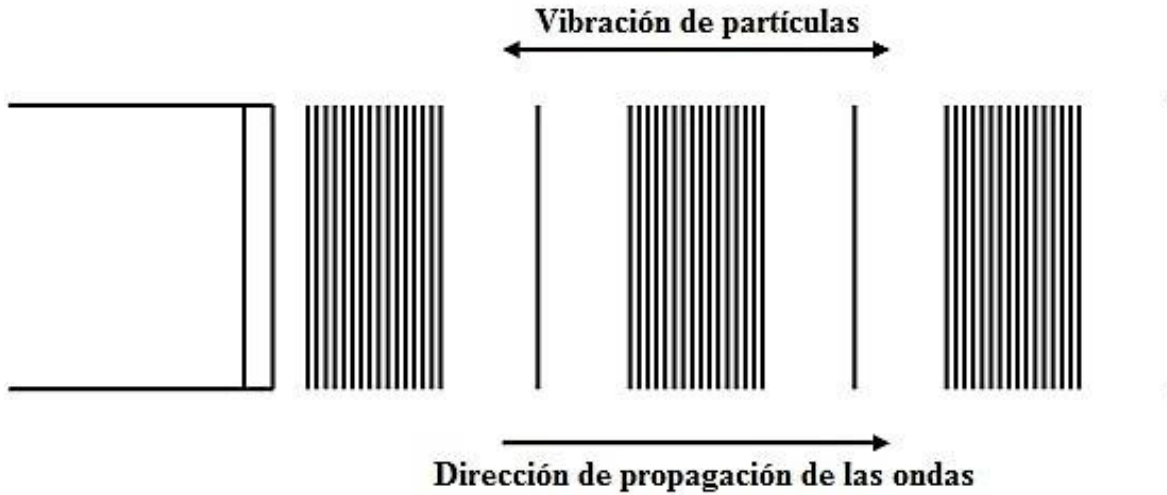


Figura 10 Representación de la dirección de propagación de las ondas en función de la orientación de la fuente vibratoria. (Tole 2005).

1.10.6 Parámetros de onda simple

Los movimientos periódicos de las partículas del medio sobre sus posiciones medias y las correspondientes fluctuaciones en la presión, pueden ser convenientemente representadas como una curva sinusoidal (Figura 11). La forma de onda sinusoidal se caracteriza por los parámetros de onda; amplitud y longitud de onda. La amplitud, es la magnitud del desplazamiento de la partícula a partir de su posición media en ese momento en particular. El pico de la amplitud representa el desplazamiento máximo de la partícula, esto corresponde al cambio máximo en la presión y además representa el vigor de las vibraciones, las cuales, se relacionan con la intensidad del ultrasonido (Tole 2005).

Cuando se gráfica la amplitud contra la distancia, la longitud de onda va a estar dada por la distancia entre dos posiciones consecutivas de la onda sinusoidal correspondiente, lo que se traduce en la distancia recorrida por la onda de presión durante un ciclo de onda completo (Figura 11). Cada ciclo de onda completo es atribuido a una vibración de la fuente, el número de vibraciones por unidad de tiempo es llamado frecuencia de vibraciones, parámetro que representa el número de veces en que la onda sonora es repetida por unidad de tiempo. Por lo tanto, el producto tanto de la longitud de onda como de la frecuencia, es la distancia total recorrida por la onda en el tiempo, en otras palabras, la velocidad de la onda. En la Figura 11, la amplitud esta graficada contra el tiempo, el periodo de la onda sería mostrado como el tiempo requerido para un ciclo de onda completo, por lo que el periodo de la onda es igual al recíproco de la frecuencia (Tole 2005).

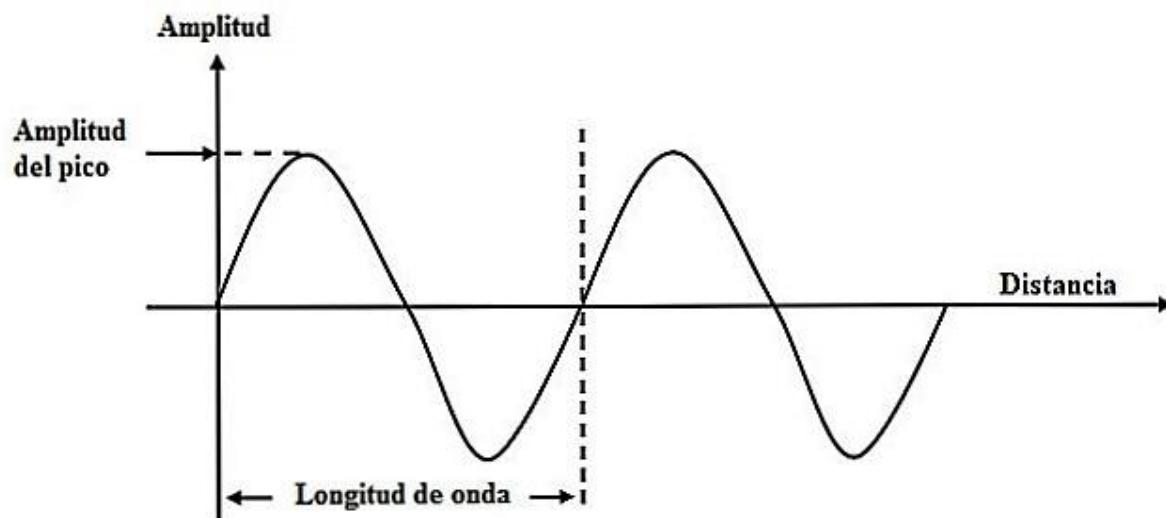


Figura 11 Representación del comportamiento que sufren las partículas del medio al someterse en la dirección de la onda ultrasónica, la cual se representa como una curva sinusoidal (Tole 2005).

1.10.7 Generación de ultrasonido

La forma más aplicada para generar ultrasonido, se lleva a cabo bajo el principio del transformador electrostrictivo. Esto se basa en la deformación elástica de materiales ferroeléctricos dentro de un campo eléctrico de alta frecuencia causado por la atracción mutua de las moléculas polarizadas en el campo. Para la polarización de las moléculas, una corriente alterna de alta frecuencia será transmitida a través de dos electrodos al material ferroeléctrico. Después de la conversión en oscilaciones mecánicas, las ondas de sonido serán transmitidas a un amplificador, el sonido se irradia al sonotrodo y finalmente al medio de tratamiento (Knorr, Zenker et al. 2004).

Un suministro de energía ultrasónica convierte el voltaje de línea de 50/60 Hz a una energía eléctrica de alta frecuencia, la cual es transmitida a un transductor piezoeléctrico dentro del convertidor, donde es cambiada a vibraciones mecánicas. Hay tres tipos de transductores ultrasónicos en uso común, incluidos los transductores de líquido conducido, transductores magnetostrictivos y transductores piezoeléctricos. Estos últimos son los dispositivos más comúnmente empleados para la generación de ultrasonido y pueden ser usados en toda la gama de frecuencias ultrasónicas. Materiales piezoeléctricos, tales como el titanato de bario o metaniobato de plomo se expanden y contraen en campos eléctricos alternos, generando ondas ultrasónicas. Los elementos piezoeléctricos comúnmente utilizados en los transductores ultrasónicos son potencialmente frágiles por lo que es una práctica normal sujetarlos entre bloques de metal (conductores frontal y posterior) (Muthukumarappan, Tiwari et al. 2010).

1.10.8 Fenómeno piezoeléctrico

Aunque un número de métodos diferentes están disponibles para la producción de vibraciones mecánicas de alta frecuencia, el método más común se basa en un fenómeno llamado efecto piezoeléctrico. Este fenómeno es mostrado por algunos materiales cristalinos, e implica la conversión reversible de dos formas de energía, las cuales son: energía mecánica y eléctrica. Cuando los cristales de materiales piezoeléctricos son comprimidos o estirados (es decir, cuando se aplica tensión mecánica sobre ellos), una carga eléctrica aparecerá sobre sus superficies, este proceso es llamado efecto piezoeléctrico. En la Figura 12 se muestra este efecto, y también muestra que la polaridad de la carga superficial inducida se invierte entre la compresión y estiramiento. Cuando una diferencia de potencial es aplicada entre las caras de un cristal piezoeléctrico, el cristal responderá por expandirse o contraerse, la energía eléctrica ha sido convertida a energía mecánica (Tole 2005).

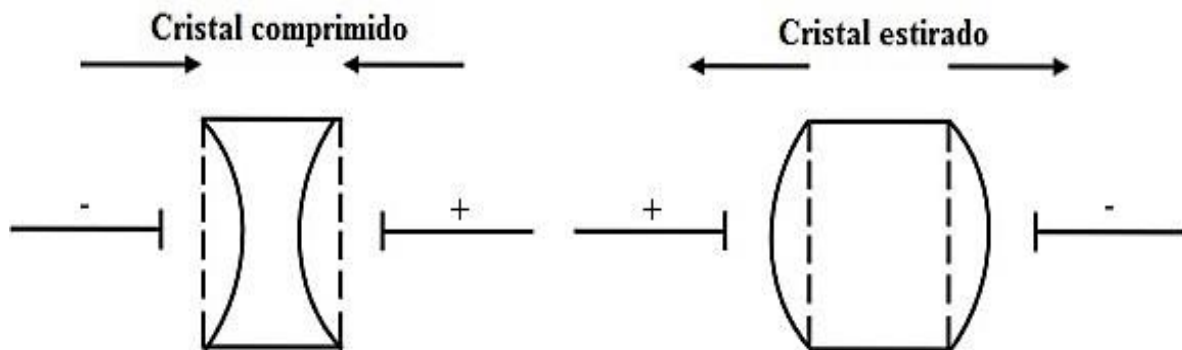


Figura 12 Deformación de un material piezoeléctrico debido a la aplicación de diferentes intensidades de corriente eléctrica. Estas deformaciones generan la vibración (Tole 2005).

1.11 Antecedentes sobre la extracción de colágeno por medio de ultrasonido

Actualmente, hay un creciente interés respecto a los procesos de extracción del colágeno, debido a la creciente tendencia en el uso de esta proteína por parte de la industria en lugar de agentes sintéticos. El colágeno puede ser obtenido mediante una hidrólisis ácida o enzimática. Debido a la naturaleza de los enlaces cruzados de la molécula de colágeno, esta se disuelve muy lentamente incluso en agua hirviendo. Como resultado, un ligero tratamiento químico es necesario para romper estos enlaces antes de la extracción. Por lo tanto, ácidos diluidos y bases son empleadas para hidrolizar parcialmente las moléculas de colágeno sin comprometer su estructura de triple hélice (Prestes 2013).

El método de extracción ácido modifica la estructura de conformación del colágeno de tal manera que la piel se hincha de dos a tres veces su volumen inicial. Así mismo, enlaces inter- e intra-moleculares son escindidos. Por otra parte, el proceso alcalino es utilizado principalmente para remover proteínas no colágenas. En un estudio por Liu y colaboradores (2015), demostraron el efecto del pre-tratamiento alcalino sobre la extracción de colágeno soluble en ácido a partir de la piel de la carpa china (*Ctenopharyngodon idella*). Ellos encontraron que a una concentración de 0.05 y 0.1 M de NaOH, las proteínas no colágenas son removidas efectivamente sin comprometer el rendimiento de extracción de colágeno. Sin embargo, a una concentración de 0.2 y 0.5 M de NaOH se ve afectado el rendimiento de extracción y la conformación estructural de la molécula de colágeno.

En la hidrólisis enzimática, la materia prima es sometida a un pre-tratamiento ácido (ácido acético 0.5 M) el cual contiene una enzima tal como la pepsina. Después, la mezcla es agitada continuamente por 48 horas seguido de una filtración (Guimarães Martins, Vieira Costa et al. 2009). Finalmente, el filtrado es sometido a precipitación con ayuda de una solución salina (NaCl 2.6 M) y dializada (Martínez-Ortiz, Hernández-Fuentes et al. 2014). Este método de extracción puede influir en la longitud de las cadenas polipeptídicas, así como en las propiedades funcionales del colágeno tales como: la viscosidad, la solubilidad, la retención de agua y la capacidad de emulsificación. Esto varía de acuerdo a los parámetros de procesamiento (enzima, temperatura, tiempo y pH), el pre-tratamiento, el método de almacenamiento y las propiedades de la materia prima inicial (Karim and Bhat 2009).

Por lo que una hidrólisis parcial controlada de la estructura original permite obtener una distribución ideal respecto al peso molecular para una aplicación en específico (Schrieber and Gareis 2007). Este factor ha hecho hincapié en el uso de enzimas proteolíticas de origen animal o vegetal, tales como: tripsina, quimotripsina, pepsina, pronasa, alcalase, colagenasas, bromelina y papaína (Gómez-Lizárraga, Piña-Barba et al. 2011, Khan, Arshad et al. 2011) debido a que estas permiten controlar el grado de escisión de la biomolécula. A pesar del alto costo de la hidrólisis enzimática, el hecho de que este método de extracción resultada con los niveles más bajos de residuos, un mejor control del proceso y altos rendimientos, justifican el uso de enzimas.

