

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA



**OBTENCIÓN DE COLÁGENO A PARTIR DE LA CABEZA DE
PAICHE (*Arapaima gigas*)**

Presentado por:

GIANELLA CARMEN CASTILLO CRISTOBAL

**TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE
INGENIERO PESQUERO**

**Lima - Perú
2022**

Document Information

Analyzed document	11 TESIS_CASTILLO-CRISTOBAL 2022.docx (D149767998)
Submitted	11/15/2022 3:46:00 PM
Submitted by	ANDRES MOLLEDA ORDOÑEZ
Submitter email	amolleda@lamolina.edu.pe
Similarity	6%
Analysis address	amolleda.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W	URL: https://1library.co/document/qvj9vn0q-elaboracion-ensilado-biologico-partir-residuos-paiche-ar... Fetched: 11/7/2022 5:32:43 PM	 5
SA	ARTICULO TERMINADO... Oñate , Quintero.docx Document ARTICULO TERMINADO... Oñate , Quintero.docx (D142618681)	 1
W	URL: https://1library.co/document/y9grnkqv-elaboracion-marinado-frito-paiche-arapaima-gigas-salsa-f... Fetched: 11/7/2022 5:32:43 PM	 5
SA	3. Colageno. Miguel.docx Document 3. Colageno. Miguel.docx (D61279028)	 5
SA	Universidad Nacional Agraria La Molina / TESIS NIVELES E-P PAICHE - JURADO (1).docx Document TESIS NIVELES E-P PAICHE - JURADO (1).docx (D138395184) Submitted by: jesvargas@lamolina.edu.pe Receiver: jesvargas.unalm@analysis.arkund.com	 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA

**OBTENCIÓN DE COLÁGENO A PARTIR DE LA CABEZA DE PAICHE
(*Arapaima gigas*)**

Presentado por:

Gianella Carmen Catillo Cristobal

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO PESQUERO

Aprobada por el siguiente jurado evaluador:

M. Sc. Tito Eduardo Llerena Daza
Presidente

Mg. Sc. Juan Rodolfo Omote Sibina
Miembro

Ing. Domingo Sánchez Amado.
Miembro

Ing. Andres Avulino Molleda Ordóñez
Asesor

DEDICATORIA

A Dios que siempre guía mi camino y me ayuda a no rendirme frente a los obstáculos que se presenten.

A mis papás, Arcadio y Giovanna, por siempre creer en mí y guiarme con sus consejos durante toda mi etapa de instrucción, por su amor incondicional y sobre todo por su apoyo durante todo el proceso de realización de este trabajo de investigación.

A mi hermana, Rossemary, por ser mi principal ejemplo a seguir. Gracias por creer en mí y en mis metas.

A mis abuelitos que me enseñaron a ser perseverante y responsable en todo lo que me proponga, en especial a mi abuelita Consuelo y mi abuelito Hernán quienes ya no están físicamente, pero espiritualmente sé que están orgullosos de lo que estoy logrando. Gracias abuelitos por sus enseñanzas.

A mi asesor, el Ing. Andrés Molleda, por su apoyo y paciencia durante el tiempo de realización de este trabajo de investigación.

A los técnicos de laboratorio Ernesto y Alan, por apoyarme durante el proceso de realización del trabajo de investigación en el laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1	Consideraciones generales del <i>Arapaima gigas</i> (paiche).....	2
2.1.1	Taxonomía.....	2
2.1.2	Características generales.....	2
2.1.3	Principales usos de la cabeza de paiche.....	4
2.1.4	Distribución geográfica.....	4
2.2	Composición Física y Química del <i>Arapaima gigas</i>	5
2.3	Variación anual de producción de paiche (<i>Arapaima gigas</i>).....	6
2.4	Proteínas del pescado.....	8
2.4.1	Proteínas del estroma.....	8
2.5	Colágeno	9
2.5.1	Composición química del colágeno.....	11
2.5.2	Colágeno tipo I.....	12
2.5.3	Hidroxiprolina.....	13
2.5.4	Fuente de obtención.....	16
2.5.5	Colágeno en organismos acuáticos	17
2.5.6	Métodos extracción de colágeno.....	18
2.5.7	Proceso de extracción del colágeno	19
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1	Lugar de ejecución.....	26
3.2	Materiales y Equipos	26
3.2.1	Materia prima	26
3.2.2	Materiales de vidrio	26
3.2.3	Otros materiales	27
3.2.4	Reactivos.....	27

3.2.5 Equipos	27
3.3. Metodología experimental.....	29
3.3.1 Determinación del tiempo de maceración en solución de hidróxido de potasio (KOH) a 1M.....	33
3.3.2 Determinación de la temperatura y tiempo de extracción de colágeno en los recortes.....	34
3.4 Métodos analíticos.....	36
3.4.1 Materia prima.....	36
3.4.2 Producto final	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
4.1 Análisis físico sensorial.....	39
4.2 Determinación del tiempo de maceración en solución de hidróxido de potasio (KOH) a 1M.....	41
4.3 Determinación de la temperatura y tiempo de extracción de colágeno en los recortes.....	46
4.4 Evaluación estadística	48
4.5 Caracterización del producto.....	51
4.5.1 Análisis físico-químicos.....	51
4.5.2 Análisis microbiológico	52
4.5.3 Rendimiento	52
4.5.4 Determinación de hidroxiprolina.....	53
V. CONCLUSIONES	55
VI. RECOMENDACIONES	56
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	57
VIII. ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Pesos (kg) y rendimiento (R%) de diversos cortes de paiche	5
Tabla 2: Composición química proximal del paiche.....	5
Tabla 3: Volumen de cosecha procedente de la acuicultura según ámbito y especie, del 2008 al 2017 en TM	6
Tabla 4: Aminoácidos presentes en el colágeno	9
Tabla 5: Clasificación y descripción de los diferentes tipos de colágeno	11
Tabla 6: Composición química del colágeno a partir de diferentes orígenes marinos.....	12
Tabla 7: Contenido de hidroxiprolina en diferentes estudios de extracción de colágeno ..	15
Tabla 8: Tratamiento, método de extracción y rendimiento de colágeno extraído de diversas fuentes de organismos acuáticos	24
Tabla 9: Evaluación sensorial en cabezas de paiche	36
Tabla 10: Escala de calificación de evaluación organoléptica en cabezas de paiche.....	36
Tabla 11: Composición física porcentual promedio de la cabeza de paiche, obtenida a partir de 10 muestras.....	40
Tabla 12: Índice de hinchamiento a diferentes tiempos y proporción muestra: solución durante la maceración.....	42
Tabla 13: Lectura promedio de pH a muestras neutralizadas	46
Tabla 14: Rendimiento de la extracción de recortes de tejido blando a diferente tiempo y temperatura	47
Tabla 15: Resultados estadísticos del ANOVA del tiempo y temperatura evaluados para el proceso de extracción de colágeno	48
Tabla 16: Composición química proximal del colágeno seco.....	51
Tabla 17: Resultado del análisis microbiológico del colágeno extraído	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Paiche (<i>Arapaima gigas</i>).....	2
Figura 2: Cabeza de paiche	4
Figura 3: Volumen de producción en las regiones de Loreto y Ucayali, del 2008 al 2017, en TM	7
Figura 4: Estructura del colágeno tipo I, a) se muestra la estructura primaria con la secuencia de los aminoácidos. b) hélice secundaria izquierda y hélice terciaria derecha. c) estructura cuaternaria de manera escalonada.....	13
Figura 5: Representación molecular de la hidroxiprolina	14
Figura 6: Curva de calibración empleada para calcular la concentración de hidroxiprolina en muestras de colágeno obtenido a partir de tendón bovino.....	15
Figura 7: Efecto de ácidos orgánicos y el tiempo de extracción sobre rendimiento del colágeno.....	22
Figura 8: Efecto de la proporción piel: solución ácido en la solubilidad del colágeno.....	22
Figura 9: Flujo general para la obtención de colágeno a partir de cabeza de paiche	29
Figura 10: Medición de índice de hinchamiento en muestras con tratamiento con solución KOH 1 N.....	33
Figura 11: Diseño experimental para la extracción de colágeno a partir de la cabeza de paiche.....	35
Figura 12: Cabeza de paiche	39
Figura 13: Muestras limpias antes del tratamiento.....	41
Figura 14: Muestras después del tratamiento	42
Figura 15: Presencia de grasa en la solución.....	43
Figura 16: Efecto del tiempo de maceración en el índice de hinchamiento (%) en tejido blando de la cabeza de paiche.....	44
Figura 17: Recortes de tejido blando en etapa de extracción.....	47
Figura 18: Rendimientos obtenidos a diferentes tiempos y temperaturas de extracción ...	49
Figura 19: Colágeno líquido obtenido después del filtrado	50
Figura 20: Colágeno seco en láminas.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Determinación estadística para evaluación de tratamientos.	62
ANEXO 2. Tabla de límites microbiológicos según R.M 591- MINSA.....	63
ANEXO 3. Determinación de composición química proximal para colágeno en polvo....	64
ANEXO 4. Determinación de hidroxiprolina.....	65

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el fin de aprovechar los residuos provenientes del procesamiento de paiche (*Arapaima gigas*) específicamente del tejido blando de las cabezas, para evaluar la extracción de colágeno. Se establecieron 3 variables independientes sobre la variable respuesta rendimiento de extracción de colágeno. Las pruebas se realizaron por duplicado evaluando el efecto del tiempo de maceración entre 6, 9 y 12 horas, el tiempo de extracción entre 1, 2 y 3 horas y la temperatura de extracción entre 70°C y 80°C. Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza ANOVA. El colágeno extraído tuvo un rendimiento de 14.63 %. La composición química proximal del colágeno obtenido fue: 89.67% de proteína, 1.46% de cenizas totales, 7.03% de humedad, y 0.76% de grasa. Asimismo, se obtuvo 11.3 g de hidroxiprolina /100g de colágeno. Con los resultados obtenidos, se logró desarrollar un método de extracción de colágeno a partir del tejido blando de cabezas de paiche, de acuerdo a lo planteado en la metodología de extracción establecido en la presente investigación.

Palabras clave: colágeno, paiche, cabeza, hidroxiprolina.

ABSTRACT

The present investigation was carried out in order to take advantage of the residues from the processing of paiche (*Arapaima gigas*), specifically from the soft tissue of the heads, to evaluate the extraction of collagen. Three independent variables were established on the collagen extraction yield response variable. The tests were carried out in duplicate, evaluating the effect of the maceration time between 6, 9 and 12 hours, the extraction time between 1, 2 and 3 hours and the extraction temperature between 70°C and 80°C. The results were statistically evaluated using the ANOVA analysis. The extracted collagen had a yield of 14.63% on a dry basis. The proximal chemical composition of the collagen obtained was: 89.67% protein, 1.46% total ashes, 7.03% moisture, and 0.76% fat. Furthermore, 11.3 g of hydroxyproline/100g of collagen was obtained. With the results obtained, it was possible to develop a method for extracting collagen from the soft tissue of paiche heads, according to what was stated in the extraction methodology established in the present investigation.

Key words: Collagen, paiche, head, hydroxyproline.

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la acuicultura en el Perú se ve influenciado por la gran variedad de especies con potencial acuícola como los peces amazónicos, pudiendo llegar a ser un rubro de producción económica muy importante por las condiciones que ofrece el territorio nacional. Actualmente, existen departamentos que se vienen convirtiendo en las principales zonas de producción acuícola en el país, por sus características ambientales y condiciones para el desarrollo de una buena acuicultura. De acuerdo a PRODUCE (2017), se registró cerca de 142 toneladas de producción de paiche promovida por la acuicultura, de las cuales el 60% se destinaron a presentaciones congeladas y el 40% a frescas teniendo como foco el mercado internacional.

En el Perú, el paiche (*Arapaima gigas*) es una de las especies emblemáticas de la Amazonía y, además al ser considerado como el pez amazónico de mejor carne se ha convertido en un recurso aprovechado comercialmente, el cual contribuye al desarrollo socioeconómico (Rebaza *et al.*, 1999). Actualmente, se sigue desarrollando su cultivo naturalmente en estanques de tierra, permitiendo al acuicultor producir carne y alevinos con facilidad.

El paiche además de ser reconocido por la calidad de su carne, es aprovechado también para la producción de cueros y artesanías a través de piel y escamas, preparación de la guaraná a través de la lengua, mas se presenta escasa literatura referida al aprovechamiento de otras partes de la anatomía de esta especie como la cabeza, aletas, cola; por lo que, la presente investigación tiene como finalidad obtener colágeno como una alternativa de aprovechamiento proveniente de la cabeza del paiche (*Arapaima gigas*). Los objetivos de la presente tesis son la determinación del tiempo de maceración; evaluando diferentes tiempos, y la determinación del tiempo y temperatura de extracción.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Consideraciones generales del *Arapaima gigas* (paiche)

2.1.1 Taxonomía

De acuerdo a Palmeira (1996), citado por Del Águila (2010), la clasificación taxonómica es la siguiente:

Orden: Osteoglossiformes

Suborden: Osteoglossoidei

Superfamilia: Osteoglossoidae

Familia: Arapaimidae

Género: *Arapaima*

Especie: *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) Nombre común: paiche



Figura 1: Paiche (*Arapaima gigas*)

2.1.2 Características generales

En el Perú es conocido con el nombre común de paiche; en Brasil su nombre más difundido es pirarucú, debido a la coloración rojiza (Sánchez, 1969; citado por Rebaza *et al.*, 1999).

El paiche (*Arapaima gigas*) es una especie de agua dulce de mayor tamaño en el planeta, la cual, en su medio natural, puede alcanzar hasta tres metros de longitud y más de 200 kg de peso (Rebaza *et al.*, 1999). A pesar de su gran tamaño, Alcántara *et al.* (2006), reportan que esta especie puede ser cultivada con buenos resultados en diversos ambientes y con diferentes alimentos.

La especie empieza a madurar cuando alcanza un peso de 40-45 kg, con una longitud entre 1.60 a 1.85m, la época de desove se da durante todo el año, pero se presenta con mayor intensidad en los meses de agosto a diciembre. El desove puede darse de forma anual, desovando a veces cada dos años, motivo por el cual la fecundidad total se reduce (Del Águila, 2010). La especie puede alcanzar hasta los 10 Kg durante el primer año de vida (García, 2010; citado por Sosa, 2017).

El paiche presenta cuerpo alargado, coloración castaño claro en el dorso y ligeramente blanquecino en las regiones lateral y ventral. Su cabeza es alargada en forma triangular y es más pequeña en relación al tamaño del cuerpo, representando aproximadamente el 10% del peso total (Alcántara *et al.*, 2006).

