

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL HIDROLIZADO DE GELATINA DE PIELS DE *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”

Tejada Periche Eder Eduardo, Fernández Jerí Yadira*, Salazar Salvatierra María Elena

RESUMEN

Los residuos de la actividad pesquera contienen altas cantidades de colágeno y gelatina, que sometidos a procesos de hidrólisis enzimáticas podrían manifestar alguna actividad biológica. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana del hidrolizado de gelatina obtenido del colágeno de las pieles de *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”. Para ello, la gelatina obtenida de las pieles de bonito se hidrolizó con la enzima alcalasa a diferentes condiciones de pH, temperatura, tiempo y relación enzima/sustrato. La actividad antioxidante *in vitro* de quince hidrolizados se evaluó mediante radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y radical catiónico 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante difusión en disco y microdilución en placa para la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los hidrolizados de gelatina de bonito presentaron grado de hidrólisis superiores a 10 %, con un máximo de 33,67 % y evidenciaron la IC50 para DPPH entre 0,459 y 1,830 mg/mL y para ABTS entre 0,075 y 0,200 mg/mL. El valor más bajo y el más alto de TEAC fue 61,76 y 165,38 μmol de trolox/g para los hidrolizados H7011 y H7012, respectivamente. Ocho hidrolizados (1000 $\mu\text{g/mL}$) presentaron efecto inhibitorio frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con CMI igual o mayor a 500 $\mu\text{g/mL}$. Se puede concluir que los hidrolizados obtenidos mostraron actividad antioxidante y antimicrobiana para el modelo experimental aplicado.

Palabras clave: grado de hidrólisis, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante, *Sarda chiliensis chiliensis*.

ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE HYDROLYZATE OF GELATIN SKIN FROM *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”

ABSTRACT

Fishing activity residues contain high amounts of collagen and gelatin, which with enzymatic hydrolysis processes could manifest some biological activity. The present work aimed to determine the antioxidant and antimicrobial activities of gelatin hydrolysate obtained from *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito” skin collagen. For this, collagen protein fractions were hydrolyzed with alcalase enzyme at different conditions of pH, temperature, time and enzyme/substrate ratio. The in vitro antioxidant activity was evaluated for the fifteen hydrolysates obtained, by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil radical (DPPH) and cationic radical 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic (ABTS). The antimicrobial activity was evaluated by disk diffusion and broth microdilution for the minimum inhibitory concentration (MIC). Bonito gelatin hydrolysates indicated hydrolysis degree above 10 % with a maximum of 33.67 % and showed the IC₅₀ for DPPH between 0.459 and 1.830 mg/mL and for ABTS between 0.749 and 0.200 mg/mL. The lowest and highest TEAC value were 61.76 and 165.38 μmol of trolox/g for hydrolysates H7011 and H7012 respectively. Eight hydrolysates (1.0 mg/mL) presented inhibition halos against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, and equal or greater MIC than 500 μg/mL. It can be concluded that the obtained hydrolysates showed antioxidant and antimicrobial activities for the experimental model applied.

Key words: Degree of hydrolysis, antimicrobial activity, antioxidant, *Sarda chiliensis chiliensis*.

INTRODUCCIÓN

El bonito (*S. chiliensis chiliensis*) es una especie pelágica que se distribuye desde Puerto Pizarro hasta Tacna, considerado como uno de los principales recursos ictiológicos del Perú, y que en el 2019 tuvo como límite de captura anual 64 mil toneladas¹. La venta directa del bonito en los mercados de abasto genera subproductos como espinas, escamas, pieles entre otros que son desechados, produciendo de esta manera contaminación ambiental y desaprovechamiento de una importante fuente de proteínas que pueden ser empleadas en la producción de hidrolizados, con un valor agregado para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética².

