



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

OBTENCIÓN DE MATERIAL COLAGENOSO DE
ESCAMAS DE PESCADO Y SU ESTERILIZACIÓN
CON RADIACIÓN GAMMA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

SAENZ SERRANO NANCY

NOMBRE DE LOS DIRECTORES

DR. DANIEL LUNA ZARAGOZA

DRA. LORENA ROMERO SALAZAR



TOLUCA, EDO. DE MÉX. MARZO DE 2017.

RESUMEN

Debido a la alta demanda de órganos y tejidos en nuestro país, se hace necesario encontrar alternativas para poder satisfacer esta necesidad. En la actualidad una ingeniería relativamente nueva, llamada ingeniería de tejidos utiliza andamios, llamados biomateriales, para hacer crecer células sobre estos y formar órganos y tejidos artificialmente. El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano y tiene un alto potencial de regeneración cuando es introducido en el cuerpo humano debido a que funciona como matriz extracelular en la mayoría de los órganos y tejidos.

En el presente trabajo se obtuvo colágeno de escamas de pescado y se caracterizó tanto a la escama de pescado, como al biomaterial obtenido por microscopía electrónica de barrido, espectroscopia de infrarrojo, difracción de rayos X, análisis termogravimétrico y espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X. Se encontró que la escama contiene hidroxiapatita y que al darle tratamiento ácido se elimina la hidroxiapatita de la escama. La escama tratada es colágeno.

Posteriormente el colágeno obtenido de las escamas se irradiaron con radiación gamma de Co-60 a dosis de 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy, 20 kGy, 25 kGy y 30 kGy, posteriormente se realizó la prueba de esterilidad, donde se encontró que la dosis de esterilidad es de 5 kGy.

El colágeno obtenido de las escamas que se irradiaron, también se caracterizaron por microscopía electrónica, por espectroscopia de infrarrojo, por difracción de rayos X y por análisis termogravimétrico, donde se encontró que la irradiación gamma no modifica la estructura química básica del colágeno, solo por microscopia electrónica de barrido se encontró que a dosis de 30 kGy hay rupturas de las cadenas de colágeno.

ABSTRACT

Due to the high demand of organs and tissues in our country, it is necessary to find alternatives to be able to satisfy this need. At present a relatively new engineering called tissue engineering uses scaffolds, called biomaterials, to grow cells over them to form organs and tissues artificially. Collagen is the most abundant protein in the human body and it has a high potential for regeneration when it is introduced into the human body because it works as an extracellular matrix in most organ and tissues.

In present work we obtained collagen from fish scales and it was characterized both the fish scale and the biomaterial obtained by scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, X-ray diffraction, thermogravimetric analysis and X-ray photoelectron spectroscopy. It was found that the scale contains hydroxyapatite and when the acid treatment is giving, its removes the hydroxyapatite from the scale. The treated scale is collagen.

Subsequently the collagen from the scales were irradiated with Co-60 gamma radiation at doses of 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy, 20 kGy, 25 kGy and 30 kGy, subsequently the sterility test was performed, the sterility dose was 5 kGy.

The collagen from the scales that were irradiated were also characterized by electron microscopy, infrared spectroscopy, X ray diffraction and thermogravimetric analysis, it was found that the irradiation gamma did not modify the basic chemical structure of collagen, only by scanning electron microscopy it was found that at doses of 30 kGy there are breakdown of collagen chains.

Contenido

RESUMEN.....	i
Acrónimos.....	III
INTRODUCCION.....	1
1. FUNDAMENTOS	3
1.1. Biomateriales.....	3
1.2. Polímeros.....	4
1.2.1. Polímeros en aplicaciones médicas.....	5
1.3. Biopolímeros naturales para la fabricación de andamios.....	6
1.4. Colágeno.....	7
1.4.1. Colágeno tipo I.....	10
1.5. <i>Carpa común (Cyprinus carpio Linnaeus, 1758)</i>	13
1.6. Desarrollo de la piel y escamas.....	15
1.7. Composición de las escamas.....	16
1.8. Esterilización	17
1.8.1. Esterilización por radiación gamma.....	18
2. MARCO EXPERIMENTAL	20
2.1. Microscopia electrónica de barrido.....	20
2.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier.....	21
2.3. Difracción de rayos X.....	22
2.4. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.....	23
2.5. Análisis termogravimétrico.....	24
2.6. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X.....	24
2.7. Métodos de Extracción de Colágeno de Escamas.....	25
3. METODOLOGIA	26
3.1. Obtención de las escamas.....	27
3.2. Limpieza.....	27
3.3. Desmineralización	28
3.4. Secado	29
3.5. Irradiación	29
3.6. Caracterización	30
3.6.1. Caracterización fisicoquímica.....	30
3.6.1.1. Microscopia electrónica de barrido.....	31

3.6.1.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier.....	32
3.6.1.3. Difracción de rayos X.....	33
3.6.1.4. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente.....	33
3.6.1.5. Análisis termogravimétrico.....	34
3.6.1.6. Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X.....	34
3.6.2. Caracterización biológica.....	34
3.6.2.1. Prueba de esterilidad.....	34
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Obtención de material colagenoso.....	36
4.2. Resultados de Microscopia Electrónica de Barrido.....	36
4.3. Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier.....	40
4.4. Difracción de rayos X.....	42
4.5. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente.....	43
4.4. Análisis termogravimétrico.....	45
4.7. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X.....	46
4.7 Pruebas de esterilidad.....	50
5. CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	53

Acrónimos

DRX	Difracción de rayos X
EDS	Espectroscopia de Dispersión de energía rayos X (Energy-dispersive X-ray spectroscopy)
ECM	Matriz extracelular (Extra celular matrix)
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy)
Gli	Glicina
HAp	Hidroxiapatita
Hip	Hidroxiprolina
ICP-Masas	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (Inductively coupled plasma mass spectrometry)
MEB	Microscopia electrónica de barrido
Pro	Prolina
TGA	Análisis Termogravimétrico (Thermogravimetric analysis)
XPS	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X. (X-ray photoelectron spectroscopy)

INTRODUCCION

Las aplicaciones del colágeno son amplias, ya que la investigación en biomateriales ha crecido a tal grado de generar diversos andamios con diversas características. Células y factores de crecimiento son introducidos en los andamios para reparar tejidos lesionados. Muchos de los andamios son principalmente de colágeno, esta proteína ha sido utilizada en aplicaciones biomédicas debido a su capacidad de formar y mantener la estructura de los tejidos y órganos (Stevens, M, 2005). Los andamios a base de colágeno, participan en la señalización celular y definen la adhesión, la diferenciación, el crecimiento y la supervivencia celular. En comparación con otros polímeros naturales, los biomateriales a base de colágenos muestran biodegradabilidad, antigenicidad y biocompatibilidad (Bain, G. 1996).

Debido a estas ventajas, los biomateriales a base de colágeno han sido empleados en el desarrollo de sustitutos de tejido y órganos (Hwang, Yu-Jer, 2012). El biomaterial colagenoso derivado de escamas de pescado puede ser utilizado como un andamio para hacer crecer células corneales, el cual podría ayudar a personas que necesitan un trasplante de córnea, ya que las escamas de pescado están compuestas de proteínas del tejido conectivo y colágeno (41 a 81%), cubiertas con sales de calcio (S.Krishnan, et al, 2012). Por lo tanto, la escama de pescado puede ser una fuente alternativa eficaz para la producción de colágeno (Pati, et al, 2010).

Sin embargo, estas técnicas aún no se practican en países subdesarrollados. Para reducir la escasez de donantes de córnea mundial también se ha optado por el uso de las córneas animales como sustituto. Numerosos estudios experimentales con primates, cerdos, vacas, ovejas, perros y peces han sido investigados para el trasplante de córneas (Ekser, et al., 2012). Precisamente la escama de pescado tiene una morfología, curvatura y composición proteínica similar a la córnea humana (Yuan, et. al., 2014). Una estrategia para diseñar una alternativa al uso de las escamas de pescado es la transformación de estas en un andamio acelular y descalcificado, que facilite la regeneración de las células corneales. Este sustituto al contener colágeno es biocompatible con el tejido huésped para restaurar la

función corneal, evitando la reacción de rechazo por ser acelular (Van Essen, et al, 2011).

Actualmente en Europa, como parte de un proyecto de la Unión Europea (COST BM 1302) una matriz derivado de las escamas de pez tilapia es examinado como un sustituto de tejido corporal. Este se compone de colágeno de tipo I (tipo de colágeno fibrilar.) y muestra una estructura similar a la córnea (Hos, et al ,2014).

En México la lista de espera para órganos y tejidos, al 26 de mayo del 2016, es de 20,265 pacientes (CENATRA, 2016), de los cuales 7,417 están en espera de un trasplante de córnea y esta lista todos los días va aumentando. La alternativa actual es el trasplante de córnea alogénico, donde la córnea proviene de donadores fallecidos. No obstante una ingeniería relativamente nueva, llamada ingeniería de tejidos utiliza andamios, llamados biomateriales, para hacer crecer células sobre estos y formar órganos y tejidos artificialmente.

En este trabajo de tesis de la licenciatura en biotecnología se planteó como objetivo extraer el material colagenoso de escamas de pescado y esterilizarlo con radiación gamma de Co-60, la hipótesis consideró que la esterilización no alteraría la estructura química del biomaterial.

Por ello, en este trabajo escrito se inicia con un capítulo de fundamentos de biomateriales, en particular sobre colágeno. En ese mismo capítulo se describe el objeto de estudio, es decir las escamas, su composición y esterilización. Debido a la importancia de las técnicas de caracterización pre y post tratamiento, se incluyen las técnicas en el Capítulo 2. Se destinó un tercer capítulo a la Metodología empleada desde la obtención de escamas, su desmineralización hasta la esterilización. El capítulo 4 se destina a presentar los resultados de la tesis y las discusiones. Por último se presentan las, conclusiones y perspectivas.

1. FUNDAMENTOS

En este capítulo se describen de manera breve conceptos y antecedentes necesarios para la investigación, se abordará desde lo que es un biomaterial debido a que el material de referencia de la tesis es colágeno y entra en el grupo de biomateriales poliméricos, también se describe la especie de pez de la cual se extrajeron las escamas así como las propiedades de las escamas de pescado y su composición. Finalmente se describen los métodos de esterilización de los biomateriales.

1.1. Biomateriales

Un gran número de materiales con estructuras y superficies controladas están siendo desarrollados para la reconstrucción de tejidos. La estrategia general consiste en usar materiales con características biológicas similares a las matrices extracelulares y así controlar el ambiente de las células que se sembrarán en dicho biomaterial (Kleinman, et al, 2003).

Los materiales candidatos a ser utilizados en la ingeniería de tejidos tienen la doble función de dirigir la morfogénesis in vivo y servir de soporte para la estructura y función del implante durante su integración en los tejidos del huésped. El material o soporte ideal para regeneración tisular debe tener ciertas propiedades (Polak , et al, 2005) estar compuesto por un material biocompatible, actuar como soporte para el crecimiento en tres dimensiones, poseer una red de poros interconectados que permitan la vascularización, integrarse al tejido huésped sin la formación de cicatriz, tener una textura superficial y composición química que promuevan la adhesión celular y la adsorción de moléculas biológicas como los factores de crecimiento, tiene que biodegradarse al mismo tiempo que se repara el tejido dañado, generando

productos que puedan ser fácilmente excretados sin ser tóxicos, tener propiedades mecánicas adaptadas a las necesidades del tejido a regenerar, tener propiedades mecánicas adaptadas a las necesidades del tejido a regenerar, producirse comercialmente bajo regulaciones previamente existentes con un costo que permita su uso rutinario en clínica (Román, 2008).

En la actualidad no existe una definición totalmente aceptada Para el término “biomaterial”. Nora Graña define a los biomateriales como cualquier sustancia o material, ya sea sintético o natural o combinación de ambos que pueden ser utilizados como un todo o como una parte de un sistema que es considerado parte del tratamiento, aumento o reemplazo de algún tejido, órgano o función del cuerpo (Morales, Olayo, 2010).

Los biomateriales solidos se pueden clasificar en tres grupos: metálicos, cerámicos, poliméricos o materiales compuestos. Debido a que el material de referencia de la tesis es colágeno y entra en el grupo de polímeros, se describen a continuación.

1.2. Polímeros

Los polímeros son largas cadenas de moléculas que consisten en un número de repeticiones de unidades pequeñas, llamadas “monómeros”. En general, un polímero se puede formar por adición y por condensación Existe una gran variedad de polímeros estos se pueden clasificar según su origen, como sintéticos, por ejemplo polietileno o polímeros naturales que incluyen al colágeno, la celulosa, el ácido desoxirribonucleico (DNA) (Buddy, Ratner, et al, 1996) y polímeros derivados sintetizados artificialmente, de sustancias naturales como los celuloideos.

Una de las claves para la consideración de polímeros para bioaplicaciones futuras es la biocompatibilidad con el huesped y la degradación de sus características al final de un periodo de tiempo. También se pueden diseñar con gran flexibilidad modificando su estructura y composición dependiendo a las necesidades (Maquet, et al, 1997). Las aplicaciones en biopolímeros son variadas por ejemplo sirven para

acarrear y liberar drogas, como implantes, andamios para regeneración tisular, suturas, entre otras (Rathner, et al, 1996).

1.2.1. Polímeros en aplicaciones médicas

El estudio de la naturaleza química de los polímeros se inició a principios de 1920, cuando Staudinger encontró que el almidón, la goma natural y la celulosa, consisten de cadenas largas de átomos de carbono y éstos se mantienen unidos por enlaces covalentes. En la década de 1930, Wallace. H. Carothers, sintetizó polímeros lineales en los laboratorios Du Pont, basándose en los estudios de Staudinger, y en el año de 1953 Staudinger, se hizo acreedor del Premio Nobel de Química.

Los biopolímeros basados en aplicaciones médicas pueden clasificarse en cuatro grupos, polímeros inertes, naturales, bioactivos y biodegradables. Esta clasificación no separa claramente un grupo de polímeros de los otros. Cuando la preocupación por la carga de materiales poliméricos no biodegradables aumenta drásticamente, la situación conduce al uso de biodegradables en su lugar. En particular, si las funciones de los polímeros están completas, deben ser retiradas del cuerpo en aplicaciones biomédicas. Los polímeros biomédicos en la medicina y la cirugía son utilizados e incluyen aplicaciones intracorpóreas, paracorpóreas y extracorpóreas (dentro, interconexión o fuera del cuerpo, respectivamente). Las aplicaciones se dan a continuación (Narayan, 2009).