Recientemente, la aplicación de ultrasónica en el proceso de extracción de colágeno tipo I a partir de diferentes materias primas ya ha sido reportada (Li, Mu et al. 2009, Kim, Kim et al. 2012, Kim, Kim et al. 2013, Ran and Wang 2014). Así mismo, se ha reportado un incremento en los rendimientos de extracción como una reducción en el tiempo de procesamiento (Tu, Huang et al. 2015). El ultrasonido es un proceso que utiliza la energía de las ondas de sonido las cuales son generadas a una frecuencia por encima del umbral de la audición humana (Chemat, Zill e et al. 2011). Los efectos del ultrasonido en un sistema líquido son debido al fenómeno conocido como cavitación (Hu, Fan et al. 2013).

En un estudio por Kim y colaboradores (2012), la extracción de colágeno a partir de la piel de la lubina japonesa (*Lateolabrax japonicus*) mostro un incremento en el rendimiento y reducción de en el tiempo de extracción después de haber recibido ultrasonido de alta intensidad a una frecuencia de 20 kHz en una solución de ácido acético. Adicionalmente, la extracción a partir del ultrasonido no altera la integridad estructural de la molécula de colágeno. Por otra parte, Li y colaboradores (2009) utilizaron el método de enzimático asistido por el ultrasonido de alta intensidad a una frecuencia de 40 kHz para extraer colágeno a partir del tendón bovino. Nuevamente, los resultados mostraron un incremento del 24% y una reducción en el tiempo de procesamiento debido a la apertura de las fibras por parte de la irradiación ultrasónica, lo que facilito la acción enzimática. No obstante, se requieren más estudios para evaluar el efecto del ultrasonido combinado con otros métodos, principalmente con una visión para su aplicación a nivel industrial (Schmidt, Dornelles et al. 2016).

2 JUSTIFICACIÓN

Tradicionalmente, el colágeno tipo I se obtiene a partir de la piel y huesos de vacas y cerdos. Sin embargo, debido a los brotes de encefalopatía espongiiforme bovina, encefalopatía espongiiforme transmisible y fiebre aftosa porcina, se ha generado incertidumbre por parte del consumidor hacia el colágeno tipo I de origen bovino y porcino, así como también a los productos derivados del mismo (Gelatina, gomitas, chicles, entre otros). Adicionalmente, el judaísmo e islam prohíben el consumo de cualquier producto relacionado con el cerdo, mientras que los hindúes no consumen productos relacionados con las vacas (Huang, Kuo et al. 2016). Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar fuentes alternativas de colágeno económicas y suficientes.

En los últimos 20 años, algunos animales acuáticos han proporcionado la materia prima (piel, escamas, vejiga natatoria, entre otros) para la extracción de colágeno tipo I debido a su alta disponibilidad y porque no presentan barreras religiosas o alguna enfermedad que cause ansiedad o incertidumbre al consumidor (Bilgen, Oktay et al. 1999, Nagai, Ogawa et al. 1999, Li, Wang et al. 2013). No obstante, el colágeno tipo I obtenido de estas fuentes de extracción, está destinado principalmente a la industria cosmética debido a su bajo contenido de hidroxiprolina (Muralidharan, Jeya Shakila et al. 2013). Es por ello que la piel de borrego puede ser una fuente atractiva de colágeno tipo I para la industria alimentaria debido a su alto contenido de hidroxiprolina, lo que se traduce en una mayor estabilidad térmica (Burjanadze 1979).

Adicionalmente, la piel de borrego es considerada como un sub-producto no comestible que no presenta alguna barrera religiosa o de salud y tiene una alta disponibilidad. Según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el estado de Hidalgo se reportan 351, 839 ovinos sacrificados, siendo superado por el estado de México con 402, 379 ovinos sacrificados (SIAP 2014). Generalmente, los sub-productos no comestibles son utilizados en la fabricación de fertilizantes o alimento para mascotas, sin embargo, actualmente hay un gran interés en estos sub-productos en virtud de que se pueden aislar minerales, ácidos grasos, vitaminas, hidrolizados de proteína y colágeno, los cuales son de alta importancia para la industria alimentaria (Schmidt, Dornelles et al. 2016).

Ha sido ampliamente reportado en la literatura, el uso de ácidos orgánicos (ácido acético, ácido cítrico y ácido láctico) para la extracción de colágeno, registrándose bajos rendimientos a comparación de los obtenidos por el método enzimático de extracción (Liu, Wei et al. 2015, Liu, Zhang et al. 2015). En los últimos años sea utilizado la irradiación ultrasónica para mejorar el rendimiento de extracción del colágeno tipo I debido a que esta tecnología mejora la transferencia de masa en el medio de extracción (Li, Mu et al. 2009). Además, el ultrasonido ha sido utilizado exitosamente en la extracción de colágeno, incrementando el rendimiento y disminuyendo el tiempo de procesamiento (Kim, Kim et al. 2012, Kim, Kim et al. 2013, Ran and Wang 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estandarizar el método de extracción de colágeno tipo I a partir de la piel de borrego como subproducto agroindustrial mediante el uso de ultrasonido de alta intensidad para su aplicación en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y biomédica.

3.2 Objetivos específicos

- Diseñar el protocolo de extracción del colágeno ovino tipo I por medio de ultrasonido, considerando el tiempo de exposición, temperatura, amplitud y número de pulsaciones.
- Caracterizar el biopolímero obtenido con base en sus propiedades térmicas (entalpía y temperatura de fusión), reológicas (viscosidad) y fisicoquímicas (peso molecular, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, punto isoeléctrico).

4 HIPÓTESIS

La extracción de colágeno asistida por ultrasonido de alta intensidad, genera un mayor rendimiento de colágeno en contraste al método de extracción convencional sin comprometer la calidad del mismo.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Para el proceso de extracción de colágeno tipo I se utilizaron pieles de borrego de la raza pelibuey en un estado de conservación salado. Estas fueron gentilmente donadas por un productor de barbacoa local en el municipio de Tulancingo de Bravo, estado de Hidalgo. Para la hidrólisis limitada de la molécula de colágeno tipo I, se utilizó pepsina de la mucosa gástrica porcina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA). Para el análisis electroforético se utilizó un marcador de peso molecular estándar (BenchMark™). Todos los demás reactivos como el ácido acético, cloruro de sodio entre otros, fueron de grado analítico.

5.2 Preparación de la piel de borrego

Se evaluó el estado de conservación de la piel al verificar que el pelo no se desprendiera con facilidad y que no presentara olores desagradables. Se eliminó la mayor parte del pelo mediante un proceso mecánico de rasurado, posteriormente, la piel fue sometida a un proceso de remojo con agua, desengrasante y tensoactivo, estos dos últimos en una concentración de 1 g/L. Lo anterior, con la finalidad de regresarle a la piel la humedad faltante y hacer más fácil la sustracción de los restos de carne y grasa durante el proceso de descarnar. La piel de borrego rasurada y descarnada se cortó en cuadrados de aproximadamente 1 cm² con ayuda de unas tijeras. Los trozos de piel se almacenaron en bolsas de polietileno a una temperatura de -18°C para su uso posterior.

5.3 Cinética de hinchamiento

Se prepararon 300 mL de ácido acético al 0.5 M y se mezclaron con 10 g de piel en trozos, esto se hizo tanto para los trozos de piel rasurados como para los trozos de piel sometidos a un pre-tratamiento alcalino (pelambre). Se registraron los cambios de peso durante el proceso de hinchamiento de la piel por diferentes periodos de tiempo con una diferencia de 10 minutos entre cada medición hasta completar un lapso de 3 horas. Una vez concluidas las mediciones, se procedió a realizar las gráficas de cinética de hinchamiento. Los tratamientos se realizaron por triplicado, el análisis estadístico se hizo con el software IBM® SPSS versión 20. Tanto el análisis de varianza como la evaluación entre las diferentes medias usando la prueba Tukey fueron determinadas con una confiabilidad del 95%.

5.4 Extracción de colágeno

El colágeno fue extraído siguiendo la metodología de Chuaychan y colaboradores (2015) con algunas modificaciones. Todo el procedimiento de extracción se realizó a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

5.4.1 Proceso de extracción enzimática convencional (EC)

Los trozos de piel descritos en la sección 5.2 se remojaron en una solución de ácido acético 0.5 M en una concentración sólido/solvente de 1:30 (p/v) y se aplicó agitación constante durante 3 horas de acuerdo a la cinética de hinchamiento realizada previamente. Después, se incorporó en la mezcla la pepsina en una concentración de 1 g/L y se dejó en agitación constante por 48 horas. Concluido el tiempo de agitación, la muestra fue filtrada con una manta doblada para separar la solución de colágeno de los remanentes sólidos que no fueron solubilizados, el filtrado se sometió a precipitación mediante la adición de una solución de cloruro de sodio 2.6 M. Posteriormente, se procedió a registrar el peso en base húmedo del colágeno insoluble para registrar el rendimiento. La muestra obtenida se re-solubilizó en una solución de ácido acético 0.5 M en una relación 1:30 con base en el peso registrado anteriormente. Finalmente, la solución resultante fue dializada y después liofilizada para su posterior caracterización.

5.4.2 Proceso de extracción enzimática asistido por ultrasonido de alta intensidad en piel rasurada (E-U-PR)

Para la realización de esta extracción, se realizó el mismo procedimiento de la sección 5.4.1 pero con la diferencia de que en este método de extracción se incorporó el uso del ultrasonido de alta intensidad antes de la adición de la enzima, de lo contrario, la enzima no tendría actividad alguna debido a la inactivación por el efecto de cavitación generado por el ultrasonido de alta intensidad (UAI). Los trozos de piel se remojaron en una solución de ácido acético 0.5 M en una concentración sólido/solvente de 1:30 (p/v) y se aplicó agitación constante durante 3 horas. Después, la mezcla se vertió en un vaso enchaquetado de 500 mL para recircular agua destilada fría (10°C), revisando la temperatura de manera constante.

Con el fin de evitar un sobrecalentamiento, el ultrasonido operó bajo el modo de pulsos. Posteriormente, se aplicó UAI a través de una sonda parcialmente inmersa en la muestra con la siguiente configuración en el equipo: frecuencia de 20 kHz, 80% de amplitud, pulsaciones de 50 segundos por cada 10 segundos de descanso, el tiempo de tratamiento se estandarizó a 40 minutos de exposición ultrasónica en cada una de las muestras. Al finalizar la irradiación ultrasónica, se agregó pepsina en una concentración de 1 g/L y se aplicó agitación constante por 48 horas. La muestra fue filtrada con una manta doblada para separar la solución de colágeno de los restos de pelo y otros remanentes sólidos que no fueron solubilizados. Después de la extracción, el colágeno en suspensión fue colectado de acuerdo al método descrito en la sección 5.4.1.

5.4.3 Proceso de extracción enzimática asistido por ultrasonido de alta intensidad en una piel con proceso de pelambre (E-U-PA).

Para la extracción de colágeno en este sistema, se realizaron los procedimientos descritos en la sección 5.4.2 con la diferencia de que la piel de borrego fue sometida a un previo proceso de pelambre de la siguiente manera: los trozos de piel previamente re-humectados y cortados se pesaron y este valor se tomó como base para la adición del 200% agua, 8% de hidróxido de calcio y el 4% de sulfuro de sodio. La piel duro en esta solución un tiempo de 24 horas para remover totalmente el pelo y epidermis. Una vez eliminados estos componentes, se realizó un lavado a fondo con agua destilada fría.

Posteriormente, se procedió a eliminar el exceso de materiales alcalinos remanentes en la piel mediante una solución con 200% de agua, 4% de sulfato de amonio y movimiento por 20 minutos para precipitar el hidróxido de calcio. Después, los trozos de piel sin hidróxido de calcio se sometieron en una solución con 200% de agua, 0.5% de tripsina y movimiento por 20 minutos con la finalidad de hidrolizar las proteínas interfibrilares no colágenas. Una vez realizado este acondicionamiento se procedió al proceso de extracción de acuerdo a las actividades realizadas en la sección 5.4.2.

5.5 Diálisis de colágeno

Las soluciones de colágeno (EC, E-U-PR y E-U-PA) fueron dializadas contra agua destilada a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) por un periodo de tres días hasta alcanzar un valor de pH de alrededor de 7. Se utilizó una membrana de diálisis marca Spectra/Por con un peso molecular de corte de 6-8 kDa.

5.6 Liofilización del colágeno

Las muestras previamente dializadas (EC, E-U-PR y E-U-PA) se vertieron en cajas Petri, las cuales se depositaron en un ultra-congelador a -70°C . Una vez alcanzada esta temperatura, las muestras se liofilizaron usando el equipo Labconco freezone 6 (Labconco Corp., Kansas City, USA).

5.7 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

El análisis térmico diferencial, es un método ampliamente utilizado en la ciencia de los polímeros para estudiar el comportamiento térmico de materiales que son sometidos a cambios físico y químicos tras un calentamiento (Mentink, Hendriks et al. 2002). Mediante el uso de la técnica de calorimetría de barrido diferencial, la temperatura de fusión (T_m) y entalpía de desnaturalización (ΔH) fueron calculadas. Estos parámetros son de gran importancia para la evaluación de la estabilidad térmica de este biopolímero (Sudharsan, Seedeve et al. 2013, Minh Thuy le, Okazaki et al. 2014).