La hidrólisis enzimática de los subproductos del pescado, es considerado un proceso ventajoso, controlado y selectivo, que genera péptidos de diferentes tamaños con propiedades funcionales o biológicas para el ser humano como antimicrobiano, antioxidante, antihipertensivo, entre otros³. Se han demostrado las actividades antioxidantes y antimicrobianas de péptidos

obtenidos a partir de hidrolizados enzimáticos, empleando como materia prima la gelatina y colágeno de los residuos de diferentes especies marinas^{2,4,5}.

Las propiedades funcionales de los hidrolizados dependen de la fuente de donde se obtenga, del grado de hidrólisis (GH), composición de los péptidos, enzima empleada y condiciones de reacción³, por lo que considerando estas propiedades y con la finalidad de proponer una aplicación alternativa al empleo de las pieles de bonito como sub productos de la actividad pesquera, se realizó la hidrólisis de la gelatina obtenida de dichas pieles empleando la enzima alcalasa y diferentes condiciones de temperatura, pH, tiempo y relación E/S, con el objetivo de obtener hidrolizados con actividad antioxidante y antimicrobiana así como demostrar el efecto del grado de hidrólisis (GH) sobre dichas actividades.

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención de las muestras: Se recolectaron como residuos de la actividad pesquera las pieles de *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”, en el Terminal Pesquero de Ventanilla – Lima, durante el mes de diciembre del 2016. Se transportó en cooler y se almacenó a -20°C hasta su tratamiento.

Obtención de gelatina por hidrólisis parcial del colágeno: Se obtuvo colágeno por hidrólisis básica. Las pieles de pescado fueron tratadas con NaOH 0,5N, en la relación 1:10 (peso de piel: volumen) a 30 °C con agitación moderada por 10 horas. Para la obtención de gelatina, al colágeno se le agregó ácido acético (pH 5) y se llevó a baño termostático de 70°C por 6 h, se filtró y congeló a -20°C por 24 h, para luego descongelarse a temperatura ambiente y llevar a secado en circulación forzada de aire a 50°C por 12 h⁶.

Cuantificación de proteína total. La gelatina se cuantificó según el método de Bradford. Se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) en el rango de concentraciones 250 - 750 µg/mL. Las lecturas fueron hechas a 595 nm.

Factores que influyen en el proceso de hidrólisis. Se realizaron 15 experimentos siguiendo el diseño factorial tipo Plackett-Burman con punto central por triplicado, para ello se empleó la enzima alcalasa de *Bacillus liqueniformis* (Sigma Aldrich) y como sustrato gelatina obtenida en el paso anterior (70,32 % de proteína). Las condiciones de reacción ensayadas fueron: pH (7, 8 y 9), temperatura (50, 60 y 70 °C), tiempo (2, 3 y 4 h) y relación [enzima]:[sustrato] ([1]:[20], [1]:[35] y [1]:[50]). Las condiciones de pH a ensayar se lograron empleando buffer fosfato pH7.0 y 8.00; y Buffer Tris-HCl pH 9.0 todos a concentración 10 mM. Se inactivó la enzima al final de cada reacción a temperatura de 90 °C por 10 minutos y se centrifugó a 3800 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Determinación del Grado de Hidrólisis (GH). Se realizó por cuantificación de proteína soluble por el método de Biuret, siguiendo el procedimiento descrito por Wangtueai *et al*⁷, se evaluó la proporción de proteína soluble en ácido tricloroacético (ATC) 20 % con respecto a

la cantidad total de proteína en las muestras. La curva de calibración se realizó con BSA y se calculó el GH con la siguiente fórmula:

$$GH = \frac{\text{Proteína soluble en solución de ATC (mg)}}{\text{Proteína total en la muestra no hidrolizada (mg)}} \times 100\%$$

Actividad antioxidante mediante el método del radical (DPPH). Se empleó el método modificado por Brand-Williams W. *et al*⁸. Para lo cual 980 µL del reactivo 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH® Sigma Aldrich) se mezcló con 20 µL de hidrolizado a diferentes concentraciones (25 a 2750 µg/mL) y se dejó reaccionar por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad, la densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro Agilent Cary 8454 a 517 nm. Se emplearon como estándares vitamina C y Trolox a concentraciones entre 0,8 – 2,8 µg/mL y 1,2 – 6,0 µg/mL, respectivamente.