Los Materiales intracorpóreos como dispositivos temporales pueden ser, aparatos quirúrgicos, suturas, adhesivos, clavos intermedulares poliméricos, y placas óseas compuestas de fibras de polímeros, también existen los dispositivos semipermanentes como son, Tendones, mallas de refuerzo, válvulas cardíacas, reconstrucción de las articulaciones y cemento óseo, dispositivos tubulares de interconexión y lentes de contacto e implantes de administración de fármacos.

Y finalmente los dispositivos complejos como son, diálisis (riñón), oxigenador de la sangre (pulmones artificiales), sistema de administración de insulina (páncreas artificial) y corazón artificial.

A pesar de que la producción de polímeros medicinales es pequeña comparada con otros plásticos industriales, el número de personas que se han beneficiado es invaluable.

Los polímeros participan prácticamente en todos los aspectos de la medicina, aunque la ciencia de los biomateriales poliméricos es mayor que la de otros polímeros de peso molecular alto. Algunos polímeros han sido diseñados para uso médico, por ejemplo, hidrogeles para lentes de contacto blandos, ácido poliglicólico para suturas absorbibles, resina especial de intercambio iónico, membranas semipermeables y más. Aunque la producción puede ser baja en algunos casos, los beneficios para los pacientes son lo suficientemente altos como para justificar el apoyo de la industria a los altos costos de investigación y desarrollo. La mayor parte del progreso de la ingeniería a través de los siglos depende del descubrimiento y la disponibilidad de nuevos materiales (Narayan, 2009).

1.3. Biopolímeros naturales para la fabricación de andamios

Estos materiales son complejos y su caracterización es difícil. Varios polímeros de este grupo son estudiados, el biopolímero más conocido de origen natural es el colágeno. Tienen la ventaja de ser biocompatibles, se obtienen fácilmente y de forma económica, son fácilmente modificable químicamente, poseen estructuras por la que las células tienen mayor afinidad y son, por lo tanto, un estímulo positivo para la adhesión y el crecimiento celular. Los biopolímeros se clasifican dependiendo de que posean una naturaleza proteica o de tipo carbohidrato (Roman, 2003).

Existen diversos tipos de polímeros naturales que se han utilizado en aplicaciones de ingeniería de tejidos: polisacáridos y polipéptidos. Los polisacáridos son una cadena de unidades de azúcar unidas por un enlace glicosídico, mientras que los

polipéptidos son una cadena de aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Dado que estos polímeros proceden de la naturaleza, son a menudo biocompatibles y biodegradables enzimáticamente. La principal ventaja para el uso de polímeros naturales es que a menudo contienen moléculas biofuncionales que ayudan en la unión, proliferación y diferenciación de las células. Las desventajas principales de los polímeros naturales son que su degradación puede inhibir la función celular y su velocidad de degradación puede no ser fácilmente controlada. Dado que la actividad enzimática puede variar entre los distintos tipos, se puede determinar si hay polímeros naturales cuando se colocan dentro de un tejido específico. Además, las propiedades mecánicas de los polímeros naturales son muy bajas, aunque las formas químicas para el reticulado de estos polímeros han demostrado mejorar la estabilidad estructural.

1.4. Colágeno

Las investigaciones del colágeno a nivel molecular comenzaron en la década de 1950, con las investigaciones de Highberger y Schmitt lograron caracterizar el colágeno molecular con ayuda de un microscopio electrónico. Ramachandran y Kartha en 1954 y Rich y Crick en 1955 desarrollaron modelos para el estudio de la estructura de tripe hélice del colágeno y finalmente Boedtker y Doty en 1956 determinaron las propiedades fisicoquímicas de la molécula de colágeno en solución, al comparar la estriación cruzada la cual se encuentra aproximadamente a los 70 nm o el equivalente a una cuarta parte de la fibrilla de colágeno en la que su longitud es de 280 nm; Smithch fue el primero en desarrollar el concepto de una serie escalonada de moléculas en las fibrillas nativas en el año de 1956.

Otras investigaciones bioquímicas y de proteínas condujeron a un conocimiento detallado de la estructura del colágeno y finalmente resultaron en el descubrimiento, por Miller y colegas (Miller y Matukas, 1969, Miller, 1971) de que las fibrillas de colágeno con bandas de 70 nm observadas en un microscopio electrónico están formados por tres tipos de colágeno diferentes pero homólogos (Mayne, et al, 1987).

Actualmente hay al menos 19 diferentes tipos de colágeno presentes en el cuerpo, el más abundante de estos, es el tipo I de colágeno, los tipos II y III de colágeno se encuentran también fácilmente en la matriz extracelular de muchos tejidos a continuación se muestra en la tabla 1.1 algunos tipos de colágeno y sus funciones.

Tabla 1.1 Algunos Tipos de colágeno y sus características

Tipo	Composición de la molécula	Características estructurales	Tejidos Representativos
Colágeno Fibrilar			
I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha 2(I)]$	Fibras de 300 nm de longitud	Piel, tendón, hueso, ligamentos, dentina, tejidos intersticiales, estroma corneal
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Fibras de 300 nm de longitud	Cartílago, humor vítreo
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibrillas de 300 nm de longitud; A menudo con tipo I	Piel, músculo, vasos sanguíneos
V	$[\alpha 1(V)]_3$	Fibrillas de 390 nm de longitud con dominio N-terminal globular; A menudo con tipo I	Similar al tipo I; También cultivos celulares, tejidos fetales, estroma corneal
Colágenos Asociados a Fibras			
VI	$[\alpha 1(VI)][\alpha 2(VI)]$	Asociación lateral con el tipo I; Dominios globulares periódicos	La mayoría de los tejidos intersticiales
IX	$[\alpha 1(IX)][\alpha 2(IX)][\alpha 3(IX)]$	Asociación lateral con el tipo II; dominio globular N-terminal; Glicosaminoglucano unido	Cartílago, humor vítreo;
Hoja de formación de colágenos			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$	Red bidimensional	Todas las láminas basales

FUENTE: K. Kuhn, 1987, en R. Mayne y R. Burgeson, eds., *Structure and Function of Collagen Types*, Academic Press, p. 2; M. van der Rest y R. Garrone, 1991, *FASEB J.* **5**: 2814.

El colágeno es un componente de la matriz extracelular de los tejidos incluyendo la piel, el hueso, el cartílago, el tendón y el ligamento. Por lo que el colágeno es el principal componente del tejido músculo-esquelético, es importante en la función celular, y le proporciona fuerza al tejido.

El colágeno es un componente de la matriz extracelular de los tejidos incluyendo la piel, el hueso, el cartílago, el tendón y el ligamento. Por lo que el colágeno es el principal componente del tejido músculo-esquelético, es importante en la función celular, y le proporciona fuerza al tejido.

El colágeno se compone de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas formando una triple hélice, proporcionando estabilidad en los tejidos (Lodish, et al, 2000). Su unidad estructural fundamental es una proteína larga (300 nm), con un diámetro de 1,5 nm que consta de tres subunidades en espiral. Cada cadena contiene alrededor de 1050 aminoácidos. Eventualmente se encontró que todos los colágenos contenían segmentos helicoidales de tres cadenas con estructura similar.

Las propiedades de cada tipo de colágeno se deben principalmente a segmentos que interrumpen la triple hélice y que se pliegan en otros tipos de estructuras tridimensionales (Lodish, et al, 2000).

En general, el colágeno de animales marinos tienen un bajo contenido de hidroxiprolina (aminoácido no esencial, derivado de la prolina.) y consecuentemente su temperatura de desnaturalización es baja aproximadamente de 25 °C a 30 °C (Nagai and Suzuki, 2000), en comparación al colágeno contenido en porcinos que es aproximadamente 37°C (Nagai and Suzuki, 2000).

En algunos países religiosos existen restricciones en cuanto a la aplicación de colágeno derivado de mamíferos es por ello que se requiere investigar fuentes alternativas para la obtención de colágeno tipo uno (Tang, Saito, 2015).

Las tres cadenas polipeptídicas son similares en secuencia, con una secuencia repetitiva de glicina-X-Y, donde X e Y son por lo general prolina y / o hidroxiprolina. La triple estructura helicoidal se forma a través de enlaces de hidrógeno y enlaces peptídicos presentes en la glicina y adyacentes al péptido de grupo carbonilo (Yamauchi, 1998).

El colágeno es degradado en la superficie de los tejidos, por las enzimas colagenasas, que pueden unirse a la triple hélice. Esto da lugar a que la hélice se disgregue y aumente la exposición de las cadenas polipeptídicas a enzimas de degradación adicionales (Fratzl, 2008).

El colágeno está presente en la curación de las heridas epiteliales, promoviendo la coagulación de la sangre, además, el colágeno contiene dominios de adhesión celular. Esto ha hecho que el colágeno sea utilizado como un andamio para el cultivo de células, como fibroblastos. Los andamios de colágeno permiten que los fibroblastos se desarrollen y estos fibroblastos a su vez, mantienen la producción de colágeno. También se ha encontrado que los hepatocitos aislados de ratas se unen y secretan albúmina mientras crecen en los andamios compuestos de colágeno y quitosano. El crecimiento y la síntesis de proteoglicanos de queratinocitos corneales se ha llevado a cabo sobre esponjas de colágeno (Fratzl, 2008).

1.4.1. Colágeno tipo I

La estructura del colágeno se caracteriza por tener una forma de triple hélice con una separación de aproximadamente 8,6 nm y tiene un peso molecular de

aproximadamente 300 kDa, una longitud de 300 nm con un diámetro de 1,5 nm, Cada molécula de colágeno de tipo I contiene dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena $\alpha 2(I)$.

El colágeno tipo I posee repeticiones de tripletes de aminoácidos de la forma Gly-X-Y donde Gly es la glicina X prolina y Y es hidroxiprolina (Figura 1.1 a)). La hidroxiprolina se deriva de la prolina mediante hidroxilación postraduccional mediada por la prolilhidroxilasa (Kucharz, 1992). Ocupa aproximadamente el 10% en la composición del colágeno, ofrece formas de cuantificar el colágeno o sus productos de degradación en presencia de otras proteínas (Woessner Jr, 1961).

El colágeno también contiene hidroxilisina, la hidroxilisina se forma a partir de lisina en el retículo endoplásmico mediante hidroxilación enzimática por lisilhidroxilasa. La formación de residuos de hidroxilosilo permite la unión de componentes de azúcar, un requisito inalterable para la molécula de colágeno para formar una estructura de triple hélice (Piez, 1985) y estabilizar la triple hélice. Debido a su naturaleza alicíclica, endurecen la cadena y forman enlaces de hidrógeno que limitan la rotación (Piez, 1984) ambos aminoácidos forman aproximadamente el 23% de la cadena de colágeno.

El colágeno tipo I es una glicoproteína con un contenido de hidratos de carbono inferior al 1%. Los componentes de azúcar son una sola unidad de galactosa o un disacárido de galactosa y glucosa O-glicosídicamente unido a través de residuos de hidroxilisina. Debido a esta secuencia peptídica particular, una cadena se enrolla hacia la izquierda y las dos cadenas restantes reúnen en una triple hélice dirigida a la derecha (Figura 1.1 b)), donde los residuos Gly están en el centro de la triple hélice y donde las cadenas laterales de X y Y están en la superficie de la hélice (Van der Rest y Garrone, 1991).

Además, hay regiones de 9 o 26 aminoácidos en los extremos de la cadena amino terminal y carboxilo de la molécula que no están incorporados en la estructura helicoidal. Estas regiones no helicoidales se denominan telopeptidos.

En el cuarto nivel de orden, las moléculas de triple hélice escalonan longitudinalmente y bilateralmente en fibras con distinta periodicidad. Las moléculas de colágeno se agregan a través de la fibrifogénesis en microfibras que consta de cuatro a ocho moléculas de colágeno. Estas fibras alcanzan de 10 a 500 nm de diámetro dependiendo del tipo de tejido y la etapa de desarrollo (Nimni, 1988). Las hélices triples están escalonadas en 67 nm con un espacio adicional de 40 nm entre las moléculas sucesivas (Figura 1.1 c)).

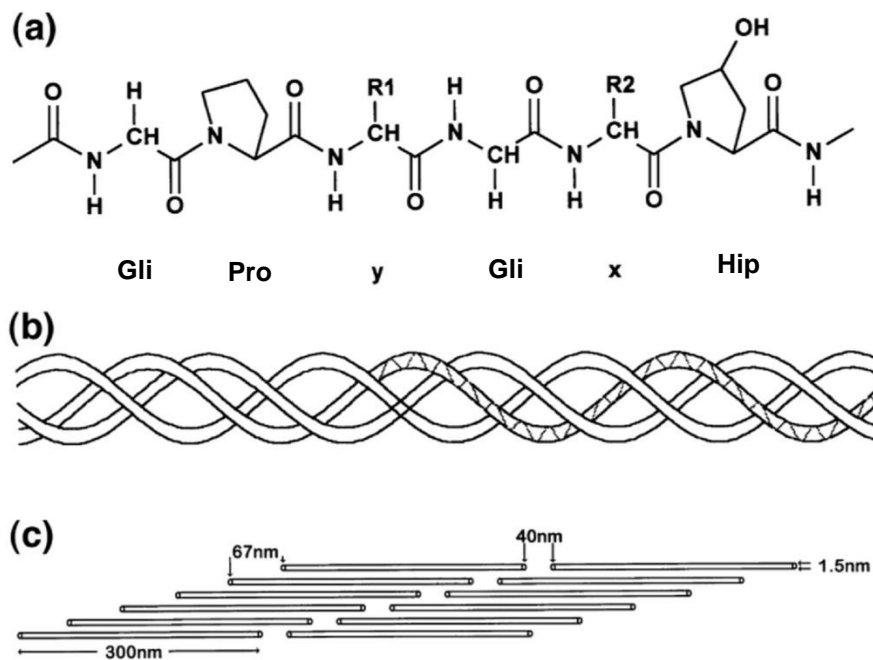


Figura 1. 1. Estructura de colágeno tipo 1 a) se muestra la estructura primaria con la secuencia de los aminoácidos. b) Hélice secundaria izquierda y hélice terciaria derecha c) estructura cuaternaria de manera escalonada.