La estabilidad térmica del colágeno ovino tipo I fue analizada por medio de un equipo DSC serie Q 2000 instrumentos TA, equipado con un sistema de enfriamiento refrigerado RCS90 y el software de análisis universal TA 2000. El instrumento fue calibrado previamente usando indio como metal estándar, las mediciones se efectuaron al mismo tiempo que las muestras se purgaban constantemente con nitrógeno de alta pureza a un flujo constante de 50 mL/min. Las muestras secas (EC, E-U-PR y E-U-PA) fueron pesadas (1 ± 0.1 mg) dentro de charolas de aluminio (instrumentos TA), selladas herméticamente y escaneadas en un intervalo de 25°C a 200°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Como referencia, una charola de aluminio vacía y sellada herméticamente fue utilizada. Tanto el valor de T_m como el de ΔH , fueron determinados por el software en base a los cambios endotérmicos registrados en el termograma.

Por otra parte, se determinó la estabilidad térmica de las muestras re-solubilizadas (EC, E-U-PR y E-U-PA) en ácido acético 0.5 M siguiendo la metodología de Kittiphattanabawon et al. (2005) con ligeras modificaciones. Se pesaron exactamente 100 mg de muestra liofilizada por cada tratamiento y se re-solubiliaron en 15 mL de ácido acético 0.5 M. Una vez homogenizadas, se tomaron 10 ± 0.2 mg y se vertieron en charolas de aluminio (instrumentos TA) para su posterior sellado hermético y escaneo térmico. Este último se realizó en un intervalo de 25°C a 60°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. El valor de T_m y ΔH fue calculado como se mencionó anteriormente.

5.8 Determinación del punto isoeléctrico (pI)

El punto isoeléctrico de los tres tratamientos (EC, E-U-PR y E-U-PA) fue obtenido con ayuda del equipo Zetasizer nano ZS90 acoplado al auto-titulador MPT-2 siguiendo la metodología de Kaewdang y colaboradores (2014) con algunas modificaciones. Este equipo calcula la potencial zeta mediante la determinación de la movilidad electroforética para después aplicar la ecuación de Henry. Así mismo, la movilidad electroforética es obtenida mediante la realización de una electroforesis en la muestra y midiendo la velocidad de las partículas usando velocimetría por láser doppler. A un cierto pH, el valor del potencial zeta en las partículas de la muestra se ve afectado. Entonces, a un intervalo de pH, la muestra presentara diferentes valores de potencial zeta. El punto donde la trama atraviesa la potencial zeta cero es llamado punto isoeléctrico.

Todas las muestras liofilizadas fueron acondicionadas de la siguiente manera: se pesaron 100 mg de cada una de ellas y se re-disolvieron en 15 mL de ácido acético al 0.5 mol/L. Después, se tomó una alícuota de 5 mL por cada muestra re-disuelta y se aforaron a 50 mL con agua destilada, estas muestras aforadas ahora son llamadas muestras listas y se requirió un volumen de 10 mL por cada una de ellas para la determinación del pI. El equipo fue configurado de acuerdo a las características del colágeno tipo I y se manejó un intervalo de pH de 3.5 a 9.5. Las muestras fueron contenidas en una celda DTS1070 donde fue medido el potencial zeta a distintos pH, los cuales fueron alcanzados con ayuda de tres soluciones buffer de hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración de 1 mol/L, 0.75 mol/L y 0.5 mol/L.

5.9 Determinación del peso molecular SDS-PAGE

Para la determinación del peso molecular por medio de las muestras EC, E-U-PR y E-U-PA se utilizó la técnica de electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970) pero con algunas modificaciones. Todas las muestras de colágeno fueron mezcladas con el buffer de muestra y desnaturalizadas a baño maría a 90°C por un lapso de tiempo de dos minutos. Se trabajó con un sistema de electroforesis vertical DSASU-400 (C.B.S. Scientific Company, Inc.), un gel de apilamiento y de resolución a una concentración del 4% y 7.5% respectivamente. Se utilizaron 20 µL de muestra desnaturalizada, así como 15 µL del marcador de peso molecular (BenchMark™). El proceso de electroforesis se realizó a un potencial eléctrico constante (136 Voltios), el cual fue aplicado por la fuente de alimentación ENDURO 300 V (Labnet International, Inc.) durante 12 horas. Concluido el proceso de electroforesis, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie R-250 (metanol al 50% (v/v), ácido acético al 10% (v/v) y azul de Coomassie al 0.05% (p/v)) por 3 horas y desteñidos con una mezcla de ácido acético al 7.5% (v/v) y metanol al 5% (v/v).

5.10 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de absorción por la técnica de FT-IR a partir de las muestras liofilizadas (EC, E-U-PR y E-U-PA) fueron obtenidos por el equipo Frontier FT-MIR (Perkin Elmer) equipado con reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Se trabajó en un intervalo de medición de 380 a 4,000 cm^{-1} y a temperatura ambiente. Las señales automáticas fueron recolectadas en 3,620 scans a una resolución de 1 cm^{-1} y digitalizadas con el software spectrum 10.

5.11 Determinación de viscosidad

Se midió la viscosidad a partir de colágeno rehidratado de acuerdo a la metodología de Yu y colaboradores (2014) con algunas modificaciones. Se utilizaron 100 mg de muestra liofilizada (EC, E-U-PR y E-U-PA) disuelta en 25 mL de ácido acético al 0.5 M y acondicionada a una temperatura de 7°C. Así mismo, se utilizó el viscosímetro (Brookfield) modelo RTV (U.S.A.) el cual trabajo con una geometría del No.5 a una velocidad de 100 rpm. El valor de viscosidad fue leído y reportado en términos de centipoise (cP).

5.12 Determinación del rendimiento de extracción

El rendimiento obtenido a partir de los diferentes tratamientos (EC, E-U-PR y E-U-PA) fue calculado en base al peso seco de los trozos de piel vírgenes, utilizando la ecuación siguiente ecuación (Sinthusamran, Benjakul et al. 2013).

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Peso del colágeno liofilizado (g)}}{\text{Peso de la piel seca inicial (g)}} \times 100$$

6 RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Cinética de hinchamiento

El hinchamiento de los trozos de piel de borrego por acción de una solución de ácido acético 0.5 M, es la etapa principal en la extracción de colágeno. Con el objetivo de conocer el tiempo máximo de hinchamiento de los trozos de piel, se elaboró una cinética de hinchamiento (Figura 13). El experimento se basó en la relación que existe entre el incremento de peso ganado expresado en porcentaje (%) y el tiempo en el cual el ácido acético interactúa con las moléculas de colágeno presentes en cada trozo de piel. La Figura 13a) ilustra el porcentaje de peso ganado por parte de los trozos de piel que fueron previamente sometidos a un pre-tratamiento alcalino, mientras que los resultados de la Figura 13b) se obtuvieron con trozos de piel previamente rasurados.

Se observó en ambos tratamientos un crecimiento significativo en el peso ganado ($P < 0.05$) por parte de los trozos de piel de borrego conforme aumentaba el tiempo de inmersión en la solución de ácido acético 0.5 M hasta que se alcanzó un punto, alrededor de los 170 minutos, en el que las moléculas de agua ya no interactuaron con las moléculas de colágeno vía puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. De tal manera que no fue necesario alargar más el tiempo de inmersión debido a que el porcentaje de peso ganado no fue significativo después de los 170 minutos.

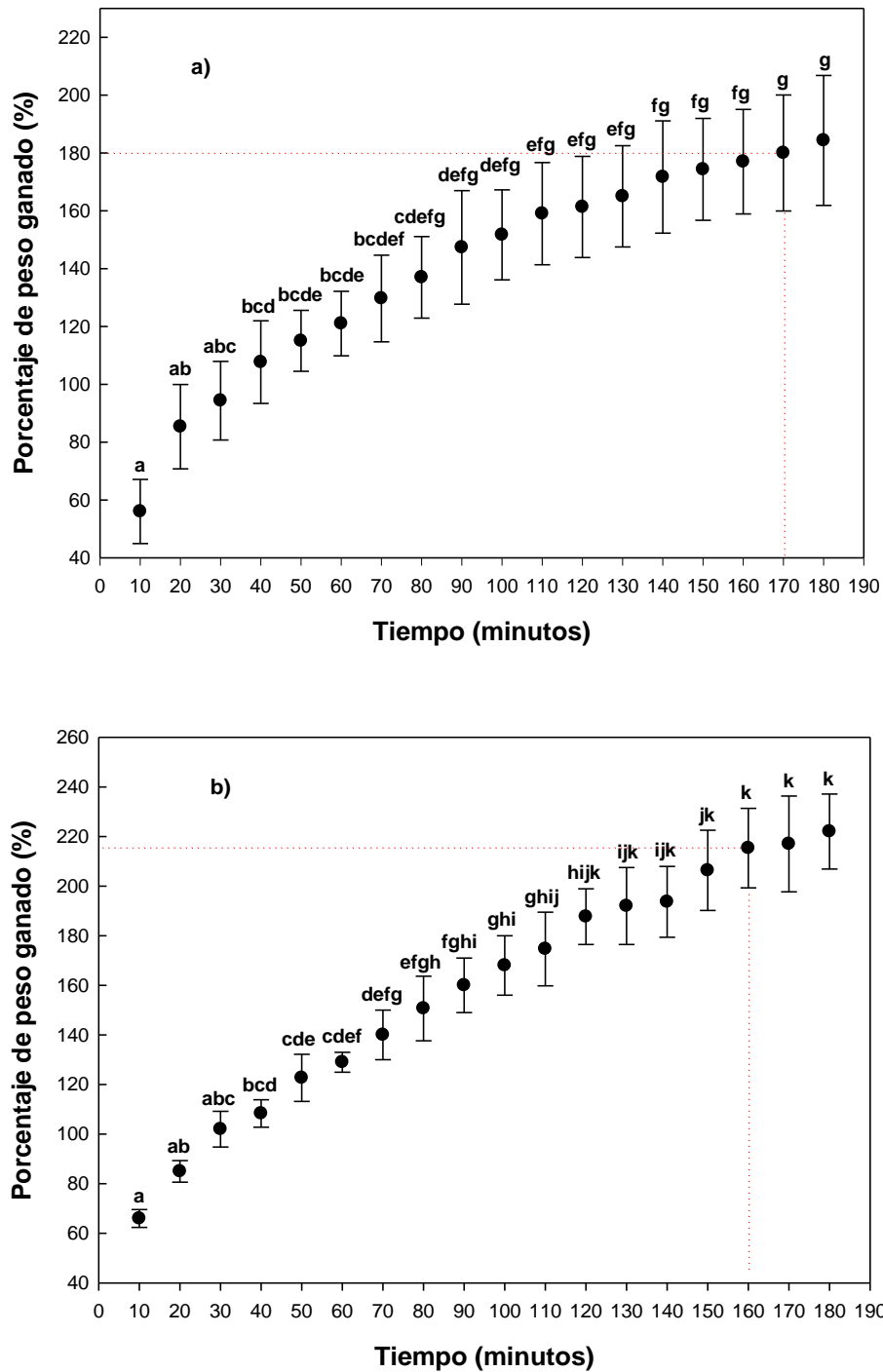


Figura 13 Cinética de hinchamiento a partir de los trozos de piel con pre-tratamiento alcalino (a) y previamente rasurados (b). Letras diferentes representan valores significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Sin embargo, la ganancia de peso no fue la misma en virtud de que los máximos porcentajes de peso ganado fueron de 180% y 218% para los trozos de piel con un proceso alcalino previo y para la muestra rasurada, respectivamente. Esta reducción en el porcentaje del peso ganado podría ser atribuido a la solubilización del colágeno durante el pre-tratamiento alcalino. Así mismo, se conoce que el colágeno sufre un proceso de deamidación (Gustavson 1956) al ser sometido a un medio alcalino provocando que los aminoácidos asparagina y glutamina se conviertan en ácido aspártico y ácido glutámico respectivamente, aumentando con ello la cantidad de grupos carboxilo los cuales podrían enlazar moléculas de agua presentes en el medio vía puentes de hidrógeno. El agua al ser una molécula dipolar, se incorpora a la proteína por acción de fuerzas polares mediante su asociación en los lugares geométricos de los péptidos liberados por la contracción de las cadenas, aumentando el volumen de la piel (Gustavson 1956, Gómez-Lizárraga, Piña-Barba et al. 2011).

Estos resultados concuerdan con los trabajos realizados por Liu y colaboradores (2015), ellos encontraron una pérdida importante de colágeno durante el pre-tratamiento alcalino de la piel de la carpa china con NaOH a una concentración 0.5 M. Sin embargo, a una concentración de 0.05 M de NaOH se alcanzó un hinchamiento significativo por parte de los trozos de piel de la carpa china durante el pre-tratamiento. Lo anterior, facilita la extracción ácida al promover la transferencia de masa en la matriz del tejido.