Actividad antioxidante mediante el método del radical catiónico (ABTS). Se empleó la metodología propuesta por Re R. *et al*⁹. Para lo cual 50 µL del hidrolizado diluido se mezcló con 950 µL del reactivo ABTS y se incubaron a 30°C por 30 min. Las lecturas se midieron en espectrofotómetro a 734 nm. Los hidrolizados se diluyeron a concentraciones de 15 a 300 µg/mL y se empleó como estándar el reactivo Trolox a las concentraciones de 2,5 - 25 µmol/L. los resultados se expresaron como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de proteína (µmoleT/g).

Actividad antimicrobiana. Se utilizó el método difusión en pozo en agar descrito por Rojas *et al*¹⁰. Para ello se prepararon suspensiones de turbidez 0,5 de la escala de McFarland de cultivos de 24 h de las cepas clínicas *Stahylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, y se inocularon en Agar Muller Hinton para bacterias y Agar Dextrosa Saboraud para la levadura, a razón de 1 mL por cada 100 mL de medio. Se homogenizó y distribuyó 25 mL en cada placa petri estéril (90 mm) y se dejó solidificar. Luego se realizaron pozos de diámetro externo 9 mm y en cada pozo se incorporó 100 µL de hidrolizado (1,0 y 0,5 mg/mL). Se dejó difundir por 1 h y se llevó a 37 °C por 24 h. Se midieron los halos de inhibición (mm.) indicativo de las propiedades antimicrobianas de las muestras analizadas.

Método de microdilución colorimétrica. Se trabajó según las metodologías del CLSI y Sarker *et al*^{11,12}, para ello en una microplaca de 96 pocillos se agregaron cantidades iguales de concentraciones geoméricamente ascendentes de la muestra, suspensión del microorganismo 1- 1,5x10⁸ ufc/mL (0,5 escala de McFarland) en caldo Muller Hinton y resazurina (20 mg/mL) como indicador de crecimiento bacteriano. Se incubó a 37 °C por 16-20 h y el crecimiento microbiano se evidenció por cambio de coloración de azul púrpura a rosado rojizo en comparación con el control. La menor concentración de hidrolizado a la que no se observó viraje de color de púrpura a rosado se consideró como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Análisis estadístico. La significancia de los factores que influyeron en el proceso hidrolítico se realizó mediante el diseño factorial tipo Plackett-Burman con punto central por triplicado y nivel de significancia de $p < 0,05$, empleando el software estadístico Minitab® v. 17.1.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de los factores que influyen en el proceso de hidrólisis

La hidrólisis enzimática a las diferentes condiciones de pH, temperatura, tiempo y relación [enzima/sustrato] expresada como porcentaje de grado de hidrólisis (GH) se muestra en la tabla 1. El menor GH (11,24 %), se observa para el tratamiento H505 bajo las condiciones de 50°C, pH 9, tiempo de 2 h y relación enzima/sustrato [1/20] y el máximo GH se reportó en el punto central en las 3 repeticiones para los experimentos H601, H602 y H603 con 33,21 %; 32,67 % y 33,04 %, respectivamente, a las condiciones de 60°C, pH 8, tiempo de 3 horas y relación enzima/sustrato [1/35]. Estudios similares se han realizado empleando la enzima alcalasa, al respecto Blanco *et al*², reportaron GH menores al 20 % para los hidrolizados del colágeno extraído de la piel de las especies de tiburón moteado, tiburón azul, pez espada y atún aleta amarilla a condiciones 50°C, pH 8, [enzima]: [sustrato] equivalente a [1]:[20] y tiempo de 3 h. Asimismo, Jridi *et al*¹³ sometieron a hidrólisis enzimática la gelatina de piel de sepia (*Sepia officinalis*), alcanzando un GH de 20,3 % empleando la enzima alcalasa a pH 8 y por un tiempo de 3 h.

