



Aplicación de diferentes niveles de pepsina para la obtención de colágeno a partir de las patas de pollo

Application of different levels of pepsine for collagen obtaining from chicken legs

Aplicação de diferentes níveis de pepsina para obter colágeno de pés de frango

Linda Mariuxi Flores-Fiallos ^I
linda.flores@epoch.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-4516-6963>

Cristina Nataly Villegas-Freire ^{II}
c.villegas@epoch.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-3392-8051>

María Augusta Guadalupe-Alcoser ^{III}
ma.guadalupe@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0547-215X>

Correspondencia: linda.flores@epoch.edu.ec

Ciencias Naturales

Artículo de investigación

***Recibido:** 20 de diciembre de 2020 ***Aceptado:** 12 de enero de 2021 * **Publicado:** 08 de febrero de 2021

- I. Master Universitario en Química Orgánica, Ingeniera Química, Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- II. Magister en Formulación, Evaluación y Gerencia de Proyectos para el Desarrollo, Master universitario en Química, Bioquímico Farmacéutico, Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- III. Magister en Ingeniería Química Aplicada, Máster Universitario en Sistemas Integrados de Gestión de la Prevención de Riesgos Laborales, la Calidad, el Medio Ambiente y la Responsabilidad Social Corporativa, Ingeniera Química, Facultad de Ciencias de la vida de la Universidad Estatal Amazónica, Puyo, Ecuador.

Resumen

Se obtuvo colágeno de las patas de pollo con la aplicación de 2, 4 y 6% de pepsina, con tres repeticiones cada uno, distribuidos bajo un diseño completamente al azar, los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza y la separación de medias según Tukey. Estableciendo que el empleo de pepsina afectó estadísticamente las características físico – químicos y microbiológicos del colágeno de las patas de pollo. Mostrándose que al aplicar el 6 % de pepsina, reportaron las mejores respuestas en nitrógeno total (13 %), mayor porcentaje de proteína (78%), densidad (0,37g/mL), una conductividad (20,48ms/cm) y menor cantidad de aerobios (42 UFC/g). En cuanto a la variable pH (5,28) del colágeno existió diferencias estadísticas pero esta disminuyó a medida que se incrementó los niveles de pepsina. Por lo que se recomienda utilizar el 6% de pepsina en la obtención de colágeno de las patas de pollo; ya que presentó las mejores características físico– químicos y microbiológicos.

Palabras claves: Extracción; pepsina; colágeno; conductividad.

Abstract

Collagen was obtained from the chicken legs with an application of 2%, 4% and 6% of Pepsin, with 3 repetitions each one, distributed under a completely random design. Analysis of variance and the division of means according to Tukey considered the results. Stating that the use of pepsin affects statistically the physical-chemical and microbiological characteristic of collagen from the chicken legs. It is shown that when applying 6% of pepsin, the best responses were reported in total nitrogen (13%), higher percentage of protein (78%), density (0.37g/mL), conductivity (20.48mS/cm), and less amount of aerobic (42 UFC/g). As for the variable pH (5.28) of collagen, there are statistical differences, but this decreased as the pepsin levels increased. There fore it is recommended to use 6% of the pepsin in obtaining collagen from the chicken legs, since the best physical-chemical and microbiological characteristic were presented.

Keywords: Extraction; Pepsin; Collagen; Conductivity.

Resumo

O colágeno foi obtido das patas de frango com a aplicação de pepsina a 2, 4 e 6%, com três repetições cada, distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado, os resultados foram

analizados por análisis de variância e separação das médias segundo Tukey. Estabelecer que o uso de pepsina afetou estatisticamente as características físico-químicas e microbiológicas do colágeno dos pés de frango. Mostrando que ao aplicar 6% de pepsina, eles relataram as melhores respostas em nitrogênio total (13%), maior porcentagem de proteína (78%), densidade (0,37g / mL), condutividade (20,48ms / cm) e menor quantidade de aeróbios (42 CFU / g). Em relação à variável pH (5,28) do colágeno, houve diferença estatística, mas esta diminuiu com o aumento dos níveis de pepsina. Portanto, é recomendado o uso de pepsina a 6% na obtenção de colágeno dos pés de frango; por apresentar as melhores características físico-químicas e microbiológicas.