FUENTE: Wolfgang Friess 1997 Collagen – biomaterial for drug delivery, Review, p.115; European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 45:113–136

La temperatura de desnaturalización del colágeno tipo I es proporcional al contenido de hidroxiprolina (Sutherland, 2013), A concentraciones mayores de hidroxiprolina mayor será la estabilidad térmica. Así la composición de los aminoácidos contenidos en el colágeno tipo uno varía entre especies animales.

1.5. *Carpa común (Cyprinus carpio Linnaeus, 1758).*

Es una especie originaria de Asia, que fue introducida en Europa en los siglos XI y XII. Alrededor del año 1831, los inmigrantes llegados a Estados Unidos la introdujeron en el río Hudson. En México las referencias de introducción de la especie para acuicultura datan de 1960, proveniente de Brasil. (Gaspar, Hernández, 2013).

Posee un cuerpo alargado y algo comprimido. Labios gruesos. Dos pares de barbillas en el ángulo de la boca, más cortas en el labio superior (Figura 1.2). Está cubierto por escamas gruesas, aleta dorsal y anal con espina aserrada en la parte anterior, dientes faríngeos. Alcanza los 60 cm y un peso de 9 Kg (Gaspar, Hernández, 2013).

La base de la aleta dorsal larga presenta de 17 a 22 rayos ramificados y una espina dorsal fuerte en frente; el contorno de aleta dorsal cóncavo anterior, la aleta anal presenta de entre 6 y 7 rayos suaves, el borde posterior de la 3ª espina dorsal y la aleta anal tiene espinillas afiladas. Línea lateral contiene de 32 a 38 escamas.

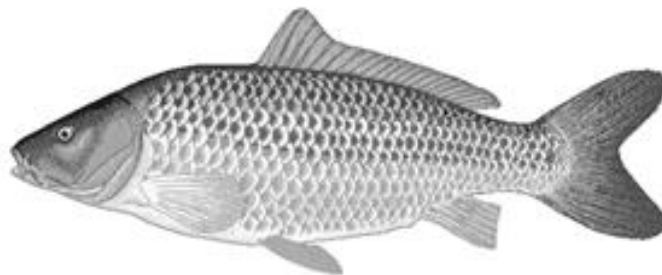


Figura 1. 2. *Cyprinus carpio Linnaeus, 1758*

La carpa común vive en los ríos, en áreas inundadas y en las aguas poco profundas confinadas, tales como lagos y reservorios de agua. El espectro ecológico de la carpa es amplio. El mejor crecimiento se obtiene cuando la temperatura del agua oscila entre 23 °C y 30 °C. Los peces pueden sobrevivir fríos períodos de invierno. Tolera salinidad de aproximadamente 5 %. El rango de pH óptimo es de 6.5-9.0. Las especies pueden sobrevivir a una baja concentración de oxígeno (0.3-0.5 mg / litro) así como a la sobresaturación.

La carpa es omnívora, con una alta tendencia al consumo de alimentos animales, tales como insectos de agua, larvas de insectos, gusanos, moluscos y zooplancton. El consumo de zooplancton es dominante en los estanques de peces donde la densidad de población es alta. También consume tallos, hojas y las semillas de las plantas acuáticas y terrestres, las plantas acuáticas deterioradas, etc. Consecuentemente esto provoca el incremento de la turbidez en el medio, causando serios problemas en el sistema (Gaspar, Hernández, 2013).

El crecimiento diario de la carpa puede ser de 2 a 4 por ciento de peso corporal. Las carpas pueden alcanzar de 0.6 a 1.0 kg de peso corporal en una temporada en los estanques de peces policultivos de las zonas subtropicales y tropicales. El crecimiento es mucho más lento en la zona templada, en donde los peces alcanzan de 1 a 2 kg de peso corporal después de 2 a 4 estaciones de cría (FAO, 2016).

Los desechos como las escamas que se descartan en las fábricas y mercados donde procesan la carpa, por lo que pueden ser fuentes potenciales de extracción de colágeno. Esta reutilización de subproductos (residuos) como fuentes viables para el colágeno, apoyará los ingresos de los piscicultores, y disminuirá el flujo de volumen de los residuos generados (Pal y Suresh, 2015).

1.6. Desarrollo de la piel y escamas

En los peces adultos la epidermis está compuesta de varias regiones (figura 1.3); la capa superficial está compuesta de una capa de células, la cual provee el color ornamental externo, superficialmente está cubierta por una gran cantidad de glicosaminoglicanos, los cuales protegen a su cuerpo de las bacterias, hongos y parásitos. El estrato intermedio de la piel está compuesto de una capa variable de células glandulares unicelulares productoras de glicosaminoglicanos (Meruane y Rojas, 2012).

La tercera región de la epidermis es la capa basal, cuya función es anclar el epitelio a la membrana basal, durante su desarrollo estas células cumplen funciones adicionales como: la producción inicial del colágeno dérmico, interactuar con el mesénquima subyacente para el desarrollo de las escamas (Le Guellec et al, 2004).

La dermis se divide en dos regiones, la primera capa o estrato laxo está compuesto de fibras de colágeno suelto, numerosos fibroblastos, nervios, células pigmentadas y escamas. La segunda capa profunda o estrato compacto, se caracteriza por una organización de colágeno denso con pocos fibroblastos. En algunas regiones la dermis se organiza de forma lamelar obteniendo un aspecto transparente similar a la córnea (Meruane, et al, 2012).

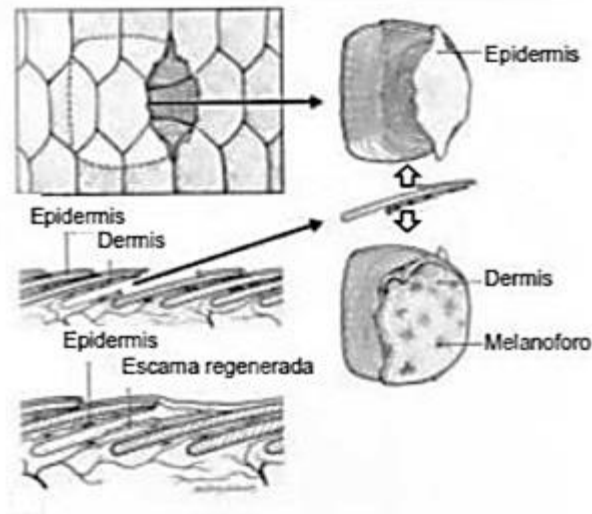


Figura 1. 3. Desarrollo de las escamas en la piel.

1.7. Composición de las escamas

Las escamas de pescado tienen un origen dérmico y contienen calcio en diversos peces telosteos y en peces condriticios, sin embargo en escamas placoideas se asemejan más a un odonton, que a las escamas típicas (Mancel Merciane 2012).

Las escamas se pueden clasificar en cuatro tipos dependiendo de la especie de pescado (Gil Duran, et al, 2016).

Existen una clasificación de tres tipos de escamas, las escamas cosmoides, ganoides y elasmoides. Las escamas elasmoides envuelven a las escamas ganoides de tal forma que se simplifican en un hueso laminar parcialmente calcificado (Merciane, 2012).

Existen dos tipos de escamas elasmoides, las ctenoideas son escamas concéntricas de protección en los márgenes posteriores y las cicloideas, las cuales exhiben anillos concéntricos sobre la superficie llamados circuli. Los circulis determinan la edad del pescado ya que durante el crecimiento de pez, nuevos circulis se van agregando en determinados periodos de tiempo (Kardong, 2008).

Las escamas de esta especie (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) son escamas cicloideas y son similares a las escamas ctenoideas (del griego "cteno", que significa peine) con un suave borde exterior (figura 1.4 a). Son comunes a los peces con rayos de aleta blanda, como carpa o salmón. Las escamas cicloideas pueden exhibir una gama de formas y tamaños las escamas de la carpa tienen una configuración única (figura 1.4 b). Mostrando un patrón de anillos de crecimiento similares a los del tronco de un árbol, este patrón indica la madurez de los peces (Steinmetz y Muller, 1991).

Las escamas elasmoides están compuestas por dos capas, el límite externo de la capa está altamente mineralizada compuesta principalmente apatita o carbonato de calcio dependiendo del pez (Chen et al, 2014) la capa interna o elasmodina, es un composito de mineral y colágeno tipo I, ordenada en forma de pliegues similar a los pliegues que tiene la madera.

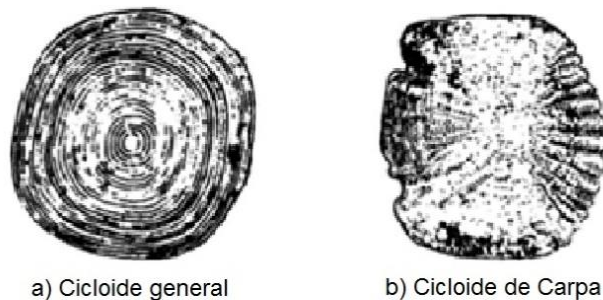


Figura 1.4. Tipos de escamas cicloides a) cicloide general y b) cicloide de carpa (Langer et al, 1962)

1.8. Esterilización

Existen numerosos tipos de biomateriales, la condición para que puedan ser aplicados en humanos es que deben de ser estériles para evitar las infecciones en

el cuerpo humano ya que pueden tener repercusiones serias en la salud e incluso pueden causar la muerte del receptor. La esterilidad se define como la ausencia de microorganismos viables (Dziedzic- Goclawsca, 2001).

Cerca de un tercio de las infecciones causadas por el implante de un biomaterial se puede prevenir siguiendo estrictamente los criterios de control de infecciones establecidas, pero en un período de reducciones de costes sanitarios esto es difícil por el nivel de garantía de esterilidad. La probabilidad de que un implante permanezca estéril después de la exposición a un proceso de esterilización dado, es una en un millón. Por lo tanto, con el fin de asegurar la esterilidad, se emplean una serie de métodos de esterilización físicas y químicas (Dziedzic- Goclawsca, 2001).

1.8.1. Esterilización por radiación gamma

La eficacia de la radiación ionizante para inactivar microorganismos se conoce desde 1886 cuando Roentgen comprobó esta propiedad con ayuda de los rayos X. en 1899, Pierre y Marie Curie estudiaron en diferentes materiales y tejidos, la acción de los rayos beta y gamma que se originaban en isotopos naturales. Marie Curie continuo las observaciones realizadas por Holwek y Lacassagne, y en 1929 publico en un artículo teórico sobre la inactivación de las bacterias por radiación (Dziedzic-Goclawsca, 2001).

El termino radiación ionizante abarca todas las radiaciones con exceso de energía que tengan la capacidad de producir ionización en la materia por ejemplo los rayos X y gama. La absorción de un julio de energía ionizante por un kilogramo de material irradiado se define como un gray (Gy) (Dziedzic-Goclawsca, 2001).

La esterilización por radiación es un método en el que la temperatura se incrementa mínimamente por lo que puede ser usado, cuando el método de esterilización por calor cause daño al producto expuesto (Diziedzic-Goclawsca, 2001).

La inactivación de los microorganismos por métodos físicos y químicos sigue una función exponencial negativa, en consecuencia, es posible calcular la probabilidad de supervivencia de estos si se conoce la cantidad de microorganismos presentes en el producto y su resistencia al agente esterilizante (Kairiyama, 2013).

El propósito de la esterilización con radiación ionizante es la reducción de carga microbiana del producto hasta llegar a niveles aceptables. En la actualidad, se cuenta con normas internacionales para la esterilización con radiaciones ionizantes de dispositivos médicos como es el caso de ISO 11137-1; 2; Y 3:2006.

2. MARCO EXPERIMENTAL

La caracterización es la evaluación de la estructura y propiedades macroscópicas que determinaran el desempeño como el posible uso del material en condiciones específicas (Morales y Olayo, 2010).

En el capítulo dos se puntualizan las técnicas que se utilizaron para caracterizar las escamas de pescado, una descripción detallada de estas técnicas va más allá del propósito de este trabajo; pero básicamente, para caracterizar la estructura del material, este se estimula ya sea con partículas, ondas o mecánicamente y de su respuesta se infiere la estructura, esta respuesta se puede clasificar en dos, la primera como una dispersión, dentro de esta clasificación se encuentra, la dispersión elástica (poco o ningún cambio de energía) y la dispersión inelástica (cambios en la energía); la segunda clasificación es una respuesta más sofisticada ya que genera imágenes del material. Finalmente es necesario llevar acabo la caracterización biológica en donde se expone el material al medio.

2.1. Microscopia electrónica de barrido.

La microscopia electrónica de barrido se fundamenta en el principio de la microscopia óptica pero en lugar de que se haga incidir un haz de luz este es sustituido por un haz de electrones, los cuales, van a barrer la muestra y mandar la señal al detector disponible, en este trabajo se ocupó un detector de rayos X (EDS), que es el que recibe los rayos X procedentes de cada uno de los puntos de la superficie sobre los que pasa el haz de electrones. Como la energía de cada rayo X es característica de cada elemento, podemos obtener información analítica cualitativa y cuantitativa de áreas del tamaño que deseemos de la superficie. Por ello se conoce esta técnica como Microanálisis por EDS.

Dentro de las consideraciones de preparación de la muestra debemos tener en cuenta que las muestras no conductoras generalmente deben de estar recubiertas

con una capa muy fina de oro o carbón, lo que les otorga propiedades conductoras. La técnica de preparación de las muestras se denomina “sputtering” o pulverización catódica. En general con este tipo de microscopia, se puede llegar a una resolución de aproximadamente 100 Å.(Sanjuan, 2016)

2.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier.

La espectroscopia de infrarrojo es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Como las demás técnicas espectroscópicas, puede ser utilizada para identificar un compuesto o investigar la composición de una muestra. La espectrometría infrarroja se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula.