Todos los hidrolizados de gelatina ensayados presentaron GH superiores a 10 %, por lo que son considerados en el grupo de alto grado de hidrólisis, y podrían mejorar las características de solubilidad y digestibilidad del mismo, si bien es cierto en la presente investigación no se realizaron pruebas funcionales a los hidrolizados, se conoce que hidrolizados de sub productos de pescado y pescado entero con GH mayores a 10 % incrementan la absorción de agua, solubilidad y capacidad espumante, además mejoran sus características sensoriales, importante para fines de la industria alimentaria^{14,15}.

El GH es considerado un indicador importante en un proceso hidrolítico, como resultado de este, se obtienen cadenas peptídicas de diferente tamaño o aminoácidos libres que pueden relacionarse con las propiedades funcionales.

Tabla 1. Efecto de los factores pH, temperatura, tiempo y relación [enzima/sustrato] en el grado de hidrólisis por tratamiento.

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

Los resultados de la presente investigación bajo diferentes tratamientos demuestran que el GH depende de los diferentes factores estudiados, siendo la relación enzima/sustrato la variable que influencia significativamente en la hidrólisis enzimática de la gelatina de bonito (p valor $< 0,05$), como se presenta en la figura 1.

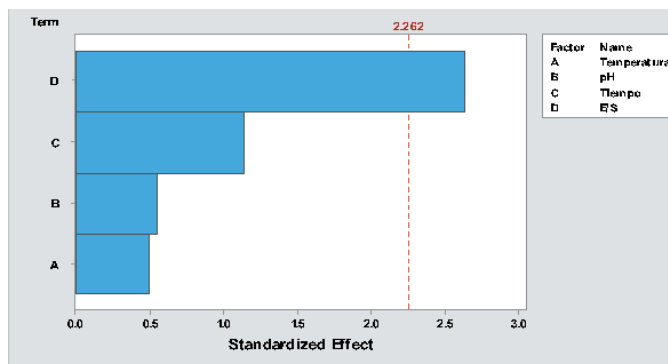


Figura 1. Diagrama de Pareto de los Factores Temperatura (valor-p: 0,635), pH (valor-p: 0,595), Tiempo (valor-p: 0,285) y relación Enzima / sustrato [E/S] (valor-p: 0,027*) en la hidrólisis enzimática de la gelatina de *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”.

Es importante notar que las variables tiempo y temperatura no influyen significativamente en el proceso de hidrólisis propuesto por lo que se puede aprovechar esta información, a fin de reducir a los mínimos valores de estos factores en un proceso de optimización, para reducir costos.

Relación entre la actividad antioxidante y el GH

En la tabla 2 se presenta la actividad antioxidante expresada como porcentaje de inhibición del radical DPPH, ABTS, así como también el IC50 y TEAC correspondiente a cada tratamiento.

Tabla 2. Grado de hidrólisis (% GH) y actividad antioxidante por los métodos DPPH● y ABTS ●+ para cada muestra.

Muestra	Grado de hidrólisis (%)	Actividad Antioxidante		
		(DPPH●)		(ABTS●+)
		IC50 mg/mL	IC50 mg/mL	TEAC (μmol Trolox/g hidrolizado proteico)
Vitamina C	–	0,00168	–	–
Trolox	–	0,00353	–	–
H601	33,21	1,240	0,139	89,28
H602	32,67	1,237	0,136	91,21
H603	33,04	1,247	0,137	90,67
H504	16,22	0,539	0,097	128,32
H505	11,24	1,827	0,161	79,45
H506	15,31	1,611	0,160	77,48
H507	11,99	1,702	0,162	76,22
H508	13,24	0,533	0,086	143,79
H509	25,80	0,959	0,114	109,08
H7010	16,59	1,226	0,135	91,74
H7011	16,96	1,830	0,200	61,76
H7012	11,49	0,459	0,075	165,38
H7013	17,17	1,706	0,172	72,12
H7014	16,67	1,006	0,122	101,33
H7015	20,99	1,393	0,114	108,92