A su vez, consideran que es una especie importante para el poblador amazónico, ya que constituye una fuente de alimentación y contribuye con la generación de ingresos a través de la comercialización (Alcántara *et al.*, 2006). Los hábitos de esta especie y la excelente calidad de su carne han originado una intensa presión de pesca y, a pesar de los programas de protección que se llevan a cabo en los países de la cuenca, existen evidencias que indican la disminución de sus poblaciones (Rebaza *et al.*, 1999).

Ante esta situación, el desarrollo de la piscicultura del paiche resulta la mejor opción para la conservación de la especie ya que ofrece reducir la presión de pesca sobre las poblaciones naturales; además de satisfacer la demanda local, regional e internacional por su carne (Rebaza *et al.*, 1999).

De igual manera, Alcántara *et al.* (2006), mencionan que la conservación de esta especie se encuentra en función a su reproducción, la cual se encuentra expuesta a las demandas de un complejo ecosistema amazónico, produciendo alta propensión a la mortalidad en sus crías, razón por la cual, durante los últimos años se ha optado por su cultivo tanto en estanques como en jaulas flotantes proporcionando óptimos resultados en ambos casos.

2.1.3 Principales usos de la cabeza de paiche

La revisión bibliografía que pueda referir a estudios realizados sobre las propiedades funcionales de la cabeza de paiche es escasa. Sin embargo, algunos estudios refieren que los huesos de la cabeza de paiche suelen emplearse para obtener cenizas de hueso, los cuales son sometidos a procesos de incineración para obtener la hidroxiapatita, que es una fuente de calcio y fósforo (Pinchi, 2014).

Las cabezas de paiche no suelen venderse en los mercados de la amazonia peruana, sin embargo, en los últimos años se ha logrado introducir su venta con fines culinarios (Figura 2) (Pinchi, 2014).

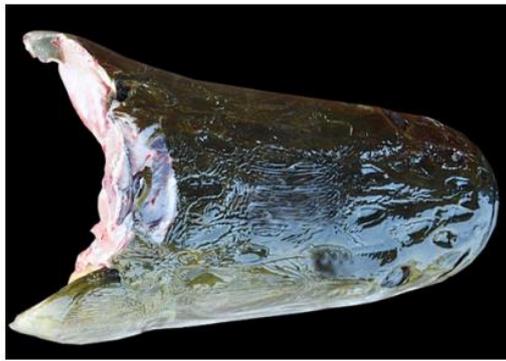


Figura 2: Cabeza de paiche

Fuente: Pinchi, 2014

2.1.4 Distribución geográfica

El paiche se encuentra en toda la cuenca del Amazonas y otros ríos comprendidos desde Guyana hasta Bahía en Brasil (Rebaza *et al.*, 1999).

En el Perú se encuentra en las cuencas bajas de los ríos Napo, Putumayo, Marañón, Pastaza y Ucayali, con abundancia en la Reserva Nacional Pacaya – Samiria (Luling *sf.*, citado por Rebaza *et al.*, 1999).

2.2 Composición Física y Química del *Arapaima gigas*

En la Tabla 1 se muestra el cuadro resumen con los pesos promedios y rendimientos de diversos cortes practicados en el paiche entero, obtenido a partir de 7 muestras.

Tabla 1: Pesos (kg) y rendimiento (R%) de diversos cortes de paiche

	Pesos kg	Rendimiento R%
Entero	8,75	100
Corte G/G con escamas	7,8	89,42
Corte H/G	6,68	76,37
Filete con piel	4,72	54,06
Filete sin piel	3,51	40,1
Cabeza	1,12	12,80

Fuente: Alcántara *et. al* (2006).

El paiche se caracteriza por presentar un contenido bajo en grasa y por carecer de espinas menudas, lo cual eleva su valor nutritivo en comparación a otras especies. En la Tabla 2 se muestra la composición química proximal según los reportes de Alcántara *et. al* (2006), García (2010) y IIAP (2017).

Tabla 2: Composición química proximal del paiche

Composición (%)	Alcántara <i>et. al.</i> (2006)	García (2010)	IIAP (2017)
Humedad	77.59 - 79.80	81.25	75.03
Proteína	17.36 - 21.81	16.5	18.45
Grasa	0.47 - 1.45	0.86	5.4
Cenizas	0.93 - 1.20	0.97	1.01

Fuente: Elaboración propia.

Según diversos estudios, las partes que mejor son aprovechadas para la obtención del colágeno son las aletas, la piel, la cabeza picada, las escamas y las espinas molidas. El proceso de extracción se realiza en un medio alcalino para las espinas, escamas, piel y cabeza por otro lado, para la extracción en aletas se realiza por medio ácido (Gaitán, 2013).

2.3 Variación anual de producción de paiche (*Arapaima gigas*)

La crianza de especies amazónicas a través de la acuicultura ha tenido un impacto positivo para el desarrollo económico en las regiones de la selva, caracterizándose el cultivo de paiche (Luján, 2019).

Según Alcántara *et. al* (2006), el paiche (*Arapaima gigas*) presenta todas las características necesarias para una buena producción en la acuicultura, debido a su rápido crecimiento.

Según PRODUCE (2017), la cosecha en toneladas según ámbito y especie en el periodo 2008-2017 tuvo su punto más alto en el año 2012, y su producción en los últimos años ha ido aumentando gradualmente, tal como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Volumen de cosecha procedente de la acuicultura según ámbito y especie, del 2008 al 2017 en TM

Ámbito/Especie	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Total	43119	44317	89021	92201	72293	125693	115269	90976	100191	100455
Continental	14986	14837	17320	23609	29564	40068	38683	45758	58771	61028
Boquichico	25	27	36	15	35	56	6	9	31	58
Camarón gigante de Malasia	6	11	15	13	11	20	78	21	34	26
Carachama	4	1	22	6	7	10	5	4	9	6
Carpa	15	15	19	8	19	6	2	4	4	5
Gamitana	539	564	680	522	453	531	504	299	1863	1047
Paco	71	75	101	130	299	443	453	825	1390	1624
Pacotana	59	12	3	12	17	15	9	219	11	35
Paiche	1	3	48	422	637	94	55	135	142	218
Tilapia	1714	1261	2013	2423	3174	3840	4610	3250	2950	3042
Trucha	12497	12817	14250	19962	24762	34992	32923	40946	52245	54878
Sábalo	52	49	114	95	46	58	37	33	87	84
Otros	3	2	19	0	102	3	1	12	4	6

Fuente: Direcciones Regionales de Producción (DIREPRO) y Empresas Acuícolas (2017).

Las tasas de crecimiento del paiche y los niveles de producción alcanzados durante su cultivo, permite a la región amazónica tener un panorama viable del desarrollo económico a través de esta actividad (Alcántara *et al.*, 2006). Las principales regiones con mayor producción de paiche son Loreto y Ucayali, siendo más alto el volumen de producción en Loreto. En el año 2011 Loreto alcanzó su pico más alto con 421.23 TM y Ucayali registró su mayor producción, con 53.07 TM, en el año 2017 (Figura 3).

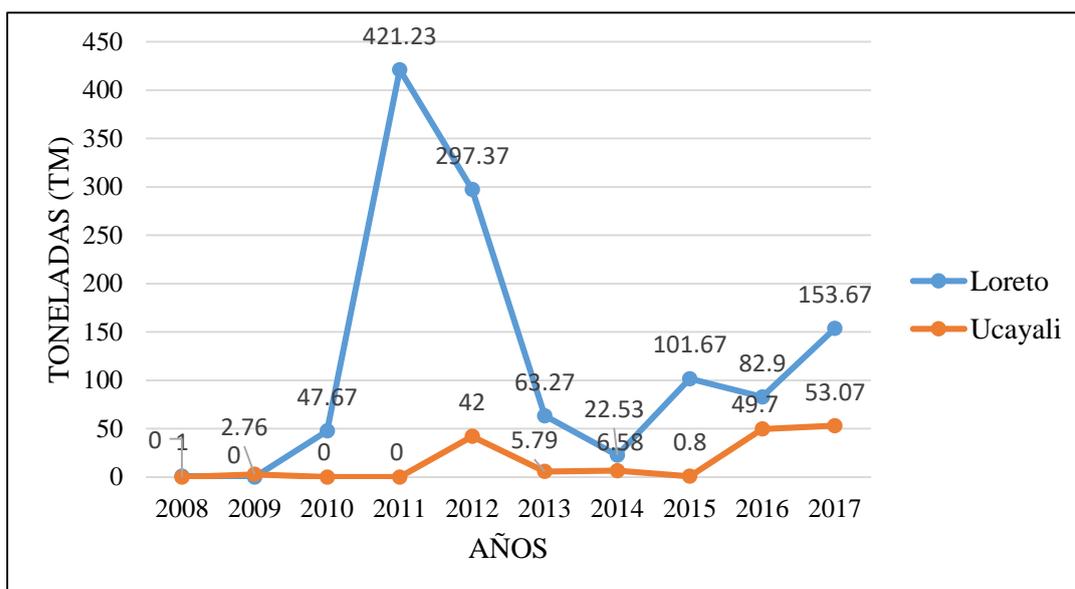


Figura 3: Volumen de producción en las regiones de Loreto y Ucayali en TM

Fuente: Direcciones Regionales de Producción (DIREPRO) y Empresas Acuícolas (2017).

Debido a las buenas características que presenta la carne de paiche, presenta una alta demanda en el mercado externo. Según un estudio realizado por la UNCTAD, los países con mayor consumo de carne de paiche son Estados Unidos, Alemania y Suiza, siendo el principal destino de exportación los Estados Unidos, donde se han exportado 384 TM en el periodo 2010-2017; por un monto total de 5.2 millones de dólares americanos (PRODUCE, 2017).

Por otro lado, el mercado nacional mostró ser un espacio favorable para la comercialización de la carne de paiche, sin embargo, no lo suficientemente grande para impulsar el cultivo de paiche (IIAP, 2017).

Si bien es cierto, el paiche es un producto de exportación, los datos brindados por PRODUCE (2017), indican que el 47.4% de la carne proveniente de la acuicultura entre los años 2010-2017 (aprox 766 TM) fueron comercializados en el mercado interno. Por otro lado, el dato proveniente de la exportación fue de 302 TM, siendo el principal mercado internacional los Estados Unidos.

Dentro de los principales importadores de paiche destacan Japón, China y USA, donde los países asiáticos realizan la importación con fines ornamentales. En el caso de los Estados Unidos, no solo se exporta la carne de paiche, sino también los subproductos como cuero y escamas que son empleados en artesanías, marroquinería de alta calidad y regalos (IIAP, 2017).

2.4 Proteínas del pescado

Las proteínas constituyen entre 15-25% del peso total del pescado, siendo el principal componente de este. La carne de pescado tiene como característica principal una menor cantidad de tejido conectivo, y dentro del mismo menor proporción de elastina que de colágeno. Esto se manifiesta cuando se somete ante cocción húmeda, lo cual provoca que los haces musculares se separen con facilidad. En base a su solubilidad, las proteínas se dividen en: sarcoplasmáticas, miofibrilares e insolubles o del estroma (Watabe, 1992; citado por ~~Sol~~ Solari, 2006).

La estructura conformacional de las proteínas en peces puede verse alterada por cambios que suceden en el ambiente físico. Asimismo, las propiedades de estas proteínas pueden ser empleadas con fines tecnológicos cuando son desnaturalizadas bajo condiciones controladas (Suzuki, 1981; citado por De la Torre, 2013).

2.4.1 Proteínas del estroma

Las proteínas del estroma son las presentes en el tejido conectivo y se encuentran en menor proporción en el músculo de pescado que en el de mamíferos, constituyendo aproximadamente el 3 % del total de proteínas en peces teleósteos y el 10 % en elasmobranquios, mientras que en mamíferos se presenta en un 17 % (FAO, 1998).

De acuerdo a lo expuesto por Watabe (1992) citado por De la Torre (2013), estas proteínas son las encargadas de brindar firmeza a la carne (tejido conectivo), y se caracterizan por ser insolubles en agua y en disoluciones salinas.

Según Mohr (1971) citado por FAO (1998), las propiedades físicas y químicas de este tipo de proteínas difieren según el tipo de tejido como la piel, vejiga natatoria y los miocomatas del músculo. Asimismo, el contenido de colágeno en los tejidos corporales de diversos animales marinos, puede ser atribuido al comportamiento natatorio que presenten estas especies (Yoshinaka *et al.*, 1988; citado por FAO, 1998).

2.5 Colágeno

El colágeno es el mayor componente del tejido animal que se caracteriza por poseer una estructura fibrosa y ser insoluble en el agua. Su principal función es la de brindar soporte estructural y celular. Es un componente de la matriz extracelular del tejido conectivo y se encuentra en la piel, el hueso, el cartílago, el tendón, etc.; teniendo una estructura característica en cada uno de estos tejidos de acuerdo a la función que desempeña en ellos (Teijón, 2006; citado por Romero, 2016).

Se caracteriza por ser la única proteína que presenta las formas hidroxiladas de la Pro y Lys (Hidroxiprolina, Hidrosilisina). En la Tabla 4 se muestra el contenido de los diferentes aminoácidos presentes en el colágeno.

Tabla 4: Aminoácidos presentes en el colágeno

Aminoácidos No Esenciales		Aminoácidos Esenciales	
Glicina	20.60%	Lisina	3.70%
Glutamato	12.60%	Leucina	2.90%
Hidroxiprolina	11.40%	Valina	2.50%
Prolina	11.20%	Fenilalanina	2.00%
Arginina	8.20%	Treonina	1.90%
Alanina	7.80%	Isoleucina	1.20%
Aspartato	6.50%	Histidina	1.10%
Serina	3.60%	Metionina	0.80%
Hidroxilisina	1.20%		
Tirosina	0.60%		

Fuente: Ramírez *et al.*, 2013; citado por Quispe, S. y Gutiérrez, L., 2019.

El contenido de aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) resulta importante respecto a la fuerza de gel de la gelatina y punto de fusión, ya que estos proporcionan rigidez a las estructuras de la triple hélice del colágeno, debido a la rigidez característica de sus grupos R (Babel, 1996; citado por Arnesen J. y Gildberg A., 2005).

El alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos aparenta tener un efecto similar, aunque estos suelen ser menos prominentes. Por otro lado, un alto contenido de aminoácidos hidroxilados, como la serina y treonina, pueden promover la regeneración de la triple hélice a partir de bobinas aleatorias (Badii F. y Howell N., 2005).

