



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**«Actividad antimicrobiana y antioxidante del
hidrolizado de gelatina obtenido de las pieles de *Sarda
chiliensis chiliensis* “Bonito” como residuos de la
actividad pesquera en el Perú»**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Eder Eduardo TEJADA PERICHE

ASESOR

Dra. Yadira FERNÁNDEZ JERÍ

Dra. María Elena SALAZAR SALVATIERRA

Lima, Perú

2019

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

DEDICATORIA

A mis padres, María Elsa y Bartolomé, quienes me muestran amor y sacrificio a cada día y representan mi motivación para avanzar cada peldaño en la vida.

A mis hermanos, Germán, Erick, Roxana, Cintia y a cada integrante de su familia, por inculcarme y ser los mejores ejemplos de superación y valores que se forjan en familia.

A mis padrinos, Leonie y Eduardo, por la consideración hacia nuestra familia y el rol ejemplar que han transmitido a cada uno de sus ahijados.

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Alma Máter, la **Universidad Nacional Mayor de San Marcos** por abrirme las puertas del conocimiento en la prestigiosa **Facultad de Farmacia y Bioquímica**, que me ha proporcionado las herramientas necesarias para afrontar los retos y desafíos de la vida.

A mis asesoras de tesis, **Dra. Yadira Fernández Jerí** y **Dra. María Elena Salazar Salvatierra**, quienes me han brindado su apoyo, motivación y paciencia para la realización del presente trabajo, así como también, su admirable compromiso del día a día en las aulas y laboratorios del cual soy fiel testigo.

A la **Dra. Elizabeth Carranza Alva**, quién estuvo siempre presta a absolver cualquier inquietud, y cuyas recomendaciones están presentes en las diferentes fases del presente trabajo de tesis.

A los **miembros del Jurado Examinador y Calificador**, (Presidente: Dr. Américo Castro, Miembros: Mg. Carmen Peña, Mg. Teresa Gallardo y Mg. Nelson Bautista) por su período en la revisión y sus recomendaciones para un buen resultado del presente trabajo.

A los **Laboratorios de Bioquímica y Microbiología** que me facilitaron sus instalaciones para materializar mi trabajo de tesis.

A mis amigos quienes estuvieron presentes en esta interesante travesía, **Paola, Wesly, Guadalupe y Giannina** siempre con el aliento de seguir adelante, por su apoyo, y su compañía hasta las últimas en esas interminables horas de ensayos en el laboratorio.

A mis amigos, **Estela, Giancarlos, Rousbel, Luis, Irving, Pablo, Litta y Neydis**, con quienes la etapa universitaria se llena de experiencias imborrables para la frágil memoria humana.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general	3
1.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
II. ANTECEDENTES	4
III. MARCO TEÓRICO	9
3.1. Actividad pesquera y subproductos generados	9
3.2. Descripción de la especie marina.....	11
3.3. Colágeno	12
3.4. Gelatina	14
3.5. Hidrólisis	16
3.6. Grado de hidrólisis.....	20
3.7. Enzimas proteolíticas.....	22
3.8. Actividad biológica de hidrolizados enzimáticos de proteínas	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1. Materiales, equipos y reactivos	32
4.2. Métodos y técnicas	35
4.2.1. Diagrama del procedimiento general de métodos de experimentación para hidrolizados de gelatina	35
4.2.2. Recolección, transporte y almacenamiento de la muestra	36
4.2.3. Obtención de gelatina por hidrólisis parcial del colágeno.....	37
4.2.4. Cuantificación de proteína total mediante el método de Bradford .	41

4.2.5. Hidrólisis enzimática y análisis de los factores que influyen en el proceso	42
4.2.6. Determinación del grado de hidrólisis por cuantificación de proteína soluble mediante el método de Biuret	43
4.2.7. Determinación del grado de hidrólisis por cuantificación del nitrógeno soluble mediante el método de micro-Kjeldahl	44
4.2.8. Determinación de la actividad antioxidante mediante el método del radical (DPPH•)	46
4.2.9. Determinación de la actividad antioxidante mediante el método del radical catiónico (ABTS•+)	48
4.2.10. Determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar-pozo	50
4.2.11. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria mediante el método de microdilución/colorimétrico	54
4.3. Análisis estadístico	57
V. RESULTADOS	58
5.1. Obtención de gelatina por hidrólisis parcial del colágeno	58
5.2. Cuantificación de proteína total mediante el método de Bradford	58
5.3. Determinación del grado de hidrólisis por cuantificación de proteína soluble mediante el método de Biuret	58
5.4. Determinación del grado de hidrólisis por cuantificación del nitrógeno soluble mediante el método de micro-Kjeldahl	61
5.5. Determinación de la actividad antioxidante mediante el método del radical (DPPH•)	63
5.6. Determinación de la actividad antioxidante mediante el método del radical catiónico (ABTS•+)	71
5.7. Determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar-pozo	77

5.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el método de microdilución/colorimétrico	81
VI. DISCUSIÓN	86
VII. CONCLUSIONES	101
VIII.RECOMENDACIONES	102
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
X. ANEXOS	120

LISTA DE ABREVIATURAS

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ABTS: 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic

IC50: Concentración inhibitoria 50.

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al Trolox

ECA: Enzima convertidora de la angiotensina

DPP-IV: Dipeptidil peptidasa-4

FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma (capacidad reductora férrica del plasma)

BHT: Butil hidroxitolueno

GH: Grado de hidrólisis.

ATC: Ácido tricloroacético

E/S: Enzima/Sustrato.

E.C: Comisión Enzimática

EROs: Especies reactivas de oxígeno

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BSA: Estándar de albúmina sérica bovina

AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales

CMI: Concentración mínima inhibitoria

TSA: Trypticase soya agar

DMSO: Dimetilsulfóxido

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Caracterización aproximada de las especies intermedias producidas en la hidrólisis enzimática de proteínas
- Tabla 2.** Enzimas proteolíticas clasificadas de acuerdo a su sitio de acción
- Tabla 3.** Especies reactivas de oxígeno
- Tabla 4.** Factores de hidrólisis enzimática de acuerdo al diseño factorial tipo Plackett-Burman con punto central por triplicado
- Tabla 5.** Esquema del protocolo de trabajo para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método DPPH•
- Tabla 6.** Esquema del protocolo de trabajo para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método de decoloración del ABTS•+
- Tabla 7.** Criterio de evaluación de actividad antimicrobiana por ensayo de difusión
- Tabla 8.** Disposición para la incorporación de muestras e inóculos en la microplaca
- Tabla 9.** Niveles de actividad antimicrobiana
- Tabla 10.** %GH de las muestras determinado mediante el método de Biuret
- Tabla 11.** Análisis del diseño factorial: %GH (Biuret) VS Temperatura, pH, tiempo y [E/S]
- Tabla 12.** %GH de las muestras determinado mediante el método de micro-Kjeldahl
- Tabla 13.** Análisis del diseño factorial: %GH (Micro-Kjeldahl) VS Temperatura, pH, tiempo y [E/S]
- Tabla 14.** Capacidad antioxidante a diferentes concentraciones de las sustancias estándares con actividad antioxidante positiva
- Tabla 15.** Capacidad antioxidante a diferentes concentraciones del total de los hidrolizados enzimáticos de proteína colagenosa
- Tabla 16.** Análisis del diseño factorial: actividad antioxidante (DPPH•) VS pH, tiempo y [E/S]
- Tabla 17.** Capacidad antioxidante a diferentes concentraciones del Trolox
- Tabla 18.** Capacidad antioxidante a diferentes concentraciones de los hidrolizados enzimáticos de proteína colagenosa
- Tabla 19.** Análisis del diseño factorial: actividad antioxidante (ABTS•+) VS pH, tiempo y [E/S]

Tabla 20. Valores de los halos de inhibición (mm)

Tabla 21. Análisis del diseño factorial: actividad antimicrobiana (difusión en poso) contra *Staphylococcus aureus* VS temperatura, pH, tiempo y [E/S]

Tabla 22. Análisis del diseño factorial: actividad antimicrobiana (difusión en poso) contra *Bacillus subtilis* VS temperatura, pH, tiempo y [E/S]

Tabla 23. Valores de CMI de hidrolizados contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*

Tabla 24. Análisis del diseño factorial: actividad antimicrobiana (CMI) contra *Staphylococcus aureus* VS temperatura, pH, tiempo y [E/S]

Tabla 25. Análisis del diseño factorial: actividad antimicrobiana (CMI) contra *Bacillus subtilis* VS temperatura, pH, tiempo y [E/S]

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Subproductos del pescado y sus diversos usos potenciales
- Figura 2.** Descripción general de la triple hélice de colágeno
- Figura 3.** Diagrama que representa la hidrólisis de tipo enzimática
- Figura 4.** Esquema que representa el proceso de hidrólisis enzimática
- Figura 5.** Secuencia de la obtención de productos en la hidrólisis enzimática
- Figura 6.** Clases de enzimas proteolíticas de acuerdo al sitio de acción
- Figura 7.** Actividades biológicas de los péptidos
- Figura 8.** Clasificación del sistema antioxidante
- Figura 9.** Diagrama general de métodos de experimentación
- Figura 10.** Diagrama de flujo de los procesos de recolección, transporte y almacenamiento de la muestra problema
- Figura 11.** Esquema para la obtención de gelatina de la piel de pescado
- Figura 12.** Esquema para la obtención del grado de hidrólisis (%GH)
- Figura 13.** Esquema para la obtención del nitrógeno soluble en ATC al 10%
- Figura 14.** Esquema para la cuantificación de nitrógeno total
- Figura 15.** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados
- Figura 16.** Gráfica de efectos principales
- Figura 17.** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados
- Figura 18.** Gráfica de efectos principales
- Figura 19.** IC50 de las sustancias antioxidantes analizadas mediante el método del radical DPPH•
- Figura 20.** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados
- Figura 21.** Gráfica de efectos principales
- Figura 22.** IC50 de las sustancias antioxidantes analizadas con el método del radical (ABTS•+)
- Figura 23.** Valores TEAC de los hidrolizados enzimáticos
- Figura 24.** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados
- Figura 25.** Gráfica de efectos principales
- Figura 26.** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados
- Figura 27.** Gráfica de efectos principales
- Figura 28.** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados

Figura 29. Gráfica de efectos principales

Figura 30. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados

Figura 31. Gráfica de efectos principales

Figura 32. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados

Figura 33. Gráfica de efectos principales (CMI)

RESUMEN

El presente trabajo de investigación aprovechó las pieles de la especie *Sarda chiliensis chiliensis* como producto de la actividad pesquera, y tuvo como objetivo determinar la actividad antimicrobiana y antioxidante del hidrolizado de gelatina, la cual fue obtenida a partir del colágeno presente en los residuos generados por dicha actividad. La metodología utilizada se basa en que fracciones equivalentes y homogéneas de la proteína colagenosa extraída de las pieles fueron hidrolizadas con la enzima alcalasa a diferentes condiciones de pH: 7, 8 y 9, temperatura: 50, 60 y 70 °C, tiempo: 2, 3 y 4 horas, y relación [enzima/sustrato]: [1/20], [1/35] y [1/50], obteniendo bajo el diseño factorial tipo Plackett-Burman con punto central por triplicado un total de 15 hidrolizados, con cada uno de ellos se procedió a determinar la actividad antimicrobiana mediante los métodos de difusión en agar y microdilución en placa para CMI, también se determinó la actividad antioxidante a través de los métodos del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) y del radical catiónico 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS•+). Como resultados al evaluar la actividad antimicrobiana se obtuvieron halos de inhibición para los hidrolizados H601, H602, H603, H504, H508, H509, H7010 y H7014 a concentración de 1,0 mg/mL mediante el método de difusión en agar, por microdilución en placa se obtuvo CMI mayores a 0,5 mg/mL, ambos métodos contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. La concentración de los hidrolizados necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH• al 50% (IC50) fue entre 458,73 y 1830,46 µg/mL. Así mismo las concentraciones de los hidrolizados, necesarias para disminuir la concentración inicial de ABTS•+ al 50% (IC50) variaron entre 74,86 y 200,45 µg/mL, obteniendo como TEAC: 61,76 µmol Trolox/g de hidrolizado proteico, el más bajo que correspondiente al hidrolizado H7011 y el TEAC: 165,38 µmol Trolox/g de hidrolizado proteico, el más alto que corresponde al hidrolizado H7012. Conclusiones, la proteína colagenosa, extraída como gelatina de las pieles de los residuos de la pesca, sometida a hidrólisis enzimática a diferentes condiciones demostró actividad antioxidante y antimicrobiana, bajo el modelo experimental trabajado, por tal razón, manifiesta el interés y provecho de la investigación.

Palabras clave: *Sarda chiliensis chiliensis*, antioxidante, antimicrobiana, pieles, colágeno, gelatina, hidrolizado, alcalasa.

ABSTRACT

The present research work took advantage of the skins of the species *Sarda chiliensis chiliensis* as a product of fishing activity, and had as objective to determine the antimicrobial and antioxidant activity of the gelatin hydrolyzate, which was obtained from the collagen present in the waste generated by said activity. The methodology used is based on which equivalent and homogeneous fractions of the collagenous protein extracted from the skins were hydrolysed with the enzyme alcalase at different conditions pH: 7, 8 and 9, temperature: 50, 60 and 70 °C, time: 2, 3 and 4 hours, and relation [enzyme / substrate]: [1/20], [1/35] and [1/50], obtaining under the factorial design type Plackett-Burman with central point in triplicate a total of 15 hydrolysed, with each one of them we proceeded to determine the antimicrobial activity by means of diffusion methods in agar and microdilution in plate for CMI, also the antioxidant activity was determined through the methods of the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) and the cationic radical 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic (ABTS•+). As results when evaluating the antimicrobial activity, haloes of inhibition were obtained for the hydrolysates H601, H602, H603, H504, H508, H509, H7010 and H7014 at a concentration of 1,0 mg / mL by the agar diffusion method, by microdilution in plate was obtained CMI greater than 0,5 mg / mL, both methods against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. The concentration of the hydrolysates necessary to reduce the initial concentration of DPPH• to 50% (IC50) was between 458,73 and 1830,46 µg/mL. Likewise, the concentrations of the hydrolysates, necessary to reduce the initial concentration of ABTS•+ to 50% (IC50) varied between 74,86 and 200,45 µg/mL, obtaining as TEAC: 61,76 µmol Trolox/g of protein hydrolyzate, the lowest corresponding to the H7011 hydrolyzate and the TEAC: 165,38 µmol Trolox/g of protein hydrolyzate, the highest corresponding to the H7012 hydrolyzate. Conclusions, the collagenous protein, extracted as gelatin from the skins of fishing waste, subjected to enzymatic hydrolysis at different conditions, showed antioxidant and antimicrobial activity, under the experimental model worked, for this reason, it shows the interest and benefit of the research.

Key words: *Sarda chiliensis chiliensis*, antioxidant, antimicrobial, skins, collagen, gelatin, hydrolyzate, alcalase.

I. INTRODUCCIÓN

Debido a la actividad pesquera, a nivel mundial se distinguen tres categorías de subproductos generados por esta actividad: los desperdicios generados en tierra, los descartes de especies por flotas pesqueras y los desperdicios a bordo, en esta última categoría podemos encontrar vísceras, pieles, cabezas, aletas, entre otras que se generan al procesar las capturas a bordo de la flota pesquera¹. Dado este escenario se origina la problemática en la que los subproductos son devueltos nuevamente a mar abierto, produciendo contaminación y el desaprovechamiento de los residuos generados¹.

El reflejo de esta situación a nivel nacional lo podemos observar de forma sencilla al visitar los mercados y centros de abasto, donde claramente notamos que la mayor cantidad de residuos de la actividad pesquera se genera como consecuencia de la venta directa de diferentes especies de pescado que provee el litoral peruano para el consumo humano².

En los últimos años, debido al aumento de investigaciones ante tal problemática, la tendencia es hacia el aprovechamiento de dichos residuos a todo nivel, por ejemplo la industria pesquera utiliza estos subproductos para la alimentación animal mediante la transformación con procesos biológicos, obteniendo de esta manera un producto con altas propiedades nutritivas, que se perfila como sustituto de la harina de pescado como alimento animal, pero, no solo se ha logrado el beneficio con este empleo, sino las investigaciones actuales inciden en la aplicación tecnológica en la producción de colágeno, diferentes pigmentos, aprovechamiento de enzimas, elaboración de fertilizantes y el más importante entre ellos la producción de hidrolizados enzimáticos con propiedades biológicas, entre otros^{1,3,4}. Por consiguiente se ha demostrado que, en los diversos componentes de los residuos de la pesquería, que entre ellos podemos encontrar espinas, escamas, pieles, entre otros, contienen en su estructura potenciales cantidades de proteína colagenosa, la cual ha despertado el gran interés de las industrias farmacéutica y cosmética en la implementación tecnológica para el empleo de los residuos de la actividad pesquera, como fuente de colágeno, el cual es necesario como materia prima en el proceso de manufactura de diferentes productos^{4,5}.

Estudios recientes consideran a los subproductos de la pesca como fuente extensiva tanto de colágeno como de gelatina y es a partir de estas fuentes proteicas que se someten a procesos de hidrólisis con enzimas proteolíticas comerciales como tripsina, quimiotripsina, pepsina, alcalasa, pronasa, colagenasa, papaína, entre otras o en combinación de estas, consiguiendo como producto final del proceso, hidrolizados que contienen péptidos y aminoácidos liberados con actividad en el organismo humano⁶. Así mismo, se ha demostrado diversas propiedades biológicas (antihipertensiva, antioxidante, inmunomoduladora, antimicrobiana, antitrombótica, entre otras) que cumplen los péptidos o aminoácidos resultantes de la hidrólisis enzimática de proteína colagenosa extraída de pescados marinos como el atún, bacalao, sardina y otras especies como camarones y cefalópodos^{7, 8}.

Tal como se ha señalado anteriormente, los residuos de la actividad pesquera representan un recurso de mucha utilidad como fuente de proteína colagenosa, por tal razón, tomaremos como muestra de residuos, las pieles de la variedad del pescado *Sarda chiliensis chiliensis*, comúnmente llamado “Bonito”, que generalmente se desecha y que en muchos casos su destino final es el relleno sanitario o en el mejor de los casos acopiado para la elaboración de alimento de animales, de esta manera corroboramos que en la actualidad no se le da un aprovechamiento adecuado como refieren diversas investigaciones en el tema^{7,8,9}.

En la presente investigación se resalta la importancia en plantear la obtención del hidrolizado enzimático de la proteína colagenosa de la piel de pescado, a la vez evidenciar que este posee dos potenciales bioactividades como son la antimicrobiana y la antioxidante, las cuales son de mucho beneficio para el organismo humano y que en actualidad se colocan entre las más investigadas como resultado fructuoso en este campo, para ello, tenemos como punto de partida la proteína a hidrolizar proveniente de la fuente como son las pieles de residuos de la actividad pesquera⁶⁻⁹. De esta manera nuestro trabajo aporta a los estudios científicos y a la población, revalorizando la extraordinaria riqueza de los recursos marinos que posee nuestro país, sirviéndose de materia que pudiendo ser aprovechada se desecha por desconocimiento de la comunidad.

1.1. Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana y antioxidante del hidrolizado enzimático de gelatina, que es obtenida a partir del colágeno presente en los residuos (pieles) de la actividad pesquera.

1.2. Objetivos específicos

1. Extraer la gelatina como producto de la hidrólisis química parcial del colágeno, a partir de las pieles de pescado como residuos de la actividad pesquera.
2. Evaluar la influencia de los factores de hidrólisis enzimática empleando la proteasa (alcalasa) sobre el sustrato de gelatina.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana del hidrolizado enzimático de la gelatina obtenida a partir de las pieles de pescado.
4. Evaluar la actividad antioxidante del hidrolizado enzimático de la gelatina obtenida a partir de las pieles de pescado.

1.3. Hipótesis

El hidrolizado de gelatina extraída de las pieles de pescado como residuos de la actividad pesquera, posee propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

II. ANTECEDENTES

La extracción de la proteína colagenosa como gelatina tiene una novedosa fuente de origen animal, tal como ha sido materia de investigación en un estudio donde se logró obtener esta proteína a partir de la piel, así como también de los huesos de la especie de pescado de río *Lates niloticus*, conocida como La perca del Nilo, también se hace referencia a que existen diferencias significativas, entre las extracciones a partir de la piel y del hueso, en cuanto a sus propiedades químicas, extractabilidad, rendimiento y sobre todo en su funcionamiento, en tanto, los consideran como potenciales fuentes de esta proteína como resultado de la explotación del recurso animal marino y su procesos derivados⁹.

Nuestro país no ha sido ajeno a estas investigaciones, Miano A. et al., 2014², demostraron cómo influye la temperatura (60 – 95 °C) y el tiempo (220 – 240 min) en el proceso de extracción de la proteína colagenosa presente en la piel del Tollo (*Mustelus mento*), por tal razón, con el control de estas variables se pueden obtener gelatinas de mayor calidad en cuanto a la fuerza de gel a 60°C y 135 min., y de la misma manera un alto rendimiento de extracción a las condiciones de 77.5°C y 240 min.; sin embargo, es preciso aclarar que otras variables como el origen de la materia prima y entre otras condiciones de extracción influyen en la calidad de la proteína de interés.

En los hidrolizados enzimáticos de proteína podemos encontrar péptidos de diferentes tamaños y aminoácidos liberados, cuyas estructuras y funcionalidad dependerá sobre todo de la proteína original, factores del proceso hidrolítico y de la enzima empleada, de esta manera se les atribuye a estos componentes presentes en los hidrolizados, múltiples bioactividades para el organismo humano^{5,9,10}. Con el empleo de una o más enzimas proteolíticas se logra obtener los hidrolizados cuya actividad biológica demostrada puede ser la mejor solución a un trastorno a la salud o quizá no, en comparación con las sustancias conocidas^{5,9,10}. A la fecha se han reportado variadas investigaciones sobre los hidrolizados de gelatina obtenida de fuente marina, que demuestran actividades

biológicas antimicrobiana, antioxidante, antihipertensiva, inmunomoduladora, entre otras, de los cuales se describen a continuación^{5,6,11-16}:

En el estudio llevado a cabo por Mendis E. et al., 2005¹¹, lograron determinar la actividad antioxidante de los péptidos bioactivos, los cuales fueron aislados de la modificación inicial de la gelatina por hidrólisis enzimática por separado con proteasas como tripsina, α -quimotripsina y pepsina. La gelatina fue obtenida a partir de las pieles de la especie *Johnius belengerii*, conocida como Hoki, en este trabajo de investigación también se determinaron las potencias de captación de radicales por parte de los péptidos obtenidos, demostrada a través del método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) obteniendo un IC50 aproximado de 156,8 μ M, dentro de todos los valores reportados se obtuvo una actividad muy aproximada a del antioxidante sintético BHT (hidroxitolueno butilado).

Así mismo, Wu H. et al., 2003¹², investigaron sobre los péptidos y aminoácidos liberados por la hidrólisis de Caballa con la enzima comercial proteasa N, donde se llegó a demostrar su efecto antioxidante, luego de la identificación y aislamiento de péptidos se evidenció cambios en la composición y niveles aumentados de péptidos (1400, 900 y 200 Da) y aminoácidos (anserina, carnosina, entre otros) luego del proceso hidrolítico de 10 horas, la actividad biológica antioxidante relativa fue analizada mediante la inhibición de la autooxidación del ácido linoleico según el método del tiocianato férrico, y también con el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), logrando actividades antioxidantes relativas de 1,5 – 6,8 y 0,1 – 15,4 con el primer y segundo método respectivamente, tomando como período de inducción de la muestra blanco 1,4 días, de este modo se evidenció períodos de inducción más elevados demostrando la propiedad en estudio.

En otro trabajo de investigación realizado por Fan J. et al., 2012¹³, se evidenció la actividad antioxidante de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de la proteína del marco de Tilapia (*Oreochromis niloticus*), en este trabajo la proteína se hidrolizó con diferentes proteasas como pepsina, neutrasa, tripsina, papaína,

entre otras, entre todos los hidrolizados obtenidos con cada una de las enzimas, se exhibió un mayor grado de hidrólisis y consecuentemente una mayor actividad antioxidante del hidrolizado con la enzima tripsina, así mismo se identificaron dos péptidos con actividad de captación de radicales hidroxilo con IC50 de 27,6 y 38,4 µg/mL.

Gómez-Guillén M. C. et al., 2010⁶, demostraron las actividades biológicas antioxidante y antimicrobiana de los péptidos presentes en el hidrolizado proteico obtenido a partir de la gelatina de la piel de pescado (atún) y de la túnica de calamar gigante. El proceso hidrolítico se llevó a cabo a 50 °C, por un tiempo de 3 horas, empleando una enzima comercial denominada alcalasa. En cuanto a la bioactividad antioxidante se llevó a cabo con el ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y con el método del radical catiónico (ABTS^{•+}), en ambos casos resultó positiva, y con mayor actividad con los péptidos de bajo peso molecular. Para demostrar la propiedad antimicrobiana contra microorganismos grampositivos y gramnegativos se realizó mediante la prueba de difusión en disco, en la que se obtuvo como resultado positivo para todas las fracciones peptídicas; sin embargo, una mayor actividad con la fracción de más bajo peso molecular.

Del mismo modo, Mosquera J., 2014⁵ logró obtener hidrolizados con proteasas comerciales alcalasa, esperasa y pepsina, a partir de los residuos de la pesca como son la túnica de calamar, las espinas y escamas de dorada y también de langostinos sin valor comercial, cada uno de los hidrolizados contenían péptidos bioactivos, los cuales fueron separados en relación a su peso molecular entre 750 y 1000 Da, esta investigación demuestra que las propiedades biológicas están relacionadas en función al tamaño molecular de los péptidos obtenidos de la hidrólisis, consecuentemente la mayor actividad se concentra en la fracción de menor tamaño. De esta manera se demostró la bioactividad inhibidora de la ECA-I y la actividad antioxidante como secuestrante de radicales libres ABTS^{•+} que posee el hidrolizado peptídico de la gelatina extraída de las escamas de dorada tratadas con la enzima esperasa y alcalasa, de la misma forma se demostró la

propiedad antimicrobiana en las fracciones peptídicas obtenidas por hidrólisis enzimática de la gelatina extraída de la túnica de calamar tratada con alcalasa y esperasa, otra actividad biológica que manifiestan los péptidos (<1KDa) liberados de la hidrólisis enzimática con alcalasa y esperasa, previa extracción de gelatina de las escamas de dorada, langostinos y túnica de calamar desecada, es la hipoglucemiante mediante la inhibición de la DPP-IV.

Podemos considerar el estudio llevado a cabo por García Moreno P. et al., 2014¹⁰, en el que se determinó la propiedad antioxidante del hidrolizado proteico, utilizando para el proceso de hidrólisis dos enzimas endoproteasas, la subtilisina y tripsina. La materia prima proteica para hidrolizar se obtuvo a partir del prensado de 5 especies marinas (sardina, jurel, besugo axilar, biga y felino pequeño) descartadas en el mar Mediterráneo. Para la evaluación de la actividad antioxidante se basó en el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•), resultando el mayor IC50 de 0,91 mg de proteína/mL., este resultado se logró al hidrolizar el prensado de sardina con tripsina más un tratamiento enzimático con subtilisina.

Por otro lado Q. Zhong-Ji et al., 2007¹⁴ investigaron sobre el hidrolizado enzimático del músculo oscuro del atún, empleando las enzimas alcalasa, neutrasa, pepsina, papaína, R-quimiotripsina y tripsina, las cuales dieron como productos hidrolizados conteniendo péptidos con bioactividad antihipertensiva, donde cada hidrolizado posee la propiedad biológica con diferencias significativas, para demostrar dicha actividad se aisló el péptido (peso molecular 1581Da) inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA) a partir de los hidrolizados, concluyendo que el hidrolizado obtenido con la enzima pepsina fue la que demostró mayor actividad antihipertensiva por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I, comparado con los hidrolizados conseguidos con las demás enzimas mencionadas en el presente estudio.

En una investigación previa realizada por Choonpicharn S. et al., 2015¹⁵ utilizan a la fuente de material rica en proteína gelatinosa, la piel de la tilapia del Nilo

(*Oreochromis niloticus*), ésta se logró hidrolizar con diferentes tipos de proteasas entre las que se reportan como bromelina, papaína, tripsina, flavourzima, alcalasa y neutrasa, cabe resaltar que cada proceso hidrolítico se llevó a cabo por separado. De esta manera se reporta que el hidrolizado cuya enzima utilizada fue la flavourzima tiene una potente actividad de eliminación de radicales ABTS^{•+}, confirmando de esta manera la propiedad biológica antioxidante medida como Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox (1 413,61 ± 88,74 µg de trolox / mg de proteína); sin embargo, fue el hidrolizado con la enzima alcalasa el que tuvo un mayor poder antioxidante (4,951 ± 1,577 mM de trolox / mg de proteína). No siendo de menor interés en este trabajo de investigación que también se haya evidenciado la bioactividad antihipertensiva a través del método de evaluación de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I cuyos valores obtenidos variaron entre 89,02–92,55%.

Por último, Alemán A. et al., 2011¹⁶, han reportado en una investigación preliminar la evidencia en cuanto a la actividad antioxidante que poseen los hidrolizados obtenidos a partir de la gelatina de las pieles de las especies marinas: atún (*Thunnus spp.*) y halibut (*Hypoglossus spp.*), así como también de la túnica de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), en este estudio la hidrólisis enzimática se llevó a cabo con múltiples enzimas, por ejemplo: colagenasa, tripsina, pepsina, alcalasa y pepsina, en las cuales se obtuvieron diferentes grados de actividad antioxidante, siendo la más alta del hidrolizado de calamar gigante, dicha propiedad biológica fue evaluada bajo dos métodos: capacidad de reducción de Fe (FRAP) y capacidad de eliminación de radicales ABTS^{•+}, por tanto, el tratamiento de hidrólisis tipo enzimático es efectivo para producir hidrolizados con función biológica antioxidante a partir de fuentes marinas.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Actividad pesquera y subproductos generados

Esta ocupación que ha evolucionado a lo largo del tiempo comprende dos actividades básicas, como son la de extracción (actividad primaria) y la de transformación (actividad secundaria) de recursos hidrobiológicos que son destinados tanto para el consumo humano directo (enlatado, fresco o congelado), e industrial (principalmente a través de la harina y aceite de pescado)^{17,18}.

En tiempos recientes, las diferentes instituciones nacionales y privadas de diferentes países, impulsan la investigación y de la misma manera a las empresas del sector pesquero a iniciar el aprovechamiento de los subproductos generados en la actividad pesquera, de esta forma se le otorga valor agregado y por consiguiente, aumentar la rentabilidad de las mismas, ya que a través de los diferentes procesos de producción se generan grandes cantidades de subproductos, los cuales son idóneos para aprovechamiento con un adecuado tratamiento. Algunos de estos subproductos generados, pueden ser las cabezas de pescado que se desechan cuando se desea sólo el músculo, también como resultado del fileteo se desechan las colas, pieles, espinas y vísceras ^{19,27}.

Una de las primeras formas de revalorizar los subproductos de la pesca fue mediante la elaboración de harina de pescado, pero en la actualidad existen novedosas y potenciales formas, en la cual el producto final derivado de los subproductos tiene un alto valor bioactivo, es decir, tiene una actividad biológica, que ejerce un beneficio al organismo, como por ejemplo los hidrolizados proteicos, así mismo tenemos otros usos como la obtención de colágeno, ácidos grasos, quitosano, condroitín sulfato, ácido hialurónico y escualeno, todos los usos que se han propuestos hasta ahora, derivan del conocimiento científico actual que aportan con investigaciones en esta área con la finalidad de reducir los desperdicios y contaminación generada por éstos^{19,27}.

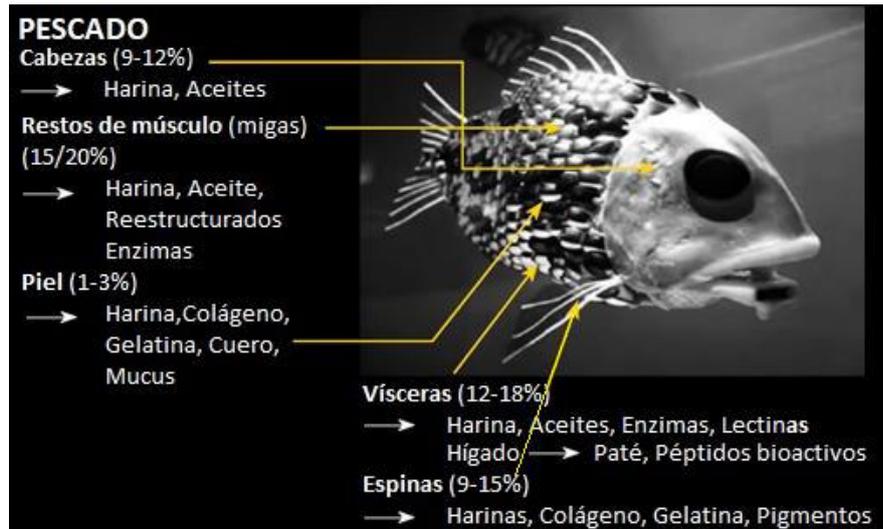


Figura 1. Subproductos del pescado y sus diversos usos potenciales²⁷.

3.1.1. Situación de la actividad pesquera a nivel mundial y generación de subproductos

Podemos resaltar un aumento de la producción de las capturas en aguas marinas, ya que en el 2014 fue de 81,5 millones de toneladas, lo que refiere un incremento ligeramente notable contrastando con los dos últimos años previos al 2017^{19,20}. En cuanto al uso, la mayor cantidad va dirigida al consumo humano directo, seguido por la transformación a harina de pescado que va aumentando debido a la obtención a partir de subproductos de pescado, que anteriormente se desechaba, de esta manera, en los últimos años varios países están aprovechando de forma más eficiente, inocua e higiénica los subproductos para la elaboración de hamburguesas, gelatina, salsas, biodiesel o biogás, productos dietéticos (quitosano), productos farmacéuticos (incluidos los aceites), pigmentos naturales (tras la extracción) y cosméticos (colágeno) y en otros procesos industriales^{19,20}.

Sin embargo, no todo es beneficioso para la población, dado que existen desventajas en cuanto a la extracción de las especies marinas por sobre captura de recursos, destrucción del hábitat y los descartes de la actividad pesquera, referida a los residuos y peces que vuelven a arrojarse al agua^{19,20}. Existe estimaciones de 1994 que el descarte marino anual era de 27 millones de toneladas, sin embargo, se evidencia una reducción al 2014 de los descartes

como subproductos a nivel mundial ascendían a 7.3 millones de toneladas, cifra que nos incita a mejorar la utilización del recurso marino, como se está realizando en los últimos años gracias a la implementación de la tecnología^{19,20}.

3.1.2. Situación de la actividad pesquera en Perú y subproductos generados

En años recientes se ha reportado que aproximadamente el 50% de la cantidad de peces extraídos y también de producción de harina proviene de la región del norte (de Piura a Ancash), así mismo, en la región del centro que comprende Lima e Ica se produce el 35%, por último, en la región sur entre Arequipa y Moquegua se produce el 15%^{18,21}.

La labor pesquera en nuestro país está sustentada en la extracción de los recursos marinos más comerciales nacionales e internacionales, las especies que principalmente sostienen esta actividad son la anchoveta (*Engraulis ringens*), el jurel (*Trachurus murphyi*) y la caballa (*Scomber japonicus*), pero también en los últimos años ha despertado el gran interés por la extracción de otras especies marinas las cuales se exportan en grandes cantidades y aceptadas a nivel internacional como es la pota (*Dosidicus gigas*), y en menor escala el dorado o perico (*Coryphaena hippurus*), entre otros^{18,21,22,23}.

Así mismo, hace algunos años en el Perú, los residuos generados por las industrias pesqueras son tratados para el aprovechamiento en la alimentación animal mediante la fermentación con bacterias lácticas, obteniendo así un producto con altas propiedades nutritivas, llamados los ensilados biológicos, éstos se caracterizan por su cualidad antimicrobiana ejerciendo su acción contra bacterias patógenas y putrefactiva, por lo que se considera un sustituto de la harina de pescado reduciendo el costo de la alimentación en los animales ^{21,22}.