Los valores de IC50 por el método DPPH se encontraron entre 0,459 (H7012) y 1,830 mg/mL (H7011) y por el método ABTS variaron entre 0,075(H7012) y 0,200 mg/mL (H7011), siendo la mejor actividad antioxidante la que presenta valores de IC50 menores, en este caso corresponde al hidrolizado H7012 seguido de H504 y H508, además los valores de TEAC más altos se reportan también para estos 3 hidrolizados. Los resultados se asemejan a los reportados por otros autores. Wang *et al*¹⁶ encontraron buenas actividades antioxidantes de tres péptidos del hidrolizado del colágeno obtenido de escamas de *Pseudosciaena crocea* determinadas por el método DPPH (IC50 1,271; 0,675 y 0,283 mg/mL) y ABTS (IC50 0,421; 0,309 y 0,210 mg/mL), por otro lado Weng *et al*¹⁷ determinaron la actividad antioxidante de diferentes hidrolizados de piel de tiburón obteniendo para una de sus fracciones IC50 (DPPH) de 0,57 mg/mL similar a Nakchum *et al*¹⁸ que obtuvieron 0,417 mg/mL, para una fracción de hidrolizado de colágeno, aplicando el mismo método.

Se puede observar que las actividades antioxidantes del presente estudio no guardan relación directa con el GH, las mejores actividades antioxidantes para H7012, H504 y H508 se obtuvieron a GH de 11,49 %, 16,42 % y 13,24 %, observando que por encima de 16 % la actividad antioxidante fue menor, lo cual concuerda con diversos estudios que han demostrado actividad antioxidante tanto de hidrolizados como de sus fracciones peptídicas empleando la enzima alcalasa con GH menores al 20 %^{4,5,13,16,17,18}.

Los IC 50 obtenidos en el estudio, demuestran una buena actividad antioxidante, no se realizó el fraccionamiento, porque uno de los potenciales usos es el empleo de hidrolizados directamente en la industria de alimentos³ y los hidrolizados H7012, H504 y H508, podrían ser empleados para estos fines. Son pocos los estudios que comparan la actividad del hidrolizado sin fraccionar, como es el estudio de Jridi *et al*¹³, quienes compararon la actividad antioxidante de cuatro hidrolizados de gelatina de la piel de sepia obtenidos con tres enzimas crudas de diferentes microorganismos y una comercial (alcalasa), demostrando una mayor actividad antioxidante para el hidrolizado con alcalasa sugiriendo que los péptidos de los diferentes hidrolizados podrían ser diferentes en términos de longitud de cadena y secuencia de aminoácidos. Por otro lado Blanco *et al*², al comparar la actividad antioxidante con los métodos de DPPH y ABTS de cuatro hidrolizados de colágeno obtenido de la piel de cuatro especies diferentes, demostraron que dicha actividad no solo está influenciada por el GH, sino también por la presencia de aminoácidos como la cisteína que interactúa con los radicales libres por sus grupos SH libres. La atribución de la buena actividad antioxidante de los hidrolizados de residuos de pescado y sus residuos podría estar asociada a la presencia de aminoácidos aromáticos y la capacidad de los grupos fenólicos como donadores de protones. Aunque, podría también relacionarse con la conformación y abundancia de los péptidos, así como a la posición de aminoácidos dentro de las secuencias peptídicas^{2,5,13}

Relación entre la actividad antimicrobiana y el GH

La actividad antimicrobiana de los diferentes hidrolizados fue evidenciada por la presencia de halos sólo frente a *S. aureus* y *B. subtilis*, como se muestra en la tabla 3 y se complementó la evaluación con la determinación de la CMI

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los hidrolizados utilizando difusión en agar y microdilución.