Generalmente, el colágeno y gelatina extraído de peces de aguas frías presentan un menor contenido de prolina e hidroxiprolina que las especies de aguas más cálidas (Arnesen J. y Gildberg A., 2005). El alto contenido de aminoácidos en las gelatinas procedentes de mamíferos y peces de aguas cálidas se ve relacionado con el alto punto de fusión (Badii F. y Howell N., 2005).

La estructura del colágeno está constituida por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadena α , dos cadenas idénticas denominadas $\alpha 1(I)$ y otra diferente denominada $\alpha 2$ que se enrollan para formar una súper hélice dextrógira con tres residuos de aminoácidos por vuelta (Gómez-Lizárraga *et al.*, 2011).

De acuerdo a Garret (1999) citado por Quispe y Gutiérrez (2019), la fuerza y estabilidad en los tejidos que presenta la proteína colágena proviene de su estructura superior de súper hélice. Por otro lado, la estabilidad de su estructura cuaternaria proviene de diferentes tipos de enlaces como los puentes de hidrógeno e interacciones intermoleculares de Van der Waals, así como de algunos enlaces covalentes.

Los puentes de hidrógeno pueden formarse por el hidrógeno del amino de un aminoácido y el oxígeno del carboxilo de otro. Sin embargo, los aminoácidos pueden establecer otro tipo de fuerzas de unión intermolecular, denominándose fuerzas de Van der Waals las cuales se caracterizan por ser muy débiles comparadas con el enlace químico y por ser interacciones de tipo físico. La mayoría de los enlaces de hidrógeno que se forma entre las cadenas en la hélice triple se establece principalmente entre protones amidas y oxígenos carbonilos. Sin embargo, la estabilidad de la proteína también puede atribuirse al grupo -OH de la hidroxiprolina, ya que este es envuelto en enlaces de hidrogeno lo cual estabiliza la estructura de la triple hélice del colágeno (Muyonga, 2004; citado por Serrano, 2011).

Su unidad estructural fundamental es una proteína larga (300nm) denominada tropocolágeno, con un peso molecular de 285 kDa y está conformada por tres cadenas polipeptídicas de igual tamaño (Teijón, 2006; citado por Romero, 2016).

En base a esto *et al.* (2012), señalan que existen alrededor de 26 tipos de colágeno designados como tipo I hasta el tipo XXVI. En la Tabla 5 se muestran los diversos tipos de colágeno y su descripción.

Tabla 5: Clasificación y descripción de los diferentes tipos de colágeno

Tipo	Descripción
Tipo I	Principalmente en el tejido conectivo, como la piel, huesos y tendones
Tipo II	Exclusivamente en el tejido cartilaginoso
Tipo III	Principalmente se encuentra en pieles muy jóvenes (hasta 50.0%), pero con el tiempo el contenido de este tipo de colágeno se reduce a 5.0 - 10.0 %
Otros tipos	Se presentan en muy bajas cantidades en organismos específicos.

Fuente: Karim y Bhat, (2009); citado por Romero, (2016).

Según Xiong (1997) citado por Mamani (2018), once variedades genéticas de colágeno ya han sido identificadas y caracterizadas. Por otro lado, el autor menciona que el colágeno se puede clasificar en 3 grupos de acuerdo a su estructura macromolecular:

- a) Colágeno fibroso estriado, que incluye a los tipos I, II y III
- b) Colágeno no fibroso, que comprende al tipo IV
- c) Colágeno miofibrilar, que incluye a los tipos VI y VII

Los que comprende los tipos V, IX y X (colágeno pericular), y VIII y XI aún no han sido clasificados.

2.5.1 Composición química del colágeno

Según estudios realizados por diversos autores, la composición química del colágeno obtenida a partir de residuos marinos presenta una variación de acuerdo al tipo de especie y ambiente donde habita. En la Tabla 6, se puede observar que el estudio realizado por Barrenechea (2017) en pieles de paiche, obtuvo un mejor resultado en contenido proteico (10%).

Tabla 6: Composición química del colágeno a partir de diferentes orígenes marinos

Análisis físico químico	Piel de paiche (Barrenechea J., 2018)	Residuos de anchoveta (Solari A. y Córdova J., 2015)	Piel de perico (Romero R., 2016)
Humedad (%)	10	8	6.8
Proteína (%)	90	87.6	88.3
Grasa (%)	0	0.3	1
Ceniza (%)	0	0.7	0.2

Fuente: Elaboración propia.

2.5.2 Colágeno tipo I

El colágeno tipo I es la proteína extracelular más abundante y mejor estudiada de los animales vertebrados, ya que representa más del 90% de la masa orgánica del hueso y es el principal colágeno de los tendones, ligamentos, córnea y tejidos conectivos intersticiales (Ríos, 2012).

Generalmente, este tipo de colágeno es el más empleado en la industria. Presenta una capacidad única para la formación de fibras insolubles con alta resistencia al estiramiento (Bhuimbar *et al.*, 2019).

Las fibras de colágeno difieren por el diámetro, en la piel de los mamíferos están organizados como cestos, lo que permite la oposición a la tracción.

Las moléculas individuales de tropocolágeno se empaquetan juntas formando una fibra de colágeno de una manera específica. Cada molécula tiene una longitud de aproximadamente 300 nm y se solapa con otra en aproximadamente 64 nm, produciendo el aspecto característico de bandas de las fibras. Esta estructura proporciona una resistencia notable: las fibras de colágeno de los tendones tienen una resistencia comparable a la del cable de cobre de alta resistencia.

A su vez, de Paz (2006) señala que este tipo de colágeno proporciona rigidez a la tensión y, en el hueso, es responsable de las propiedades biomecánicas relacionadas con la resistencia a la carga y la tensión.

De acuerdo a lo expuesto por Saenz (2017), este tipo de colágeno posee repeticiones de tripletes de aminoácidos de la forma Gly X-Y donde Gly es la glicina, X prolina e Y es la hidroxiprolina (Figura 4).

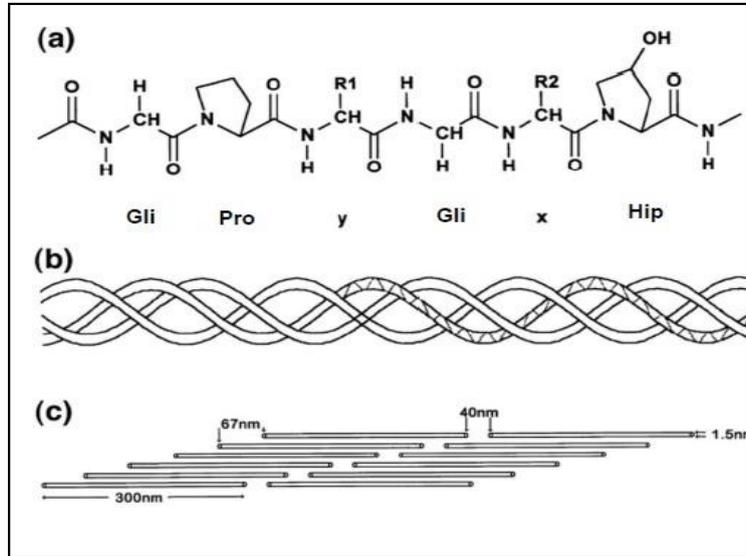


Figura 4: Estructura del colágeno tipo I, a) se muestra la estructura primaria con la secuencia de los aminoácidos. b) hélice secundaria izquierda y hélice terciaria derecha. c) estructura cuaternaria de manera escalonada

Fuente: Friess, 1997; citado por Saenz, 2017.

Como se mencionó anteriormente, dentro de los tripletes de aminoácidos la hidroxiprolina es uno de los aminoácidos que se repite n veces a lo largo de la cadena polipeptídica, constituye el 10% de la composición del colágeno y se encuentra exclusivamente en este tipo de proteínas, es a partir de este razonamiento que se hace uso de un factor de conversión con valor de 7.46, para calcular así la concentración de colágeno (Gómez-Lizárraga *et al.*, 2011).

2.5.3 Hidroxiprolina

La hidroxiprolina es uno de los aminoácidos más abundante en el colágeno, su contenido oscila entre los 13 y 14%, se le considera como una medida de cuantificación de colágeno en un producto (Figura 5) (Franca y Waszczynskyj, 2002; citado por Mamani, 2018).

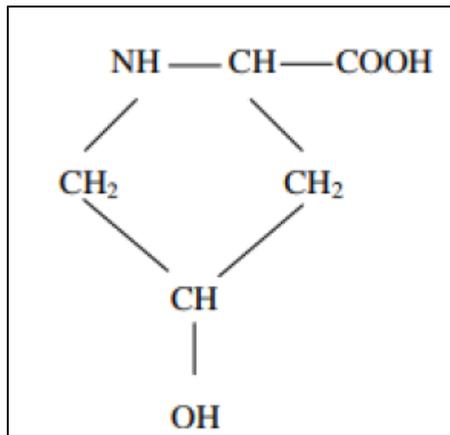


Figura 5: Representación molecular de la hidroxiprolina

Fuente: Franca y Waszczyński, 2002; citado por Mamani, 2018

Según Ward y Courts, 1977; citado por Eluk, 2006, las gelatinas extraídas mediante procesos alcalinos poseen un mayor contenido de hidroxiprolina que las extraídas por tratamiento ácido. Esto atribuido a que las materias primas sometidas a procesos alcalinos pierden péptidos pobres en hidroxiprolina.

Existen diversos métodos para cuantificar el contenido de hidroxiprolina, como por ejemplo la cromatografía de columna, sin embargo, el método más empleado es el ensayo colorimétrico basado en la reacción de hidroxiprolina con p-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Ehrlich) (Gómez-Lizárraga *et al.*, 2011).

Según los estudios realizados por Gómez-Lizárraga *et al.* (2011), en extracción de colágeno a partir de tendón bovino, para la cuantificación de este se diluyó una muestra después del proceso de extracción del cual se tomaron 7 alícuotas rotuladas con las letras: A, B, C, D, E, F y G, tomándose una muestra de colágeno puro como control.

Se determinó la cantidad de hidroxiprolina a partir de la medida de absorbancia y construcción de la ecuación de la recta (Figura 6), y mediante un factor de conversión adecuado se calculó el contenido de colágeno en cada muestra.

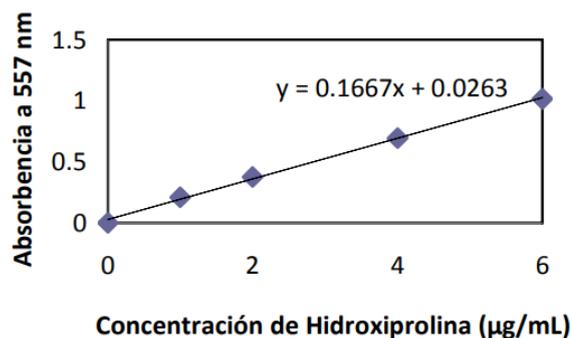


Figura 6: Curva de calibración empleada para calcular la concentración de hidroxiprolina en muestras de colágeno obtenido a partir de tendón bovino

Fuente: Gómez-Lizárraga *et al.*, 2011.

En el estudio realizado por Romero (2016), para la cuantificación del contenido de hidroxiprolina en pieles de perico, se ejecutó mediante el método establecido de acuerdo a la A.O.A.C. (990.26) (A.O.A.C., 2005), obteniendo 7.89 g/ 100 g de hidroxiprolina, tal como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7: Contenido de hidroxiprolina en diferentes estudios de extracción de colágeno

Componente	Romero, 2016	Solari y Córdova, 2015	Bhuimbar, 2019
	Pieles de perico	Residuos de anchoveta	Residuos marinos
Hidroxiprolina (g/100g)	7.89 g/100g	52.9 mg/100g	2.20 g/100g

Fuente: Elaboración propia.

2.5.4 Fuente de obtención

La principal fuente de extracción de colágeno proviene de los residuos de especies bovinas y de la piel, huesos y cartílagos de cerdo (Wang *et al.* 2008; citado por Serrano, 2011).

Sin embargo, en los últimos años la presencia de reacciones alérgicas y el brote de encefalopatía espongiiforme generado a partir de la extracción de colágeno en bovinos, limitaron su uso en la industria (Bhuimbar *et al.*, 2019).

Por otro lado, existen problemas con la extracción de colágeno a partir de pieles de cerdo y especies bovinas, ya que representa una limitación socio cultural para algunas religiones, como el judaísmo y el islam, que consideran inapropiados este método de obtención (Badii F. y Howell N., 2005).

Otra de las limitaciones en la obtención de colágeno proveniente de bovinos, es el costo de obtención, ya que se ve afectado por el elevado valor que presenta el levante de esta especie y de la baja productividad en el colágeno (Serrano, 2011).

Según Bhuimbar *et al.* (2019), el uso de colágeno y sus productos derivados, demanda nuevas fuentes de obtención que sean seguras. Por ello, la obtención a partir de organismos acuáticos se ha ido incrementado en las últimas décadas entre las que destacan los trabajos realizados a partir del uso de la piel, huesos y escamas de pescado (Serrano, 2011).

Como se mencionó anteriormente, la fuente de obtención de colágeno por medio de animales acuáticos resulta más segura, además brinda un mayor rendimiento que la proveniente de animales terrestres (Ahmed *et al.*, 2020). Por otro lado, algunas de las principales ventajas de emplear como fuente de obtención de colágeno a recursos marinos son:

- a) Alto contenido de colágeno.
- b) Menor riesgo de enfermedades como Encefalopatía espongiiforme bovina.
- c) Menor presencia de toxinas biológicas y contaminantes.
- d) Baja respuesta inflamatoria.
- e) Metabólicamente apropiado.

2.5.5 Colágeno en organismos acuáticos

El contenido de colágeno en los organismos marinos es menor que en los mamíferos, variando del 1 al 12% de la proteína y del 0.2 al 2.2% del peso del músculo. (De la Torre, 2013). Así mismo, uno de los factores que influye en el contenido de colágeno en músculo de pescado es la temperatura del agua del medio en donde viven. Un mayor contenido de colágeno fue encontrado en especies que habitan en aguas de temperaturas más elevadas (Torres-Arreola *et al.*, 2008).

En lo referente a composición de aminoácidos, se ha encontrado que el colágeno proveniente de especies marinas presenta una similar distribución de aminoácidos al proveniente de los mamíferos (De la Torre, 2013).