Se fundamenta en la interacción de la materia con la radiación, esta interacción provoca procesos como la absorción o la difusión. Cuando una molécula absorbe o emite un fotón, su estado energético cambia. En general este cambio se manifiesta como un cambio en la energía traslacional de la molécula, y como un cambio en su estado electrónico vibracional o rotacional. Como las energías asociadas a cada uno de estos cambios son diferentes, exceptuando los cambios traslacionales, los estados energéticos de las moléculas están cuantizados, consecuentemente, los procesos de absorción y emisión solo pueden darse a determinadas frecuencias de los fotones. Además, el conjunto de frecuencias a las que se produce este proceso es propio de cada molécula.

El funcionamiento se basa en el principio del interferómetro de Michelson. La radiación de la fuente, divide el haz dirigiendo la mitad de la radiación a un espejo fijo y la otra mitad a un espejo móvil. Los dos rayos se recombinan de una manera constructiva o destructiva dependiendo de la posición del espejo. El resultado es un interferograma que representa a la intensidad en función del tiempo, la cual se

convierte en la transformada de Fourier vía algoritmo matemático, en un diagrama de intensidad en función de la frecuencia o conocido como espectro (LSAP, 2016).

2.3. Difracción de rayos X.

Los rayos X se producen cuando una partícula cargada con suficiente energía cinética, es frenada rápidamente. Los electrones generalmente, son las partículas utilizadas y la radiación se obtiene de un tubo de rayos X que contiene una fuente de electrones y dos electrodos metálicos. El alto voltaje entre los electrodos dirige los electrones hacia el ánodo, o blanco, y al golpear sobre él, con una elevada velocidad producen rayos X en el punto de impacto que se irradian en todas direcciones. La mayor parte de la energía cinética de los electrones que golpean el blanco se convierte en calor y menos del 1% se transforma en rayos X (Hammond, 2009).

Los rayos X emitidos son de diferentes longitudes de onda y la variación de intensidad con λ depende del voltaje del tubo. La intensidad es cero a cierta longitud de onda, llamada λ lím, aumenta rápidamente a un máximo y entonces disminuye sin un límite hacia la parte de longitudes de onda larga. Cuando se aumenta el voltaje del tubo, la intensidad de todas las longitudes de onda aumenta y la posición de la λ mínima y máxima se desplaza a longitudes de onda más cortas. No todos los electrones se frenan de la misma forma, algunos se detienen con un solo impacto y pierden toda su energía, otros experimentan sucesivos impactos, perdiendo fracciones de su energía cinética de forma sucesiva hasta perderla toda (Hammond, 2009).

Los electrones que son detenidos en un solo impacto son los que producen fotones de máxima energía, es decir rayos X de mínima longitud de onda, estos electrones transfieren toda su energía a un fotón. La difracción es esencialmente un fenómeno de dispersión en el que participan un gran número de átomos. Puesto que los átomos están dispuestos periódicamente en una red, los rayos dispersados por ellos

tienen unas relaciones de fase definidas entre ellos, estas relaciones de fase son tales que en la mayoría de las direcciones se produce una interferencia destructiva sin embargo en algunas direcciones se produce una interferencia constructiva y se forman rayos difractados (Hammond, 2009)..

Un difractograma de rayos X recoge los datos de intensidad en función del ángulo de difracción (2θ), obteniéndose una serie de picos que proporcionan información útil de la muestra analizada. Una fase cristalina dada, siempre produce un patrón de difracción característico, ya sea en estado puro o como constituyente de una mezcla. Este hecho es la base para el uso de la difracción como método de análisis químico. El análisis cualitativo se realiza mediante la identificación del patrón de difracción de esa fase. A partir del difractograma de una muestra se puede comparar en patrones almacenados en una biblioteca (Hammond, 2009).

2.4. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

La espectrometría masas por plasma acoplado inductivamente ICPMS es altamente sensible y determina de forma cuantitativa a casi todos los elementos presentes en la tabla periódica que tengan un potencial de ionización menor que el potencial de ionización del argón a concentraciones muy bajas (nanogramo/litro o parte por trillón, ppt). Se basa en el acoplamiento de un método para generar iones (plasma acoplado inductivamente) y un método para separar y detectar los iones (espectrómetro de masas).

La muestra, en forma líquida, es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador donde es transformada en aerosol gracias a la acción de gas argón. Dicho aerosol es conducido a la zona de ionización que consiste en un plasma generado al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia. En el interior del plasma se pueden llegar a alcanzar temperaturas de hasta 8000 K. En estas condiciones, los átomos presentes en la muestra son ionizados. Los iones pasan al

interior del filtro cuadrupolar a través de una interfase de vacío creciente, allí son separados según su relación carga/masa. Cada una de las masas sintonizadas llega al detector donde se evalúa su abundancia en la muestra. (Universidad de Burgos, 2007).

2.5. Análisis termogravimétrico.

El análisis termogravimétrico es idóneo para medir una propiedad física de un sistema (sustancia o un material) en función de la temperatura.

En un análisis termogravimétrico se registra, de manera continua, la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, o bien en función de la temperatura, o bien en función del tiempo. En el primer caso se denomina experimento dinámico en donde, la temperatura de la muestra va aumentando de manera controlada normalmente de forma lineal con respecto al tiempo, y en el segundo experimento denominado isoterma, la temperatura se mantiene constante durante todo el experimento. La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo o de la temperatura se denomina termograma o curva de descomposición térmica (UAM, 2008).

2.6. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X.

Esta técnica es capaz de obtener la composición química de varias superficies de material hasta 1 nm de profundidad. La mayoría de los elementos pueden ser detectados excepto el hidrógeno. El interés principal de esta técnica es examinar la composición, es decir, el porcentaje atómico de cada uno de los componentes, revela qué elementos químicos están presentes en la superficie, por ejemplo carbono y oxígeno; nos informa sobre la naturaleza de enlaces químicos que existe

entre estos elementos. Un procesamiento apropiado de los datos conduce a la composición elemental de la muestra (Benoit, 2016).

La interacción de fotones con la materia hace que los átomos inestables X que lo componen, permita a los electrones en órbita romper la atracción que los mantiene en sus orbitales. A continuación, abandonan el átomo con una energía cinética, viajado a una distancia en función de la energía y el material de la que operan. Si su energía es suficiente, los electrones alcanzan la superficie, se extraen a partir del material y pasan el vacío. Los electrones emitidos, bajo el efecto de los fotones se recogen y se cuentan de acuerdo con sus energías cinéticas, la relación se puede calcular por energías de enlace (Benoit, 2016).

2.7. Métodos de Extracción de Colágeno de Escamas.

Existen diversos métodos para obtener el colágeno de escamas de diferentes especies de pescados, una de ellos utiliza ácido acético 0.5 M para separar el colágeno y se precipita con NaCl 2.6 M y presencia de Tris (hidroximetil) aminometano 0.05 M a pH de 7.0 (Kumar et al., 2016). Otro método utiliza HNO₃ al 5% y finalmente el material obtenido es lavado con etanol al 70% (Yuan et al., 2014, van Essen, et al., 2013).

3. METODOLOGIA

En capítulo 3 se describe el proceso que se llevó a cabo en el laboratorio y sus respectivos análisis. La metodología que se siguió en el presente trabajo de investigación se presenta en la figura 3.1.

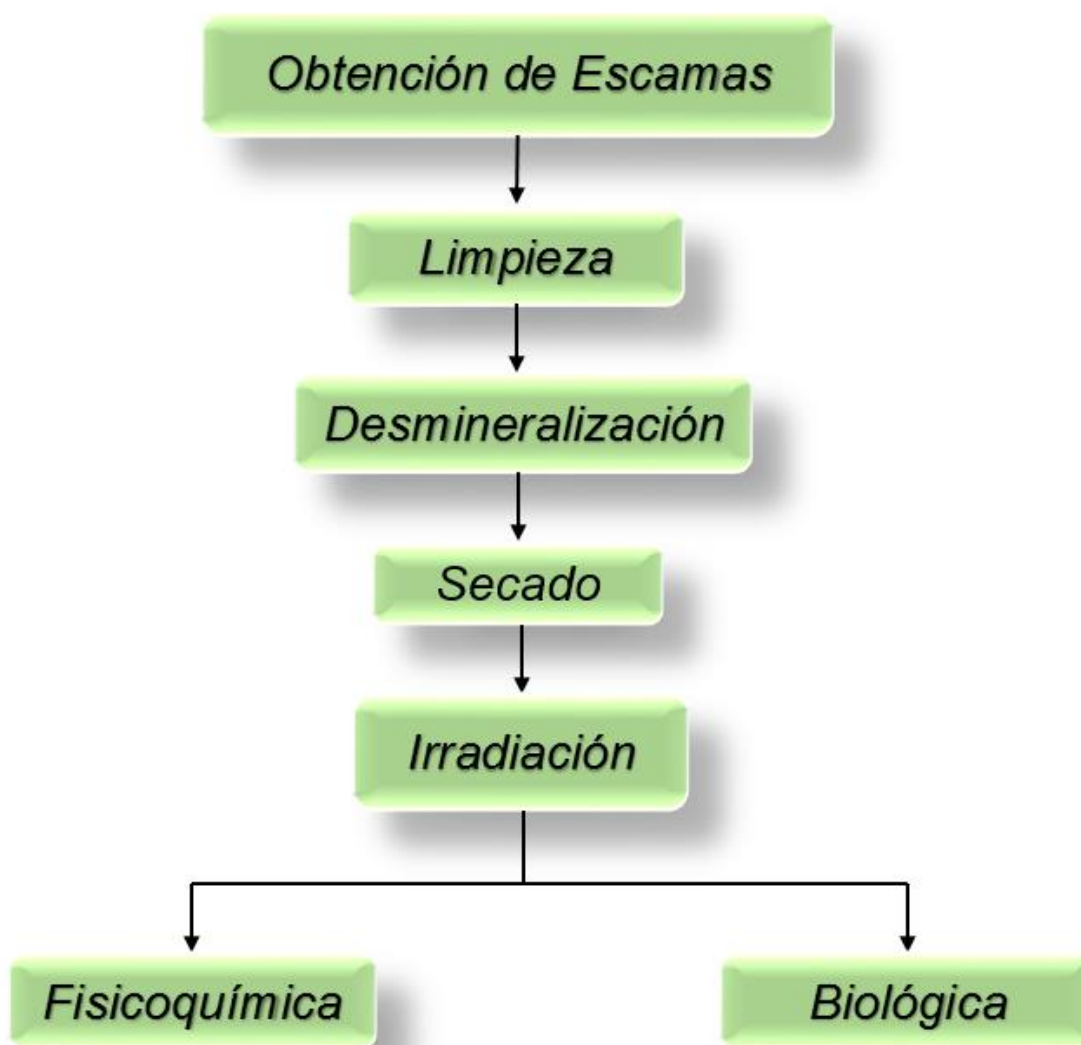


Figura 3. 1. Diagrama de flujo del trabajo experimental.

El trabajo experimental se realizó en el Banco de Tejidos Radioesterilizados (BTR) y en el Laboratorio Anexo de Ciencias Básicas y Ambientales, ubicados en el

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) que se localiza en la carretera México Toluca, La Marquesa, Ocoyoacac, Municipio del Estado México. En las siguientes secciones se describen los pasos de la metodología.

3.1. Obtención de las escamas

Se obtuvieron escamas de carpa común (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), de la cual se llevó a cabo la extracción de las escamas del pescado con ayuda de unas pinzas, las escamas obtenidas se guardaron en un congelador a una temperatura de -40 °C para su posterior procesamiento.



Figura 3. 2. Extracción de las escamas de carpa plateada (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758).

3.2. Limpieza

Debido al contenido de mucopolisacaridos de la superficie del pescado, se llevó a cabo una limpieza inicial de las escamas que consistió en la adición de peróxido de hidrogeno a una concentración al 3%, se mantuvieron en agitación constante por 72 horas después se realizaron 5 lavados con agua destilada para retirar de la escama los residuos de peróxido.



Figura 3.3. Limpieza de las escamas

3.3. Desmineralización

Para eliminar el mineral que se encuentra en las escamas de pescado, se utilizó una solución ácida a una concentración de 0.6 M, se dejó en agitación constante durante 24 horas, Después se removió el epitelio de la escama con ayuda de un bisturí (Figura 3.4), posterior a esto se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos hasta un pH de 7.4.



Figura 3 4. Escamas de pescado desmineralizada.

3.4. Secado

Para que las escamas y su derivado se puedan conservar y manejar a temperatura ambiente, se sometieron a un proceso de secado llamado liofilización a una temperatura inicial de -40°C , una temperatura final a 20°C , a un vacío de 0.06 mBars durante un tiempo de 24 h.

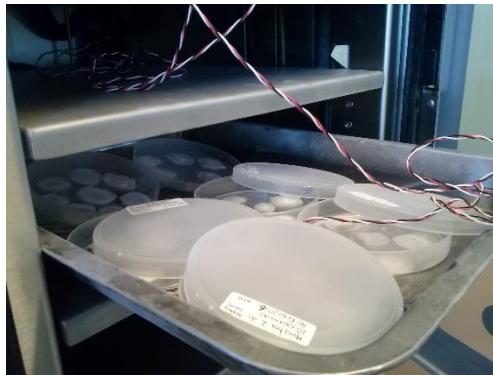


Figura 3.5. Liofilización de las escamas desmineralizadas

3.5. Irradiación

Una vez secas las escamas que se sometieron a irradiación gamma de Co-60 a dosis de 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy, 20 kGy, 25 kGy y 30 kGy, estas dosis se eligieron debido que el intervalo al que generalmente se esterilizan los tejidos para trasplante es entre 25 y 30 kGy.

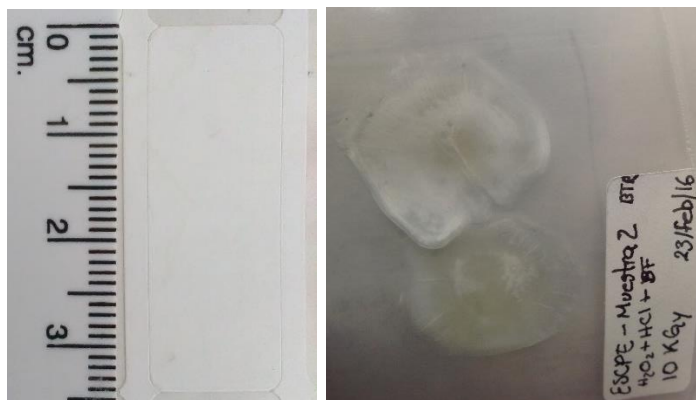


Figura 3.6. Escama irradiada a 10 kGy.