Muestra	Halos de inhibición (mm) para la concentración de 1 mg/mL de cada muestra		CMI (µg/mL)	
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
H601	15,5	14,5	> 1000	1000
H602	15,0	14,0	> 1000	1000
H603	15,5	14,0	> 1000	1000
H504	13,5	13,5	500	500
H505	-	-	-	-
H506	-	-	-	-
H507	-	-	-	-
H508	14,0	-	1000	1000
H509	13,0	13,5	1000	1000
H7010	14,0	-	1000	1000
H7011	-	-	-	-
H7012	-	-	-	-
H7013	-	-	-	-
H7014	14,5	13,5	1000	>1000
H7015	-	-	-	-

Los hidrolizados H601, H602, H603, H504, H508, H509, H7010 y H7014 mostraron actividad antimicrobiana baja frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con halos entre 13 a 15,5 mm; sin embargo superan a lo obtenido por Gómez-Guillén *et al*⁴ quienes reportan para el hidrolizado de piel de atún, halos de inhibición de aproximadamente 7,5 mm (con discos de 5 mm) frente a *Staphylococcus aureus*; así también Vinoth L¹⁹, demostró actividad antimicrobiana en hidrolizados de piel y músculo de quince pescados, destacando el del pez globo *Arothron stellatus* que presentó halo de 9 mm para *S. aureus* y 6 mm frente a *Escherichia coli*.

También a los hidrolizados se les determinó la CMI mediante el método de microdilución colorimétrica, hallando que la mayoría presentó CMI igual a 1000 µg/mL, que indicaría una actividad baja, o sin actividad en casos de CMI mayores a 1000 µg/mL; sin embargo, el hidrolizado H504 con GH de 16,22 % mostró CMI de 500 µg/mL frente a *S. aureus* y *B. subtilis*. Los valores entre 500 - 1000 µg/mL que indicarían baja actividad; estarían posiblemente asociadas a las características propias de los componentes (péptidos, aminoácidos, proteínas no hidrolizadas, entre otros) de los hidrolizados, como la solubilidad, peso molecular, polaridad, estructura y composición; y que a la vez podrían interaccionar no sólo con el microorganismo sino también con el medio de cultivo³. Sin embargo, considerando que estos hidrolizados derivan sólo de proteínas y no tienen otro tipo de componente; podríamos afirmar que lo obtenido no es despreciable por lo que se recomienda continuar con la purificación de los péptidos a fin de obtener mejores actividades.

