



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE PROPIEDADES DE PELÍCULAS
PROTEÍNICAS DE PESQUERÍAS DE LA SUBCLASE
ELASMOBRANCHII

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

KARLA MARÍA CASTAÑEDA PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor. Josefina Esperanza Viades Trejo

VOCAL: Profesor. María de los Ángeles Valdivia López

SECRETARIO: Profesor. Alberto Tecante Coronel

1er. SUPLENTE: Profesor. Hiram Fernando Ramírez Cahero

2° SUPLENTE: Profesor. Alejandro Zavala Riva Palacio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA

MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA, CONJUNTO “E”, EDIFICIO DE BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTOS, LABORATORIO 322 Y 323.

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. MA. DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ _____

SUSTENTANTE:

KARLA MARÍA CASTAÑEDA PÉREZ _____

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a su Facultad de Química por la excelente formación profesional que me dieron y por la gran satisfacción de haber estudiado allí.

A la M. en C. Ángeles Valdivia López por la oportunidad de realizar este proyecto así como por su tiempo, apoyo y asesoría durante éste.

A la Q.F.B. Julieta Sandoval Guillén por todo el apoyo, enseñanzas, consejos y paciencia durante mi estancia en el laboratorio y elaboración de este trabajo, pero sobretodo por tu amistad. Muchas gracias.

A la Dra. Josefina Viades Trejo y al Dr. Alberto Tecante Coronel por su tiempo para la revisión de este trabajo así como por sus comentarios y aportaciones.

Agradecimientos

A Dios por permitirme llegar hasta aquí y por todas sus bendiciones.

A mis papás por su apoyo y por la educación que me dieron. En especial a mi mamá por darme la vida, todo tu amor y apoyo incondicional. Por tu lucha para que yo salga adelante, por tus enseñanzas, por impulsarme a ser una persona mejor cada día y lograr mis sueños y mis metas, porque has estado a mi lado y sé que siempre lo estarás. Este logro es nuestro y es gracias a ti.

A Oscar porque esta etapa y este proceso lo hemos vivido juntos, me has apoyado y ayudado siempre, me has ayudado a crecer, hemos crecido juntos y seguiremos creciendo juntos. Gracias por no dejarme flaquear, por todo tu amor, comprensión y paciencia.

A mi familia, mis abuelos, mis tíos y primos, por todo su cariño, siempre están al pendiente de mi y brindándome todo su apoyo. Ha sido increíble crecer con ustedes y tenerlos a mi lado. Los quiero.

A mis amigos por lo que hemos vivido juntos, porque sé que cuento con su apoyo y cariño, porque sé que mis alegrías y tristezas también son de ustedes así como las de ustedes son mías.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Dany, Jess, Julie, Mara, Marcos, Pam, por su ayuda, apoyo y amistad; y sobre todo por soportar los olores de mi trabajo. Con ustedes mi estancia en el laboratorio fue muy padre.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Justificación	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo general	3
1.2.2 Objetivos particulares	3
2. Trabajos previos	4
3. Antecedentes	6
3.1 Elasmobranquios	6
3.1.1 Descripción	6
3.1.2 Cazón	6
3.1.3 Raya	8
3.2 Distribución y captura	8
3.3 Producción pesquera	11
3.3.1 Producción pesquera mundial	11
3.3.2 Producción pesquera nacional	13
3.4 Empaques biodegradables	15
3.4.1 Generalidades	14
3.4.2 Películas	16
3.4.3 Películas de proteínas	18
3.4.4 Degradación	20