3.6. Caracterización

La caracterización se dividió en dos apartados, la primera es la caracterización fisicoquímica en la que se realizaron análisis con equipos especializados como microscopia electrónica de barrido (MEB) con análisis químico elemental (EDS), espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), difracción de rayos X (DRX), espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-Masas) y espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS). Por otro lado se realizó la caracterización biológica en la cual se hicieron pruebas de esterilidad con tioglicolato estéril y caldo de soyatripticaseína de acuerdo a la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 2011).

3.6.1. Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica tanto de las escamas sin tratamiento, como de las escamas tratadas pre y pos-irradiadas incluyó diversos tipos de análisis. Los cuales se refieren a continuación.

3.6.1.1. Microscopia electrónica de barrido

Se colocó la escama en un soporte de aluminio específico del microscopio de la marca *JSM-6610* (Figura 3.7), adhiriendo la muestra con una cinta de aluminio, posteriormente las muestras se trataron con la técnica sputtering, cubriendo la muestra con una fina capa de oro por un tiempo de 60 s, utilizado un equipo Denton Vacuum, *DENTON II* (Figura 3.8). El uso de la técnica MEB permite observar la morfología de las partículas en las escamas, pre y post irradiadas, para lo cual se usó una fuente de electrones a 20 KeV. Las imágenes se tomaron con un detector de dispersión de electrones a una amplificación de 1000X.



Figura 3.7. Soporte de aluminio especial para el microscopio SEM.



Figura 3.8. Preparación de la muestra con el recubrimiento de oro para escamas pre y post irradiadas.

3.6.1.2. Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier.

El espectro infrarrojo se utilizó para la identificación de los grupos funcionales de las escamas de pescado pre y pos irradiadas. Para este análisis se utilizó un equipo *Nicolet 6700 FT-IR* de la marca *Thermo Scientific* donde las escamas se colocaron de forma directa en el equipo.



Figura 3.9. Espectrómetro infrarrojo.

3.6.1.3. Difracción de rayos X.

La identificación de estructuras cristalinas para las escamas de pescado, se llevó a cabo por difracción de rayos X, con un equipo *Discovery 8, Burker*, que utiliza una fuente monocromada difractada a 25kV, a un tamaño de paso de 0.02° durante 30 minutos para adquirir el espectro de rayos X continuo. Alcanzando líneas de identificación de los minerales en las muestras, programando el instrumental a una velocidad de 2°/min y en un intervalo para 2θ de 4 a 70° de incidencia.

3.6.1.4. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente.

Se eligieron dos muestras de escamas limpias pero sin irradiar y otro par de las escamas tratadas. Las muestras se calcinaron por separado en una mufla marca *Furnace 1400* a una temperatura de 900°C durante 5 horas. Posteriormente, cada una de las muestra fue colocada en medio ácido y se procesó en un Espectrómetro de masas *Agilent Technologies 7700 Serie ICP MS*.

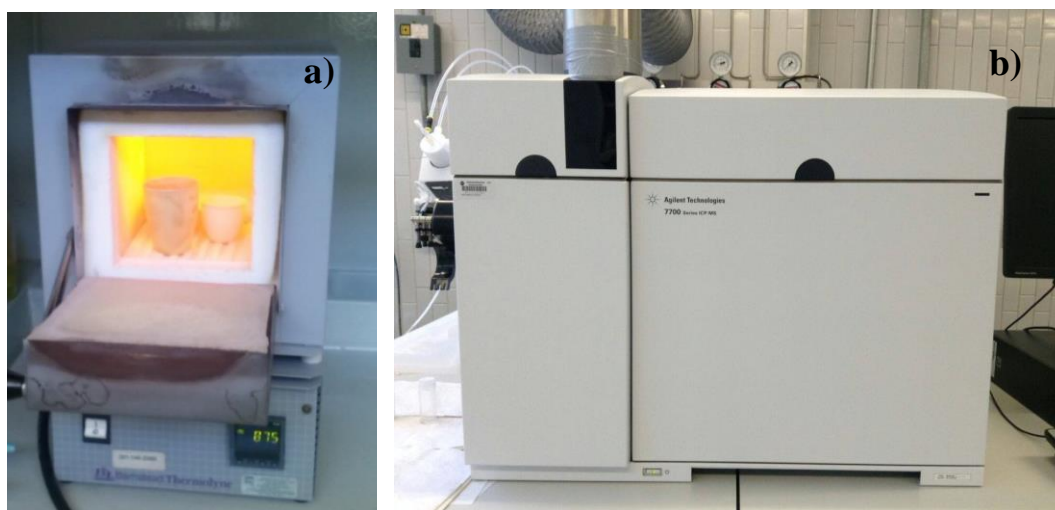


Figura 3.10. (a) Proceso de calcinación de las escamas. (b) Espectrómetro de Masas

3.6.1.5. Análisis termogravimétrico.

Este análisis permite realizar medidas para determinar, indirectamente, la composición de las escamas, así mismo se evalúa su estabilidad a diversas temperaturas. Se utilizó un equipo termogravimétrico modelo *SDT Q 600 V 20.9 Build 20*, bajo una atmósfera de Helio, a una velocidad de calentamiento de 10.00°C/min y por un intervalo de 0°C a 800.00 °C.

3.6.1.6. Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X.

Este análisis cuantitativo nos permitió obtener información sobre los elementos presentes en los biomateriales. Se utilizó un equipo de la marca K Alpha, Thermo Scientific se decaparon las escamas y los datos obtenidos fueron graficados para interpretar los enlaces contenidos tomando en cuenta la energía de enlace de los elementos característicos de la molécula de colágeno. Se utilizó la escama tratada para llevar a cabo este análisis.

3.6.2. Caracterización biológica

Una vez irradiadas las muestras se sometieron a prueba de esterilidad para validar su potencial uso en sistemas biotecnológicos.

3.6.2.1. Prueba de esterilidad

El biomaterial esterilizado con radiación gamma fue cultivado en caldos aerobios y anaerobios tioglicolato estéril y soyatripticaseina estéril, por cada dosis de

irradiación en el material colagenoso, se dejaron incubando durante 14 días a temperatura controlada, de acuerdo a la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

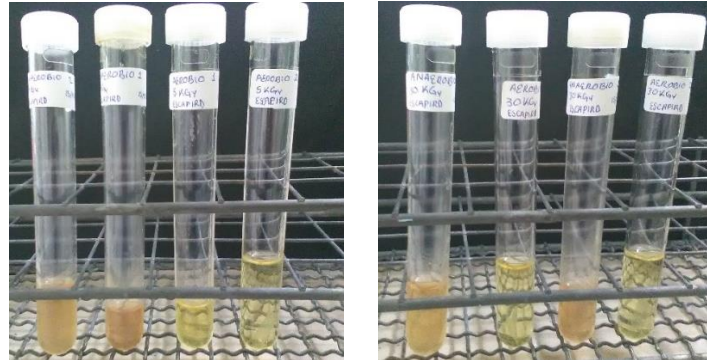


Figura 3.11. Prueba de esterilidad de las escamas de pescado irradiadas a 5 kGy y 30 kGy.

4. RESULTADOS

En este capítulo se describen y discuten los resultados obtenidos de acuerdo al marco experimental.

4.1. Obtención de material colagenoso.

La escama inicial se observa de color blanco con gris, como se muestra en la figura 4.1. a), mientras que al darle el tratamiento ácido, las escamas se transforman en un material transparente como se observa en la figura 4.1. b). Lo que sugiere que la escama perdió la capa de mucopolisacaridos, además de la parte mineral. La escama transparente se cortó en forma de círculo para su presentación.

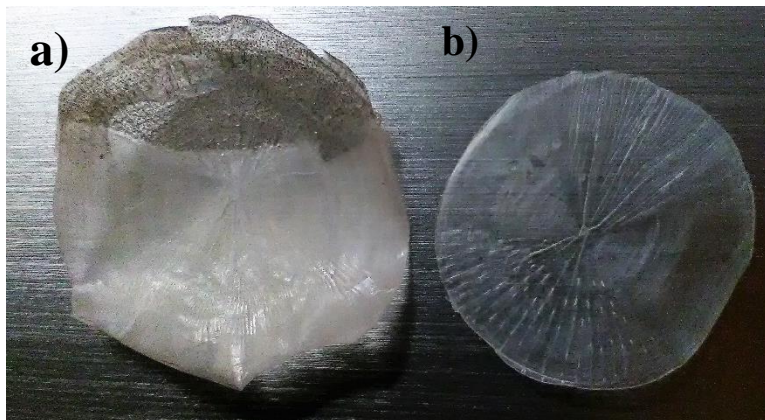


Figura 4. 1. a) Escama de carpa plateada, b) escama tratada.

4.2. Resultados de Microscopia Electrónica de Barrido.

La figura 4.2. muestra las características estructurales de la escama de carpa plateada y se observa un patrón característico que corresponde a los circuli, los

cuales son continuos en la superficie de las escamas con distancias entre 23 y 35 micrometros de separación aproximadamente. De manera perpendicular a los circuli se pueden apreciar los rayos de la escama.

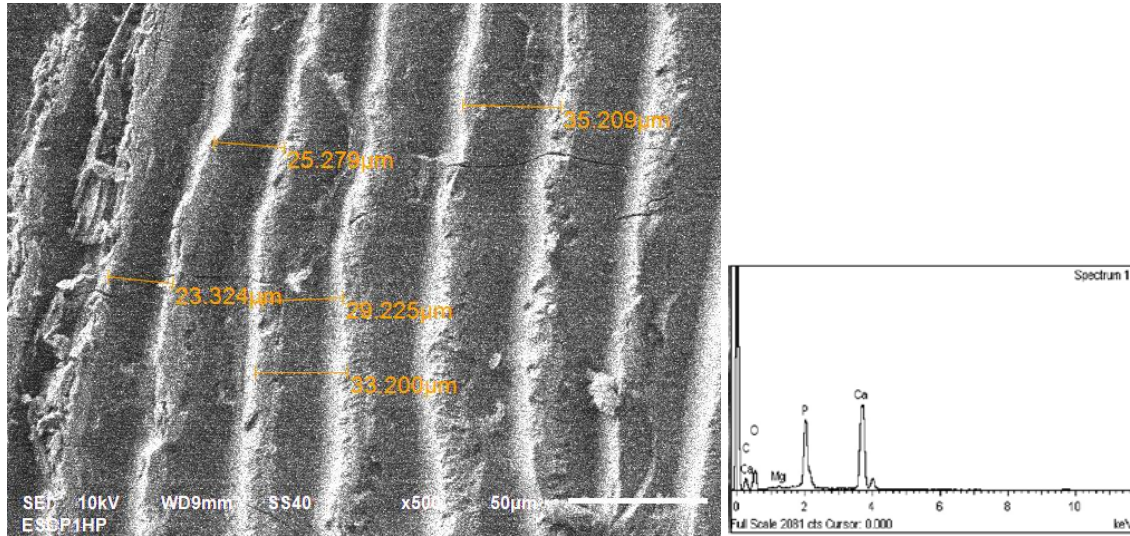


Figura 4. 2. Micrografía de la superficie de las escamas, con su respectivo EDS.

El análisis químico por EDS en la escama normal, mostró presencia elemental de calcio, carbono, fósforo, oxígeno y nitrógeno principalmente.

Una vez que se le da el tratamiento ácido a la escama de pescado, en la micrografía electrónica se observa una morfología similar que la escama sin tratarla, sin embargo el análisis por EDS solo mostró la presencia elemental de carbono y oxígeno, en tanto que el calcio y fósforo desaparecieron lo que indica que la escama está completamente desmineralizada, y contiene materia orgánica, posiblemente material colagenoso.

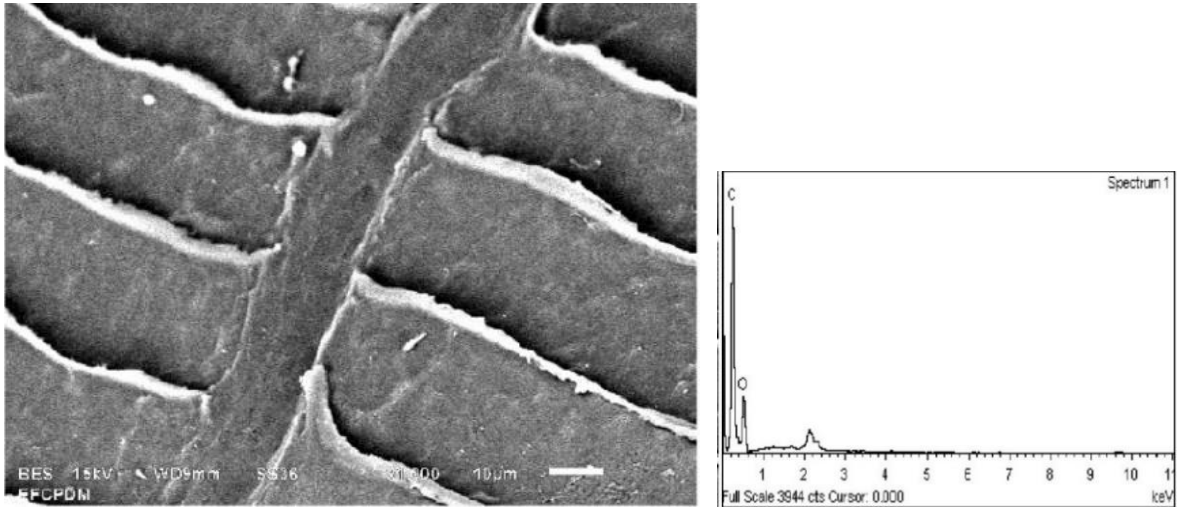


Figura 4. 3. Micrografía de escama tratada.

En la figura 4.4. se muestran las micrografías de las superficies de las escamas tratadas a las diferentes dosis de irradiación, donde se puede observar cambios físicos importantes en la superficie en la escama en donde se ve un mayor daño físico en las fibras de colágeno contenidas en la escama es la irradiada a 30 kGy (figura 4.4.f)), incluso existen regiones que ya no se alcanzan a notar las divisiones de los circuli, en cambio a dosis menores de 30 kGy (25, 20, 15, 10 y 5 kGy) la superficie no se ve alterada (figura 4.4.a), b),c),d) y e)).