2.5.6 Uso y aplicaciones del colágeno

El colágeno en su estado nativo, ya sea en la forma de fibras o polvo, puede ser expuesto a reacción de hidrólisis para obtener: fibra de colágeno, colágeno parcialmente hidrolizado (gelatina) y colágeno hidrolizado. La hidrólisis parcial puede realizarse en un medio ácido o alcalino, para obtener gelatina, mientras que el colágeno hidrolizado es obtenido por hidrólisis química y enzimática bajo condiciones controladas (Mamani, 2018).

Según lo enunciado por Villela (2004) citado por Serrano (2011), actualmente el colágeno tiene aplicaciones muy importantes en el campo de los biomateriales y materiales médicos. La aplicabilidad del colágeno como biomaterial en la ingeniería de tejidos, destaca por su capacidad de adaptarse al cuerpo humano y cumplir una función específica. El autor menciona que dentro de los biomateriales más usados sobresale las aleaciones metálicas, polímeros y sustancias biológicas.

Su uso en la industria farmacéutica y cosmética destaca por su aplicación directa en la piel para prevenir y tratar las arrugas, en la fabricación de cremas dermatológicas, en la producción de parches para heridas y la elaboración de productos para el cabello que contribuye al fortalecimiento capilar. Por otro lado, su aplicación no solo se limita al uso externo, ya que también puede administrarse vía oral por medio de complementos nutricionales. De esta manera, el colágeno absorbido contribuye a la regeneración del tejido conjuntivo (Serrano J., 2011).

También se utiliza una cantidad significativa de proteína de colágeno en la fabricación de gelatinas, las cuales presentan diferentes propiedades funcionales como gel, emulsionante, espesante, estabilizador y coloides (Schrieber y Gareis, 2007; citado por Ahmed *et al.*, 2020).

En la industria de alimentos, destaca por realizar mejoras en las propiedades de la textura, ya que, a elevadas temperaturas, 60-65°C, durante el procesamiento de los productos la proteína colagenasa gelatiniza y obtiene la capacidad de encapsular las grasas (Rosa *et al.*, 1977; citado por Mamani., 2018).

Bhuimbar *et al.* (2019) menciona que, la capacidad que presenta el colágeno para formar fibrillas permite su uso como material de envase en alimentos. Esto se demuestra en los estudios realizados por el autor en los residuos de pescado, los cuales se emplearon eficazmente para el desarrollo de este material, el cual además presentó propiedades antibacterianas.

Según De la Torre (2013), el colágeno proveniente de recursos marinos también puede aplicarse en la industria de alimentos, como material para la conservación de alimentos gracias al efecto de capa protectora que es capaz de desarrollar.

Debido a la mayor disponibilidad de recursos marinos, el uso proveniente de estas fuentes presenta mayor demanda en contraposición de fuentes tradicionales (Serrano, 2011).

2.5.6 Métodos extracción de colágeno

La extracción de colágeno suele involucrar dos etapas fundamentales: a) pretratamiento de la materia prima; y b) proceso de extracción de colágeno. El objetivo principal del pretratamiento de residuos es la de eliminar impurezas para mejorar la calidad del colágeno obtenido (Ahmed *et al.*, 2020).

Este proceso puede ser realizado con un ácido o álcali, cuyo principal propósito es la de remover proteínas no colagénicas, además de escindir los enlaces cruzados de colágeno (Du *et al.*, 2013).

Al realizar este proceso con un álcali, este hidroliza las proteínas para luego poder eliminarla con lavados posteriores. Por esta razón el control en esta etapa debe tener un cuidado especial, ya que el álcali empleado puede hidrolizar el colágeno presente en las muestras (Serrano, 2011).

Existen diferentes métodos que son empleados para la extracción del colágeno, en base a esto los colágenos pueden ser clasificados como: colágeno soluble en ácido (CSA), colágeno soluble en sal (CSS), colágeno asistido por ultrasonido (CAU) y colágeno soluble en pepsina (CSP). Los rendimientos y propiedades fisicoquímicas del colágeno extraído varían según el método empleado (Ahmed *et al.*, 2020).

En el proceso de extracción, cuando la temperatura llega a los 60°C, el colágeno húmedo sufre una reducción de su longitud (de 1/3 – ¼ del tamaño original) y adquiere elasticidad (esto debido a la distribución de los puentes de hidrogeno cruzados entre las cadenas del colágeno). Cabe recalcar que, en presencia de ácidos, álcalis y soluciones acuosas salinas, el colágeno puede absorber una considerable cantidad de agua. El punto isoeléctrico del colágeno se encuentra en el rango de 6.5 a 8.5 (Mamani, 2018).

Según Bhuimbar *et al.* (2019), el proceso alcalino implica realizar el pretratamiento de residuos con una solución fría a un mayor tiempo y la extracción a pH neutro. Por otro lado, el pretratamiento en solución ácida implica un menor tiempo. Asimismo, el autor menciona que, aunque el ácido inicia el proceso de hidratación en las proteínas, la solubilidad depende absolutamente del tipo de ácido, fuerza iónica y pH, lo cual influye en las propiedades de hinchamiento.

2.5.7 Proceso de extracción del colágeno

Según estudios realizados por Miano *et al.* (2014), determinaron que por hidrólisis alcalina la extracción de gelatina a partir de piel de tollo (*Mustelus mento*), se da a temperaturas entre 60°C y 65°C mientras que el rango óptimo de tiempo de extracción se da entre los 220 y 240 min. Para la ejecución del proyecto, las pieles de tollo fueron sometidas a un pre tratamiento con NaOH 0.1N a temperatura de 10°C por 48 horas, posteriormente fueron lavadas con agua destilada y para neutralizar se hizo empleo de ácido clorhídrico 0.05N.

En el proceso de extracción se describe que las pieles pre tratadas fueron expuestas a diferentes intervalos de temperatura y tiempo para hallar los valores óptimos. La suspensión obtenida fue filtrada para luego obtener la parte líquida (gelatina en solución). En el estudio también se encontró que existe influencia de la temperatura y tiempo de extracción en el rendimiento y fuerza de gel de gelatina obtenida a partir de piel de tollo (*Mustelus mento*), donde a mayores tiempos de extracción mayor rendimiento de gelatina (27-28%).

Solari y Córdova (2015) reportaron que, la extracción de colágeno provenientes de residuos del procesamiento de anchoveta, resulta una fuente alternativa que puede generar valor agregado a estas fuentes. El porcentaje de proteínas encontrado en el colágeno extraído de residuos fue de 87.6%. Cabe recalcar que para este proceso se realizó un tratamiento con NaOH 0.1N durante 6 horas a los descartes para la remoción de proteínas no colagénicas, luego se sometió a lavados sucesivos para eliminar la soda y alcanzar pH cercano a la neutralidad. Luego la muestra fue sometida a un proceso de precipitación salina, dializado y liofilizado. Por otro lado, para la cuantificación del colágeno, los autores lo realizaron en base a la determinación de hidroxiprolina, cuyo valor obtenido fue de 52.9 mg/g para el colágeno extraído de la especie.

De acuerdo a Romero (2016), los niveles óptimos para la obtención de gelatina, provenientes de piel de perico (*Coryphaena hippurus*), con mayor valor de fuerza gel y rendimiento de extracción se dan a una temperatura 56,8 °C, tiempo 331 minutos y concentración de ácido cítrico 0,26 % (p/v). Para el autor el empleo de ácido cítrico tuvo como finalidad neutralizar el pH y facilitar el proceso de extracción, además de eliminar la formación de sales que pueden ocurrir por el lavado previo con NaOH. El rendimiento de extracción de proteína obtenido por el autor fue de 20.4%.

En la mayoría de estudios, se detalla que para la etapa de eliminación de proteínas no colagenosas se emplea hidróxido de sodio como pretratamiento para la extracción de colágeno. No obstante, un estudio realizado en piel de paiche ejecutado por Barrenechea (2017) se determinó que el uso de hidróxido de potasio 1N resulta eficiente como pretratamiento, ya que a dicha concentración se logró el desprendimiento de escamas al 100% y la hinchazón de la piel fue de dos centímetros y medio.

Por otro lado, para la lograr la neutralización, se planteó realizarlo sin el uso de ácidos orgánicos, para lo cual sometió las pieles a lavados consecutivos con agua destilada, llegando a un pH de 7.15 después de once lavados. En cuanto a tiempo y temperatura de extracción, los mejores valores de fuerza gel se obtuvieron a una temperatura de 70°C por un lapso de tres horas. El rendimiento obtenido fue de 7.11% en base a piel limpia con escamas.

Por otro lado, en el estudio realizado por Mamani (2018) en tarsos de pollo mediante hidrólisis alcalina, encontró que los parámetros óptimos para la extracción de colágeno se daban a una concentración de 0.25 M de hidróxido de sodio en un tiempo de 6 horas, el cual se trabajó a temperatura ambiente, mientras que el proceso de extracción se realizó a una temperatura constante de 80°C en un tiempo de 3 horas, con estos niveles logró obtener el mejor rendimiento, 11.21%. El autor menciona que es importante recalcar las condiciones ambientales a las cuales se trabajó el proceso de hidrólisis, ya que, al ubicarse a una altitud de 2230 msnm, el tiempo obtenido puede diferir cuando el proceso se lleve a cabo a nivel del mar.

Según Bhuiambar *et al.* (2019), el empleo de ácidos orgánicos en la extracción de colágeno soluble en ácido presenta un efecto favorable en cuanto a la solubilidad y rendimiento. El pretratamiento utilizado en el estudio fue con NaOH a 0.1M por 36 h, luego las pieles fueron lavadas con agua desmineralizada para remover los restos de solución alcalina. Para el proceso de extracción se empleó diferentes ácidos orgánicos como acético, cítrico, láctico, tartárico y fórmico; y ácidos inorgánicos como clorhídrico y sulfúrico a diferentes tiempos: 24h, 48h y 72h.

En la Figura 7, se puede observar que el ácido láctico fue el que presentó un mayor rendimiento respecto a los demás y el efecto del empleo de ácidos inorgánicos mostraron un rendimiento insignificante. También demostraron que, a un mayor tiempo de exposición en el ácido, la solubilidad del colágeno presentó un mejor resultado. El autor menciona que una de las desventajas de usar ácido acético, pese a tener un alto grado de solubilidad, es la de agregar un olor rancio al colágeno.

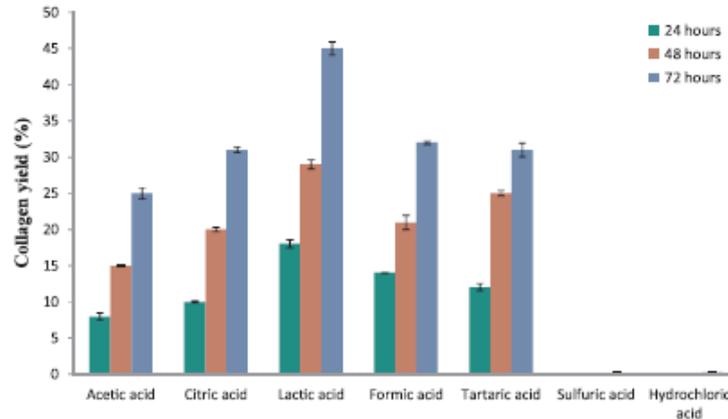


Figura 7: Efecto de ácidos orgánicos y el tiempo de extracción sobre rendimiento del colágeno

Fuente: Bhimbar *et al.*, 2019

En el estudio realizado por Sadowska *et al.* (2002), menciona que, para obtener condiciones óptimas de colágeno extraído con un color apto e inodoro en pieles de bacalao, el uso de ácido cítrico en comparación del ácido acético ayuda a inhibir el desarrollo parcial del olor a rancio a las soluciones de colágeno. Por otro lado, el empleo de ácido acético deja un olor característico del ácido en el producto, por lo cual no es recomendable su uso. Asimismo, demostraron que la solubilidad del colágeno depende tanto de la concentración del ácido como la relación piel: ácido que se emplee.

En la Figura 8 se puede observar que la solubilidad del colágeno aumenta conforme es más elevado la proporción de piel-ácido. La línea inferior representa a pieles enteras tratadas con el ácido durante 24 horas, y la línea superior a pieles picadas bajo el mismo tratamiento.

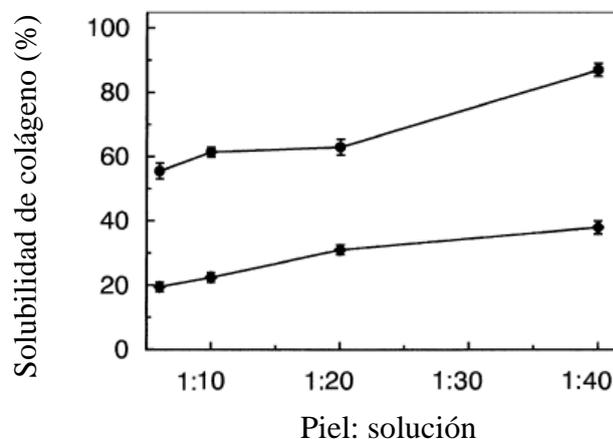


Figura 8: Efecto de la proporción piel: solución ácido en la solubilidad del colágeno

Fuente: Sadowska *et al.*, 2002.

Como se puede observar en la mayoría de reportes, se indica que la temperatura adecuada de trabajo, antes del proceso de extracción, es de 4°C a menos que se indique lo contrario, con el fin de evitar al máximo la contaminación y proliferación de microorganismos. Se observa que, aunque el proceso de extracción a nivel de laboratorio consta de etapas relativamente sencillas, el estudio de cada etapa requiere un análisis cuidadoso de cada una de las variables que intervienen en ellas (Serrano. 2011).

En la Tabla 8, se puede apreciar un resumen de los diferentes tratamientos, métodos de extracción y rendimiento obtenido de cada estudio realizado en organismos acuáticos. Como se puede observar, la mayoría de estudios han sido realizados tomando como materia prima la piel del pescado y otros residuos como escamas, más en la literatura la información sobre estudios realizados en las cabezas de pescado, es escasa.