Palavras-chave:Extração; pepsina; colágeno; condutividade..

Introducción

Los mataderos avícolas generan efluentes líquidos, compuestos de grasas, proteínas y restos de animales. También generan los desechos sólidos, tales como: los huesos, las entrañas, patas, cabezas, piel. Los cuales usualmente al no poder ser utilizados son desechados en los vertederos, debido a que por sus características organolépticas no son aptas para el consumo humano directo. La producción de carne de pollo, genera una gran cantidad de subproductos los cuales en su mayoría poseen una alta fuente de proteína, es así que a partir de las crestas se puede extraer colágeno de tipo I en una proporción del 1 al 1.6% (Castro, D. 2016).

El colágeno es una proteína fibrosa insoluble en agua, formada por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas las cuales son las responsables de su resistencia es el principal componente fibroso de huesos, dientes, tejido conectivo (cartílago, tendones). Esta proteína posee numerosas aplicaciones principalmente en la industria farmacéutica y alimenticia debido a sus propiedades físico-químicas, ya que puede ser usado como agente emulsificante, estabilizante, gelificante. Es una de las proteínas más abundantes en los organismos Heterótrofos. Son más fáciles de aislar mientras más joven sea el animal ya que al ser más viejo la carne tiende a ser más dura y con poca flexibilidad. Cuando se hierve el colágeno en agua se convierte en la proteína Hidrosoluble conocida comúnmente como “Gelatina”, que la cual al enfriarse al ambiente esta se cuaja formando así un gel.

La pepsina es una enzima presente de forma natural en el organismo, y de forma particular en el jugo gástrico. La pepsina ayuda en la digestión de los alimentos degradando las proteínas que

llegan al estómago. Es producida y secretada por la mucosa gástrica en el momento de la digestión. La pepsina también puede ser comercializada. En este caso proviene del estómago del cerdo. La pepsina forma parte de la composición de numerosos quesos y de ciertas sodas (Figueroa, C. et al. 2016).

Actúa principalmente sobre enlaces peptídicos de naturaleza hidrófoba, preferentemente aromáticos. La pepsina es más activa con un pH de entre 2 y 3. Se desactiva permanentemente con un pH superior a 6. Es segregada por las células de las paredes del estómago. Se libera en forma de pepsinógeno. Digestión de los telopeptidos. La digestión de los telopeptidos se hace con pepsina. Al eliminar los telopeptidos, el colágeno resulta menos antígeno, más puro y con mejores posibilidades para ser utilizado como biomaterial (Figueroa, C. et al. 2016).

Los estudios sobre fuentes alternativas y nuevas funcionalidades de colágeno ha experimentado un gran auge, en parte debido al creciente interés en la valoración los subproductos industriales (desde la industria de la carne y el 15 pescado). Debido a esto, hoy en día también se obtiene colágeno a partir de patas de pollo siendo éste un sustituto de colágeno procedente de manera convencional a partir de algunos mamíferos.

Con la extracción selectiva de este tipo de proteínas es posible generar valor agregado a la cadena productiva a partir de los desechos avícolas, además que, la cantidad de residuos en el ambiente será significativa.

Por lo anotado, en la presente investigación se planteó el siguiente objetivo:

- Evaluar los diferentes niveles de colágeno obtenidos a partir de las patas de pollo

Materiales y Métodos

En la presente investigación se utilizó 10.000 g de patas de pollo y niveles de 2, 4 y 6 % de pepsina y un tratamiento control, con 500 g de materia prima para cada tratamiento y 5 repeticiones por tratamiento.