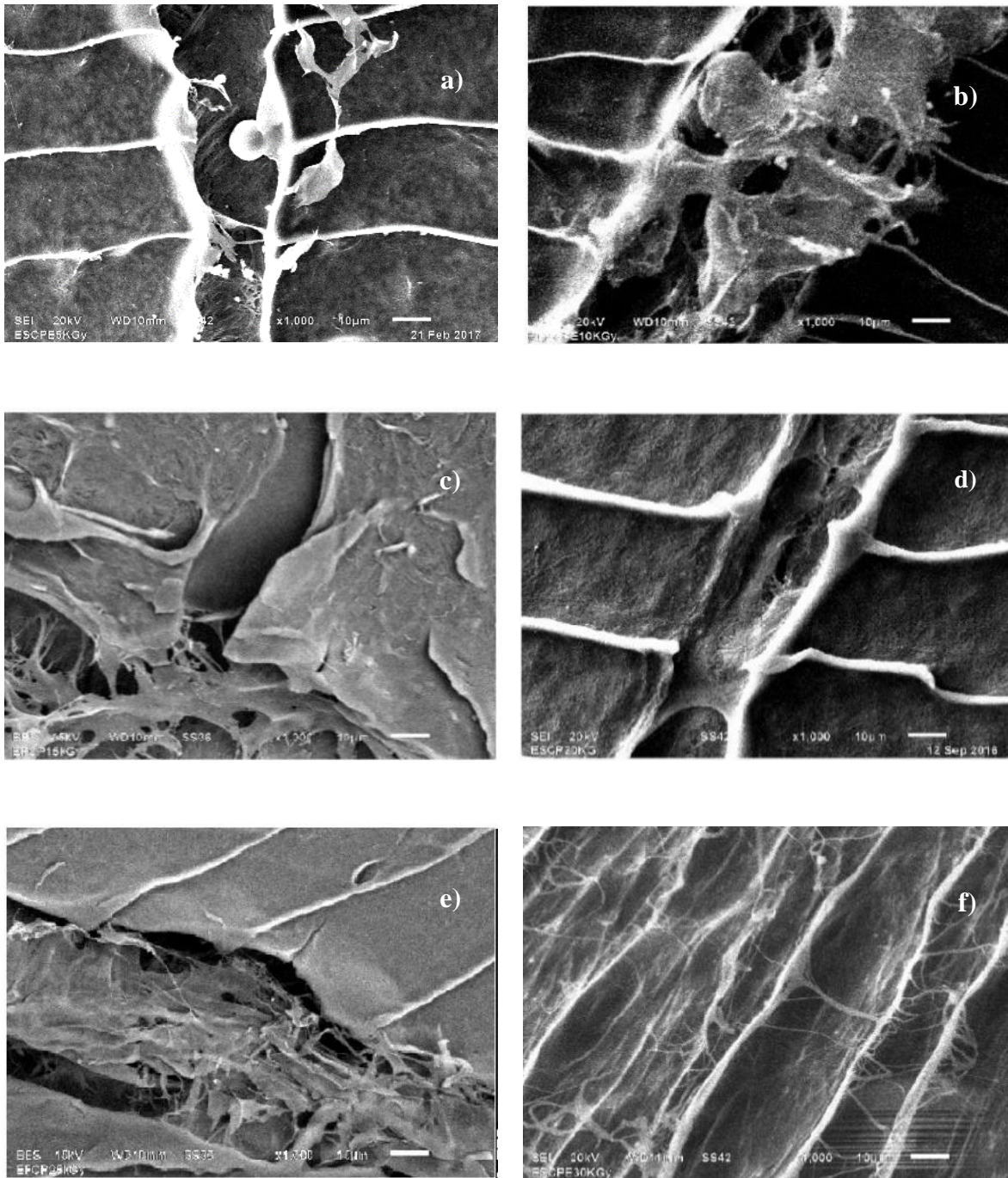


Figura 4. 4. Micrografías electrónicas de las escamas tratadas e irradiadas a: a) 5 kGy, b) 10 kGy, c) 15 kGy, d) 20 kGy, e) 25 kGy, f) 30 kGy.

4.3. Espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier.

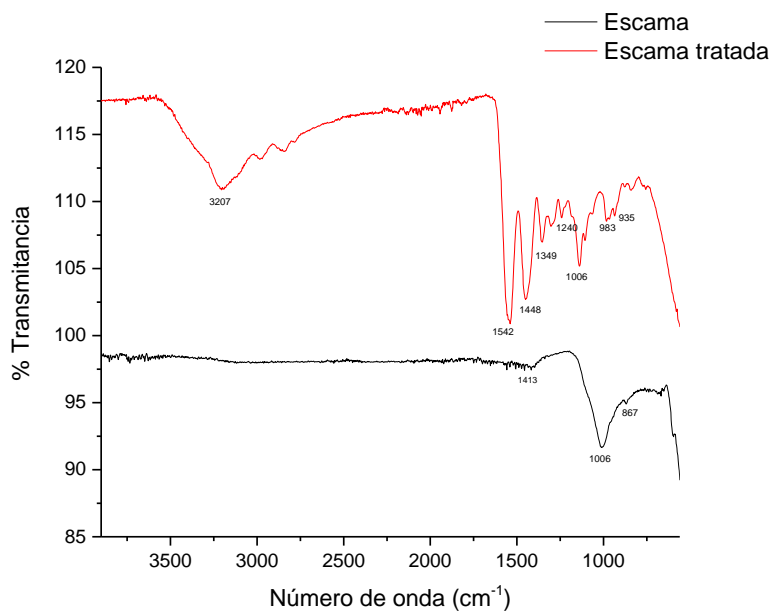


Figura 4. 5. Espectro de infrarrojo de la escama a) natural y b) tratada.

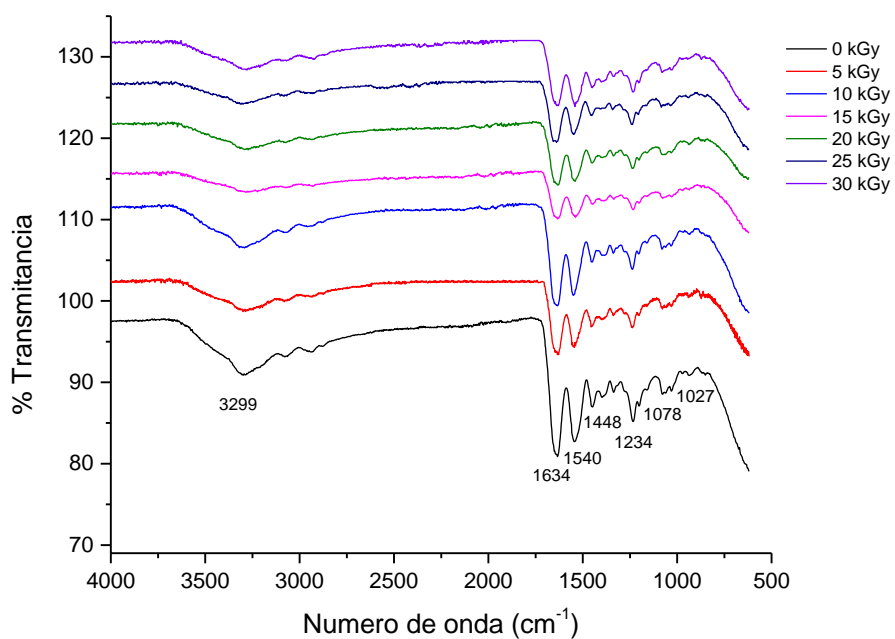


Figura 4. 6. Espectro de infrarrojo de las escamas tratadas e irradiadas.

En el espectro de infra-rojo de la escama de pescado se define la banda de los fosfatos como se puede apreciar en la figura 4.5.a) lo que indica que la escama aún no está desmineralizada, una vez que le damos el tratamiento ácido a la escama, se puede apreciar que la banda de los fosfatos desaparece y aparecen las bandas de las amidas primarias, secundarias, terciarias, así como los grupos OH, todos estos característicos de la proteína de colágeno, ya que al unirse los grupos ácidos con los grupos básicos de aminoácidos es como se van formando las proteínas, y da lugar a grupos amidas (Figueiredo, et al, 2012).

Los espectros de infra-rojo que se observan en la figura 4.6 son las escamas tratadas y las cuales se irradiaron. Se puede comprobar que tanto la muestra que no se le dio ninguna dosis de irradiación (0 kGy) como las escamas tratadas que se sometieron a irradiación no tuvieron cambios químicos.

Tabla 4.1. Bandas asignadas por FTIR de hidroxiapatita y colágeno tipo I

Número de onda cm ⁻¹	Vibraciones	
	Hidroxiapatita	colágeno
867	PO ₄ ³⁻	-
1006	PO ₄ ³⁻	-
1234	-	Amida III
1349	-	CH ₂
1448	-	CH ₂
1540	-	Amida II
1634	-	Amida I
2850	-	CH ₂
2930	-	CH ₂
3299	OH	OH

Modificada de Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy

M.M. Figueiredo, J.A.F. Gamelas and A.G. Martins Chemical Engineering Department, University of Coimbra Portugal, 2013.

4.4. Difracción de rayos X.

Con respecto al difractograma de rayos X, se observó que la escama de pescado contiene HAp, como se puede apreciar en la figura 4.7.b) y c), de acuerdo a la tarjeta JCPDS-9-432 (Blanton, 1986), lo que nos indica que el proceso de tratamiento ácido, removió a la hidroxiapatita de la escama.

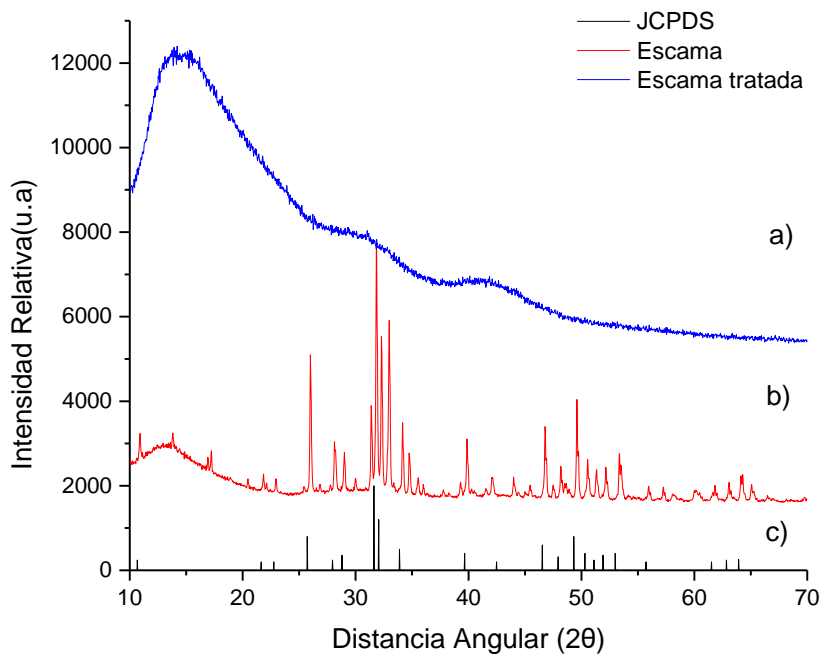


Figura 4. 7. Difractograma de Rayos X de a) escama tratada, b) escama y c) JCPDS-9-432.

Por otro lado se observó que las escamas tratadas que fueron sometidas a irradiación presentan un pico en DRX en 7.8 2θ , lo que coincide con el espectro del colágeno puro, de acuerdo a Rodríguez et. al., 2016, porque a pesar de que es un compuesto amorfo, presenta cierta simetría, como se puede apreciar en 7.8 2θ , posiblemente debida a la unión de la triple hélice con la glicina de la molécula de colágeno (Figura 4.8).

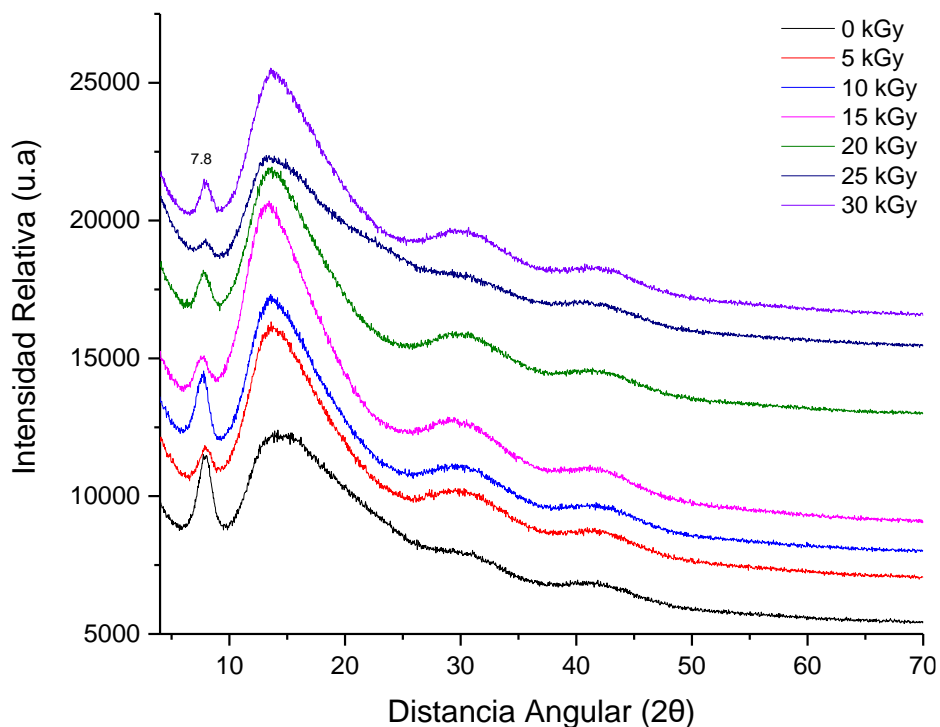


Figura 4. 8. Difractograma de Rayos X de las escamas tratadas e irradiadas

4.5. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

De acuerdo a los resultados obtenidos por ICP-masas, se encontró que el contenido de calcio es de 4.20 % mientras que la escama tratada, muestra un contenido de calcio de solo 0.024%, lo que corrobora lo obtenido por MEB, FTIR y DRX, en donde la escamas contienen un fosfato de calcio (HAp) y una vez que se le da el tratamiento ácido, se puede notar que la HAp de la escama ya no está presente, los resultados se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. *Contenido de calcio en las escamas y escamas tratadas*