6.2 Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Para la evaluación de la estabilidad térmica del colágeno, se trabajó con muestras en estado seco y rehidratadas. Respecto a las muestras secas, estas fueron acondicionadas por un periodo de siete días dentro de una cámara hermética que contenía pentaóxido de difósforo (P_2O_5) como agente desecador. Lo anterior, con el objetivo de equilibrar las muestras a una humedad final del 0.7% en base seca. Una vez acondicionadas, se depositó 1 ± 0.1 mg por cada muestra (EC, E-U-PR y E-U-PA) en una charola de aluminio pequeña (instrumentos TA), la cual fue cerrada herméticamente para su posterior evaluación térmica. Las condiciones de escaneo se describieron en la sección 5.7. Por otra parte, la preparación de las muestras rehidratadas se realizó a una concentración de 100 mg de colágeno liofilizado en 15 mL de ácido acético 0.5 M. Adicionalmente, se requirió de 10 ± 0.2 mg por cada muestra rehidratada dentro de las charolas de aluminio para su posterior sellado hermético y evaluación térmica.

En la Figura 14 se observan los termogramas de las tres muestras secas evaluadas. Todas presentaron un solo evento térmico a una temperatura de fusión (T_m) entre $93^\circ C$ y $112^\circ C$. Entendiéndose por T_m como la temperatura a la cual la estructura de triple hélice del colágeno cambia a una estructura desorganizada y amorfa (Sudharsan, Seedeve et al. 2013). Los tratamientos que fueron sometidos a ultrasonido (E-U-PR y E-U-PA) presentaron un evento térmico más definido sugiriendo una distribución molecular más homogénea, lo cual se atribuye a una mejor difusión enzimática hacia el interior de la estructura fibrilar previamente abierta por las ondas de choque generadas durante la cavitación ultrasónica mejorando el proceso de hidrólisis y rendimiento de extracción (Li, Mu et al. 2009).

Analizando el comportamiento térmico de la muestra EC, esta presentó una curva más extendida y menos pronunciada sugiriendo que el proceso de hidrólisis fue menos localizado en las regiones telopeptídicas de tal manera que se produjo una distribución molecular menos uniforme a comparación de las reportadas por las muestras que recibieron irradiación ultrasónica tales como: E-U-PR y E-U-PA (Gabbott 2008). Estos resultados son congruentes con los reportados por Duraipandy y colaboradores (2015) en donde encontraron un evento térmico similar en forma y amplitud de la curva del termograma. Ellos trabajaron con tres tratamientos de películas; una fue elaborada con colágeno nativo, otra con colágeno entrecruzado con nano partículas de plata y la última con colágeno entrecruzado con glutaraldehído. A todas las películas se les determinaron las propiedades térmicas usando el equipo DSC Q200. Ellos manejaron un intervalo de calentamiento de 20°C a 300°C con una velocidad de calentamiento de 5°C/min. Adicionalmente, ellos trabajaron con charolas de aluminio y utilizaron 3 mg de muestra por cada tratamiento.

En la Tabla 1 se puede observar que la muestra EC mostro diferencias significativas ($P < 0.05$) en su valor de ΔH debido a la amplia distribución de pesos moleculares y esta distribución se investigó por medio de la técnica SDS-PAGE (ver sección 6.4).

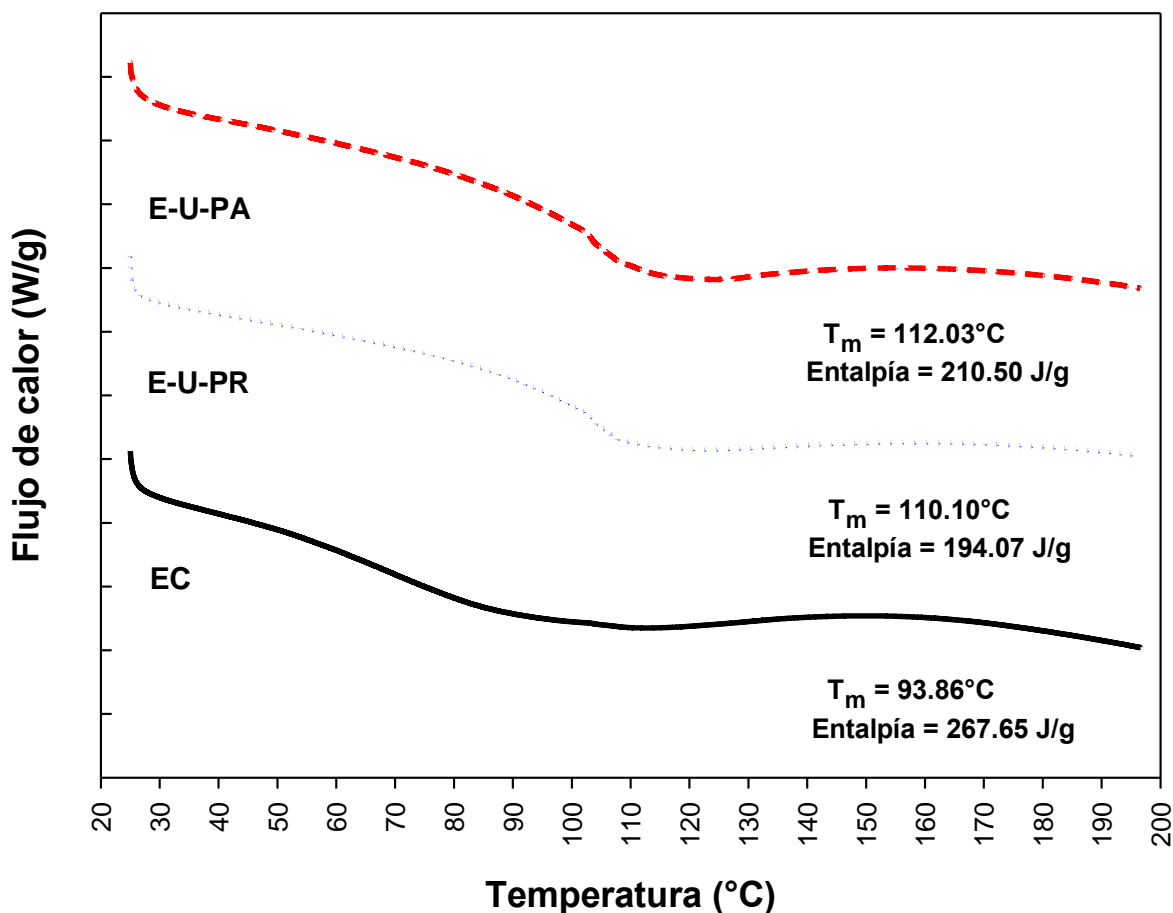


Figura 14 Termogramas de las muestras secas (EC, E-U-PR y E-U-PA) con un contenido de humedad del 0.7% en base seca corridas en un intervalo de temperatura que va de los 25°C a 200°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

Tabla 1 Temperatura de fusión (T_m) y entalpía (ΔH) de las diferentes muestras secas (EC, E-U-PR y E-U-PA) de colágeno ovino tipo I.

Muestras	Entalpía (ΔH)	Temperatura de fusión (T_m)
E-U-PA	210.50 \pm 24.50 J/g ab	112.03 \pm 3.65°C b
E-U-PR	194.07 \pm 33.44 J/g a	110.10 \pm 2.68°C b
EC	267.65 \pm 9.95 J/g b	93.86 \pm 1.19°C a
Letras diferentes representan valores significativamente diferentes ($P < 0.05$) en cada columna.		

Por otra parte, en la Figura 15 se presentan los termogramas de las tres muestras rehidratadas. Ambas muestras presentaron valores de T_m y ΔH similares sugiriendo que la estructura de triple hélice fue predominante en las moléculas de colágeno aún después de haber recibido ultrasonido de alta intensidad. Estos resultados son congruentes con aquellos encontrados en otras especies tales como becerro (40.8°C) y cerdo (37°C) (Veeruraj, Arumugam et al. 2013, Wu, Wang et al. 2014). Adicionalmente, el notorio desplazamiento de la T_m hacia una temperatura menor por parte de las muestras rehidratadas es atribuido al efecto plastificante del agua (Slade and Levine 1993, Nazhat 2008, Roos 2008).

Como un ejemplo del efecto plastificante del agua se tiene que la muestra EC en estado seco presentó un valor de T_m de alrededor de 94°C el cual se desplazó a una temperatura de 40°C cuando esta fue rehidratada debido a que las moléculas de agua rompen los puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura de triple hélice del colágeno, reduciendo la energía de cohesión entre las cadenas alfa y provocando así la desnaturalización de la molécula del colágeno (Batzer and Kriebich 1981). El mismo comportamiento fue encontrado por Bigi y colaboradores (1987) que trabajaron con colágeno tipo I obtenido a partir del tendón de la cola de rata Wistar.

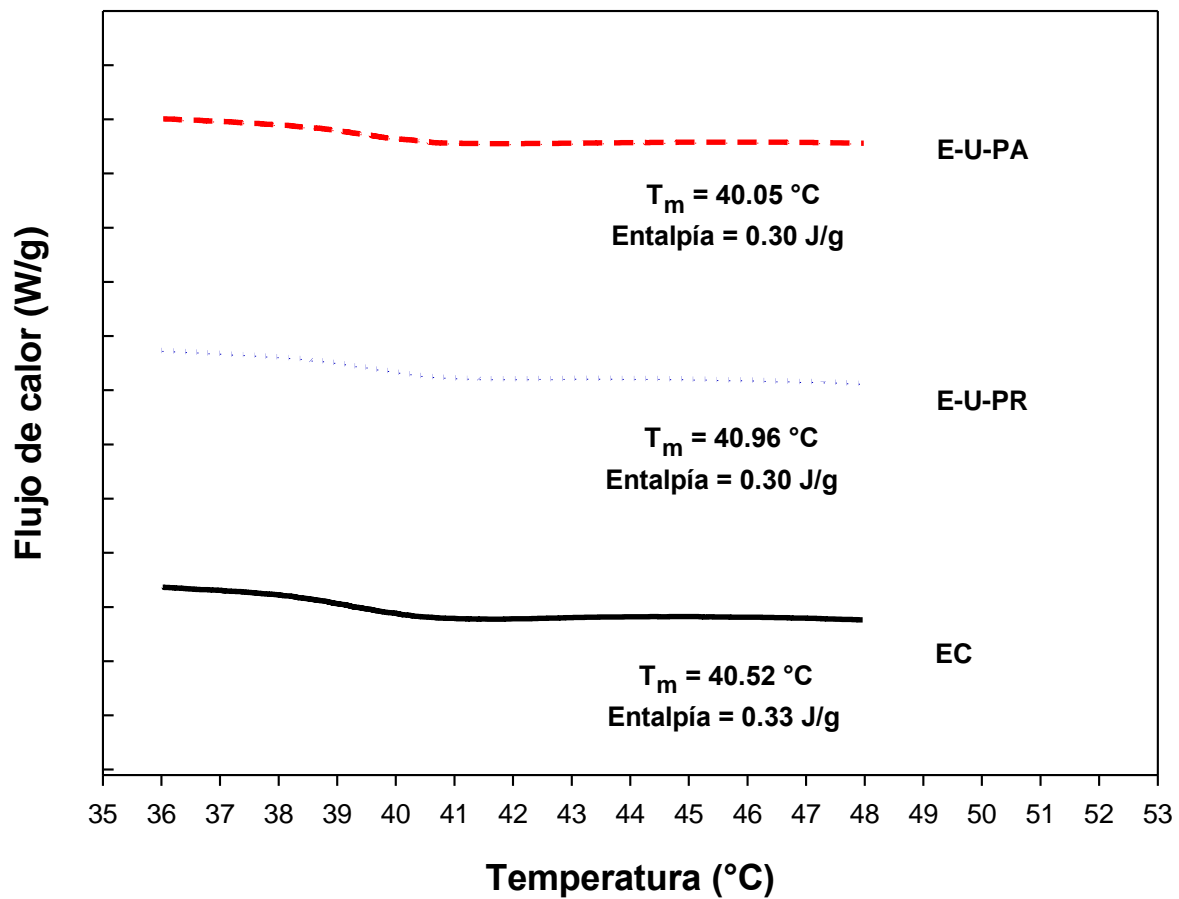


Figura 15 Ampliación de los termogramas de DSC obtenidos a partir de las muestras rehidratadas (EC, E-U-PR y E-U-PA). Escaneadas de 25°C a 60°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

6.3 Determinación del punto isoelectrico (pI)

Para la obtención del punto isoelectrico se utilizó el equipo Zetasizer-nano ZS90 acoplado a un titulador MPT-2 con los cuales se mide el potencial Z en función del pH. Entendiéndose por el potencial Z como una medida de la magnitud electrostática de repulsión originada en el límite de la capa difusa que rodea la partícula. El acondicionamiento de las muestras liofilizadas se describió en la sección 5.8. Todas las muestras de colágeno ovino tipo I (EC, E-U-PR y E-U-PA) fueron sometidas a un pH inicial de 3.5 y llevadas a un pH final de 9.5. El pH en el que la magnitud electrostática de repulsión fue cero, se interpretó como punto isoelectrico (Sinthusamran, Benjakul et al. 2013, Kaewdang, Benjakul et al. 2014, Chen, Li et al. 2016).