3.2. Descripción de la especie marina

La especie *Sarda chiliensis chiliensis* a la que conocemos comúnmente como “Bonito” se ha logrado mantener como uno de los principales recursos ictiológicos de nuestro país. Las características resaltantes se deben a su cuerpo

de forma alargada, cabeza de gran dimensión de forma puntiaguda y su tronco cubierto de forma parcial por escamas muy pequeñas. En cuanto a su coloración es azul acero degradándose hasta llegar a una coloración gris plateada en las partes inferiores de su cuerpo^{24,25,26}. Esta especie está clasificada como un pescado azul por contener gran cantidad de grasas sobre todo poliinsaturadas: Omega 3, ácido oleico y ácido linoleico. Los lugares de pesca donde se extrae la mayor cantidad de bonito son Piura, Lambayeque, Lima, Ica y Arequipa. Se estiman datos del año 2014 donde se reporta que en la capital se desembarcó 7600 toneladas métricas (TM) de esta especie, así mismo en Ica 6400 TM, siguiendo Piura con 6200 TM desembarcadas, en Lambayeque 3900 TM y Arequipa con 3400 TM, entre otras ciudades^{24,25,26}.

3.3. Colágeno

Es una de las proteínas estructurales más abundantes en el organismo de los animales vertebrados, así por ejemplo en el ser humano esta proteína constituye un tercio de la proteína total, ello debido a que es un componente comúnmente encontrado en la matriz extracelular, siendo así la principal proteína de los diferentes tipos de tejido conectivo y está presente en diferentes partes del organismo vivo, como en la piel, huesos, tendones, cartílagos, vasos sanguíneos, dientes, cornea, entre otras^{27,28}.

Esta proteína es sintetizada por los fibroblastos, que son células de tejido conectivo propiamente dicho, además se caracteriza por ser una proteína insoluble en agua y por poseer una estructura fibrosa. Además, muchas investigaciones en vertebrados nos reportan la identificación de hasta veintiocho tipos de colágeno, con variaciones entre estos tipos debido a la diferencia en la composición de por lo menos 46 cadenas polipeptídicas desiguales^{28,29}.

3.3.1. Estructura del colágeno

Esta proteína está compuesta por tres cadenas polipeptídicas levóginas, dispuestas en forma paralela, en una conformación tipo helicoidal a las que se les denomina cadenas α , estas cadenas se enrollan una sobre otra, unidas por el enlace puente de hidrógeno de tal manera que forman una triple superhélice

de orientación dextrógira que tiene una alta resistencia a algunas proteasas (pepsina, tripsina y quimotripsina), pero puede ser degradada por enzimas colagenasas específicas^{28,29,30}.

Un análisis más detallado de cada una de las tres cadenas polipeptídicas que conforman la triple superhélice (tropocolágeno), nos sugiere que en su estructura el tercer residuo es el aminoácido glicina (Gly), de acuerdo a la representación X-Y-Gly, ya que esta secuencia es regular y periódica en cada una de dichas cadenas, en la cual X y Y aluden a cualquier aminoácido; sin embargo, las investigaciones reportan que el triplete más encontrado en la proteína colagenosa es Pro-Hyp-Gly, cabe señalar que esta disposición es frecuente en todos los tipos de colágeno, lo que resulta en la composición de aminoácidos de la proteína colagenosa sea singular: glicina (33%), prolina (12-20%) e hidroxiprolina(10%) entre otros aminoácidos en menor porcentaje^{28,29,30}.

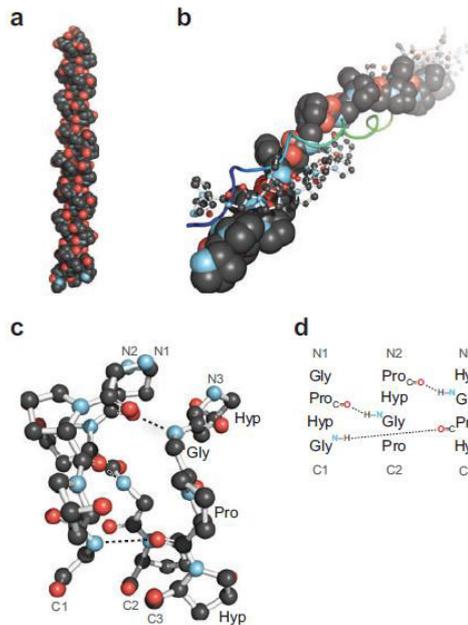


Figura 2. Descripción general de la triple hélice de colágeno. (A) la primera estructura de alta resolución cristalina de una triple hélice de colágeno, formado a partir de (ProHypGly)₄-(ProHypAla)₅-(ProHypGly)₅. (B) Observe el eje de una hélice triple (ProProGly)₁₀. (C) segmento de triple hélice de colágeno que destaca el escalonamiento de enlaces de hidrógeno entre hebras. (D) Escalonamiento de las tres hebras en el segmento en el panel C ²⁸.

3.3.2. Tipos de colágeno

Tres cadenas polipeptídicas que, entre sus diferentes tipos, se unen para conformar el tropocolágeno, definirán el tipo de colágeno que se origina por combinación de las ya mencionadas 46 cadenas variables, por lo tanto, los hasta ahora 28 tipos de colágeno, pueden constituirse por la unión triple de 1 o más tipos de cadenas polipeptídicas, así pues, debido a la variedad de cadenas

polipeptídicas, los tipos de colágenos pueden llegar a ser muy complejos y de estructura diversa, debido a sus variantes de empalme, la posibilidad de que hayan dominios adicionales de tipo no helicoidal, por su ensamblado, entre otras^{27,28}. El colágeno tipo I se conforma por dos cadenas $\alpha 1(I)$ y la tercera cadena viene a ser $\alpha 2(I)$, por otro lado, el colágeno tipo II tiene tres cadenas $\alpha 1(II)$ iguales, caso similar es el del colágeno tipo III con tres cadenas $\alpha 1(III)$ iguales, pero el colágeno tipo IV está conformado por dos cadenas iguales $\alpha 1(IV)$ más una cadena $\alpha 2(IV)$. De este modo, la familia de la proteína colagenosa se subdivide en diferentes tipos según la función que adopta: así tenemos a los colágenos fibrilares o formadores de fibrillas (tipos I,II,III,V,XI,XXIV y XXVII) que son los más abundantes por estar presente en las estructuras óseas y en la matriz fibrilar de los cartílagos articulares, los colágenos de membrana basal (tipo IV) cuya triple hélice se caracteriza por ser muy flexible, los colágenos asociados a fibrillas con triple hélices interrumpidas (colágenos FACIT, tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX y XXI) que se asocian como moléculas individuales con fibrillas de colágeno grande, los colágenos de cadena corta (tipos VIII y X) forman redes hexagonales, los de anclaje de colágeno fibrilar o fibrillas de anclaje (tipo VII), multiplexos (tipos XV y XVIII), los colágenos asociados a la membrana con triple hélice interrumpidas (colágenos MACIT, tipos XIII,XVII,XXIII y XXV), el colágeno tipo VI microfibrilar con enlaces cruzados altamente disulfuros, entre otros de función única^{27,28,29}. Cuando las 3 cadenas que forman el tropocolágeno son semejantes darán origen a un colágeno homotrímico como los tipos: II, III, VII, VIII, X; sin embargo, si la triple hélice está formada por dos o más cadenas diferentes, dará lugar al colágeno heterotrímico, como son los tipos I, IV, V, VI, IX y XI. Por otra parte, el colágeno tipo I se erige como el de mayor demanda por las diferentes industrias, que, en los últimos tiempos la fuente que presenta gran expectativa se ha enfocado en los peces^{27,28,29,30}.

3.4. Gelatina

La gelatina es un polipéptido que se obtiene por desintegración (hidrólisis) parcial del colágeno extraído principalmente de pieles de ganado vacuno y cerdo, es decir, se obtiene la gelatina mediante la ruptura de los enlaces que unen las

cadenas polipeptídicas de la súper hélice del colágeno, de esta manera se logra el desenredo y disociación de dichas cadenas, tornando soluble a la gelatina que en un primer momento era insoluble en agua en forma de colágeno^{29,31}.

Es importante señalar que este biopolímero, obtenido por descomposición del colágeno tiene innumerables aplicaciones industriales, en la industria alimentaria es materia prima principal para la producción de golosinas (gelificadas) como gomitas y jaleas. La ventaja que ofrece el uso de gelatina es por ser inodora, insípida, fácilmente dispersable y se hidrata de manera rápida, entre otras. Otra de sus aplicaciones industriales es en el área farmacéutica, donde se aprovecha la propiedad de formación de películas, además es la materia prima principal para la elaboración de las cápsulas duras y blandas^{31,32,33}.

3.4.1. Gelatina obtenida de pescado

Durante muchos años se ha tenido como fuente de colágeno a las pieles de ganado vacuno, huesos de ganado ovino y piel de porcino, pero no siempre es aceptada, por ejemplo, la población musulmana y judía no acepta la gelatina proveniente del ganado vacuno por motivos religiosos, además de estar asociadas a enfermedades propias de los animales terrestres de los que se obtiene comúnmente, por ejemplo, la encefalopatía esponjiforme bovina (EEB). Ante tal problemática, en los últimos años se ha tratado de encontrar fuentes alternativas de gelatina, hallando que los subproductos (pieles, espinas y escamas) del pescado son una fuente rica en proteína colagenosa^{31,32,33}.

Esta alternativa, representa un excelente aprovechamiento de los subproductos de la actividad pesquera, puesto que se utilizan los desechos como: piel, cabeza, cola, entre otros, formados, por ejemplo, luego del fileteo del pescado u otra aplicación que, al no ser aprovechados, se desechan y generan contaminación, dado que representan un alto porcentaje del peso inicial del pescado^{27,31}. Entre las ventajas de la utilización de la gelatina de pescado tenemos que se extrae de una fuente altamente renovable, libre de enfermedades propias de animales terrestres y tiene el olor y sabor menos desagradable en comparación con la gelatina extraída de las pieles de cerdo; sin embargo, la gran desventaja está en

que tiene la fuerza de gel ligeramente menor en comparación con las gelatinas de origen vacuno, ovino y porcino^{27,31,32}.

Se ha logrado recopilar trabajos actualizados de investigación a nivel mundial donde se evidencia la importancia de la novedosa fuente de gelatina, la cual deriva de la proteína colagenosa, por ejemplo en Brasil, De Souza R. et al., 2011³² lograron extraer gelatina a partir de las pieles de la cabeza de la especie *Cyprinus carpio*, en EE.UU se pudo optimizar la extracción de gelatina a partir de la piel de la especie de pescado *Ictalurus punctatus* Yang H. et al., 2007³¹, un estudio en India reporta la extracción de gelatina a partir de desechos (pieles y huesos) de *Oolithes ruber* y *Nemipterus japonicus* Koli J. et al., 2013³³, en Malasia se logró extraer gelatina a partir de los residuos (escamas y huesos) de la especie *Oreochromis niloticus* Zakaria S. y Abu N., 2015³⁴, del mismo modo un estudio publicado en Turquía obtuvo la extracción y posterior caracterización fisicoquímica de la gelatina extraída de las pieles de dos especies de pescado *Perca fluviatilis* y *Sander volgensis* por Thi C. et al., 2017³⁵, y Perú no ha sido ajeno en esta área de investigación, así tenemos un estudio que logró extraer colágeno a partir de los residuos del procesamiento industrial de la especie *Engraulis ringens* Solari A. y Córdova J., 2015³⁶, así como también reportan que la temperatura y el tiempo de extracción influyen en las propiedades de la gelatina extraída a partir de la piel de *Mustelus mento*, Miano A. et al., 2014².

3.5. Hidrólisis

Dentro de las muchas definiciones que se tiene por este cambio químico, podemos detallar que el proceso de hidrólisis se trata de una de las más grandes reacciones químicas, en la cual el principal gestor de dicha reacción es la molécula de agua. En esta transformación interviene una molécula inicial con enlace covalente, que bajo la presencia de agua, reacciona con ésta, y como resultado del proceso se obtiene la formación de un nuevo enlace covalente entre el radical (OH^-) del agua con un grupo que se forma de la ruptura del enlace covalente de la molécula inicial, de esta manera podemos señalar a la hidrólisis como reacción de desplazamiento de tipo nucleofílico, donde un nucleófilo (rico en electrones) ataca a un átomo electrofílico (necesitado en electrones)^{37,38}.

3.5.1. Hidrólisis enzimática

Este tipo de hidrólisis se diferencia de los demás debido a que implica la acción de una proteína enzimática en el proceso hidrolítico. Una peculiaridad de la hidrólisis enzimática es la formación del complejo enzima-sustrato [E-S] que está referida a un estado de transición del proceso hidrolítico, luego de la formación de este complejo, se lleva a cabo la reacción de hidrólisis, que al concluir se obtiene un producto diferente al sustrato inicial además de recuperar la enzima inalterada^{39,40}.

La hidrólisis enzimática se aprovecha en la investigación, alimentación y diversidad de industrias para transformar el sustrato inicial, y como resultado del proceso hidrolítico se modifican las propiedades funcionales y nutritivas del sustrato⁴⁸. Debido a lo señalado la hidrólisis de tipo enzimática presenta ciertas ventajas ante la hidrólisis química, por ejemplo, la selectividad por el centro de reacción de su sustrato específico, acción hidrolítica con las condiciones moderadas en cuanto a pH y temperatura del medio de reacción, no adición de sustancias inherentes a la reacción (extrañas) y el sostenimiento del valor nutritivo durante y posterior a la reacción de hidrólisis⁴¹.

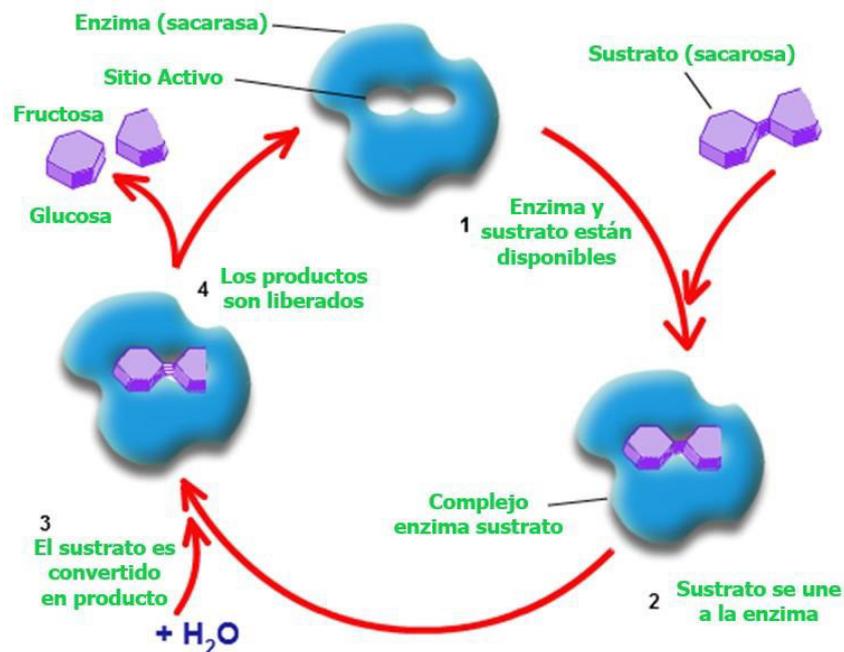


Figura 3. Diagrama que representa la hidrólisis de tipo enzimática, nótese la formación del complejo enzima-sustrato [E-S]⁴².

3.5.1.1. Hidrólisis enzimática de proteínas

Este subtipo de hidrólisis tiene como sustrato inicial una macromolécula proteica, y como producto del proceso se logra conseguir la ruptura de los enlaces peptídicos que presenta la proteína, por ende, se obtiene al final del proceso péptidos de diferentes tamaños y aminoácidos libres en el medio de reacción; sin embargo, es posible obtener estos productos a través de la hidrólisis química ácida o alcalina de proteínas, pero con ciertas desventajas comparada con la hidrólisis enzimática, ya que son muy dificultosas en el control del proceso, además, simultáneamente con los productos de interés del proceso hidrolítico de proteínas se generan toxinas, destrucción de aminoácidos libres, o de lo contrario productos con valor nutricional nulo o exiguo^{43,44}. La hidrólisis enzimática es el método más beneficioso para la obtención de péptidos de cadena corta de composición definida y aminoácidos deseables, proyectados a una medida ideal, productos de altísima calidad, por el control que se puede ejercer en el proceso^{43,44,45}.

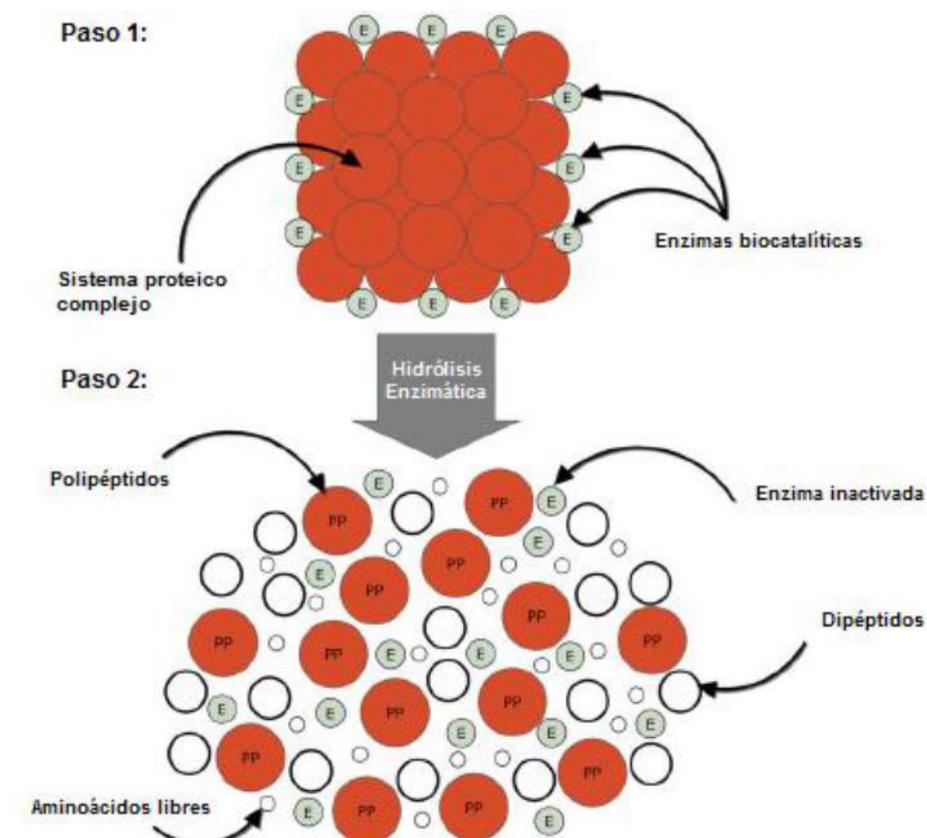


Figura 4. Esquema que representa el proceso de hidrólisis enzimática⁴⁶.

El proceso hidrolítico enzimático de proteínas se lleva a cabo a través de una serie de etapas secuenciadas de reacciones que involucran rupturas de enlaces. Los productos se grafican como se muestra en la figura 5:

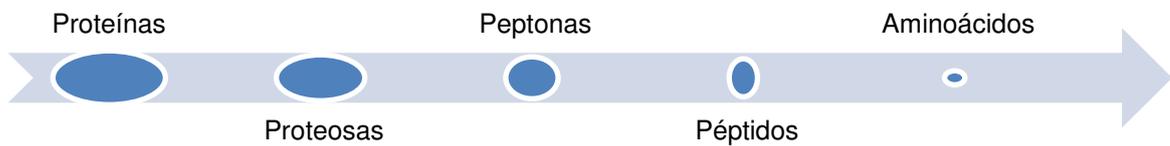


Figura 5. Secuencia de la obtención de productos en la hidrólisis enzimática⁴².

Podemos observar las especies intermedias de formación en el proceso, diferenciándose una de otra en la propiedad de solubilidad, además de su tamaño molecular medio (TM) aproximado para las especies intermedias, así como de la relación nitrógeno amino/nitrógeno total (NA/NT) de las mismas, caracterizadas en la tabla 1.

Tabla 1. Caracterización aproximada de las especies intermedias producidas en la hidrólisis enzimática de proteínas⁴¹.

	<i>TM</i>	<i>NA/NT</i>
<i>proteínas</i>	> 20000	< 0,01
<i>proteosas</i>	5000 - 10000	< 0,01
<i>peptonas</i>	1000 - 6000	0,1 - 0,5
<i>péptidos</i>	200 - 500	0,5 - 0,8
<i>aminoácidos</i>	75 - 200	0,8 - 0,9

3.5.1.1.1. Hidrolizados enzimáticos de colágeno o gelatina de pescado

Cuando hacemos referencia a la hidrólisis de colágeno y gelatina, se pretende dar a entender acerca de la descomposición o ruptura de los enlaces de la proteína colagenosa integral o parcialmente hidrolizada (gelatina), consiguiendo como resultado una cantidad considerable de péptidos de desigual tamaño. Para la hidrólisis tanto de la gelatina como del colágeno, en los últimos tiempos,

diferentes investigaciones y empresas han dirigido su atención hacia una hidrólisis de tipo enzimática a fin de lograr un proceso controlado, y de esta forma obtener aminoácidos y péptidos de tamaño o peso molecular determinados y deseados, pero a la vez se consigue péptidos de variado tamaño, tornando de esta manera al producto de la hidrólisis con muchas ventajas respecto a la proteína inicial, como por ejemplo, mejoras en cuanto a las propiedades funcionales de viscosidad y solubilidad, así como también su biodisponibilidad, que son considerablemente mejores comparados con la proteína sin hidrolizar. No está de más aclarar que este tipo de reacción hidrolítica se caracteriza por ser un proceso controlado en cuanto a las condiciones de pH, temperatura, enzima sustrato, tiempo, entre otras, y que, sin el empleo de una enzima, el proceso sería considerablemente lento o no factible. No obstante, no podemos dejar de lado la especificidad de la enzima por el sustrato, para lo cual, el colágeno como sustrato puede ser hidrolizado por numerosas enzimas (pepsina, tripsina, quimotripsina y papaína)^{47,48,49,50}.

Se ha notificado en numerosas investigaciones que la hidroxiprolina es un aminoácido específico de la proteína colagenosa, además siendo el dipéptido más común de encontrar tras su hidrólisis el conformado por Prolina-Hidroxiprolina (Pro-Hpro)⁴⁸.

3.6. Grado de hidrólisis

Es fundamental determinar el valor de (GH) en un proceso hidrolítico, debido a que es un indicador confiable y muy definitivo del nivel de la reacción que se lleva a cabo, puesto que se precisa la cuantificación de las rupturas de los enlaces peptídicos de la proteína originaria. Este parámetro es muy importante de determinar porque nos mide el grado o estado de la reacción química de hidrólisis, ya que como resultado de este, se obtendrá cadenas peptídicas de diferente tamaño o aminoácidos libres, los cuales influyen directamente en las propiedades funcionales y nutricionales del producto, que tendrá un determinado uso de acuerdo a lo obtenido; sin embargo, también se reporta que el %GH final depende de las variables controladas en el proceso, entre las que más influyen podemos citar al tiempo de reacción, temperatura, pH, entre otros factores

fisicoquímicos, además de la relación enzima-sustrato y del tipo de enzima a emplear^{45,51,52}.

Para el cálculo de este indicador, se utiliza la ecuación:

$$GH = \frac{h}{h \text{ total}} \times 100\%$$

Donde GH: Grado de Hidrólisis, h: cantidad de enlaces peptídicos hidrolizados y h total: cantidad de enlaces peptídicos totales en la muestra original⁵⁵.

Si bien es cierto, a la fecha se ha desarrollado numerosos métodos para cuantificar y determinar el GH, la elección del método depende de muchas variables, por ejemplo, de la muestra hidrolizada, sensibilidad del método con la muestra y equipos por emplear. De acuerdo con los diferentes estudios realizados, las técnicas que frecuentemente podemos distinguir en las investigaciones para determinar el %GH se justifican en tres principales razones como la determinación de los grupos α -amino liberados, determinación del nitrógeno soluble posterior a la precipitación de la proteína con ácido tricloroacético (ATC), y, por último, valoración mediante potenciometría del protón liberado por la escisión del enlace peptídico^{45,51,52,53,54}.

3.6.1. Factores que afectan la hidrólisis enzimática.

En la actualidad, muchas investigaciones reportan información específica sobre los factores que afectan las reacciones donde intervienen los catalizadores enzimáticos, entre los que tenemos: pH, temperatura, tiempo, concentración enzima/sustrato, entre otras; sin embargo, por la mayor influencia que generan, dos se han estudiado a la fecha^{55,56}:

- Temperatura, la mayoría de los catalizadores biológicos cumplen su óptimo trabajo a temperatura ambiente o a temperatura fisiológica (37 °C) y de manera constante, no obstante, existen excepciones y a la vez, evidencia científica *in vitro*, los cuales reportan que a mayor temperatura (40 °C) mejora considerablemente la actividad enzimática, pero al sobrepasar los niveles de temperatura, la actividad enzimática disminuye debido a la desnaturalización^{55,57}.

- pH, este factor es muy variable para cada enzima, puesto que depende del medio donde se lleva a cabo la reacción enzimática, por ejemplo, las de tipo citosólicas soportan una variación de pH entre 7-8, las de tipo lisosomal, ejercen su acción a pH óptimo ácido, y enzimas como la pepsina, necesita de un pH entre 1,5 – 2 para optimizar su actividad^{55,56}.

3.7. Enzimas proteolíticas.

Estas enzimas pertenecen a la clase de las hidrolasas, consiguientemente, van a ejercer su acción en el proceso de hidrólisis proteica, específicamente en los enlaces de naturaleza peptídica. Como producto de su actividad en una reacción catalítica va a liberar al medio, aminoácidos o péptidos de cadena más corta, respecto a la molécula proteica inicial (sustrato). En cuanto a la clasificación de las enzimas proteolíticas, podemos agruparlas según su especificidad por el sitio de acción en dos clases, las primeras corresponden a las exopeptidasas, que actúan sobre C- o N- terminal denominadas carboxipeptidasas y aminopeptidasas respectivamente; sin embargo, algunos autores las agrupan según el número de aminoácidos liberados como aminopeptidasas si libera un aminoácido, dipeptidilpeptidasa o dipeptidasa si libera un dipéptido y tripeptidilpeptidasa si libera un tripéptido^{58,59,60}.

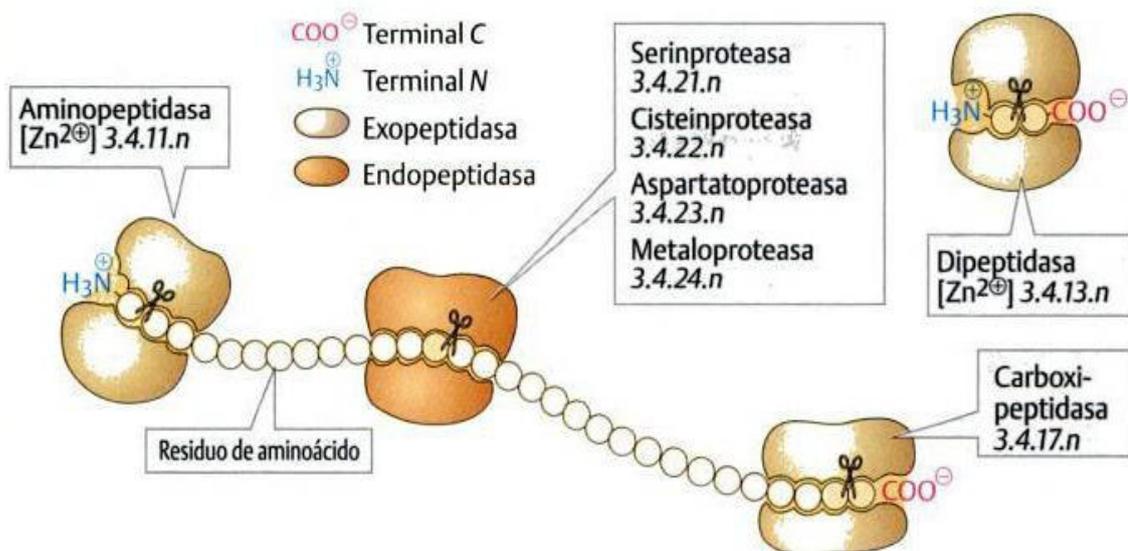


Figura 6. Clases de enzimas proteolíticas de acuerdo al sitio de acción⁵⁸.

La segunda son las endopeptidasas, ejerce su acción de hidrólisis en el enlace peptídico que está contenido dentro de la estructura de las cadenas proteicas pudiendo ser serinproteinasas, cisteinilproteinasas, aspartilproteinasas y metaloproteinasas, según el residuo catalítico primario^{58,59,60}. Se han logrado aislar del ser humano, animales, bacterias y de seres no vivos como los virus. Además, se han aprovechado en procesos industriales de alimentos, detergentes, cuero, fotográfica, así como también en la investigación y en la salud a través de la industria farmacéutica^{61,62}.

Tabla 2. Enzimas proteolíticas, clasificadas de acuerdo a su sitio de acción. Las flechas señalan los sitios de escisión⁶¹.

<i>Enzima</i>	<i>Fuente principal</i>	<i>Sitio de escisión</i>
Endopeptidasas		
Serin proteasas		
Tripsina	bovino	-Arg o Lys↓no específico-
Quimotripsina	bovino	-Trp (or Phe, Leu, Tyr) ↓ no específico-
Enteroquinasa	bovino	Asp-Asp-Asp-Lys↓ no específico-
Elastasa	porcino	-Ala (or Gly or Val) ↓ no específico-
Subtilisina	microbiano	-Trp (or Tyr, Phe, Leu) ↓ no específico-
Cistein proteasas		
Bromelina	planta	- no específico↓ no específico-
Papaína	planta	-Arg (o Lys) ↓ no específico-
Ficina	planta	- no específico↓ no específico-
TEV protease	E. coli	específico para -Gln-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly-
TVMV protease	E. coli	específico para -Glu-Thr-Val-Arg-Phe-Gln↓Ser-
Metaloproteasas		
Termolisina	microbiano	-Leu (o Phe) ↓Leu (o Phe, Val, Met, Ala, Ile)-
Colagenasa	microbiano	-Pro-neutro↓Gly-Pro-
Aspartil proteasas		
Pepsina	porcino	-Phe (o Tyr, Leu, Trp) ↓Trp (o Phe, Tyr, Leu)-
Catepsina D	bovino	-Phe (o Leu) ↓ no específico (no Val, Ala)-

Exopeptidasas		
Serin proteasas		
Carboxipeptidasa Y	levadura	- no específico ↓ no específico
Cistein proteasas		
Catepsina C	bovino	retira N-terminal dipéptido
Metaloproteasas		
Carboxipeptidasa A	bovino	-no específico ↓ aromático o ramificado preferido
Carboxipeptidasa B	porcino	específico para C-terminal Arg o Lys

3.7.1. Enzima alcalasa

Aislada de la bacteria *Bacillus subtilis*, de donde viene su denominación como Subtilisina Carlsberg, pertenece a la clase de las endoproteasas, específicamente se trata de una serinproteasa con clasificación E.C 3.4.21.62, y en la actualidad la preparación de esta enzima se obtiene en cantidades industriales a partir de la bacteria *Bacillus licheniformis*, cuya producción está a cargo de la empresa Novozymes®⁶³.

Está conformada con un intervalo de 268 – 275 residuos aminoacídicos y la característica principal es que posee una estructura de nivel terciario, compuesta por siete hojas β plegadas dispuestas en forma paralela, las mismas que están envueltas por nueve α hélices y, por último, dos hojas tipo β plegada en dirección antiparalela^{63,64}.

Esta enzima tiene un mecanismo de acción muy similar entre las de su categoría, cuyos residuos catalíticos son Asp, His y Ser, las cuales varían en su posición. Se ha logrado conocer por investigaciones que tolera variaciones de pH entre 6 – 12, por lo que se trata de una enzima que tiene actividad en medios alcalinos, y en cuanto a la temperatura, tolera variaciones entre 30 – 80 °C, reportando diferencias en su actividad, por lo que hace que esta enzima sea utilizada en diversos procesos debido a su gran adaptabilidad al medio de reacción⁶²⁻⁶⁶. Además, se ha conseguido el beneficio en campos de mayor utilidad como en la industria alimentaria de los lácteos, cárnicos y vegetales como, mejorando

propiedades funcionales como la solubilidad, mejora del sabor, viscosidad y también propiedades nutricionales, a la vez la industria del medio ambiente obtuvo beneficio al ser empleada para el tratamiento de aguas residuales, también es empleada en la industria textil, además del ya conocido empleo en las diversas investigaciones⁶²⁻⁶⁶.

3.8. Actividad biológica de hidrolizados enzimáticos de proteínas

Se ha puesto en evidencia, gracias a las investigaciones, sobre la actividad biológica que cumplen los hidrolizados que derivan de moléculas proteicas de fuente animal y vegetal. A través de la hidrólisis química o enzimática y también por fermentación microbiana, se logra obtener como resultado del proceso hidrolítico péptidos de cadena más corta, hasta incluso algunos aminoácidos libres en el medio de reacción, esto depende de muchos factores como por ejemplo la enzima utilizada, el tiempo de reacción y entre otras condiciones fisicoquímicas; sin embargo, con la hidrólisis enzimática de proteínas se ha logrado obtener productos que demuestran propiedades biológicas que prometen un gran beneficio para la salud^{67,68}.

Se ha logrado agrupar e identificar los hidrolizados según el %GH y sus respectivas propiedades⁶⁹:

- a. Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis (1-10%).** A través de este tipo de hidrolizados se logra mejorar las propiedades funcionales de la proteína inicial, como por ejemplo aumento de la solubilidad y de los poderes emulsificante y espumante, utilizados cada uno de ellos según las necesidades debido a los beneficios que ofrece al aumentar dichas propiedades mencionadas⁶⁹.
- b. Hidrolizados con alto grado de hidrólisis (mayor al 10%).** Con la obtención de este tipo de hidrolizados se busca que el producto del proceso hidrolítico obtenga mejoras en las propiedades nutricionales, respecto a la proteína inicial. La característica principal es que los péptidos logran mejor absorción gastrointestinal⁶⁹.

Dentro de todas las propiedades biológicas reportadas a la fecha podemos destacar la actividad antioxidante Bkhairia I. et al., 2016⁷⁰, antimicrobiana Demers-Mathieu V. et al., 2013⁷¹, inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina-ECA Mirzaei M. et al., 2016⁷², hipoglucémica Hsieh C. et al., 2015⁷³, antitrombótica Yang W. et al., 2007⁷⁴ y la más visionaria entre todas que corresponde a la actividad antitumoral Xue Z. et al., 2012⁷⁵, donde todas estas se relacionan directamente con los péptidos y aminoácidos contenidos en el hidrolizado proteico^{67,69}.

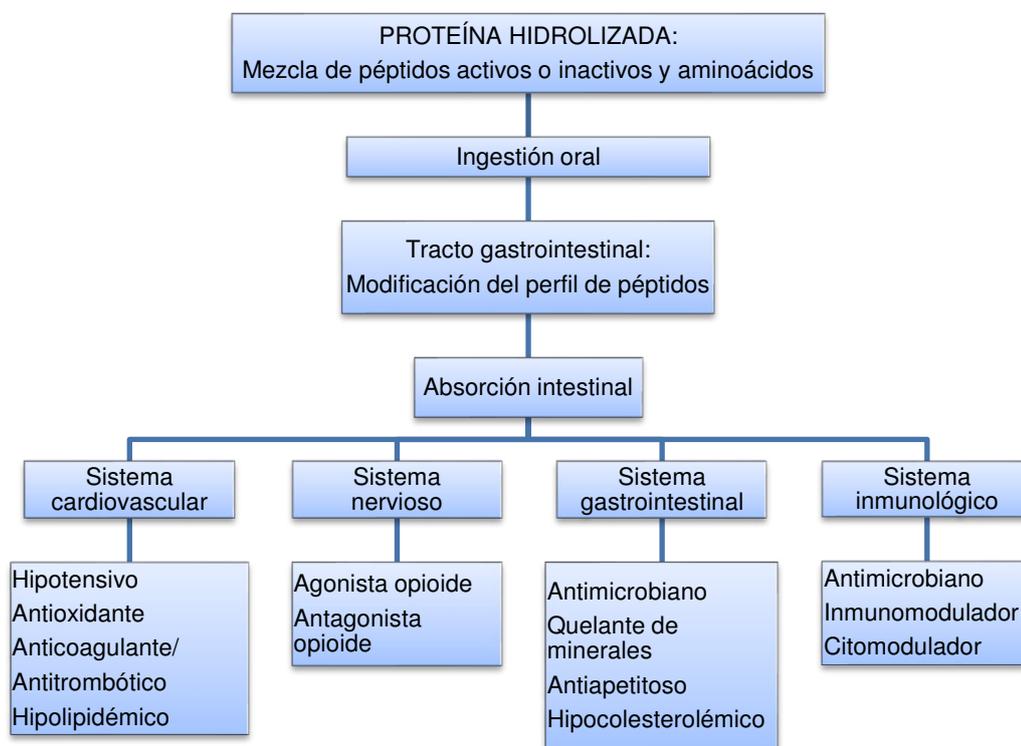


Figura 7. Actividades biológicas de los péptidos obtenidos como producto de la hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias⁶⁷.