Muestra	% Ca
Escama de pescado	4.20 ± 0.04
Escama de pescado tratadas	0.024 ± 0.001

4.4. Análisis termogravimétrico

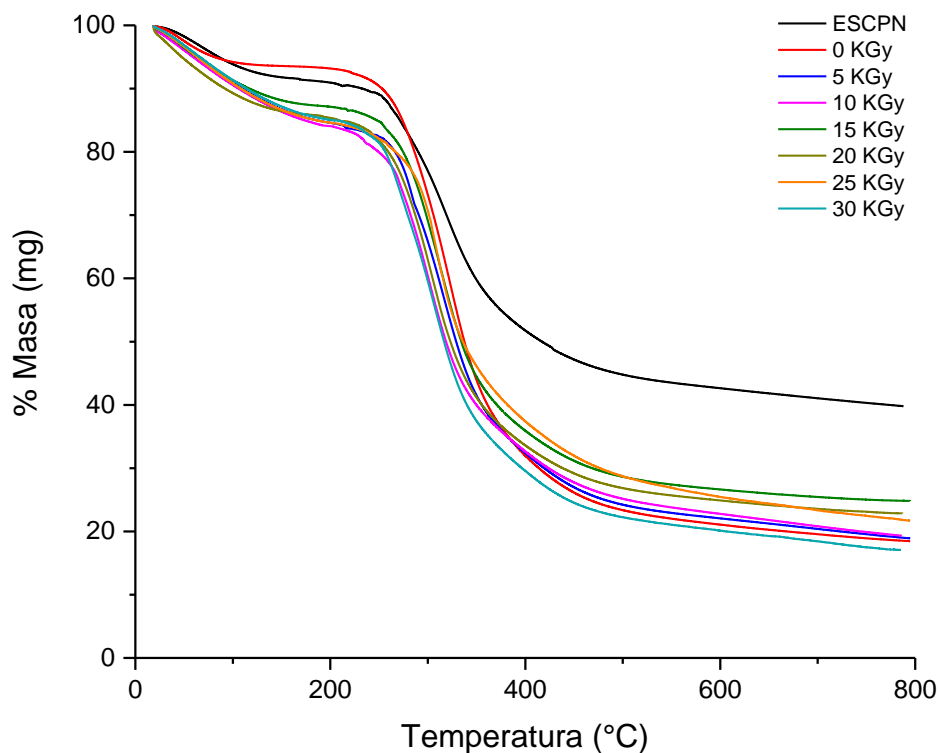


Figura 4. 9. Análisis Termogravimétrico de las escamas normal (ESCPN), escama tratada (0 kGy) y escamas tratadas e irradiadas (5, 10, 15, 20, 25 y 30 kGy).

La figura 4.9. Muestra el comportamiento de las escamas al aumentar la temperatura.

En referencia a Figueiredo, et al, en el caso de la escama natural, sin tratamiento (ESCPN), se nota que entre 80 y 150°C existe una disminución de masa de un 10% debido a la pérdida de agua y que de 220 a 500°C aproximadamente se da la transformación de la proteína en CO₂ principalmente, llegando hasta un 39.8 % de la masa inicial, quedando principalmente cenizas y la HAp ya que el punto de fusión de este biomaterial es de 1100 °C.

En el caso de la escama tratada pero sin irradiar (0 kGy) en la etapa de eliminación de humedad (de 80 y 150°C) llega a un 93% de masa, que equivaldría a eliminar un 7 % de agua, mientras que de 220°C a 500°C llega hasta 20 % de la masa inicial, en tanto que las escamas tratadas e irradiadas, en la etapa de eliminación de humedad (de 80 y 150°C) llegan a perder el 15% en promedio de su masa inicial, llegando al 85% de la masa inicial, en tanto que de 220 a 500°C se transforma el colágeno en CO₂ quedando solo cenizas, permaneciendo solo el 20% en promedio de la masa inicial.

La diferencia entre la escama tratada sin irradiar y las irradiadas con respecto al contenido de humedad, nos indica que en la manipulación que se realiza durante el desarrollo de la irradiación, da lugar a un proceso de hidratación, que es aproximadamente del 8% en promedio. (Figueiredo, 2012)

4.7. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X.

Se estudiaron los principales estados atómicos energéticos superficiales de las escamas de pescado tratadas, a través de los orbitales C1s, N1s y O1s debido a que la molécula que se busca es el colágeno y son los componentes principales de dicha proteína. Los espectros detallados se ajustaron por medio del programa Origin Versión 9.1, usando curvas gaussianas con ancho total a la mitad del máximo (FWHM) sugeridas en los manuales de XPS (Highberger, et al, 1950).

La figura 4.10. muestra el espectro general de XPS de la escama de pescado tratada, donde se identificó la composición elemental del material orgánico que compone a la escama, estos elementos son C, O y N, lo que concuerda con la proteína del colágeno.

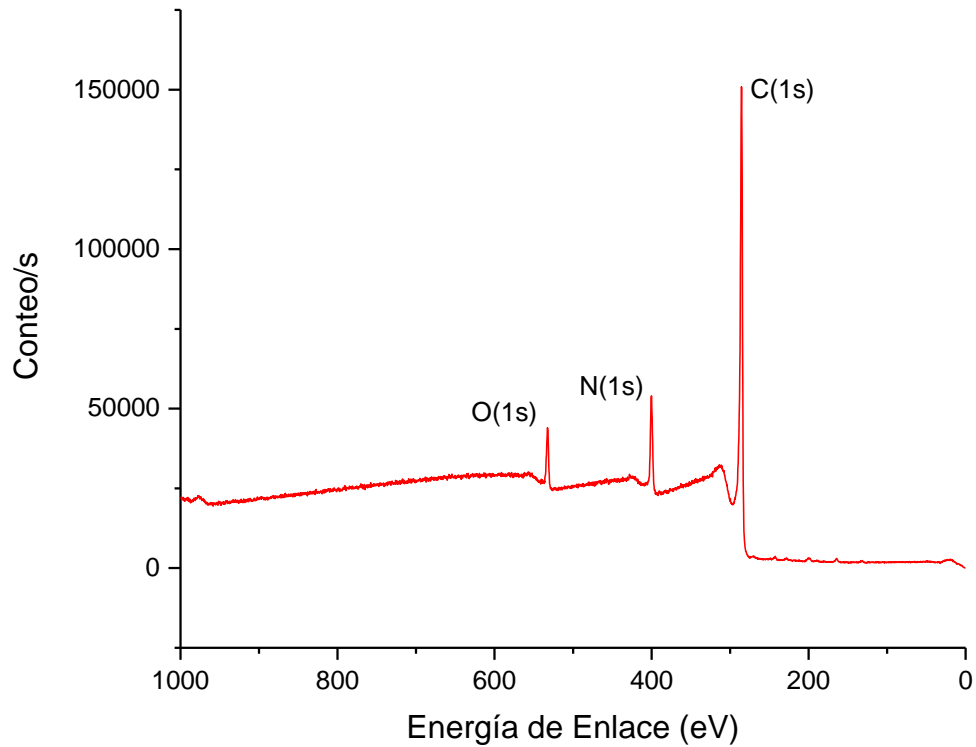


Figura 4. 10. Espectro general de XPS de la escama tratada.

De manera similar se obtuvieron, los espectros de alta resolución XPS colectados en la región de 283 a 292 eV. En esta región que corresponde al C 1s se observan en la figuras 4.11, donde después de realizar la deconvolución por el programa Origin, se observan los picos a 284.4, 285.97, 286.62, 287.99, 289.3 eV, el primero corresponde al enlace entre el C-H, el segundo enlace es debido a la unión C-C, el tercer picos está relacionado a la unión entre el C-N, el cuarto pico corresponde al enlace entre el C=O y el último pico (a 289.3 eV) corresponde a la unión entre O=C-O en la proteína del colágeno (Gurdak et al., 2006).

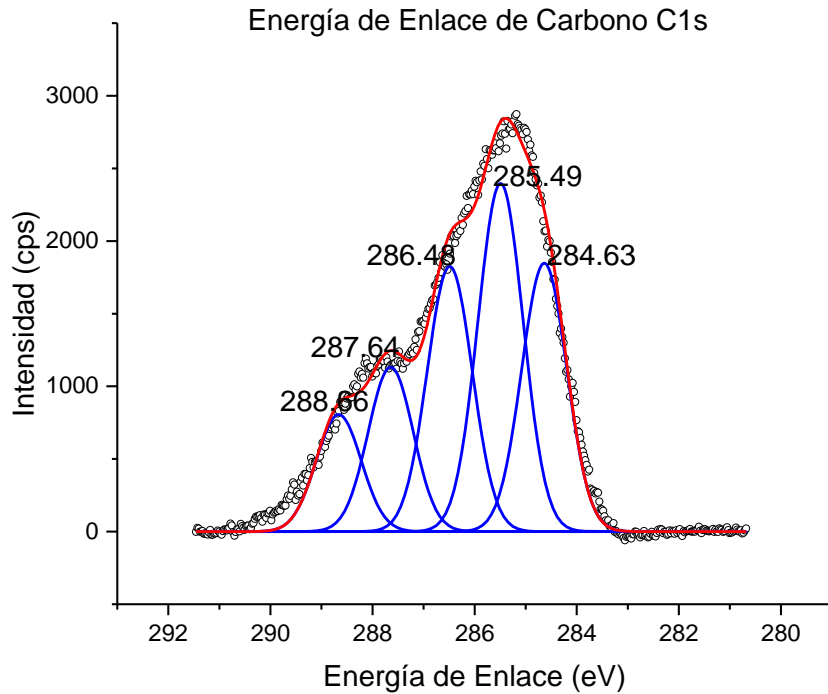


Figura 4. 11. Espectro XPS de alta resolución del carbono 1s de la escama tratada

En la figura 4.11. se observa el espectro de alta resolución del O 1s, el cual se encuentra en la región de 530 a 535 eV, en la que se distinguen 2 picos del oxígeno al realizar la deconvolución del elemento, mediante el programa Origin 9.1, uno de los picos se encuentra en 531.8 eV que corresponde al enlace entre el O=C, mientras que el otro pico se encuentra en 533.3 eV, donde se unen el O-C (Yang, et al, 2017).

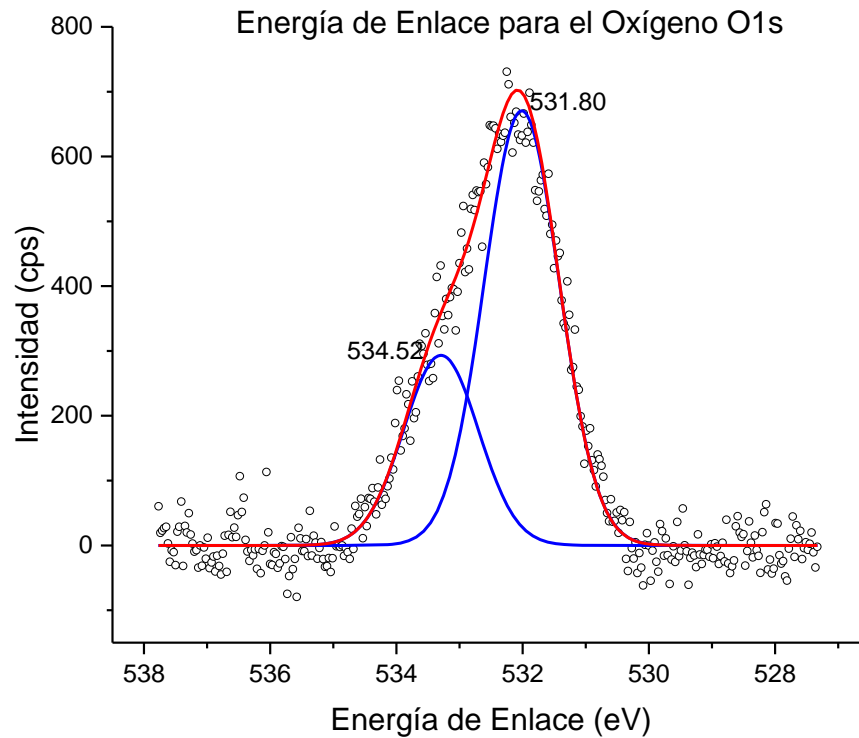


Figura 4. 12. Espectro XPS de alta resolución del oxígeno 1s de la escama tratada

Finalmente el espectro de alta resolución del N 1s pudo ser ajustado por el programa Origin versión 9.1, obteniendo 3 picos separados (pico 1 en 398.5 eV, el pico 2 en 399.7 eV y el pico 3 en 401.8 eV) el primer pico se atribuye a la unión entre H-N=R₂, el segundo pico se debe a los enlaces entre H₂=N-R y el pico 3 es debido a la unión entre N-C de la estructura del colágeno (Yang et al 2016).