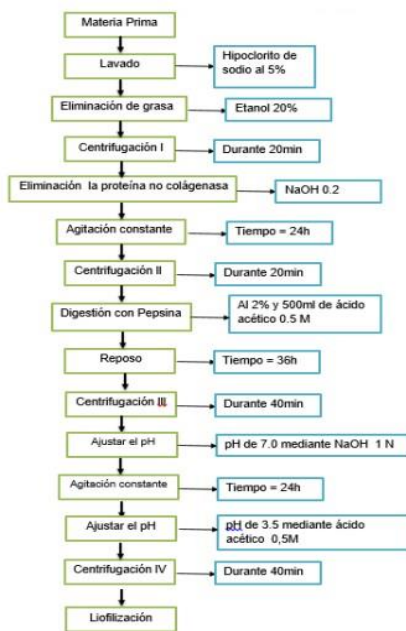
Se evaluó distintos niveles de pepsina para la extracción de colágeno, con niveles de 2, 4, y 6% de pepsina. Estos tratamientos fueron distribuidos en un Diseño Completamente a Azar (DCA), con cuatro tratamientos (incluido el control) y 5 repeticiones por tratamientos, teniendo así un total de 20 unidades experimentales.

La extracción de colágeno se hizo en base al siguiente procedimiento: Las patas se lavaron en agua potable, se adicionó una solución de hipoclorito de sodio a 5 % durante una hora y se enjuagó

con agua destilada. La piel y los tendones se separaron de los huesos con ayuda de un bisturí, luego se realizó la eliminación de las grasas y pigmentos mediante una agitación constante en etanol al 20% durante 24 horas. Se centrifugó la muestra de 500mL cada muestra por 20 minutos y se desechó el sobrenadante, en el cual se encontraba todas las grasas presentes en el tejido tratado.

Se eliminó la proteína ajena al colágeno mediante agitación constante con NaOH 0.2 N por un tiempo de 24 h, para luego centrifugar nuevamente por 20 minutos y después se desechó el sobrenadante. Luego se agregó la pepsina (sigma- Aldrich) al 2% y 500mL de ácido acético 0.5 M al precipitado. La mezcla se sometió a un reposo de 36 horas para luego centrifugar por 40 minutos. El sobrenadante se ajustó a un pH de 7.0 mediante NaOH 1 N y se mantuvo en agitación durante 24 h, se ajustó nuevamente el pH a 3.5 con ácido acético 0.5 M. luego se añadió NaCl al 0,9M lentamente para precipitar la proteína, esta mezcla se centrifugó durante 40 minutos, el precipitado resultante de disolvió en ácido acético 0.5 M. Como último se realizó la liofilización en un liofilizador Marca a una temperatura de -54°C durante 48 horas.

Figura 1: Diagrama de flujo para la obtención de Colágeno



Fuente: Autor

Resultados y discusión

Se determinó el nitrógeno total mediante el método de kjeldahl según AOAC, 2001.11. La concentración de nitrógeno se multiplicó por el factor de proteína (6,25) para obtener el porcentaje de proteína presente en la muestra. Para lo cual se pesó la 1g muestra en una balanza analítica y se colocó en un balón de kjeldahl, se agregó 10g de catalizador (mezcla de sulfato de cobre y sulfato de sodio) y 25 mL de H₂SO₄. Luego se colocó en el digestor y se esperó hasta que se elimine todo el humo, hasta que la disolución se aclare y se continuó la ebullición durante al menos otros 30 min. Se enfrió el balón y se colocó 200mL de agua, 100 ml de NaOH al 50% y unos gránulos de Zn para estabilizar la reacción. Luego se colocó en el área de destilación. En un Erlenmeyer se puso 100ml de H₃BO₃ al 2.5% y se colocó debajo del área mencionada. Introduciendo la punta del tubo del destilado en el Erlenmeyer.