En la Figura 16 se observa que el punto isoelectrico de la muestra EC se encontró a un pH de 8.87, mientras que para las muestras E-U-PR y E-U-PA el punto isoelectrico se registró a un pH de 8.85 y 8.32 respectivamente. Estadísticamente, los valores de pI registrados por las muestras EC y E-U-PR no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$), sin embargo, el valor de pI registrado por la muestra E-U-PA difiere significativamente ($P < 0.05$) de los demás sugiriendo que el proceso alcalino modificó la estructura del colágeno. Lo anterior es atribuido a un proceso conocido como deamidación, el cual es producido cuando las moléculas de colágeno se someten a un fuerte proceso alcalino (pH 13). La deamidación se da en los aminoácidos asparagina y glutamina transformándolos en ácido aspártico y ácido glutámico respectivamente, provocando un desplazamiento del punto isoelectrico a un valor de pH menor (Gustavson 1956).

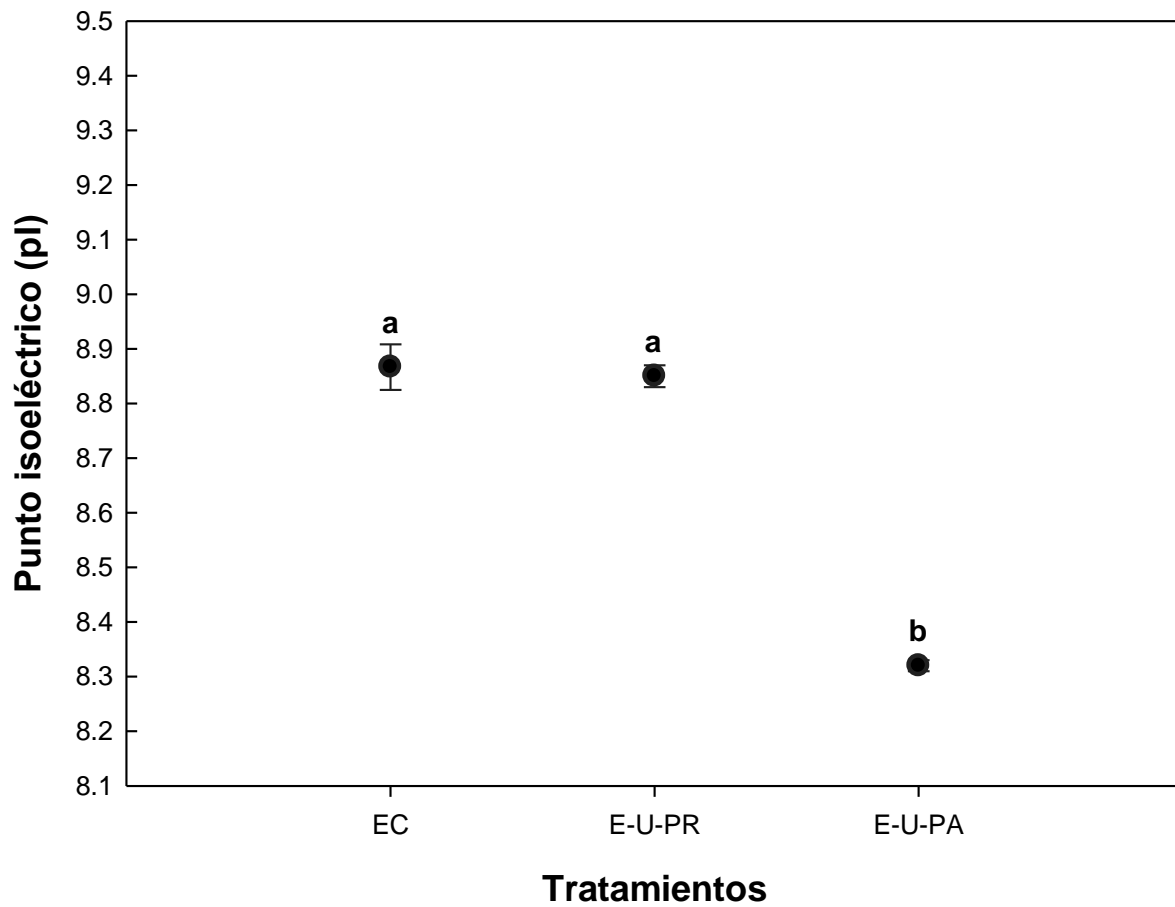


Figura 16 Determinación del punto isoelectrico a partir de la obtención del potencial Z en función del pH. Todas las muestras fueron sometidas a un intervalo de pH inicial de 3.5 y llevadas a un pH final de 9.5. Las letras representan las diferencias significativamente ($P < 0.05$) del promedio de tres repeticiones.

6.4 Determinación del peso molecular por SDS-PAGE

Para el análisis electroforético de las muestras de colágeno ovino tipo I (EC, E-U-PR y E-U-PA) se utilizó la técnica de electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico. El peso molecular de las bandas electroforéticas fue obtenido a partir de una regresión logarítmica tomando como base los pesos moleculares de la proteína estándar. Todas las muestras fueron acondicionadas según lo descrito en la sección 5.9. En la Figura 18 se observan los patrones electroforéticos de cada muestra, incluyen las cadenas α y β , así como algunos agregados de alto y bajo peso molecular. Respecto a la muestra EC, las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ fueron encontradas a los 125 kDa y 109 kDa respectivamente, mientras que la cadena β fue encontrada a los 230 kDa. A diferencia de las muestras E-U-PR y E-U-PA, la muestra EC presento agregados de bajo peso molecular (otros) sugiriendo que la proteólisis enzimática fue uniforme (Chen, Chen et al. 2016).

Para la muestra E-U-PR, las cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β fueron encontradas a los 126 kDa, 112 kDa y 233 kDa respectivamente, mientras que en la muestra E-U-PA fueron encontradas a los 129 kDa, 115 kDa y 233 kDa. Este incremento en el peso molecular por parte de las cadenas α y β en las muestras E-U-PR y E-U-PA sugiere una modificación estructural significativa sobre la conformación de triple hélice del colágeno la cual es atribuida a la aplicación de ultrasonido de alta intensidad (UAI). Este mismo comportamiento fue encontrado por Kim y colaboradores (2013) al extraer colágeno tipo I a partir de la piel de lubina a diferentes amplitudes ultrasónicas.

Adicionalmente, la muestra E-U-PA presento altos valores de peso molecular incluso por arriba de los reportados para la muestra E-U-PR confirmando una modificación estructural adicional la cual es atribuida a la deamidación que sufren los aminoácidos asparagina y glutamina cambiando sus propiedades electrostáticas debido a que aumenta la concentración del grupo carboxilo (COO^-). Así mismo, Liu y colaboradores (2015) también reportaron el mismo comportamiento el cual atribuyeron al fuerte tratamiento alcalino que aplicaron en la piel de la carpa china con el propósito de remover proteínas no colágenas presentes.

El presente estudio de investigación se encontró una diferencia con respecto a la intensidad de las bandas que representan a las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$. La intensidad en las bandas de las cadenas $\alpha 1$ fue de aproximadamente dos veces mayor que la de las cadenas $\alpha 2$ confirmando la obtención de colágeno tipo I por partes de los tres tratamientos (Jongjareonrak, Benjakul et al. 2005, Bae, Osatomi et al. 2008, Ahmad and Benjakul 2010).

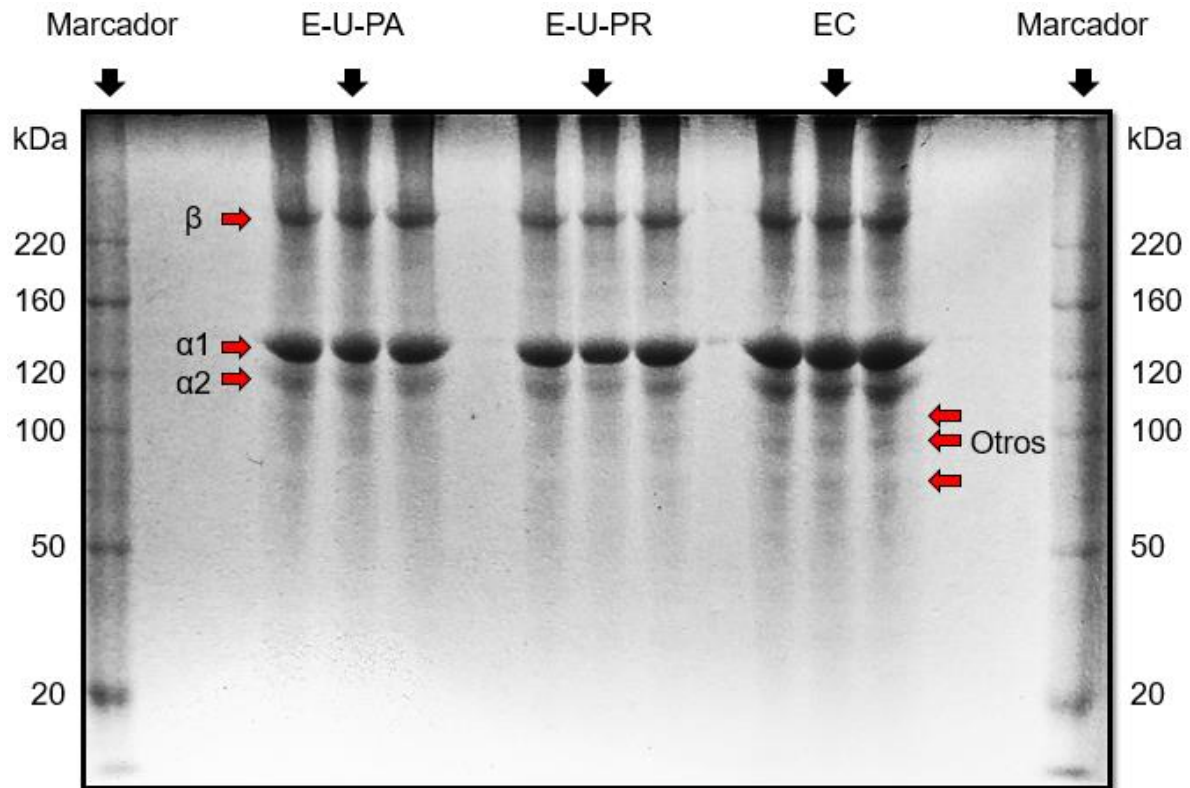


Figura 17 Determinación del peso molecular a partir de los tratamientos (extracción convencional (EC), extracción asistida por ultrasonido a partir de la piel de borrego rasurada (E-U-PR) y extracción asistida pro ultrasonido a partir de la piel de borrego con tratamiento alcalino (E-U-PA)).

6.5 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

Para la obtención de las bandas amida características del colágeno tipo I se utilizó la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR por sus siglas en inglés), se trabajó con tres muestras de colágeno ovino tipo I (EC, E-U-PR y E-U-PA) previamente dializadas y liofilizadas. Se requirió de una cantidad de muestra mínima, la cual se depositó en el lente del equipo para su posterior prensado y evaluación infrarroja. Las condiciones de evaluación se describieron en la sección 5.10. Todas las muestras evaluadas exhibieron la forma típica de un espectro infrarrojo para el colágeno tipo I. En la Figura 17 se observan las bandas amida características (A, B, I, II y III) demostrando una similitud respecto a la estructura secundaria de las moléculas de colágeno (Kittiphattanabawon, Benjakul et al. 2009). Estos resultados sugieren que la conformación de triple hélice de las moléculas de colágeno a partir de las muestras E-U-PR y E-U-PA fue predominante a pesar de haber recibido ultrasonido de alta intensidad (UAI). Lo anterior es congruente con lo reportado por Li y colaboradores (2009) debido a que encontraron el mismo comportamiento en las bandas amida características generadas a través de una muestra de colágeno asilada por el método convencional como por una muestra de colágeno aislada por medio de una extracción asistida por UAI.

Todas las bandas amida (A, B, I, II y III) fueron encontradas en números de onda similares a los reportados por Skopinska-Wisniewska y colaboradores (2014), los cuales obtuvieron a través de la evaluación infrarroja del colágeno tipo I aislado de los tendones de las colas de ratas albinas jóvenes. Así mismo, Ran y Wang (2014) reportaron números de onda similares respecto a las bandas amida características, los cuales obtuvieron a partir del colágeno tipo I asilado del tendón bovino bajo un proceso de extracción asistido por UAI. Sin embargo, otros autores (Benjakul, Thiansilakul et al. 2010, Matmaroh, Benjakul et al. 2011, Liu, Liang et al. 2012) reportan las mismas bandas amida pero a números de onda significativamente diferentes, principalmente las bandas amida A y amida I. Por lo que el proceso de extracción como la purificación del colágeno tipo I podrían repercutir en la intensidad de los picos, así como en el desplazamiento de las bandas amidas a diferentes números de onda.