Tabla 8: Tratamiento, método de extracción y rendimiento de colágeno extraído de diversas fuentes de organismos acuáticos

Autor	Especie	Parte	Pre tratamiento			Extracción	Rendimiento	Hyp
			Químico	Condiciones	Neutralización			
Miano <i>et al.</i> , 2014	Tollo	Piel	NaOH 0.1N	T° = 10°C Tiempo= 48 h 1:3 (p/v)	HCL 0.5 N	Tiempo= 4 h T° = 77.5°C	29.8%	-
Solari A. y Córdova J., 2015	Anchoveta	Residuos (espinas, espinazos y escamas)	NaOH 0.1N	T° = 4°C Tiempo= 6 h	Agua	Ác acético 0.5M por 2 días	-	52.0 mg/100g en colágeno
Romero R. 2016	Perico	Piel	NaOH 0.05M	T° = 10-12°C Tiempo= 6 h 1:5 (p/v)	Ac cítrico 0.025 M	Tiempo= 5 h 31 min T° = 56.8°C	20.4%	7.90 g/ 100g colágeno
Barrenechea J. 2017	Paiche	Piel	KOH 1N	T° = ambiente Tiempo= 12 h 1:5 (p/v)	Agua destilada	Tiempo= 3 h T° = 70°C	7.11%	-
Bhuimbar <i>et al.</i> , 2019	Varios	Residuos	NaOH 0.1 M	T° = 4°C Tiempo= 36 h 1:3 (p/v)	ác láctico 0.5M	Tiempo= 72 h T° = 4°C	45%	4.83 mg/100g colágeno

Fuente: Elaboración propia

2.5.6 Cuantificación del colágeno

Como se mencionó anteriormente, la cuantificación de colágeno puede efectuarse por el contenido de hidroxiprolina, existiendo diferentes métodos para realizarlo como, por ejemplo, cromatografía por columna. Sin embargo, el método más empleado es un ensayo colorimétrico basado en la reacción de hidroxiprolina oxidada con p-dimetilaminobenzaldehído (reactivo de Ehrlich).

El contenido de hidroxiprolina proveniente de especies marinas que habitan en ambientes fríos es menor comparado al que viven en ambientes cálidos; además presentan una menor estabilidad térmica (Serrano. 2011).

El colágeno puede presentar una variación marcada en la composición de aminoácidos, en especial los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, la cantidad de esta última depende del medio ambiente en el cual habita la especie. Por esta razón es importante determinar la temperatura de desnaturalización del colágeno, así como también controlar la temperatura durante el proceso (Serrano. 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

La investigación se llevó a cabo dentro de las instalaciones de los laboratorios de Procesos y Química de Recursos Hidrobiológicos de la Facultad de Pesquería, en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2 Materiales y Equipos

3.2.1 Materia prima

La materia prima empleada fueron las cabezas de paiche proporcionada por la empresa Silver Corporation S.A.C., ubicada en Satipo, Junín.

3.2.2 Materiales de vidrio

- Vasos de precipitación de 50 ml, 100 y 500 ml.
- Matraces volumétricos de 100 y 1000 ml.
- Matraz Kitasato.
- Papel de filtro.
- Baguetas.
- Probeta de 50 ml.
- Pipeta de 5 ml.
- Peras decantadoras de 500ml y 1000 ml.
- Fiolas de 500 y 1000 ml.
- Placas Petri.

3.2.3 Otros materiales

- Bolsas de polietileno, paños de limpieza, papel toalla, jabón desinfectante, detergente.
- Fuentes, cuchillos de acero inoxidable, tabla de picar, guantes, hielo, agua destilada, agua potable.

3.2.4 Reactivos

- Hidróxido de potasio químicamente puro marca Merck..
- Ácido sulfúrico (97% p/v) marca J.T Baker.
- Catalizador de sulfato de potasio (97% p/p) marca J.T Baker.
- Indicador de Tashiro (rojo de metilo y azul de metileno) marca J.T Baker.
- Éter etílico o de petróleo, o hexano marca J.T Baker.
- Sulfato cúprico (3% p/p) marca J.T Baker.
- Ácido cítrico 0.025 M marca Sigma.
- Solución acuosa de ácido clorhídrico al 50% v/v marca J.T Baker.
- Solución concentrada de hidróxido de sodio marca Merck.
- Alcohol isopropílico puro marca Merck.
- Albúmina de suero bovino (BSA) marca Sigma.
- Solución acuosa de cloramina T al 10.5% (p/v) marca Sigma-Aldrich.
- Solución acuosa de ácido perclórico al 17.5% marca Merck.
- Solución de p-dimetilaminobenzaldehído (P-DAB) al 5% marca Merck.

3.2.5 Equipos

- Balanza analítica, marca Sartorius TE 214S, con carga máxima de 210 g, cuya precisión es de 0.1 mg (País de procedencia: Alemania).

- Balanza digital, marca Superss 3S/New Su, con carga máxima de 15 kg, cuya precisión es de 2 g.
- Potenciómetro, marca HANNA.
- Baño maría, marca Memmert, modelo WNB 45, temperatura de 20-95°C. (País de procedencia: Alemania).
- Termómetro digital (marca DIGITRON).
- Refrigeradora doméstica (marca: ELECTROLUX).
- Secador (MLM BSU 100).
- Centrifugadora International equipment CO (País de procedencia: Estados Unidos).
- Espectrofotómetro de dos celdas. Marca: Hitachi (País de procedencia: Japón).

3.3. Metodología experimental

En la Figura 9 se muestra el flujo general, que se utilizó para la obtención de colágeno a partir de la cabeza del paiche (*Arapaima gigas*). y el desarrollo de cada una de las operaciones.



Figura 9: Flujo general para la obtención de colágeno a partir de cabeza de paiche

a) Recepción de la materia prima

La materia prima empleada en el presente estudio fueron las cabezas de paiche, las cuales fueron recepcionadas y congeladas hasta su posterior uso, se realizó una evaluación organoléptica para verificar el estado de frescura.

b) Lavado I

Se realizó el lavado de forma manual para retirar las impurezas o restos físicos presentes en la materia prima.

c) Cortado

Se procedió a recortar la parte del tejido blando de la cabeza limpia con un cuchillo de acero inoxidable, los recortes presentaron un peso aproximado de 50 gr.

d) Lavado II

Se realizó un segundo lavado con agua potable durante 30 minutos con la finalidad de remover los restos de sangre y escamas.

e) Macerado

Se procedió a sumergir los recortes limpios, obtenidos del tejido blando de la cabeza, en una solución de hidróxido de potasio (KOH) a 1M a tres diferentes tiempos, en esta fase se evaluó cual brindó un mejor volumen de hinchamiento. La proporción peso tejido blando: volumen solución maceración fue de 1:5 (p/v).

La concentración del hidróxido de potasio se tomó de referencia a lo trabajado en la investigación realizada por Barrenechea (2017), quien empleó KOH a 1N para macerar pieles de paiche, el cual en la presente investigación se optó por convertirlo a molaridad para trabajar en las mismas condiciones que la concentración del ácido cítrico trabajado para la neutralización, siendo esta 1M.

f) Neutralizado

En esta etapa se realizó el lavado con agua a fin de remover los residuos de la solución alcalina y posterior a ello se neutralizó con una concentración de ácido cítrico 0.025 M. Esta etapa tiene como finalidad eliminar la formación de sales y facilitar la etapa de extracción.

g) Extracción

Una vez logrado el pH cercano al neutro se procedió a la extracción empleando un vaso precipitado con un volumen de agua 5 veces mayor que la muestra (1:5), posteriormente los recipientes se pusieron en baño maría con temperatura controlada. Las condiciones de extracción se llevaron a cabo en función a 2 variables de estudio: temperatura (70 y 80°C) y tiempo (1, 2 y 3 horas) a fin de medir la variable respuesta: rendimiento de extracción de colágeno. Finalizado la extracción se separó la parte líquida, quedando tejidos no disueltos con pequeñas incrustaciones de cartílago que no se pudo separar al momento de preparar la muestra.

h) Centrifugado y Filtrado

Una vez obtenido el mejor resultado a tiempo y temperatura adecuada, el colágeno extraído se sometió a un proceso de centrifugado, a 3000 rpm por 20 min, con la finalidad de separar pequeñas partículas que no corresponden al colágeno. Luego las muestras fueron filtradas usando papel filtro Whatman N° 40 empleando el matraz Kitasato, esta operación fue realizada con el fin de asegurar que se separe todos los sólidos que pudiesen quedar en la solución.

i) Secado

Se realizó por medio de un secador con aire forzado a una temperatura de 50 °C por un tiempo de 7 horas, para ello la solución filtrada fue puesta en bandejas de 37 cm de largo, 25 cm de ancho y 1.5 cm de alto colocando en cada bandeja una solución de colágeno de aproximadamente 250 ml, formando así láminas delgadas. Este proceso se realizó a fin de eliminar el contenido de agua del producto y evitar su deterioro.

j) Molienda

Las láminas obtenidas fueron molidas utilizando una licuadora convencional y posteriormente con un mortero hasta obtener colágeno en polvo con un tamaño aproximado de partícula de 0.4 mm. Este proceso se realizó con la finalidad de obtener un producto homogéneo.

k) Envasado

El producto final se almacenó en bolsas de polietileno para evitar la hidratación del producto, luego fueron envasadas al vacío para ser conservar la calidad del producto por un mayor periodo de tiempo.

l) Almacenado

El producto final se almacenó en un ambiente seco.

3.3.1 Determinación del tiempo de maceración en solución de hidróxido de potasio (KOH) a 1M

El objetivo del ensayo experimental fue determinar el tiempo adecuado de inmersión de los recortes en la solución de hidróxido de potasio, a diferentes tiempos: 6H (T1), 9H (T2) y 12H (T3). Para lo cual se evaluó el índice de hinchamiento que presentó cada muestra en cada tratamiento, y se escogió el mejor tratamiento. Este índice fue tomado como referencia del estudio realizado por Barrenechea (2017), quien en su propuesta de extracción de colágeno a pieles de paiche, plantea que bajo una concentración de hidróxido de potasio a 1N, se puede escoger el mejor tratamiento de maceración. Si bien, el autor refiere a pieles, y las muestras de este estudio corresponde a recortes de tejido blando de la cabeza de paiche, se evalúa el mejor tratamiento en base al similar fundamento planteado por el autor.

La evaluación del índice de hinchamiento se realizó adaptando lo reportado en el trabajo de investigación realizado por Barrenechea (2017), para lo cual en vez de evaluar el hinchamiento a través del espesor se realizó en función al volumen ocupado. Este índice se evaluó del cociente entre el volumen final y volumen inicial de la muestra antes y después de ser sometida a pretratamiento (maceración), tomando como referencia al volumen inicial ocupado por la muestra en la probeta antes del pretratamiento y el volumen final se midió como el volumen ocupado por la muestra en la probeta luego del pretratamiento, en la Figura 10 se puede observar la medición efectuada.



Figura 10: Medición de índice de hinchamiento en muestras con tratamiento con solución KOH 1 N

3.3.2 Determinación de la temperatura y tiempo de extracción de colágeno en los recortes

Se realizó la medición a diferentes temperaturas, 70 °C (T1) y 80 °C (T2), tomando como intervalos de tiempo: 1, 2 y 3h. Se tomó como variable respuesta el rendimiento de colágeno extraído, expresado como el peso seco de la gelatina. El resultado obtenido de cada tratamiento se analizó mediante un diseño completamente al azar (DCA).

En esta etapa se sometieron las muestras previamente maceradas y neutralizadas, obtenidas del mejor resultado que brindó la primera etapa (Maceración con KOH a 1M por 12 h). El experimento se realizó en una proporción recorte de tejido blando: agua de 1:5 (%p/v), sometiéndose a 2 temperaturas distintas (70 °C y 80 °C) en 3 diferentes tiempos (1, 2 y 3 h).

3.3.3. Diseño experimental.

El presente trabajo de investigación se realizó teniendo en cuenta la matriz experimental mostrada en la Figura 11.

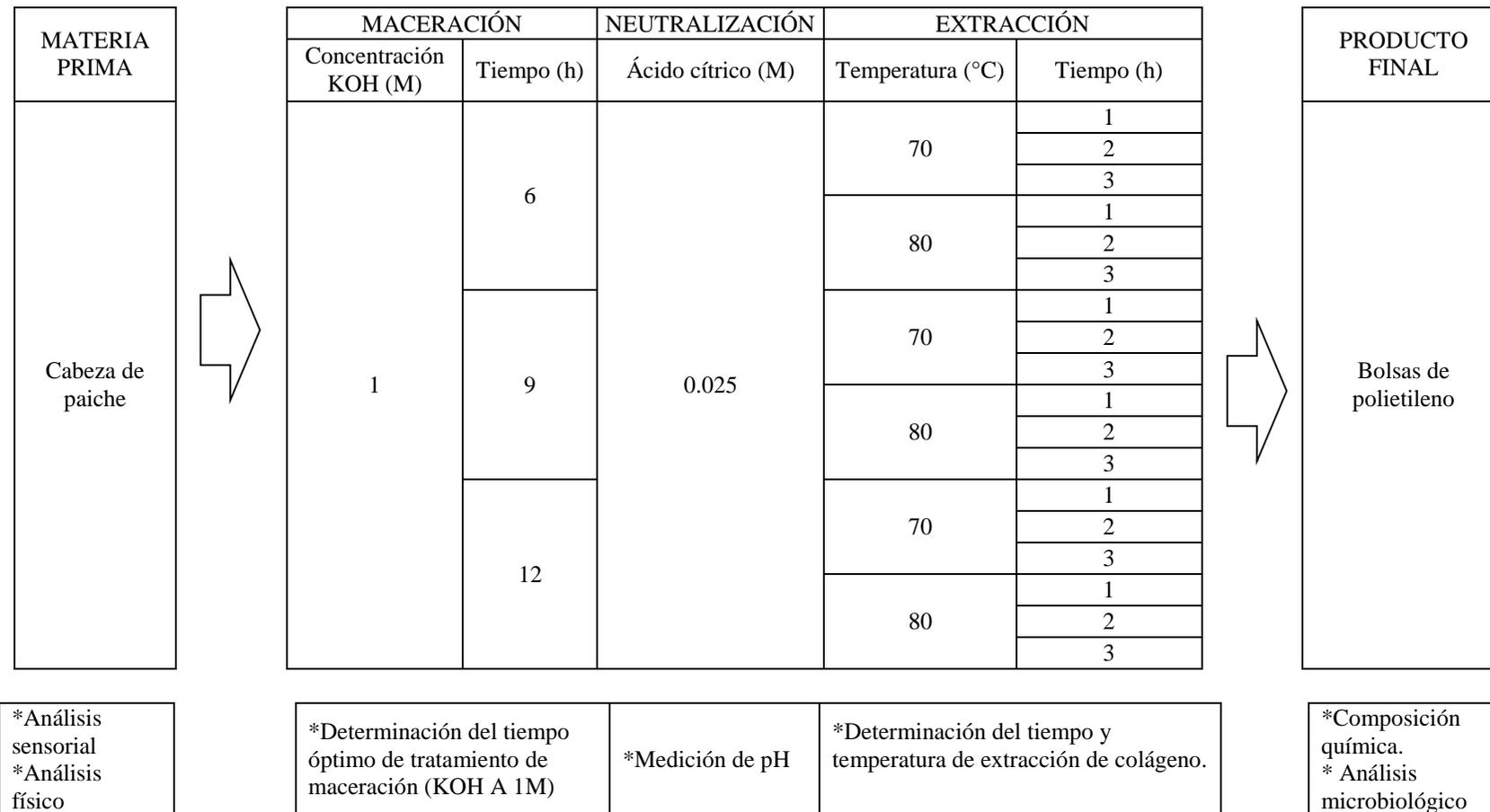


Figura 11: Diseño experimental para la extracción de colágeno a partir de la cabeza de paiche

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Materia prima

- **Análisis sensorial**

Las cabezas de paiche fueron evaluadas sensorialmente según las características de olor, color, textura y apariencia general, adaptando la tabla de evaluación sensorial propuesto por Alcántara *et al.* (2006), para las muestras en estudio. En la Tabla 9 se puede observar los ítems evaluados.