CONCLUSIONES

Según los resultados las condiciones de reacción enzimática empleando la enzima alcalasa influyen en el grado de hidrólisis, llegando a obtener hidrolizados de 33,65 % a las condiciones de 60°C, pH 8, tiempo de 3 h y relación enzima/sustrato [1/35], siendo la relación E/S la variable que influye significativamente en el proceso de hidrólisis. Sin embargo, las mayores actividades antioxidantes y antimicrobianas se presentaron a GH entre 13 y 17 %. Tres hidrolizados H504, H508 y H7012 presentaron buena actividad antioxidante con valores de TEAC de 128,32; 143,79; 165,38 mol Trolox/g hidrolizado proteico. Ocho hidrolizados presentaron actividad antimicrobiana baja frente a *Staphylococcus aureus* (13 -15.5 mm) y *Bacillus subtilis* (13 - 14,5 mm), el hidrolizado H504 mostró CMI de 500 µg/mL frente a *S. aureus* y *B. subtilis*. En base a los resultados de la presente investigación la gelatina obtenida de la piel de *Sarda chiliensis chiliensis* puede ser empleada en un proceso controlado para obtener hidrolizados con propiedades funcionales y actividad antioxidante y antimicrobiana que pueden ser aprovechados por la industria de alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. R.M. N° 003-2019-PRODUCE. 7 de enero 2019. Establecen el límite de captura del recurso bonito para el período 2019. Publicado en El Peruano. Martes 8 de enero del 2019.
2. Blanco M, Vásquez J, Pérez-Martín R, Sotelo C. Hydrolysates of fish skin collagen: an opportunity for valorizing fish industry byproducts. *Mar Drugs*. 2017; 15 (5): 131-145.
3. Hleap J, Gutiérrez C. Hidrolizados de pescado - producción, beneficios y nuevos avances en la industria. -Una revisión. *Acta Agron*. 2017; 66 (3): 311-322.
4. Gómez-Guillén MC, López-Caballero M, Alemán A, López de Lacey A, Giménez B, Montero P. Sea by-products as Real Material: New ways of Application. 1ra ed. Kerala, India: Transworld Research Network; 2010; 7.
5. Chi CF, Cao ZH, Wang B, Hu FY, Li ZR, Zhang B. Antioxidant and Functional Properties of Collagen Hydrolysates from Spanish Mackerel Skin as Influenced by Average Molecular Weight. *Molecules*. 2014; 19 (8): 11211-11230.
6. Thi Hue C, Hang NT, Razumovskaya R. Physicochemical characterization of gelatin extracted from european perch (*Perca fluviatilis*) and Volga pikeperch (*Sander volgensis*) skins. *Turk J Fish Aquat Sci*. 2017; 17: 1117-1125.
7. Wangtueai S, Siebenhandl-Ehn S, Haltrich D. Optimization of the preparation of gelatin hydrolysates with antioxidative activity from Lizardfish (*Saurida* spp.) Scales Gelatin. *Chiang Mai J Sci*. 2016; 43 (1): 68-79.
8. Brand-William W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*. 1995; 28: 25-30.
9. Re R, Pekkegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved Abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999; 26(9): 1231-1237.
10. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003; 88(2): 199-204.
11. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility. Tests for bacteria that grow aerobically; approved Standard. 10th Ed. Vol 32, CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
12. Rojas J, Ruiz J, Almonacid R, Ortiz J, Palomino M, Huaroto L, et al. Antibacterial activities of essential oils from three medicinal plants in combination with EDTA against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Br Microbiol Res J*. 2016; 17(4): 1-10
13. Jridi M, Lassoued I, Nasri R, Ayadi MA, Nasri M, Souissi N. Characterization and Potential Use of Cuttlefish Skin Gelatin Hydrolysates Prepared by Different Microbial Proteases. *BioMed Res Int*. 2014; 1-14.
14. Llerena T, Rodríguez W. Obtención y caracterización de un hidrolizado de colágeno purificado producido mediante el uso de la enzima delvolase. *Anales Científicos*. 2017; 78 (2): 251 – 259.
15. León-López A, Morales-Peñaloza A, Martínez-Juárez VM, Vargas-Torres A, Zeugolis DI, Aguirre-Álvarez G. Hydrolyzed Collagen-Sources and Applications. *Molecules*. 2019 Nov 7; 24(22):4031. doi: 10.3390/molecules24224031.

16. Wang B, Wang YM, Chi CF, Luo HY, Deng SG, Ma JY. Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena cricea*). *Mar Drugs*. 2013; 11 (11): 4641-4661.
17. Weng W, Tang L, Wang B, Chen J, Su W, Osako K, et al. Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin hydrolysates. *J Funct Foods*. 2014; 11: 342-351.
18. Nakchum L, Kim SM. Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. *Prep Biochem Biotech*. 2016; 46 (2): 123-130.
19. Vinoth Kumar L. Antimicrobial activity of biopeptides extracted from fish protein hydrolysate. [Tesis de Maestría]. Thoothukudi, India: Tamilnadu Veterinary and Animal Science University; 2013.