La banda amida A es atribuida a las vibraciones de tensión del grupo NH y se produce en un intervalo de 3,400-3,440 cm^{-1} . Sin embargo, cuando un grupo NH está involucrado con un puente de hidrógeno en la cadena peptídica, este es desplazado a un número de onda menor (Doyle, Bendit et al. 1975). Como ejemplo de lo anterior, las bandas amida A de las muestras EC, E-U-PR y E-U-PA sugieren la presencia de puentes de hidrógeno debido a que se encontraron a 3,298.33 cm^{-1} , 3,297.67 cm^{-1} y 3,298.33 cm^{-1} respectivamente (Barth 2007). Estos resultados demuestran que la conformación estructural de triple hélice permanece en todas las muestras de colágeno (Skopinska-Wisniewska, Olszewski et al. 2014). Así mismo, las muestras EC, E-U-PR y E-U-PA presentaron la banda amida B ($\approx 2,930 \text{ cm}^{-1}$) la cual está relacionada con el estiramiento asimétrico del grupo CH_2 (Zhang, Duan et al. 2014).

Por otra parte, las bandas amida I reportadas para las muestras EC, E-U-PR y E-U-PA fueron encontradas a los 1,630.00 cm^{-1} , 1,632.33 cm^{-1} y 1,630.33 cm^{-1} sin haber presentado diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellas (Tabla 2). Esta banda es correlacionada con las vibraciones de estiramiento de los grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), las vibraciones de estiramiento y flexión del grupo NH a lo largo de toda la columna vertebral polipeptídica de la biomolécula (Skopinska-Wisniewska, Olszewski et al. 2014). Lo anterior confirma la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo NH y el grupo $\text{C}=\text{O}$ del cuarto residuo responsable del introducción de las cadenas alfa en una conformación de triple hélice (Matmaroh, Benjakul et al. 2011).

Tabla 2 Números de onda (cm^{-1}) obtenidos a partir de las diferentes bandas amida registradas por cada espectro infrarrojo de las diferentes muestras de colágeno ovino tipo I.

Muestra	Amida A (cm^{-1})	Amida B (cm^{-1})	Amida I (cm^{-1})	Amida II (cm^{-1})	Amida III (cm^{-1})
E-U-PA	3,298.33 \pm 0.58 a	2933.67 \pm 1.53 b	1,630.33 \pm 0.58 a	1,544.33 \pm 2.08 a	1,235.00 \pm 0.00 a
E-U-PR	3,297.67 \pm 3.05 a	2928.00 \pm 1.73 a	1,632.33 \pm 4.04 a	1,544.00 \pm 1.73 a	1,235.00 \pm 1.00 a
EC	3,298.33 \pm 3.79 a	2934.00 \pm 1.00 b	1,630.00 \pm 0.00 a	1,544.33 \pm 2.08 a	1,235.67 \pm 1.53 a
Letras diferentes representan valores significativamente diferentes ($P < 0.05$) en cada columna.					

Por otro lado, la banda amida II de las muestras fue encontrada dentro del margen establecido por la literatura y es responsable de la combinación del grupo NH en el plano de curvatura y las vibraciones de estiramiento del grupo CN. La banda amida III representan la combinación de picos entre las vibraciones de estiramiento del grupo C-N y la deformación del grupo N-H a partir de enlaces amida, así como las absorciones provenientes del constante movimiento vibratorio de los grupos CH_2 de la glicina en la columna vertebral y de la prolina presente en las cadenas laterales (Jackson, Choo et al. 1995). La banda amida III de la muestra EC fue encontrada a los $1,235.67 \text{ cm}^{-1}$ mientras que para las muestras E-U-PR y E-U-PA fue registrada a los $1,235.00 \text{ cm}^{-1}$.

En la literatura (Li, Wang et al. 2013, Liang, Wang et al. 2014, Wang, Liang et al. 2014) es común por los autores relacionar la integridad de la conformación de triple hélice mediante el cálculo de la relación entre el número de onda de la banda amida III obtenido en el espectro infrarrojo y el número de onda $1,450\text{ cm}^{-1}$. El cociente de esta relación fue encontrado a un valor de 0.85 para los tres diferentes tratamientos del presente estudio. Este valor indica que el proceso de extracción tanto convencional como el ultrasónico generó un colágeno tipo I con alto grado de pureza en virtud de que los valores cercanos a 1.0 confirman la integridad estructural de la molécula de colágeno (Guzzi Plepis, Goisis et al. 1996).

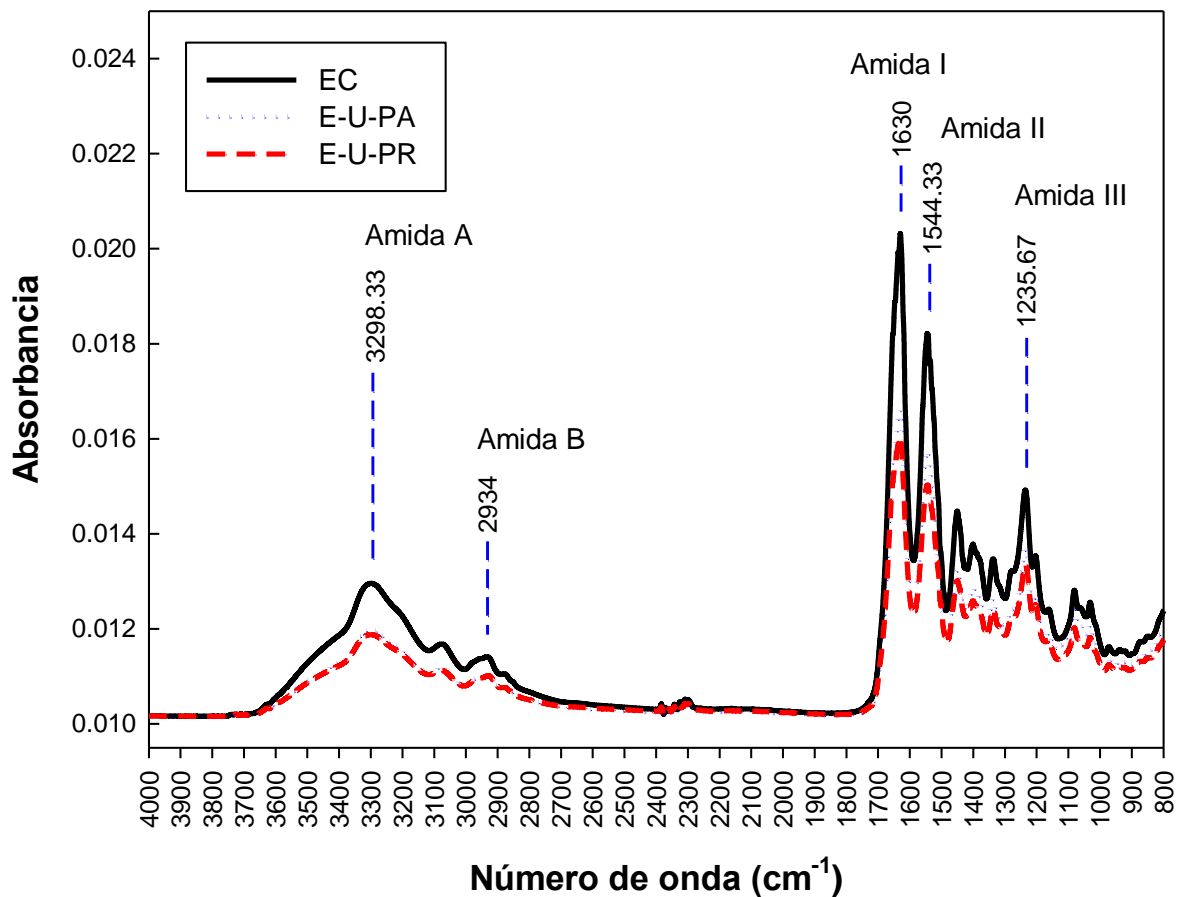


Figura 18 Espectros infrarrojos de las muestras de colágeno ovino tipo I previamente dializadas y liofilizadas, obtenidos por medio de la técnica de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

6.6 Determinación de la viscosidad

La viscosidad de las muestras EC, E-U-PR y E-U-PA en solución fue medida a partir del viscosímetro Brookfield, las condiciones de evaluación se describieron en la sección 5.11. Entendiéndose por viscosidad, como aquel comportamiento físico en el que las moléculas de un medio líquido ofrecen una resistencia a fluir en respuesta de una fuerza o tensión de cizallamiento aplicada. En la Figura 19 se observa una diferencia en el comportamiento viscoso por parte de las muestras de colágeno tipo I obtenida a partir de diferentes métodos de extracción. Así mismo, se observa que las muestras de los tratamientos E-U-PR y E-U-PA presentaron una viscosidad mayor en comparación a la muestra del tratamiento EC. Sin embargo, entre las muestras del tratamiento EC y E-U-PR no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) sugiriendo que el proceso alcalino previo al método de extracción asistido por ultrasonido de alta intensidad (E-U-PA) modificó la conformación de triple hélice de tal manera que su resistencia a fluir fue mayor (Veis 1964).

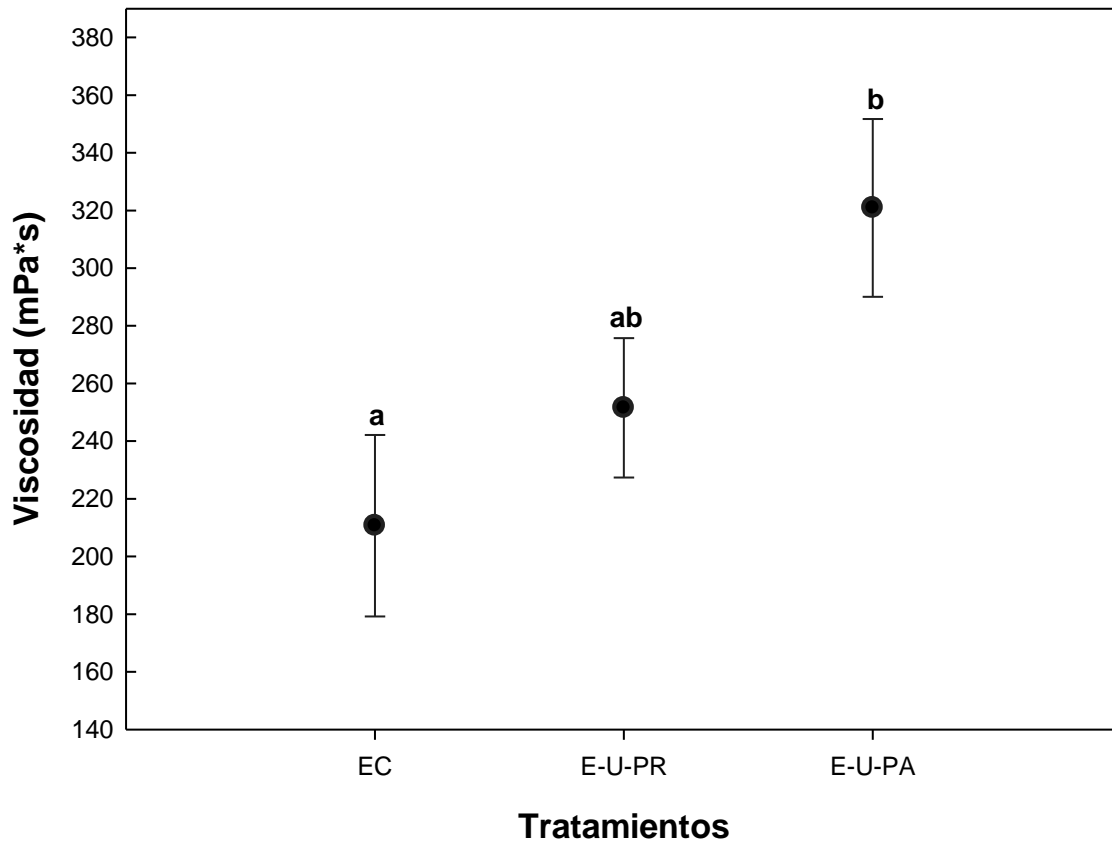


Figura 19 Determinación de la viscosidad a partir de las diferentes muestras de colágeno ovino tipo I. Las letras representan las diferencias significativamente ($P < 0.05$) del promedio de tres repeticiones.

Es bien conocido en la literatura (Harding 1997) que existe una relación entre el peso molecular y la viscosidad de un biopolímero. A mayor peso molecular se observa una mayor viscosidad. Esto es congruente con los datos obtenidos en el presente proyecto en donde la Figura 20 ilustra la correlación del parámetro viscosidad contra el parámetro de peso molecular. Se aprecia un incremento de la muestra E-U-PA respecto a su peso molecular y de la misma manera presentó la mayor viscosidad debido a la resistencia a fluir por parte de las moléculas de colágeno de esta muestra, provocando un incremento en el volumen hidrodinámico de las moléculas de colágeno. Cabe mencionar que las dos variables de viscosidad y peso molecular fueron investigadas por metodologías diferentes (Brookfield y SDS-PAGE respectivamente) sugiriendo la congruencia de los resultados entre ellas.