Tabla 9: Evaluación sensorial en cabezas de paiche

CARACTERÍSTICA	ASPECTO	PUNTAJE
Apariencia	Muy brillante	3
	Brillante	2
	Opaco	1
Olor	Ligero olor a algas frescas	3
	Ligero a tierra, lodo	2
	Pronunciado a pútrido	1
Branquias	Rojo brillante	3
	Ligeramente decolorado	2
	Color decolorado	1
Opérculos	Ausencia de coloración rojiza	3
	Bordes inferiores rojizos	2
	Bordes inferiores muy rojizos	1

Tabla 10: Escala de calificación de evaluación organoléptica en cabezas de paiche

CALIFICACION	PUNTAJE
BUENO	9-12
REGULAR	5-8
MALO	1-4

- **Análisis físico**

Se realizó la medición de longitud de la cabeza de las diferentes muestras, y el peso promedio de las mismas. Asimismo, se describió la composición física de la cabeza de paiche, tomando en cuenta la piel, huesos, agallas y otros restos.

$$\text{Composición (\%)} = \frac{\text{Peso W}}{\text{Peso M.P}} \times 100$$

Donde:

W: Peso en gramos de remanentes como piel, huesos, agallas, etc.

M.P: Peso en gramos de la materia prima (cabeza de paiche).

3.4.2 Producto final

- **Análisis microbiológico**

- Coliformes totales, ICMSF (1983)
- Mohos y levaduras, ICMSF (1983)
- *Staphylococcus aureus*, ICMSF (1983)

- **Análisis químico**

Los análisis de composición proximal se realizaron según los procedimientos propuestos por la Association of Official Analytical Chemists International (A.O.A.C., 2005). Los ensayos serán los siguientes :

- Humedad (A.O.A.C. 950.46)
- Proteína total (A.O.A.C. 984.13)
- Grasa cruda (A.O.A.C. 920.39)
- Ceniza (A.O.A.C. 942.05)

- **Rendimiento del producto final**

Se calculó el rendimiento en base al producto final obtenido (colágeno seco en polvo) con respecto al peso húmedo de los recortes frescos provenientes del tejido blando de la cabeza de paiche, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento producto final (\%)} = \frac{\text{Peso del producto final} \times 100}{\text{Peso húmedo de recortes frescos}}$$

- **Índice de hinchamiento**

Se evaluó como el cociente entre el volumen final y volumen inicial de la muestra antes y después del pretratamiento.

$$\text{Índice de hinchamiento} = \frac{V_f \text{ después del pretratamiento}}{V_i \text{ antes del pretratamiento}}$$

- **Determinación de hidroxiprolina**

Se realizó de acuerdo al método de cuantificación del contenido de hidroxiprolina según los procedimientos descritos por la A.O.A.C. (990.26) (A.O.A.C., 2005), considerándose los siguientes pasos:

- Se hidrolizaron las muestras obtenidas con HCl al 50% v/v, se procedió a ajustar el pH de la solución a un valor entre 6 y 7 con NaOH 1 N.
- De la solución preparada se agregó 1 ml de solución oxidante (cloramina T y tampón fosfato pH=6).
- Se procedió a agitar la muestra y posterior a ellos, se agregará 3 ml de ácido perclórico 17.5% con una solución p-dimetilaminobenzaldehído al 5%.
- La solución anterior se mezcló y calentó a 60°C durante 20 min.
- Se dejó enfriar y finalmente se midió la absorbancia a 560 nm.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Análisis físico sensorial

De acuerdo a los resultados obtenidos de la evaluación sensorial de cabezas de paiche, utilizando la Tabla 9 propuesta por Alcántara *et al.* (2006) adaptada para esta materia prima, las cabezas de paiche evaluadas para el proceso de extracción de colágeno se encuentran en una calificación de “Bueno”, puesto que las cabezas recepcionadas presentaban una apariencia brillante, olor ligero a algas frescas, branquias ligeramente decoloradas y los opérculos en su mayoría presentaban ausencia de coloración rojiza, obteniendo así un puntaje de 10 puntos como se muestra en la escala presentada en la Tabla 10.



Figura 12: Cabeza de paiche

La longitud y peso promedio de las cabezas de paiche que se utilizaron fue de 23 cm y 2.11 Kg respectivamente, de acuerdo a lo mencionado por Alcántara *et al.* (2006), el peso de la cabeza representa aproximadamente el 10% del peso del paiche entero, por lo cual se puede inferir que las muestras de paiche entero se encontraban en peso aproximado de 20 kg.

De acuerdo a Del Águila (2010), el paiche alcanza su madurez con un peso de 40 a 45 kg y una longitud total entre 1.60 a 1.85m. A su vez, García (2010) citado por Sosa (2017), menciona que la especie puede alcanzar los 10 kg en el primer año de vida, por lo que se puede inferir que las especies empleadas para este estudio se encontrarían en su etapa juvenil.

En la Tabla 11 se puede observar la composición física aproximada de las cabezas de paiche, si bien existe bibliografía sobre la composición del cuerpo total de la especie (cabeza, vísceras, piel, filete, otros restos), aún no existe una revisión bibliográfica sobre la composición de la cabeza del paiche.

Tabla 11: Composición física porcentual promedio de la cabeza de paiche, obtenida a partir de 10 muestras

Componente físico de la cabeza del paiche	Peso kg	Composición %
Escamas	0.100	5
Agallas	0.316	15
Huesos	0.679	32
Carne	0.393	19
Tejido blando	0.623	29
Total (Entero)	2.11	100

Para realizar la extracción de colágeno sólo se consideró emplear el tejido blando (29%) separado de la cabeza del paiche.

4.2 Determinación del tiempo de maceración en solución de hidróxido de potasio (KOH) a 1M

Para la determinación del tiempo más adecuado de maceración en solución de hidróxido de potasio 1M, se evaluó el índice de hinchamiento en cada muestra, generado después de someterse a tratamiento. Los recortes fueron previamente lavados, para así evitar efectos en la calidad de colágeno, ya que si no se realiza una adecuada limpieza la solución alcalina no puede penetrar correctamente en la muestra (Serrano, 2011).



Figura 13: Muestras limpias antes del tratamiento

Los resultados obtenidos con un tiempo de maceración a 6 h, no presentaron resultados favorables, puesto que, en base al índice de hinchamiento, las muestras evaluadas a este tiempo obtuvieron un valor similar al volumen inicial ocupado por la muestra, siendo este valor de 5cm^3 .

Como se observa en la Tabla 12 las muestras evaluadas a las 6 horas de maceración y a diferente proporción tejido blando: solución macerada (1:3, 1:5 y 1:7) , lograron alcanzar un volumen final de 5.5 cm^3 y 6 cm^3 , lo cual nos indica que a medida que va aumentando el volumen de la solución, también va aumentando el índice de hinchamiento, llegando a un valor máximo de 1.2 (20%)

Tabla 12: Índice de hinchamiento a diferentes tiempos y proporción muestra: solución durante la maceración

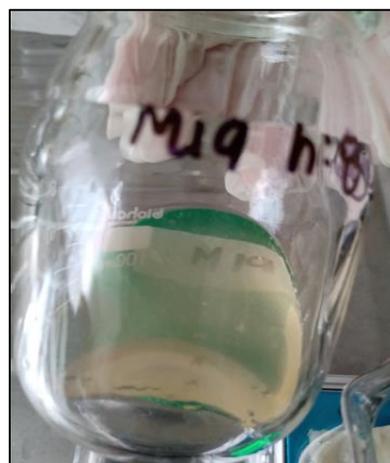
Tiempo de maceración (h)	Relación tejido blando: solución		
	1:3	1:5	1:7
6	1.1 (10%)	1.2 (20%)	1.2 (20%)
9	1.3 (30%)	1.4 (40%)	1.4 (40%)
12	1.4 (40%)	1.6 (60%)	1.6 (60%)

Las muestras sometidas a maceración durante 9 horas, lograron alcanzar un volumen final de 6.5 cm^3 y 7 cm^3 , lo cual representa un índice de hinchamiento entre **1.3 (30%) a 1.4 (40%)**. Las características que presentaron después del tratamiento fueron que las muestras presentaron una coloración más blanquecina conforme aumentaba el tiempo de tratamiento, esto ocasionado por la despigmentación de las muestras frente a la acción del hidróxido, además se observó que cada tratamiento presentó una capa de líquido sobrenadante que fue la grasa saponificada (Figura 14).

Proaño *et al.* (2015), citado por Barrenechea (2017) indica presencia de un sobrenadante formado por la saponificación de las grasas, proceso que ocurre con la reacción química entre la grasa y una base, en este estudio la saponificación fue producida por el efecto del hidróxido de potasio.



(a) Muestra macerada a 6 horas



(b) Muestra macerada a 9 horas

Figura 14: Muestras después del tratamiento

Barrenechea (2017), menciona en su estudio que durante la etapa de maceración se logró observar presencia de grasa en la solución tornándose esta de un color más oscuro, con lo cual pudo determinar que el efecto del hidróxido de potasio en las muestras puede actuar como un agente blanqueador.

Los resultados obtenidos a las 12 horas de tratamiento, fueron superior a lo obtenido en los tratamientos anteriores, se logró alcanzar un índice de hinchamiento entre **1.4 (40%) a 1.6 (60%)**. Las muestras presentaron un aspecto más blanquecino conforme avanzaba el tiempo de pretratamiento, y se observó mayor presencia de grasa saponificada que aquellas maceradas durante 6 y 9 horas.

En la Figura 15 se puede observar el proceso de desprendimiento de grasa del tejido blando, esto debido a que la solución alcalina reacciona con la grasa formando una capa en la superficie de la solución de macerado, simultáneamente despigmentar la muestra tratada.



Figura 15: Presencia de grasa en la solución

Por otro lado, Shyni *et al.* (2014) citado por Romero (2016), menciona que la acción de un álcali permite eliminar pigmentos no deseados en la solución. Para la presente investigación se demostró que con el efecto del hidróxido de potasio se logra realizar la decoloración en el tejido blando, que pese a no ser una etapa establecida en el procedimiento de esta investigación, contribuyó a eliminar compuestos no deseados en el producto final.

De los resultados obtenidos se optó por seleccionar las muestras maceradas con hidróxido de potasio 1M a 12 horas y una relación muestra/ solución de 1:5, la cual coincide con los resultados obtenidos por diversos autores quienes emplearon una solución de maceración similar, como en el estudio realizado por Romero (2016) quien empleó en la etapa de pretratamiento para pieles de perico una relación de peso/volumen 1:5 y Barrenechea (2017) que trabajó con una relación de peso/volumen de 1:5 para pieles de paiche. Con esta información se definió la relación tejido blando: solución de macerado, observándose que mientras más alto es la proporción de volumen de solución de la maceración, las muestras lograban alcanzar un mayor índice de hinchamiento.

Para la evaluación del mejor tratamiento de maceración se tomó en cuenta el índice de hinchamiento generado por distintos tiempos de exposición frente a la solución alcalina, encontrando que a 12 horas de tratamiento se logró alcanzar un mayor índice de hinchamiento tal como se muestra en la Figura 16.

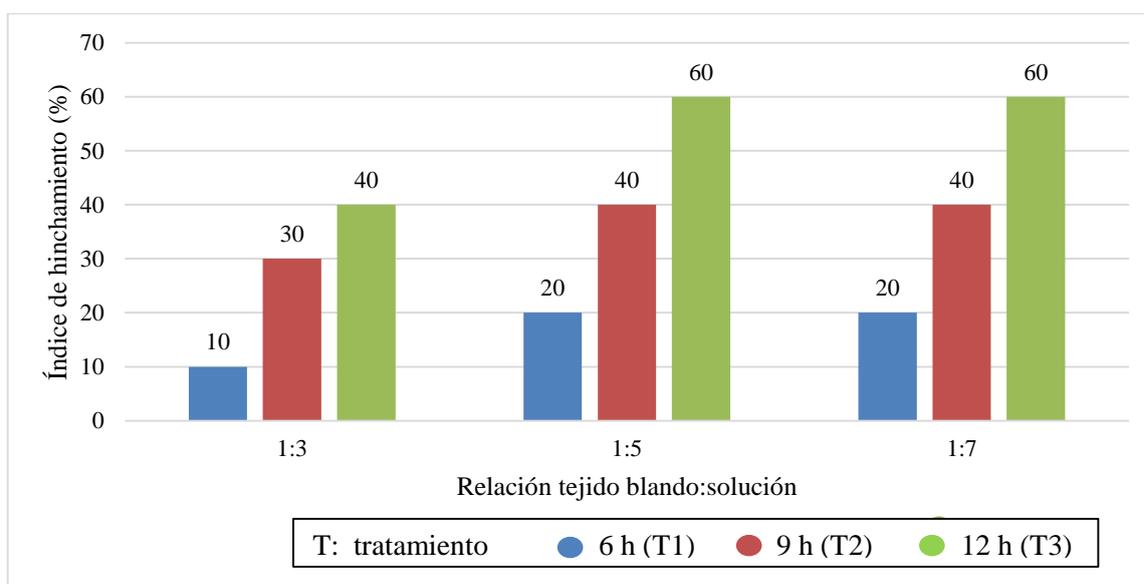


Figura 16: Efecto del tiempo de maceración en el índice de hinchamiento (%) en tejido blando de la cabeza de paiche

Asimismo, se observó que la relación tejido blando: solución 1:5 y 1:7 presentaron similares resultados luego del tratamiento, por lo cual por temas de ahorro del recurso agua se optó por escoger la proporción 1:5.