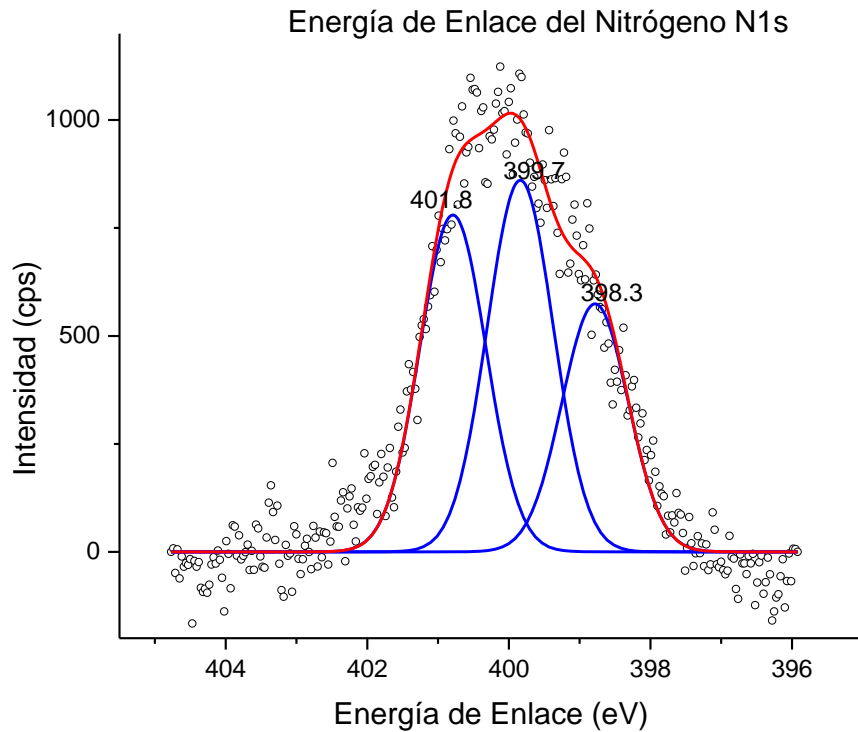


Figura 4. 13. Espectro XPS de alta resolución del nitrógeno 1s de la escama tratada

4.7 Pruebas de esterilidad

Al llevar a cabo la siembra de las escamas irradiadas en los medios de cultivo para aerobios y anaerobios (Tabla 4.3) no presentaron crecimiento en las escamas tratadas, lo que indica que la dosis de esterilidad es de 5 kGy. Sin embargo para asegurar la esterilidad y que no altere el material se recomendará esterilizar entre 15 y 20 kGy.

Tabla 4 3 Resultados de las pruebas de esterilidad de las escamas tratadas e irradiadas.

Muestra	Aerobias tioglicolato	Anaerobias soyatripticaseina
5 kGy	Sin contaminación	Sin contaminación
10 kGy	Sin contaminación	Sin contaminación
15 kGy	Sin contaminación	Sin contaminación
20 kGy	Sin contaminación	Sin contaminación
25 kGy	Sin contaminación	Sin contaminación
30 kGy	Sin contaminación	Sin contaminación

5. CONCLUSIONES

Por microscopia electrónica se pudo observar la morfología superficial de las escamas normales y las escamas tratadas.

Por TGA se identificó que la degradación de colágeno es mayor en cuanto se elimina la parte mineral.

Con FTIR se encontraron los grupos funciones tanto de la escama natural como de la escama tratada, observándose grupos fosfatos en la escama natural, en tanto que en las escamas tratadas se observan las bandas características de la proteína del colágeno que son las amidas primarias, secundarias y terciarias, así como los grupos carboxilo, de los grupos ácidos de la proteína de interés.

Por XPS se pudo corroborar la obtención del colágeno donde se pudieron localizar los átomos involucrados en las amidas primarias, secundarias, terciarias, metilenos y grupos ácidos del colágeno que forma las escamas.

Por DRX se encontró que el mineral principal que compone a la escama es HAp y se comprobó que al darle el tratamiento ácido a la escama, el mineral desaparece quedando únicamente la proteína de colágeno.

Se pudo observar que al irradiar el colágeno proveniente de las escamas, por FTIR, DRX, este no sufre modificaciones químicas, sin embargo a una dosis de 30 kGy se puede observar por MEB, rupturas de las fibras de colágeno en la superficie de las escamas.

Se encontró que la dosis de esterilidad mínima experimental, del colágeno proveniente de las escamas tratadas con radiación de Co-60, es de 5 kGy.

Con los análisis y resultados experimentales obtenidos, se concluye que las escamas de pescado tratadas contienen colágeno y que al irradiarlas no se pierde la estructura química de la mencionada proteína, por lo que se cumple el objetivo que era la obtención de material colagenoso de escamas de pescado esterilizado con radiación gamma.

PERSPECTIVAS

Derivado de las conclusiones del trabajo se pueden enunciar las siguientes perspectivas:

- Realizar diversos estudios como cultivo de células corneales, escalar la obtención del colágeno y plantear un protocolo para aplicarlo como un sustituto de córnea en animales, para su posterior uso clínico en humanos.
- Verificar el protocolo de análisis para validar que se obtiene colágeno tipo I conforme en concordancia con la literatura.

En general hay un conjunto de pasos que pueden continuarse a partir de este trabajo de tesis biotecnológico. Para ello es relevante contar con un mayor acceso a información que permita interpretar ágilmente los resultados experimentales. Por ejemplo si se tienen bases de datos con acceso libre para poder identificar las energías de enlace de cada átomo, la interpretación de análisis XPS, es eficiente.

REFERENCIAS

Bain, G.; Ray, W. J.; Yao, M.; Gottlieb, D. I., (1996) *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 223, 691-694.

Benoit R. CNRS Orléans, la surfase, XPS Level 1 Recuperado de <http://www.lasurface.com/xps/niveau1.php> 28 de octubre 2016

Berg E.A., Platts-Mills T.A.E y Commins S.P., (2014), "Drug allergens and food—the cetuximab and galactose- α -1,3-galactose story," *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, vol.112,no. 2,pp.97–101.

Blanton T., (1986), The International Centre for Diffraction Data® (ICDD®) recuperado de <http://www.icdd.com/> 3 de Noviembre del 2016.

Boedtker, H., and Doty, P. (1956). *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4267-4280.

Buddy D Rathner allan S Hoffman Frederick J Schoen Jack E. Lemons *Biomaterials science: An introducción to Materials in Medicine.*

CENATRA: Centro Nacional de Trasplantes [Internet]. México: CENATRA; 2016 [citado 26 may 2016]. Estadísticas [aprox. 1 pantalla]. Disponible en http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_estadisticas.html.

Crist BV (1998) Advanced peak-fitting of monochromatic XPS spectra. *J Surf Anal* 4:428–434.

Dziedzic-Gloclawska A., (2001), Aplicación de la radiación ionizante para esterilizar aloinjertos de tejido conectivo. Glyn O. Philips. (1 Ed.) Radiación y operación de banco de tejidos pp 62, Peru: Printing Service S.A.C.

Ekser B, Ezzelarab M, Hara H., van der Windt D. J., Wijkstrom M., Bottino R., Trucco M, Cooper D K C, (2012), Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *Vol 379: 672–83.*

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), MGA0381 Esterilidad, 10 ed. 349-351 p.p.

FAO, (2016) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758), recuperado de: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es 12 de enero 2016

Figueiredo M., Gamelas J., Martins A., (2012), Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy, in: *Infrared Spectroscopy-Lyfe medical sciences*, T.Theophanides. (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/36379. Available from: <http://www.intechopen.com/sci-hub.cc/books/infrared-spectroscopy-life-and-biomedical-sciences/characterization-of-bone-and-bone-based-graft-materials-using-ftir-spectroscopy>

Gaspar-Dillanes Ma. T. Hernandez Montaña D., (2013), *Pesquerías continentales en México*

Gil-Duran S., Arola D., Ossa E.A., (2016), Effect of chemical composition and microstructure on the mechanical behavior of fish scales from *Megalops Atlanticus*, *J Mech Behav Biomed Mater*, vol 56:134-45.

Gurdak E., Rouxhet P. G, Dupont-Gillain C. C., (2016) Factors and Mechanisms Determining the Formation of Fibrillar Collagen Structures in Adsorbed Phases, *Colloids Surf B Biointerfaces* 52 (1), 76-88.

Hammond C., 2009, "The Basics of Crystallography and Diffraction" International Union of Crystallography, Oxford University Press, (3 Ed.).

Highberger, J. H., Gross, J., and Schmitt, F. O. (1950). *J. Am. Chem. Soc.* 72, 3321-3322.

Hos D., van Essen T.H., Bock F., Chou C. H. , Pan H. A. , Lin C. C. , Huang M. C. , Chen S.C. , Cursiefen C., (2014), M.J. Jager, *Dezellularisierte Kollagenmatrix aus der Schuppe des Tilapia-Fisches als Hornhautersatz („BioCornea“)* , vol 111: 1027–1032

ISO 11137-1 (2006) *Sterilization of health care products, Radiation. Part 1: requeriments for development, validation and routine control of a esterilization process for medical devices.*

ISO 11137-1 (2006) Sterilization of health care products, Radiation. Part 2: establishing the esterilization dose

ISO 11137-1 2006 Sterilization of health care products, Radiation. Part 3: guidance on dosimetric aspects

Joon B. Park y Roderics S. Lakes, (1992), biomaterials: an introduction, Plenum Press, Nueva York

Kairiyama E., compiladora (2013) Código de prácticas para la esterilización por irradiación de tejidos humanos para uso clínico editorial tecnológica de costa rica 1°Ed., 78 pp impreso en costa rica

Kardong, K.V., (2008), Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution. McGraw-Hill, Boston, USA

Krishnan S., Sekar S., Katheem M.F, Krishnakumar S., (2012), Sastry, "Fish Scale Collagen a novel material for corneal tissue engineering, "Artificial Organs, vol.36, no.9, pp.829–835.

Kleinman HK, Philip D, Hoffman MP, (2003), Role of extra celular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 14 526-32.

Kucharz E.J., (1992). *The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology*, Springer–Verlag, Berlin, pp. 34–39.

Kumar P. G. y Suresh P. V., (2016). *Food Sci. Emerg. Technol.* Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients, doi:10.1016/j.ifset.2016.03.015

Le Guellec, D.; Morvan-Dubois, G. & Sire, J-Y. (2004) Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.*, 48:217-31.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: Freeman W. H.; 2000. Section 22.3, Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582/> 8/Junio/2016.

LSAP del Centro de Astrobiología, Espectroscopia Infrarroja, Recuperado de: http://www.uhv.es/sites/pecas/doc/poster_infrarojo.pdf 6 de diciembre 2016

Maquet V, Jerome R., (1997), Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. *Mater Sci Forum* 250:15-42.

Merciane M, Rojas M., (2012), Desarrollo de la piel y su anexos en vertebrados, *Int. J. Morphol.*, 30(4):1422-1433, 2012.

Miller, E. J. (1971). *Biochemistry* 10, 1652-1659.

Miller, E. J., and Matukas, V. J. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sei. U.S.A.* 64, 1264-1268.

Morales Corona J, Olayo R, (2010), Introducción a la física biológica: biomateriales Cap. 23 pp1097, México: El colegio Nacional.

Nagai T. y Suzuki N, 2000, "Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins," *Food Chemistry*, vol. 68, no. 3, pp.277–281.

Nimni M.E., Harkness R.D., (1988), Molecular structures and functions of collagen, in: Nimni M.E. (Ed.), *Collagen Vol. I – Biochemistry*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1–79.

Pati F., Adhikari B., and Dhara S., 2010, "Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability," *Bioresource Technology*, vol.101, no.10, pp.3737–3742.

Pal G.K, Suresh P.V., Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.

Pal, G. K., Nidheesh, T., y Suresh, P. V. (2015). Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*). *Food Research International*, 76, 804-812.

Page, L.M., Espinosa-Pérez H., Findley L.T., Gilbert C.R., Lea R.N., Mandrak N.E., Mayden R.L. y Nelson J.S., (2013)

<http://www.fishbase.org/ComNames/CommonNameSummary.php?autoctr=239434>
06 de julio 2016.

Piez K.A., J.I. Kroschwitz (1985), Collagen in: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Wiley, New York, (Ed.), pp. 699–727.

Piez K.A., (1984), Molecular and aggregate structures of the collagens, in: K.A. Piez, Polak J, Hench L. (2005) Gene therapy progress and prospects: in tissue engineering. Gene Ther; 12:1725-33.

Ramachandran, G. N., and Kartha, G. (1954). Nature (London) 174, 269-270.

Reddi A.H. (Eds.), Extracellular Matrix Biochemistry, Elsevier, New York, pp. 1–40.

Rich, A., and Crick, F. H. C. (1955). Nature (London) 176, 915-916.

Roman D. I. (2008), Análisis del comportamiento de combinaciones de células troncales y biomateriales mediante un procedimiento de imagen fotonica no invasivo (tesis de doctorado) Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

Sanjuán Fernández C., La microscopía electrónica de barrido SEM (I) Concepto y usos, Patología Rehabilitación Construcción recuperado de <https://www.patologiasconstruccion.net/2012/12/la-microscopia-electronica-de-barrido-sem-i-concepto-y-usos/> 2 junio 2016

Schmitt, F. O. (1956). Proc. Am. Philos. Soc. 100, 476-486.

Stevens, M. M.; George J. H., (2005), Science 31, 1135-1138.

Sutherland T.D., Peng Y.Y., Truemanetal H.E., (2013), “Anewclass of animal collagen masquerading as an insect silk,” Scientific Reports, vol.3, article 2864.

Tang J., Saito T., (2015), “Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative Study”, BioMed Research International Volume, Article ID 139476, 8 pages

Universidad Autónoma de Madrid (UAM), 2008, Unidad de Análisis Térmico, recuperado

de:https://uam.es/ss/Satellite/es/1242668322022/1242666562032/UAM_Laboratorio_FA/laboratorio/Laboratorio_de_Analisis_Termico.htm 11 de octubre 2016.

Universidad de Burgos, Espectrometría de Masas de Plasma (ICP-MS), Recuperado de: <http://www.ubu.es/es/pct/servicios-cientificos-tecnicos/espectrometria/espectrometria-masas-plasma-icp-ms>. 10 de enero 2017

van Essen T. H., Lin C. C., Lai H. J., Hussain A. K., Luyten G. P. M., y Jager M.J., 2011, "A biocornea of fish scales—first results of a research model, "Acta Ophthalmologica, vol.89, supplement 248.

Van Der Rest, M., y Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. FASEB J. 5, 2814–2823.

Woessner Jr. J.F., (1961), The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid, Arch. Biochem. Biophys. 93 440–447.

Yamauchi M., Mechanic G., (1988), Crosslinking of collagen, in: M.E. Nimni (Ed.), Collagen Vol. I – Biochemistry, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 157–172.

Yang H., Weihua D., Shanbai X., Yang K., Arvind D., Jun W., Zhipeng G., (2016). Development of collagen/polydopamine complexed matrix as mechanically enhanced and highly biocompatible semi-natural tissue engineering scaffold, Acta biomaterialia 47