Enseguida se colocó el balón en el área de destilación. Se esperó hasta en el Erlenmeyer la solución llegue a 300ml de destilado. Se Retirar del equipo y se colocó el indicador Verde Rojo de Bromo cresol lo que hizo cambiar de coloración a verde menta. Luego se tituló con HCl al 0.1 N. Se tomaron datos para luego ser transformado a través de un factor en proteína utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\%N = \frac{14xNxVx100}{mx1000} \qquad \%P = \frac{14NxVx100xfactor}{mx1000}$$

Donde:

V: Titulación leída de HCL 0,1 N

m: Masa de la muestra en gramos

N: 0,1 N HCl

Factor: 6.25

La densidad se determinó mediante el método gravimétrico tomado de Farmacopea, ISO 787/11, ASTM B527. Donde se midió la densidad del colágeno en polvo. Se determinó la temperatura y la humedad relativa del laboratorio. Encontrando una temperatura de 18°C y una humedad relativa de 45%. Primero se pesó la probeta vacía, después se pesó la probeta más el colágeno y por último

se pesó la probeta más agua, con los datos obtenidos se procedió a aplicar la siguiente ecuación para hallar la densidad de la muestra:

$$Densidad = \frac{(Peso\ de\ probeta\ +\ colágeno) - peso\ de\ probeta\ vacía}{(Peso\ de\ probeta\ +\ agua) - peso\ de\ probeta\ vacía}$$

Se determinó el potencial de Hidrógeno (pH) de las muestras de colágeno mediante el método potenciómetro NTE INEN 1519 - 1987. Se utilizó un pHmetro marca el cual se calibro con dos soluciones Buffer con pH 7 y 4 se realizó la verificación con el Buffer de pH 7, luego se disolvió 10g de muestra en 50 mL de agua destilada mediante agitación 30 min y se colocó en un vaso de precipitación de 100mL se dejó decantar durante 30 min, se sumergió el electrodo en la muestra hasta que se estabilice el equipo, y se procedió a tomar la lectura.

Los resultados de la valoración físico química del colágeno obtenido con los diferentes niveles de pepsina, se reporta en la Tabla 1, donde se aprecia que existe variación por el efecto de la pepsina.

Tabla 2: Análisis físico-químico y microbiológico de colágeno de patas de pollo obtenidos con diferentes niveles de pepsina

Variables	Niveles de pepsina, %				E.e.	Prob.
	0	2	4	6		
Nitrógeno, %	10 b	11 ab	13 a	13 a	0,01	0,01
Proteína %	62 b	67 ab	78 a	78 a	0,03	0,01
Ph	6,10 a	5,99 ab	5,75 bc	5,28 c	0,06	2,14E-07
Densidad, g/ml	0,26 c	0,33 b	0,35 ab	0,37a	0,01	2,3 E-07
Conductividad ms/cm	16,55	17,36 c	18,45 b	20,48 a	0,10	0,00
Aerobios totales ufc/g	22,00	40,00 a	42,00 a	42,00 a	35,75	9,73E-01

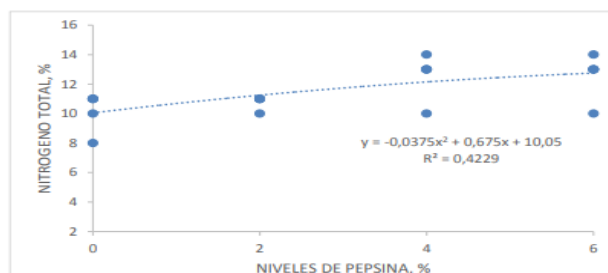
Fuente: Autor

E.E: Error estándar; Prob.>0,05: No existen diferencias estadísticas; Prob.<0,05: Existen diferencias estadísticas; Medidas con letras distintas en una fila difieren estadísticamente según prueba Tukey.

Los contenidos de nitrógeno total del colágeno presentaron diferencias significativas (P<0,05), por el efecto de los niveles de pepsina adicionadas, por cuanto los mayores contenidos se encontraron al adicionar 4 y 6% de pepsina que presentaron 13% de nitrógeno total, en cambio al utilizar el 2% de pepsina y el grupo control redujeron su contenido de nitrógeno al 10 y 11%.

Por lo que mediante el análisis de la regresión se estableció una tendencia cuadrática significativa como se muestra en la Figura 2, que indica que el porcentaje de nitrógeno total aumenta, pero no de forma proporcional a medida que se incrementa los niveles de pepsina. Siendo similar con lo que reporta Almeida, P. et al (2013), quien afirma que se obtuvo el 13,5% de nitrógeno total, valor que es similar al valor encontrado en este estudio.

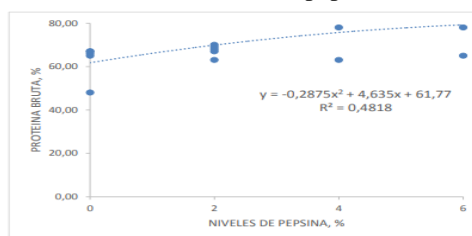
Figura 2: Comportamiento de Nitrógeno total (%) del colágeno obtenido de las patas de pollo



Fuente: Autor

Los contenidos de proteína del colágeno presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), por efecto de los niveles de pepsina aplicadas, por cuanto los mayores contenidos de encontraron al aplicar 4 y 6% de pepsina que presentaron el 78% de proteína, mientras que al utilizar los niveles de 2% y el grupo control redujeron su contenido proteico a 67 y 62%, respectivamente, por lo que mediante el análisis de la regresión se estableció una tendencia cuadrática significativa Figura 3, que determina el contenido proteico del colágeno aumenta pero no de forma proporcional.

Figura 3: Comportamiento del contenido de proteína (%) del colágeno obtenido de las patas de pollo con distintos niveles de pepsina

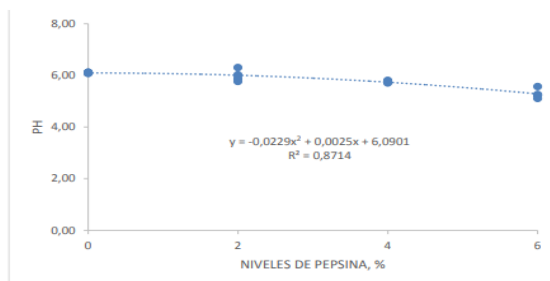


Fuente: Autor

Al aplicarse los distintos niveles de pepsina en la extracción de colágeno se determinó que hubo diferencias significativas ($P > 0,05$), ya que presentaron valores de 6,10, al aplicar 6%, 5,99, con el 4% de pepsina, 5,75 con 2% y 5,28 en el tratamiento control, por lo que mediante el análisis

de la regresión se estableció una tendencia cuadrática significativa Figura 4, que establece que a medida que se incrementa los niveles de pepsina tiende a disminuir el pH.

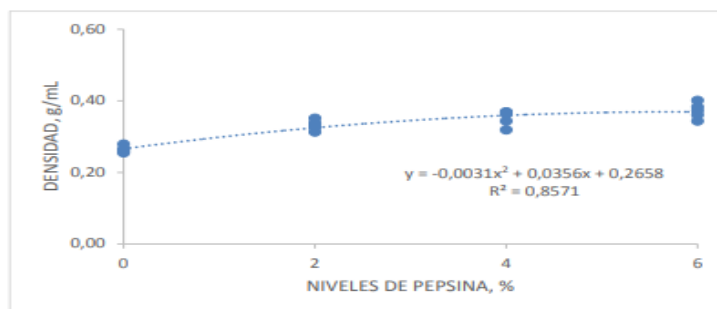
Figura 3: Comportamiento pH del colágeno obtenido de las patas de pollo con distintos niveles de pepsina



Fuente: Autor

La densidad frente a los distintos niveles de pepsina mostraron diferencias estadísticas ($P < 0,05$), ya que al aplicar 4 y 6% de pepsina la densidad del colágeno fue de 0,35 y 0,37 g/ml en su orden, mientras que con el tratamiento control y 2% de pepsina se encontraron valores inferiores y que fueron de 0,26 y 0,33 g/ml (en su orden); por lo que mediante el análisis de la regresión se estableció una tendencia cuadrática significativa observada en la figura 4, que determina que a medida que se incrementa los niveles de pepsina la densidad tiende a incrementarse pero no de forma proporcional, esto posiblemente se deba a que el porcentaje de pepsina añadida no era suficiente para desdoblar la proteína de colágeno haciendo que sea más densa la relación al tratamiento control. La densidad del colágeno es de 0,906 g/ml, lo que quiere decir que es soluble en agua (Castenblaque, E. 2015)

Figura 4: Comportamiento del contenido de densidad (g/ml) obtenido de las patas de pollo con distintos niveles de pepsina

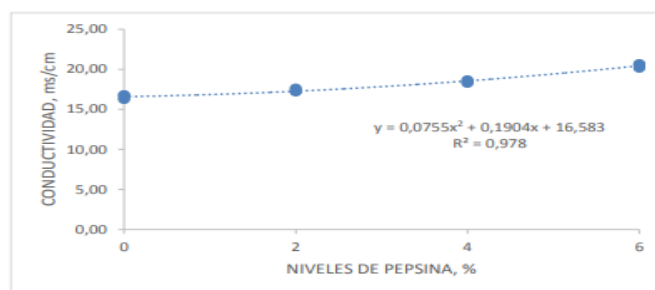


Fuente: Autor

La conductividad frente a los distintos niveles de pepsina presentó valores con diferencias significativas ($P < 0,05$) por cuanto los mayores contenidos se encontraron al aplicar el 6% de pepsina que reportó un valor de 20,48 mS/cm, mientras que al aplicar el grupo control presentó una conductividad menor de 16,55 mS/cm; por lo que, el análisis de la regresión estableció una tendencia cuadrática significativa tal como lo muestra la Figura 5, que indica que a medida que se incrementa los niveles de pepsina la conductividad aumenta gracias a la acción de la pepsina la cual degrada los enlaces peptídicos y permite la presencia de sólidos totales disueltos en el colágeno.

Los contenidos encontrados de conductividad no deben ser superior a 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Torres, J. 2012), las patas de pollo poseen pequeñas cantidades de minerales y sales, lo que quiere decir que la conductividad del colágeno extraído es alto debido a la presencia de sales y minerales en las patas de pollo, ya que es orgánico y por ende es deficiente para conducir electricidad por naturaleza.

Figura 5: Comportamiento de conductividad (mS/cm) obtenido de las patas de pollo con distintos niveles de pepsina



Fuente: Autor

En el colágeno de las patas de pollo la presencia de aerobios totales (UFC/g) fue de 22 ± 43 UFC/g en el obtenido con el grupo de control, 40 ± 89 UFC/g con el 2% de pepsina y 42 ± 88 UFC/g al emplearse los niveles 4 y 6% de pepsina, notándose que a mayores cantidades de pepsina existe una mayor presencia de aerobios totales; aunque la presencia de estos microorganismos se deba a la contaminación ambiental, por cuanto para la obtención de colágeno que utilizó el proceso de liofilización a una temperatura de -540C en el cual debería haberse eliminado todo tipo de microorganismos.

Debido a su crecimiento lento y su baja competitividad los aerobios totales se manifiestan en condiciones no favorables, por consiguiente, debido a su baja presencia en el colágeno obtenido es apto para el consumo e industrialización sin afectar la salud de los consumidores.

Para obtener colágeno de patas de pollo con niveles 2, 4 y 6% de pepsina se utilizó 500 g en cada tratamiento, después de obtener el colágeno se liofilizó y se obtuvo el rendimiento aplicando la siguiente ecuación, donde los resultados se reflejan en la tabla 2.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Gramos de producto}}{\text{Gramos de materia prima}} \times 100$$

Tabla 2: Rendimiento de colágeno al aplicarse los distintos niveles de pepsina

Niveles de pepsina %	Cantidad, g	%
0%	156	31,2
2%	123	24,6
4%	246	49,2
6%	310	62

Fuente: Autor

Obteniendo como el mejor tratamiento en rendimiento con el 6% de pepsina en la extracción de colágeno en las patas de pollo, donde se obtuvo un rendimiento del 62% equivalente a 310 g de colágeno en relación a los 500 g de masa de piel y tendones de las patas de pollo.

Conclusiones

- Los niveles de pepsina en la extracción de colágeno afectaron estadísticamente su composición físico-química.
- Al utilizarse el 6% de pepsina, el colágeno presentó mejores respuestas en nitrógeno (13), proteína (78%), densidad (0,37g/mL) y conductividad (20,48 μ s/cm).
- Los resultados microbiológicos demostraron que a mayor cantidad de pepsina más alta es la presencia de aerobios totales, por cuanto en el colágeno del grupo control fue de 22 \pm 43 UFC/g y se elevó a 42 \pm 88/g con la utilización del 6% de pepsina.
- Con el ejemplo de 6% de pepsina en la extracción de colágeno en las patas de pollo, se obtuvo los mejores rendimientos (62%).

Referencias

1. Almeida, P. Alves, W., Farias, T. & Curvelo, J. 2012. Elaboración y clasificación sensorial de gelatinas de patas de pollos. Correlación usando redes neuronales artificiales. 130 - 134. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262462953_elaboracion_y_clasificacion_sensorial_de_gelatinas_de_patas_de_pollos_correlacion_usando_redes_neuronales_artificiales.
2. Almeida, P. Silva, J. Lannes, C. & Farias, T. 2013. Quality assurance and economical feasibility of an innovative product obtained from a byproduct of the meat industry in Brazil. *Business Management*, págs. 2745-2756.
3. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/journal/AJBM/article-fulltext-pdf/85954E139414>.
4. Aragón, M. 2011. Biomateriales. Disponible en <https://es.scribd.com/doc/64642318/fuentes-del-colageno-y-sus-metodosde-extraccion>
5. Basurto, C. & Grijalva, E. 2015. Escuela Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López- Tesis- Incidencia De Colágeno De Pollo Y Temperatura Del Proceso En La Calidad Proteica De Salchicha Escaldada. Calceta-Manabí. Disponible en: <http://repositorio.esпам.edu.ec/bitstream/42000/442/1/TAI97.pdf>. BENÍTEZ, R. IBARZ, A. & PAGAN, J. 2010. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Popayán – Colombia.: Grupo de Química de Productos Naturales, Departamento de Química, Universidad del Cauca. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v42n2/v42n2a08.pdf>.
6. Castelblanque, E. (2015). Desarrollo del diagrama de estado del Gel Colágeno para impresión de alimentos en 3D. Valencia. Obtenido de Disponible en: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54286/TFGEvaCastelblanque_14363445500244268693290021222438.pdf?sequence=6&isAllowed=y.
7. Castro, D. 2016. Obtención de Colágeno de Crestas de Pollo. Obtenido de Proyecto de Grado. Disponible en: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/478/2/145358.pdf>

8. Certad, M. & Pérez, B. 2007. Características de la Gelatina de Patas de Pollo Obtenida por un Proceso Ácido. 322-328. CORREA, M. & LOPES, C. 2013. Gelation property and water holding capacity of heat-treated collagen at different temperature and pH values. Food Research, 213-223. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912004279?via%3Dihub>
9. Gómez, L. Piña, B. & Rodríguez, F. 2011. Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México. Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. México. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/sv/v24n4/v24n4a6.pdf>
10. López, M. Amaral, R. & Kalil, S. 2008. Proteolisis enzimática del colágeno dentinario. Consicentiae Saúde, 477-486. Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/ode/v12n14/v12n14a04.pdf>.
11. Peralta, C. Rivera, N. & Gualdrón, L. 2012. Extracción de colágeno en medio ácido-básico a partir de los cascos de bovinos. Epsilon, 59-69. Disponible en: <https://revistas.lasalle.edu.co/index.php/ep/article/view/2203/2027>
12. Serrano, J. 2011. Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*). Bogotá. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4880/1/jenifercarolinaserranogaona.2011.pdf>

© 2020 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons

Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)

(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).