Luego de realizar la etapa de pre tratamiento y determinar que a 12 horas de macerado las muestras presentan un mejor índice de hinchamiento, se procedió a realizar la etapa de neutralización. Para esta etapa se empleó ácido cítrico como agente neutralizador.

Según Barrenechea (2017), menciona que realizar la etapa de neutralizado facilita la etapa de extracción. Asimismo, Wang *et al.* (2008), citado por Barrenechea (2017), mencionan que bajar el pH de la solución, cercano a la neutralidad, ayuda a aumentar el rendimiento del colágeno a extraer, porque éste se va a disociar en el líquido al formar puentes de hidrógeno con el agua, confiriéndole estabilidad a la proteína proveniente de la unión del hidrógeno del amino de un aminoácido (como la glicina o hidroxiprolina) y el oxígeno del carboxilo de otro. No obstante, también el rendimiento puede disminuir por las diferentes interacciones que pueden tener la proteína del colágeno, Estas interacciones (puentes de hidrógeno, interacciones entre iones, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals) pueden romperse o establecerse con gran facilidad por los cambios ocurridos en las condiciones del entorno como la variación del pH, pudiendo de esta manera también bajar la calidad del mismo.

Para el presente estudio se logró obtener un pH de 7.2, las muestras fueron acondicionadas en un recipiente con ácido cítrico a 0.025M por 3 horas en una relación tejido blando: solución de 1:5 (p/v). Para neutralizar primero se eliminó la solución de maceración, luego se adicionó la solución de ácido cítrico, el cual tenía un pH de 3.2, finalmente se realizó un lavado las muestras con agua destilada para eliminar la formación de sales.

Para la concentración de ácido cítrico elegida, se tomó como referencia los estudios realizados por Romero (2016), quien en su investigación de extracción de colágeno en pieles de perico empleó una concentración de 0.025M para obtener un pH neutro luego de la etapa de maceración. Por otro lado, Silvera (2018) empleó una concentración de ácido cítrico 0.05M para la neutralización en pieles de tilapia. Ambos autores refieren que es necesario una etapa posterior de enjuague para poder eliminar la formación de sales.

En la Tabla 13 se observa el pH alcanzado en la neutralización (7.2) a una temperatura del medio ambiente (20°C).

Tabla 13: Lectura promedio de pH a muestras neutralizadas

Muestra	pH	T ambiente °C
Tejido macerado	13.6	20.0.
Tejido neutralizado y lavado con agua destilada.	7.2	20.0

En la mayoría de estudios realizados para extracción de colágeno, el agente neutralizador que se emplea son los ácidos inorgánicos como el clorhídrico y acético; en este estudio se usó un ácido orgánico como el ácido cítrico y se logra acondicionar las muestras hasta obtener un pH cercano al neutro.

4.3 Determinación de la temperatura y tiempo de extracción de colágeno en los recortes

Para escoger el mejor resultado de esta etapa, se evaluó el mejor rendimiento obtenido después de cada extracción, para lo cual se extrajo una alícuota de 5 ml de cada extracción y se llevó a secar por medio de la estufa para calcular el peso de gelatina en seco.

En esta etapa se observó que la muestra no se disolvía por completo a temperatura (70°C) y tiempos menores (1 h). Sin embargo, a mayor temperatura (80°C) y tiempo mayor (3h), se observó que la muestra lograba disolverse en mayor porcentaje; el residuo generado estuvo compuesto por pequeños trozos de tejido no hidrolizables entre los cuales estaría presente la elastina.

En la Figura 17 se observa los recortes de tejido blando listos para la extracción, los cuales fueron sometidos a agitación constante por intervalos de 1 hora.



Figura 17: Recortes de tejido blando en etapa de extracción

En la Tabla 14 se puede observar como el rendimiento varía conforme va aumentando la temperatura y tiempo de extracción. Las variables que otorgaron un mayor rendimiento para la extracción, de acuerdo a lo experimentado, son las que corresponden al tratamiento N°12 (T12) con una temperatura de 80 °C y tiempo de 3 horas.

Tabla 14: Rendimiento de la extracción de recortes de tejido blando a diferente tiempo y temperatura

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)	Promedio (%)
T1	70	1	10.96	10.08
T2	70	1	9.2	
T3	70	2	12.6	11.40
T4	70	2	10.19	
T5	70	3	12.48	12.09
T6	70	3	11.7	
T7	80	1	10.73	11.18
T8	80	1	11.62	
T9	80	2	12.92	11.96
T10	80	2	10.99	
T11	80	3	13.15	13.60
T12	80	3	14.04	

Para determinar el tiempo y temperatura óptima se empleó los porcentajes de extracción de colágeno. Se utilizó la prueba de ANOVA de dos vías, al tener dos factores analizados: Tiempo y temperatura. Se tomó en cuenta para la evaluación un nivel de significancia de 0,05.

4.4 Evaluación estadística

De la Tabla 15, según el análisis estadístico de ANOVA se puede observar que los parámetros evaluados, tiempo y temperatura, empleados para la extracción de colágeno no presentan una comparación significativa media.

Tabla 15: Resultados estadísticos del ANOVA del tiempo y temperatura evaluados para el proceso de extracción de colágeno

Pruebas de efectos Inter sujetos
Variable dependiente: Rendimiento (%)

Origen	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	Razón-F	Sig.
Modelo corregido	13,600 ^a	5	2,720	2,202	0,182
Intersección	1646,895	1	1646,895	1333,230	0,000
Temperatura	3,329	1	3,329	2,695	0,152
Tiempo	9,822	2	4,911	3,976	0,080
Temperatura * Tiempo	0,449	2	0,225	0,182	0,838
Error	7,412	6	1,235		
Total	1667,906	12			
Total corregido	21,011	11			

a. R al cuadrado = 0,647 (R al cuadrado ajustada = 0,353)

De acuerdo a la tabla 15 se aprecia que producto de la interacción entre la temperatura y el tiempo hubo un valor de significancia de 0,838. Este valor resulta superior al nivel de 0,05, por lo que se debe indicar que no existen diferencias significativas entre los rendimientos de extracción de colágeno, de acuerdo al tiempo y temperatura evaluados; por lo tanto, el tiempo y temperatura poseen valores no significativos sometido el tejido blando de la cabeza de paiche para obtener el colágeno.

En la Figura 18 se puede observar que el tratamiento con una temperatura de 80 °C y de tiempo de 3 horas tuvo un valor promedio mayor de porcentaje de colágeno extraído.

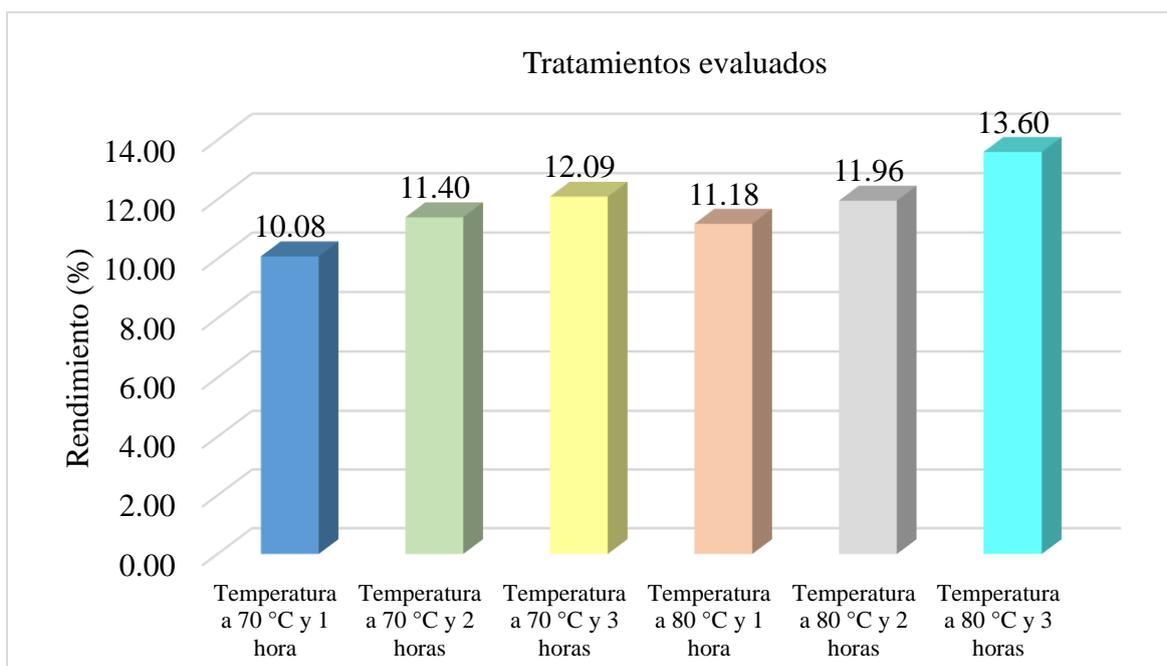


Figura 18: Rendimientos obtenidos a diferentes tiempos y temperaturas de extracción

Los resultados de este estudio concuerdan con los parámetros encontrados en el estudio realizado por Mamani (2018), quien pese a trabajar con diferente materia prima, tarsos de pollo, estableció que el mejor tiempo de extracción fue de 3 horas a una temperatura de 80 °C. Cabe indicar que el autor menciona que las condiciones del tiempo empleado en su investigación pueden variar debido a la altitud en que se realizó el proyecto.

Por otro lado, en el estudio realizado por Barrenechea (2017), se obtuvo un mejor valor de fuerza gel y rendimiento de colágeno a una temperatura de 70 °C por un tiempo de 3 horas. A su vez, Miano *et. al* (2014), menciona que la mejor temperatura de extracción de colágeno en pieles de tollo se logró a una temperatura de 77.5 °C por un tiempo de 4 horas logrando obtener un rendimiento de 29.8%, teniéndose así que a mayores temperaturas de extracción se obtiene un mejor rendimiento en la extracción de colágeno.

De acuerdo a lo expuesto, se puede concluir que a mayores tiempos de extracción se puede obtener mayores rendimientos, lo cual se puede corroborar con los resultados obtenidos en el presente estudio que demuestra que un mayor rendimiento de extracción de colágeno se obtuvo con una temperatura de 80 °C por lapso de 3 horas.

Después de haber encontrado el mejor resultado en la etapa de extracción, en este caso se logró a una temperatura de 80°C y 3 horas, el colágeno pasó a un proceso filtrado con papel filtro Whatman 40 y con ayuda de una bomba de vacío, esto con el fin de eliminar los residuos no colágenicos (Figura 19). El colágeno una vez filtrado se procedió a secar en bandejas para poder obtener láminas de colágeno.



Figura 19: Colágeno líquido obtenido después del filtrado

En la Figura 20 se observa el colágeno seco en láminas, este presentó un color ligeramente translúcido.



Figura 20: Colágeno seco en láminas

4.5 Caracterización del producto

4.5.1 Análisis físico-químicos

A continuación, en la Tabla 16, se presentan los resultados del análisis químico proximal del colágeno seco.

Tabla 16: Composición química proximal del colágeno seco

Análisis fisicoquímico	Resultado (g/100g)
Humedad (g/100g colágeno)	7.03 %
Proteínas (g/100g colágeno)	89.67 %
Grasa (g/100g colágeno)	0.76 %
Ceniza (g/100g colágeno)	1.46 %

Según Solari y Córdova (2015), en su investigación realizada al colágeno extraído de residuos de anchoveta obtuvieron un resultado de 8% de humedad, 87.6% de proteína, 0.3% de grasa y 0.7% de cenizas. Por otro lado, Barrenechea (2017) en su estudio realizado para la extracción de colágeno en pieles de paiche obtuvo un contenido de humedad de 7.7%, 89.5% de proteína, 0.7% de grasa y 0.4% de cenizas. Romero (2016), en su estudio realizado en obtención de colágeno a partir de pieles de perico obtuvo un resultado de 88.3% de proteína, 6.8% de humedad, 1% de grasa y 0.2% de cenizas.

Los resultados obtenidos en la presente investigación se encuentran dentro de los niveles establecidos por los autores anteriormente citados. Sin embargo, el método desarrollado puede ser optimizado aún, para mejorar la composición química final del producto, para así lograr reducir el contenido de cenizas.

4.5.2 Análisis microbiológico

Tabla 17: Resultado del análisis microbiológico del colágeno extraído

Ensayos	Resultado	Norma Sanitaria N.º 071- MINSA/DIGESA V.01 /Límites microbianos
N de Coliformes (NMP/g)	0	10 ²
N de Staphylococcus aureus (UFC/g)	10	10 ²
N de Mohos y Levaduras (UFC/g)	24	10 ²

En la Tabla 17 se puede observar que los resultados de los análisis microbiológicos se encuentran dentro del rango permisible establecido por la norma sanitaria, lo cual demuestra que los procedimientos efectuados durante toda la etapa de la extracción del colágeno se realizaron de manera inocua, pese a que la temperatura de trabajo se realizó a temperatura ambiente, siendo un medio propicio para la proliferación de bacterias.

4.5.3 Rendimiento

El rendimiento de extracción de colágeno a partir del tejido blando de la cabeza de paiche se calculó como la cantidad de colágeno obtenido dividida entre el peso de los recortes de tejido blando.

$$\text{Rendimiento producto final (\%)} = \frac{\text{Peso del producto final} \times 100}{\text{Peso húmedo de recortes frescos}}$$

$$R (\%) = \frac{73}{500} * 100$$

$$R (\%) = 14.63 \%$$

Según Karin y Bath (2009), citado por Quispe y Gutiérrez (2019); los rendimientos obtenidos para colágeno, en piel de pescados, oscilan entre los 6 y 19%. En la investigación realizada por Mamani (2018) en tarsos de pollo, obtuvo un rendimiento de 11.21% bajo similares condiciones de extracción que el presente trabajo, puesto que trabajó con temperatura de 80°C y tiempo estimado de 3 horas, pese a no ser la misma materia prima, el resultado fue similar.

En el trabajo realizado por Barrenechea (2017), en extracción de colágeno en pieles de paiche, se obtuvo un rendimiento de 7.11%, en el cual se trabajó a condiciones similares de extracción que en el presente trabajo.