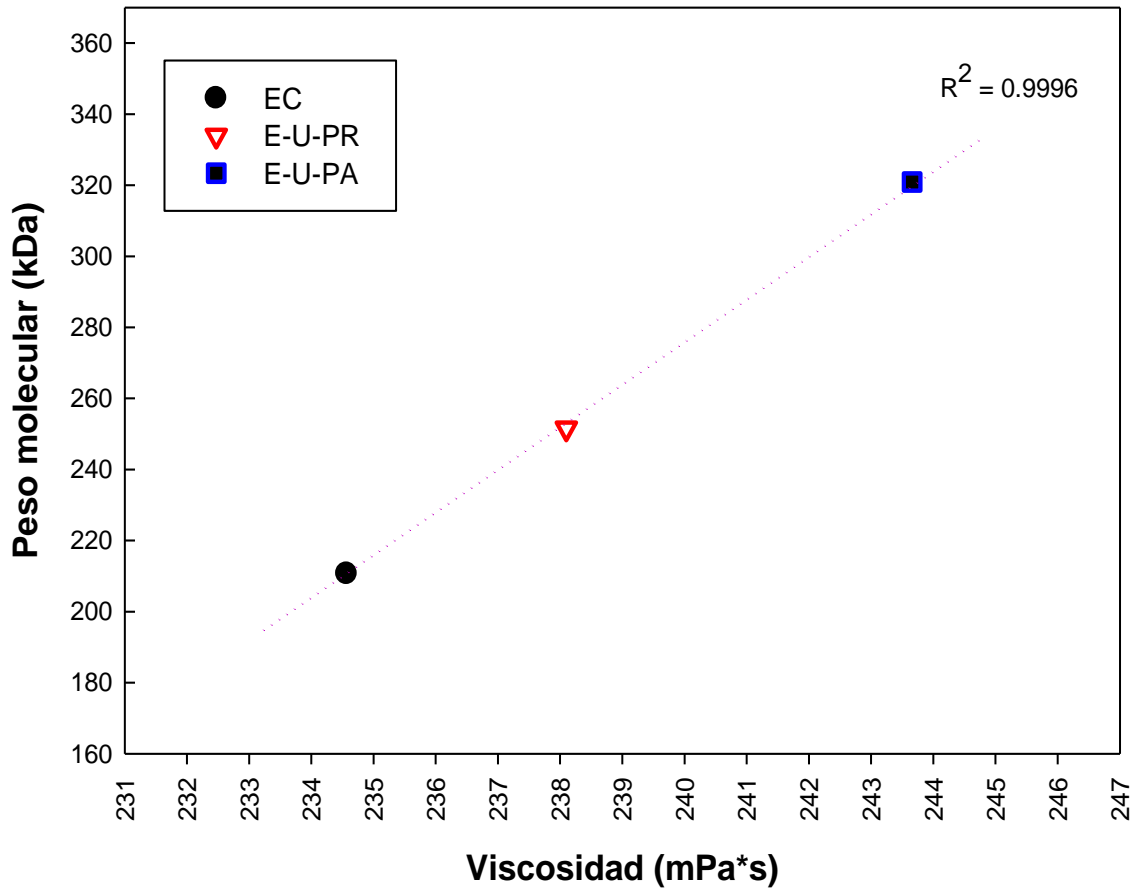


Figura 20 Correlación entre el peso molecular y la viscosidad en el colágeno ovino tipo I. Ambos parámetros fueron determinados a través de técnicas diferentes.

6.7 Determinación del rendimiento de extracción

Los rendimientos de colágeno a partir de los tres tratamientos de extracción (EC, E-U-PR y E-U-PA) fueron obtenidos aplicando la ecuación descrita en la sección 5.12. En la Figura 21 se observa que el rendimiento de extracción del tratamiento E-U-PR fue del 26.73%, mientras que los tratamientos EC y E-U-PA presentaron un rendimiento del 20.25% y 16.99% respectivamente. Estadísticamente, las muestras E-U-PR y E-U-PA difieren significativamente ($P < 0.05$) respecto al rendimiento de extracción. Liu y colaboradores (2015) reportaron una pérdida de colágeno tipo I durante la aplicación de una solución de NaOH al 0.5 M en el proceso de extracción en comparación a una solución de NaOH a menor concentración, lo que sugiere que la pérdida de colágeno por parte del tratamiento E-U-PA fue debido al fuerte proceso alcalino.

Adicionalmente, en la literatura se reporta un incremento en el rendimiento de extracción cuando se aplica ultrasonido de alta intensidad (Li, Mu et al. 2009, Kim, Kim et al. 2012), lo cual se ve reflejado en el aproximadamente 6% de incremento en el rendimiento de extracción por parte de la muestra E-U-PR. Sin embargo, entre los rendimientos de extracción obtenidos por los tratamientos EC y E-U-PR no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$). Estos resultados sugieren que la aplicación de ultrasonido de alta intensidad promueve una mejor solubilización de colágeno durante el proceso de extracción debido a que hubo una apertura de la estructura fibrilar generando una mejor acción enzimática.

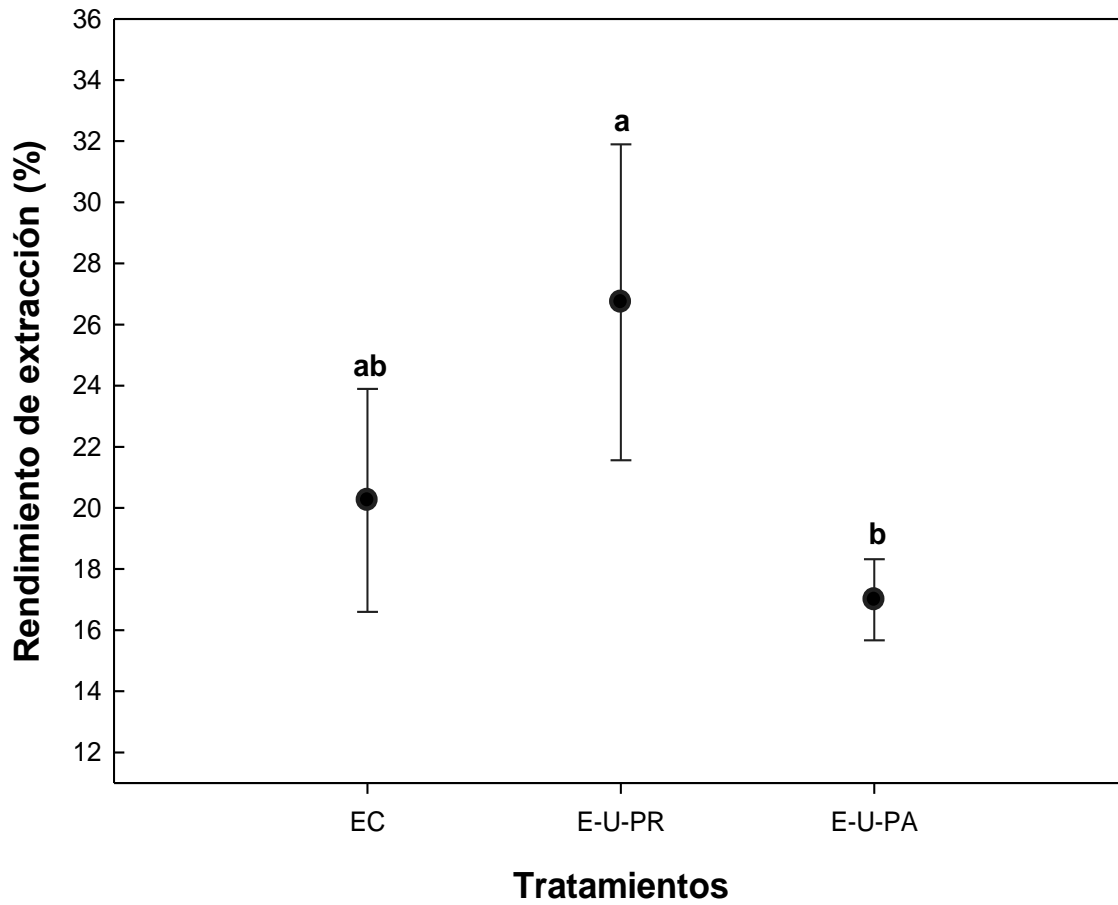


Figura 21 Rendimiento de extracción de colágeno ovino tipo I a partir de los distintos tratamientos (EC y E-U-PR y E-U-PA).

7 CONCLUSIONES

Se logró estandarizar el método de extracción asistido por ultrasonido de alta intensidad del colágeno tipo I a partir de un subproducto agroindustrial como la piel de borrego. Se encontró un incremento en el rendimiento de extracción por parte del tratamiento E-U-PR a diferencia de los demás tratamientos sin comprometer la integridad estructural de la triple hélice. Adicionalmente, los resultados arrojados por las técnicas de SDS-PAGE, calorimetría de barrido diferencial (DSC) y viscosidad a partir de las muestras obtenidas por los tratamientos E-U-PR y E-U-PA sugieren que el colágeno ovino tipo I puede ser utilizado en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y biomédica.

8 PERSPECTIVAS

Se requiere investigar el efecto que tiene el pre-tratamiento alcalino sobre el colágeno tipo I obtenido a partir de la piel de borrego por medio de una extracción asistida por ultrasonido de alta intensidad a diferentes temperaturas (4°C, 10°C, 15°C, 20°C y 25°C) y tiempos de exposición (24, 36, 48, 60 y 72 horas) con el objetivo de estudiar el rendimiento de extracción y las características moleculares, tales como; punto isoeléctrico, hinchamiento, peso molecular, estabilidad térmica y viscosidad del colágeno tipo I. Lo anterior, debido a los resultados arrojados por la muestra E-U-PA del presente estudio.

9 REFERENCIAS

Abou Neel, E. A., L. Bozec, J. C. Knowles, O. Syed, V. Mudera, R. Day and J. K. Hyun (2013). "Collagen--emerging collagen based therapies hit the patient." Adv Drug Deliv Rev **65**(4): 429-456.

Ahmad, M. and S. Benjakul (2010). "Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*)." Food Chemistry **120**(3): 817-824.

Awad, T. S., H. A. Moharram, O. E. Shaltout, D. Asker and M. M. Youssef (2012). "Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review." Food Research International **48**(2): 410-427.

Bae, I., K. Osatomi, A. Yoshida, K. Osako, A. Yamaguchi and K. Hara (2008). "Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes." Food Chemistry **108**(1): 49-54.

Barth, A. (2007). "Infrared spectroscopy of proteins." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1767**(9): 1073-1101.

Batzer, H. and U. T. Kreibich (1981). "Influence of water on thermal transitions in natural polymers and synthetic polyamides." Polymer Bulletin **5**(11-12): 585-590.

Benjakul, S., Y. Thiansilakul, W. Visessanguan, S. Roytrakul, H. Kishimura, T. Prodpran and J. Meesane (2010). "Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*)." Journal of the Science of Food and Agriculture **90**(1): 132-138.

Bentley, J. P. (1976). "Excelsior: A Retrospective View Of Collagen." Journal of Investigative Dermatology **67**(1): 119-123.

Bieńkiewicz, K. J. (1983). Physical Chemistry of Leather Making. Florida, USA., Robert E. Krieger Publishing Company.

Bigi, A., G. Cojazzi, N. Roveri and M. H. J. Koch (1987). "Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturation." International Journal of Biological Macromolecules **9**(6): 363-367.

Bilgen, G., G. Oktay, Z. Tokgöz, G. Guner and S. Yalcin (1999). "Collagen Content and Electrophoretic Analysis of type I Collagen in Breast Skin of Heterozygous Naked Neck and Normally Feathered Commercial Broilers." Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences **23**: 483-487.

Brodsky, B. and J. A. M. Ramshaw (1997). "The collagen triple-helix structure." Matrix Biology **15**(8): 545-554.

Brodsky, B., J. A. Werkmeister and J. A. M. Ramshaw (2005). *Collagens and Gelatins*. Biopolymers Online, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 119-128.

Burjanadze, T. V. (1979). "Hydroxyproline content and location in relation to collagen thermal stability." Biopolymers **18**(4): 931-938.

Chemat, F., H. Zille and M. K. Khan (2011). "Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction." Ultrasonics Sonochemistry **18**(4): 813-835.

Chen, J., L. Li, R. Yi, N. Xu, R. Gao and B. Hong (2016). "Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*)." LWT - Food Science and Technology **66**: 453-459.

Chen, S., H. Chen, Q. Xie, B. Hong, J. Chen, F. Hua, K. Bai, J. He, R. Yi and H. Wu (2016). "Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*)." Food Hydrocolloids **52**: 468-477.

Chuaychan, S., S. Benjakul and H. Kishimura (2015). "Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*)." LWT - Food Science and Technology **63**(1): 71-76.

Doyle, B. B., E. G. Bendit and E. R. Blout (1975). "Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides." Biopolymers **14**(5): 937-957.

Duraipandy, N., R. Lakra, K. Vinjimur Srivatsan, U. Ramamoorthy, P. S. Korrapati and M. S. Kiran (2015). "Plumbagin caged silver nanoparticle stabilized collagen scaffold for wound dressing." Journal of Materials Chemistry B **3**(7): 1415-1425.

Gabbott, P. (2008). *A Practical Introduction to Differential Scanning Calorimetry. Principles and Applications of Thermal Analysis*. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd: 1-50.