3.8.1. Actividad antioxidante

El organismo humano es de naturaleza aerobia, es decir, requiere al oxígeno como una molécula indispensable para los procesos de reacción que se dan en el organismo, conocidos como procesos metabólicos y necesario también para la respiración, no obstante, luego de las reacciones en las que interviene, da paso a la formación de sustancias intermedias de alta toxicidad para el

organismo, debido a que son muy reactivos con las moléculas orgánicas estables, razón por la cual son denominados Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), entre ellas podemos destacar primero a los radicales libres como el ion superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($\cdot OH$), alcoxilo ($ROO\cdot$) y el óxido de nitrógeno, y en segundo lugar, tenemos a los no radicales, conformados por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y peroxinitrito ($ONOO^-$), que al reaccionar con el hierro, cobre u otras EROs, dan lugar a los radicales libres^{67,76}.

Tabla 3. Especies reactivas de oxígeno, donde se señalan en paréntesis los radicales libres y no radicales⁷⁷.

Compuestos (EROs)	Características
O^{-2} (anión superóxido)	Se forma en reacciones de autooxidación
HO_2 (radical perhidroxi)	Forma hidrogenada del anterior. Más liposoluble
H_2O_2 (peróxido de hidrógeno)	No es un radical libre, pero tiene una acción oxidante
$OH\cdot$ (radical hidroxilo)	Es el radical libre más reactivo que se conoce
$ROO\cdot$ (radical peroxilo)	

Si bien cierto, se ha citado que el organismo necesita a la molécula de oxígeno como una sustancia vital, pero no todos los EROs se generan al interior del organismo, específicamente en las células, es decir, de forma endógena, sino también de manera exógena. Del primer origen se puede mencionar la formación a través de los procesos bioquímicos como en la respiración celular, fagocitosis, autooxidación de lípidos, proteínas, aminoácidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y por la actividad enzimática^{76,77}. En cuanto a la vía de formación exógena tenemos por intoxicaciones en general, medicamentos, consumo de tabaco, radiaciones, xenobióticos y el ozono, en síntesis, a través de todas estas especies antes mencionadas son las vías para el origen de los radicales libres a los cuales se les ha responsabilizado de desencadenar patologías degenerativas como arterioesclerosis, artritis reumatoide, úlcera péptica, hipertensión, Parkinson, Alzheimer, diabetes, en el peor de los casos dañar el ADN de las células y por último, con mayor relación a los radicales libres, el envejecimiento^{76,77}.

Los antioxidantes son sustancias tanto de origen natural como sintetizadas artificialmente que, en pequeñas concentraciones cumplen la acción de impedir la transferencia de los electrones entre el radical libre y la molécula de fácil oxidación. Los organismos vivos poseen diferentes mecanismos de defensa ante los radicales libres clasificados de diferentes aspectos, según su función pueden ser primarios o secundarios, la otra clasificación es según su síntesis, pudiendo ser enzimático, producidos endógenamente o los no enzimático que, generalmente son adquiridos mediante la alimentación como son los grupos de los polifenoles, vitaminas, carotenoides, minerales, entre otros^{11,78,79}.

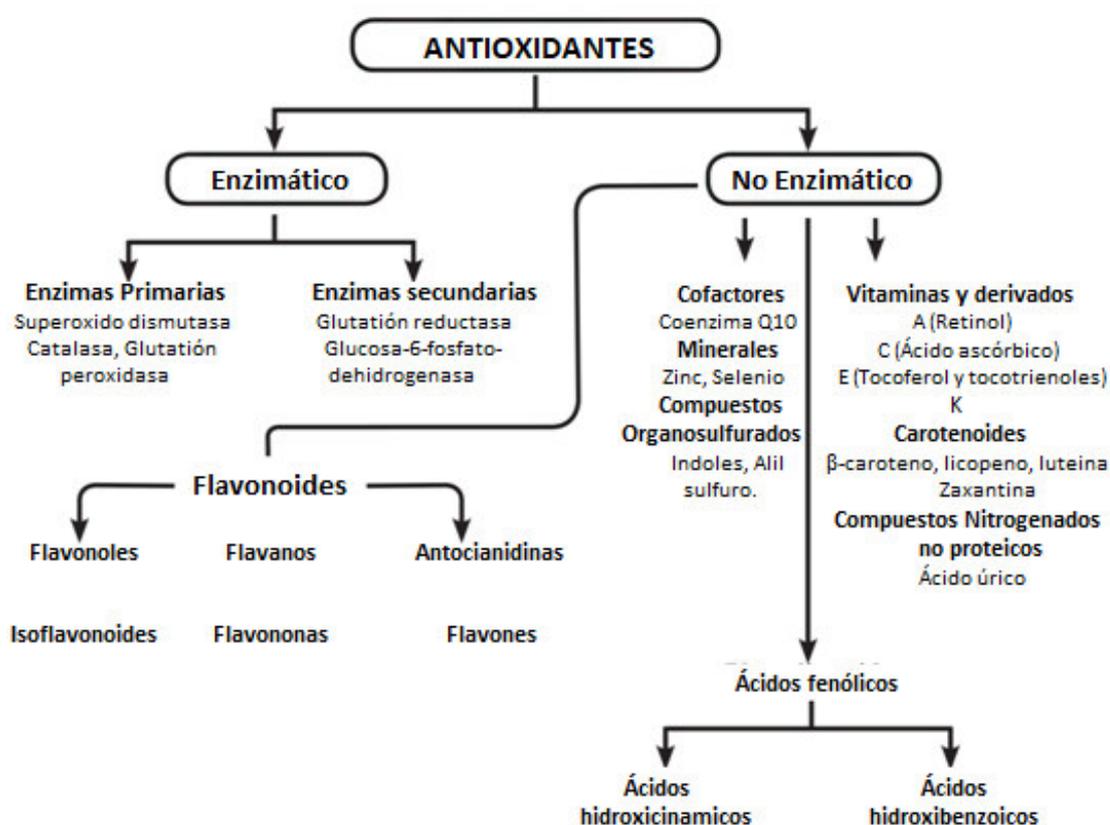


Figura 8. Clasificación del sistema antioxidante⁷⁹.

Se ha buscado a través de muchas investigaciones la inclusión de compuestos generados por la hidrólisis de proteínas tanto de origen animal como vegetal, es decir, de fuentes naturales, con el objetivo de inhibir la oxidación de estos tipos de alimentos, previniendo de esta manera que los radicales libres, responsables de la oxidación de las moléculas orgánicas y del estrés oxidativo, puedan ejercer

su acción degenerativa de las moléculas orgánicas. Ante esta situación, además de la necesidad en la elaboración de alimentos y de los radicales libres presentes en el organismo, hoy en día, cobra mayor valor e interés la identificación de péptidos y aminoácidos presentes en los hidrolizados enzimáticos de proteínas, tal y como se menciona en la investigación relacionada a la actividad antioxidante de los hidrolizados de gelatina de pescado realizado por Kim S. et al., 2001⁸⁰. Graszkiwicz A. et al., 2010⁸¹ demostraron que el hidrolizado del huevo de donde se separaron péptidos de pequeño tamaño presentaron actividad antioxidante, así mismo, el estudio llevado a cabo por Peng X. et al., 2009⁸² referente al hidrolizado del suero leche en el cual se purificaron según el peso molecular los péptidos obtenidos, los cuales demostraron tener propiedad antioxidante. Los mecanismos por los cuales los hidrolizados de proteína de diversas fuentes naturales demuestran actividad antioxidante, se debe a un conjunto de acciones, por ejemplo, eliminando los radicales libres, quelando iones e incluso impidiendo la peroxidación lipídica^{10,11,67,83}.

3.8.2. Actividad antimicrobiana

En las últimas décadas las investigaciones van dirigidas, en su mayoría, a descubrir nuevas fuentes de antibióticos, sobre todo de origen natural debido a la resistencia microbiana que hoy en día se atraviesa con los antibióticos de síntesis química, considerando que los antimicrobianos naturales no generan toxicidad en el organismo. De todas las posibilidades de acuerdo a las investigaciones recientes y que a la fecha aún continúan, resalta un área de investigación que nos señala precisamente que, a partir de las proteínas de fuente animal y vegetal, sometidas al proceso de hidrólisis enzimática, se pueden obtener péptidos y aminoácidos con efecto antimicrobiano^{71,84,85}.

Jovanović J. et al., 2015⁸⁶ lograron demostrar que los péptidos obtenidos por hidrólisis de la clara de huevo, aislados por ultrafiltración, tuvieron bioactividad antimicrobiana contra algunos microorganismos gram-positivos, gram negativos e incluso contra la levadura *Candida albicans*, también Beaulieu L. et al., 2013⁸⁷ en su estudio de investigación pudieron demostrar la actividad inhibidora del crecimiento de bacterias gram-positivas y negativas a partir de fracciones

peptídicas del hidrolizados de subproductos de cangrejo, Ennaas N. et al., 2015⁸⁸ lograron aislar y caracterizar cuatro péptidos con propiedad antimicrobiana gram-positiva y gram negativa, que fueron obtenidos a partir del hidrolizado de los subproductos del pescado *Scomber scombrus*. Esta área de estudio se sitúa como uno de las más recurridas por la necesidad de descubrir alternativas tanto para la industria alimentaria como para la salud de la población^{67,89,90}.

Matsuzaki K., 1999⁹¹ señala que los péptidos aumentan la permeabilidad de la membrana plasmática bilipídica del organismo procarionota debido a una interacción muy dinámica, que logra desestabilizar dicho componente celular. Por otro lado, en un estudio de revisión Mulero J. et al., 2011⁸⁹ señala también otros posibles mecanismos de acción como es la provocación de la fagocitosis al interactuar el péptido con la membrana, además al entrar en contacto con las moléculas de ADN o ARN alterando la división celular y síntesis proteica respectivamente^{67,89}.

3.8.3. Otras actividades biológicas

Numerosas investigaciones hoy en día muestran gran interés por la búsqueda de nuevos agentes con actividad biológica, direccionado hacia fuentes de origen natural, en ese sentido, numerosos estudios lograron reportar otras actividades biológicas, que poseen un gran avance y prospectiva, tal es caso de Wang Z. et al., 2016⁹² quienes demostraron la bioactividad antitumoral en células MCF-7 (células de cáncer de mama) y Hep G-2 (células de cáncer de hígado) con el hidrolizado proteico del alga *Arthrospira platensis*, aislando fracciones peptídicas y su posterior identificación, por su parte Kongo J. et al., 2011⁹³ pudieron demostrar *in vitro* la actividad hipocolesterolemica con el hidrolizado enzimático de la proteína desgrasada de maíz, por último, Kumrungsee T. et al., 2016⁹⁴ demostraron que los péptidos obtenidos del hidrolizado enzimáticos del germen de trigo inhibieron indirectamente la calmodulina II dependiente de Ca^{2+} , por inhibición de la proteína quinasa II, que interviene en la regulación de funciones vasculares.

No podemos negar que en el campo de la investigación en cuanto a los hidrolizados proteicos tornan un futuro de muchos retos promisorios en el área farmacéutica y de los nutracéuticos por los amplios beneficios que ofrecen al organismo, puesto que en la actualidad ya se incluyen en dietas y se comercializan en diferentes países, siendo aceptadas por la población, tal es el caso de Ameal® en Japón, Evolus® en Finlandia y Bio Zate® en USA, todos ellos, integran a sus productos péptidos aislados de la hidrólisis enzimática que poseen actividad biológica con la finalidad de mejorar o mantener la salud^{67,92,95}.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales, equipos y reactivos

4.1.1. Materiales biológicos

- Muestra de pieles de pescado Bonito (*Sarda chiliensis chiliensis*)
- Enzima alcalasa (proteasa de *Bacillus licheniformis*, Sigma-Aldrich)
- Estándar de albúmina de suero bovino (BSA)
- *Pseudomonas aeruginosa* cepa clínica
- *Bacillus subtilis* cepa clínica
- *Staphylococcus aureus* cepa clínica
- *Candida albicans* cepa clínica
- *Escherichia coli* cepa clínica

4.1.2. Materiales

- Tubos de ensayo
- Beakers
- Matraces
- Bureta
- Pipetas.
- Pipetas Pasteur
- Aparato Microkjeldahl – Pirex (USA)
- Microplacas de poliestireno estériles
- Tubos ependorff
- Piceta
- Micropipeta multicanal de 10 – 100 μL – Eppendorf research
- Micropipeta 10 – 100 μL – Boeco
- Micropipeta 100 – 1000 μL – Boeco
- Placas petri

4.1.3. Equipos

- Espectrofotómetro UV-VIS - Agilent Cary 8454
- Balanza analítica – Mettler (precisión de $\pm 0,0001\text{g}$)
- Estufa universal UN30– MEMMERT
- Potenciómetro – SI Analytics – Lab. 850 (precisión $\pm 0,01\text{ pH}$)
- Baño maría – Trade Raypa
- Congelador vertical
- Cabina de flujo laminar – Telstar (Clase II – EN12469-2000)
- Cocinilla eléctrica doble placa

4.1.4. Reactivos

- Sol. de NaCl al 5%
- Sol. NaOH 0,5N
- Sol. CH₃COOH 0,5M
- Colorante azul brillante de Coomassie G-250
- Etanol al 95%
- Ácido fosfórico al 85% (w/v)
- Buffer fosfato de sodio pH=8, 10mM
- Buffer fosfato de sodio pH=7, 10mM
- Buffer Tris-Base / HCl pH=9, 10mM
- CuSO₄·5H₂O
- C₄H₄KNaO₆·4H₂O
- Agua destilada
- NaOH
- Na₂S₂O₃·5H₂O
- H₃BO₃ sol.sat.
- HCl 0.01N Estand.
- C₆H₄COOHCOOK
- H₂SO₄ Conc. (gravedad específica 1,84 libre de nitrógeno)
- K₂SO₄
- HgO

- Indicador: Sol. 2% rojo de metilo + Sol.2% verde de bromocresol (1:5)
- Ácido tricloroacético (ATC) Sol. 20%
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH- Sigma-Aldrich®)
- CH₄O (G.R.)
- Vitamina C (L-Ácido Ascórbico – Sigma-Aldrich®)
- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS- Sigma-Aldrich®)
- K₂S₂O₈
- C₂H₅OH (Abs.)
- Caldo Mueller-Hinton (Merck)
- Resazurina (Sigma Aldrich®, USA)
- Agar Trypticase de Soya
- Agua para Inyección
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox- Sigma Aldrich®)

4.2. Métodos y técnicas

4.2.1. Diagrama del procedimiento general de métodos de experimentación para hidrolizados de gelatina

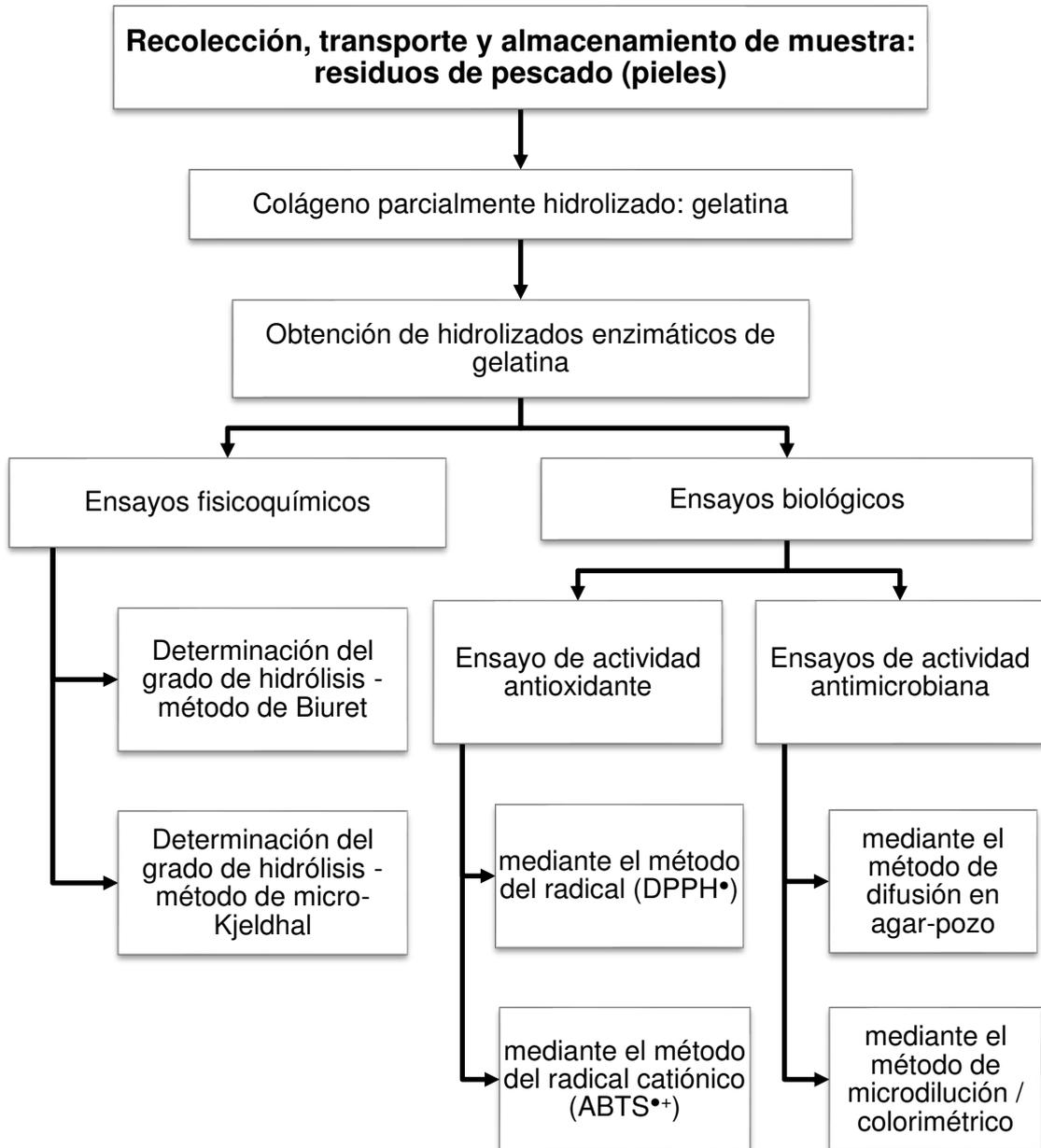


Figura 9. Diagrama general de métodos de experimentación llevados a cabo con los hidrolizados enzimáticos de la gelatina extraída de la piel de pescado.

4.2.2. Recolección, transporte y almacenamiento de la muestra

Consideraciones en la recolección de muestras:

- Se recolectaron los residuos de la actividad pesquera correspondiente a las pieles de la especie *Sarda Chiliensis Chiliensis* (Bonito), el peso total de muestra fue 1,820 Kg., cabe señalar que las pieles tenían adheridas restos de tejido muscular, propias de la especie en referencia, luego de retirar los restos el peso neto de la muestra colectada fue de 1,150 Kg.
- Lugar y fecha de recolección: la recolección se llevó a cabo en el Terminal Pesquero de Ventanilla, ubicado en la Av. Nestor Gambetta 6311, Provincia Constitucional del Callao, durante el mes de diciembre del año 2016 y en el horario de 4:30 am – 7:00 am.
- Almacenamiento y transporte: las muestras colectadas se almacenaron en un cooler, provisto de gel refrigerante, con la finalidad de mantener la temperatura entre (-2 a 8°C). La cantidad de muestra total se transportó en las mismas condiciones señaladas, hasta llegar al laboratorio de Bioquímica en el 3er piso del Departamento de Bioquímica, donde finalmente se almacenó la muestra a -20°C hasta su uso.

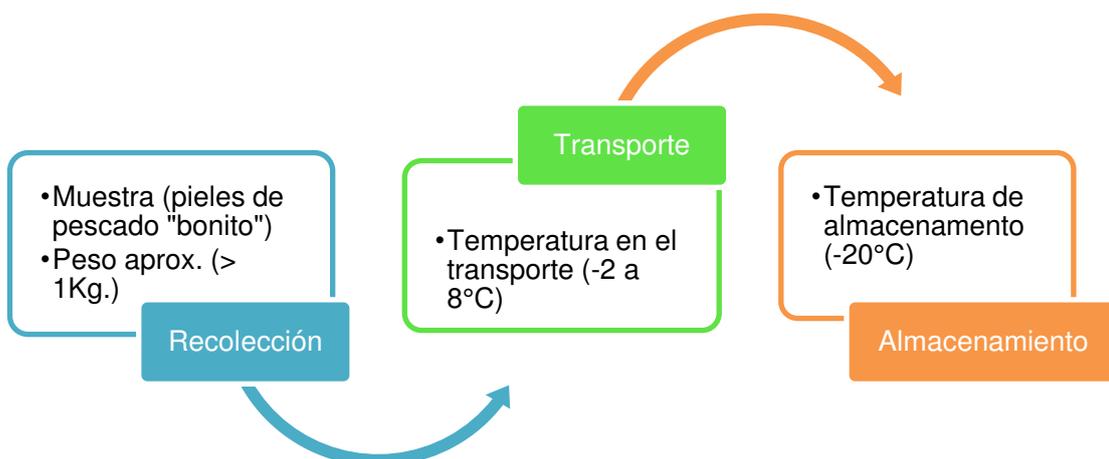


Figura 10. Diagrama de flujo de los procesos de recolección, transporte y almacenamiento de la muestra problema.

4.2.3. Obtención de gelatina por hidrólisis parcial del colágeno

La metodología de referencia para obtener gelatina a partir del colágeno de las pieles de pescado de la especie ya mencionada anteriormente fue la descrita en la patente desarrollada por Gómez-Guillén y Montero, 2001⁹⁶, con algunas modificaciones en adaptación a nuestra investigación, detallada en las etapas siguientes:

4.2.3.1. Descongelación, limpieza y pesaje de la muestra

La muestra recolectada, almacenada a (-20°C), se descongeló a temperatura ambiente hasta lograr el estado natural de la muestra de consistencia blanda, de inmediato se retiró manualmente y con ayuda de agua destilada los restos de músculos flotantes y otras sobras, el peso final de la muestra limpia fue de 1,150Kg.

4.2.3.2. Reducción de tamaño y lavado

Las muestras obtenidas del paso anterior se cortaron en trozos de aproximadamente 1 x 1 cm., posteriormente los trozos se lavaron con solución de cloruro de sodio al 5%, con una fuerte agitación durante un tiempo de 30 minutos a una temperatura de 10°C., considerando la relación de peso de la piel: volumen de solución de 1:10 (p:v).

4.2.3.3. Hidrólisis en medio básico

La muestra previamente lavada en la etapa anterior se trató con una solución de NaOH 0,5N con las condiciones de temperatura de 30 °C, por un tiempo continuo de 10 horas, con una relación de peso de la piel:volumen de solución de NaOH 0,5N de 1:10 (p:v), con agitación moderada, la finalidad de esta etapa es conseguir eliminar la mayor cantidad de proteínas distintas al colágeno y grasa que está adherida a la piel del pescado, dicha eliminación se extiende como semisólidos en el sobrenadante.

4.2.3.4. Lavado

Con la finalidad de eliminar todo el sobrenadante por hidrólisis de la etapa anterior, se lavaron los trozos de piel con abundante agua destilada a condiciones de temperatura ambiente y tiempo 10 minutos.

4.2.3.5. Solubilización de colágeno y tratamiento térmico para la obtención de gelatina

En esta etapa el colágeno presente en la matriz de la piel trozada del pescado se solubilizó en medio ácido y a la vez por acción de la temperatura pasó a gelatina, para obtener lo señalado los trozos de 1 x 1 cm. se trataron con agua destilada ajustando a pH=5 con ácido acético 0,5M en baño maría a una temperatura entre 60-70 °C por un tiempo de 4 – 6 horas, con una relación peso piel:volumen de agua destilada pH=5 de 1:10 (p:v) y con agitación moderada. Trabajar bajo estas condiciones, garantizó una alta solubilidad del colágeno y luego del tiempo señalado, obtener la gelatina disuelta en la solución en baño maría.

4.2.3.6. Filtración

La solución obtenida del paso anterior se filtró con la ayuda de un tamiz, a la vez se colecta la solución en beakers de gran volumen (3L), la finalidad de esta etapa fue lograr la aclaración de la solución y retener las partículas generadas en la agitación anterior.

4.2.3.7. Congelación

En esta etapa se congeló la solución obtenida del paso 6 en bandejas de gran extensión a condiciones de -20 °C por un tiempo continuo de 24 horas, la finalidad de este paso es eliminar el exceso de agua.

4.2.3.8. Descongelación y secado

El producto que se obtuvo del proceso anterior se descongeló a temperatura ambiente, formándose de esta manera bloques de gelatina coagulada y exceso

de agua líquida que se eliminó por decantación, inmediatamente se colocaron los bloques en placas petri de gran tamaño y bandejas extensas para el secado en la estufa de circulación de aire forzado a temperatura de 50 °C y por un tiempo de 12 horas.

4.2.3.9. Raspado y almacenamiento

Como producto del paso anterior se generó láminas secas de color amarillento adheridas a la superficie de las placas petri de gran tamaño y bandejas, dichas láminas fueron raspadas y almacenadas inmediatamente en tubos de polietileno a temperatura ambiente y de forma hermética, de esta forma se logró extraer la gelatina, con la cual se realizó los ensayos posteriores, siendo conservada hasta su posterior uso.

Al término del proceso de extracción de gelatina a partir de los residuos correspondientes a las pieles de pescado, se calculó el rendimiento de la extracción haciendo uso de la ecuación propuesta por Thi C. et al., 2017³⁵:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{Peso seco de la gelatina (g)}}{\text{Peso de la muestra inicial (piel) (g)}} \times 100\%$$

En la figura 11 se representa el proceso para obtención de gelatina por hidrólisis parcial del colágeno presente en los residuos de la actividad pesquera, correspondiente a las pieles del pescado “Bonito”.

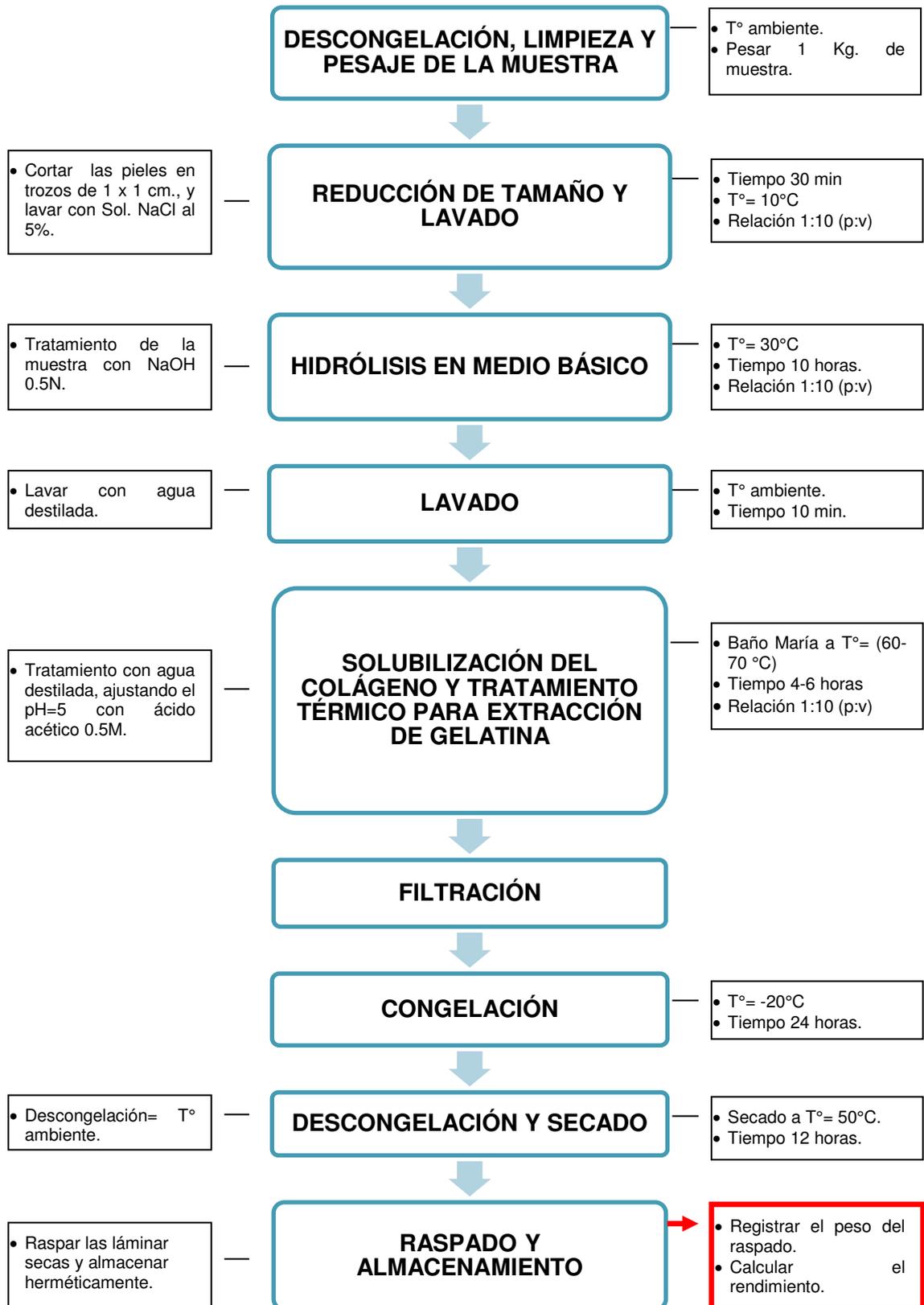


Figura 11. Esquema para la obtención de gelatina de la piel de pescado.

4.2.4. Cuantificación de proteína total mediante el método de Bradford

El componente básico del reactivo de Bradford, el colorante Azul Brillante de Coomassie-G250, se une a las proteínas, este reactivo en solución es de pH ácido, con una máxima absorbancia a 465 nm., al producirse la unión entre el colorante del reactivo en solución con la proteína, ocurre un cambio de coloración, por ende, un cambio máximo en la absorbancia a 595 nm., longitud de onda a la cual nos proporcionará la cantidad de proteína total en nuestra muestra^{97,98}.

Para la cuantificación de proteína total de la muestra que corresponde a la gelatina extraída de la piel de pescado, se realizó una curva de calibración, en la que se utilizó como estándar a la proteína albúmina sérica bovina (BSA). Para ello se mezcló en tubos de ensayo 10 µL de las diluciones del estándar o muestra problema resuspendida (2,5 %) (w/w) o diluciones, con 500 µL del reactivo de Bradford, así mismo detallamos que se utilizó como blanco la lectura del agua destilada, empleada para las diluciones del estándar y de la muestra. Luego de una agitación moderada por 1 min. a cada tubo de reacción se dejó reposar en una zona oscura, protegida de la luz a temperatura ambiente por 4 minutos, pasado el tiempo se procedió a la lectura al espectrofotómetro a 595 nm. Es importante señalar que la curva de calibración fue elaborada con el rango de concentraciones de BSA entre 250-750 µg/mL, tal como se demuestra en el anexo 2^{97,98}.

Luego de la elaboración de la curva de calibración y lectura de la muestra por triplicado, se procede a calcular la cantidad de proteína por interpolación de la lectura de la muestra en la curva correspondiente (Anexo 2), obteniendo la ecuación^{97,98}:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g BSA/mL}) = (\text{Abs } \lambda 595 \text{ nm} - 0,004) / 0,0006$$
$$R^2 = 0,9966$$

4.2.5. Hidrólisis enzimática y análisis de los factores que influyen en el proceso

El procedimiento a seguir para el proceso de hidrólisis de tipo enzimático de la gelatina obtenida a partir de las pieles de *Sarda Chiliensis Chiliensis* (Bonito), fue de acuerdo al método propuesto por Gómez-Guillén, 2010⁶, para lo cual se empleó la enzima comercial alcalasa (proteasa de *Bacillus licheniformis*, Sigma-Aldrich) y se planteó las condiciones para la realizar el análisis de los factores que influyen en el proceso hidrolítico enzimático, las condiciones a las que se experimentó el proceso hidrolítico fueron pH, temperatura, tiempo y relación [enzima]:[sustrato]. Para evaluar la significancia de dichos factores se analizó bajo el diseño factorial tipo Plackett-Burman con punto central por triplicado, un nivel de significancia de $p < 0,05$, logrando un total de 15 ensayos en combinación de las variables.

De esta manera, primero se determinó la cantidad (g/mL) de enzima contenida en la solución de alcalasa, utilizando la curva de calibración del estándar de proteína albúmina sérica bovina (BSA) con la que se cuantificó la proteína total de la muestra. Luego se disolvió la gelatina en los buffer correspondientes al tampón fosfato pH=7 (10mM), tampón fosfato pH=8 (10mM) y tampón Tris-Base/HCl pH=9 (10mM) en relación (2,5% w/w), seguidamente se añade la enzima alcalasa en la relación [enzima]:[sustrato] [1:20], [1:35] y [1:50], inmediatamente cada muestra de hidrólisis se somete a temperaturas de 50, 60 y 70°C, por último, los tiempos de hidrólisis fueron 2, 3 y 4 horas, las condiciones señaladas para las muestra a hidrolizar están de acuerdo al diseño factorial señalado. Cabe señalar que el pH inicial de cada muestra se mantuvo constante durante todo el proceso de hidrólisis con la adición de gotas de ácido cítrico 0,1N o hidróxido de sodio 0,1N. Concluido el tiempo, la enzima se inactivó por calentamiento de la mezcla a 90 °C durante 10 min y centrifugación a 3800 rpm durante 15 min a 4 °C, almacenando el sobrenadante a -20°C, hasta su posterior análisis. En tabla 4 se detallan condiciones de hidrólisis para cada muestra.

Tabla 4. Factores de hidrólisis enzimática de acuerdo al diseño factorial tipo Plackett-Burman con punto central por triplicado.

		ALCALASA			
CONDICIONES		Temperatura (°C)	pH	Tiempo de hidrólisis (h)	Relación [enzima]:[sustrato] [w:w]
MUESTRA					
H601		60	8	3	[1/35]
H602		60	8	3	[1/35]
H603		60	8	3	[1/35]
H504		50	7	2	[1/50]
H505		50	9	2	[1/20]
H506		50	9	4	[1/50]
H507		50	9	4	[1/20]
H508		50	7	2	[1/20]
H509		50	7	4	[1/50]
H7010		70	7	4	[1/50]
H7011		70	9	2	[1/50]
H7012		70	7	2	[1/20]
H7013		70	9	4	[1/20]
H7014		70	7	4	[1/20]
H7015		70	9	2	[1/50]

4.2.6. Determinación del grado de hidrólisis por cuantificación de proteína soluble mediante el método de Biuret

Se determinó el GH por cuantificación de proteína soluble con el reactivo de Biuret, de acuerdo al procedimiento descrito por Betty M. et al. 2014⁹⁹ con ligeras modificaciones señaladas por Wangtueai S. et al. 2016¹⁰⁰, según las cuales se logra el %GH en relación a la proteína soluble presente en la muestra luego del proceso hidrolítico tratada con ATC al 10% en proporción con la proteína total de la muestra. Para el referido procedimiento se mezclaron volúmenes iguales de cada hidrolizado con ATC al 20%, con agitación moderada por 5 min, posteriormente y se centrifugó a 10 000 rpm por un tiempo de 15 minutos. Se

analizó el sobrenadante traslúcido para determinar el contenido de proteína soluble empleando el método de Biuret. Del mismo modo se determinó mediante este método, la cantidad de proteína total en cada hidrolizado y en las tres muestras sin hidrolizar en sus tampones correspondientes, previamente se elaboró una curva de calibración con el estándar BSA (Anexo 3).

Se calculó el grado de hidrólisis de cada muestra de acuerdo a la fórmula⁹⁹:

$$\% GH = \frac{\text{Proteína soluble en ATC al 10\% en la muestra hidrolizada (mg)}}{\text{Proteína total en la muestra (mg)}} \times 100\%$$

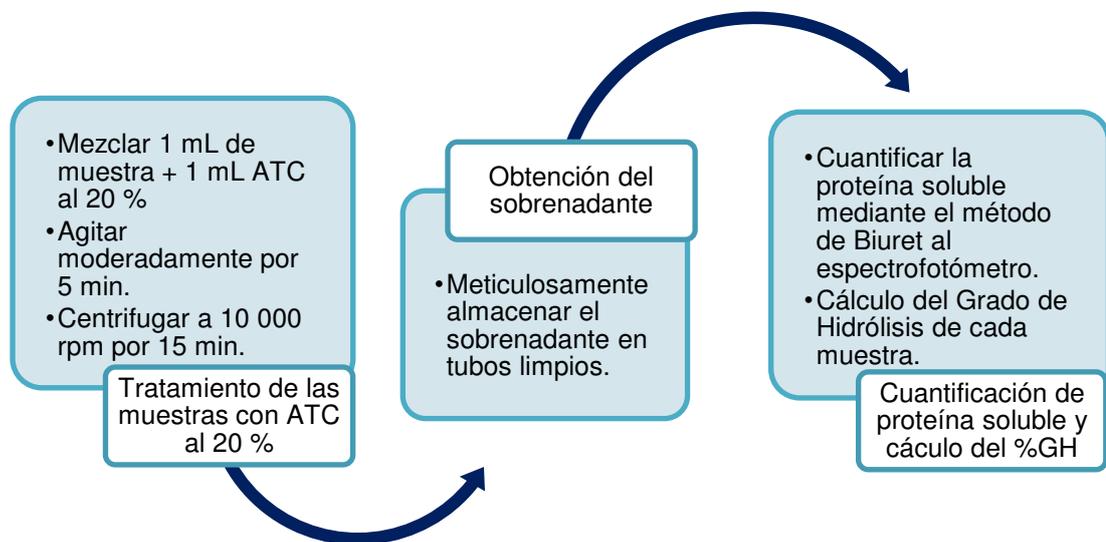


Figura 12. Esquema para la obtención del grado de hidrólisis (%GH).

4.2.7. Determinación del grado de hidrólisis por cuantificación del nitrógeno soluble mediante el método de micro-Kjeldahl

Para esta determinación se procedió según las metodologías empleadas en las investigaciones de Kim S. et al., 1990¹⁰¹ y Hoyle N. and Merritt J., 1994¹⁰² las cuales hacen uso del método de obtención del nitrógeno soluble en ATC al 10% seguido por la técnica de micro-Kjeldahl o Kjeldahl AOAC, 1980¹⁰³ para la cuantificación de nitrógeno soluble tanto en las muestras hidrolizadas como en las muestras sin hidrolizar. Relacionando de esta manera el grado de hidrólisis parcial obtenido, a las que se adiciona algunas modificaciones señaladas por Qi M. et al., 1997¹⁰⁴.

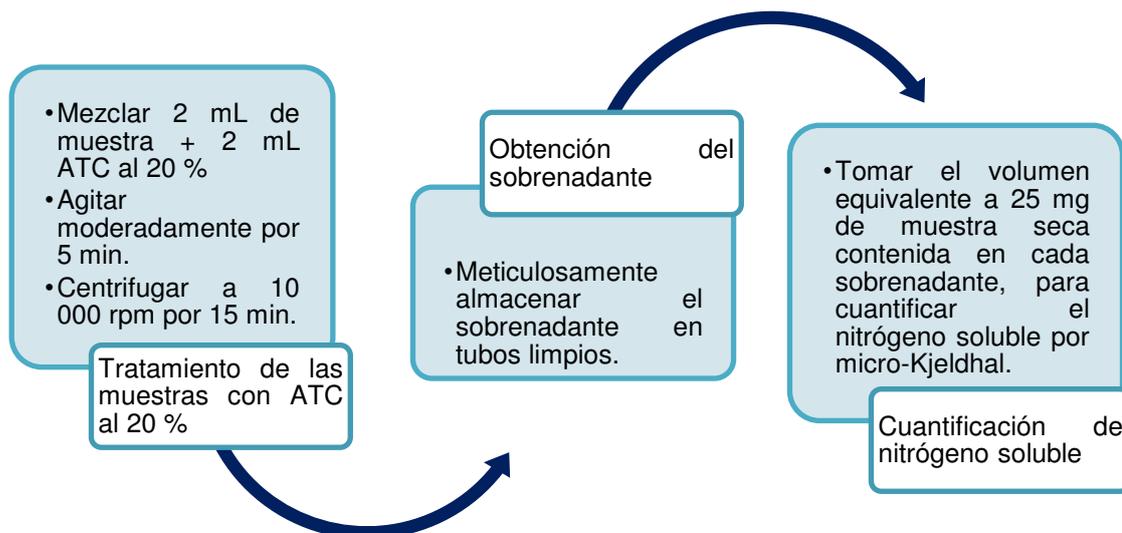


Figura 13. Esquema para la obtención del nitrógeno soluble en ATC al 10%, en las muestras hidrolizadas.

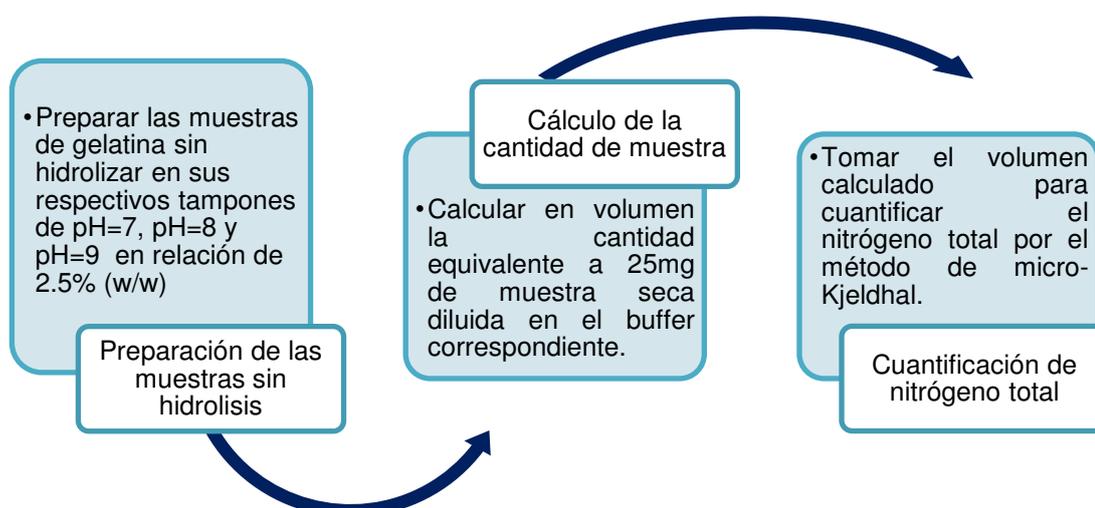


Figura 14. Esquema para la cuantificación de nitrógeno total presente en las muestras no hidrolizadas.

La metodología de micro-Kjeldahl empleada fue de acuerdo a la AOAC, 1980¹⁰³, con ligeras modificaciones, desarrollada en tres etapas: digestión, destilación y titulación en el laboratorio de Bioquímica del 3er piso del Departamento de Bioquímica de la UNMSM¹⁰³.

- Digestión: se tomó en un matraz micro-Kjeldahl cantidad en volumen equivalente a 25 mg de muestra seca contenida en cada sobrenadante de las muestras hidrolizadas con ATC al 10% o de la muestra sin hidrolizar, según

se cuantifique el nitrógeno soluble en ATC o nitrógeno total sin hidrolizar, se agregó con precaución los reactivos necesarios K_2SO_4 (2g), HgO (40mg) y H_2SO_4 (2,15mL) con peso específico 1,84, libre de nitrógeno, posteriormente se llevó a temperatura de ebullición por 1,5 horas, hasta obtener una solución translúcida incolora sin trazas de materia orgánica carbonizada¹⁰³.

- Destilación: previo enfriamiento, se trasvasó la solución obtenida a un balón de pequeño volumen, recuperando los restos de la solución con un mínimo de agua destilada, se agregó 8 -10 mL de la solución de hidróxido de sodio con tiosulfato de sodio, y se sometió a calentamiento. Se acumuló aproximadamente 15 mL del destilado en un matraz a través de una manguera sumergida en la solución que contiene 5 mL de solución saturada de H_3BO_3 y II-IV gotas de indicador de rojo de metilo+verde de bromocresol, finalmente se observó un viraje de color del indicador, pasando de color verde esmeralda a amarillo claro¹⁰³.
- Titulación: Se tituló la solución con HCl 0,01N estandarizado y se registró el volumen correspondiente al gasto del ácido clorhídrico 0,01N. Se recomienda titular un blanco para realizar los cálculos correspondientes¹⁰³.

Para realizar el cálculo tanto del nitrógeno soluble de las muestras hidrolizadas, como del nitrógeno total presente en las muestras sin hidrólisis se procedió a utilizar la fórmula¹⁰³:

$$\% N = \frac{[(\text{gasto mL HCl de la muestra} - \text{gasto mL del blanco}) \times \text{normalidad de HCl}]}{\text{mg muestra seca}} \times 100\%$$

4.2.8. Determinación de la actividad antioxidante mediante el método del radical (DPPH•)

Para la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* se consideró la metodología de Ortega E. et al, 2015¹⁰⁵, la cual corresponde a una modificación del método original de barrido entre los radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) y el antioxidante descrita por Brand-Williams W. et al.,1995¹⁰⁶.

El método de decoloración se evidencia cuando la solución del DPPH• se mezcla con una solución antioxidante (sustancia a prueba), la cual dona protones, de tal forma que la absorbancia inicial a 517 nm disminuye, en tanto, el color púrpura de la solución del radical se decolora a un color amarillo pálido, esta pérdida de la intensidad de color es directamente proporcional a la actividad antioxidante que demuestra la sustancia a prueba¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

El procedimiento incluyó la preparación de cantidad suficiente de solución stock, 2 mg del reactivo DPPH (Sigma-Aldrich®) se disolvió con 100 mL de metanol, la solución resultante se dejó reaccionar a T° ambiente por 24 horas en oscuridad. Luego se preparó la solución de trabajo en el espectrofotómetro Agilent Cary 8454, previa calibración, obteniendo una absorbancia inicial estable de $0,75 \pm 0,050$ a una longitud de onda de 517 nm^{106,107}.

Los hidrolizados se diluyeron a las concentraciones de 25, 50, 125, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1750, 2250 y 2750 µg/mL, y se evaluó la actividad triplicado, también, se realizó la lectura del blanco propio del método debido a que la muestra es ligeramente coloreada, la absorbancia final se leyó en el espectrofotómetro a 517 nm luego de 30 minutos de reposo iniciada la reacción entre la solución del radical DPPH• y la muestra, que, por diferencia de absorbancias, se obtiene el porcentaje de captación de radicales libres¹⁰⁶⁻¹¹⁰.

Como estándares de actividad antioxidante positiva se utilizó vitamina C y Trolox a concentraciones entre 0,8 – 2,8 µg/mL y 1,2 – 6,0 µg/mL, preparados bajo las mismas condiciones que las diluciones de los hidrolizados.

Tabla 5. Esquema del protocolo de trabajo para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método DPPH• y procedimiento con las muestras, blanco y estándares^{106,107}.

<i>Solución</i>	<i>Blanco</i>	<i>Patrón de referencia</i>	<i>Muestra Problema o estándar</i>
Muestra	20 µL	---	20 µL
Metanol	980 µL	20 µL	---
DPPH•	---	980 µL	980 µL

Luego de 30 min. de reposo de reacción, se midió la absorbancia a 517 nm. Proceder a la lectura de cada una de las diluciones de las muestras problema, blanco y estándar por triplicado.

Se halló el porcentaje de inhibición o captación de radicales libres, mediante la ecuación^{106,107}:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs. inicial} - [\text{Abs. final} - \text{Abs. blanco}]}{\text{Abs. inicial}} \times 100\%$$

Para el cálculo del (IC50) se procedió a realizar las gráficas de las curvas entre la concentración de las muestras y estándares versus el % de inhibición¹¹¹.

Se obtuvo la ecuación general para cada gráfica de las muestras evaluadas:

$$y = mx \pm b$$

Al reemplazar valores se obtuvo $IC50 = \frac{50-b}{m}$

Donde:

m: valor de la pendiente de la curva

b: valor de intercepto en y.

4.2.9. Determinación de la actividad antioxidante mediante el método del radical catiónico (ABTS^{•+})

La propiedad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos fue evaluada *in vitro* de acuerdo a la metodología propuesta por Re R. et al.,1998¹¹² con ligeras variaciones en adaptación a nuestra muestra. Esta metodología se justifica en la decoloración del radical catiónico (ABTS^{•+}) y se ajusta a una mayor cantidad de sustancias con actividad antioxidante, debido a que puede ser aplicada para sustancias lipófilas e hidrófilas¹¹²⁻¹¹⁵.

Se preparó cantidad suficiente de solución stock del radical ABTS^{•+}, para lo cual, 19,4 mg del reactivo (ABTS-Sigma-Aldrich®) se disolvió con 2 mL de agua destilada, protegida de la luz, luego se adicionó a la solución 3,3 mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) y agua destilada hasta un volumen total de 5 mL, se dejó reaccionar en reposo a temperatura ambiente por un tiempo de 16 horas en

frasco ámbar. Por último, se preparó la solución de trabajo, diluyendo la solución stock con volumen necesario de etanol absoluto hasta obtener una absorbancia estable de $0,700 \pm 0,02$ (absorbancia inicial), previa calibración del equipo. Las absorbancias se midieron en el espectrofotómetro Agilent Cary 8454 a una longitud de onda de 734 nm ¹¹²⁻¹¹⁵.

Los hidrolizados se diluyeron a las concentraciones de 15, 37.5, 75, 150, 225 y 300 $\mu\text{g/mL}$, posteriormente se ensayó la actividad antioxidante de las diluciones por triplicado. Asimismo, se realizó la lectura previa del blanco, midiendo las absorbancias en el espectrofotómetro a 734 nm a partir de los 6 minutos de reposo, de esta manera se logró obtener el porcentaje de captación de radicales libres. Se utilizó al estándar de actividad antioxidante positiva al reactivo trolox (Sigma-Aldrich®) entre las concentraciones de 2,5 – 25 $\mu\text{Mol/L}$, preparadas en las mismas condiciones que las muestras problema.

Tabla 6. Esquema del protocolo de trabajo para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método de decoloración del ABTS^{•+} y procedimiento con las muestras, blanco y estándares^{113,114}.

<i>Solución</i>	<i>Blanco</i>	<i>Patrón de referencia</i>	<i>Muestra Problema o estándar</i>
Muestra	50 μL	---	50 μL
Etanol absoluto	950 μL	50 μL	---
ABTS ^{•+}	---	950 μL	950 μL
Luego de 6 min de reposo de reacción, se midió la absorbancia a 734 nm . Proceder a la lectura de cada una de las diluciones de las muestras problema, blanco y estándar por triplicado.			

Se halló el porcentaje de inhibición, mediante el uso de la ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs. inicial} - [\text{Abs. final} - \text{Abs. blanco}]}{\text{Abs. inicial}} \times 100\%$$

Se calculó el IC50 y se procedió a realizar las gráficas de las curvas entre la concentración de las muestras y estándares versus el % de inhibición, empleando la ecuación general de la recta:

$$y = mx \pm b$$

Reemplazando valores obtenemos $IC50 = \frac{50-b}{m}$

Donde:

m: valor de la pendiente de la curva

b: valor de intercepto en y.

Los resultados se expresaron en valores TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox), valor correspondiente a la concentración de la solución del estándar trolox (μMol) que tiene la capacidad antioxidante equivalente a la muestra para inhibir los radicales catiónicos ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) en un tiempo determinado^{112,116}. Se llevó a cabo el cálculo de la Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox a un tiempo definido de 6 minutos.

Para expresar los resultados en valores TEAC se emplea la ecuación propuesta por Marquez et. al, 2014¹¹⁷:

$$TEAC = \frac{IC50 \text{ del estándar (trolox)}}{IC50 \text{ de la muestra problema}}$$

Donde:

- IC50 del estándar (trolox) = concentración (mmMoles de trolox/litro de solvente) a la cual, el estándar de actividad antioxidante positiva (trolox), inhibe el 50% de los radicales libres en la solución del radical catiónico ($\text{ABTS}^{\bullet+}$).
- IC50 de la muestra problema = concentración del hidrolizado (g de hidrolizado/litro de solvente) a la cual inhibe el 50% de los radicales libres en la solución del radical catiónico ($\text{ABTS}^{\bullet+}$).

4.2.10. Determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar-pozo

Respecto a la propiedad antimicrobiana de los hidrolizados de gelatina, se llevó a cabo *in vitro* de acuerdo a la metodología propuesta por Hufford C. et al., 1975¹¹⁸; considerando ligeras variaciones en adaptación con la muestra a evaluar¹⁴⁰.

Selección de microorganismos utilizados

Para el ensayo de actividad antimicrobiana se seleccionó y posteriormente se utilizó los microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* todas ellas pertenecientes a cepas clínicas de procedencia hospitalaria, proporcionadas por el laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

Identificación de microorganismos

Para la identificación de cada microorganismo se procedió de acuerdo a los ensayos descritos en el Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias del Instituto Nacional de Salud – INS¹²⁰ y en el Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas¹¹⁹.

La identificación de la especie *Staphylococcus aureus* se dio mediante la observación de la morfología celular por tinción Gram, crecimiento en agar sangre, crecimiento en agar manitol salado, prueba de la catalasa y presencia de desoxirribonucleasa. Para identificar *Pseudomonas aeruginosa* se dio por el ensayo de observación de morfología celular por tinción Gram, crecimiento en agar cetrimide, prueba de oxidasa, agar TSI, crecimiento en TSA a 42°C, crecimiento en agar TSI y por la prueba de utilización del citrato. *Escherichia coli* identificada por observación de morfología de colonias en agar Mac Conkey, crecimiento en agar TSI, crecimiento en el medio lisina hierro, prueba de rojo de metilo, prueba de indol, prueba de motilidad y prueba de β -galactosidasa (ONPG). *Bacillus subtilis* se identificó por la morfología celular por tinción Gram, prueba de motilidad, prueba de la catalasa y lecitinasa. Por último, para la levadura *Candida albicans*, se aplicó la observación de la morfología de las colonias en agar sabouraud dextrosa, examen microscópico y prueba del tubo germinativo^{119,120}.

Preparación del inóculo de los microorganismos

Se procedió con la preparación del inóculo de la cepa clínica del hongo *Candida albicans*, la cual se inició a partir de los microorganismos de la misma especie cultivados 48 horas previas en agar dextrosa Sabouraud. Cantidad suficiente de dichos microorganismos se suspendieron en una solución salina al 0,90% estéril, posteriormente la suspensión se ajustó al nivel de turbidez de un tubo 0,5 de la escala Mc Farland, equivalente a una concentración aproximada de $1 - 1,5 \times 10^8$ ufc/mL¹¹⁸⁻¹²¹.

En cuanto a la preparación de los inóculos se inició a partir del cultivo de cada bacteria en agar TSA, el cual se realizó 24 horas antes, se aisló cada bacteria del agar TSA y se suspendió cantidad suficiente de cada bacteria en solución salina al 0,90% estéril, por último, cada suspensión se ajustó a la escala de turbidez de 0,5 McFarland, que corresponde a la concentración aproximada de $1 - 1,5 \times 10^8$ ufc/mL¹¹⁸⁻¹²¹.

Preparación de las muestras

Las muestras evaluadas corresponden a todos los hidrolizados obtenidos, los cuales se diluyeron a 2 concentraciones diferentes de 1,0 mg/mL y 0,50 mg/mL. Se utilizó como medio diluyente agua estéril para inyección.

Preparación e inoculación de las placas

Se utilizó el medio sólido no selectivo reconstituido de agar dextrosa Sabouraud para el microorganismo fúngico *Candida albicans*. Se adicionó el inóculo, preparado en el paso anterior en volúmenes de 1 mL de inóculo y 100 mL de medio reconstituido. La nueva suspensión obtenida del inóculo incorporado al medio se homogenizó y luego se distribuyó una cantidad aproximada de 25 mL en placas Petri de vidrio con diámetros de 90 mm, previamente esterilizadas. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente. Solidificado el medio, se formaron los pozos equidistantes en cada placa con el uso de un sacabocado con diámetro externo de 9 mm^{118,140}.

Para los microorganismos bacterianos se utilizó el medio sólido no selectivo reconstituido de agar Mueller Hinton. Se adicionó el inóculo de la bacteria respectiva, a volumen de 1 mL de inóculo por cada 100 mL del medio reconstituido. La suspensión obtenida del inóculo incorporado al medio se homogenizó y luego se distribuyó una cantidad aproximada de 25 mL en placas Petri de vidrio con diámetros de 90 mm, previamente esterilizadas, una vez concluida la preparación se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente, rotulando la placa con el microorganismo que corresponde. Por último, una vez solidificado el medio, se formaron de los pozos equidistantes en cada placa con el uso de un sacabocado con diámetro externo de 9 mm^{118,140}.

Incorporación de muestras e incubación de placas

A cada pozo de las placas, se agregó 100 µL de la muestra de cada hidrolizado a concentraciones de 1,0 mg/mL y 0,50 mg/mL y se dejó en reposo por 60 minutos, con la finalidad de que muestra difunda en el agar, luego del tiempo señalado se llevaron a incubación a las condiciones de 37°C por 24 horas tanto para los microorganismos fúngicos como bacterianos. Los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó agua estéril para inyección como blanco para corroborar su efecto de inhibición en el crecimiento de los microorganismos en estudio, debido a su empleo como diluyente en la preparación de las muestras a evaluar. Así mismo se usaron los controles positivos de actividad antimicrobiana al fluconazol (0,2 mg/mL) y ciprofloxacino (0,2mg/mL) en comparación con los microorganismos fúngicos y bacterianos respectivamente^{118,140}.

Lectura e interpretación de resultados

Se observaron las zonas de inhibición del crecimiento de microorganismos y se procede con la medición, las cuales se manifiestan en forma de halos claros alrededor del pozo, la medición es por diámetro total, incluyendo el diámetro del pozo y del halo formado en milímetros (mm), se considera una actividad antimicrobiana significativa a los diámetros mayores a 18mm., de acuerdo a la metodología propuesta por Rojas R. et al., 2003¹⁴⁰.

Tabla 7. Criterio de evaluación de actividad antimicrobiana por ensayo de difusión¹²².

Actividad antimicrobiana	Diámetro del halo (mm)
SUSCEPTIBLE (Alta)	≥20
INTERMEDIA (Moderada)	15-19
RESISTENTE (Baja)	≤14

4.2.11. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria mediante el método de microdilución/colorimétrico

Se evaluó la propiedad antimicrobiana de los hidrolizados mediante el método de microdilución/colorimétrico de acuerdo a los protocolos desarrollados por CLSI M07-A9, 2012¹²² y Wiegand I. et al., 2008¹²³ con ligeras modificaciones, estas se justifican en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del agente antimicrobiano en diluciones de agar o caldo a la cual es susceptible el crecimiento *in vitro* de un aislado de bacteria aeróbica en condiciones estandarizadas de preparación de inóculos, tiempo y temperatura de incubación. En una microplaca con pocillos, se agregan cantidades iguales de las concentraciones geoméricamente ascendentes de la sustancia antimicrobiana, además de un número fijo de la bacteria aerobia inmersa en un medio de crecimiento líquido, como el caldo Mueller Hinton. Por último, el indicador del crecimiento bacteriano, que luego de un tiempo (16-20 horas) se evalúa si hubo o no crecimiento bacteriano por cambio de la coloración o sedimento en los pocillos de incubación en comparación con los controles respectivos y estableciendo el valor de la CMI^{122,123}.

Selección de microorganismos utilizados

Se seleccionó a los microorganismos que, de acuerdo a los resultados, mostraron mejor actividad por el método de difusión en agar, por lo tanto, se seleccionó las cepas clínicas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, ambas cepas identificadas en el método antimicrobiano por difusión en agar.

Preparación del inóculo de los microorganismos

Se inició 24 horas antes a partir del cultivo de cada bacteria en agar TSA, luego se aisló y suspendió algunas colonias en solución salina al 0,90% estéril, luego cada suspensión se ajustó a la escala de turbidez de 0,5 McFarland correspondiente a la concentración aproximada de $1 - 1,5 \times 10^8$ ufc/mL. Se realizó doble dilución del inóculo en caldo Mueller Hinton, la primera se realizó a la proporción de 1:30 (inóculo: caldo), la segunda dilución se realizó a proporción de 1:5 (primera dilución: caldo) obteniendo la concentración de 1×10^6 ufc/mL. Se procedió con la preparación del indicador de resazurina a la concentración de 20mg/mL, luego se calculó el volumen de resazurina a agregar al inóculo a razón de 50µL por 10 mL de inóculo^{122,123,124}.

Preparación de las muestras

Se emplearon los hidrolizados H601, H602, H603, H504, H508, H509, H7010 y H7014 para esta evaluación, los cuales se diluyeron en 8 concentraciones seriadas doblemente concentradas entre 1000 – 7,81 µg/mL de acuerdo al protocolo CLSI M07-A9. Se utilizó como medio diluyente al DMSO y caldo Mueller Hinton¹²².

Preparación del control de esterilidad

Se utilizó el caldo Mueller Hinton con el indicador de resazurina, las proporciones a añadir fueron por cada 20mL de caldo Mueller Hinton corresponde agregar 100 µL de resazurina de acuerdo a los protocolos de referencia antes descritos^{122,123}.

Incorporación de muestras e inóculos en las microplacas

Se llevó a cabo en microplacas estériles de 96 pocillos, en una cabina de flujo laminar.

La incorporación de las muestras e inóculos se realizó por triplicado por cada muestra y bacteria en orientación horizontal de la microplaca como se detalla en la tabla 8, se utilizó 6 filas y 10 columnas por cada muestra, espaciadas por 2 filas y 2 columnas sin utilidad.

La disposición horizontal para la incorporación de muestras e inóculos fue la siguiente^{122,123}:

- A la 1° y 12° columna no se les dio utilidad (vacías).
- En la segunda columna (A1-C1 y F1-H1), 200 µL del control de esterilidad.
- En las columnas (A3 – A10, B3 – B10, C3 – C10, F3 – F10, G3 – G10, H3 – H10), 100 µL de las diluciones doblemente seriadas de las muestras con 100 µL del inóculo correspondiente a cada bacteria que contiene el indicador resazurina.
- En la columna 11, 200 µL de inóculo que corresponde al control de crecimiento bacteriano, denominado también control positivo.

Al finalizar la incorporación de las muestras e inóculos en las microplacas, se procedió a la incubación en la estufa a condiciones de 37 °C por un tiempo de 24 horas^{122,123}.

Tabla 8. Disposición para la incorporación de muestras e inóculos en la microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	CE	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	CP	○	S.a.
B	○	CE	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	CP	○	S.a.
C	○	CE	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	CP	○	S.a.
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
F	○	CE	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	CP	○	B.s.
G	○	CE	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	CP	○	B.s.
H	○	CE	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	CP	○	B.s.

Leyenda:

- CE: control de esterilidad
- CP: Control positivo
- S.a.: *Staphylococcus aureus* cepa clínica
- B.s.: *Bacillus subtilis* cepa clínica
- ○ : pocillo vacío

Lectura de los resultados

Se inspeccionó de forma visual notificando cualquier variación de color azul-púrpura hacia rosado rojizo como crecimiento bacteriano positivo, así mismo, se consideró como CMI, la concentración más baja a la cual se mantuvo la coloración azul-púrpura, sin variación del color inicial, así mismo se calculó el valor promedio de las tres diluciones a la cual no hubo variación de color y se reportó como CMI; sin embargo, es necesario seguir el modelo de reporte de resultados de acuerdo a los protocolos citados anteriormente^{122,123}.

Interpretación de resultados

Los resultados obtenidos se interpretaron de acuerdo a los niveles establecidos por Holetz F. et al., 2002¹²⁵, quienes lograron establecer criterios para determinar según la concentración de muestra a evaluar si posee una débil, moderada o buena actividad antimicrobiana y si la CMI sobre pasa los 1000 µg/mL, consideran que la muestra no posee propiedad antimicrobiana. Se tomó en consideración la tabla 9 para considerar los niveles de actividad antimicrobiana según la CMI¹²⁵.

Tabla 9. Niveles de actividad antimicrobiana¹²⁵.

<i>Nivel de actividad antimicrobiana</i>	<i>CMI</i>
INACTIVO o sin actividad	> 1000 µg/mL
DÉBIL o BAJA	500 a 1000 µg/mL
MODERADA	100 a < 500 µg/mL
BUENA	< 100 µg/mL

4.3. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño factorial para poder estimar la significancia de los efectos principales, el tipo de diseño factorial que se empleó para nuestro estudio fue de tipo Plackett-Burman, en el referido diseño se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. Se recurrió al uso del programa informático-estadístico Minitab® versión 17.1.0 para el procedimiento de análisis estadístico de acuerdo a los datos generados en nuestro estudio.

V. RESULTADOS

5.1. Obtención de gelatina por hidrólisis parcial del colágeno

Se observó la formación de láminas delgadas de coloración parda amarillenta adheridas en toda la superficie de las placas de secado, se dio paso al proceso de raspado de las láminas, tal como se observan en el anexo 1. Se registró el peso total del raspado, obtenido que fue de 182,43 g., el cual fue almacenado en tubos de polietileno.

Se calculó el rendimiento haciendo uso de la ecuación propuesta en punto 4.2.3.9. Raspado y almacenamiento, de esta manera el rendimiento calculado fue de 15,86%, es decir, por cada 100g de residuos correspondientes a las pieles del pescado "Bonito" se obtuvo 15,86g de gelatina.

5.2. Cuantificación de proteína total mediante el método de Bradford

Como resultado de la interpolación de la absorbancia en la lectura de la muestra en la curva de calibración con el estándar BSA señalada en el anexo 2, se obtuvo que la proteína total en la muestra problema fue de 439,5mg proteína BSA/mL, lo que corresponde al 70,32% del porcentaje total de la gelatina extraída.

5.3. Determinación del grado de hidrólisis por cuantificación de proteína soluble mediante el método de Biuret

Los resultados del %GH se muestran en la tabla 10, estos valores nos relacionan la cuantificación de proteína soluble contenida en la muestra hidrolizada tratada con ATC al 10%, así como también la cuantificación de proteína total en las muestras hidrolizadas y sin sometimiento a hidrólisis. Los mayores (%GH), lo presentan los hidrolizados H601, H602, H603 y H509 con 33,21%, 32,67%, 33,04% y 25,80% respectivamente.

Tabla 10. Grado de hidrólisis (%GH) de las muestras determinado mediante el método de Biuret.

CONDICIONES MUESTRA	ALCALASA				GRADO DE HIDRÓLISIS
	Temperatura (°C)	pH	Tiempo de hidrólisis (h)	Relación [enzima:sustrato] [w:w]	(%GH)
H601	60	8	3	[1/35]	33,21
H602	60	8	3	[1/35]	32,67
H603	60	8	3	[1/35]	33,04
H504	50	7	2	[1/50]	16,42
H505	50	9	2	[1/20]	11,24
H506	50	9	4	[1/50]	15,31
H507	50	9	4	[1/20]	11,99
H508	50	7	2	[1/20]	13,24
H509	50	7	4	[1/50]	25,80
H7010	70	7	4	[1/50]	16,29
H7011	70	9	2	[1/50]	16,96
H7012	70	7	2	[1/20]	11,49
H7013	70	9	4	[1/20]	17,17
H7014	70	7	4	[1/20]	16,67
H7015	70	9	2	[1/50]	20,99

De acuerdo a la tabla 10, se puede apreciar que la mayoría de los hidrolizados llegan a obtener un alto porcentaje de grado de hidrólisis, llegando a ser todos los valores de GH superiores al 10%.

Tabla 11. Análisis del diseño factorial: %GH (Biuret) VS Temperatura, pH, tiempo y [E/S]

Factores	Grados de libertad (DF)	Valor F	Valor p
Temperatura	1	0,24	0,635
pH	1	0,30	0,595
Tiempo	1	1,29	0,285
[E/S]	1	6,98	0,027*

$\alpha = 0,05$

$p < 0,05$

* El factor [E/S] tiene influencia estadísticamente significativa en el grado de hidrólisis, empleando un diseño factorial tipo Plackett-Burman.

De acuerdo al análisis estadístico se observó que las diferentes condiciones de hidrólisis influyen en la obtención del %GH; sin embargo, el factor [E/S] tiene una influencia estadísticamente significativa en la obtención del resultado. Así mismo, se realizó un análisis respecto a la influencia de las diferentes combinaciones de las condiciones hidrolíticas a las que fueron sometidas las muestras y el correspondiente %GH obtenido, tal como se observa en las gráficas mostradas en las figuras 15 y 16.

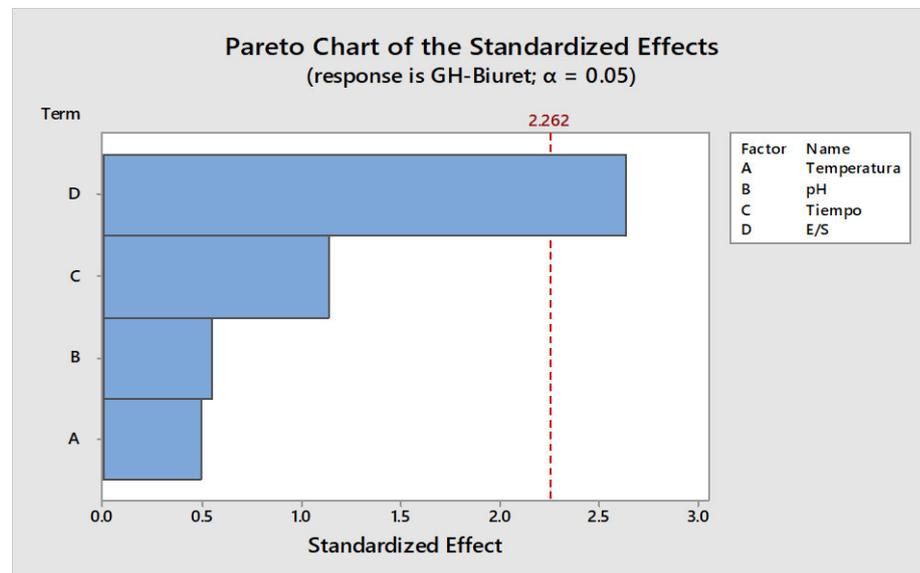


Figura 15. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, donde se compara la magnitud absoluta de cada uno de los factores en los resultados del %GH. Así mismo, se señala en el gráfico que el factor [E/S] en la hidrólisis es estadísticamente significativo.

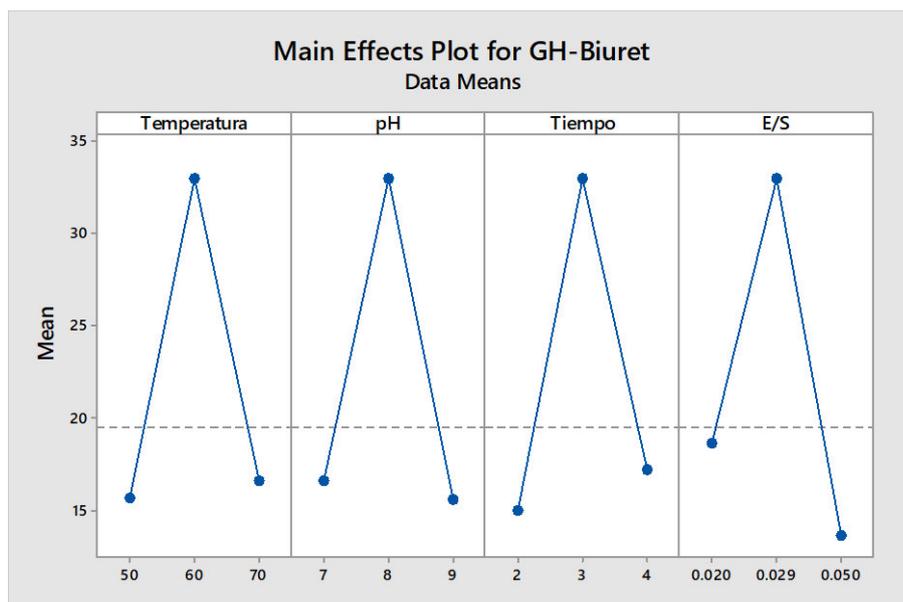


Figura 16. Gráfica de efectos principales, en la cual se puede observar que a diferentes grados de los factores se obtienen efectos mayores y menores, de tal forma que, a condiciones de 60° C, pH 8, 3 horas y relación de [E/S]:[1/35], se obtienen mayores efectos en el %GH.

5.4. Determinación del grado de hidrólisis por cuantificación del nitrógeno soluble mediante el método de micro-Kjeldahl

Los resultados del porcentaje del grado de hidrólisis mediante la cuantificación del nitrógeno soluble por el método de micro-Kjeldahl se expresan en la tabla 12. Notamos que al igual que los resultados con el método anterior, los mayores grados de hidrólisis corresponden a los hidrolizados H601, H602, H603 y H509, con una ligera variación.

Tabla 12. Grado de hidrólisis (%GH) de las muestras determinado mediante el método de micro-Kjeldahl.

CONDICIONES MUESTRA	ALCALASA				GRADO DE HIDRÓLISIS
	Temperatura (°C)	pH	Tiempo de hidrólisis (h)	Relación [enzima]:[sustrato] [w:w]	(%GH)
H601	60	8	3	[1/35]	33,33
H602	60	8	3	[1/35]	29,52
H603	60	8	3	[1/35]	31,42
H504	50	7	2	[1/50]	17,69

H505	50	9	2	[1/20]	10,05
H506	50	9	4	[1/50]	16,29
H507	50	9	4	[1/20]	10,28
H508	50	7	2	[1/20]	14,61
H509	50	7	4	[1/50]	26,92
H7010	70	7	4	[1/50]	15,85
H7011	70	9	2	[1/50]	17,41
H7012	70	7	2	[1/20]	10,46
H7013	70	9	4	[1/20]	18,80
H7014	70	7	4	[1/20]	17,98
H7015	70	9	2	[1/50]	22,88

De los valores hallados se puede apreciar que los hidrolizados logran un %GH mayor al 10%, hasta un 33,33% que corresponde a la muestra H601, los cuales son valores altos pese a que las muestras fueron sometidas a diferentes condiciones de hidrólisis.

Tabla 13. Análisis del diseño factorial: %GH (Micro-Kjeldahl) VS Temperatura, pH, tiempo y [E/S]

Factores	Grados de libertad (DF)	Valor F	Valor p
Temperatura	1	0,26	0,620
pH	1	0,28	0,608
Tiempo	1	0,79	0,398
[E/S]	1	5,63	0,042*

$\alpha = 0,05$

$p < 0,05$

* El factor [E/S] tiene influencia estadísticamente significativa en el grado de hidrólisis, empleando un diseño factorial tipo Plackett-Burman.

Se evidenció que los diferentes efectos de las condiciones hidrolíticas a las que fue sometido el sustrato influyen en el resultado de %GH, pese a ello, se corroboró que el efecto [E/S] es estadísticamente significativo. Las gráficas de las figuras 17 y 18 señalan cómo las configuraciones experimentales afectan al resultado obtenido.

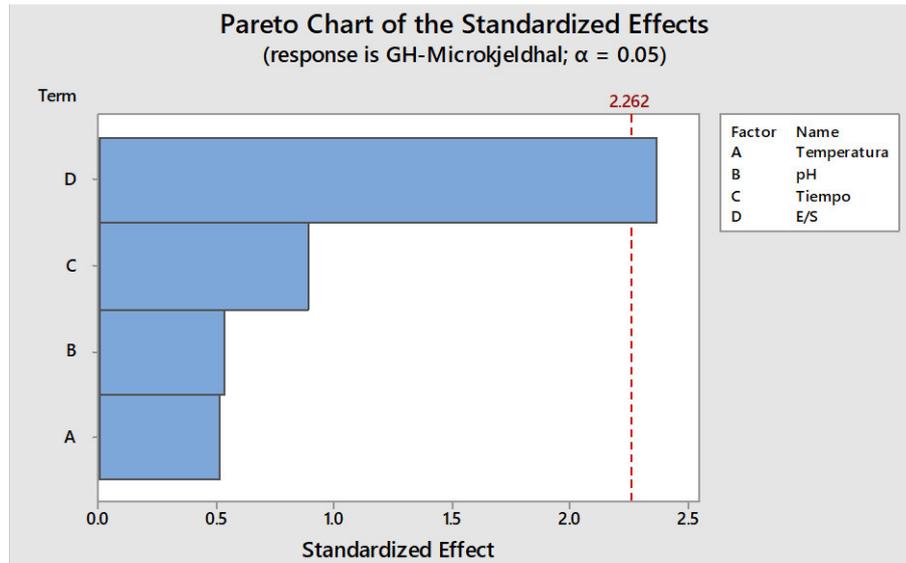


Figura 17. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, nos da la comparación de la magnitud absoluta de los efectos como resultados del %GH. El factor [E/S] es estadísticamente significativo en el %GH.

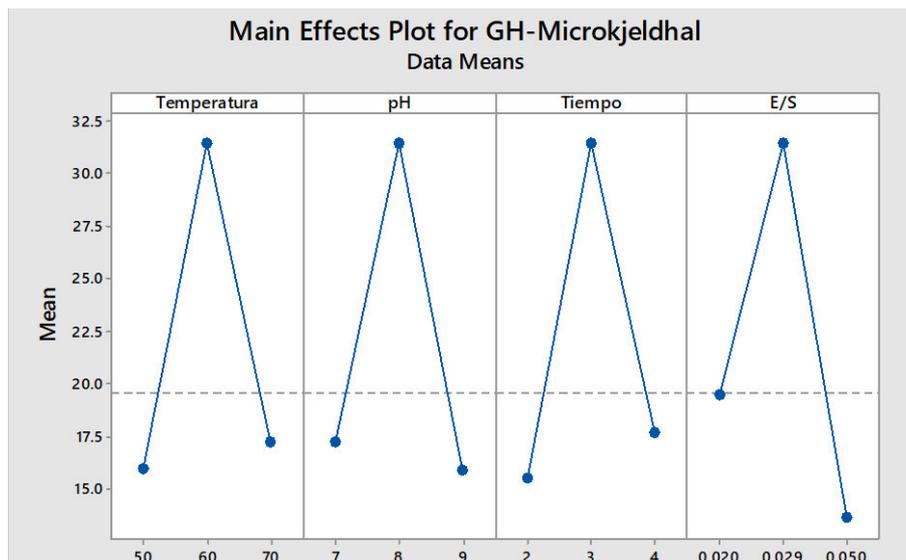


Figura 18. Gráfica de efectos principales, a diferentes grados de los factores de hidrólisis enzimática se obtienen efectos mayores y menores, de acuerdo con la gráfica, a las condiciones de 60° C, pH 8, 3 horas y relación de [E/S]:[1/35], se obtienen valores más altos en el %GH.

5.5. Determinación de la actividad antioxidante mediante el método del radical (DPPH•)

En la tabla 14 se señalan los resultados de la actividad antioxidante a diferentes concentraciones de las sustancias estándares (vitamina C y Trolox), los

resultados se reportan como porcentaje de inhibición del radical (DPPH[•]), así como también el IC50 correspondiente a cada sustancia.

Tabla 14. Capacidad antioxidante a diferentes concentraciones de las sustancias estándares con actividad antioxidante positiva.

<i>Sustancia estándar con actividad antioxidante</i>	<i>Concentración (µg/mL)</i>	<i>% inhibición del radical (DPPH[•])</i>	<i>IC50</i>
Vitamina C	2,8	83,61	1,68 µg/mL
	2,4	75,80	
	2,0	62,78	
	1,6	48,32	
	1,2	34,52	
	0,8	18,20	
Trolox	6,0	80,00	3,53 µg/mL
	4,8	68,67	
	3,6	52,86	
	2,4	34,58	
	1,2	18,45	

Se obtuvo como resultado el porcentaje de inhibición de acuerdo a las diferentes concentraciones de cada uno de los hidrolizados enzimáticos, además de los IC50 respectivos para cada muestra. Así mismo, podemos observar en estos resultados una relación directamente proporcional entre la concentración de las muestras a evaluar y la capacidad antioxidante de las mismas. Podemos notar que el menor IC50 le corresponde al hidrolizado H7012 con 458,73 µg/mL; sin embargo, el mayor IC50 hallado le pertenece al hidrolizado H7011 con 1830,46 µg/mL.

Tabla 15. Capacidad antioxidante a diferentes concentraciones del total de los hidrolizados enzimáticos de proteína colagenosa.

<i>Muestra problema</i>	<i>Concentración (µg/mL)</i>	<i>% inhibición del radical (DPPH[•])</i>	<i>IC50</i>
Hidrolizado	500,00	18,99	1240,97 µg/mL

H601	750,00	28,93	
	1000,00	40,37	
	1250,00	51,01	
	1750,00	75,93	
	2250,00	86,93	
Hidrolizado H602	500,00	19,00	1236,52 µg/mL
	750,00	29,13	
	1000,00	39,54	
	1250,00	50,52	
	1750,00	77,29	
	2250,00	87,83	
Hidrolizado H603	500,00	18,38	1246,86 µg/mL
	750,00	28,28	
	1000,00	39,73	
	1250,00	49,73	
	1750,00	77,74	
	2250,00	86,95	
Hidrolizado H504	50,00	28,51	539,39 µg/mL
	125,00	33,34	
	250,00	41,21	
	750,00	60,76	
	1000,00	67,28	
	1250,00	77,84	
	1750,00	94,34	
Hidrolizado H505	750,00	24,21	1827,36 µg/mL
	1000,00	30,66	
	1250,00	36,85	
	1750,00	47,12	
	2250,00	59,06	
	2750,00	73,08	
	Hidrolizado	125,00	
250,00		20,88	
500,00		25,69	

H506	750,00	32,80	
	1000,00	37,11	
	1250,00	41,23	
	1750,00	50,89	
	2250,00	62,78	
	2750,00	77,09	
Hidrolizado H507	125,00	16,86	1702,02 µg/mL
	250,00	21,63	
	500,00	26,62	
	750,00	30,83	
	1000,00	34,02	
	1250,00	38,87	
	1750,00	48,07	
	2250,00	59,40	
	2750,00	75,94	
Hidrolizado H508	25,00	24,41	533,44 µg/mL
	50,00	26,65	
	250,00	36,32	
	500,00	50,45	
	750,00	63,52	
	1000,00	71,88	
	1250,00	81,05	
Hidrolizado H509	50,00	17,74	958,83 µg/mL
	125,00	24,54	
	250,00	32,02	
	500,00	38,54	
	750,00	45,88	
	1000,00	52,75	
	1250,00	60,38	
	1750,00	74,59	
	2250,00	83,17	
Hidrolizado H7010	50,00	18,86	1226,28 µg/mL
	125,00	23,42	

	250,00	28,00	
	500,00	33,16	
	750,00	40,65	
	1000,00	46,78	
	1250,00	53,74	
	1750,00	61,42	
	2250,00	71,27	
Hidrolizado H7011	500,00	20,25	1830,46 µg/mL
	750,00	25,11	
	1000,00	30,63	
	1250,00	34,62	
	2250,00	58,99	
	2750,00	72,63	
Hidrolizado H7012	25,00	27,05	458,73 µg/mL
	50,00	32,56	
	250,00	40,61	
	500,00	54,64	
	750,00	65,62	
	1000,00	74,59	
	1250,00	82,34	
Hidrolizado H7013	500,00	21,64	1706,43 µg/mL
	750,00	26,30	
	1000,00	32,66	
	1250,00	37,43	
	2250,00	60,83	
	2750,00	78,18	
Hidrolizado H7014	50,00	21,75	1005,89 µg/mL
	125,00	27,84	
	250,00	34,89	
	500,00	40,96	
	750,00	46,00	
	1000,00	50,46	
	1250,00	55,26	

	1750,00	66,87	
	2250,00	79,02	
Hidrolizado H7015	250,00	18,97	1392,99 µg/mL
	500,00	23,97	
	750,00	31,95	
	1000,00	39,35	
	1250,00	46,89	
	1750,00	61,04	
	2250,00	73,91	
	2750,00	86,18	

En las tablas 14 y 15 se puede evidenciar la relación directa entre la actividad antioxidante y la concentración de cada sustancia, es decir, a mayor concentración de la muestra a evaluar, mayor capacidad antioxidante, nótese así mismo que, las concentraciones del estándar de vitamina C están entre los valores de 0,8 – 2,8 µg/mL, del estándar Trolox entre 1,20 – 6,00 µg/mL y finalmente de las muestras problema, es decir, de los hidrolizados entre 25,00 – 2750,00 µg/mL.

El IC50, que viene a ser concentración de la sustancia antioxidante necesaria para obtener 50% de inhibición del radical libre DPPH•, hallado como resultado del cálculo para cada sustancia analizada se reporta en la figura 19, donde se puede verificar las diferencias de los valores para cada hidrolizado respecto a las sustancias estándares que poseen un IC50 muy reducido, debido a su alta actividad antioxidante.

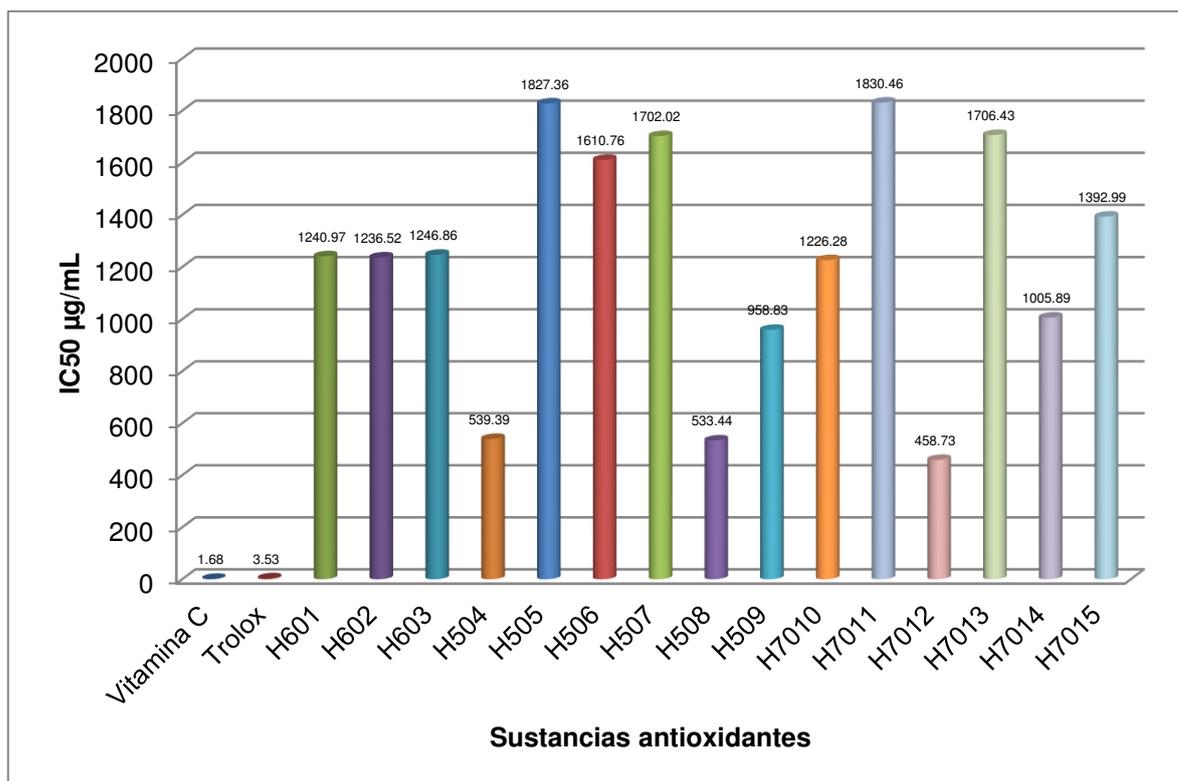


Figura 19. IC50 de las sustancias antioxidantes analizadas mediante el método del radical DPPH•.

Tabla 16. Análisis del diseño factorial: actividad antioxidante (DPPH•) VS pH, tiempo y [E/S]

Factores	Grados de libertad (DF)	Valor F	Valor p
pH	1	58,56	0,000*
Tiempo	1	5,43	0,042*
[E/S]	1	0,22	0.652

$\alpha = 0,05$

$p < 0,05$

* Los factores pH y tiempo influyen de forma estadísticamente significativa en la obtención de hidrolizados con propiedad antioxidante, empleando el diseño factorial tipo Plackett-Burman.

Considerando el análisis estadístico, las configuraciones experimentales a las que se trabajó el proceso hidrolítico inciden en la obtención de hidrolizado con actividad antioxidante evaluado mediante el método del DPPH•, no obstante, los factores de pH y tiempo influyen estadísticamente significativa en la obtención de hidrolizados con propiedad antioxidante. De la misma forma, en las gráficas

20 y 21 se evidencia cómo las condiciones hidrolíticas influyen en la obtención del resultado evaluado.

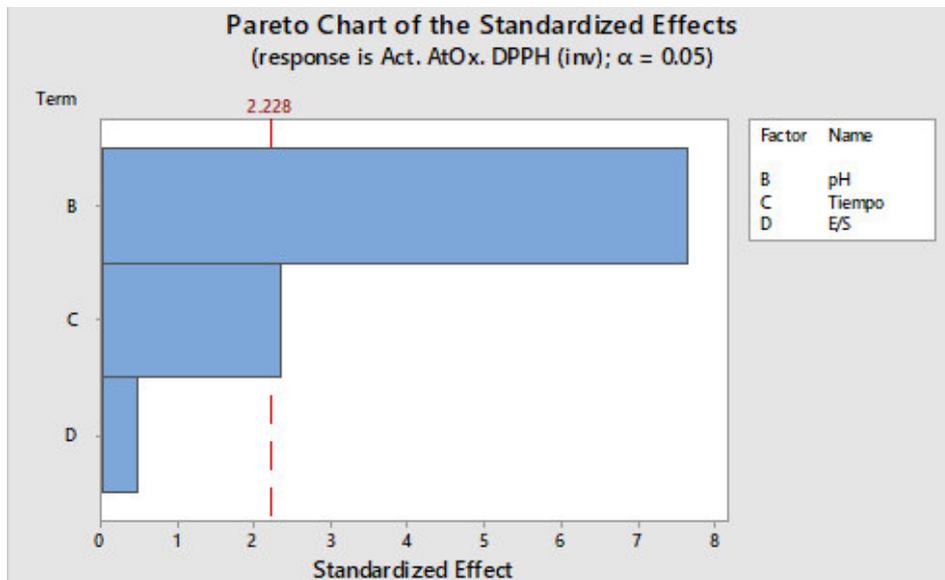


Figura 20. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, compara la magnitud absoluta de los efectos como resultados de la actividad antioxidante. Los factores pH y tiempo son estadísticamente significativos para la obtención de hidrolizados con actividad antioxidante.

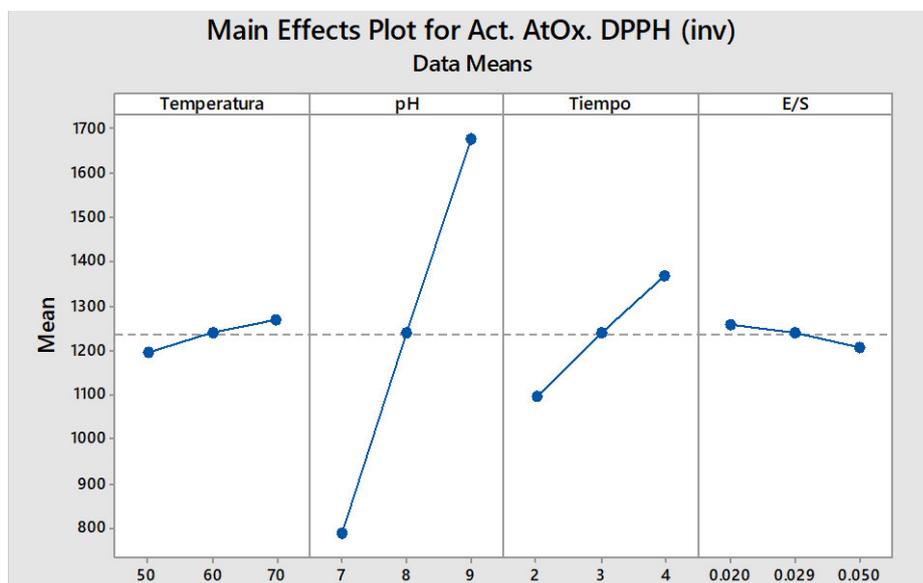


Figura 21. Gráfica de efectos principales, de acuerdo con la gráfica, a las condiciones de 50° C, pH 7, 2 horas y relación de [E/S]:[1/20], se obtienen bajos valores de IC50 de actividad antioxidante con DPPH*. Cabe señalar que la gráfica debe interpretarse de modo inverso, dado que a menor IC50 de la muestra, refiere mayor actividad antioxidante.

5.6. Determinación de la actividad antioxidante mediante el método del radical catiónico (ABTS^{•+})

La determinación de la bioactividad antioxidante también se realizó mediante el método del del radical catiónico (ABTS^{•+}). En la tabla 17, se reportan los resultados de la función biológica analizada a diferentes concentraciones de la sustancia utilizada como estándar Trolox, de esta manera se halló el IC50, el cual fue 12,38 μM .

Tabla 17. Capacidad antioxidante a diferentes concentraciones del Trolox, sustancia estándar con actividad antioxidante positiva.

<i>Sustancia estándar con actividad antioxidante</i>	<i>Concentración (μM)</i>	<i>% inhibición del radical (ABTS^{•+})</i>	<i>IC50</i>
Trolox	2,50	10,45	12,38 μM
	5,00	17,82	
	10,00	46,32	
	12,50	51,41	
	25,00	97,14	

Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones, además se hallaron los IC50 respectivos para cada muestra. Con los valores encontrados, se expresó el resultado final en valores TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox), que corresponde a la concentración de la solución del estándar Trolox (μM) que tiene la capacidad antioxidante equivalente a la muestra problema, los resultados se indican en la tabla 18.

Se indica así mismo que, las concentraciones utilizadas para evaluar la capacidad antioxidante del estándar Trolox, variaron entre 2,50 – 25,00 μM y las concentraciones consideradas para evaluar las muestras problema variaron entre 15,00 – 300,00 $\mu\text{g/mL}$, con la finalidad de obtener el IC50 de cada sustancia.

Tabla 18. Capacidad antioxidante a diferentes concentraciones de los hidrolizados enzimáticos de proteína colagenosa.

<i>Muestra problema</i>	<i>Concentración (µg/mL)</i>	<i>% inhibición del radical (ABTS^{•+})</i>	<i>IC50</i>	<i>TEAC</i>
Hidrolizado H601	37,50	17,35	138,67 µg/mL	89,28 (µmol Trolox/g hidrolizado proteico)
	75,00	28,16		
	150,00	53,70		
	225,00	78,64		
Hidrolizado H602	37,50	18,27	135,73 µg/mL	91,21 (µmol Trolox/g hidrolizado proteico)
	75,00	29,42		
	150,00	55,45		
	225,00	78,79		
Hidrolizado H603	37,50	19,73	136,54 µg/mL	90,67 (µmol Trolox/g hidrolizado proteico)
	75,00	27,71		
	150,00	53,05		
	225,00	80,26		
Hidrolizado H504	15,00	19,24	96,48 µg/mL	128,32 (µmol Trolox/g hidrolizado proteico)
	37,50	28,00		
	75,00	41,25		
	150,00	69,92		
	225,00	99,24		
Hidrolizado H505	37,50	12,68	161,10 µg/mL	79,45 (µmol Trolox/g hidrolizado proteico)
	75,00	24,90		
	150,00	44,98		
	225,00	67,67		
	300,00	94,25		
Hidrolizado H506	75,00	25,20	159,79 µg/mL	77,48 (µmol Trolox/g hidrolizado proteico)
	150,00	48,60		
	225,00	66,84		
	300,00	91,36		
Hidrolizado H507	75,00	23,30	162, 43 µg/mL	76,22
	150,00	47,40		

	225,00	69,67		($\mu\text{mol Trolox/g}$ hidrolizado proteico)
	300,00	88,89		
Hidrolizado H508	15,00	24,97	86,10 $\mu\text{g/mL}$	143,79 ($\mu\text{mol Trolox/g}$ hidrolizado proteico)
	37,50	33,00		
	75,00	47,01		
	150,00	71,80		
Hidrolizado H509	37,50	20,92	113,50 $\mu\text{g/mL}$	109,08 ($\mu\text{mol Trolox/g}$ hidrolizado proteico)
	75,00	35,88		
	150,00	63,88		
	225,00	92,00		
Hidrolizado H7010	37,50	18,27	134,95 $\mu\text{g/mL}$	91,74 ($\mu\text{mol Trolox/g}$ hidrolizado proteico)
	75,00	31,86		
	150,00	53,63		
	225,00	79,42		
Hidrolizado H7011	75,00	19,89	200,45 $\mu\text{g/mL}$	61,76 ($\mu\text{mol Trolox/g}$ hidrolizado proteico)
	150,00	37,20		
	225,00	55,22		
	300,00	75,00		
Hidrolizado H7012	15,00	25,24	74,86 $\mu\text{g/mL}$	165,38 ($\mu\text{mol Trolox/g}$ hidrolizado proteico)
	37,50	35,24		
	75,00	49,22		
	150,00	81,26		
Hidrolizado H7013	75,00	24,78	171,66 $\mu\text{g/mL}$	72,12 ($\mu\text{mol Trolox/g}$ hidrolizado proteico)
	150,00	42,99		
	225,00	63,90		
	300,00	85,45		
Hidrolizado H7014	37,50	20,80	122,18 $\mu\text{g/mL}$	101,33 ($\mu\text{mol Trolox/g}$ hidrolizado proteico)
	75,00	34,16		
	150,00	57,96		
	225,00	86,65		
Hidrolizado H7015	37,50	21,64	113,66 $\mu\text{g/mL}$	108,92
	75,00	34,79		

	150,00	65,45		(µmol Trolox/g hidrolizado proteico)
	225,00	90,31		

Se evidenció una relación directa entre la actividad antioxidante y la concentración de cada sustancia en evaluación. El IC50 de cada sustancia analizada se reporta en la figura 22, donde se verifica las diferencias entre los valores de cada hidrolizado con la sustancia estándar, la cual posee un IC50 de 3,10 µg/mL debido a la alta actividad antioxidante; sin embargo, el menor IC50 entre los hidrolizados analizados, le corresponde al hidrolizado H7012 con 74,86 µg/mL, a la vez, muy por el contrario el IC más alto entre los hidrolizados enzimáticos le corresponde al H7011 con 200,45 µg/mL.

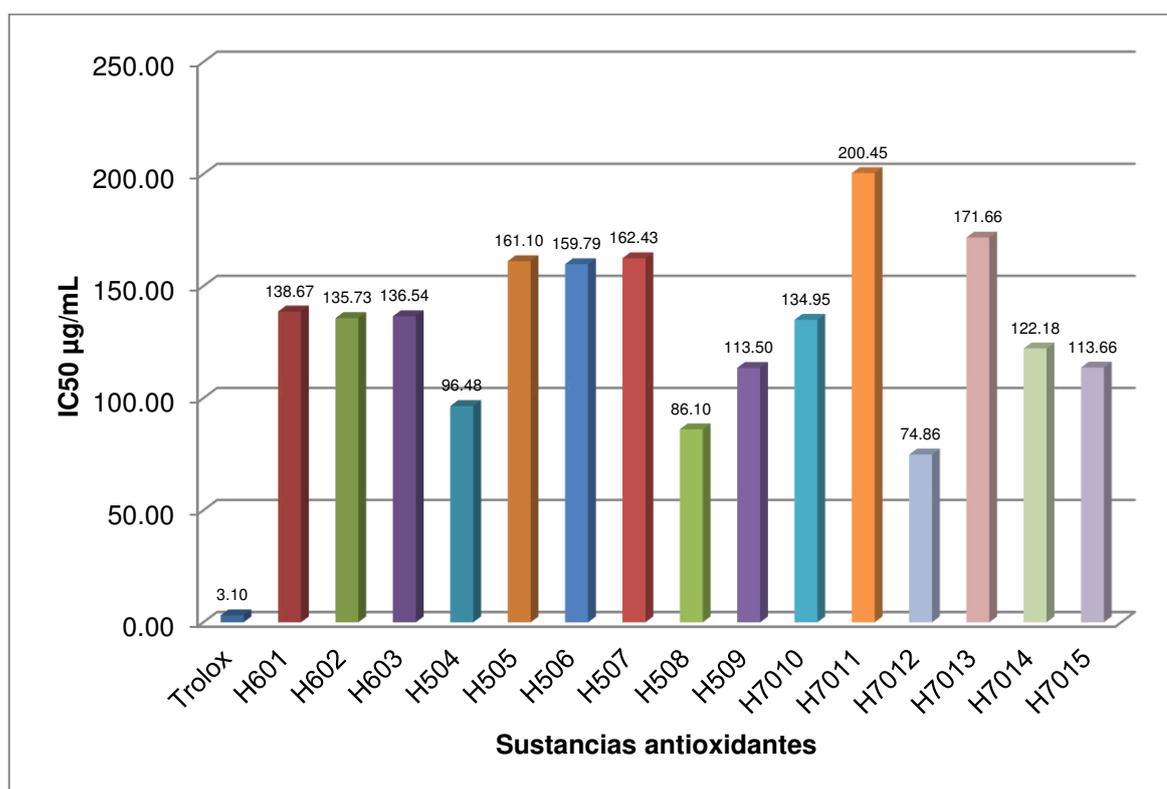


Figura 22. IC50 de las sustancias antioxidantes analizadas con el método del radical (ABTS^{•+})

Del mismo modo se grafica en la figura 23 los resultados respecto a los valores TEAC para cada hidrolizado, entendido este como el valor corresponde a la concentración de la solución del estándar Trolox (µM) que tiene la capacidad

antioxidante equivalente a la muestra problema individual, podemos notar que el mayor valor del TEAC le corresponde al hidrolizado H7012 con 165,38 $\mu\text{mol Trolox/g hidrolizado proteico}$, y por el otro lado tenemos el hidrolizado H7011 con el menor valor TEAC, con 61,76 $\mu\text{mol Trolox/g hidrolizado proteico}$.

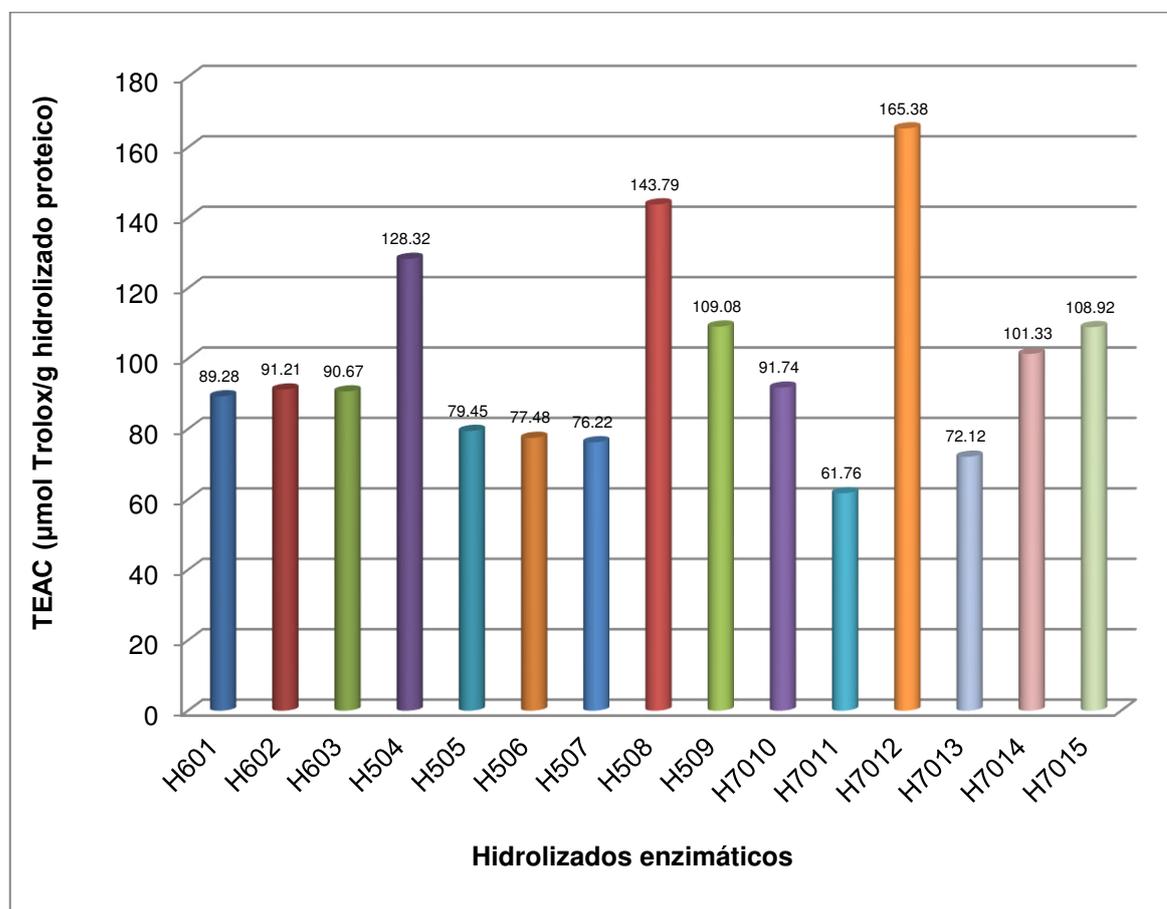


Figura 23. Valores TEAC de los hidrolizados enzimáticos.

Tabla 19. Análisis del diseño factorial: actividad antioxidante (ABTS^{•+}) VS pH, tiempo y [E/S]

Factores	Grados de libertad (DF)	Valor F	Valor p
pH	1	21,33	0,001*
Tiempo	1	7,82	0,019*
[E/S]	1	1,14	0,311

$\alpha = 0,05$
 $p < 0,05$

* Los factores pH y tiempo influyen estadísticamente significativa en la obtención de hidrolizados con propiedad antioxidante, empleando el diseño factorial tipo Plackett-Burman.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico los factores de pH y tiempo tienen una influencia estadísticamente significativa en la obtención de hidrolizados con propiedad antioxidante, así mismo las gráficas 24 y 25 indican cómo las configuraciones experimentales a las que se sometió la reacción de hidrólisis afectan la actividad antioxidante determinada mediante el método del radical ABTS^{•+}.

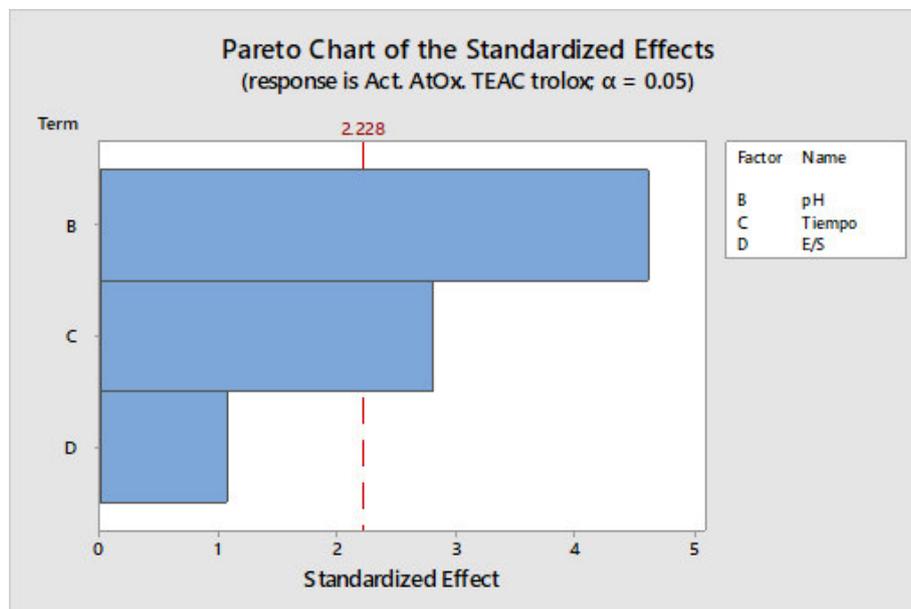


Figura 24. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, compara la magnitud absoluta de los efectos como resultados de la actividad antioxidante. En el gráfico se visualiza que los factores pH y tiempo son estadísticamente significativos para la obtención de hidrolizados con actividad antioxidante.

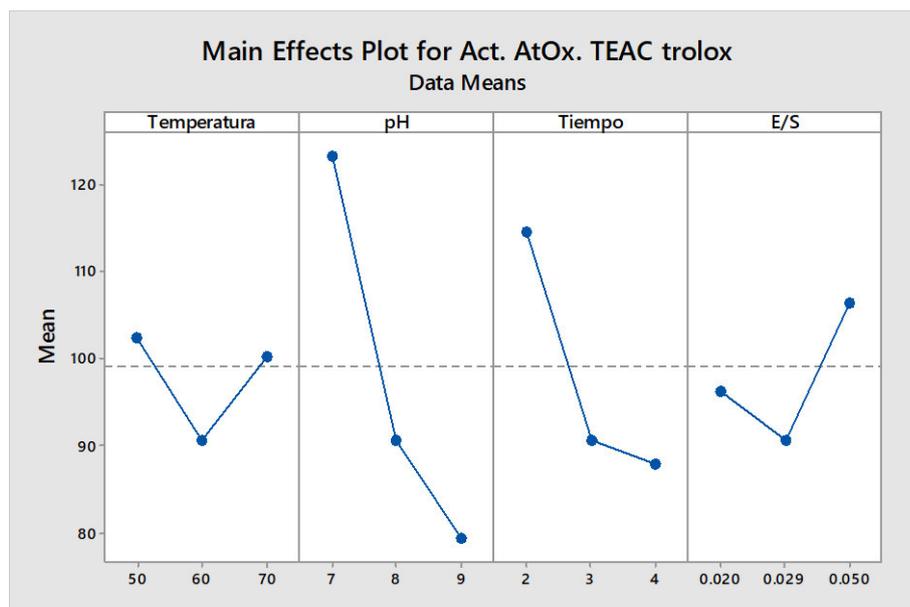


Figura 25. Gráfica de efectos principales, nos muestra que a diferentes grados de los factores de hidrólisis enzimática se obtienen efectos diferentes, de acuerdo con la gráfica, a las condiciones de 50° C, pH 7, 2 horas y relación de [E/S]:[1/20], se obtienen los más altos valores TEAC de actividad antioxidante con ABTS^{••}. Cabe señalar que la gráfica debe interpretarse de modo directo, dado que a mayores valores TEAC de la muestra, refiere mayor actividad antioxidante.

5.7. Determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar-pozo

De acuerdo a los resultados obtenidos, se reporta como positivos para algunos agentes bacterianos con actividad biológica baja a intermedia por formación de un halo claro alrededor del pozo, que indica inhibición del crecimiento del microorganismo, las medidas de estos halos se detallan en la tabla 20 y se observan en el anexo 10.

Tabla 20. Valores de los halos de inhibición (mm) obtenidos de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar-pozo.

Microorganismo Hidrolizado [1000 µg/mL]	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
	Medida de halos (mm)*				
H601	-	15,5	-	14,5	-
H602	-	15,0	-	14,0	-
H603	-	15,5	-	14,0	-

H504	-	13,5	-	13,5	-
H505	-	-	-	-	-
H506	-	-	-	-	-
H507	-	-	-	-	-
H508	-	14,0	-	-	-
H509	-	13,0	-	13,5	-
H7010	-	14,0	-	-	-
H7011	-	-	-	-	-
H7012	-	-	-	-	-
H7013	-	-	-	-	-
H7014	-	14,5	-	13,5	-
H7015	-	-	-	-	-

*: Los valores en mm incluyen la medida del pozo.

-: No se reportó halo de actividad antimicrobiana

Tabla 21. Análisis del diseño factorial: actividad antimicrobiana (difusión en pozo) contra *Staphylococcus aureus* VS temperatura, pH, tiempo y [E/S]

Factores	Grados de libertad (DF)	Valor F	Valor p
Temperatura	1	0,90	0,367
pH	1	29,80	0,000*
Tiempo	1	1,23	0,297
[E/S]	1	0,90	0,367

$\alpha = 0,05$

$p < 0,05$

* El factor pH influye estadísticamente significativa en la obtención de hidrolizados con propiedad antimicrobiana, empleando un diseño factorial tipo Plackett-Burman.

Tabla 22. Análisis del diseño factorial: actividad antimicrobiana (difusión en pozo) contra *Bacillus subtilis* VS temperatura, pH, tiempo y [E/S]

Factores	Grados de libertad (DF)	Valor F	Valor p
Temperatura	1	0,60	0,459
pH	1	5,40	0,045*
Tiempo	1	0,60	0,459
[E/S]	1	0,60	0,459

$\alpha = 0,05$

$p < 0,05$

* El factor pH influye estadísticamente significativa en la obtención de hidrolizados con propiedad antimicrobiana, empleando un diseño factorial tipo Plackett-Burman.

Respecto al análisis estadístico se confirma que los factores considerados influyen en la obtención de hidrolizados con propiedad antimicrobiana contra el microorganismo correspondiente; no obstante, el factor pH, tiene una influencia estadísticamente significativa en la obtención del resultado previsto. Así mismo, en las gráficas 26, 27, 28 y 29 se muestra el análisis respecto la influencia de las diferentes combinaciones de las condiciones hidrolíticas sobre la propiedad biológica en evaluación.

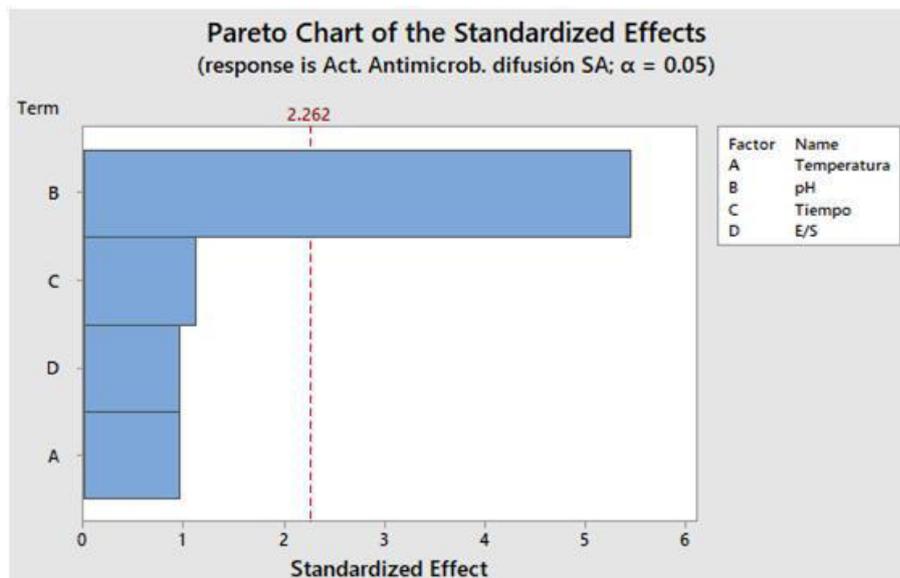


Figura 26. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, compara la magnitud absoluta de los efectos como resultados de la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Así mismo, se observa en el gráfico que el factor pH es estadísticamente significativo para la obtención de hidrolizados con actividad antimicrobiana.

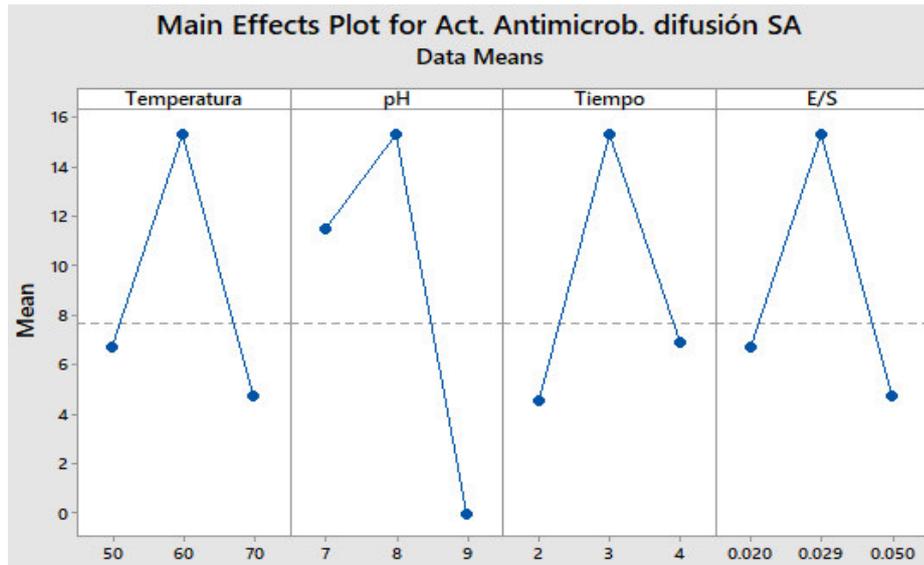


Figura 27. Gráfica de efectos principales, nos muestra que a diferentes grados de los factores de hidrólisis enzimática se obtienen efectos diferentes, de acuerdo con la gráfica, a las condiciones de 60° C, pH 8, 3 horas y relación de [E/S]:[1/35], se obtienen los más altos valores de halos de inhibición de crecimiento bacteriano.

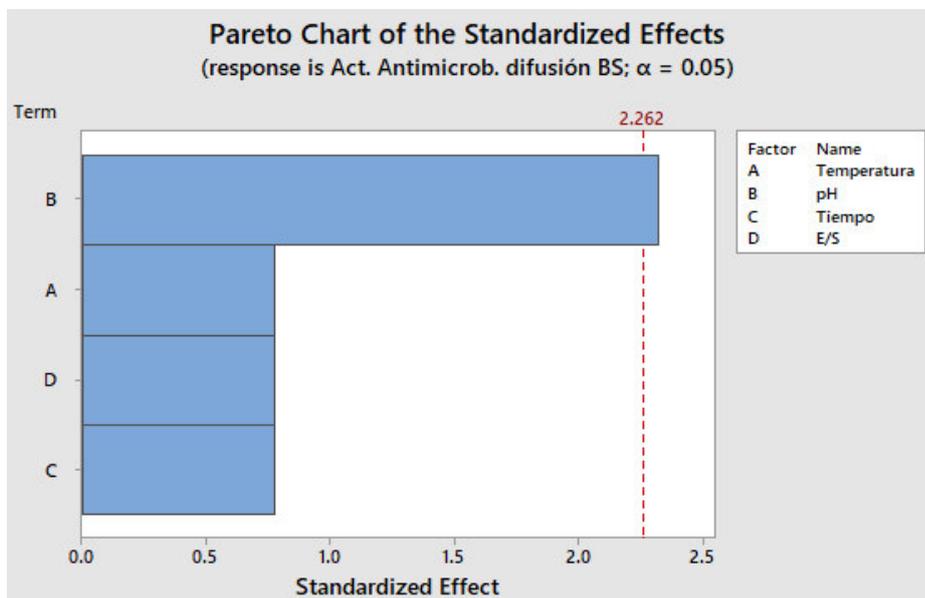


Figura 28. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, compara la magnitud absoluta de los efectos como resultados de la actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*. El factor pH es estadísticamente significativo para la obtención de hidrolizados con actividad antimicrobiana.

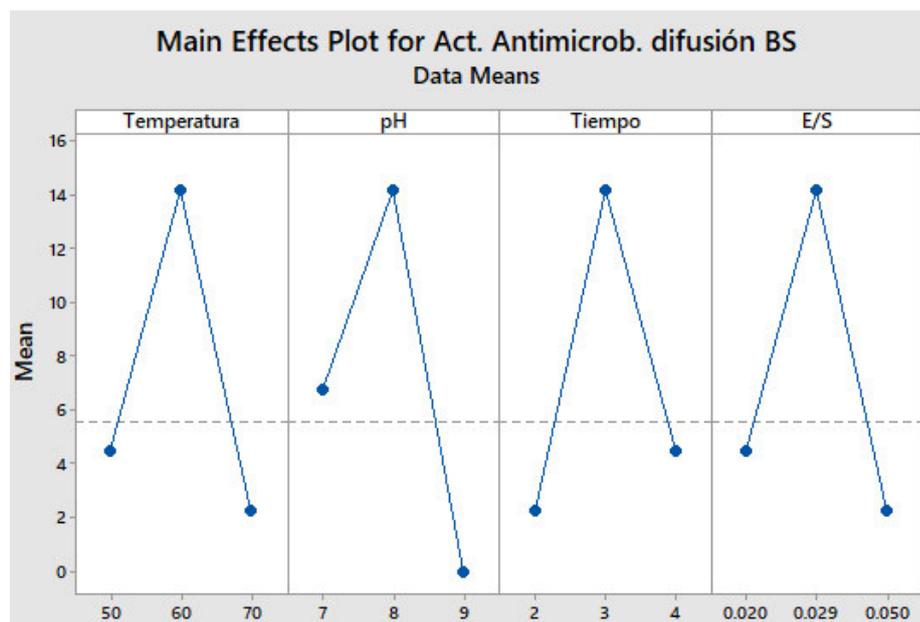


Figura 29. Gráfica de efectos principales, nos muestra que a diferentes grados de los factores de hidrólisis enzimática se obtienen efectos diferentes, de acuerdo con la gráfica, a las condiciones de 60° C, pH 8, 3 horas y relación de [E/S]:[1/35], se obtienen los más altos valores de halos de inhibición de crecimiento bacteriano.

5.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el método de microdilución/colorimétrico

En la tabla 23 se reportan los resultados del ensayo de determinación de actividad antimicrobiana de los hidrolizados enzimáticos mediante el método de microdilución/colorimétrico, que tiene por finalidad encontrar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Así mismo, en las figuras del anexo 5 se pueden observar las coloraciones en las microplacas correspondientes a la lectura de los resultados.

Tabla 23. Valores de CMI de hidrolizados contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Microorganismo Hidrolizado	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
H601	> 1000	1000
H602	> 1000	1000
H603	> 1000	1000

H504	500	500
H508	1000	1000
H509	1000	1000
H7010	1000	1000
H7014	1000	> 1000

Los resultados del CMI se justifican en la no variación en coloración en los pocillos, por lo tanto, se mantiene la coloración inicial o se torna incoloro. Por el contrario, se reporta como crecimiento bacteriano positivo ante un mínimo cambio en el color del indicador.

Tabla 24. Análisis del diseño factorial: actividad antimicrobiana (CMI) contra *Staphylococcus aureus* VS temperatura, pH, tiempo y [E/S]

Factores	Grados de libertad (DF)	Valor F	Valor p
Temperatura	1	0,29	0,603
pH	1	23,52	0,001*
Tiempo	1	2,61	0,140
[E/S]	1	0,29	0,603

$\alpha = 0,05$

$p < 0,05$

* El factor pH influye estadísticamente significativa en la obtención de hidrolizados con propiedad antimicrobiana, empleando un diseño factorial tipo Plackett-Burman.

Tabla 25. Análisis del diseño factorial: actividad antimicrobiana (CMI) contra *Bacillus subtilis* VS temperatura, pH, tiempo y [E/S]

Factores	Grados de libertad (DF)	Valor F	Valor p
Temperatura	1	0,00	1,00
pH	1	18,75	0,002*
Tiempo	1	3,00	0,117
[E/S]	1	0,00	1,00

$\alpha = 0,05$

$p < 0,05$

* El factor pH influye estadísticamente significativa en la obtención de hidrolizados con propiedad antimicrobiana, empleando un diseño factorial tipo Plackett-Burman.

Conforme al estadístico se corroboró que los factores del proceso hidrolítico influyen en la obtención de hidrolizados con propiedad antimicrobiana; sin embargo, el factor pH, tiene una influencia estadísticamente significativa. En las gráficas 30, 31, 32 y 33 se evidencia la influencia de las condiciones hidrolíticas sobre la actividad biológica evaluada.

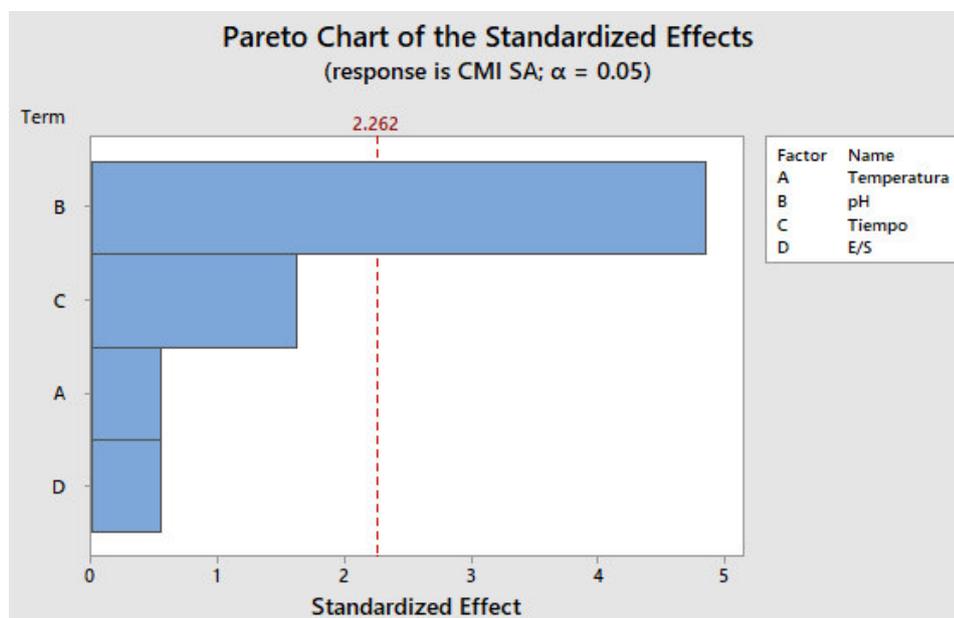


Figura 30. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, compara la magnitud absoluta de los efectos como resultados de la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. El factor pH es estadísticamente significativo para la obtención de hidrolizados con actividad antimicrobiana.

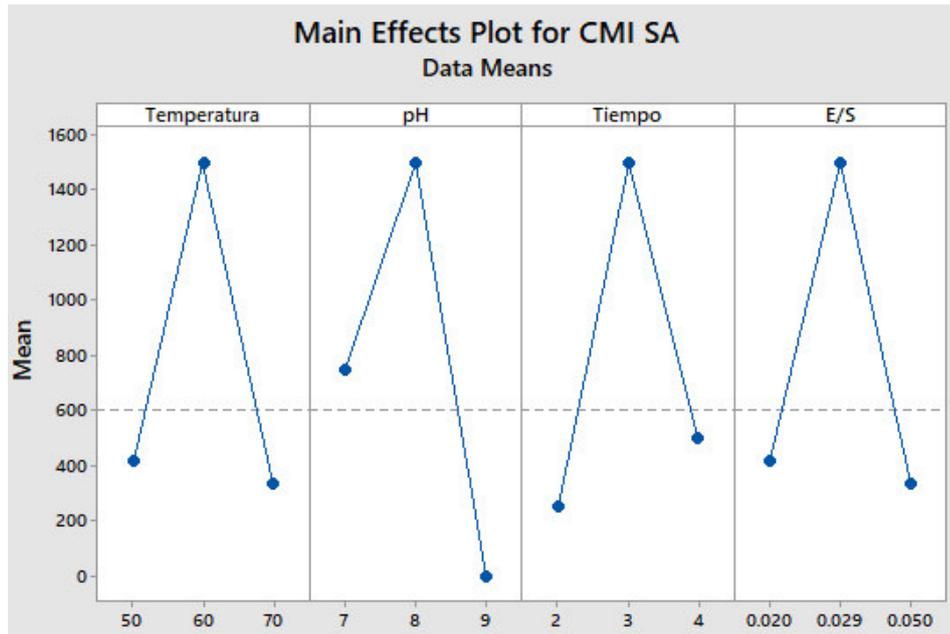


Figura 31. Gráfica de efectos principales, nos muestra que a diferentes grados de los factores de hidrólisis enzimática se obtienen resultados diferentes, de acuerdo con la gráfica de interpretación inversa, a las condiciones de 60° C, pH 8, 3 horas y relación de [E/S]:[1/35], se obtienen los más bajos valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

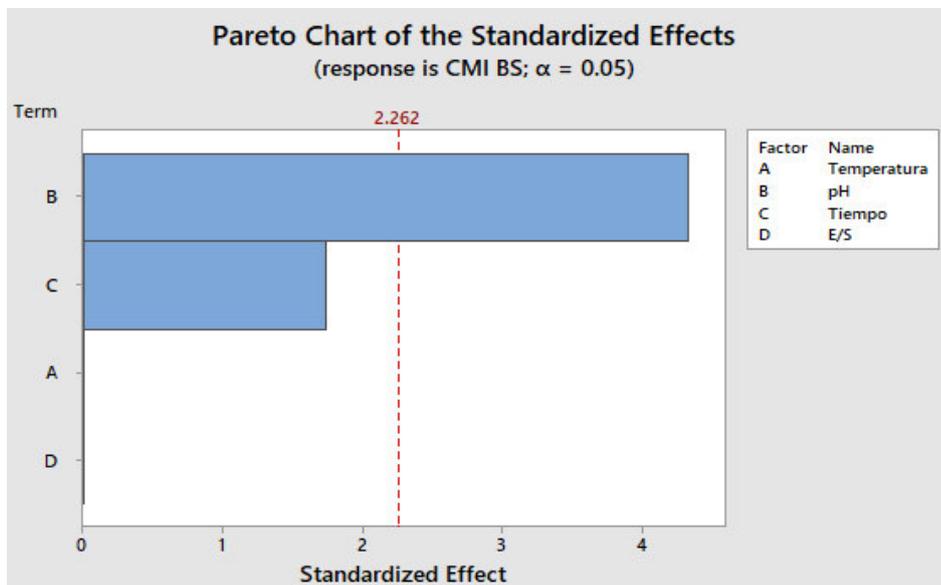


Figura 32. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados, compara la magnitud absoluta de los efectos como resultados de la actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*. El factor pH es estadísticamente significativo para la obtención de hidrolizados con actividad antimicrobiana.

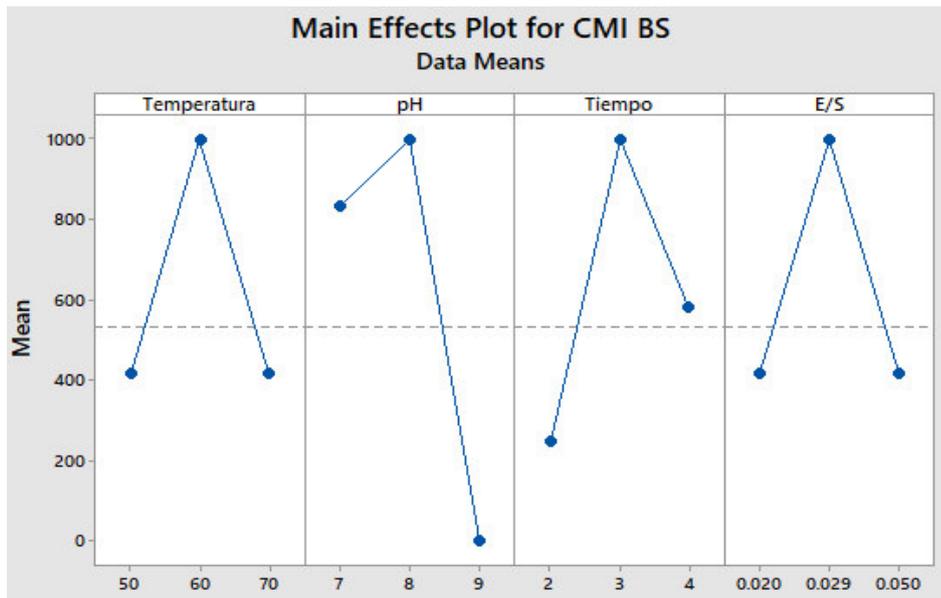


Figura 33. Gráfica de efectos principales, nos muestra que a diferentes grados de los factores de hidrólisis enzimática se obtienen resultados diferentes, de acuerdo con la gráfica de interpretación inversa, a las condiciones de 60° C, pH 8, 3 horas y relación de [E/S]:[1/35], se obtienen los más bajos valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

VI. DISCUSIÓN

Se recolectaron los residuos de la actividad pesquera concernientes a las pieles del pescado “Bonito”; sin embargo, es necesario en esta etapa la limpieza minuciosa de los restos del organismo adheridos a las pieles, como son las sobras musculares, grasa y entre otros cuerpos extraños, dado que en lo posible tratamos de buscar la menor degradación de la proteína colagenosa presente en las pieles por efecto de la contaminación microbiana y por lo tanto, expuesta a enzimas propias del entorno, por este motivo, se trató de seleccionar las pieles frescas y no contaminadas con residuos biológicos, consecuentemente para mantenerlas y evitar de este modo la degradación proteica, se almacenó a bajas temperaturas, tales consideraciones y recomendaciones fueron tomadas de investigaciones anteriores relacionadas con la extracción de gelatina a partir de diferentes partes de organismos acuáticos, tal es el caso de Miano A. et al., 2014², Gómez-Guillén et al., 2001⁹⁶ y Yang et al., 2007³¹, quienes propusieron cuidados y consideraciones en el almacenamiento de las muestras recolectadas, así como también mejoras en el pretratamiento para una óptima extracción de gelatina de organismo acuáticos, y con la finalidad de obtener una gelatina de alta calidad^{2,31,96}.

De esta manera, teniendo en cuenta los argumentos antes descritos y a su vez ostentando como referencia lo obtenido en nuestra investigación como valor de rendimiento (15,86%) del producto en el proceso de extracción de gelatina, es apropiada la comparación con estudios realizados que emplearon otras especies de pescados, entre las cuales podemos encontrar especies marinas y de río, o también es el caso de especies de agua frías o cálidas, pues todas estas características influyen en el rendimiento de la extracción de la proteína de interés, encontrando claramente diferencias en el contenido y calidad del producto alcanzado, tal es el caso de un estudio realizado por Miano A. et al., 2014² en el que lograron extraer gelatina a partir de la piel de tollo, así mismo, demuestran que los rendimientos de gelatina de esta parte del organismo vivo oscilan entre 16,7 a 29,8%, a su vez estos rendimientos no solo dependen del

método y de las condiciones del proceso de extracción como son la temperatura y tiempo de extracción, sino también depende de la especie y de la parte del organismo del cual se extrae la proteína parcialmente hidrolizada que es la gelatina, por otra parte, también podemos contrastar el resultado del rendimiento obtenido con la investigación llevada a cabo por Muyonga J. et al., 2004⁹ en la que reporta valores de rendimientos de extracción de gelatina a partir de las pieles de la especie *Lates niloticus* entre 12,5 – 16% dependiendo en qué estadio se encuentra el animal, joven o adulto respectivamente, quedando claro que el rendimiento del proceso de extracción depende de muchos factores propias del método de extracción proteica como también del organismo vivo^{2,9}.

Es de este modo que podemos encontrar variaciones en cuanto al rendimiento del proceso de extracción de gelatina conseguidos en diferentes trabajos de investigación con especies distintas, que al ser comparados en cuanto al rendimiento alcanzado en nuestro trabajo se aproxima a los resultados de los referidos estudios, tal es el caso de Mohtar N. et al., 2010¹²⁶ quienes reportaron un rendimiento de 17,4% empleando las pieles de la especie *Macruronus novaezelandiae*, en cuanto a los resultados logrados por Koli J. et al., 2013³³ informaron un rendimiento de extracción de gelatina entre 3,55 – 7,46% de las pieles de *Otolithes ruber*, lo cual corresponde a valores menores al nuestro, por último, en el estudio desarrollado por Thi C. et al., 2017³⁵ reportaron valores del rendimiento en la extracción de gelatina a partir de las pieles de las especies *Perca fluviatilis* y *Sander volgensis* entre 10,2 – 13,8 %. Es necesario indicar que el rendimiento de gelatina obtenido a través del método utilizado y comparado con los trabajos citados anteriormente, coinciden y corresponde a un valor intermedio a alto entre los reportados a la actualidad, por lo tanto es aceptable; sin embargo, se pudo verificar que con el empleo del método de extracción se genera ciertas pérdidas de gelatina en los continuos pasos de lavado, transferencias de la solución de gelatina, así como la insuficiente solubilización del colágeno presente en las pieles de la especie empleada^{33,35,126}.

En referencia a la cuantificación de proteína contenida en el producto de la extracción de la gelatina se obtuvo como resultado un 70,32% respecto a la

proteína total, esta evaluación se determinó mediante el método de Bradford, la selección de este método empleado se justifica por su alta sensibilidad en la unión del colorante del reactivo con las proteínas, su rapidez de reacción con las moléculas proteicas y sobre todo por la estabilidad de la reacción al mantener una duración prolongada por casi 1 hora, tiempo necesario para la lectura de la muestra y para la elaboración de la curva de calibración con el estándar de proteína de albúmina sérica bovina, nuestro valor hallado en la investigación es comparable con estudios previos que cuantificaron en porcentaje de proteína en la gelatina extraída de la piel de diferentes especies de pescado, tal es el caso del estudio publicado por Cheow C. et al., 2007¹²⁷ en el que hallaron el porcentaje de proteína en la gelatina extraída de las pieles de la especie de pescado *Johnius dussumieri*, el cual asciende $69,2 \pm 0,13$, el cual es un valor muy aproximado al encontrado en nuestro trabajo de investigación, no podemos dejar de citar un estudio recién publicado y llevado a cabo en Brasil por Costa da Silva E. et al., 2017¹²⁸ en el que reportan que el porcentaje de proteína hallado en la gelatina extraída a partir de la piel de la especie *Brachyplatystoma filamentosum* fue de $72,76 \pm 2,02$, cifra superior, pero muy similar a la encontrada en nuestro ensayo de cuantificación proteica. Por otro lado, Muyonga J. et al., 2004⁹, informan que el porcentaje de proteína en la gelatina extraída de la piel de la especie *Lates niloticus* es muy alta, variando entre 87,4 – 88,8% en ejemplares jóvenes o adultos, de la misma forma establecen que el porcentaje de proteína presente en las gelatinas extraídas está influenciado por factores de extracción como la temperatura, además de lo ya citado como el estadio, origen de los ejemplares y finalmente de la especie de la que se extrae la proteína; sin embargo, si es comparado con nuestro ensayo, ambas metodologías coinciden en algunos factores de extracción, como la temperatura de 60-70°C, pero diferenciándose en el tiempo y pH de extracción. Según la investigación publicada por Aleman A. et al., 2011¹⁶ la gelatina extraída de las pieles de la especie *Thunnus spp.* contiene un $89,6 \pm 1\%$ de proteína, lo cual corresponde a un valor muy alto en comparación con lo cuantificado en nuestro estudio, no obstante, cabe resaltar que se trata de otra especie a partir de la cual se extrae la gelatina. En una reciente publicación realizada por Thi C. et al., 2017³⁵

encontraron que el porcentaje de proteína en la gelatina extraída de las pieles de la especie *Perca fluviatilis* fue de $88\pm 0,4\%$, un valor ligeramente superior al hallado en nuestro estudio con el empleo una metodología de extracción similar a la nuestra, de otro lado podemos mencionar que se tratan de especies diferentes, así mismo, es importante señalar que los trabajos de investigación citados para este resultado emplearon métodos de cuantificación proteica diferentes al de Bradford^{9,16,35,127,128}.

Se analizó un total de 15 hidrolizados, dado que la misma muestra (gelatina extraída de la piel de pescado), fue sometida a diferentes condiciones hidrolíticas como pH, tiempo, temperatura y relación [enzima]:[sustrato], según el diseño factorial tipo Plackett-Burman con tres puntos centrales, de esta manera se procedió con la determinación del %GH, considerado un excelente indicador sobre estado del proceso de hidrólisis enzimática, dado que nos precisa la cantidad de enlaces peptídicos escindidos de la proteína inicial, y que de acuerdo a estudios anteriores está influenciado por diferentes factores en el proceso hidrolítico como tipo de enzima a emplear, temperatura, tiempo de hidrólisis, relación enzima:sustrato, entre otros no menos importantes¹²⁹. En nuestro caso la proteína colagenosa extraída de la piel de pescado fue sometida a hidrólisis con alcalasa, y resulta como producto de esta reacción numerosas cadenas de péptidos de diferentes tamaños y a la vez aminoácidos, todos ellos libres en el medio de reacción (hidrolizado). Se empleó la metodología de acuerdo al estudio publicado por Gómez-Guillen et al., 2010⁶, no obstante, se planteó diferentes condiciones para el proceso hidrolítico de las muestras (15), evidenciándose la variación en cuanto a la temperatura (50, 60 y 70°C), pH (7, 8 y 9), tiempo de reacción (2, 3 y 4 horas) y relación [enzima]:[sustrato] ([1:20], [1:35] y [1:50]), posteriormente se determinó el %GH de cada hidrolizado, de esta manera se procede al análisis de la influencia de los factores en el proceso hidrolítico^{6,129}.

Para una mayor precisión en el análisis sobre la influencia de los factores a los que se expuso la hidrólisis de las muestras, se determinó el %GH mediante dos métodos, el primero de ellos por cuantificación de proteína soluble tratada con

ATC al 10% mediante el método de Biuret, y el segundo por cuantificación de nitrógeno soluble en ATC al 10% a través del método de micro-Kjeldahl, de esta manera se resumen los resultados obtenidos en las tablas 10 y 12, así como también, en los gráficos respectivos. De tal análisis se desprende que todas las muestras sobrepasan el 10% de GH, hasta un máximo de 33,21% hallado con el método de Biuret, si se compara con los resultados hallados con el método de micro-Kjeldahl, notamos una ligera variación en los valores reportados para el %GH; sin embargo, se confirma también mediante el segundo método que todas las muestras logran un GH mayor al 10%, lo cual nos indica altos valores conseguidos. Así mismo, con los métodos de Biuret y micro-Kjeldahl se pudo evidenciar que el mayor grado de hidrólisis reportado corresponde cuando la muestra es hidrolizada bajo las condiciones de 60°C, contenida en un medio de reacción correspondiente a un buffer de pH 8, tiempo de hidrólisis de 3 horas y por último la relación de [enzima]:[sustrato] oportuna de [1:35], tales resultados son contrastados con el GH de 47,52% reportados por Gómez-Guillen et al., 2010⁶ a los 150 minutos de la hidrólisis con la enzima alcalasa cuyo sustrato fue la gelatina extraída de la piel del atún a condiciones pH 8, 50°C y relación de enzima:sustrato de 1:20 (w:w), es importante destacar que en este estudio se señala gráficamente que a partir de los 120 minutos el %GH tiene pequeñas variaciones, así mismo se empleó un método diferente para la cuantificación del grado de hidrólisis. Cabe destacar además la aproximación con nuestros resultados el %GH de 25,6±2,0% alcanzado por hidrólisis de la gelatina de la piel de atún con la enzima alcalasa, proceso que fue llevado a cabo bajo las condiciones de pH 8, 50°C (consideradas como óptimas), además la [relación enzima: sustrato] fue de [1:20 p:p] y durante un tiempo total de 3 horas según lo indicado por Alemán A. et al., 2011¹⁶, otra publicación llevada a cabo por García-Moreno P. et al., 2014¹⁰ señalan que el grado de hidrólisis alcanzado a partir de los descartes de sardina varió entre 13,2 - 14,9% tratados con la combinación de las enzimas alcalasa y tripsina a las condiciones de pH 8 y 50 °C y relación de enzima:sustrato de 3% (p/p). Conforme a los resultados obtenidos la muestra H509 hidrolizada a 50°C, pH 7, tiempo de 4 horas y [relación enzima: sustrato] de [1:50], alcanzó uno de los grados de hidrólisis más altos 25,80% y 26,92%

con cada método, lo que es contrastable con las condiciones óptimas de hidrólisis (pH 7 y 50°C) para la enzima alcalasa reportado según Kim S. et al., 2010⁷, de igual modo podemos citar a la investigación de Alemán A. et al., 2011¹³⁰, en el que encontraron un grado de hidrólisis entre 27,1±0,9 – 30,9±0,9% como resultado del proceso hidrolítico de gelatina extraída de piel del pescado Catfish con la enzima alcalasa a condiciones de 50°C y pH 8; sin embargo, en una publicación reciente realizada por N. Greyling, 2017⁶⁴ indica intervalos óptimos de las condiciones hidrolíticas (pH de 6 – 10 y temperatura 55 – 70°C) a las cuales la enzima alcalasa alcanza valores altos en cuanto al grado de hidrólisis, aclarando que depende a la vez del sustrato a hidrolizar. Por último nuestros resultados son comparables con la evidencia científica actual llevada a cabo por Blanco M. et al., 2017⁵¹ en la cual someten a hidrólisis con la enzima alcalasa a las gelatinas extraídas de las pieles de las especies *Prionace glauca*, *Scyliorhinus canicula*, *Xiphias gladius* y *Thunnus albacares* bajo las condiciones de 55 °C (considerada como óptima), ajuste de pH 8 con NaOH, [relación enzima: sustrato] de [1:20] y durante un tiempo total de 3 horas, obteniendo un GH de 16,52±3,74%, 15,80±0,99%, 12,56±1,79% y 11,49±1,5% para cada especie mencionada respectivamente. No está de más indicar que los %GH reportados por los estudios citados han sido determinados con el empleo de diferentes metodologías, e incluso en algunos de ellos similares a las nuestras. Así mismo, los resultados mostrados del grado de hidrólisis, hallados tanto por el método de Biuret como por micro-Kjeldahl, sugieren la influencia de los factores en el proceso hidrolítico enzimático, la cual fue analizada estadísticamente, donde según las gráficas que corresponden al diagrama de Pareto muestran que los factores de temperatura, pH, tiempo de hidrólisis y relación [enzima:sustrato] influyen de manera positiva en dicha reacción química-enzimática, en la cual no hay interacción entre los factores; sin embargo, entre todos los cuatro que se consideran en el trabajo la influencia de [E/S] es estadísticamente significativa, no obstante, no implica que los demás factores no influyan en el proceso hidrolítico, tal como se aprecia en la gráfica de efectos principales, en la que involucra que el mayor grado de hidrólisis obtenido fue a las condiciones de 60 °C, pH 8, un tiempo de 3 horas y la relación

[enzima:sustrato] de [1/35], tales resultados parecen correlacionarse con los reportados en investigaciones anteriores, por ejemplo el desarrollado por Márquez M. et al., 1993⁶⁶ donde resalta la importancia de la concentración del sustrato y producto sobre la cinética de hidrólisis de proteínas con la enzima alcalasa a condiciones de 50°C y pH 8, así mismo determina la influencia del tiempo en el grado de hidrólisis sobre proteínas de fuente vegetal. También se encontró un estudio llevado a cabo por Yang A. et al., 2016⁶⁵ en el que relaciona el %GH de la proteína de huevo influenciado por el factor tiempo (0-180 minutos), donde se observa una meseta poco variable a partir de los 120 minutos en adelante, así mismo se determinó las condiciones óptimas para la reacción hidrolítica con alcalasa (pH 8 y 60°C). Por último Gbogouri G. et al., 2004¹³¹, evaluaron la influencia de los factores temperatura, relación [enzima/sustrato] y pH en la hidrólisis enzimática de las cabezas de la especie *Salmo salar*, con la enzima alcalasa, obteniendo %GH de 11,50 – 17,30%, este último a condiciones de [E/S] 5,2%, 57°C y pH 8, así mismo en esta investigación consideran que no hay interacción entre los factores estudiados, lo cual concuerda con las consideraciones halladas en nuestro ensayo y respectivos resultados. Pese a que nuestros valores del grado de hidrólisis alcanzados y la vez comparados con los obtenidos por otros investigadores son aproximados, no se han encontrado estudios bajo una matriz experimental semejante a la trabajada en nuestro análisis^{6,7,10,16,51,65,131}.

Entre todas las actividades biológicas que se pueden demostrar para un hidrolizado enzimático de proteínas de fuente animal o vegetal, la actividad antioxidante se perfila como la de mayor interés y de gran investigación a nivel mundial, y sin duda alguna si se trata de la proteína colagenosa extraída de pescado, ya que la gelatina muchas veces proviene de partes singulares como escamas, músculo, cabezas, huesos y de la piel^{27,32,67-69}. Ante esta posibilidad se evaluó *in vitro* la capacidad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos de gelatina mediante dos métodos, el primero por decoloración de la solución del radical (DPPH•) y el segundo justificado por la decoloración de la solución de los radicales relativamente estables de (ABTS•⁺)^{106,112,115}.

Los resultados mostrados en las tablas 14 y 15, así como en la figura 19 corresponden a la capacidad antioxidante que presenta cada una de las muestras hidrolizadas con alcalasa a diferentes condiciones de T°, pH, tiempo de hidrólisis y relación [E:S], con el empleo del método del radical (DPPH•), a la vez estos resultados se reportan mediante el IC50, que viene a ser la concentración de la sustancia en evaluación necesaria para inhibir el 50% de los radicales DPPH• presentes en la solución, de esta manera debe entenderse que a menor IC50, mayor es la capacidad antioxidante, debido a que necesita menor concentración para alcanzar la inhibición señalada, una clara muestra de ello recae sobre los IC50 muy reducidos hallados para las sustancias estándares con actividad antioxidante positiva, las cuales fueron 1,68 y 3,53 µg/mL para la vitamina C y el Trolox correspondientemente. Así mismo, en relación a nuestras muestras problema (hidrolizados), cabe destacar que el menor IC50, traducido como la muestra que posee mayor capacidad antioxidante, compete al H7012 con un IC50 de 458,73 µg/mL que al ser contrastado con los valores de los estándares de vitamina C y Trolox es mucho mayor, por otro lado, tenemos a los hidrolizados que reportaron valores mayores de IC50 como el H7011 y H505 con 1830,46 y 1827,36 µg/mL respectivamente, tratándose los hidrolizados de menor capacidad antioxidante. De acuerdo con los resultados alcanzados, estos pueden ser contrastados según lo informado a través del estudio realizado por Weng W. et al., 2014⁴⁹ en Japón, en el cual los péptidos aislados del hidrolizado de gelatina extraída de la piel de la especie marina *Prionace glauca*, muestran una alta propiedad antioxidante con valores de IC50 que varían entre 0,57 – 2,04 mg/mL, dicha propiedad fue evaluada mediante el método del radical DPPH•, cabe destacar que en este estudio se empleó la enzima comercial Protamex; sin embargo, bajo condiciones de hidrolisis parecidas. Por último Wang B. et al., 2013¹³² reportan que lograron aislar tres péptidos provenientes de la hidrólisis de colágeno de las escamas de *Pseudosciaena crocea*, a la vez señala que el proceso enzimático fue seriado con dos enzimas, tripsina y pepsina, obteniendo de esta manera el hidrolizado que contiene tres péptidos caracterizados con propiedades antioxidantes con IC50 de 1,271, 0,675, y 0,283 mg/mL, evaluados mediante el método de radical DPPH•, donde podemos notar que estos valores

son muy comparables a los hallados en el presente estudio. No es de menor importancia el sustento hallado por Nakchum L. et al., 2015¹³³ al obtener un hidrolizado con alcalasa del colágeno de la piel de calamar que demuestra, mediante el método *in vitro* del radical DPPH•, tener propiedad antioxidante con un IC50 equivalente a 417,43 µg/mL^{49,132,133}.

La propiedad antioxidante de las muestras problema también fue evaluada con el método del radical (ABTS•+), la justificación radica en que a través de este método puede evaluarse antioxidantes hidrofóbicos e hidrofílicos, ello sumado a que la gelatina contiene ambos tipos de péptidos¹³⁵. Para este ensayo de decoloración fue necesario hallar el IC50 (12,38µM) del estándar Trolox que posee actividad antioxidante positiva, como también el IC50 de todas muestras hidrolizadas bajo diferentes factores de hidrólisis (temperatura, tiempo, pH y relación [enzima:sustrato], no obstante, los resultados fueron expresados como valores TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox) en unidades de (µmol Trolox/g de hidrolizado proteico), que nos indica la concentración de la solución estándar Trolox en µmol, que posee la capacidad antioxidante equivalente a los gramos de la muestra problema evaluada, precisamente los valores más altos de TEAC conllevan a que la muestra evaluada posea mayor actividad antioxidante, de esta manera en nuestros resultados las mayores capacidades antioxidantes las presentaron H7012, H508, H504 y H509 con valores TEAC de 165,38, 143,79, 128,32 y 109,08 µmol Trolox/g de hidrolizado proteico respectivamente, muy por el contrario los menores valores TEAC fueron mostrados por H7011 y H7013 con valores TEAC de 61,76 y 72,12 µmol Trolox/g de hidrolizado proteico en el orden que corresponde. En comparación con lo obtenido, resultados semejantes han sido hallados por Sai-Ut S. et al., 2014¹³⁴ quienes hidrolizaron la gelatina extraída de la piel de la especie *Unicorn leatherjacket* con dos enzimas, una de ellas siendo una proteasa de *B. amyloliquefaciens* y la segunda concerniente a la alcalasa, logrando obtener en los hidrolizados valores TEAC de 66 y 48 µmol Trolox/g de hidrolizado proteico, respectivamente, es importante señalar que en esta investigación se relaciona directamente el grado de hidrólisis con la actividad antioxidante, la cual es valorada a través del método ABTS•+; sin embargo, el proceso hidrolítico se llevó

a cabo condiciones fijas de pH, temperatura y relación enzima: sustrato, variando únicamente el tiempo de hidrólisis. En la investigación llevada a cabo por Karnjanapratum S. et al., 2017¹³⁵ demostraron la capacidad antioxidante, mediante el método del radical ATBS, tanto del hidrolizado de gelatina extraída de *Aluterus monoceros* como de dos fracciones peptídicas liberadas en la hidrólisis enzimática con glicil endopeptidasa parcialmente purificada, reportando valores los TEAC para el hidrolizado de 65,49 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de hidrolizado, para la primera fracción peptídica 82,46 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de péptido y para segunda fracción peptídica 9,31 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de péptido. Algunos de los valores referenciados son considerados bajos de acuerdo a lo descrito por autores, quienes señalan que hidrolizados tratados con la enzima proteolítica alcalasa logran mejores propiedades antioxidantes a través de la inhibición de radicales libres¹³⁶. De acuerdo a los resultados expuestos en la tabla 18 podemos evidenciar que las muestras que poseen mayor actividad antioxidante H7012, H508, H504 y H509, no corresponden necesariamente a las que poseen mayor %GH, sin embargo, por la presencia de las fracciones peptídicas liberadas pueden estas aumentar la potencia de dicha propiedad, siendo necesario la determinación de la secuencia peptídica, así como del tamaño molecular^{134,135}. Es importante indicar que en la figura 20 y la 21 (de interpretación inversa), así como 24 y 25, muestran el análisis e interpretación estadística sobre las condiciones hidrolíticas que afectan en la obtención de hidrolizados con propiedad biológica antioxidante, tanto para la evaluación mediante el método del radical DPPH•, como para el radical ABTS•+, dicho antecedente es corroborado por P. García Moreno et al., 2014¹⁰ donde indica que tanto el sustrato, método de hidrólisis enzimático y las condiciones de temperatura, pH, relación [E:S] y duración influyen en la ruptura proteica, por ende, en la obtención de péptidos con propiedad antioxidante, y que al contrastar con la gráficas de Pareto, efectos normales estandarizados y efectos principales resultantes, nos indica que los factores tiempo, temperatura, pH y relación [enzima/sustrato] influyen en la obtención de hidrolizados con actividad antioxidante; sin embargo, los factores antes mencionados por no tener interacción entre ellos, se realiza el análisis de las condiciones de tiempo, pH y relación [enzima/sustrato], hallando

de esta manera que los factores de pH y tiempo son estadísticamente significativos, por tanto, según los antecedentes encontrados, y en adición a lo hallado en nuestro trabajo, el hidrolizado de gelatina de piel de pescado se perfila con un potencial efecto antioxidante, sin embargo, aunque los resultados se aproximan a las referencias señaladas no se han hallado estudios con una matriz experimental semejante a la considerada en nuestro trabajo¹⁰.

Es de gran importancia indicar que pese a las frecuentes investigaciones no se ha establecido el mecanismo de acción exacto de los péptidos con actividad antioxidante, motivo por el cual se ha estudiado y reconocido que los péptidos derivados de la hidrólisis de gelatina de pescado están conformados por aminoácidos hidrofóbicos y, en el caso de nuestro estudio se demuestra la propiedad antioxidante por inhibición de radicales libres *in vitro*^{47,80,135}.

Si bien es cierto los estudios acerca de la propiedad antimicrobiana que presentan los péptidos como resultado de la hidrólisis enzimática de especies marinas son muy escasas, no obstante, en los últimos años ha aumentado considerablemente el interés de parte de los investigadores por demostrar tal actividad biológica, en relación con nuestro trabajo de investigación se determinó dicha bioactividad atribuida a los hidrolizados enzimáticos de la gelatina extraída de la piel del pescado “Bonito” con uso de la enzima alcalasa, es importante señalar que como producto de la reacción hidrolítica a diferentes condiciones se liberan péptidos y aminoácidos contenidos en cada uno de los hidrolizados, en ese sentido se evaluó mediante dos métodos, siendo el primero por difusión en agar, logrando los resultados descritos en la tabla 20, y el segundo por el método de microdilución/colorimétrico, encontrando los resultados detallados en la tabla 23. Del total de 15 muestras que corresponden a los hidrolizados obtenidos, no todos demostraron tener función bioactiva antimicrobiana, tal como se muestran en la tabla de resultados para la prueba de difusión en pozo, de este modo en H601, H602, H603, H504, H508, H509, H7010 y H7014 se evidenció actividad antimicrobiana baja a intermedia con halos menores iguales a 15,5 mm (considerando el diámetro del pozo), reportando sensibilidad solo las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* en algunos casos.

Consecuentemente, tales muestras que evidenciaron actividad por la prueba anterior fueron consideradas para el ensayo de microdilución/colorimétrico, hallando que gran parte de estas, muestran una concentración mínima inhibitoria mayor o igual a 500 µg/mL, lo cual corresponde a una actividad baja, o sin actividad en casos de CMI mayores a 1000 µg/mL; sin embargo, con la muestra H504 las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* mostraron sensibilidad a una CMI de 500 µg/mL¹²⁵. Si bien es cierto y conforme a los resultados, se evidencia bioactividad antimicrobiana en algunas de muestras hidrolizadas, a la vez, estas mismas muestras presentan variabilidad en cuanto a las dos pruebas que fueron sometidas respectivamente, esta alteración puede ser justificada inicialmente por las características propias de todos los componentes del hidrolizado (proteínas no hidrolizadas de diferentes tamaños, péptidos, aminoácidos, entre otros), entre ellas la solubilidad, peso molecular, polaridad, estructura y composición que influyen directamente tanto en la interacción con el microorganismo como en medio de crecimiento de los mismos, basándonos en lo anteriormente descrito, no se espera una correspondencia de resultados respecto al ensayo de microdilución colorimétrica^{7,138}.

En consideración con nuestros resultados hallados para el primer ensayo, estos fueron comparados con el estudio realizado por Gómez-Guillen et al., 2010⁶, en el cual según lo reportado, guarda relación en cuanto a la propiedad antimicrobiana que se le atribuye a los péptidos aislados del hidrolizado enzimático de la gelatina extraída de la piel de Atún, cabe señalar que en este estudio el ensayo de difusión en disco se realizó con 18 cepas diferentes en las que se muestran variada sensibilidad en cada microorganismo, siendo baja para *Staphylococcus aureus*, con un halo de inhibición menor a 2,5 mm; sin embargo, en dicho estudio también se reporta una baja actividad contra *P. aeruginosa* y *E. coli*, microorganismos que según nuestros resultados no son sensibles con las muestras de hidrolizado de gelatina extraída de las piel de Bonito, lo que sugiere una purificación de los péptidos obtenidos en nuestras muestras hidrolizadas para una mayor seguridad contra los microorganismos que no tuvieron resultados positivos. Asimismo, Vinoth L., 2013¹³⁷ demostró la propiedad antimicrobiana de

los hidrolizados enzimáticos de la proteína de la piel de la especie *Arothron stellatus* tratada con alcalasa, con el empleo del método de difusión en disco logró obtener halos de inhibición de 9 mm y 6 mm contra *Staphylococcus aureus* y *E. coli* respectivamente. En consideración con una investigación llevada a cabo por Song R. et al., 2012¹³⁸ optimizaron la actividad antimicrobiana de los hidrolizados obtenidos con seis enzimas diferentes del músculo de la especie *Setipinna taty*, de todas las enzimas, el hidrolizado de pepsina demostró mayor actividad antimicrobiana que los demás, que al igual que en nuestro estudio se analizó dicha propiedad biológica bajo dos ensayos, el primero de ellos por el método de difusión en pozo de agar, obteniendo halos de inhibición de 17,7, 11,3 y < 6 mm contra *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* respectivamente, añadiendo a los pozos 25 µL de hidrolizado a una concentración de 113,5 µg/mL, los resultados por aplicación de la segunda metodología de concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron de 28,38 µg/mL contra *E. coli* y > 113,50 µg/mL contra *Staphylococcus aureus*, pero no fue determinada para *Bacillus subtilis*, estos resultados demuestran una mayor actividad antimicrobiana en comparación con lo reportado en nuestro estudio, lo que sugiere una alta importancia en la selección de la enzima proteolítica a emplear así como del sustrato y sus respectivas condiciones de hidrólisis que son los factores diferenciales identificados, adicionalmente en este estudio se evidencia el posible mecanismo de acción de los péptidos contenidos en los hidrolizados enzimáticos, a través del daño en una macromolécula principal de la célula bacteriana como es la membrana celular, que mediante microscopía electrónica se observa la destrucción irreparable de dicha membrana. De igual forma, una publicación reciente llevada a cabo por Jemil I. et al., 2017¹⁴¹ hidrolizan el músculo de *Sardinella aurita* con el crudo enzimático de *Bacillus subtilis* A26, obteniendo de esta manera el respectivo hidrolizado que demuestra actividad antimicrobiana, para ello se empleó el método de difusión en pozo únicamente contra *E. coli*, obteniendo un diámetro de inhibición máximo de 17 mm, así mismo reportan la CMI contra *Staphylococcus aureus* y *E. coli* con 2,475 y 0,619 mg/mL, cabe destacar que en este estudio a diferencia del nuestro no emplean como sustrato de hidrólisis a la gelatina extraída de piel de pescado, ni

la enzima alcalasa, que reportan que su uso en reacciones hidrolíticas favorece la obtención de péptidos con alta actividad biológica¹³⁶. Por último Sila A. et al., 2013¹³⁹ refiere que los hidrolizados de la proteína muscular de la especie *B. callensis*, con %GH de 5,1, 6,6, 10,45 y 14,53% tratados con la enzima alcalasa, poseen la propiedad biológica antimicrobiana contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, demostrada mediante el método de difusión en agar, en el que se añadió 20 µL a una concentración de 1mg/mL, logrando de esta manera halos de inhibición de < 5 mm, hasta > de 15 mm; sin embargo, una de las fracciones peptídicas purificadas del hidrolizado con GH de 10,45% mostró zonas de inhibición mayores a 15 mm para los microorganismo *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, y otras medidas para *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Micrococcus luteus*, entre otros, lo que evidencia que con la purificación de péptidos de acuerdo a su tamaño, que están contenidos en los hidrolizados, se logra mayor actividad contra los microorganismos estudiados, entre ellos, patógenos para la población humana. De acuerdo con los trabajos de investigación citados, guardan cierta relación en cuanto a los resultados hallados, lo que condice que los hidrolizados de la gelatina extraída de la piel del pescado Bonito, probablemente contienen péptidos con actividad antimicrobiana, no obstante, aunque los resultados reportados se aproximen a los estudios señalados, no se han encontrado alguno con una matriz de experimentación cercana a lo considerado en esta investigación. De los resultados expuestos anteriormente se aduce que los hidrolizados que presentan actividad antimicrobiana corresponden a aquellas muestras que lograron un alto grado de hidrólisis, hallando una correlación directa entre el %GH con la bioactividad antimicrobiana, además en concordancia con los resultados del análisis factorial que indica que el factor de hidrólisis de pH tiene una influencia estadísticamente significativa para la obtención de hidrolizados con actividad antimicrobiana, sin embargo, los demás factores también influyen en la generación de los mismos. Asimismo, es notable resaltar que en los trabajos previos no se ha establecido de manera precisa sobre el mecanismo de acción de los péptidos, liberados por hidrólisis de la proteína nativa, con la propiedad biológica en discusión, empero, algunos autores señalan con limitadas

evidencias que los péptidos con actividad antimicrobiana, son de bajo peso molecular, de tal manera que la composición por aminoácidos, carga y su tamaño determina la propiedad del mismo, logrando interacción entre estos péptidos y algunos componentes de la membrana celular ^{7, 138}.

VII. CONCLUSIONES

- Se extrajo la gelatina a partir de los residuos correspondientes a las pieles de la especie *Sarda chiliensis chiliensis* “Bonito” con un rendimiento de 15.86%.
- Las condiciones de hidrólisis de temperatura, pH, tiempo y relación [enzima/sustrato], influyen en el %GH de gelatina con la enzima alcalasa, logrando 33.21 – 11.24% y 33.33 – 10.05%, analizados mediante el método de Biuret y Micro-Kjeldahl respectivamente.
- Los hidrolizados de la gelatina de piel de pescado tratados con alcalasa presentan actividad antioxidante analizados por los métodos del radical DPPH•, donde la muestra H7012 posee el menor IC50 458.73 µg/mL, y el mayor IC50 1830.46 µg/mL corresponde a la muestra H7011, y del radical ABTS•+, al lograr el mayor y menor TEAC de 165.38 – 61.76 µmol Trolox/g hidrolizado proteico, para las muestras H7012 y H7011 respectivamente.
- Los hidrolizados de gelatina de piel de pescado H601, H602, H603, H504, H508, H509, H7010 y H7014 poseen actividad antimicrobiana al presentar halos de inhibición de crecimiento (< 15.5mm) contra *Staphylococcus aureus*, y *Bacillus subtilis* (excepto H508 y H7010). Así mismo, poseen una CMI del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* mayores o iguales de 500 µg/mL, por lo cual presentan una baja actividad antimicrobiana.

VIII. RECOMENDACIONES

- Rigurosa limpieza, lavado y tratamiento con NaOH para eliminación de la grasa y proteína diferente a la gelatina presente en las pieles recolectadas.
- Optimizar las condiciones del proceso de extracción de la gelatina de la piel de pescado, en referencia al tiempo, temperatura y lavados sucesivos, para lograr un mayor rendimiento.
- Optimizar las condiciones hidrolíticas para la enzima alcalasa, respecto a la temperatura, tiempo, pH y relación [enzima/sustrato].
- Separar y establecer la composición aminoacídica de las fracciones peptídicas presentes en los hidrolizados enzimáticos de gelatina de pescado.
- Separar e identificar las fracciones peptídicas presentes en los hidrolizados, responsables de la actividad antimicrobiana.
- Separar e identificar las fracciones peptídicas presentes en los hidrolizados, responsables de la actividad antioxidante.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bucio López S. Valorización de subproductos de la industria pesquera: obtención de derivados lipídicos ricos en ácidos grasos poliinsaturados y de concentrados de harina de pescado con bajo contenido en grasa [tesis doctoral]. Burgos: Universidad de Burgos, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos; 2015.
2. Miano A., Rojas C. y Barraza G. 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*). Revista Scientia Agropecuaria. 2014: 140-47.
3. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal. Memorias de un taller regional organizado por el Instituto de Investigaciones Porcinas (IIP) y la FAO. Italia. [Internet]. 2018. Recuperado de: <http://www.fao.org/3/w4132s/w4132s.pdf>.
4. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma: FAO; 2012.
5. Mosquera Jordán M. Nanoencapsulación de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas procedentes de subproductos de la pesca. [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria; 2014.
6. Gómez-Guillén C., López-Caballero M., Alemán A., López de Lacey A., Giménez B. y Montero P. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. Revista Sea by-products as a raw material: New ways of application. 2010; 89-115.
7. Kim S. and Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. Revista Journal of Functional Foods. 2010; 2:1-9.

8. Ryan J., Ross R., Bolton D., Fitzgerald G. and Stanton C. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Revista Nutrients*. 2011; 3:765-91.
9. Muyonga J. H., Cole C. G. B. y Duodu K. G. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. Uganda. [Internet]. 2018. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X03001528>.
10. García Moreno, P. J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N. M., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A., & Guadix, E. M. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Research International*. 2014; 65 (Part C), 469-476.
11. Mendis E., Rajapaske N. and Kim S. Antioxidant Properties of a Radical-Scavenging Peptide Purified from Enzymatically Prepared Fish Skin Gelatin Hydrolysate. Corea del Sur. [Internet]. 2018. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15686405>.
12. Wu, H., Chen H. & Shiau C. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolyzates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Taiwan. [Internet]. 2018. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996903001042>.
13. Fan J., He J., Zhuang Y. and Sun L. Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Frame Protein Molecules 2012; 17, 12836-12850.
14. Ji Q., Je J. and Kim S. Antihypertensive Effect of Angiotensin I Converting Enzyme-Inhibitory Peptide from Hydrolysates of Bigeye Tuna Dark Muscle, *Thunnus obesus*. Korea. [Internet]. 2018. Recuperado de: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/720721>.
15. Choonpicharn S., Jaturasitha S., Rakariyatham N., Suree N. and Niamsup H. Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin. *J. Food Sci Technol*. 2015; 52(5):3134–3139.

16. Alemán A., Giménez B., Montero P. y Gómez-Guillén M.C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology* 44. 2011; 407-413.
17. Yurkievich, G. y Sánchez C. Estructura territorial de la actividad pesquera en Guaymas, Sonora”, *Investigaciones Geográficas*, núm. 91, Instituto de Geografía, UNAM, México.2016; pp. 152-167.
18. Ministerio de la Producción. (s.f.). Diagnóstico del sector pesquero y acuícola frente al cambio climático y lineamientos de adaptación. Perú. [Internet]. 2018. Recuperado de: <http://www.produce.gob.pe/documentos/pesca/dgsp/publicaciones/diagostico-pesquero/Tomo-1.pdf>
19. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 2016; 224 pp.
20. Kelleher K., Descartes en la pesca de captura marina mundial. Una actualización. División de Productos e Industrias de la Pesca de la FAO. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO); 2008.
21. Ministerio de la Producción. (s.f.). Diagnóstico del sector pesquero y acuícola frente al cambio climático. Diagnóstico Actual del Sector Pesca y Acuicultura. Perú. [Internet]. 2018. Recuperado de: <http://www.produce.gob.pe/documentos/pesca/dgsp/publicaciones/diagostico-pesquero/Tomo-3.pdf>
22. Solano M. y Vidaurre J. Aplicación de modelos cinéticos no estructurados en el modelamiento de la fermentación láctica de subproductos de pesca. *Rev. Scientia Agropecuaria*. 2017; 8(4) 367 – 375.
23. Vela L., Álvarez G., Cossio J., Helguero B., Martínez M. y Santacruz R. Diagnóstico estratégico del sector pesquero peruano. 2014; pp. 58
24. Samamé M. Edad y crecimiento del bonito *Sarda Chiliensis Chiliensis*

- (Cuvier). Bol. Instituto del Mar del Perú. 1997; 16 (1):1-19.
25. Oceana. Cómo evolucionó el abastecimiento del bonito en las últimas décadas. Perú. [Internet]. 2018 Recuperado de: <http://peru.oceana.org/es/blog/como-evoluciono-el-abastecimiento-del-bonito-en-las-ultimas-decadas>.
 26. Dávalos L. Desarrollo de nuggets de bonito (*Sarda chiliensis chiliensis*) bajos en calorías y con la adición de chía (*Salvia hispánica*) como antioxidante (tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Pesquero). Arequipa: Universidad Nacional De San Agustín. Facultad De Ciencias Biológicas; 2016.
 27. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Guía para el aprovechamiento de los subproductos de pescado. España. Madrid, 2012.
 28. Shoulders M. and Raines R. Collagen Structure and Stability. Annu. Rev. Biochem. California Institute of Technology. 2009.78:929-958. Estados Unidos. [Internet]. 2018. Recuperado de: arjournals.annualreviews.org by.
 29. Pedraza C. y Martínez J. Respuesta fisiológica del tejido conjuntivo de músculos y tendones tras la aplicación de los agentes físicos. Fisioterapia 2008;30(6):279–285.
 30. Brinckmann J., Notbohm H. and Müller P. Collagen: Primer in structure, processing and assembly. (ed. rev.) The Netherlands. Springer, Top Curr Chem. 2005; 247:1-6.
 31. Yang H., Wang Y., Jiang M., Oh J., Herring J. and Zhou P. 2-Step Optimization of the Extraction and Subsequent Physical Properties of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Skin Gelatin. Journal of food science. 2007; Vol. 72, Nr. 4.
 32. De Souza R., Fernandes S., Petry F. e De Almeida L. Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum. Ciência Rural, Santa Maria. 2011; v.41, n.5, p.904-909, mai.

33. Koli J., Basu S., Venkateswarlu G., Choukasy M. and Nayak B. Optimization of fish gelatin extraction from skins and bones: A comparative study. *Ecology, Environment and Conservation* 19 (1): 2013; pp. (47-56).
34. Zakaria S. and Abu N. Extraction and Characterization of Gelatin from Black Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Scales and Bones. *Int'l Conf. on Advances in Science, Engg., Technology & Natural Resources (ICASETNR-15)*. 2015; 77-80.
35. Thi C., Thi N. and Razumovskaya R. Physicochemical Characterization of Gelatin Extracted from European Perch (*Perca fluviatilis*) and Volga Pikeperch (*Sander volgensis*) Skins Turkish. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2017; 17:1117-1125.
36. Solari A. y Córdova J. Extracción de colágeno proveniente de residuos del procesamiento de *Engraulis ringens* "Anchoveta". *Ciencia e Investigación* 2015; 18(2): 65-68.
37. Larson R and Weber E. Reaction mechanisms in environmental organic chemistry. Estados Unidos. [Internet]. 2018. Recuperado de: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781351419727>
38. Suthersan S. and Payne F. *In situ remediation engineering*. (ed. rev.) Boca Raton, Florida. Taylor and Francis group. 2005; 446:19-24).
39. Salazar C., López A. y Cano J. Efecto del pH y la temperatura en la hidrólisis enzimática de subproductos de la industria bovina. *Revista Lasallista de Investigación - Vol. 9 No. 2 - 2012 - 26-32*.
40. Szekely G. and Didaskalou C. Biomimics of Metalloenzymes via Imprinting. *Molecularly Imprinted Catalysts. Principles, Syntheses, and Applications - 2016: 121-158*.
41. Guadix A., Guadix E., Páez Dueñas M., González-Tello P. y Camacho F. *Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas*. España. [Internet]. 2018. Recuperado de:

<https://www.researchgate.net/publication/236217209>
_Procesos_Tecnologicos_y_metodos_de_control_en_la_hidrolisis_de_pr
oteinas.

42. Shivang Patel. Biotechnology. Mechanism of enzyme action. [Internet]. 2018. Recuperado de: <http://amazingbiotech.blogspot.com/2013/11/mechanism-of-enzyme-action.html>.
43. Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. España. [Internet]. 2018. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/248485474_Enzymatic_protein_hydrolysates_in_human_nutrition.
44. Gaviria E., Benítez R., Lenis L. y Hoyos J. Optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas presentes en semillas de Guandul (*Cajanus cajan*). Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2015; Vol 13 No. 2 (114-122).
45. Benítez R., Ibarz A. y Pagan J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Acta Bioquím Clín Latinoam. 2008; 42 (2): 227-36.
46. Ochoa K. Hidrólisis enzimática en una y dos etapas de la proteína de la Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) para obtener péptidos bioactivos. (tesis de Maestría). Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 2017.
47. Gómez-Guillén M., Giménez B., López-Caballero M. y Montero A. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN, CSIC). 2008; 10. 28040.
48. Figueres T. y Basés E. Revisión de los efectos beneficiosos de la ingesta de colágeno hidrolizado sobre la salud osteoarticular y el envejecimiento dérmico. Nutrición Hospitalaria. 2015; 32 [Supl. 1]: 62-66.

49. Weng W., Tang L., Wang B., Chen J., Su W., Osako K. and Tanaka M. Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 2014; 11:342 – 351.
50. Hleap J.y Gutiérrez C. Hidrolizados de pescado – producción, beneficios y nuevos avances en la industria. *Acta Agronómica*. 66 (3) 2017, p 311-322.
51. Blanco M., Vázquez J., Pérez R. and Sotelo C. Hydrolysates of Fish Skin Collagen: An Opportunity for Valorizing Fish Industry Byproducts. *Marine Drugs* 2017, 15, 131.
52. Greyling N. Optimization of enzymatic hydrolysis of monkfish heads for preparing protein hydrolysates as animal feed ingredient. (Tesis de maestría). Stellenbosch University, Faculty of Engineering. 2017.
53. Silvestre M., Morais H., Silva V. and Silva M. Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP*. 2013. V. 38, n. 3, p. 278-290.
54. Franco L. Enzimas: qué son y para que sirven. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*, 2007; 101.
55. Baynes J. and Dominiczak M. *Bioquímica médica*. (3a Ed.). Barcelona, España. (Elsevier España S.L., 2011, p.59).
56. Robinson P. *Enzymes: principles and biotechnological applications*. *Essays Biochem*. 2015; 59, 1–41.
57. Singh R., Kumar M., Mittal A. and Mehta P. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *Biotech*. 2016; 6:174.
58. Koolman J. and Röhm K. *Bioquímica texto y atlas*. (3a Ed.). Madrid, España. (Editorial Médica Panamericana. 2004; p. 183).
59. Brix K. and Stöcker W. *Proteases: Structure and Fuction*. (1a Ed.). Viena,

Austria. (Springer-Verlag Wien, 2013).

60. García B., Vicedo A., García J. y Saldaña A. Enzimas proteolíticas relacionadas con la enfermedad periodontal inflamatoria. *Rev. Cubana Estomat.* 1998;35(2):62-67.
61. Mótýán J., Tóth F. and Tózsér J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules* 2013; 3, 923-942.
62. Mahajan R. and Badgujar S. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research* 2010; 3(9), 2048-2068.
63. G. de la Fuente. Alcalasa: vestida para la ocasión. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. *BioTecnología.* Vol. 9, No. 2, 17-21.
64. Salwanee S., Wan Aida W., Mamot S., Maskat M. and Ibrahim S. Effects of Enzyme Concentration, Temperature, pH and Time on the Degree of Hydrolysis of Protein Extract from Viscera of Tuna (*Euthynnus affinis*) by Using Alcalase. *Sains Malaysiana.* 2013; 42(3): 279–287.
65. Yang A., Long C., Xi J., Tong P., Cheng Y., Wang Y. and Chen H. Enzymatic characterisation of the immobilised Alcalase to hydrolyse egg white protein for potential allergenicity reduction. *J Sci Food Agric.* 2016.
66. Marquez M. and Fernandez V. Enzymic Hydrolysis of Vegetable Proteins: Mechanism and Kinetics. *Process Biochemistry.* 1993; 28: 481-490.
67. Nasri M. Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. *Advances in Food and Nutrition Research.* 2016; 1-51.
68. Villadóniga C., Vairo S., Morcelle del Valle S., Errasti E., Bruno M., Barros M. y Cantera A. Productos bioactivos obtenidos por proteólisis (nutracéuticos y alimentos funcionales). *Aplicaciones industriales.* 2009; 273-297.

69. Vioque J., Clemente A., Pedroche J., Yust M. y Millán F. Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*. 2001; Vol. 52. Fasc. 2, 132-136
70. Bkhairia I., Slama R., Nasri R., Jridi M., Ghorbel S. and Nasri M. *In-vitro* antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from golden grey mullet prepared by commercial, microbial and visceral proteases. 2016; 1-11.
71. Demers-Mathieu V., Gauthier S., Britten M., Fliss I., Robitaille G. and Jean J. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *International Dairy Journal*. 2013; 28:94-101.
72. Mirzaei M., Mirdamadi S., Reza M. and Aminlari M. Antioxidant, ACE-Inhibitory and antibacterial activities of *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates and their peptide fractions. *Functional Foods in Health and Disease*. 2016; 6(7): 425-439.
73. Hsieh C., Wang T., Hung C., Chen M. and Hsu K. Improvement of glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats by Atlantic salmon skin gelatin hydrolysate as the dipeptidyl-peptidase IV inhibitor. *Food Funct.*, 2015, 6, 1887–1892.
74. Yang W., Wang Z. and Xu S. A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters* 18. 2007; 449–451.
75. Xue Z., Gao J., Zhang Z., Yu W., Wang H. and Kou X. Antihyperlipidemic and Antitumor Effects of Chickpea Albumin Hydrolysate. *Plant Foods Hum Nutr*. 2012; 67:393–400.
76. San-Miguel A. y Martin-Gil F. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gac Med Bilbao*. 2009; 106: 106-113.

77. Paredes F. y Roca J. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offarm.* 2002; Vol. 21 núm. 7.
78. Moharram H. and Youssef M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* 2002; Vol. 11, No. 1, pp. 31-42.
79. Carocho M. y Ferreira I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51. 2013 15–25.
80. Kim S., Kim Y., Byun H., Nam K., Joo D. and Shahidi F. Isolation and Characterization of Antioxidative Peptides from Gelatin Hydrolysate of Alaska Pollack Skin. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49, 1984-1989.
81. Graszkiwicz A., Żelazko M. and Trziszka T. Application of pancreatic enzymes in hydrolysis of egg-white proteins. *J. Food Nutr. Sci.* 2010; Vol. 60, No. 1, pp. 57-61.
82. Peng X., Xiong Y. and Kong B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry* 113 (2009) 196–201.
83. Chen H., Muramoto K., Muramoto F., Fujimoto K. and Nokihara K. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46, 49-53.
84. Jiménez X., Urisa C., Tellez A., Mercado Y., Abreu A. and Arana A. Hydrolysate antimicrobial activity released from bovine whey protein concentrate by the aspartyl protease Eap1 of *Sporisorium reilianum*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 2017; Vol. 16, No. 1: 11-18.
85. Salampessy J., Phillips M., Seneweera S. and Kailasapathy K. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket

- (*Meuschenia sp.*) insoluble proteins. Food Chemistry. 2010; 120: 556–560.
86. Jovanović J., Stefanović A., Grbavčić S., Šekuljica N., Elmalimadi M., Bugarski B. and Knežević-Jugović Z. Peptides with improved antimicrobial activity screened by membrane ultrafiltration from egg white protein hydrolysates. 42nd International Conference of SSCHE. May 25–29, 2015, Tatranské Matliare, Slovakia.
 87. Beaulieu L., Thibodeau J., Bonnet C., Bryl P. and Carbonneau, M. Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. Pharma Nutrition. 2013; 1:14-157.
 88. Ennaas N., Hammami R., Beaulieu L. and Fliss I. Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) by-products. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2015; 1-6.
 89. Mulero J., Zafrilla P., Martínez-Cachá A., Leal M. and Abellán J. Péptidos bioactivos. Clin. Invest. Arterioscl. 2011;23(5):219-227.
 90. Sedaghati M., Ezzatpanah H., Mashhadi M., Tajabadi M., Aminafshar M. and Dameshghian M. β -lactoglobulin and α -lactalbumin Hydrolysates as Sources of Antibacterial Peptides. J. Agr. Sci. Tech. 2014. Vol. 16: 1587-1600.
 91. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Biochimica et Biophysica. 1999; 1-10.
 92. Wang Z. and Zhang X. Characterization and antitumor activity of protein hydrolysates from *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) using two-step hydrolysis. J Appl Phycol. 2016.
 93. Kongo J., Nsor J. and Zhang H. Hypocholesterolemic activity and characterization of protein hydrolysates from defatted corn protein. Asian

Journal of Biochemistry 6. 2011; (6): 439 - 449.

94. Kumrungsee T., Akiyama S., Guo J., Tanaka M. and Matsui T. Identification of peptides in wheat germ hydrolysate that demonstrate calmodulin-dependent protein kinase II inhibitory activity Food Chemistry 213. 2016; 329–335.
95. Vioque J. y Millán F. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. CTC Alimentación 26. 2006; 103-107.
96. Gómez-Guillén M.C. y Montero García M.P., inventores; Procedimiento de fabricación de gelatina de origen marino y producto así obtenido. 2001. España 2 155 395 B1.
97. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72:248–254.
98. García H. y Vázquez R. Cuantificación de proteínas: una revisión. Instituto de Biotecnología UNAM. BioTecnología. 1998; (3): 77 - 88.
99. Betty M., Awuor O., Kirwa M. and Francis M. Antioxidative and Functional Properties of *Rastrineobola argentea* (Dagaa) Fish Protein Hydrolysate. Discourse Journal of Agriculture and Food Sciences. 2014; Vol. 2(6): 180-189, June.
100. Wangtueai S., Siebenhandl-Ehn S. and Haltrich D. Optimization of the Preparation of Gelatin Hydrolysates with Antioxidative Activity from Lizardfish (*Saurida spp.*) Scales Gelatin. Chiang Mai J. Sci. 2016; 43(1): 68-79.
101. Kim S., Park P. and Rhee K. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. Revista Journal Agricultural and Food Chemistry. American Chemical Society. 1990;38(3):651–56.
102. Hoyle N. and Merritt J. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science-77. 1994; Vol. 59, No. 1,

103. Qi M., Hettiarachchy N. and Kalapathy U. Solubility and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolates Modified by Pancreatin. *Journal of Food Science*—1111. 1997; Vol. 62, No. 6.
104. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*, 13th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, 1980.
105. Ortega E., Jurado B., Ramos E., Zamudio M. y Aparicio E. Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante del aceite de *Euterpe Precatoria* Mart. Obtenido por diferentes métodos de extracción. *Revista Sociedad Química del Perú*. 2015; 81(1).
106. Brand-Williams W., Cuvelier M. E. and Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm. -Wiss. U.-Technol.* 1995; 28.25-30.
107. Pyrzyńska K. and Pękal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Anal. Methods*, 2013, 5, 4288–4295.
108. Rodríguez O., Andrade W. y Díaz F. Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (*Papaveraceae*). *Revista de Tecnología*. 2015. Vol. 14, Número 2, Págs. 21-36.
109. Chandra T. and Anju G. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine*. 2014; Vol. 1, No. 4, 244-249.
110. Son S. and Lewis B. Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 468-472.
111. Xie J. and Schaich K. M. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 4251–4260.

112. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999; Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237.
113. Fogliano V., Verde V., Randazzo G., and Ritieni A. Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47, 1035-1040.
114. Arts M., Dallinga J., Hans-Peter Voss, Haenen G. and Bast A. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry* 80. 2003; 409–414.
115. Shalaby E. and Shanab S. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013; Vol. 7(10), pp. 528-539.
116. Mârghitaş L., Stanciu O., Dezmirean D., Bobiş O., Popescu O., Bogdanov S. and Graca M. *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry* 115. 2009; 878–883.
117. Márquez C., Otero C., Rojano B. y Osorio J. Actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* s.) en poscosecha. *Temas agrarios*. 2014; Vol. 19:(2), 173 - 184.
118. Hufford C., Funderburk M., Morgan J. and Robertson L. Two Antimicrobial Alkaloids from Heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1975; Vol. 64, No. 5.
119. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Lima; 2007. 101p.
120. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Lima; 2005. 109 p.

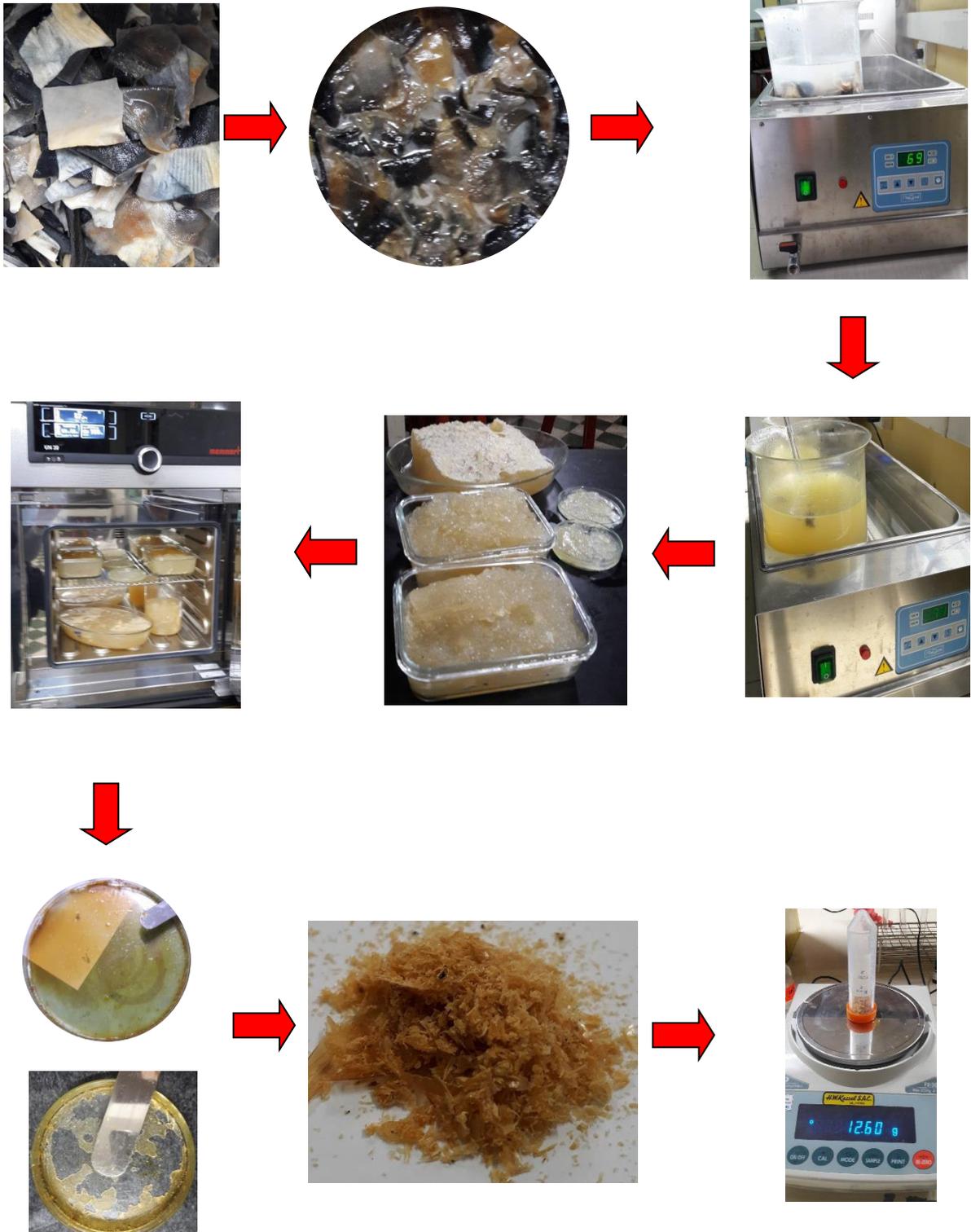
121. Charri K. y Huamán. Actividad del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “Canela” frente a biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* inducidas *in vitro* sobre lentes de contacto blandos. (tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2017.
122. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition. Vol. 32, CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012; 88 p.
123. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008;3(2):163–75.
124. Liu M., Seidel V., Katerere D. and Gray A. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods.* 2007;42 (4):325–329.
125. Holetz F., Pessini G., Sanches N., Garcia D., Nakamura C. and Dias B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. 2002;97(7):1027–31.
126. Mohtar N., Perera C. and Queck S. Optimisation of gelatine extraction from hoki (*Macruronus novaezelandiae*) skins and measurement of gel strength and SDS–PAGE. *Food Chemistry* 122. 2010; 307–313.
127. Cheow C., Norizah M., Kyaw Z., Howell N. Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *Food Chemistry* 101. 2007; 386–391
128. Costa da Silva E., Henriques L. and Pena R. Optimization and characterization of gelatin from kumakuma (*Brachyplatystoma filamentosum*) skin. *CyTA – Journal of food.* 2017.

129. Sbroggio M., Montilha M., Figueiredo V., Georgetti S. and Kurozawa L. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Sci. Technol, Campinas*. 2016. 36(2): 375-381.
130. Alemán A., Giménez B., Gómez Guillén M. and Montero P. Enzymatic hydrolysis of fish gelatin under high pressure treatment. *International Journal of Food Science and Technology* 2011; 46, 1129–1136.
131. Gbogouri G., Linder M., Fanni J. and Parmentier M. Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. *Journal of Food Science*. 2004; Vol. 69, Nr. 8.
132. Wang B., Wang Y., Chi C., Luo H., Deng S. and Ma J. Isolation and Characterization of Collagen and Antioxidant Collagen Peptides from Scales of Croceine Croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Mar. Drugs*. 2013, 11, 4641-4661.
133. Nakchum L. and Kim S. Preparation of Squid Skin Collagen Hydrolysate as an Antihyaluronidase, Antityrosinase, and Antioxidant. Memorial University of Newfoundland. 2015.
134. Sai-Ut S., Benjakul S., Sumpavapol P. and Kishimura H. Antioxidant activity of gelatin hydrolysate produced from fish skin gelatin using extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* H11. *J. of Food Processing and Preservation*. 2014.
135. Karnjanapratum S., O'Callaghan Y., Benjakul S., O'Keeffe M., Fitzgerald R. and O'Brien N. Purification and identification of antioxidant peptides from gelatin hydrolysates of Unicorn Leatherjacket skin. *Ital. J. Food Sci*. 2017; vol 29, 158.
136. Intarasirisawat R., Benjakul S., Visessanguan W. and Wu J. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chemistry* 135. 2012; 3039–3048

137. Vinoth L. Antimicrobial activity of biopeptides extracted from fish protein hydrolysate. (Tesis de Maestría). Tamilnadu Veterinary and Animal Science University, India, 2013.
138. Song R., Wei R., Zhang B. and Wang D. Optimization of the Antibacterial Activity of Half-Fin Anchovy (*Setipinna taty*) Hydrolysates. Food Bioprocess Technol. 2012; 5:1979–1989.
139. Sila A., Nedjar-Arroume N., Hedhili K., Chataigné G., Balti R., Nasri M., Dhulster P. and Bougatef A. Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. Food Science and Technology. 2013;1-6.
140. Rojas R., Bustamante B., Bauer J., Fernández I., Albán J. and Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. J. of Ethnopharm. 88. 2003; 199–204.
141. Jemil I., Abdelhedi O., Nasri R., Mora L., Jridi M., Aristoy M., Toldrá F. and Nasri M. Novel bioactive peptides from enzymatic hydrolysate of Sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle proteins hydrolysed by *Bacillus subtilis* A26 proteases. Food Research International. 2017.

X. ANEXOS

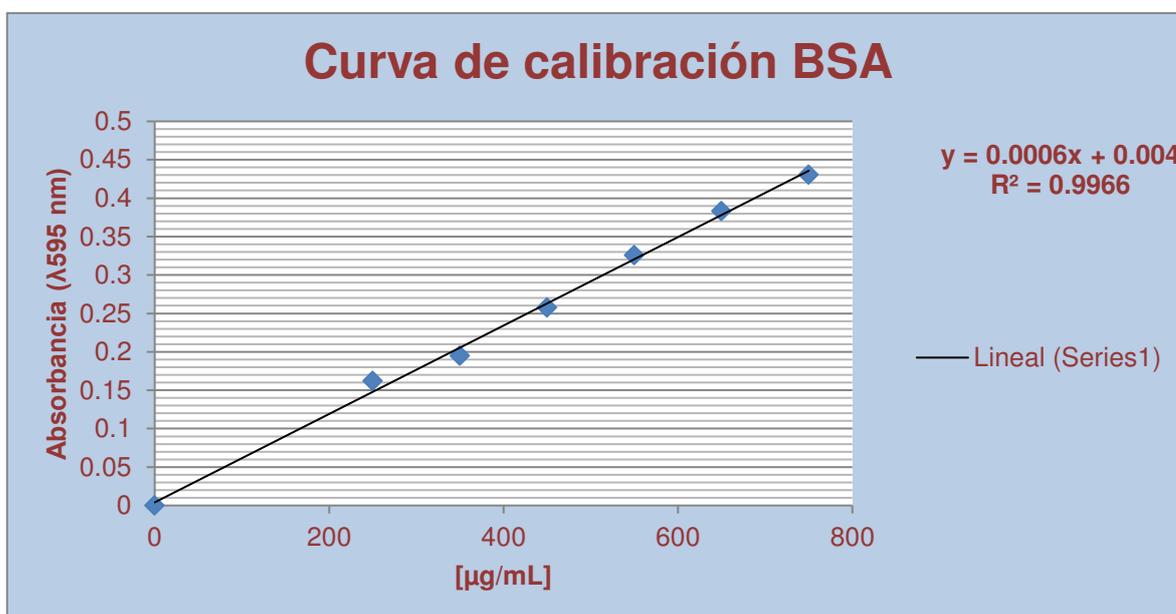
Anexo 1. Proceso de obtención de gelatina de piel de pescado



Anexo 2. Curva de calibración con el estándar de la proteína albúmina sérica bovina (BSA), para la cuantificación de proteína total mediante el método de Bradford

[$\mu\text{g/mL}$]	Abs. ($\lambda 595 \text{ nm}$)
0	0
250	0.16221
350	0.19504
450	0.25788
550	0.32579
650	0.38317
750	0.43053

Diluciones y absorbancias correspondientes del estándar BSA para la elaboración de la curva de calibración.

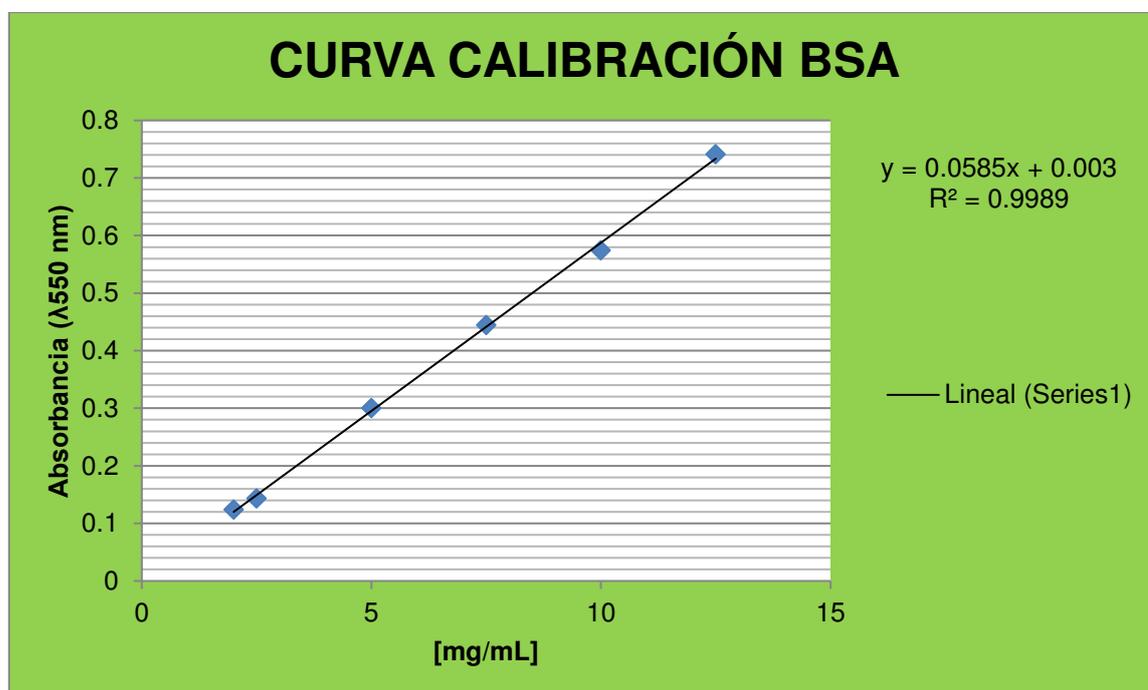


Curva de calibración con el estándar de proteína de albúmina sérica bovina (BSA).

Anexo 3. Curva de calibración con el estándar de la proteína albúmina sérica bovina (BSA), para la cuantificación de proteína total mediante el método de Biuret

[mg/mL]	Abs. (λ 550 nm)
2	0.1238
2.5	0.14326
5	0.30008
7.5	0.44455
10	0.57419
12.5	0.74112

Diluciones y absorbancias correspondientes del estándar BSA para la elaboración de la curva de calibración.



Curva de calibración con el estándar de proteína de albúmina sérica bovina (BSA).

Anexo 4. Evaluación del grado de hidrólisis mediante el método de micro-Kjeldahl.



DIGESTIÓN

- Tomar en un matraz micro-Kjeldhal el volumen equivalente a 25 mg de muestra seca.
- Agregar los reactivos necesarios como K_2SO_4 , HgO y H_2SO_4 (peso específico 1.84, libre de nitrógeno).
- Digerir a temperatura de ebullición por 1.5 horas.



DESTILACIÓN

- Trasvasar a un balón la solución obtenida de la etapa anterior.
- Agregar 8 -10 mL de la solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio, y someter a caletamiento.
- Recepcionar 15 mL del destilado en un matraz que contiene 5 mL de Sol. Sat. de H_3BO_3 y II-IV gotas del indicador.

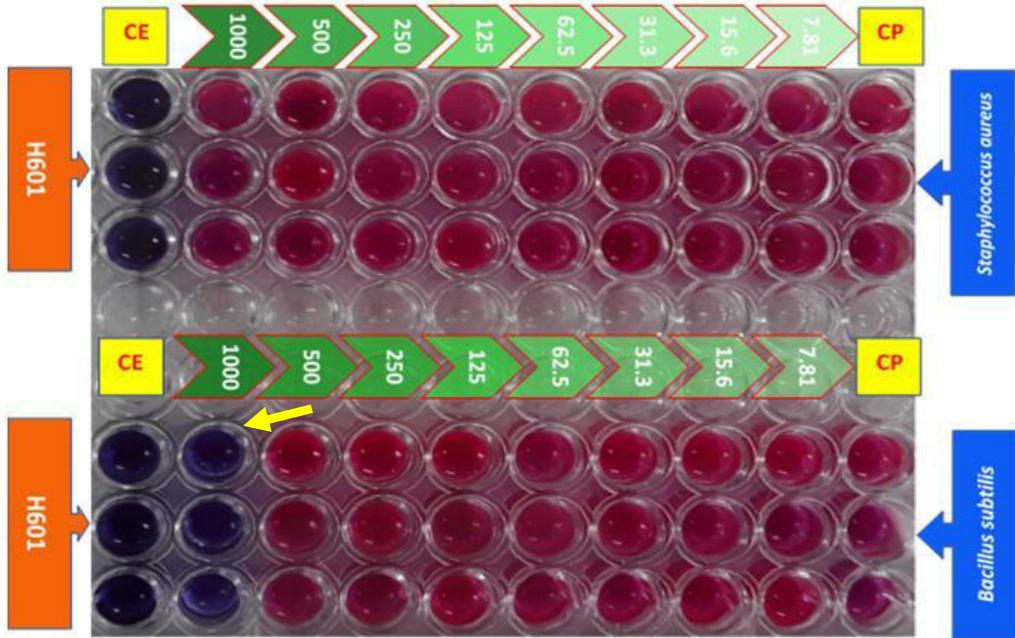


TITULACIÓN

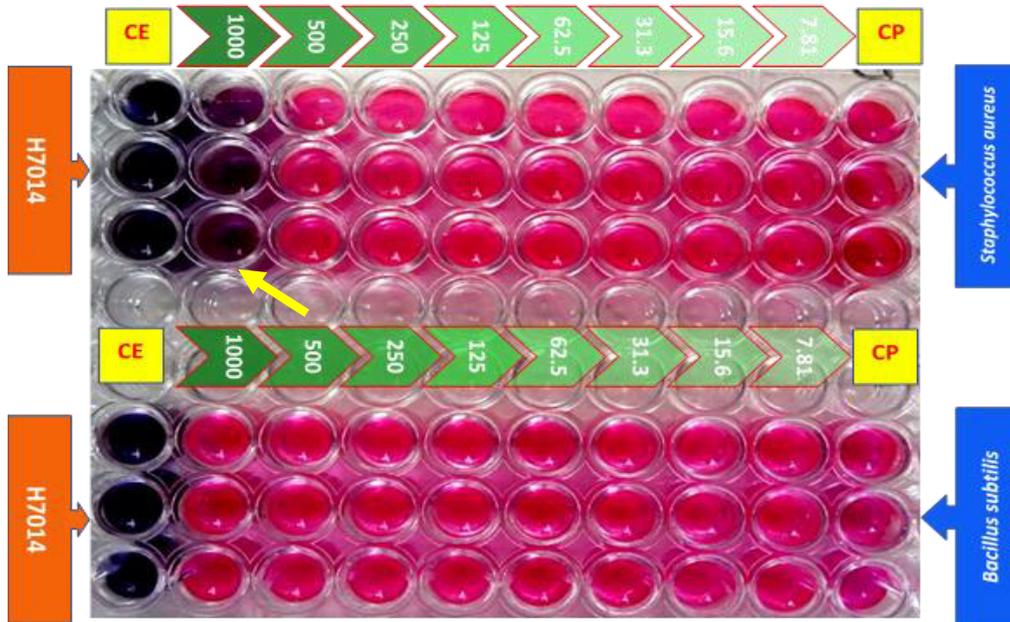
- Homogenizar la solución obtenida de 15 mL destilado.
- Titular la solución con HCl 0.01N estandarizado.
- Registrar el volumen del gasto de HCl 0.01N en la titulación hasta el viraje de color del indicador.
- Titular un blanco, y realizar los cálculos correspondientes

Diagrama de flujo de la metodología de micro-Kjeldahl empleada para la cuantificación del nitrógeno en las muestras

Anexo 5. Coloración de las microplacas para evaluación de la actividad antimicrobiana de los hidrolizados enzimáticos

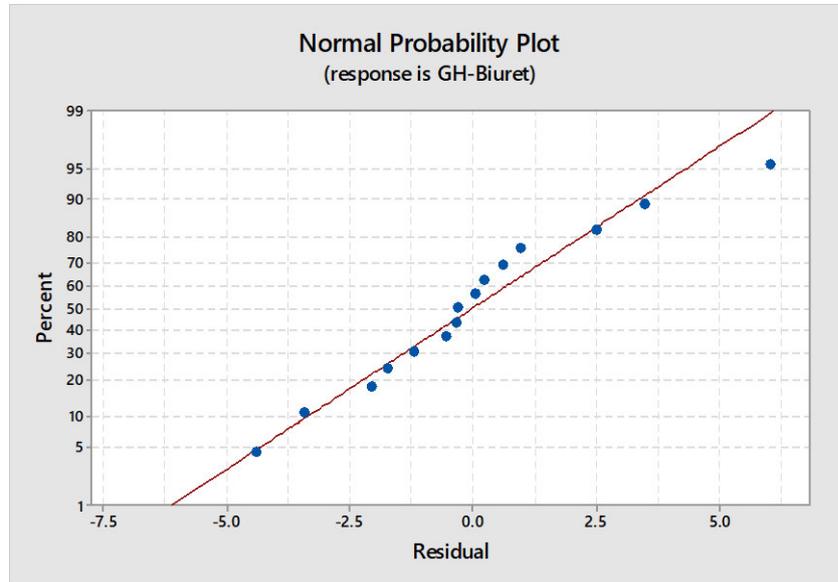


Resultado en microplaca para el hidrolizado enzimático H601.
 Leyenda: CE: Control de Esterilidad, CP: Control Positivo



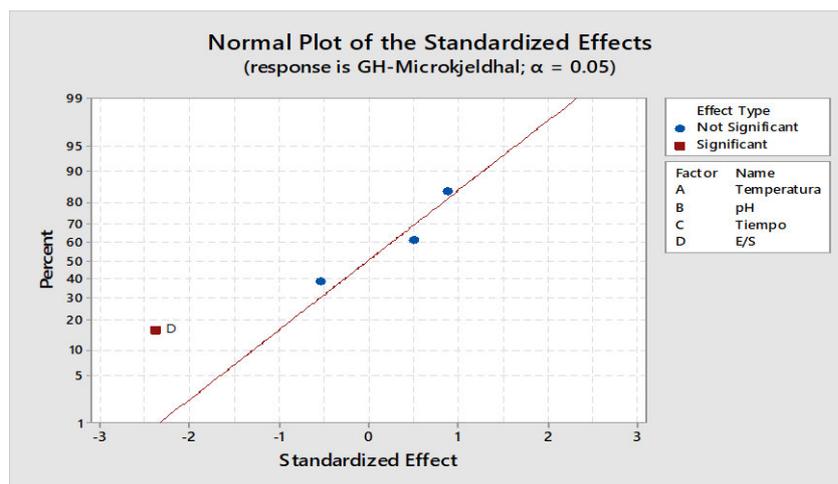
Resultado en microplaca para el hidrolizado enzimático H7014.
 Leyenda: CE: Control de Esterilidad, CP: Control Positivo

Anexo 6. Gráfica de análisis estadístico de la determinación del grado de hidrólisis por cuantificación de proteína soluble mediante el método de Biuret



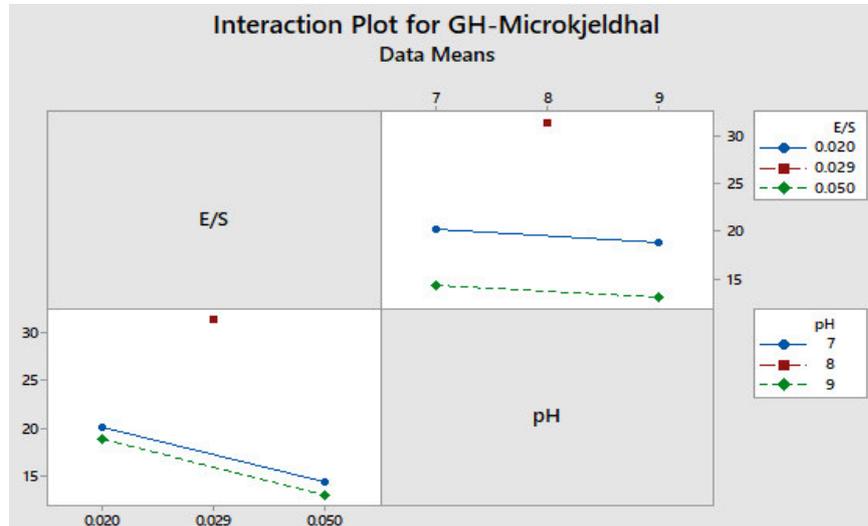
Gráfica de probabilidad normal, donde la distribución acumulada de los residuos se ajusta a recta obtenida como una normal, en tanto, la hipótesis de normalidad no es vulnerada.

Anexo 7. Gráfica de análisis estadístico de la determinación del grado de hidrólisis por cuantificación del nitrógeno soluble por el método de micro-Kjeldahl



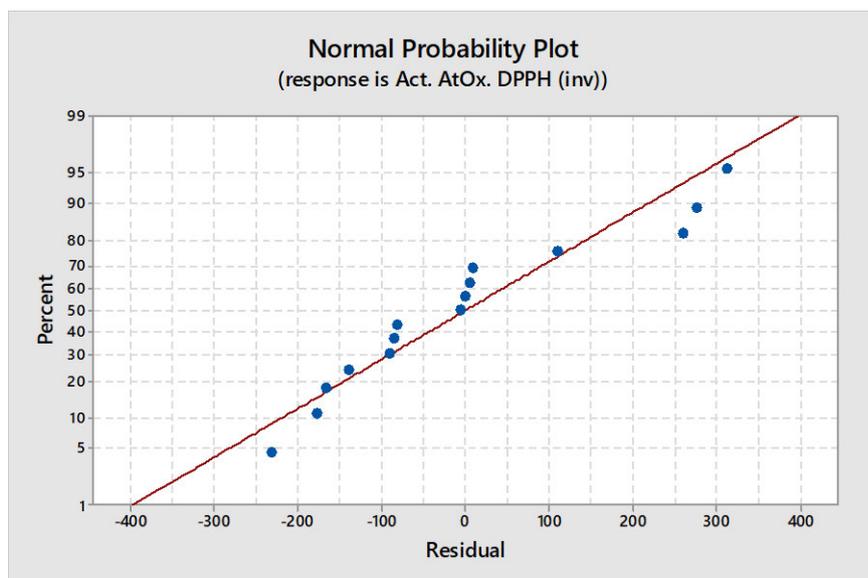
Gráfica de la normal de efectos estandarizados, los efectos más distantes de “0” hacia ambas direcciones, son estadísticamente más significativos, la dirección del efecto debido al factor [E/S] es negativo, es decir, disminuye el efecto al cambiar del valor bajo al valor alto.

Anexo 8. Gráfica de interacción entre los factores pH VS [E/S] resultado del análisis estadístico de la determinación del grado de hidrólisis por el método de micro-Kjeldahl



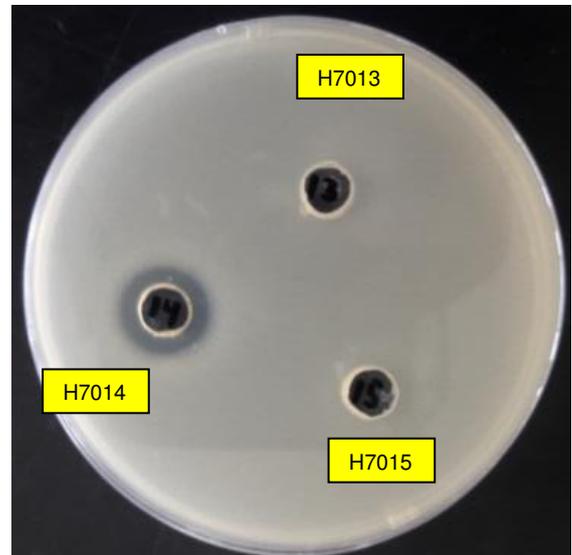
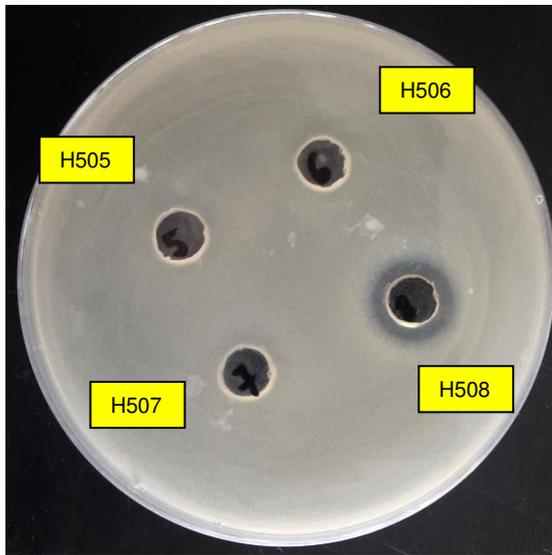
Gráfica de interacción de factores pH y [E/S], en el diseño factorial experimental tipo Plackett Burman, se considera que no existe interacción de los factores.

Anexo 9. Gráfica de análisis estadístico de la determinación de la actividad antioxidante mediante el método del radical (DPPH[•])

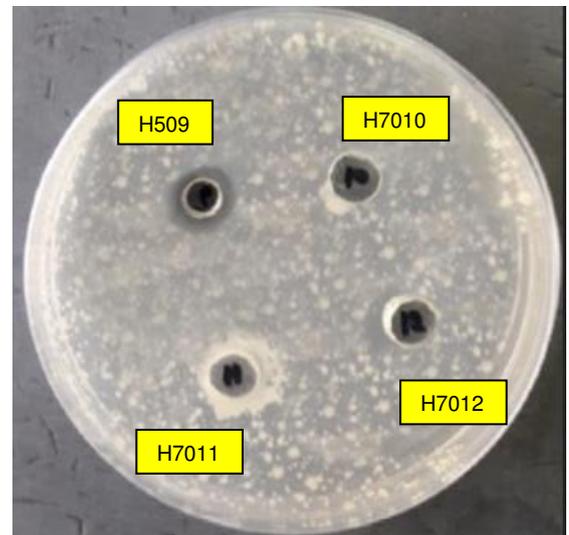
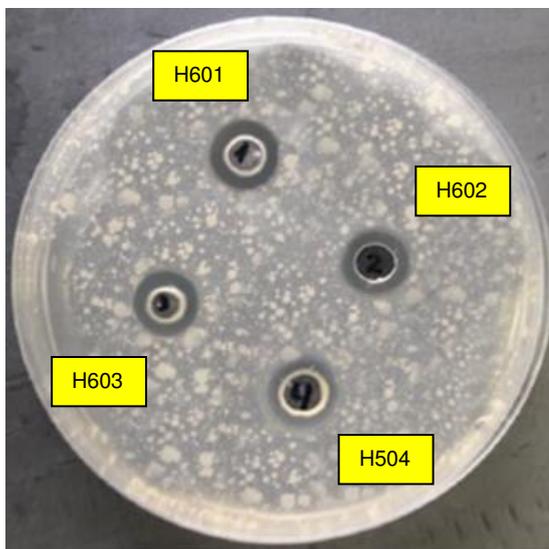


Gráfica de probabilidad normal, los puntos (residuos) se aproximan a la recta, por consiguiente, la distribución es normal, en consecuencia, la hipótesis de normalidad no se vulnera.

Anexo 10. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados mediante el método de difusión en agar-pozo



Actividad antimicrobiana de los hidrolizados mediante el método de difusión en pozo contra *Staphylococcus aureus*.



Actividad antimicrobiana de los hidrolizados mediante el método de difusión en pozo contra *Bacillus subtilis*.