Algunos de los factores que influyen en el rendimiento de extracción de colágeno son: el tipo de especie empleada, acondicionamiento previo a la extracción y las condiciones de extracción empleada tal como lo describe Karin y Bath (2009); citado por Quispe y Gutiérrez (2019) en su investigación de extracción de colágeno realizada en residuos de trucha.

Por lo que se puede concluir que los valores obtenidos en la extracción de colágeno a partir del tejido blando de cabeza de paiche comparado a lo obtenido en otras investigaciones, está dentro del rango establecido.

4.5.4 Determinación de hidroxiprolina

El contenido de hidroxiprolina en el tejido blando de cabezas de paiche en base seca fue de 11.3 g / 100 g muestra.

De acuerdo a lo expuesto por Bhuijbar (2019), el contenido de hidroxiprolina en una muestra atribuye que es exclusivamente de la proteína colágeno, por lo cual ayuda a estimar el colágeno cuantitativamente.

Romero (2016) obtuvo un valor de hidroxiprolina de 7.89 g/100gr a partir de la extracción de colágeno realizada en pieles de perico. Sin embargo, para fines de comparación el autor también obtuvo el valor de hidroxiprolina en las pieles antes del tratamiento, obteniendo un valor de 6.49 g/100g.

El valor de hidroxiprolina de 11.3 g/100 g del producto en seco (colágeno en polvo) fue superior a los estudios mencionados, el cual posiblemente se debe al tratamiento con solución alcalina lo que permitió eliminar las proteínas no colagénicas según Solari y Córdova (2015).

Según Ramírez *et al.* (2013); citado por Quispe y Gutiérrez (2019), el contenido de hidroxiprolina presente en el colágeno de organismos marinos es de 11.4 g/100 g, dicho valor se asemeja a lo obtenido en la presente investigación el cual fue de 11.3mg / 100g. Sin embargo, resulta superior a lo obtenido en la investigación realizada por Romero (2016), quien obtuvo un valor de 7.89 g/100g en pieles de perico. Esto puede atribuirse al empleo de distinta materia prima ya que según Arnesen y Gildberg (2005) el colágeno y gelatina extraído de peces de aguas frías suelen presentar un menor contenido de prolina e hidroxiprolina que las especies de aguas más cálidas.

Lo expuesto anteriormente concuerda con lo enunciado por Torres Arreola (2008) quien menciona que uno de los factores que influye en el contenido de colágeno en músculo de pescado es la temperatura del agua del medio en donde viven, ya que un mayor contenido de colágeno fue encontrado en especies que habitan en aguas de temperaturas más elevadas. Así, el paiche al ser una especie que habita en aguas cálidas obtuvo un mayor valor de hidroxiprolina que el perico, que es una especie que habita en aguas frías.

V. CONCLUSIONES

- Las operaciones seguidas para obtener el colágeno de la cabeza de paiche en esta investigación fue: recepción de materia prima, lavado I, cortado, lavado II, macerado, neutralización, extracción, centrifugado/filtrado, secado, molienda, envasado y almacenado.
- La composición física de la cabeza de paiche estuvo compuesta por un 29% de tejido blando, 19% de carne, 32% de huesos, 15% de agallas y un 5 % de escamas.
- El índice de hinchamiento del producto obtenido utilizando una proporción de tejido blando: solución de maceración de 1:5 fue de 1.6 (60%)
- Los parámetros de tiempo de maceración, temperatura y tiempo de extracción del colágeno a partir del tejido blando de las cabezas de paiche fue de : maceración de 12 horas y la extracción a una temperatura de 80 °C por un tiempo de 3 horas; Parámetros con el cual se obtuvo el máximo rendimiento.
- El rendimiento de colágeno de materia prima a producto fue de 14.63% en base seca.
- La composición química proximal del colágeno seco obtenido del tejido blando de las cabezas de paiche, presentó una humedad de 7.03%, contenido proteico de 89.67%, 1.46% de cenizas y 0.76% de grasas.
- La hidroxiprolina del colágeno obtenida a partir del tejido blando de cabeza de paiche fue de 11.3 g hidroxiprolina/ 100g muestra o 113 mg/g de muestra

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un perfil de aminoácidos presentes en el colágeno extraído con el fin de definir su composición exacta.
- Realizar el proceso de hidrolizado del producto.
- Promover la utilidad del colágeno extraído en polvo en la industria alimentaria con el fin de brindar un valor agregado a estos residuos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, M.; Kumar, A.; Patel R. (2020). Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea food waste. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18, 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100315>.
- Alcántara, F; Wust, W; Tello, S; Rebaza, M; Del Castillo, D, (2006). Paiche: El Gigante del Amazonas. (En línea). Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. 70 PP.
- A.O.A.C. (2005). Official Methods of the Association of Official Agricultural Chemist's International. 18th. Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Arnesen, J., & Gildberg A. (2005). Extracción y caracterización de gelatina en piel de salmón del atlántico (*Salmo salar*). *Bioresource Technology*, 98(1), 53-57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.021>.
- Barrenechea, E. (2017). Aprovechamiento de la piel de paiche (*Arapaima gigas*) para la obtención de colágeno. Tesis Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. 78 pp.
- Badii, F., & Howell, N. (2005). Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 630-640. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.06.006>.

- Bhumbar, M; Bhagwat, P; Dandge, P. (2019). Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(2), 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102983>.
- De la Torre, G. (2013). Obtención de colágeno y su efecto como capa protectora edible utilizando nisina como preservante en productos cárnicos y quesos. Tesis para optar el título de ingeniero químico. Universidad de Guayaquil. Guayaquil - Ecuador. 109pp.
- De Paz, P. (2006). Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares. Posible tratamiento de enfermedades degenerativas mediante la dieta. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España. 378 pp.
- Del Águila, J. (2010). Programa de Manejo Pesquero en la Cocha San Jacinto-ORMARENA “Los Tigres Negros” – Comunidad de San Jacinto. Programa de Cooperación Hispano Peruano - Proyecto Araucaria XXI. Ministerio del Ambiente. Iquitos – Perú. 64 p.
- Du, L; Khiari, Z; Pietrasik, Z; Betti, M. (2013). Physicochemical and functional properties of gelatins extracted from turkey and chicken heads. *Poultry science*, 92(9), 989-1000. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03161>.
- Eluk, D. (2006). Modelado reocinético de la maduración de soluciones de gelatina en flujo de corte. Tesis para optar el título de Magister en Ciencias y Tecnología de los Alimentos. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe – Argentina. 193 pp.
- Food Agricultural Organization FAO. (1998). El pescado fresco: Su calidad y cambios de su calidad. Documento Técnico de Pesca. N° 348. Roma, FAO. 202 pp.
- Gaitán, O. (2013). Efecto de la temperatura en el colágeno presente en espinas intramusculares de filetes de bocachico (*Prochilodus magdalenae*) sobre las características de textura y microestructurales. Tesis para optar el título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá–Colombia. 56 p.

- Gómez-Lizárraga K; Piña C.; Rodríguez N. (2011). Obtención y caracterización de colágeno tipo I a partir de tendón bovino. *Superficies y vacío*, 24(4), 137-140.
- Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana IIAP. (2017). El cultivo del paiche. Biología, procesos productivos, tecnologías y estadísticas. 110pp.
- Luján, D. (2019). Elaboración de ahumado en frío a partir de filete de paiche (*Arapaima gigas*). Tesis de Ingeniero Pesquero. Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 2019.
- Mamani, C. (2018). Obtención de colágeno por el método de hidrólisis alcalina a partir de (tarsos) de pollo provenientes de la industria avícola en la Región Arequipa. Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa-Perú. 107pp.
- Miano, A; Rojas, C; Barraza, G. (2014). Influencia de la temperatura y tiempo de extracción en la fuerza de gel y rendimiento de gelatina obtenida a partir de piel de tollo (*Mustelus mento*). *Scientia Agropecuaria*, 5, 140-147.
- Pinchi, J. (2014). Transformación y disposición final de residuos provenientes del procesamiento primario de paiche (*Arapaima gigas*). Tesis UNAP. Yurimaguas-Perú. 61 pp.
- Ministerio de la Producción PRODUCE. (2017). Anuario Estadístico Pesquero y Acuicola. Perú.
- Quispe, S., & Gutiérrez, L. (2019). Extracción del colágeno a partir de los residuos de la trucha y determinación del rendimiento y su aplicación como gelatina. Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa-Perú. 149pp.
- Rebaza, M; Alcántara, F; Valdivieso, M. (1999). Manual de piscicultura de paiche. (*Arapaima gigas*). 35 pp.

- Ríos, J. (2012). Elaboración de soportes de colágeno tipo I asociados a hemoglobina aislada de sangre periférica humana. Tesis para optar el título de Magister en Ciencias Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá-Colombia. 63pp.
- Romero, R. (2016). Obtención de gelatina de piel de perico (*Coryphaena hippurus*) y caracterización de sus propiedades fisicoquímicas. Tesis de Ingeniero Pesquero. Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 2016.
- Sadowska, M; Kolodziejska, I; Niecikowska, C. (2002). Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 81(2), 257-262. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00420-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00420-X).
- Saenz, N. (2017). Obtención de material colagenoso de escamas de pescado y su esterilización con radiación gamma. Tesis para obtener el título de licenciado en biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca-México. 64pp.
- Sato, K; Yomogida, K; Wada, T; Yorihazi, T; Nishimune, Y; Hosowaka, N; Nagata, K. 2012. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *Journal of biological chemistry*, 277(40), 37678-37684. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M205347200>.
- Serrano, J. (2011). Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachipomus*). Tesis Mg. Sc. Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 2011. 85 pp.
- Solari, F. (2006). Variaciones en la composición proteica del músculo de *Colossoma macropomun* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae), provenientes de criaderos durante su almacenamiento en frío. Tesis para optar el título de biólogo. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 64 p.
- Solari, A., & Córdova, J. (2015). Extracción de colágeno proveniente de residuos del procesamiento de anchoveta (*Engraulis ringens*). *Ciencia e Investigación*, 18(2), 65-68. DOI: <https://doi.org/10.15381/ci.v18i2.13609>.

- Sosa, C. (2017). Elaboración de ensilado biológico a partir de residuos de paiche (*Arapaima gigas*). Tesis para optar el título de ingeniero pesquero. Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 2017.
- Torres-Arreola, W; Pacheco-Aguilar, R; Sotelo-Mundo, R; Rouzaud-Sández, O; Ezquerria-Brauer, J. (2008). Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Revista de Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2), pp. 101-108.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Determinación estadística para evaluación de tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Rendimiento (%)

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	13,600 ^a	5	2,720	2,202	0,182
Intersección	1646,895	1	1646,895	1333,230	0,000
Temperatura	3,329	1	3,329	2,695	0,152
Tiempo	9,822	2	4,911	3,976	0,080
Temperatura * Tiempo	0,449	2	0,225	0,182	0,838
Error	7,412	6	1,235		
Total	1667,906	12			
Total corregido	21,011	11			

a. R al cuadrado = 0,647 (R al cuadrado ajustada = 0,353)

ANEXO 2. Tabla de límites microbiológicos según R.M 591- MINSA.

IV.3 Mezclas en seco de uso instantáneo (refrescos, gelatinas, jaleas, cremas, otros).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	10	10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	3	5	1	10	10 ²
<i>Bacillus cereus</i> (*)	7	3	5	2	10 ²	10 ³
<i>Salmonella</i> sp. (**)	10	2	5	0	Ausencia /25 g	-----
Mohos	3	3	5	1	10	10 ²
(*) Sólo para productos que contengan cereales.						
(**) Sólo para productos que contengan leche, cacao y/o huevo						

Los valores provienen del grupo IV Productos deshidratados, liofilizados o centrados y mezclas de la R.M 591- MINSA.

ANEXO 3. Determinación de composición química proximal para colágeno en polvo



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE ZOOTECNIA - DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE NUTRICIÓN
LABORATORIO DE EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE ALIMENTOS

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

INFORME DE ENSAYO LENA N° 1110/2021

CLIENTE : CASTILLO CRISTOBAL GIANELLA CARMEN
NOMBRE DEL PRODUCTO : 01 muestra de colágeno
(Denominación responsabilidad del cliente)
MUESTRA : PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
IDENTIFICACION : AQ21-1110

RESULTADOS DE ANALISIS QUIMICO

CÓDIGO	AQ21-1110
a.- HUMEDAD, %	7.03
b.- PROTEINA TOTAL (N x 6.25), %	89.67
c.- GRASA, %	0.76
d.- FIBRA CRUDA, %	0.07
e.- CENIZA, %	1.46
f.- ELN, %	1.01

ELN: Extracto libre de nitrógeno

Métodos utilizados:

- a.- Humedad: AOAC (2005), 950.46
- b.- Proteína total: AOAC (2005), 984.13
- c.- Grasa: AOAC (2005), 920.39
- d.- Fibra cruda: AOAC (2005), 962.09
- e.- Ceniza: AOAC (2005), 942.05

Atentamente,

La Molina, 12 de Diciembre del 2021


Ing. Alejandrina Gotojo Méndez
Jefe del Laboratorio de Evaluación
Nutricional de Alimentos



ANEXO 4. Determinación de hidroxiprolina



LABS - ITP
Página 1 de 1

LABORATORIO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA PRODUCCIÓN

INFORME DE ENSAYO N° 0568/21

Solicitante	:	GIANELLA CASTILLO CRISTOBAL
Dirección	:	CALLE LAS ALHELIES N° 101, URB. ATE, ATE-LIMA-LIMA
Producto declarado	:	COLAGENO DE CABEZA DE PESCADO.
Presentación y Condiciones de la Muestra	:	En bolsa de polietileno tipo Ziploc. T° = 22,7 °C.
Cantidad de muestras	:	Una unidad de 100 g Aprox.
Fecha de recepción de la muestra	:	26.11.21
Fecha de Ejecución de Análisis	:	09.12.21
Referencia de la muestra	:	FOST de fecha 20.11.2021.
N° de Solicitud de Servicio de Ensayo	:	0162-21

ENSAYO	NORMA O REFERENCIA	UNIDADES	RESULTADOS
Contenido de Hidroxiprolina	Kolar, K. (1990). Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. Journal of the Association of official Analytical Chemists, 73(1), 54-57.	g Hidroxiprolina/100 g muestra	11,3

Observaciones: XXX



Firma Digital

Firmado digitalmente por ALVARO
GUZMAN Gary Edwin FAU
2072388477.sufi
Módulo: Signe el autor del documento
Fecha: 10.11.2021 16:13:18 -0500

Callao, 15 de diciembre del 2021