Gómez-Lizárraga, K., C. Piña-Barba and N. Rodríguez-Fuentes (2011). "Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino." Superficies y Vacío **24**: 137-140.

Guimarães Martins, V., J. A. Vieira Costa and C. Prentice-Hernández (2009). "Fish protein hydrolyzed obtained by chemical and enzymatic processes from corvina." Química Nova **32**(1): 61-66.

Gustavson, K. H. (1956). The Chemistry and Reactivity of Collagen. New York, USA. , Academic Press Inc.

Guzzi Plepis, A. M. D., G. Goissis and D. K. Das-Gupta (1996). "Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen " Polymer Engineering & Science **36**(24): 2932-2938.

- Harding, S. E. (1997). "The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution." Progress in Biophysics and Molecular Biology **68**(2–3): 207-262.
- Hu, H., X. Fan, Z. Zhou, X. Xu, G. Fan, L. Wang, X. Huang, S. Pan and L. Zhu (2013). "Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments." Ultrasonics Sonochemistry **20**(1): 187-195.
- Huang, C. Y., J. M. Kuo, S. J. Wu and H. T. Tsai (2016). "Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion-hydro-extraction process." Food Chemistry **190**: 997-1006.
- Huang, Y.-R., C.-Y. Shiau, H.-H. Chen and B.-C. Huang (2011). "Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*)." Food Hydrocolloids **25**(6): 1507-1513.
- Jackson, M., L.-P. i. Choo, P. H. Watson, W. C. Halliday and H. H. Mantsch (1995). "Beware of connective tissue proteins: Assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1270**(1): 1-6.
- Johansson, P. (2013). Characterization of Protein Surface Interaction: Collagen and Osteocalcin. Master in Sciences, Linköping University, Institute of Technology
- Jongjareonrak, A., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai and M. Tanaka (2005). "Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*)." Food Chemistry **93**(3): 475-484.
- Kaewdang, O., S. Benjakul, T. Kaewmanee and H. Kishimura (2014). "Characteristics of collagens from the swim bladders of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*)." Food Chemistry **155**: 264-270.
- Karim, A. A. and R. Bhat (2009). "Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins." Food Hydrocolloids **23**(3): 563-576.
- Kentish, S. and M. Ashokkumar (2011). The Physical and Chemical Effects of Ultrasound. Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing. H. Feng, G. V. Barbosa-Cánovas and J. Weiss. London, UK, Springer 1-12.
- Khan, M. I., M. S. Arshad, F. M. Anjum, A. Sameen, R. Aneeq ur and W. T. Gill (2011). "Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages." Food Research International **44**(10): 3125-3133.
- Kiew, P. L. and M. D. Mashitah (2013). "Isolation and characterization of collagen from the skin of Malaysian catfish (*Hybrid Clarias* sp.)." Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry **56**(4): 441-450.

- Kim, H. K., Y. H. Kim, Y. J. Kim, H. J. Park and N. H. Lee (2012). "Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*." Fisheries Science **78**(2): 485-490.
- Kim, H. K., Y. H. Kim, H. J. Park and N. H. Lee (2013). "Application of ultrasonic treatment to extraction of collagen from the skins of sea bass *Lateolabrax japonicus*." Fisheries Science **79**(5): 849-856.
- Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai and M. Tanaka (2005). "Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*)." Food Chemistry **89**(3): 363-372.
- Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan and F. Shahidi (2009). "Isolation and properties of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*)." European Food Research and Technology **230**(3): 475-483.
- Knorr, D., M. Zenker, V. Heinz and D.-U. Lee (2004). "Applications and potential of ultrasonics in food processing." Trends in Food Science & Technology **15**(5): 261-266.
- Kozłowska, J., A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska and K. Piechowicz (2015). "Northern pike (*Esox lucius*) collagen: Extraction, characterization and potential application." Int J Biol Macromol **81**: 220-227.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Li, D., C. Mu, S. Cai and W. Lin (2009). "Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen." Ultrason Sonochem **16**(5): 605-609.
- Li, Z. R., B. Wang, C. Chi, Q. Zhang, Y. Gong, J. Tang, H. Luo and G. Ding (2013). "Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*)." Food Hydrocolloids **31**(1): 103-113.
- Liang, Q., L. Wang, W. Sun, Z. Wang, J. Xu and H. Ma (2014). "Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)." Process Biochemistry **49**(2): 318-323.
- Liu, D., L. Liang, J. M. Regenstien and P. Zhou (2012). "Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)." Food Chemistry **133**(4): 1441-1448.
- Liu, D., G. Wei, T. Li, J. Hu, N. Lu, J. M. Regenstien and P. Zhou (2015). "Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin." Food Chemistry **172**: 836-843.

- Liu, D., X. Zhang, T. Li, H. Yang, H. Zhang, J. M. Regenstein and P. Zhou (2015). "Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)." Food Bioscience **9**: 68-74.
- Martínez-Ortiz, M. A., A. D. Hernández-Fuentes, D. J. Pimentel-González, R. G. Campos-Montiel, A. Vargas-Torres and G. Aguirre-Álvarez (2014). "Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization." CyTA - Journal of Food **13**(2): 253-258.
- Mason, T. J., E. Riera, A. Vercet and P. Lopez-Buesa (2005). Application of Ultrasound Emerging Technologies for Food Processing D.-W. Sun. San Diego, California. USA, Elsevier Academic Press 323-351.
- Matmaroh, K., S. Benjakul, T. Prodpran, A. B. Encarnacion and H. Kishimura (2011). "Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*)." Food Chemistry **129**(3): 1179-1186.
- Mentink, C. J. A. L., M. Hendriks, A. A. G. Levels and B. H. R. Wolffenbuttel (2002). "Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin." Clinica Chimica Acta **321**(1-2): 69-76.
- Minh Thuy le, T., E. Okazaki and K. Osako (2014). "Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam." Food Chemistry **149**: 264-270.
- Mohammadi, R., M. A. Mohammadifar, A. M. Mortazavian, M. Rouhi, J. B. Ghasemi and Z. Delshadian (2016). "Extraction optimization of pepsin-soluble collagen from eggshell membrane by response surface methodology (RSM)." Food Chemistry **190**: 186-193.
- Muralidharan, N., R. Jeya Shakila, D. Sukumar and G. Jeyasekaran (2013). "Skin, bone and muscle collagen extraction from the trash fish, leather jacket (*Odonus niger*) and their characterization." J Food Sci Technol **50**(6): 1106-1113.
- Muthukumarappan, K., B. K. Tiwari, C. P. O'Donnell and P. J. Cullen (2010). Ultrasound Processing: Rheological and Functional Properties of Food. Novel Food Processing. Effects on Rheological and Functional Properties. J. Ahmed, H. S. Ramaswamy, S. Kasapis and J. I. Boye. London, UK, CRC Press 85-102.
- Nagai, T., T. Ogawa, T. Nakamura, T. Ito, H. Nakagawa, K. Fujiki, M. Nakao and T. Yano (1999). "Collagen of edible jellyfish exumbrella." Journal of the Science of Food and Agriculture **79**(6): 855-858.
- Nazhat, S. N. (2008). Thermal Analysis of Biomaterials. Principles and Applications of Thermal Analysis, Blackwell Publishing Ltd: 256-285.
- Piez, K. A. (1967). Soluble Collagen and the Components Resulting from its Denaturation. Treatise on Collagen. G. N. Ramachandran. London, UK, Academic Press: 207-252.

- Pineda, C., A. Bernal, R. Espinosa, C. Hernández, N. Marín, A. Peña, P. J. Rodríguez and C. Solano (2009). "Principios Físicos Básicos del Ultrasonido." Rev. chil. reumatol **25**(2): 60-66.
- Pingret, D., A.-S. Fabiano-Tixier and F. Chemat (2013). "Degradation during application of ultrasound in food processing: A review." Food Control **31**(2): 593-606.
- Prestes, R. C. (2013). "Collagen and its Derivatives: Characteristics and Applications in Meat Products " UNOPAR Cient Cienc Biol Saúde **15**(1): 65-74.
- Raichel, D. R. (2006). The Science and Applications of Acoustics USA, Springer Science+Business Media, Inc.
- Ramachandran, G. N. (1988). "Stereochemistry of collagen*." International Journal of Peptide and Protein Research **31**(1): 1-16.
- Ran, X. G. and L. Y. Wang (2014). "Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products." J Sci Food Agric **94**(3): 585-590.
- Roos, Y. H. (2008). The Glassy State. Food Materials Science: Principles and Practice. J. M. Aguilera and P. J. Lillford. New York, NY, Springer New York: 67-81.
- Salazar, J., J. A. Chávez, A. Turó and M. J. García-Hernández (2010). Effect of Ultrasound on Food Processing Novel Food Processing. Effects on Rheological and Functional Properties. J. Ahmed, H. S. Ramaswamy, S. Kasapis and J. I. Boye. London, UK, CRC Press: 65-84.
- Schmidt, M., R. Dornelles, R. Mello, E. Kubota, M. Mazutti, A. Kempka and I. Demiate (2016). "Collagen extraction process." International Food Research Journal **23**(3).
- Schrieber, R. and H. Gareis (2007). Gelatin Handbook Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- SIAP. (2014). "Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Resumen municipal pecuario." Retrieved 15 de febrero, 2016, from <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-municipal-pecuario/>.
- Sillanpää, M., T.-D. Pham and R. A. Shrestha (2011). Ultrasound Technology in Green Chemistry. Dordrecht, Heidelberg, London, New York, Springer
- Sinthusamran, S., S. Benjakul and H. Kishimura (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.
- Skopinska-Wisniewska, J., K. Olszewski, A. Bajek, A. Rynkiewicz and A. Sionkowska (2014). "Dialysis as a method of obtaining neutral collagen gels." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **40**: 65-70.

- Slade, L. and H. Levine (1993). The glassy state phenomenon in food molecules. The Glassy State in Foods. J. M. V. Blanshard and P. Lillford. Nottingham, UK, University Press: 35-102.
- Soria, A. C. and M. Villamiel (2010). "Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review." Trends in Food Science & Technology **21**(7): 323-331.
- Sudharsan, S., P. Seedeivi, R. Saravanan, P. Ramasamy, S. Vasanth Kumar, S. Vairamani, A. Srinivasan and A. Shanmugam (2013). "Isolation, characterization and molecular weight determination of collagen from marine sponge *Spirastrella inconstans* (Dendy)." African Journal of Biotechnology **12**(5): 504-511.
- Tole, N. M. (2005). Basic Physics of Ultrasonographic Imaging Geneva, World Health Organization
- Tu, Z.-c., T. Huang, H. Wang, X.-m. Sha, Y. Shi, X.-q. Huang, Z.-z. Man and D.-j. Li (2015). "Physico-chemical properties of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scales by ultrasound-assisted extraction." Journal of Food Science and Technology **52**(4): 2166-2174.
- Veeruraj, A., M. Arumugam and T. Balasubramanian (2013). "Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*)." Process Biochemistry **48**(10): 1592-1602.
- Veis, A. (1964). The macromolecular chemistry of gelatin. London, UK, Academic Press Inc.
- Wang, L., Q. Liang, T. Chen, Z. Wang, J. Xu and H. Ma (2014). "Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)." Food Hydrocolloids **38**: 104-109.
- Wu, G. P., X. M. Wang, L. P. Lin, S. H. Chen and Q. Q. Wu (2014). "Isolation and Characterization of Pepsin-Solubilized Collagen from the Skin of Black Carp (*Mylopharyngodon piceus*)." Advances in Bioscience and Biotechnology **05**(07): 642-650.
- Yu, D., C. F. Chi, B. Wang, G. F. Ding and Z. R. Li (2014). "Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*)." Chin J Nat Med **12**(9): 712-720.
- Zhang, J., R. Duan, L. Huang, Y. Song and J. M. Regenstien (2014). "Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii* Kishinouye)." Food Chemistry **150**: 22-26.

10 Anexos

10.1 AMIDIQ



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

Nuevas tecnologías y tendencias en la Ingeniería Química

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

EDHER ARMANDO GONZÁLEZ-VARGAS, ALMA DELIA HERNÁNDEZ-FUENTES,
RUBÉN JIMÉNEZ-ALVARADO, RAFAEL G. CAMPOS-MONTIEL Y GABRIEL
AGUIRRE-ÁLVAREZ

Por la presentación del trabajo:

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COLÁGENO POR MEDIO DE
ULTRASONIDO**

Título: Cuetzalcóatl
Diseño: Aurelio Agustín Rojas Robledo, Pintor
Ejecución: Raúl Solís Medina, Escultor
Colaboradores: Macdonio López, Beatriz Adriana Rodríguez Andrade, Cecilia Rangel Mexicano, Dulce María Elizabeth Carreras Orduña, Alejandro Lemus Ortiz
Fecha: 24 de Agosto de 2015
Metal ubicado en la Unidad de Convivencia Estudiantil del Campus II del Instituto Tecnológico de Celaya

XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ
Puerto Vallarta, Jalisco, México, del 3 al 6 de mayo de 2016



Dr. Mauricio Sales Cruz
PRESIDENTE DE AMIDIQ



Dr. Pedro Alberto Quintana Hernandez
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR



Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO