



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL  
COLÁGENO PRESENTE EN ESPINAS  
INTRAMUSCULARES DE FILETES DE BOCACHICO  
(*Prochilodus Magdalenae*) SOBRE LAS  
CARACTERÍSTICAS DE TEXTURA Y  
MICROESTRUCTURALES**

**OSCAR ALBERTO GAITAN GOMEZ**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos  
Bogotá, Colombia  
2013

---

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL  
COLÁGENO PRESENTE EN ESPINAS  
INTRAMUSCULARES DE FILETES DE BOCACHICO  
(*Prochilodus Magdalenae*) SOBRE LAS  
CARACTERISTICAS DE TEXTURA Y  
MICROESTRUCTURALES**

**OSCAR GAITAN GOMEZ**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Director (a):

Ph.D., Médico Veterinario Zootecnista Héctor Suárez Mahecha

**Línea de Investigación:** Biopreservación de alimentos

**Grupo de Investigación:** Aseguramiento de la Calidad de Alimentos, Desarrollo de  
Nuevos Productos

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos  
Bogotá, Colombia  
2013

*Para mis hijas y mi esposa, motores y motivación de mi vida, por entender todo el tiempo que les quité.*



## **Agradecimientos**

Gracias a Dios por darme la vida para llegar hasta aquí.

A mi director de tesis Héctor Suarez, guía constante y apoyo permanente.

A mi familia por su compañía y comprensión.



## Resumen

El bocachico es el nombre común del pez *Prochilodus* sp. nativo de las cuencas hidrográficas de varios países suramericanos. En Colombia hace parte de los peces dedicados a la piscicultura y aunque no es alta la producción, es un pez que se destaca en el consumo tradicional. La presencia de espinas intramusculares ha impedido que sean comercializados los filetes del bocachico, sin embargo el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido la posibilidad de obtener filetes de esta especie. Los cortes en las espinas intramusculares permiten exponer los componentes internos de la espina. En este sentido es necesario determinar la clase de colágeno asociado a las espinas intramusculares y el efecto que puede tener los procesos térmicos sobre la degradación del colágeno, para permitir la obtención de filetes de esta especie. La aplicación de procesos físicos en la espina intramuscular antes del tratamiento térmico podría ser una alternativa en la degradación de estas espinas. El objetivo de este trabajo fue analizar microestructuralmente los componentes que pueden ser afectados según la duración del proceso térmico. Las espinas intramusculares de filetes de bocachico fueron analizadas a través de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), temperatura de desnaturalización del colágeno, microscopía electrónica de transmisión y fuerza de corte, sometidas a tres tiempos de duración del tratamiento térmico (1.5; 2 y 3 min). Los resultados indican que el colágeno presente en espinas intramusculares es tipo I. el tratamiento térmico que consiguió la mayor degradación del colágeno fueron tres minutos, coincidiendo con los valores menores para la prueba de fuerza de corte. Los resultados permiten concluir que la degradación del colágeno es iniciada desde el interior de las espinas intramusculares hacia la capa externa, sin que esta última se vea afectada por el tratamiento térmico.

**Palabras clave:** pescado, tejido conectivo, productos acuícolas, huesos, sajado.

---

## Abstract

The “bocachico” is the common name of fish *Prochilodus* sp. native watersheds of several South American countries. In Colombia is part dedicated to fish farming and although not high production is a fish that stands out in the traditional consumption. The presence of intramuscular bones are marketed has prevented bocachico fillet, but the development of new technologies has enabled the possibility of this species fillets. The cuts allow intramuscular bones expose the internal components of pin bones. In this sense it is necessary to determine the type of collagen associated with intramuscular bones and the effect it can have thermal processes on the degradation of collagen, to allow obtaining this species fillets. The application of physical processes in the pin bones intramuscular before heat treatment could be an alternative in the degradation of these spines. The aim of this study was to analyze microstructural components that may be affected by the duration of the thermal process. Intramuscular bone bocachico fillets were analyzed by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE), the collagen denaturation temperature, and transmission electron microscopy strength force, subjected to three times of duration of heat treatment (1.5, 2 and 3 min). The results indicate that intramuscular bone collagen is present in type I. thermal treatment achieved greater collagen degradation were three minutes, coinciding with the lowest values for shear strength test. The results show that collagen degradation is initiated from inside intramuscular bone to the outer layer, although this shows effect of heat treatment.

**Keywords:** fish, connective tissue, aquaculture products, bones, cut.

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	VII
Lista de figuras.....	X
Lista de tablas .....	XI
Introducción .....	1
<b>1. Capítulo 1: Aislamiento y caracterización del colágeno de espinas intramusculares del Bocachico (<i>Prochilodus magdalenae</i>).....</b>	<b>3</b>
1.1 Resumen .....	3
1.2 Abstract .....	3
1.3 Ictiofauna colombiana: un breve recorrido por las especies dulce acuícolas....	4
1.4 El colágeno: aislamiento y caracterización en peces .....	6
<b>2. Capítulo 2. Análisis microestructural del efecto térmico en la degradación del colágeno en espinas intramusculares de filetes del pescado bocachico (<i>Prochilodus sp</i>).....</b>	<b>17</b>
Resumen.....	17
Abstract.....	18
Introducción.....	18
<b>3. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.1 Conclusiones .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
3.2 Recomendaciones .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
4. Anexo: Publicación sometida.....	34

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1-1: Proceso general de extracción de colágeno en peces.....	7
Figura 2-1. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de espinas intramusculares del pescado bocachico ( <i>Prochilodus</i> sp.) (A) y piel de porcino colágeno tipo I (B). ....	23
Figura 2-2. Análisis por medio de microscopia electrónica de barrido a espinas intramusculares de bocachico, sometidas a tres tiempos de tratamiento térmico. ....	25

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1-1: Principales tipos de colágeno .....	8
Tabla 2-1. Relación de temperatura y viscosidad en la desnaturalización del colágeno .	22
Tabla 2-2. Análisis de fuerza de corte en espinas intramusculares de bocachico dependiente de la duración del tratamiento térmico. ....	26



# Introducción

Varias especies piscícolas nativas de las cuencas hidrográficas de Colombia son hoy en día reproducidas y cultivadas en la piscicultura, sin embargo la presencia de espinas intramusculares impide la generación de nuevos productos como filetes. El bocachico (*Prochilodus* sp) es una de ellas, esta especie es reconocida a nivel nacional por las agradables características organolépticas, sin embargo son desconocidos algunos factores asociados a la espina intramuscular, como el tipo de colágeno, factores fisicoquímicos que inciden en la transformación y obtención de estos filetes, procesos térmicos y otras características que es necesario determinar para conocer el fenómeno que permite determinar la degradación del colágeno presente en las espinas intramusculares.



# 1. Capítulo 1: Aislamiento y caracterización del colágeno de espinas intramusculares del Bocachico (*Prochilodus magdalenae*)

## Isolation and characterization of collagen from Bocachico (*Prochilodus magdalenae*): An option to improve its consumption

Oscar Gaitán G.<sup>1</sup> y Héctor Suárez M, PhD<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Colombia. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA.

\*Correspondencia: [ogaitang@unal.edu.co](mailto:ogaitang@unal.edu.co)

### 1.1 Resumen

Objetivo. Presentar una revisión sobre el consumo de las principales especies dulceacuícolas presentes en la ictiofauna colombiana. Considerando aspectos relacionados con la caracterización del colágeno presente en las espinas intramusculares, como: características, tipos, modos de extracción y ubicación en la morfología de algunas especies. Conclusiones. La revisión permite comprender la necesidad de introducir tecnologías que permitan degradar el colágeno presente en las espinas intramusculares y facilitar la obtención de filetes de especies nativas como el bocachico.

**Palabras clave:** Piscicultura, productos pesqueros, espinas intramusculares.

### 1.2 Abstract

Objective. To present a revision on the consumption of the main fresh water species in Colombia's Ichthyofauna. This review will consider aspects related with collagen in

intramuscular bones such as: collagen features, types, extraction and morphological location within some species. Conclusions. New technologies are required to break down collagen from intramuscular bones and make it easier to obtain native species fillets such as Bocachico.

Key words: Fish culture, fish products, intramuscular bones.

### **1.3 Ictiofauna colombiana: un breve recorrido por las especies dulce acuícolas**

En actualidad en Colombia dentro de las especies más consumidas, producto de la pesca de captura continental y piscicultura, la cual hace referencia a todo tipo de extracción y cultivo de recursos vivos naturales de agua dulce, está el Bocachico (*Prochilodus Magdalenae*), especie que ha venido experimentando un descenso en su consumo quizá debido a la sobre explotación como lo sustenta el informe de la FAO sobre el estado de la pesca y la acuicultura 2010. El informe técnico de pesca y acuicultura para Colombia (2007) a cargo de la Corporación Colombia Internacional (CCI) para las cuencas del Magdalena, Sinú y Atrato deja ver que esta especie es la de mayor reporte de captura tanto en el alto, medio y bajo magdalena por encima de la mojarra lora (*Oreochromis niloticus*), el bagre rayado (*Pseudoplatystoma magdaleniatum*), el nicuro (*Pimelodus clarias*) y otras especies de interés comercial en Colombia. Las artes de pesca de captura son variadas y entre ellas se cuentan la atarraya, el chinchorro, el cóngolo y el trasmallo, siendo éste último el responsable de la captura del mayor número de ejemplares pero también los de menor talla. La captura de ejemplares que aún no han alcanzado la talla mínima legal es muy alta al igual que la presión de pesca sobre esta especie, razón por la cual ha venido disminuyendo la oferta paulatina de los subsecuentes años, lo que podría también aportar al conjunto de razones asociadas a su baja oferta en los mercados actuales.

En lo que respecta a la comercialización, se encuentra que el pescado de cultivo es percibido como una opción más barata, mejor controlada, sin incidencia de parásitos y metales pesados. En términos generales presenta mejores condiciones de calidad que el pescado obtenido de la pesca extractiva (Guerrero et al., 2009); por su parte el bocachico obtenido por pesca de captura es comercializado en Colombia sin que el consumidor final tenga información detallada de la procedencia, pues no existe trazabilidad asociada a estos productos y tampoco se realiza un proceso de sensibilización frente a la acuicultura entendida como el conjunto de actividades, técnicas y conocimientos del cultivo de especies acuáticas vegetales y animales, o a la piscicultura actividad dedicada al cultivo de peces bajo manejo o implementación de buenas prácticas, esto influye en la decisión del consumidor y en la preferencia por otras especies o por mercados más especializados. Dentro de los peces de cultivo más consumidos se cuentan principalmente cuatro especies, la tilapia roja (*Oreochromis sp*) con un 47,17% de la actividad piscícola, la tilapia plateada (*Oreochromis niloticus Linnaeus*), la cachama (*Piaractus brachypomus*) y la

trucha (*Oncorhynchus mykiss*) cada una de ellas con el 24,04%, 15,02%, 9,58% respectivamente; el 4,18% restante de la producción nacional corresponde a otras especies donde se encuentra el Bocachico (*Prochilodus magdalenae*), la Carpa (*Ciprinus carpio*) y el Yamú (*Brycon siebenthalae*) entre otras de interés comercial, como lo sustenta la CCI (2009). Se debe resaltar que, con el fin de regular, autorizar y controlar el ejercicio de la actividad pesquera y acuícola, el Instituto Colombiano de Desarrollo Rural (INCODER) emitió la resolución 01459 de 2004 con el fin de asegurar el aprovechamiento sostenible de los recursos pesqueros y acuícolas y establecer una medida de control y vigilancia del volumen a comercializar nacionalmente de la especie (*Prochilodus platensis*) bocachico proveniente de la república de Argentina, especie que, hasta el momento, se estaba importando y comercializando sin atender a normativa alguna o sin aclarar al consumidor su procedencia.

Con respecto al cultivo de bocachico, según el informe de junio de 2010 presentado por el Instituto colombiano de desarrollo rural (INCODER) en Colombia se adelantan investigaciones en tres estaciones piscícolas (Bahía Málaga, Repelón y Gigante) de acuerdo con la priorización de las especies y el interés nacional; de esas investigaciones, tres se interesan por especies nativas de consumo con el fin de involucrarlas en la acuicultura nacional, a saber, blanquillo, bagre pintado y dorada; dos están enfocadas en el mejoramiento genético de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y de la tilapia roja (*Oreochromis mossambicus spp*); una en la reproducción de la pacora; una en la reproducción en cautiverio de pataló y doncella y una en la producción de alevinos de pargo lunarejo y meros. Estos datos dejan ver que a pesar de la importancia de los estudios ícticos en Colombia y de la relevancia de la región neotropical, como la más diversa a nivel mundial debida a su riqueza hídrica, los avances en el conocimiento de la diversidad son lentos comparados con los países vecinos (Ortega y Vari 1986; Buckup y Menezes 2003; Lasso et al. 2004) Tampoco concuerda la relación entre la riqueza estimada de más de 2.000 especies (Cala 2001) y los registros preliminares de Mojica (1999) y Reis et al. (2003) de 838 y 690 especies, respectivamente.

El conocimiento que se posee sobre la ictiofauna nativa son sus nombres científicos y algunas áreas de distribución, la biología en general, hábitos reproductivos, requerimientos alimenticios, velocidad de crecimiento, entre otros, sólo es conocido en muy pocas especies. El sistema hidrográfico Magdalena-Cauca, posee alrededor de 146 especies dulceacuícolas primarias (Dahl, 1971), incluyendo la ictiofauna del río Sinú y San Jorge, de las cuales aproximadamente 75 especies deben considerarse autóctonas (Miles, 1947). En el alto Cauca se encuentran alrededor de 14 especies autóctonas de las 46 que representan la ictiofauna indígena; de las cuales tienen importancia comercial y/o deportiva siete especies y dos de ellas se encuentran en vía de extinción: la sabaleta (*Brycon henni*) y el jetudo o pataló (*Ichthyoelephas longirostris*) (Gurzedá y Brugman, 1974)

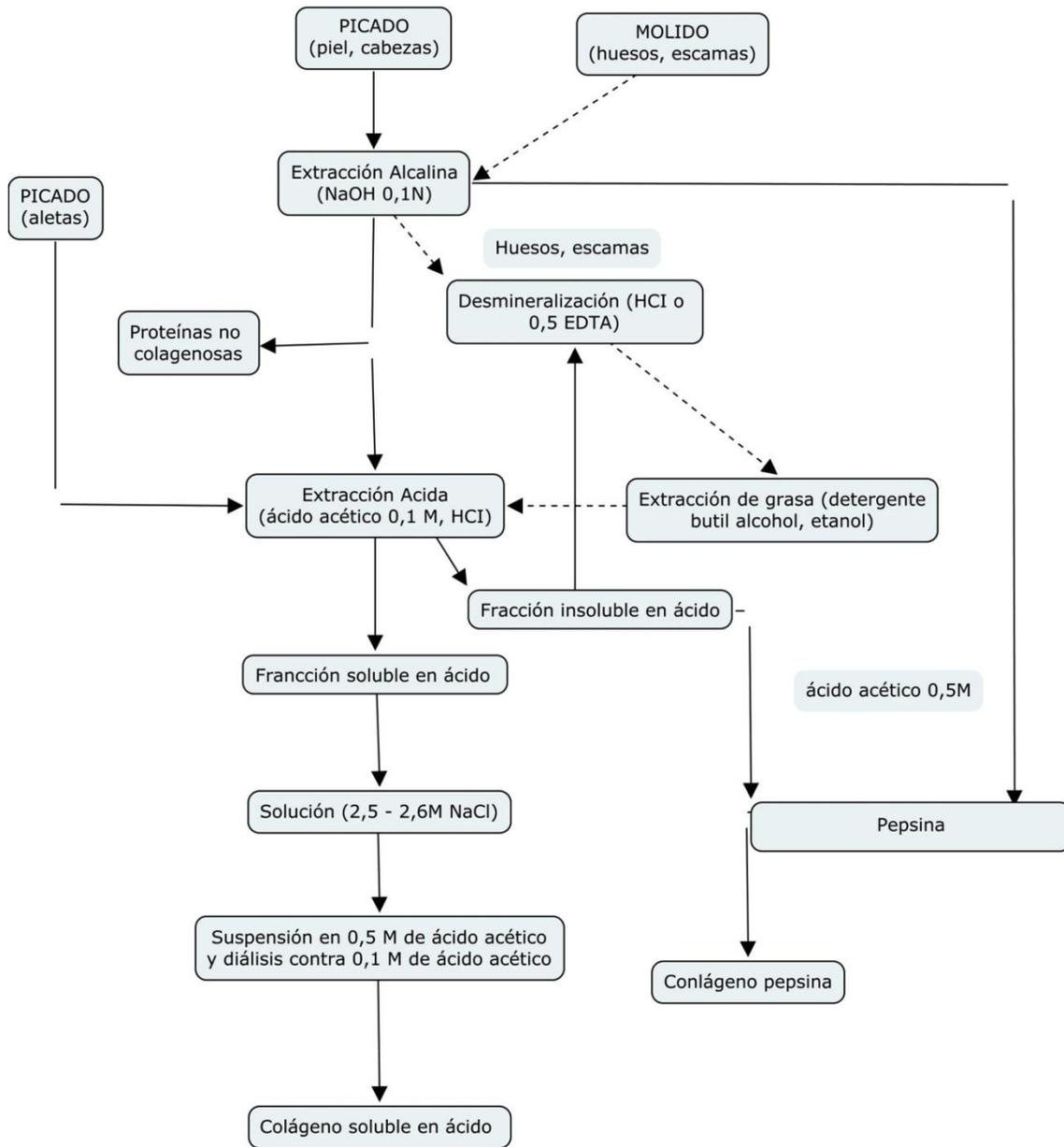
Contando las siete especies que se encuentran en el alto Cauca, que también son comunes al complejo hidrográfico Magdalena-Cauca, se tiene un total de 18 especies; de las 146 especies dulceacuícolas que se encuentran en el norte de Colombia, que son de

interés comercial y/o deportivo, las restantes son de interés científico, ornamental o de importancia económica muy limitada. Entre las 18 especies de interés comercial se encuentra el bocachico, la especie más común en Colombia (Salazar, 1999); se alimenta de perifiton y es característica su migración en épocas de desove hacia las partes altas de los ríos. Se ha logrado su reproducción inducida convirtiéndola en una especie muy común en la gastronomía y una de las más apetecidas por el sabor de la carne, de donde resulta raro que aún no se encuentren estudios relacionados con las características de espinas intramusculares, piel y carne, asociadas a la influencia del colágeno (Tellez, 2007) y (Noreña, 1977), evento determinante en el desarrollo de nuevas tecnologías para desarrollar productos diferenciados como el filete de bocachico.

## 1.4 El colágeno: aislamiento y caracterización en peces

El colágeno un constituyente común en las espinas, la piel, las escamas y la carne de la anatomía del pez, según Foegeding (1996) es una fracción importante de los tejidos conectivos tales como los tendones, piel, huesos, sistema vascular y envolturas de tejido conectivo que rodea los músculos de animales. Se han reconocido más de 12 tipos de colágeno discriminados con números romanos donde el tipo I es el más encontrado como el tipo de colágeno principal en piel, espinas, escamas y aletas de varias especies de peces (Kimura, 1983; Nagai y Suzuki, 2000; Kimura, 1992). Los tipos de colágeno que se caracterizan en los estudios asociados con el aislamiento y caracterización están centrados en colágeno soluble en ácido o en colágeno soluble en pepsina, este último sería la fracción del colágeno no soluble en ácido. Para una mejor ilustración del proceso de extracción general del colágeno de los peces y basado en las partes involucradas en el aislamiento se relaciona un esquema en la figura 1. Según diversos estudios (Nagai y Suzuki, 2000; Arnesen y Gildberg, 2006; Hall 2011) las partes que mejor se explotan para la extracción del colágeno son las aletas, la piel, la cabeza picada, las escamas y las espinas molidas. El proceso se realiza en medio alcalino para espinas, escamas, piel y cabeza, mientras que para la extracción de aletas se extrae por adición de ácido acético para separar la fracción soluble de la insoluble. El colágeno es ampliamente usado en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética, del cuero y de los biomateriales (Morimura et al., 2002) consecuentemente, las investigaciones han sido dirigidas hacia un incremento en la utilización del colágeno residual de los peces para la producción de gelatina (Nagai y Suzuki, 2000; Arnesen y Gildberg, 2006; Nagai et al., 2008; Woo et al., 2008; Duan et al., 2009; Zhang et al., 2009).

**Figura 1-1:** Proceso general de extracción de colágeno en peces.



Fuente: Hall, 2011.

En la actualidad es fácil encontrar estudios con el objetivo de aislar y caracterizar el colágeno soluble en ácido, trabajos desarrollados en especies como Tilapia (Zeng et al., 2009), Salmón (Eckhoff et al., 1998; Pei et al., 2010), Carpa (Duan et al., 2009), Pargo (Jongjareonraka et al., 2005), Trucha (Bauchart et al., 2007), Luvina (Nagai et al., 1999) e incluso Bagre (Zhang et al., 2009), sin embargo no se registran estudios de este tipo con Bocachico (*Prochilodus magadalenae*) y aunque se ha determinado la composición química, los minerales, el contenido de aminoácidos y lípidos de las espinas de muchas

especies, las espinas de pescado varían de manera significativa en la composición química según la especie (Toppe et al., 2006).

En un trabajo realizado por Suárez et al, (2007) el colágeno es descrito como una proteína fibrosa, que constituye la fracción principal del tejido conectivo y contribuye con la firmeza y dureza de la carne. Abundante en los tendones, piel, huesos, sistema vascular, en las envolturas del tejido conectivo que rodean el músculo y en los peces en el miocomata. Según Nagai et al, (2008) el colágeno está ampliamente distribuido en piel, espinas, cartílago, tendones, dientes, si se poseen, y otros órganos que constituyen cerca del 30% de la proteína animal; la unidad estructural es el tropocolágeno, una proteína en forma de varilla (15 Å de diámetro y 3.000 Å de longitud) formada por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas  $\alpha$  (alfa) súper envueltas en una triple hélice. Cada cadena  $\alpha$  forma una hélice con giro a la izquierda con tres aminoácidos por vuelta. El entorchamiento de las tres cadenas forma una triple hélice presentando giro a la derecha. Las cadenas polipeptídicas de las unidades del tropocolágeno están unidas por medio de enlaces cruzados covalentes, donde participan cadenas laterales de lisina e histidina. Los enlaces cruzados, son reducibles y durante la maduración del tejido conectivo van siendo gradualmente substituidos por enlaces no reducibles (Belitz y Gorsch, 1988; Suárez et al., 2007). En animales más viejos, como por ejemplo los mamíferos, este tipo de enlaces cruzados no reducibles, son responsables de la dureza de la carne. La cadenas  $\alpha$  contienen 100 tipos de restos de aminoácidos, siendo su composición variada. Esta diversidad en la composición de los aminoácidos de las cadenas  $\alpha$  es la causa de la existencia de los cinco tipos principales de colágeno (Tabla 1.).

**Tabla 1-1:** Principales tipos de colágeno

TIPO	Cadenas Peptídicas	Composición Molecular	Distribución
I	$\alpha^1 \alpha^2$	$[\alpha^1 (I)]^2 ]\alpha^2 (I)$	Piel, tendones, miocomata, huesos y músculos (epimisio)
II	$\alpha^1$	$[\alpha^1 (II)]^2$	Cartílago
III	$\alpha^1$	$[\alpha^1 (III)]^3$	Piel fetal, sistema cardiovascular, membranas sinoviales, organos internos y músculos (perimisio)
IV	$\alpha^1 \alpha^2$	$[\alpha^1 (IV)]^3 (?)h (?)$	Membranas basales, cápsulas del cristalino, glomérulos, membrana placentaria, pulmones y músculos (endomisio)
V	$\alpha A, \alpha B, \alpha C (?)$	$[\alpha B ], \alpha A \text{ el } (\alpha B)^3 + (\alpha A)^3 \text{ el } (\alpha C)^3 (?)$	Membrana placentaria, sistema cardiovascular, pulmones y músculos (endomisio). Son también componentes secundarios de varios tejidos.

**Fuente:** Belitz y Gorsch

En cuanto a los tipos de colágenos, los mismos autores mencionan que el tipo más común es conocido como colágeno tipo I, el cual está formado por tres cadenas polipeptídicas; dos de ellas denominadas  $\alpha 1$ , idénticas y unidas entre sí por puentes de hidrógeno, la

tercera cadena  $\alpha_2$ , posee una secuencia de aminoácidos diferente. Cada cadena tiene peso molecular de 100.000 daltons, dando un peso molecular total de 300.000 daltons para el colágeno (Lindent y Lorient, 1996; Suárez et al 2007). Otro tipo de colágeno encontrado en el músculo, que parece ejercer un papel importante en su dureza, es el tipo III y está formado por tres cadenas  $\alpha$  idénticas denominadas  $\alpha_1$  (III). Este tipo de colágeno posee enlaces disulfuro intramoleculares en el péptido en el helicoidal carboxiterminal. Otra clase de molécula de colágeno, conocida como tipo IV, es más compleja y parece encontrarse formada por cadenas polipeptídicas de tamaños diferentes.

La composición del colágeno de tipo V aún no está muy clara y parece presentar más de un tipo de conformación molecular. Este tipo de colágeno se encuentra en peces. El colágeno es un grupo de moléculas similares, sin embargo sus componentes aún no han sido completamente identificados. En algunos casos, las cadenas de péptidos que constituyen el colágeno están unidas mediante enlaces covalentes cruzados. Cuando dos péptidos se unen de esta manera, se denomina componente  $\beta$ , y cuando los tres están unidos, el producto es conocido como componente  $\gamma$ . La solubilidad del colágeno disminuye a medida que aumentan los enlaces cruzados intermoleculares. Según Ando et al. (1999), el colágeno presente en el músculo de los peces está formado por los tipos I y V, y contiene fibras heterotípicas. La alta proporción en fibras del tipo V resulta en la formación de fibras delgadas, hecho mostrado a través del estudio del diámetro de la fibra de colágeno en peces pelágicos (peces que habitan en mar abierto en capas superficiales), siendo de 20,6 Å incluyendo mayor cantidad de fibras de colágeno del tipo V. Situación también presente en *matrinxã Brycon cephalus* (Suárez-Mahecha et al., 2007) Este tipo de colágeno tiene tendencia a degradarse durante el almacenamiento, tornando la carne blanda en el período post mortem. Para peces demersales (peces que habitan los fondos marinos), el diámetro de la fibra de colágeno se encuentra en valores alrededor de 26 Å.

En lo que a la composición de aminoácidos del colágeno se refiere, Suárez et al., (2007) menciona que los aminoácidos encontrados en el colágeno se caracterizan por la elevada riqueza en glicina (33%), prolina (12%) y alanina (11%) y por contener dos aminoácidos poco frecuentes en las demás proteínas, hidroxiprolina (12%) e hidroxilisina (1%). Además explica que en las cadenas polipeptídicas del colágeno son producidas dos oxidaciones importantes: la conversión de prolina en hidroxiprolina y la conversión de lisina en hidroxilisina. Los sistemas enzimáticos utilizan oxígeno molecular, a cetoglutarato, ión ferroso y una sustancia reductora, como el ascorbato. Este último favorece la cicatrización de las heridas debido al papel en la síntesis del colágeno y en su deficiencia. En la deficiencia de ácido ascórbico, los mucopolisacáridos de la sustancia basal de la célula presentan un carácter anormal y existen cambios significativos en la naturaleza de las fibrillas de colágeno que son formadas. A nivel enzimático existe un indicio que el ácido ascórbico está envuelto en la conversión de prolina a hidroxiprolina, funcionando como agente reductor (Coon, 1980). En peces más viejos, el colágeno del miocomata es más débil y tiene menos enlaces cruzados que aquel de peces jóvenes. Por otro lado, peces más viejos tienen más colágeno (presencia de miocomata más espeso) que peces más

jóvenes (Love, et al., 1972; Love, 1992), de donde se afirma que a medida que los enlaces cruzados de colágeno se van formando, la solubilidad, en diversos solventes, como soluciones salinas y ácidas, va disminuyendo; contrario a lo que sucede en los mamíferos con el pasar de la edad, donde la cantidad de colágeno insoluble aumenta.

Con relación a la proteólisis enzimática en la carne, según Coon (1980) la mayoría de las enzimas proteolíticas tienen baja actividad en el colágeno nativo, además, degradan fácilmente el colágeno desnaturalizado. Se han identificado colagenasas en diversos tejidos animales, sin embargo, es difícil detectar su presencia debido al hecho de exhibir una escasa actividad, por los mecanismos de control que opera en los tejidos. La mayoría de las colagenasas animales hidrolizan un solo enlace en cada una de las tres cadenas de la molécula de colágeno. Diversos microorganismos, especialmente *Clostridium*, producen colagenasas. Estas enzimas difieren de las colagenasas animales porque degradan extensamente el colágeno. Las proteínasas no colagenasas pueden hidrolizar la molécula del colágeno en la región telopeptídica.

En lo referente a la revisión de investigaciones relacionados con el colágeno presente en las espinas del pescado, algunos presentan resultados asociados a la estructura de las espinas, contenido de colágeno y su degradación, las características microestructurales de dichas espinas y las consecuencias en un proceso de pre y post cocción sobre las espinas intramusculares de los peces, sin embargo, no se han encontrado estudios que relacionen de manera conjunta estos parámetros investigativos. La mayoría de estudios han sido realizados en países asiáticos como China, Japón y Tailandia, mientras otros pertenecen a países nórdicos, estos países centran su interés en la industria acuícola. En esta región predominan los estudios relacionados con el aislamiento y la caracterización del colágeno soluble en ácido (CSA) en una gran variedad de especies marinas como de agua dulce (Pati et al., 2010; Duan et al., 2009; Zhang et al., 2009; Wang et al., 2008; Ogawa et al., 2004; Kittiphattanabawon et al., 2005; Nagai et al., 2000; Nagai y Suzuki, 2000; Nagai et al., 2001) todos los estudios encontrados se realizaron en peces teleósteos que se caracterizan por tener un esqueleto interno óseo.

Es importante resaltar que en especies de consumo nacional como Bocachico (*Prochilodus Magdalenae*), no se registran investigaciones ni en lo que respecta a las características microestructurales de espinas, como tampoco en aspectos relacionados con el colágeno presente en espinas intramusculares; tampoco han sido encontradas investigaciones relacionadas con las características de las espinas después de procesos de cocción, cualquiera que éste sea. En relación con éste último parámetro se pueden mencionar las investigaciones de Gokoglu et al., (2003) así como las de Yoneda et al., (2002), en especies marinas. La primera de ellas intenta comparar diferentes tipos de cocción como freír, hervir, hornear, asar o cocinar en microondas y determinar los cambios que produce estos tipos de cocción en relación con la composición proximal y el contenido mineral, además, se determinó el contenido de proteína, humedad media, cenizas, grasa y minerales. Finalmente la investigación concluye que los métodos de cocción más

saludables son hornear y asar a la parrilla. La otra investigación se centra en los cambios de sabor y la textura de la *fluvia mutica* por cocción durante el almacenamiento.

Existe un número relativamente limitado de investigaciones relacionadas con el efecto del método de cocción sobre las espinas de algunas especies de peces o aquellos relacionados con el aislamiento y caracterización del colágeno soluble en ácido (CSA) en huesos de pescado, también son escasos los estudios realizados en la composición química, mineral, contenido de aminoácidos y lípidos de las espinas de algunas especies de peces (Toppe et al., 2006). Vale la pena destacar también los aportes de las investigaciones de Shimosaka (1999 y 2002) quien establece una relación entre la composición química y estructura cristalina en la espina del pescado durante la cocción y entre la composición química y la estructura cristalina de la espina de pescado curado en una solución de ácido acético respectivamente, estos resultados indican que los cambios en la cristalinidad, muestran incremento en la intensidad de difracción luego de 24 horas de inmersión debido al incremento de la parte amorfa de la apatita. Los componentes inorgánicos Ca, P, Mg, y Mn se disuelven entre el 60 y 90% luego de las 24 horas de inmersión en ácido acético al 4% y los huesos de los peces pequeños son una alta fuente de Ca y reblandecerlos permite el consumo sin detectar las espinas. Shimosaka (1999 y 2002) también realizó un trabajo con Shimosaka et al. (1999) en donde describe los cambios en las propiedades físicas y la composición de las espinas de pescado durante la cocción en una solución de ácido acético y una infusión de té verde. De este trabajo se resalta el cambio en las propiedades físicas de las espinas después del proceso, obteniendo la fracturabilidad de las espinas a las 120 horas de inmersión en ácido acético al 4%. Es importante aclarar que en estudios previos, Shimosaka et al. (2006), las espinas que fueron sometidas a procesos de ablandamiento por medio de agua en ebullición retuvieron mayor cantidad de calcio disminuyendo su fracturabilidad.

Cómo es evidente, aun falta mucha investigación relacionada con especies de interés comercial para Colombia como el Bocachico (*Prochilodus magdalenae*). Si bien es cierto que la carne es apetecida por el sabor, también es rechazada por la cantidad de espinas intramusculares que esta especie posee. Investigaciones que provean información acerca de la constitución, composición química y caracterización del colágeno presente en las espinas intramusculares, así como las transformaciones que éstas sufran después de procesos de cocción podrán ayudar a mejorar las alternativas para generar productos en forma de filete con espinas pero de fácil ingesta a pesar de ellas.

## REFERENCIAS

- Ando, M., Oishi, K. Moshizuki, S., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y. Effect of inhabited sea area on meat firmness and its post-mortem change in chub mackerel during chilled storage . FISHERIES SCI. 2002; 68: 1337-1343
- Arnesen J. & Gildberg, A. Extraction of muscle proteins and gelatine from cod head. PROCESS BIOCHEM. 2006; 41: 697–700.

Bauchart, C., Chambon, C., Patureau, P., Savary-Auzeloux, I., Rémond, D., Morzel, M. Peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle subjected to ice storage and cooking. *FOOD CHEM.* 2007; 100: 1566–1572

Buckup P.A. & Menezes N.A. (eds). Catálogo dos peixes marinhos e de água doce do Brasil. 2da ed. 2003 URL: <http://www.mnrj.ufrj.br/catalogo/>

Cala P. Ictiofauna de agua dulce de Colombia en el contexto global neotropical y su estado actual: una revisión bibliográfica. *Dahlia (Rev. Asociación Colombiana de Ictiología)* 2001; 4: 3- 14.

Corporación Colombia Internacional. Informe Técnico regional de cuencas del Magdalena, Sinú y Atrato, Colombia 2007.

Corporación Colombia Internacional. Pesca y Acuicultura Colombia. CCI. 2009

Dahl G. Los peces del norte de Colombia. Ministerio de Agricultura, Instituto de Desarrollo de los Recursos Naturales Renovables (Inderena). Talleres Litografía Arco. Bogotá, Colombia. 1971; 391 p.

Duan, R., Zhang J., Dua,X., Yao, X & Konno, K. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *FOOD CHEM.* 2009; 112, 702 – 706.

Eckhoff, K., Aidos, I., Hemre, G. & Lie, O. Collagen content in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) and subsequent changes in solubility during storage on ice. *FOOD CHEM.* 1998; 62, 197 – 200.

El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Departamento de pesca y acuicultura de la FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación, Roma

Foegeding, E, Lanier, T.C. and Hultin, H.O., Characteristics of edible muscle tissue, in *FOOD CHEM.* 1996; Ed by Fennema OR. Marcel Dekker, New York, pp 879–942.

Gokoglu, N., Yerlikaya, P. & Cengiz, E. Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FOOD CHEM.* 2004; 84, 19 – 22.

Guerrero, L., Claret, A., Hernández, M.D., Aguirre, E., Rincón, L., Pérez, E., Grau, A. Rodríguez, C. y Fernández. Creencias de los consumidores españoles sobre el pescado de crianza en comparación con el de pesca extractiva C. En XII congreso nacional de acuicultura, Madrid, España. 2009. 442-44

Gurzeda A. y Brugman A. J. Potencial para el desarrollo de la acuicultura en Colombia. *Acuicultura en America Latina. Simposio FAO/CARPAS, Motevideo Uruguay.* 1974

Hall, G. (2011) *Fish Processing, sustainability and new opportunities.* Willey-Blackwell Publishing. Oxford, U.K. 244-248.

Instituto colombiano de desarrollo rural (INCODER) Informe de gestión. [En línea] junio 2010. Consultado el 4 de octubre de 2010, disponible en [http://www.incoder.gov.co/file/planificacion/infor/Inf\\_de\\_gest\\_I\\_semestre\\_2010.pdf](http://www.incoder.gov.co/file/planificacion/infor/Inf_de_gest_I_semestre_2010.pdf)

Instituto Colombiano de Desarrollo Rural (INCODER). Resolución 01459. Diario Oficial de Colombia num. 45679, 22 de septiembre de 2004.

Jongjareonraka, A., Benjakula, S., Visessanguanb, W., Nagai, T., & Tanakad, M. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). FOOD CHEM. 2005. 93, 475 – 484.

Kimura S. Wide distribution of the skin type I collagen  $\alpha 3$  chain in bony fish. COMP BIOCHEM PHYS A. 1992.102(B): 255–260.

Kimura, S. (1983) Vertebrate skin type I collagen: Comparison of bony fishes with lamprey and calf. COMP BIOCHEM PHYS B. 1983; 74 (3): 525-528

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., Tanaka, M., Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). FOOD CHEM. 2005; 89: 363–372.

Lasso C., Lew D., Taphorn D., Do Nascimento C., Lasso-Alcalá Ó., Provenzano F. y Machado-Allison A. 2004a. Biodiversidad ictiológica continental de Venezuela. Parte I. Lista de especies y distribución por cuencas. Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales 2004: 105 – 195.

Miles C. Los peces del río Magdalena. 1947. Ministerio de economía nacional. Sección de piscicultura, pesca y caza. Editorial el gráfico. Bogotá

Mojica, J.; Galvis, G.; Sanchez, P.; Castellanos, C.; Villa – Navarro, F. Peces Del Valle medio Del río Magdalena, Colombia. Biota Colombiana. [En línea] 2006; 7(1): 23 – 38. Consultado septiembre 20 de 2010, disponible en [http://www.siac.net.co/biota/bitstream/123456789/198/1/Magdalena\\_Medio\\_031006.pdf](http://www.siac.net.co/biota/bitstream/123456789/198/1/Magdalena_Medio_031006.pdf)

Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu, T., Kida, K. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. PROCESS BIOCHEM. 2002; 37:1403–1412

Nagai, T. & Suzuki N., Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. Food Chem. 2000; 68:277–281.

Nagai, T., Suzuki, N., Nagashima, T. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu. FOOD CHEM. 2008; 111: 296–301.

Nagai, T., Yamashita, E., Taniguchi, K., Kanamori, N., & Suzuki, N. Isolation and characterization of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). Food Chem. 2001; 72: 425–429.

Noreña, S. Análisis Ictiofaunístico para el Desarrollo de la Piscicultura en el Occidente Colombiano. Depósito de documentos de la FAO. 1977. Consultado octubre 4 de 2010. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/005/ac866s/AC866S33.htm>

Ogawa, M., Portier, R., Moody, M., Bell, J., Schexnayder, M. & Losso, J. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). FOOD CHEM. 2004; 88: 495 – 501

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de pesca y acuicultura de la FAO. Roma, 2010.

Ortega H. & Vari R.P. Annotated checklist of the freshwater fishes of Peru. Smithson. Contrib. Zool. [En línea] 1986; 437: 1 – 25. Disponible en [http://si-pddr.si.edu/jspui/bitstream/10088/5158/2/SCtZ-0437-Lo\\_res.pdf](http://si-pddr.si.edu/jspui/bitstream/10088/5158/2/SCtZ-0437-Lo_res.pdf)

Pati, F., Adhikari, B. & Dhara, S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. BIORESOURCE TECHNOL. 2010; 101: 3737 – 3742.

Pei, X., Yang, R., Zhang, Z., Gao, L., Wang, J., Xu, Y., Zhao, M., Han, X., Liu, Z., Li, Y. Marine collagen peptide isolated from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) skin facilitates learning and memory in aged C57BL/6J mice. FOOD CHEM. 2010; 118 (2): 333–340

Reis R.E., Kullander S.O. & Ferraris Jr. C.J. (eds.). Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs. Porto Alegre, Brasil. 2003. 729 p.

Salazar, G. Situación de la acuicultura rural de pequeña escala en Colombia, importancia, perspectivas y estrategias para su desarrollo. Red de acuicultura rural en pequeña escala. FAO. 1999: 1-26.

Sato, K., Ando, M., Kubota, S., Origasa K., Kawase, H. Involvement of Type V Collagen in Softening of Fish Muscle During Short-Term Chilled Storage. J AGR FOOD CHEM. 1997; 45 (2):343-348.

Shigemura, Y., Ando, M., Oishi, K., Mochizuki, S., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y., Kawai, T. Effect of inhabited sea area on chub mackerel meat texture and possible degradation of type V collagen during chilled storage. FISHERIES SCI. 2004; 70: 933–935

Shigemura, Y., Ando, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y., Kawai, T. Correlation of type V collagen content with post-mortem softening of fish meat during chilled storage. FISHERIES SCI. 2003; 69 (4): 842-848.

Shimosaka, C. Relationship between the chemical composition and crystal structure of Fish Bone cured in an Acetic Acid solution. J CLIN BIOCHEM NUTR. 2002; 31: 9-17

Shimosaka, C., Shimomura, M & Terai, M. Changes in the physical properties and composition of fish bone during cooking in an acetic acid solution and green tea infusion. JHEJ. 2002; 49 (8): 873 – 879.

Shimosaka, C., Shimomura, M & Terai, M. Changes in the physicals properties and composition of fish bone during cooking by heating under normal pressure. Nihon Kasei Gakkaishi, JHEJ. 1996; 47: 1213-1218.

Shimosaka, C., Shimomura, M & Terai, M. Changes in the physical properties and composition of fish bone during cooking in an acetic acid solution and green tea infusion. Journal JHEJ, 2002; 49: 873 – 879.

Shimosaka, C. Relationship between chemical composition and crystalline structure in fish bone during cooking. J CLIN BIOCHEM NUTR. 1999; 26 (3): 173 – 182.

Suarez, H. Efeito do resfriamento sobre a textura *post mortem* da carne do matrinxã *Brycon cephalus* (pisces: characiforme). Dissertação (Mestrado) Florianópolis: Departamento de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciencias Agrarias, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. 2002

Suárez, H., De Francisco, A., Beirão, L., Pardo, S., Cortés, M. Pérdida de Textura *post mortem* de la carne de pescado durante el almacenamiento en frío. Acta Biológica Colombiana, [En línea] 2007;12 (1): 3-18. Disponible en <http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF's/v12n1/v12n1a1.pdf>

Suárez-Mahecha H., Beirão L.H., Francisco A., Nakaghi L.S.O., Pardo-Carrasco S.C. Efeito do resfriamento sobre a textura *post-mortem* da carne do peixe matrinxã *Brycon cephalus*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [En línea] 2007; 59, (4): 1067-1073. Disponible en <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v59n4/37.pdf>

Tellez, C. Pesca y acuicultura Colombia 2007. Informe técnico regional cuencas del Magdalena sinu y atrato. Corporación Colombia Internacional y Ministerio de agricultura y desarrollo rural. 2007 Disponible en: [http://www.cci.org.co/cci/cci\\_x/datos/BoletinesIncoder/Publicaciones/CuencaMagdalena-Sinu-Atrato.pdf](http://www.cci.org.co/cci/cci_x/datos/BoletinesIncoder/Publicaciones/CuencaMagdalena-Sinu-Atrato.pdf)

Toppe, J., Albrektsena, S., Hope, B & Aksnes, A. Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. COMP BIOCHEM PHYS B. 2006; 146 (3): 395 – 401.

Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L. & Hu, Q. Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). Food Chem, 2008; 108 (2): 616 – 623.

Yoneda, C., Kasamatsu, C., Hatae, K. & Watabe, S. Changes in taste and textural properties of the foot of the Japanese cockle (*Fulvia mutica*) by cooking and during storage. FISHERIES SCI. 2002; 68 (5): 1138-1144.

Zeng, S., Zhang, C., Lin, H., Yang, P., Hong, P., Jiang, Z. Isolation and characterization of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). FOOD CHEM. 2009; 116 (4): 879–883

Zhang, J., Duan, R., Tian Y. & Konno, K. (2009). Characterization of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). FOOD CHEM, 2009; 116 (1): 318 – 322.

## **2. Capítulo 2. Análisis microestructural del efecto térmico en la degradación del colágeno en espinas intramusculares de filetes del pescado bocachico (*Prochilodus sp*)**

Oscar Gaitán G, MSc<sup>1</sup> y Héctor Suárez M, PhD<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Colombia. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA. \*Correspondencia: [oagaitang@unal.edu.co](mailto:oagaitang@unal.edu.co)

### **Resumen**

La presencia de espinas intramusculares en filetes de peces impide la comercialización de estos productos, motivo por el cual la aplicación de procesos físicos antes del tratamiento térmico podría ser una alternativa en la degradación de estas espinas. El objetivo de este trabajo fue analizar microestructuralmente los componentes que pueden ser afectados según la duración del proceso térmico. Las espinas intramusculares de filetes de bocachico fueron analizadas a través de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), temperatura de desnaturalización del colágeno, microscopía electrónica de barrido y fuerza de corte, sometidas a tres tiempos de duración del tratamiento térmico (1.5; 2 y 3 min). Los resultados indican que el colágeno presente en espinas intramusculares es tipo I. el tratamiento térmico que consiguió la mayor degradación del colágeno fueron tres minutos, coincidiendo con los valores menores para la prueba de fuerza de corte. Los resultados permiten concluir que la degradación del colágeno es iniciada desde el interior de las espinas intramusculares hacia la capa externa, sin que esta última se afecte por el tratamiento térmico.

**Palabras clave:** pescado, tejido conectivo, productos acuícolas,

## Abstract

The presence of intramuscular bone in fish fillets prevents the marketing of these products, which is why the application of physical processes before heat treatment could be an alternative in the degradation of these spines. The aim of this study was to analyze microstructural components that may be affected by the duration of the thermal process. Intramuscular bone bocachico fillets were analyzed by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE), the collagen denaturation temperature, and transmission electron microscopy cutting force, subjected to three times of duration of heat treatment (1.5, 2 and 3 min). The results indicate that intramuscular bone collagen is present in type I. thermal treatment achieved greater collagen degradation were three minutes, coinciding with the lowest values for shear strength test. The results show that collagen degradation is initiated from inside intramuscular bone to the outer layer, although this shows effect of heat treatment.

**Keywords:** fish, connective tissue, aquaculture products, bones, cut.

## Introducción

El bocachico es el nombre común del pez *Prochilodus* sp. nativo de las cuencas hidrográficas de varios países suramericanos. En Colombia hace parte de los peces dedicados a la piscicultura y aunque no es alta la producción, es un pez que se destaca en el consumo tradicional. La presencia de espinas intramusculares ha impedido que sean comercializados los filetes del bocachico, sin embargo el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido la posibilidad de obtener filetes de esta especie (Suarez et al. 2008; Suárez-Mahecha et al. 2009). Los cortes en las espinas intramusculares permiten exponer los componentes internos de la espina. En este sentido es necesario determinar la clase de colágeno asociado a las espinas intramusculares y el efecto que puede tener los procesos térmicos sobre la degradación del colágeno, para permitir la obtención de filetes de esta especie.

En peces, es importante la cantidad de aminoácidos presente en especies provenientes de aguas frías (templadas) y cálidas (tropicales) (Regenstein et al. 2007). En este sentido, el contenido de hidroxiprolina es mucho mayor en el colágeno en peces de aguas tropicales en comparación con peces de agua fría. Comparativamente, los mamíferos poseen cantidades mucho más altas de hidroxiprolina en el colágeno. Estas diferencias son importantes con respecto a la estabilidad del colágeno.

Huesos y espinas están formados por colágeno e hidroxiapatita,  $(Ca_{10} (PO_4)_3 (OH)_2)$  (también conocido como Bioapatite, hidroxil apatita, carbonato de apatita o dahlita) además de otros componentes como lípidos y agua. El colágeno tipo I representa aproximadamente 20% de la masa del hueso y 35% en volumen (Pasteris et al. 2008), y más del 90% de la matriz orgánica del hueso (Piez & Reddi 1984). La principal diferencia entre el colágeno tipo I en diferentes tejidos (por ejemplo, piel y hueso) se refiere a la disposición y reticulación de las fibras de colágeno, en lugar de la composición química de las propias fibras (Bailey et al. 1998; Hanson & Eyre 1996). El colágeno es una molécula de triple hélice compuesta de tres  $\alpha$  cadenas, en los mamíferos, consta de dos hélices idénticas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  uno hélice  $((\alpha_1)_2 \alpha_2$  heterotrímero). La Glicina comprende aproximadamente un tercio de los residuos de aminoácidos en todos los colágenos, además de prolina o hidroxiprolina. El alto contenido de hidroxiprolina del colágeno es inusual entre las proteínas y está directamente relacionada con la estabilidad y la insolubilidad de la molécula. En comparación con el colágeno, las propiedades químicas y mecánicas de la fase mineral del hueso (hidroxiapatita) no se conocen bien. La hidroxiapatita tiene dos funciones en los tejidos mineralizados, uno es en gran parte mecánica (la adición de rigidez y resistencia a la estructura) y el otro es fisiológica (que sirve como reservorio de iones) (M J Glimcher 1998). La hidroxiapatita es una fase mineral, caracterizada por pequeños cristales (Noto 2011). El tamaño y conformación de los cristales de hidroxiapatita en el pescado y huesos de mamíferos son generalmente muy similares (H. Kim et al. 1995), pero existe gran variabilidad en el tamaño del cristal de hidroxiapatita entre tejidos y grupos taxonómicos (P Fratzl et al. 2004; Olszta et al. 2007). El hueso mineralizado contiene aproximadamente 66% de hidroxiapatita en peso y 50% en volumen con relativamente poca variabilidad. Los peces a diferencia de otros vertebrados pueden contener apreciablemente menos mineral (Biltz & Pellegrino 1969), lo que se refleja en la densidad ósea baja en algunas especies de peces (Smith 2008). Las proporciones relativas de los componentes orgánicos e inorgánicos en el hueso, así como las interacciones entre estos componentes son en gran parte responsable de las propiedades del material de hueso como fuerza, dureza y rigidez (Pasteris et al. 2008). El objetivo de esta investigación fue obtener espinas intramusculares de filetes sajados de bocachico sometidas a tratamiento térmico y determinar las variaciones fisicoquímicas y microestructurales.

### **Materiales y método**

Para el desarrollo de la investigación fueron utilizados especímenes de bocachico (*Prochilodus sp*) con peso aproximado de 400 a 500 gramos para obtener las espinas intramusculares a través de disección.

### Determinación de la desnaturalización del colágeno

La determinación de la temperatura de desnaturalización del colágeno está basada en el método descrito por Kimura et al. (1988). Se llena el cilindro del viscosímetro con 0,1% (m/v) de solución de colágeno en ácido acético. El cilindro del viscosímetro se deja inmerso en baño de agua a 30°C y se deja en reposo durante 30 minutos, para permitir que la solución de colágeno se equilibre con la temperatura del agua.

La temperatura fue incrementada por etapas de 10°C hasta 50°C y mantenida en cada temperatura durante 10 minutos. La viscosidad de la solución de colágeno fue medida a intervalos de temperatura de entre 2°C a 30°C y hasta 50°C. La viscosidad fraccional fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Viscosidad fraccional} = \frac{\text{Máxima viscosidad} - \text{viscosidad medida}}{\text{Máxima viscosidad} - \text{viscosidad mínima}}$$

Las curvas de desnaturalización térmica fueron obtenidas graficando las viscosidades fraccionales contra la temperatura. La temperatura de desnaturalización fue llevada a la temperatura a la cual la viscosidad fraccional fue 0,5. Para la determinación de la desnaturalización del colágeno fue utilizado el viscosímetro de cilindros concéntricos marca haake, modelo rotovisco rv 20, sistema m 5, que permite ajustes para mediciones a diferentes temperaturas.

### Preparación de colágeno de espinas intramusculares

Para la obtención del colágeno fue utilizado el método propuesto por Nagai y Suzuki, (2000). Todos los procedimientos de preparación se realizaron a 4°C. Las espinas fueron tratadas con 0,1 N NaOH para eliminar las proteínas no colágenas, a continuación, se lavó con agua destilada y se liofilizó. La descalcificación de las espinas fue realizado con 0.5 M de ácido etilendiaminotetraacético - EDTA (pH 7,4) durante 5 días, cambiando la solución de EDTA una vez al día. Después de lavar el residuo con agua destilada.

La grasa fue eliminada con 10% de alcohol butílico. Después, el residuo fue lavado con agua destilada y se liofilizo. La materia insoluble se extrajo con 0,5 M acético ácido durante 3 días, y el extracto se centrifugó a 20 000x g durante 1 h. El residuo se volvió a extraer con la misma solución durante 2 días, y el extracto se centrifugo en las mismas condiciones. Cada solución viscosa fue mezclada y salada mediante la adición de NaCl a una concentración final de 0,9 M, seguido por la precipitación del colágeno mediante la adición de NaCl (concentración final 2,6 M) a pH neutro (en 0,05 M de Tris-HCl, pH 7,5). El precipitado resultante fue

obtenido por centrifugación a 20 000x g durante 1h y fue disuelto en ácido acético 0,5 M. Posteriormente fue dializado frente a ácido acético 0,1 M, agua destilada, y finalmente liofilizado.

### **Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE se realizó según el método de Weber y Osborn (1969). La muestra de colágeno fue disuelta en fosfato de sodio 0,02 M (pH 7,2) que contiene 1% SDS y 3,5 M de urea. Fue realizada la electroforesis en 3,5% en gel de fosfato 0,1 M buffer (pH 7,2) conteniendo 0,1% de SDS.

### **Cocción de espinas intramusculares**

Muestras de espinas intramusculares de bocachico fueron sometidas a cocción en microondas a 2450 MHz a máxima potencia durante 1.5, 2 y 3 minutos. Este procedimiento se basa en el método usado por Gokoglu et al (2004).

### **Análisis Microestructural MEB**

Para el análisis microestructural fue utilizado un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca FEI, modelo Quanta 200 y registrados los cambios ocurridos en muestras sin cocción y durante 1.5, 2 y 3 minutos de cocción. En este análisis fueron realizadas descripciones de las alteraciones morfológicas de la espina intramuscular. Para la determinación una pequeña cantidad de muestra fue fijada a una tira de papel carbón autoadhesiva y polarizada con una capa fina de oro-platino. Las muestras fueron observadas con un voltaje de 15kV.

### **Análisis de la textura (fracturabilidad)**

Para el análisis de fracturabilidad fue usado el texturómetro marca Stable Micro Systems modelo TA.XT. Plus con celda de carga de 50 kg y utilizada la técnica de doblado en tres puntos, con la que fueron determinados los cambios de fracturabilidad en la espina pre y post cocción. Esta determinación fue realizada mediante la fuerza de compresión y considerada la firmeza expresada en Newton (N) definida como la fuerza mecánica requerida para la deformación del material en el punto de bioruptura. Fue utilizada una probeta de 3.0 mm de diámetro y velocidad de 3 mm/s.

### **Análisis estadístico**

Los datos de los análisis fisicoquímicos e instrumentales fueron analizados con ANOVA de dos vías para un diseño factorial, utilizando el programa R versión

2.12.2, fue realizada comparación múltiple entre tratamientos con test de Tukey empleando la probabilidad de  $p < 0.05$ .

## Resultados y discusión

### Desnaturalización del colágeno

Los resultados del análisis de la temperatura de desnaturalización del colágeno presente en espinas intramusculares de bocachico, obtenidos a través del efecto de la temperatura en la viscosidad son presentados en la tabla 2-1.

**Tabla 2-1. Relación de temperatura y viscosidad en la desnaturalización del colágeno**

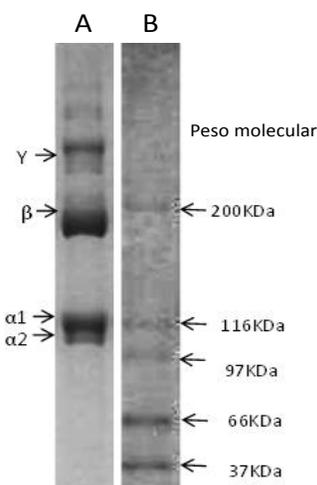
Viscosidad	Temperatura °C
0.95	20
0.90	23
0.80	26
0.5	29
0.2	31
0.18	33
0.12	35
0.04	37
0.0	40

Como resultado la temperatura de desnaturalización presentó valores alrededor de 31°C. Estos valores son más bajos que los reportados para piel de porcino de 37°C y mayores que para colágeno de piel de otras especies de peces marinos como sea-bass Japanes 26.5°C; chub mackerel 25.6°C; bullhead shark 25.0°C (Nagai & Suzuki 2000). Sin embargo Pati et al, (2010) reporta temperatura de desnaturalización en espinas de sea bass de 30°C. en este sentido varios estudios reporta que la temperatura de desnaturalización del colágeno de peces de aguas fría es menor que la que presenta los peces de aguas tropicales (Nagai & Suzuki 2000). La diferencia en temperaturas de desnaturalización puede ser atribuido a la cantidad de colágeno y componentes inorgánicos presente, es estimado que aproximadamente el 30% de los componentes de hueso es el colágeno y el resto son sustancias inorgánicas, como calcio, fósforo, azufre, y nitrógeno (Mori et al. 2012)

La temperatura de desnaturalización de colágenos a partir de diferentes fuentes como piel, huesos, espinas y aletas tiene correlación directa con el contenido de

aminoácidos como prolina e hidroxiprolina (Burjanadze & Kisiriya 1982), además de la conformación espacial de triple hélice de la molécula de colágeno, la cantidad de estos aminoácidos determina la estabilidad intra e intermolecular (Wong 1989). De otra parte la Temperatura de desnaturalización de colágeno de la piel de cerdo y ternera es de 37°C y 40,8°C respectivamente (Ikoma et al. 2003), ambas presentan altos contenidos de estos aminoácidos, mientras que, el colágeno de peces de aguas frías tienen baja temperatura de desnaturalización, porque el contenido de prolina e hidroxiprolina son muy bajos (Sadowska et al. 2003). También es reportada la diferencia en la temperatura de desnaturalización con la variación de la temperatura de su entorno de vida. Por ejemplo, los peces de aguas profundas tienen menor temperatura de desnaturalización en comparación con los peces de agua dulce y los mamíferos terrestres (Pati et al. 2010).

### Determinación del colágeno en espinas intramusculares



**Figura 2-1. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de espinas intramusculares del pescado bocachico (*Prochilodus* sp.) (A) y piel de porcino colágeno tipo I (B).**

La figura 1 muestra la electroforesis SDS-PAGE de las muestras de espinas intramusculares de bocachico y piel de porcino colágeno tipo. Los resultados permiten mostrar la existencia de dos subunidades diferentes de cadena  $\alpha$  en las espinas intramusculares de bocachico, además confirmando la clasificación para colágeno tipo I. Las muestras de espinas intramusculares presentan dos cadenas diferentes ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ) alrededor de 116KDa y 110KDa respectivamente, coincidiendo con otras investigaciones en espinas para peces de aguas tropicales y templadas (Ogawa et al. 2003; Ogawa et al. 2004). Otras investigaciones (Kimura et al. 1991) reportan presencia de colágeno I en dos formas moleculares  $(\alpha 1)_2 \alpha 2$  en carpa como principal componente y  $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 3$  como componentes

secundarios, sin embargo el presente estudio no mostro la presencia de cadenas  $\alpha_3$ , coincidiendo con Nagai y Suzuki (2000). La figura 1 también muestra cadenas moleculares de la forma Y y  $\beta$  presentes en colágeno tipo I en pescado. Siendo el componente  $\beta$  presente en los enlaces cruzados en las cadenas dímeros y el componente Y presente en los enlaces cruzados en cadenas trímeros.

Como ha sido mencionado la estabilidad térmica del colágeno está directamente relacionada con la abundancia de prolina e hidroxiprolina, donde los altos contenidos de estos aminoácidos incrementan la estabilidad térmica debido a la mayor densidad de enlaces cruzados (Wong, 1989). Además la edad también podría afectar la estabilidad de la molécula de colágeno, por la formación de las bases de shiff que confieren mayor estabilidad a la molécula (Suárez et al. 2002), sin embargo los peces utilizados en este trabajo fueron procedentes de cultivo, no sobrepasando los 8 meses de edad.

### Resultado análisis microestructural MEB

El resultado del análisis ultra estructural por medio de microscopia electrónica de barrido a las espinas intramusculares de bocachico, es mostrado en la figura 2.

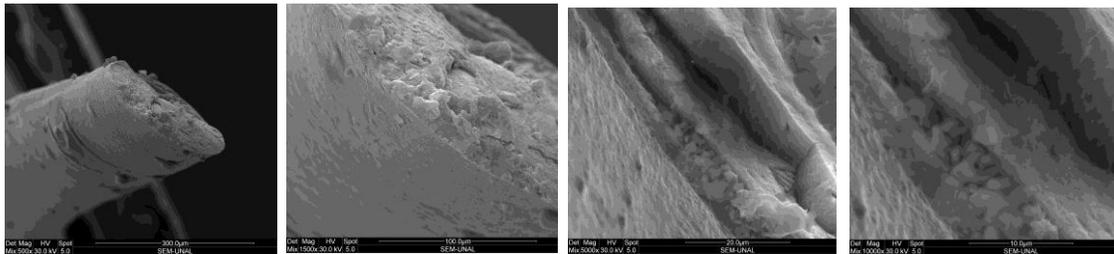
1.5 min

500

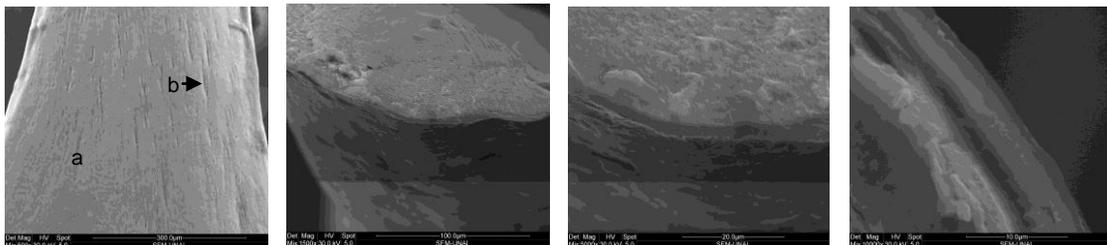
1500

5000

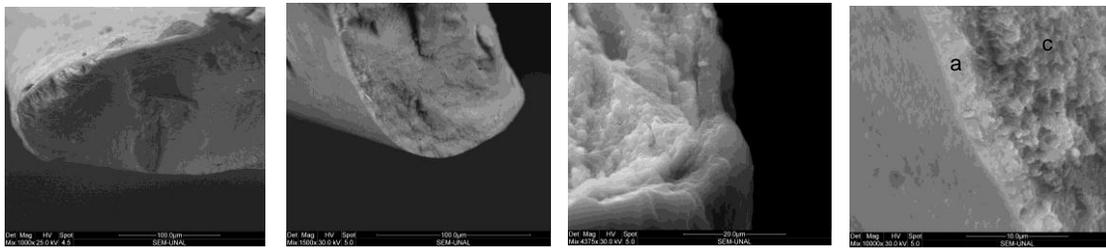
10000



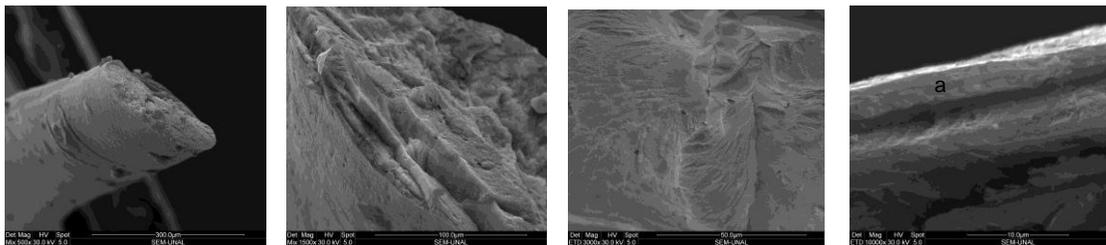
2.0min



3.0 min



### Control



**Figura 2-2. Análisis por medio de microscopía electrónica de barrido a espinas intramusculares de bocachico, sometidas a tres tiempos de tratamiento térmico y cuatro medidas de aumento (500µm, 1500µm, 5000µm y 10000µm).**

En las microfotografías de la muestra control pueden observarse las estructuras presentes en la espina intramuscular. Los análisis permiten mostrar la capa externa (a) fácilmente diferenciable a lo largo de todas las microfotografías, donde están presentes las trabéculas óseas (b) que permiten el paso de los vasos sanguíneos que nutren la espina intramuscular, esta capa no muestra alteraciones observables por efecto del tratamiento térmico. A continuación aparecen diferentes capas formadas por colágeno y cristales de hidroxapatita (c), los cuales en la medida que son afectadas por la duración del tratamiento terminan siendo indistinguibles, muestra de la degradación del colágeno y posiblemente alteración de la estructura molecular de la hidroxapatita. En la medida que incrementa la duración del tratamiento térmico, las estructuras observadas inicialmente pierden el arreglo arquitectónico y la diferenciación entre capas. Los resultados indican que la degradación de las estructuras formadas por componentes orgánicos e inorgánicos es afectada principalmente en las capas internas de la espina intramuscular, evento que no es fácilmente apreciable en la capa externa.

La fortaleza del colágeno y mineralización de las espinas puede ser afectado por la edad, así el tiempo de cultivo de peces es un factor importante que debe ser considerado, cuando se pretende obtener filetes de especies con presencia de espinas intramusculares. Según (Norman et al. 1996; Zioupos et al. 1999), la

concentración de colágeno en el envejecimiento óseo humano contribuye a la porosidad y resistencia a las fracturas de los huesos, mientras que el grado de mineralización del hueso imparte rigidez y resistencia al hueso (Wang et al. 2000). En este sentido esta relación entre la fase mineral y orgánica del hueso no se entiende bien (D. R. Katti et al. 2010). Diversos estudios han sugerido que la mayoría de los cristales de hidroxapatita en el hueso son producidos dentro de las fibrillas de colágeno (Jäger & Peter Fratzl 2000; Weiner et al. 1999), mientras que otros autores (Fritsch & Christian Hellmich 2007; Ch Hellmich & Ulm 2002; Sasaki et al. 2002) sugieren que este mineral es producido fuera de la fibrilla. De esta forma la resistencia a la interacción colágeno/mineral es conferida por los diferentes enlaces moleculares (enlace de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas) (W. R. Walsh et al. 1994).

La disposición de colágeno e hidroxapatita parece ser similar en mamíferos y peces (Bigg et al. 2000). Los peces, sin embargo, están caracterizados por una mayor proporción de los haces de colágeno no calcificada en el esqueleto (Neuman y Mulryan, 1968). Por otra parte, las fibrillas de colágeno de hueso de pescado tienden a ser menos densa que en mamíferos (Lee & M J Glimcher 1991).

### Análisis de la textura (fracturabilidad)

**Tabla 2-2. Análisis de fuerza de corte en espinas intramusculares de bocachico dependiente de la duración del tratamiento térmico.**

Tiempo	Fuerza de corte
1.5	9.25±0.17 <sup>b</sup>
2.0	7.92±0.51 <sup>c</sup>
3.0	6.28±0.38 <sup>d</sup>
Crudo	17.87±0.61 <sup>a</sup>

Letras diferentes en la columna representan diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

Los resultados de la prueba de análisis de fuerza presentan diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) indicando que el menor valor fue para la duración de tres minutos en el tratamiento térmico. Este valor indica que fue alcanzada la mayor degradación del colágeno y cristales de hidroxapatita, aunque en el análisis micro estructural no fueron observadas alteraciones de la capa externa de la espina intramuscular, esta no tuvo influencia en los resultados de la fuerza de corte, posiblemente siendo también degradados sus componentes. Es posible que la cantidad de mineral por unidad de longitud como es determinada en estudios de densidad ósea, sea sólo en parte responsable de las propiedades físicas y de resistencia mecánica y química de la degradación.

## Conclusiones

Los cortes realizados a las espinas intramusculares de bocachico es una técnica que permite obtener filetes de esta especie debido a la baja temperatura requerida para la desnaturalización por procesos térmicos.

Nuevos productos acuícolas como filetes de bocachico podrían ser una alternativa, en la utilización de estos resultados.

## Recomendaciones

Valorar la utilización de filetes de bocachico para la elaboración de pastas y geles, como materia prima en la elaboración de productos piscícolas.

Realizar estudios de vida útil en filetes de bocachico, empleando la técnica citada.

## Bibliografía

- Bailey, A.J., Paul, R.G. & Knott, L., 1998. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106(1–2), pp.1–56. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0047637498001195>.
- Bigp, A. et al., 2000. Structural aspects of the calcification process of lower vertebrate collagen. *Connective Tissue Research*, 41(1), pp.37–43.
- Biltz, R.M. & Pellegrino, E., 1969. The chemical anatomy of bone I. A comparative study of bone composition in sixteen vertebrates. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 51(3), pp.456–466.
- Burjanadze, T. V & Kisiriya, E.L., 1982. Dependence of thermal stability on the number of hydrogen bonds in water- bridged collagen structure. *Biopolymers*, 21(9), pp.1695–1701.
- Fratzl, P et al., 2004. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *Journal of Materials Chemistry*, 14(14), pp.2115–2123.
- Fritsch, A. & Hellmich, Christian, 2007. “Universal”microstructural patterns in cortical and trabecular, extracellular and extravascular bone materials: micromechanics-based prediction of anisotropic elasticity. *Journal of theoretical biology*, 244(4), pp.597–620.

- Glimcher, M J, 1998. The nature of the mineral phase in bone: biological and clinical implications. *Metabolic bone disease and clinically related disorders*, 2, pp.23–50.
- Hanson, D.A. & Eyre, D.R., 1996. Molecular site specificity of pyridinoline and pyrrole cross-links in type I collagen of human bone. *Journal of Biological Chemistry*, 271(43), pp.26508–26516.
- Hellmich, Ch & Ulm, F.-J., 2002. Are mineralized tissues open crystal foams reinforced by crosslinked collagen?—some energy arguments. *Journal of biomechanics*, 35(9), pp.1199–1212.
- Ikoma, T. et al., 2003. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32(3), pp.199–204.
- Jäger, I. & Fratzl, Peter, 2000. Mineralized collagen fibrils: a mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophysical Journal*, 79(4), pp.1737–1746.
- Katti, D.R., Pradhan, S.M. & Katti, K.S., 2010. Directional dependence of hydroxyapatite-collagen interactions on mechanics of collagen. *Journal of biomechanics*, 43(9), pp.1723–1730.
- Kim, H., Rey, C. & Glimcher, Melvin J, 1995. Isolation of calcium- phosphate crystals of bone by non- aqueous methods at low temperature. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(10), pp.1589–1601.
- Kimura, S., Miyauchi, Y. & Uchida, N., 1991. Scale and bone type I collagens of carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 99(2), pp.473–476.
- Lee, D.D. & Glimcher, M J, 1991. Three-dimensional spatial relationship between the collagen fibrils and the inorganic calcium phosphate crystals of pickerel (*Americanus americanus*) and herring (*Clupea harengus*) bone. *Journal of molecular biology*, 217(3), pp.487–501.
- Neuman, W., Mulryan, B., 1968. The discrepancy in the carbonate found in fish bone and blood. *Calcified Tissue International* 2, 237e241.

- Mori, H. et al., 2012. Fish scale collagen of the Pacific saury (< i> Cololabis saira</i>). *Materials Science and Engineering: C*.
- Nagai, T. & Suzuki, N., 2000. Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68(3), pp.277–281.
- Norman, T.L., Nivargikar, S. V & Burr, D.B., 1996. Resistance to crack growth in human cortical bone is greater in shear than in tension. *Journal of biomechanics*, 29(8), pp.1023–1031.
- Noto, C.R., 2011. Hierarchical control of terrestrial vertebrate taphonomy over space and time: discussion of mechanisms and implications for vertebrate paleobiology. In *Taphonomy*. Springer, pp. 287–336.
- Ogawa, M. et al., 2003. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 51(27), pp.8088–8092.
- Ogawa, M. et al., 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (< i> Pogonia cromis</i>) and sheepshead seabream (< i> Archosargus probatocephalus</i>). *Food Chemistry*, 88(4), pp.495–501.
- Olszta, M.J. et al., 2007. Bone structure and formation: a new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 58(3), pp.77–116.
- Pasteris, J.D., Wopenka, B. & Valsami-Jones, E., 2008. Bone and tooth mineralization: why apatite? *Elements*, 4(2), pp.97–104.
- Pati, F., Adhikari, B. & Dhara, S., 2010. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource technology*, 101(10), pp.3737–3742.
- Piez, K.A. & Reddi, A.H., 1984. *Extracellular matrix biochemistry*, Elsevier New York, etc.
- Regenstein, J.M., Zhou, P. & Shahidi, F., 2007. Collagen and gelatin from marine by-products. *Maximising the value of marine by-products*, pp.279–303.

- Sadowska, M., Kołodziejska, I. & Niecikowska, C., 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (< i> Gadus morhua</i>). *Food Chemistry*, 81(2), pp.257–262.
- Sasaki, N. et al., 2002. Atomic force microscopic studies on the structure of bovine femoral cortical bone at the collagen fibril-mineral level. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(3), pp.333–337.
- Smith, R.E., 2008. *Structural Bone Density of Pacific Cod (Gadus macrocephalus) and Halibut (Hippoglossus stenolepis): Taphonomic and Archaeological Implications*. Portland State University. Department of Anthropology.
- Suárez, H. et al., 2002. Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. *Boletim do Instituto de Pesca*, 28(1).
- Suarez, H., Carrasco, S.C.P. & Rodríguez, M.C., 2008. Calidad físico-química y atributos sensoriales de filetes sajados biopreservados de cachama, empacados al vacío bajo refrigeración. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 21(3), pp.330–339.
- Suárez Mahecha, H. et al., 2009. EVALUATION OF NEW TECHNOLOGY TO MITIGATE INTRAMUSCULAR THORNS IN CACHAMA FILLETS. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62(1), pp.4989–4997.
- Walsh, W.R., Ohno, M. & Guzelsu, N., 1994. Bone composite behaviour: effects of mineral-organic bonding. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5(2), pp.72–79.
- Wang, X. et al., 2000. Effect of collagen denaturation on the toughness of bone. *Clinical orthopaedics and related research*, 371, pp.228–239.
- Weiner, S., Traub, W. & Wagner, H.D., 1999. Lamellar bone: structure–function relations. *Journal of structural biology*, 126(3), pp.241–255.
- Wong, D.W.S., 1989. *Mechanism and theory in food chemistry*, Van Nostrand Reinhold.
- Zioupos, P., Currey, J.D. & Hamer, A.J., 1999. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(2), pp.108–116.

## **Microstructural and physicochemical analysis of the collagen present in the intramuscular bones of the bocachico fish (*Prochilodus sp*)**

Análisis microestructural y fisicoquímico del colágeno presente en espinas intramusculares del pescado bocachico (*Prochilodus sp*)

Análise microestrutural e físico-químico do colágeno presente em espinhos intramusculares em peixe bocachico (*Prochilodus sp*)

Héctor Suárez<sup>1</sup>, MVZ, PhD; Oscar Gaitán<sup>2</sup>, Qui, MSc. Consuelo Díaz<sup>1</sup>, IA PhD.

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA.

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

### **Abstract**

**Background:** the presence of intramuscular bones impedes the production and commercialization of fish fillet products; however, the application of physical processes, such as thermal treatments, offers alternatives for the degradation of said bones. **Objective:** the present study aimed to carry out a microstructural and physicochemical analysis of bocachico intramuscular bones subjected to a thermal treatment. **Methods:** the intramuscular bones of bocachico fillets were analyzed using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), denaturalization temperature of the collagen, electron microscopy and cutting force. Three thermal treatment times were used (1.5, 2 and 3 min). **Results:** the collagen present in the intramuscular bones is type 1. The three minute thermal treatment degraded the collagen components in the internal structures of the bones, coinciding with the lowest values of the cutting force test. **Conclusions:** the results lead to the conclusion that the degradation of the collagen initiates in the internal structure of the intramuscular bones and moves towards the external layer which does not present the effects of the thermal treatment.

**Keywords:** *aquaculture, microstructure, fish, connective tissue.*

---

<sup>1</sup> Corresponding author: carrera 30 #45-03 edificio 500C ICTA; email: [hsuarezm@unal.edu.co](mailto:hsuarezm@unal.edu.co)

## Resumen

**Antecedentes:** la presencia de espinas intramusculares en filetes de peces impide la obtención y posterior comercialización de estos productos, motivo por el cual la aplicación de procesos físicos antes del tratamiento térmico podría ser una alternativa en la degradación de estas espinas. **Objetivo:** El alcance del presente estudio fue realizar análisis fisicoquímico y microestructural de espinas intramusculares de bocachico sometidas a proceso térmico. **Métodos:** las espinas intramusculares de filetes de bocachico fueron analizadas a través de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), temperatura de desnaturalización del colágeno, microscopia electrónica de transmisión y fuerza de corte. Fueron utilizados tres tiempos de duración del tratamiento térmico (1.5; 2 y 3 min). **Resultados:** el colágeno presente en espinas intramusculares es tipo I. El tratamiento térmico durante tres minutos degrada los componentes del colágeno en las estructuras internas de la espina, coincidiendo con los valores menores para la prueba de fuerza de corte. **Conclusiones:** los resultados permiten concluir que la degradación del colágeno es iniciada desde el interior de la estructura de la espina intramuscular hacia la capa externa, sin que esta capa muestre efecto del tratamiento térmico.

**Palabras clave:** *acuicultura, microestructura, pescado, tejido conectivo.*

## Resumo

**Antecedentes:** a presença de espinhos intramuscular impede a obtenção de filetes de peixe e posterior comercialização destes produtos, razão pela qual a aplicação de processos físicos antes do tratamento térmico pode ser uma alternativa na degradação desses espinhos. **Objetivo:** A finalidade deste estudo foi realizar o análise físico-químico e microestrutural em espinhos intramusculares bocachico submetidos a processo térmico. **Metodos:** Os espinhos intramusculares de filetes do bocachico foram analisados por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), temperatura de desnaturação do colageno, microscopia electrónica de transmissão e força de corte. Foram utilizados três tiempos de duração do tratamento térmico (1,5, 2 e 3 min). **Resultados:** O colágeno presente em espinhos intramuscular é do tipo I. O tratamento térmico por três minutos degrada os componentes do colágeno nas estruturas internas do espinho, coincidindo com os menores valores para o teste de resistência ao corte. **Conclusões:** Os resultados mostram que a degradação do colageno é iniciada a partir do interior do espinho afetando posteriormente a camada externa, sem que essa camada presente efeito do tratamento térmico. **Palavras-chave:** *aquicultura, microestrutura, o peixe, o tecido conjuntivo.*

## Introduction

Bocachico is the common name of the fish *Prochilodus* sp., native to the watersheds of various South American countries. In Colombia, it is used in fish farming, but without high production, and it is noted for its traditional consumption. The presence of intramuscular bones has impeded the production and commercialization of bocachico fillets; however, the development of new technologies has facilitated the production of fillets from native fish species that have intramuscular bones (Mesa-Granda et al, 2006; Suarez et al, 2008; Suárez-Mahecha et al, 2009). Cuts in intramuscular bones expose the internal components of the bones. However, it is unknown what class of collagen is associated with the intramuscular bones of bocachico. The effect that thermal treatments, which would allow for the production of fillets from this species, could have on the degradation of the collagen is also unknown.

In fish, the molecular structure of collagen is influenced by the quantity of amino acids present in cold-water (temperate) and warm-water (tropical) species (Regenstein et al, 2007). Furthermore, the hydroxyproline content is much higher in the collagen of tropical-water fish as compared to cold-water fish. Comparatively, mammals have much higher hydroxyproline quantities in collagen. These differences are important with respect to the stability of the collagen.

Bones are formed by collagen and hydroxyapatite,  $(Ca_{10} (PO_4)_3 (OH)_2)$  (the latter is also known as Bioapatite, hydroxyl apatite, carbonate of apatite or dahlite), among other components such as lipids and water. Type I collagen represents approximately 20% of the bone mass, 35% of the bone volume and more than 90% of the organic matrix of bones (Pasteris et al, 2008). The principal difference between the type I collagen of different tissues (for example, skin and bone) is related to the arrangement and reticulation of the collagen fibers (Bailey et al, 1998; Hanson and Eyre, 1996). Collagen is a triple helix molecule composed of three chains, which, in mammals, is consisted of two identical helices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  and a third helix  $((\alpha_1)_2 \alpha_2)$  heterotrimeric). Glycine composes approximately one-third of the amino acid residues in all collagen, in addition to proline and hydroxyproline. The high hydroxyproline content is unusual among proteins and is directly related to the stability and insolubility of the molecule. In comparison with collagen, the chemical and mechanical properties of the mineral phase of bone (hydroxyapatite) are not well-known. Hydroxyapatite has two functions in mineralized tissues: one is largely mechanical (rigidity and resistance of the structure); and the other is physiological (serving as an ion reservoir) (Glimcher, 1998). Hydroxyapatite is a mineral phase, characterized by small crystals (Noto, 2011). The size and conformation of the hydroxyapatite crystals are generally similar in fish and mammal bones (Kim et al, 1995), but there is a large amount of variability in the size of hydroxyapatite crystals

between tissues and taxonomic groups (Fratzl *et al*, 2004; Olszta *et al*, 2007). Mineralized bone contains approximately 66% in weight and 50% in volume of hydroxyapatite, with little variability. Fish, contrary to other vertebrates, can contain appreciably less mineral (Biltz and Pellegrino, 1969), which can be reflected in the low bone density of some fish species (Smith, 2008). The relative proportions of organic and inorganic components, as well as the interactions between these components, are largely responsible for the material properties of bone, such as strength, hardness and rigidity (Pasteris *et al*, 2008). The objective of this study was to obtain intramuscular bones from thermal-treated bocachico fillets and determine the ultrastructural and physiochemical variations.

### **Materials and method**

Intramuscular bones were obtained from bocachico fillets (*Prochilodus sp*) that weighed approximately between 400 and 500 grams and were cut into 4mm sections. The fish were obtained from a aquaculture market.

### **Determination of the denaturalization of collagen**

The determination of the denaturalization temperature of the collagen was based on the method described by Kimura *et al*. (1988): filling a cylinder viscosimeter with 0.1% (m/v) of a solution of collagen in acetic acid and immersing the cylinder in a water bath at 30°C for 30 minutes to allow the collagen solution to reach equilibrium with the water temperature.

The temperature was increased by 10°C intervals until 50°C and maintained at each temperature for 10 minutes. The viscosity of the collagen solution was measured at temperature intervals of 2°C between 30°C and 50°C. The fractional viscosity was calculated using the following equation:

$$\text{Fractional viscosity} = \frac{\text{Maximum viscosity} - \text{measured viscosity}}{\text{Maximum viscosity} - \text{minimum viscosity}}$$

The curves of the thermal denaturalization were obtained by graphing the fractional viscosities against the temperature. The denaturalization temperature was seen as the temperature at which the fractional viscosity was 0.5. To determine the denaturalization of the collagen, a concentric-cylinder viscosimeter were used (rotovisco rv20 model with M5 measuring system, Haake), which allows for adjustments for measurements at different temperatures.

### **Preparation of intramuscular bone collagen**

The method proposed by Nagai and Suzuki, (2000) was used to obtain the collagen. All of the preparation procedures were carried out at 4°C. The bones were treated with 0.1 N NaOH in order to eliminate the non-collagen proteins, washed with distilled water and lyophilized. The bones were decalcified with 0.5 of ethylenediaminetetraacetic acid EDTA (pH 7.4) for 5 days, changing the EDTA solution once a day. Afterwards, the residue was washed with distilled water.

The fat was eliminated with 10% butilo alcohol. Then, the residue was washed with distilled water and lyophilized. The insoluble material was extracted with 0.5 M acetic acid for 3 days and the extract was centrifuged at 20,000 x g for 1 h. The residue was again extracted with the same solution for 2 days and the extract was centrifuged with the same conditions. Each viscous solution was mixed and salted with the addition of NaCl for a final concentration of 0.9 M, followed by precipitation of the collagen with the addition of NaCl (final concentration of 2.6 M) at a neutral pH (in 0.05 M of Tris-HCL, pH 7.5). The resulting precipitate was obtained by centrifugation at 20,000 x g for 1h and was dissolved in 0.5 M acetic acid. Afterwards, it was dialyzed with 0.1 M acetic acid and distilled water and finally lyophilized.

### **SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE was carried out according to the method of Weber and Osborn (1969). The collagen sample was dissolved in 0.02 M sodium phosphate (pH 7.2) that contained 1% SDS and 3.5 M urea. The electrophoresis was performed at 3.5% in 0.1 M buffer phosphate gel (pH 7.2) that contained 0.1 % SDS.

### **Cooking of the intramuscular bones**

The bocachico intramuscular bones were cooked in microwaves at 2450 MHz at maximum power for 3 minutes. This procedure was based on the method used by Gokoglu *et al.* (2004).

### **Microstructural Analysis SEM**

The microstructural analysis was carried out using a scanning electron microscope (SEM) (Quanta 200 model, FEI), registering the changes that occurred in the uncooked samples and in the samples that were cooked for 1.5, 2 and 3 minutes. In this analysis, the ultrastructural alterations of the intramuscular bones were described. For the determination, a small quantity of the sample was fixed to a strip of self-adhesive, carbon paper and polarized with a fine layer of gold-platinum. The samples were observed with a voltage of 15kV.

### Texture analysis (fracturability)

A texturometer was used for the fracturability analysis (TA.XT Plus model, Stabel Micro Systems) with a force capacity of 50 kg and using the doubling technique in three points, with the changes of fracturability that were determined in the bones pre- and post-cooking. This determination was carried out through compression force, considering the firmness, expressed in Newton (N), defined as the required mechanical force for the deformation of the material in the point of biorupture. A 3.0 mm diameter cylinder at a rate of 3 mm/s was used.

## Results and discussion

### Denaturalization of the collagen

The results of the denaturalization temperature of the collagen present in the bocachico intramuscular bones, as obtained from the effect of the temperature on the viscosity, are presented in Table 1.

**Table 3. Relationship of temperature and viscosity in the denaturalization of the collagen**

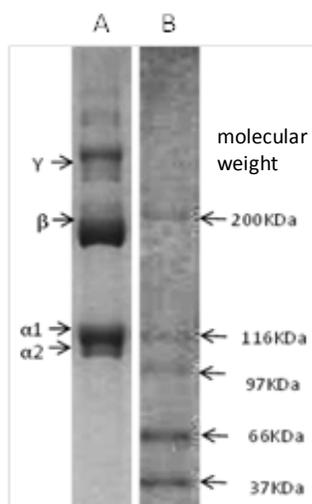
Viscosity	Temperature °C
0.95	20
0.90	23
0.80	26
0.5	29
0.2	31
0.18	33
0.12	35
0.04	37
0.0	40

The denaturalization temperature presented values around 31<sup>0</sup>C. These values are lower than those reported for porcine skin (37<sup>0</sup>C) and higher than those for collagen of the skin of other marine fish species, such as the Japanese sea-bass (*Lateolabrax japonicus*) 26.5<sup>0</sup>C; chub mackerel (*Scomber japonicus*) 25.6<sup>0</sup>C; and bullhead shark (*Carcharhinus leucas*) 25.0<sup>0</sup>C (Nagai and Suzuki 2000). However, Pati *et al.* (2010) reported a denaturalization temperature in sea bass bones of 30<sup>0</sup>C. That is to say, various studies have reported that the denaturalization temperature of collagen of cold-water fish is lower than that of tropical-water fish (Nagai and Suzuki, 2000). The difference in the denaturalization temperatures can be attributed to the quantity of collagen and the inorganic components present; it is estimated that approximately 30%

of the components of bones are represented by collagen and the rest are inorganic substances such as calcium, phosphorus, sulfur and nitrogen (Mori *et al*, 2012).

The denaturalization temperature of collagen from different sources, such as skin, bones and fins, has a direct correlation with the content of amino acids, such as proline and hydroxyproline (Burjanadze and Kisiriya, 1982). In addition to the spatial conformation of the triple helix of the collagen molecule, the quantity of these amino acids determines the intra- and intermolecular stability. On the other hand, the denaturalization temperature of collagen from the skin of pigs and heifers is 37°C and 40.8°C, respectively (Ikoma *et al*, 2003), both presenting high contents of amino acids; meanwhile, the collagen of cold-water fish has a low denaturalization temperature because the proline and hydroxyproline contents are low (Sadowska *et al*, 2003). Furthermore, a difference in denaturalization temperatures has been reported with variation in the habitat temperature. For example, deep-water fish have a lower denaturalization temperature when compared to fresh-water fish and terrestrial mammals (Pati *et al*, 2010).

### Determination of the collagen in the intramuscular bones



**Figure 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of bocachico intramuscular bone (*Prochilodus* sp.) (A) and porcine skin type I collagen (B).**

Figure 1 presents the SDS-PAGE electrophoresis of the bocachico intramuscular bone and porcine skin type I collagen samples. The results indicate the existence of two different subunits of chain  $\alpha$  in the bocachico intramuscular bones, confirming the type I

collagen classification. The intramuscular bone samples presented two different chains ( $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ ) around 116KDa and 110KDa, respectively, coinciding with other studies on bones for tropical- and temperate-water fish (Ogawa *et al*, 2003; Ogawa *et al*, 2004). Other studies (Kimura *et al*, 1991) have reported the presence of collagen 1 in two molecular forms  $(\alpha 1)_2 \alpha 2$  in carp as the principal component and  $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 3$  as secondary components. However, the present study did not show the presence of  $\alpha 3$  chains, coinciding with Nagai and Suzuki (2000). Figure 1 also shows the molecular chains of the Y and  $\beta$  forms present in type I collagen in fish, with the  $\beta$  component present in the cross-links in the dimer chains and Y present in the cross-links in the trimer chains.

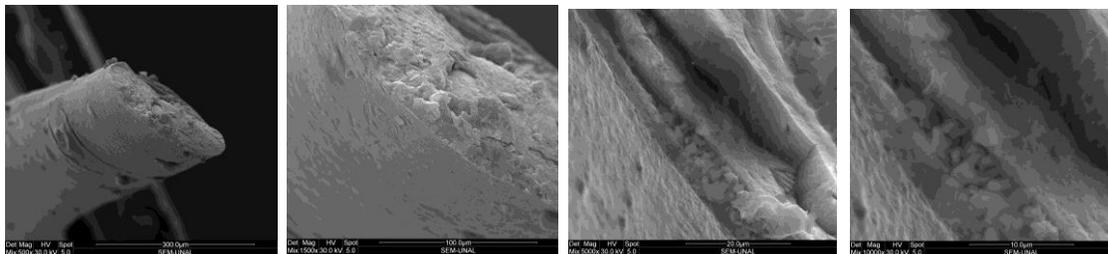
As previously mentioned, the thermal stability of collagen is directly related to the abundance of proline and hydroxyproline, where high contents of these amino acids increase the thermal stability due to the higher density of the cross-links. Furthermore, age can also affect the stability of the collagen molecule due to the formation of Schiff bases that confer higher stability to the molecule (Suárez *et al*, 2002). However, the fish used in this study was from aquaculture and did not surpass the age of 8 months.

### Microstructural analysis results SEM

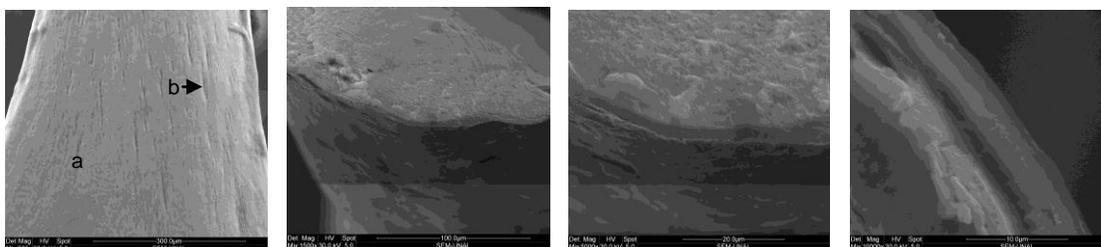
The result of the ultrastructural analysis with a scanning electron microscope on bocachico intramuscular bones subjected to a thermal process is presented in Figure 2.

1.5 min cooking time

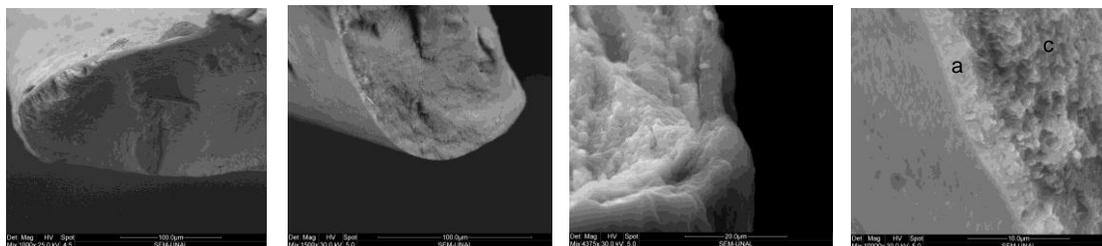
Magnification      500      1500      5000      10000



2.0 min cooking time



### 3.0 min cooking time



### Control

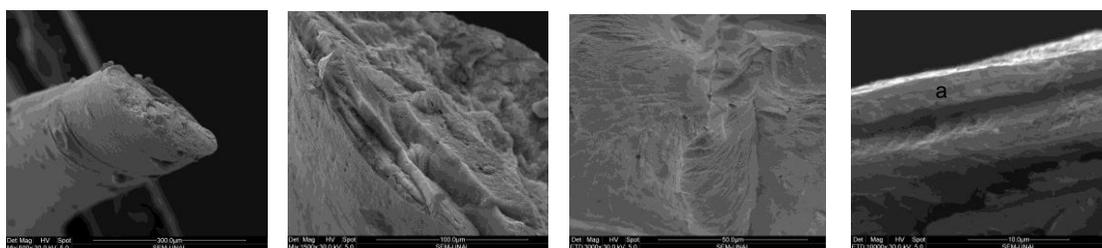


Figure 2. Analysis by scanning electron microscope of bocachico intramuscular bones subjected to three periods of a thermal treatment and five measuring magnifications (500µm, 1500µm, 5000µm and 10000µm).

In the microphotographs of the control sample, the structures present in the intramuscular bones can be observed. The analyses permitted the demonstration of the external layer (a), easily discernable throughout all of the microphotographs, where the bone trabeculae are present (b), which permit the passage of the blood vessels that supply nutrients to the intramuscular bones. This layer did not present observable alterations due to the thermal treatment. In addition, there are different layers formed by collagen and hydroxyapatite crystals (c), which were affected by the duration of the thermal treatment, being indistinguishable as a result of the degradation of the collagen and possibly from the alteration of the molecular structure of the hydroxyapatite. Insofar as the duration of the thermal treatment increased, the observed structures began to lose their architectural arrangement and differentiation between the layers. The results indicate that the degradation of the structures formed by organic and inorganic components is principally seen in the internal layers of the intramuscular bones, an event that is not readily discernable in the external layer.

The strength of the collagen and the mineralization of the bones can be affected by age, so the culture time of fish is an important factor that must be considered when contemplating the production of fillets from species that contain intramuscular bones.

According to (Norman *et al*, 1996; Zioupos *et al*, 1999), the concentration of collagen with aging, for example in human bones, contributes to porosity and resistance to fractures, while the mineralization grade of the bones imparts rigidity and resistance to the bone (Wang *et al*, 2000). In this sense, the relationship between the mineral and organic phases of bones is not well understood (Katti *et al*, 2010). Various studies have suggested that the majority of hydroxyapatite crystals in bones are produced within the collagen fibrils (Jäger and Fratzl, 2000; Weiner *et al*, 1999), while other authors (Fritsch and Hellmich, 2007; Hellmich and Ulm, 2002; Sasaki *et al*, 2002) have suggested that this mineral is produced outside of the fibrils. In this manner, resistance to the interaction of collagen/mineral is conferred by the different molecular links (hydrogen link, Van der Waals interactions, hydrophobic interactions) (Walsh *et al*, 1994).

The arrangements of collagen and hydroxyapatite appear to be similar in mammals and fish (Bigp *et al*, 2000). Fish, however, are characterized by a higher proportion of non-calcified collagen in the skeleton (Neuman and Mulryan, 1968). On the other hand, collagen fibrils in fish bones have a lower density than in mammals (Lee and Glimcher, 1991).

### Texture analysis (fracturability)

Table 4. Analysis of the cutting force in bocachico intramuscular bones affected by the thermal treatment.

Time (minutes)	Cutting force
1.5	9.25±0.17 <sup>b</sup>
2.0	7.92±0.51 <sup>c</sup>
3.0	6.28±0.38 <sup>d</sup>
Raw	17.87±0.61 <sup>a</sup>

Different letters in the column represent significant differences ( $p < 0.05$ )

The results of the force analysis test present statistical differences ( $p < 0.05$ ), with the lowest value seen in the three minute thermal treatment. This value resulted from the highest degradation of the collagen and hydroxyapatite crystals, although in the microstructural analysis, no alterations were observed in the external layer of the intramuscular bones. This did not influence the results of the cutting force, possibly because it also contained degraded components. It is possible that the quantity of mineral per unit of length, as determined in studies on bone density, is only partly responsible for the physical properties, the mechanical resistance and the chemical degradation.

## Bibliography

- Bailey A.J, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev* 1998; 106:1–56.
- Bigi A, Koch MH, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K. Structural aspects of the calcification process of lower vertebrate collagen. *Connect Tissue Res* 2000; 41:37–43.
- Biltz RM, Pellegrino E.. The chemical anatomy of bone I. A comparative study of bone composition in sixteen vertebrates. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 1969; 51:456–466.
- Burjanadze TV, Kisiriya EL. Dependence of thermal stability on the number of hydrogen bonds in water- bridged collagen structure. *Biopolymers* 1982; 21:1695–1701.
- Fratzl P, Gupta HS, Paschalisb EP, Roschgerb P. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *J Mater Chem* 2004; 14:2115–2123.
- Fritsch A, Hellmich C. Universal”microstructural patterns in cortical and trabecular, extracellular and extravascular bone materials: micromechanics-based prediction of anisotropic elasticity. *J Theor Biol* 2007; 244:597–620.
- Glimcher MJ. The nature of the mineral phase in bone: biological and clinical implications. *Metabolic bone disease and clinically related disorders* 1998; 2:23–50.
- Hanson DA, Eyre DR.. Molecular site specificity of pyridinoline and pyrrole cross-links in type I collagen of human bone. *J Biol Chem* 1996, 271; 43:26508–26516.
- Hellmich Ch, Ulm FJ. Are mineralized tissues open crystal foams reinforced by crosslinked collagen?—some energy arguments. *J biomech* 2002; 35:1199–1212.
- Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, Walsh D, Mann S. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticas*. *Int J Biol Macromol* 2003; 32:199–204.
- Jäger I, Fratzl P. Mineralized collagen fibrils: a mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophys J* 2000; 79:1737–1746.

- Katti DR, Pradhan SM, Katti KS. Directional dependence of hydroxyapatite-collagen interactions on mechanics of collagen. *Journal of biomechanics* 2010; 43:1723–1730.
- Kim H, Rey C, Glimcher, Melvin J. Isolation of calcium- phosphate crystals of bone by non- aqueous methods at low temperature. *J Bone Mineral Res*, 1995; 10:1589–1601.
- Kimura S, Miyauchi Y, Uchida N. Scale and bone type I collagens of carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Com Biochem* 1991; 99:473–476.
- Lee DD, Glimcher M J. Three-dimensional spatial relationship between the collagen fibrils and the inorganic calcium phosphate crystals of pickerel (*Americanus americanus*) and herring (*Clupea harengus*) bone. *J mol biol* 1991; 217:487–501.
- Neuman W, Mulryan B. The discrepancy in the carbonate found in fish bone and blood. *Calcif Tissue Int* 1968; 2:237e241.
- Mori H, Tone Y, Shimizu K, Zikihara K, Tokutomi S, Ida T, Ihara H, Haraet M. Studies on fish scale collagen of the Pacific saury (*Cololabis saira*). *Mater Sci Eng* 2012; 33:174–181.
- Mesa-Granda M, Cerón-Muñoz M, Olivera M, Botero-Aguirre M. Rayos x: una herramienta para la cuantificación de algunas estructuras óseas en cachama blanca, *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). *Actual Biol* 2006; 28::67-73.
- Nagai T, Suzuki N. Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. *Food Chem* 2000; 68:277–281.
- Norman TL, Nivargikar SV, Burr DB. Resistance to crack growth in human cortical bone is greater in shear than in tension. *J biomechan* 1996;29:1023–1031.
- Noto CR. Hierarchical control of terrestrial vertebrate taphonomy over space and time: discussion of mechanisms and implications for vertebrate paleobiology. In *Taphonomy* 2011. Springer, pp. 287–336.
- Ogawa M. Moody MW, Portier RJ, Bell J, Schexnayder MA, Losso JN.. Biochemical properties of black drum and sheepshead seabream skin collagen. *J Agri food Chem* 2003; 51:8088–8092.

- 
- Ogawa M, Portie RJ, Moody MW, Bell J, Schexnayder MA, Losso JN. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chem* 2004; 88:495–501.
- Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim YY, Kaufman MJ, Douglas EP, Gower LB.. Bone structure and formation: a new perspective. *Mater Sci Eng* 2007; 58:77–116.
- Pasteris JD, Wopenka B, Valsami-Jones E. Bone and tooth mineralization: why apatite? *Elements* 2008; 4:97–104.
- Pati F, Adhikari B, Dhara, S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresour technol* 2010; 101:3737–3742.
- Regenstein JM, Zhou P, Shahidi F. Collagen and gelatin from marine by-products. *Maximis val marine prod* 2007;1:279–303.
- Sadowska M, Kołodziejska I, Niecikowska C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem*; 2003; 81:257–262.
- Sasaki N, Tagami A, Goto T, Taniguchi M, Nakata M, Hikichi K. Atomic force microscopic studies on the structure of bovine femoral cortical bone at the collagen fibril-mineral level. *J Mater Sci: Materials in Medicine* 2002; 13:333–337.
- Smith RE. Structural Bone Density of Pacific Cod (*Gadus macrocephalus*) and Halibut (*Hippoglossus stenolepis*): Taphonomic and Archaeological Implications. Portland State University. Department of Anthropology 2008:289p
- Suárez H, De francisco A, Beirão L. H. Block J, M, Saccol A, Pardo-Carrasco S., Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. *Bol Inst Pesca*; 2002;28:101-110.
- Suarez H, Pardo S, Rodríguez MC. Calidad físico-química y atributos sensoriales de filetes sajados biopreservados de cachama, empacados al vacío bajo refrigeración. *Rev Col Cien Pec* 2008; 21:330–339.
- Suárez Mahecha, H. Pardo SC, Cortés RM, Ricaurte S, Rojano B.. Evaluation of new technology to mitigate intramuscular thorns in cachama filets. *Rev Fac Nal Agro* 2009; 62:4989–4997.

Walsh WR, Ohno M, Guzelsu N. Bone composite behaviour: effects of mineral-organic bonding. *J Mater Sci: Materials in Medicine* 1994; 5:72–79.

Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Hubbard GB, Athanasiou KA, Agrawal CM.,. Effect of collagen denaturation on the toughness of bone. *Clin Orthop Related Res* 2000; 371:228–239.

Weiner S, Traub W, Wagner HD. Lamellar bone: structure–function relations. *J struc biol* 1999; 126:241–255.

Zioupos P, Currey JD, Hamer AJ. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *J Biom Mater Res*; 1999:45108–116.