4. Materiales y métodos	23
4.1 Diagrama general de la investigación	23
4.2 Caracterización de la piel	24
4.3 Obtención del extracto proteínico	24
4.3.1 Extracción de la proteína de la piel de pescado	24
4.3.2 Caracterización del extracto proteínico	25
4.3.3 Evaluación del rendimiento	25
4.4 Formación de las películas a partir del extracto proteínico	27
4.5 Evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera de las películas	28
4.5.1 Acondicionamiento	28
4.5.2 Medición del espesor	28
4.6 Propiedades mecánicas	28
4.6.1 Fuerza de fractura en la punción	29
4.6.2 Fuerza de fractura en la extensión	30
4.7 Propiedades de barrera	31
4.7.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	31
4.7.2 Permeabilidad al oxígeno (PO)	32
4.8 Actividad de agua	32
4.9 Punto de fusión	33
4.10 Biodegradabilidad	34
4.11 Análisis estadístico	35
5. Resultados y discusión	36
5.1 Caracterización de la piel	32
5.2 Obtención del extracto proteínico	40
5.2.1 Caracterización del extracto proteínico	40
5.2.2 Evaluación del rendimiento	43

5.3	Formación de las películas a partir del extracto proteínico	44
5.4	Evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera de las películas	47
5.4.1	Medición del espesor	47
5.5	Propiedades mecánicas	48
5.5.1	Fuerza de fractura en la punción	50
5.5.2	Fuerza de fractura en la extensión	54
5.6	Propiedades de barrera	58
5.6.1	Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	59
5.6.2	Permeabilidad al oxígeno (PO)	62
5.7	Actividad de agua	64
5.8	Punto de fusión	67
5.9	Biodegradabilidad	69
6.	Conclusiones	75
7.	Referencias	79

Capítulo 1. Introducción

1.1 Justificación

En los últimos años ha surgido un especial interés por el cuidado del medio ambiente debido a la contaminación que producen los materiales de empaque para alimentos, que, en su mayoría son de origen sintético y que no son biodegradables o bien tardan muchos años en degradarse. Por ello ha crecido el interés en buscar nuevas tecnologías para desarrollar empaques biodegradables y amigables con el medio ambiente que sustituyan total o parcialmente el uso de materiales sintéticos para así reducir el impacto ambiental y que a la vez brinden protección y favorezcan la conservación de los alimentos.

Se sabe que para la formación de estas películas es necesario tener un componente que sea capaz de constituir una matriz estructural con suficiente cohesión, por ejemplo, proteínas, polisacáridos y lípidos. Es por esto que se han utilizado desperdicios de alimentos para elaborar las películas, en este caso, la proteína de la piel de pescado.

México posee 1 mil 593 kilómetros de costas, de los cuales 73% corresponden al Océano Pacífico y el 27% restante al Golfo de México y Mar Caribe. La pesca de tiburones y rayas ha ocupado en los últimos años alrededor del décimo lugar en la producción pesquera nacional y contribuye con alrededor de 2.5% del volumen total de productos pesqueros generados en las últimas dos décadas (PROY-NOM-029, 2004).

La comercialización del pescado en nuestro país se realiza en gran parte en forma de filete y el desperdicio a veces es utilizado para producir comida para animales o harinas pero en su mayoría se desecha e incluso los comerciantes en la Ciudad de México deben pagar para desechar estos desperdicios. Se ha observado que estos desperdicios tienen aproximadamente la misma cantidad de proteína que el músculo de la pesquería (Batista, 1999).

Es por esto que se decidió utilizar las proteínas de estos desechos, específicamente la piel, para elaborar películas de tal manera que sea una opción de desarrollo de un empaque degradable y así reducir el impacto ambiental tanto por el material como por el aprovechamiento de las pesquerías.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Extraer las proteínas de la piel de pesquerías de la Subclase *Elasmobranchii* (cazón y raya) para evaluar su funcionalidad como formadoras de películas biodegradables, así como las propiedades de dichas películas.

1.2.2 Objetivos particulares

- Obtener un extracto de proteína proveniente de piel de pesquerías de la subclase *Elasmobranchii*, específicamente cazón y raya.
- Elaborar películas a partir de este extracto de proteína.
- Determinar las propiedades mecánicas de las películas, fuerza de fractura en la punción y fuerza de fractura en la extensión.
- Establecer las propiedades de barrera de las películas, es decir, permeabilidad al vapor de agua y permeabilidad al oxígeno.
- Conocer características fisicoquímicas como: actividad de agua y punto de fusión.
- Determinar cualitativamente la biodegradabilidad de las películas formadas.
- Evaluar la influencia de la especie de la pesquería sobre las características de las películas formadas.

Capítulo 2. Trabajos previos

La investigación y desarrollo de películas y recubrimientos hechos a base de proteínas de la agricultura se ha realizado en los últimos 20 años. Para esto, se han utilizado recursos renovables como la caseína, el suero, la soya, zeína de maíz, el colágeno, la albúmina de huevo, el trigo y la queratina entre otros.

En la última década, la proteína de pescado ha sido ampliamente utilizada debido a su alta capacidad para el desarrollo de películas. Las fuentes de esta proteína son el músculo, o bien, los desechos del procesamiento del pescado como la piel y los huesos.

En trabajos anteriores se han podido formar películas a base de proteínas extraídas del músculo de Tilapia del Nilo (*Paschoalick et al., 2003*), de piel de Halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Carvalho et al., 2008), de proteína soluble del músculo de Marlin (Iwata et al., 2000), del músculo de calamar (*Todarodes pacificus*) (Leerahawong et al., 2011), por nombrar algunos ejemplos.

Por otro lado, en la Universidad Nacional Autónoma de México se han realizado también algunos trabajos sobre películas proteínicas. Hernández-Jardón (2007) utilizó la proteína de chíá para elaborar películas a través de la interacción con un plastificante (glicerol y sorbitol). Las películas formadas fueron flexibles y manejables, y presentaron propiedades mecánicas y de barrera aceptables.

Con el antecedente de Hernández-Jardón, Silva-Navarro (2009) desarrolló películas activas preparadas a partir de concentrado de proteína de chía y glicerol como plastificante, incorporando polifenoles extraídos de la semilla de chía en concentraciones de 200-600 ppm y evaluó el efecto de protección frente a la oxidación de lípidos.

Y en cuanto a trabajos a partir de proteína de pescado, Granados-Navarrete y Martínez-García (2010) desarrollaron películas a partir de un concentrado proteínico de piel de pesquería del género *Ephinephelus* (pescado mero) y evaluaron sus características mecánicas y de barrera. Además modificaron las películas con CaCl_2 , CaSO_4 y glucono- δ -lactona (GDL) y determinaron el efecto que producen estos compuestos en las propiedades mecánicas y de barrera.

Capítulo 3. Antecedentes

3.1 Elasmobranquios

3.1.1 Descripción

Elasmobranquio se refiere al grupo de peces que presentan un esqueleto cartilaginoso, que poseen generalmente cinco pares de aberturas branquiales en posición lateral, (algunos representantes tienen seis o siete) están ubicados taxonómicamente en la Subclase *Elasmobranchii* de la Clase *Chondrichthyes*. Este grupo de peces comprende a las categorías comerciales denominadas tiburones y rayas (PROY-NOM-029, 2004).

3.1.2 Cazón

Se le conoce como tiburón a cualquier especie de elasmobranquio que incluye a los organismos conocidos en el lenguaje común como "tiburones", "cazones", y "angelitos" y que pertenecen taxonómicamente a la Subclase *Elasmobranchii*, Superorden *Euselachii* (*Selachimorpha*), cuya principal característica externa es la de poseer generalmente cinco pares de aberturas branquiales dispuestas a los costados de la cabeza, aunque existen especies con seis o siete pares de aberturas branquiales (PROY-NOM-029, 2004).

El cuerpo de los tiburones (Figura 3.1) es fusiforme y fuertemente musculoso; se divide en dos regiones: el tronco y la cola. Presenta diferentes aletas distribuidas a todo lo largo del cuerpo; tiene dos aletas dorsales, la anterior es la que se observa cuando el animal nada cerca de la superficie y la caudal que se divide en dos lóbulos, uno superior, generalmente de mayor tamaño y otro inferior, más pequeño; tiene dos aletas pectorales, dos pélvicas o ventrales y una anal (Cifuentes et al., 1997).

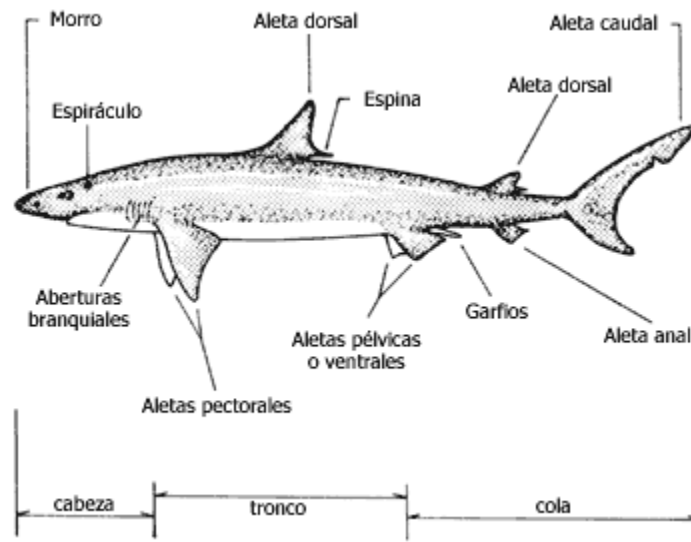


Figura 3.1. Morfología del tiburón (Cifuentes et al., 1997)

Según su tamaño, se llama tiburones a los que tienen una talla mayor a metro y medio y cazones a los que miden menos; a las crías de los tiburones se les conoce como cazones.

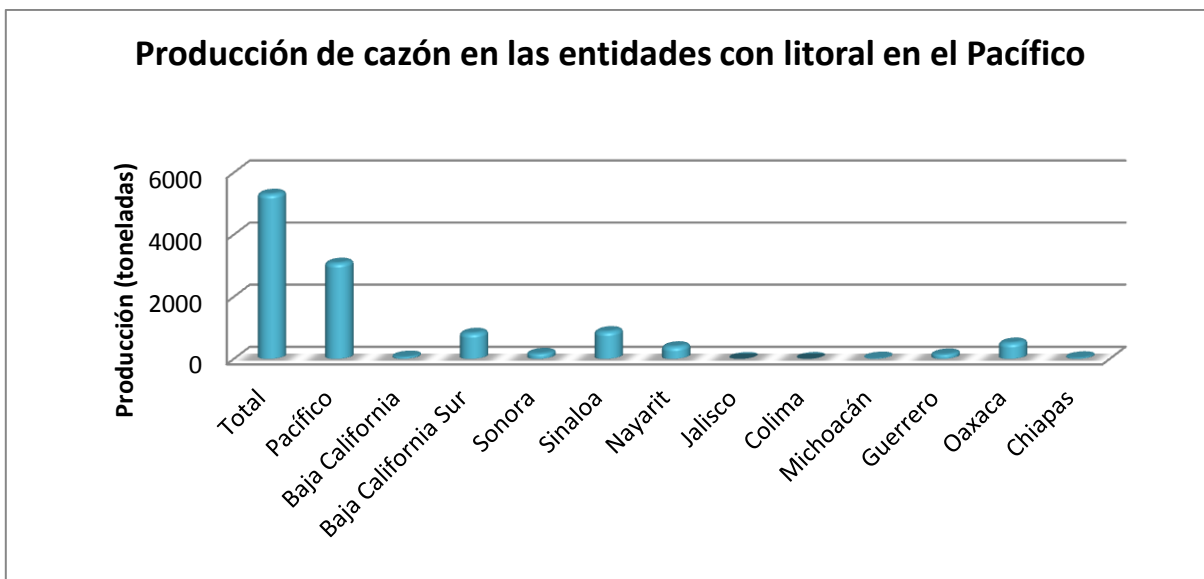
3.1.3 Raya

Se denomina raya al grupo de elasmobranquios del Superorden *Baotidea*, que poseen la boca y las hendiduras branquiales en posición ventral. Las especies del grupo incluyen a los organismos conocidos en el lenguaje común como "cubanas", "mantas", "mantarrayas", "mariposas", "gavilanes", "rayas", "diablitos", "guitarras" y "torpedos" (PROY-NOM-029, 2004).

Las rayas poseen un esqueleto cartilaginoso y cuerpo aplanado de la región dorsal a la ventral; en ambos lados del cuerpo se extienden las aletas pectorales que se asocian con la cabeza, constituyendo un dispositivo para la natación; la parte terminal del cuerpo se hace angosta formando la cola (Cifuentes et al., 1997).

3.2 Distribución y captura

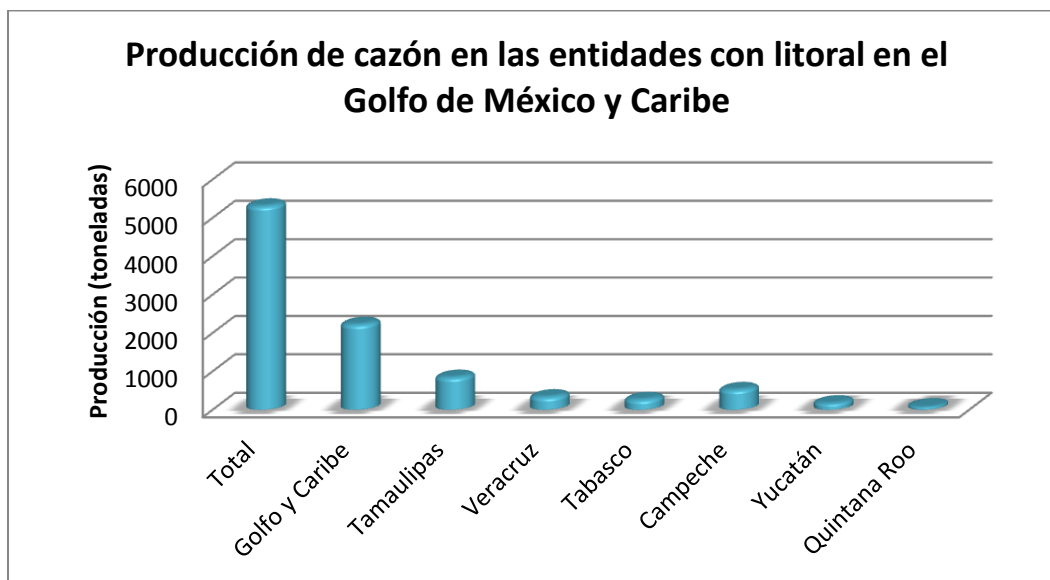
En nuestro país el cazón se captura todo el año; del total de la producción nacional, 3 086 toneladas (58.1%), provienen del Pacífico (Figura 3.2), principalmente de Baja California Sur (827 ton) y Sinaloa (881). Mientras que del Golfo de México y Caribe (Figura 3.3) provienen 2 222 toneladas (41.9%), principalmente de Tamaulipas (844 ton) (CONAPESCA, 2009).



*Total de la producción nacional Cazón (5 308 ton)

** Producción de Cazón procedente del Pacífico (3 086 ton)

Figura 3.2. Producción de Cazón en peso desembarcado de las entidades con litoral en el Pacífico. (CONAPESCA, 2009)

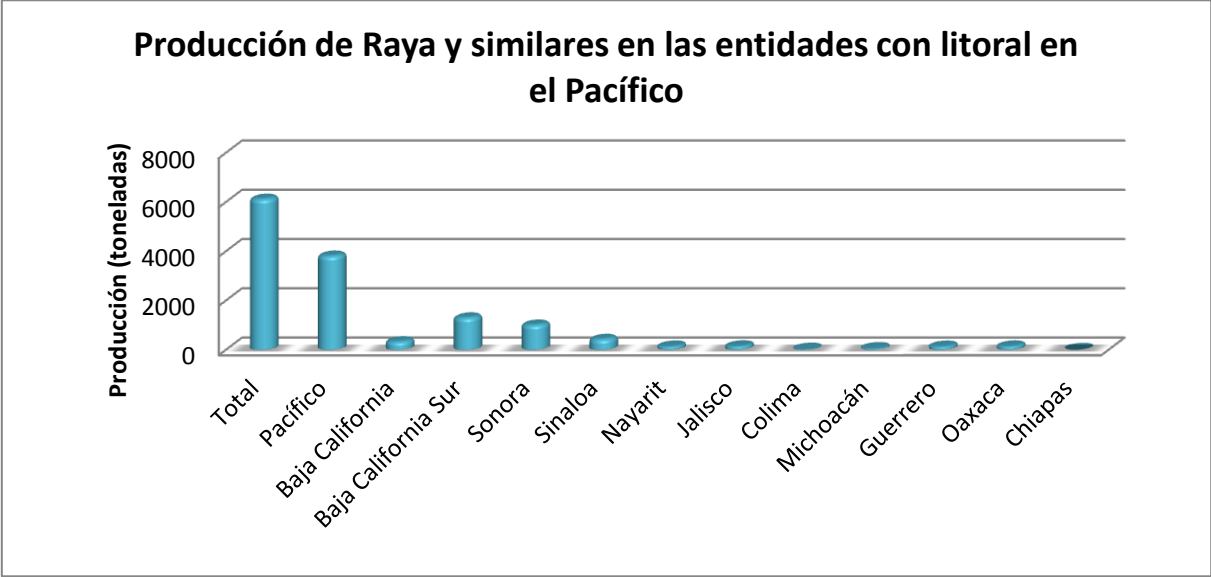


*Total de la producción nacional de Cazón (5 308 ton)

** Producción de Cazón procedente del Golfo de México y Caribe (2 222 ton)

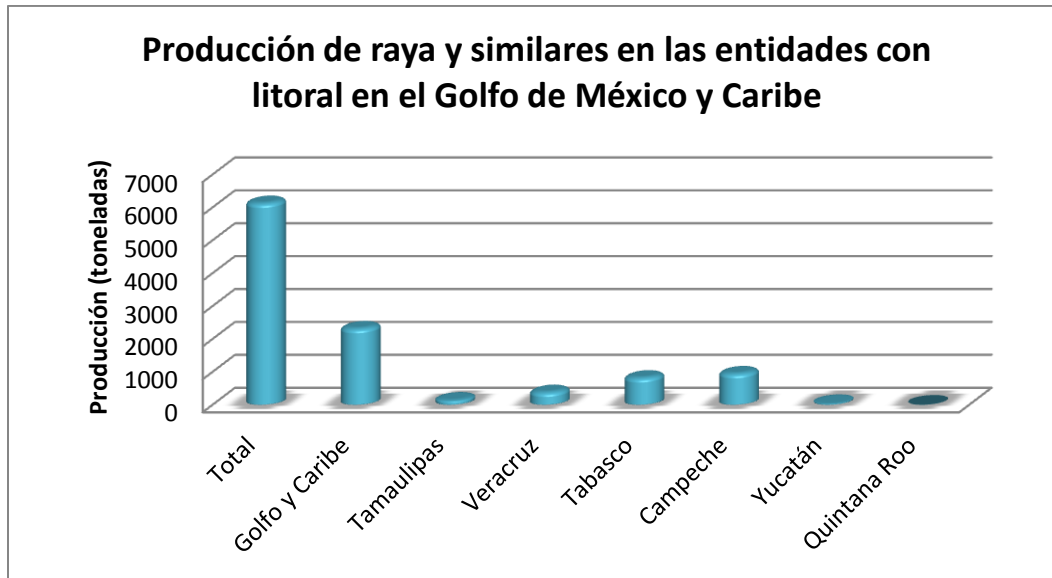
Figura 3.3. Producción de Cazón en peso desembarcado de las entidades con litoral en el Golfo de México y Caribe. (CONAPESCA, 2009)

En cuanto a la raya, la mayor parte de la producción proviene del Pacífico (Figura 3.4) con 3 811 toneladas (62.3%), principalmente de Baja California Sur (1 302 ton) y Sonora (1 010 ton). Del Golfo y el Caribe (Figura 3.5) provienen 2 311 toneladas (37.7%) siendo Campeche (943 ton) y Tabasco (814) los principales productores (CONAPESCA, 2009).



*Total de la producción nacional de Raya y similares (6 122 ton)
 ** Producción de Raya y similares procedente del Pacífico (3 811 ton)

Figura 3.4. Producción de Raya y similares en peso desembarcado de las entidades con litoral en el Pacífico. (CONAPESCA, 2009)



*Total de la producción nacional de Raya y similares (6 122 ton)

** Producción de Raya y similares procedente del Golfo de México y Caribe (2 311 ton)

Figura 3.5. Producción de Raya y similares en peso desembarcado de las entidades con litoral en el Golfo de México y Caribe. (CONAPESCA, 2009)

La relación entre las distintas partes del cuerpo de los elasmobranquios es en general la siguiente: la cabeza representa 22% del total; el tronco, 51%; las aletas, 5%; la piel 7%; la carne, 42%; los cartílagos, 4%; las vísceras, 20%; el hígado, 7% y la sangre, 5% (Cifuentes et al., 1997).

3.3 Producción pesquera

3.3.1 Producción pesquera mundial

México posee 1 mil 593 kilómetros de costas, de los cuales 73% corresponden al Océano Pacífico y el 27% restante al Golfo de México y Mar Caribe. La Tabla 3.1 nos muestra que se encuentra entre los primeros 20 países en producción pesquera con alrededor 1.5 millones

de toneladas anuales que significan el 1.5% de la captura mundial (1 340 000 ton) (FAO, 2007).

Tabla 3.1. Producción pesquera mundial. Capturas por productores principales (FAO, 2007)

País o área	Producción por captura (ton)
Total mundial	90 063 851
China	14 659 036
Perú	7 210 544
Indonesia	4 936 629
USA	4 767 596
Japón	4 211 201
India	3 953 476
Chile	3 806 085
Rusia	3 454 214
Filipinas	2 499 634
Tailandia	2 468 784
Noruega	2 378 950
Myanmar	2 235 580
Vietnam	2 121 400
República de Corea	1 858 206
Bangladesh	1 494 199
Islandia	1 399 167
Malasia	1 385 703
México	1 340 000
China, Taiwán	1 174 393
Canadá	1 005 966

3.3.2 Producción pesquera nacional

La producción de tiburones y rayas ha ocupado en los últimos años alrededor del décimo lugar en la producción pesquera nacional, considerando inclusive a los recursos pesqueros para consumo humano directo y para uso industrial. La importancia relativa de la pesquería por la producción que genera, está relacionada con su contribución de alrededor de 2.5% del volumen total de productos pesqueros generados en las últimas dos décadas (PROY-NOM-029, 2004).

De todas las especies de elasmobranquios que se distribuyen en aguas de jurisdicción federal de todo el país, es el grupo de los tiburones el que principalmente sostiene a la pesquería. De aproximadamente 104 especies con registro de distribución de aguas de jurisdicción federal, son 39 especies las que se presentan con mayor frecuencia en la producción, de las cuales 12 son más abundantes y pertenecen a las familias *Alopiidae*, *Carcharhinidae*, *Squatinae*, *Sphyrnidae* y *Triakidae* (PROY-NOM-029, 2004).

Del total de la producción nacional de tiburones, aproximadamente el 60% corresponde a grandes tiburones y el 40% es de especies pequeñas y juveniles, que se registran como "cazón" (PROY-NOM-029, 2004).

Para las rayas se reconocen en aguas de jurisdicción federal aproximadamente 85 especies de las cuales 37 tienen importancia comercial (18 en el Océano Pacífico y 14 en el Golfo de México y Mar Caribe), siendo las más representativas por su presencia y valor en el mercado, las especies de las familias: *Dasyatidae*, *Myliobatidae*, *Rhinopteridae* y *Gymnuridae* (PROY-NOM-029, 2004).

3.4 Empaques biodegradables

3.4.1 Generalidades

Los empaques son parte de la tecnología de alimentos cuya función es preservar y proteger al producto, particularmente del ataque microbiano y del proceso oxidativo. Además, son usados para mantener sus características y por tanto su calidad, así como para extender su vida de anaquel.

Por mucho tiempo los polímeros han sido los materiales más comunes de empaques debido a que presentan varias características deseadas como suavidad, brillo y transparencia. Sin embargo, el aumento en el uso de empaques sintéticos ha llevado a serios problemas ecológicos debido a su no biodegradabilidad. Aunque su sustitución completa con películas amigables con el medio ambiente es difícil de alcanzar, al menos para los usos específicos como los alimentos, el uso de bioplásticos debe ser el futuro (Siracusa et al., 2008).

El desempeño esperado de los bioplásticos que se usan como empaque para alimentos es contener el alimento y protegerlo del ambiente así como mantener la calidad. Es obvio que para desempeñar estas funciones es importante controlar y modificar sus propiedades mecánicas y de barrera, que, en consecuencia dependen de la estructura polimérica del material de empaque (Siracusa et al., 2008).

Debido a que las películas son tanto componentes del alimento como empaques del mismo es muy importante que cumplan con buenas cualidades sensoriales, buenas propiedades de barrera contra la humedad y contra el oxígeno, buenas propiedades mecánicas, libres de

tóxicos, libres de contaminantes, buena estabilidad bioquímica, fisicoquímica y microbiana, de tecnología simple y de un bajo costo tanto de materiales como en los procesos.

La protección de los alimentos contra el oxígeno es uno de los requerimientos más importantes de los materiales de empaque, buenas propiedades de barrera al oxígeno de las películas son importantes para mantener la calidad inicial de los productos (Hong & Krochta, 2006). La permeabilidad al vapor de agua (PVA) y la permeabilidad al oxígeno (PO) son las propiedades de barrera más investigadas para conocer la habilidad de las películas para proteger a los alimentos del medio ambiente, y en el caso de la PVA, de los componentes adyacentes del alimento con diferente actividad acuosa (Damodaran & Paraf, 1997).

Además de las propiedades de barrera también es importante considerar las propiedades mecánicas de las películas para caracterizar su habilidad de protección contra el abuso mecánico durante su manipulación y almacenamiento. Pruebas de extensión proveen información acerca de la flexibilidad y elongación de los materiales de empaquetamiento, propiedades que son el resultado de la interacción cadena-cadena de los polímeros que forman las películas; el incremento en estas interacciones da como resultado películas más fuertes pero menos flexibles (Damodaran & Paraf, 1997).

3.4.2 Películas

Una película o recubrimiento generalmente se define como una capa delgada y continua de material comestible aplicada a los alimentos ya sea por inmersión, rocío o como envoltura, que provee una barrera selectiva contra la transmisión de gases, vapores y solutos ofreciendo

también protección mecánica. Usualmente los recubrimientos son directamente aplicados y formados sobre la superficie de los productos, mientras que las películas son formadas por separado como láminas u hojas delgadas y después aplicadas a los productos (Gennadios & Weller, 1990).

En general, los requisitos de una buena película para empaque (Kader, 1989) son:

- Permitir una baja pero controlada respiración del producto (reducida absorción de O₂).
- Ser una barrera selectiva de gases y vapor de agua.
- Crear una atmósfera modificada con respecto a la composición interna de gases.
- Reducir la migración de lípidos.
- Mantener la integridad estructural y mejorar el manejo mecánico.
- Servir como vehículo para incorporar aditivos (saborizantes, colorantes, antioxidantes, agentes antimicrobianos).
- Prevenir (o reducir) la degradación microbiana del producto durante el almacenamiento.

Los biopolímeros que se usan para producir películas para empaques y recubrimientos biodegradables se mencionan en la Figura 3.6:

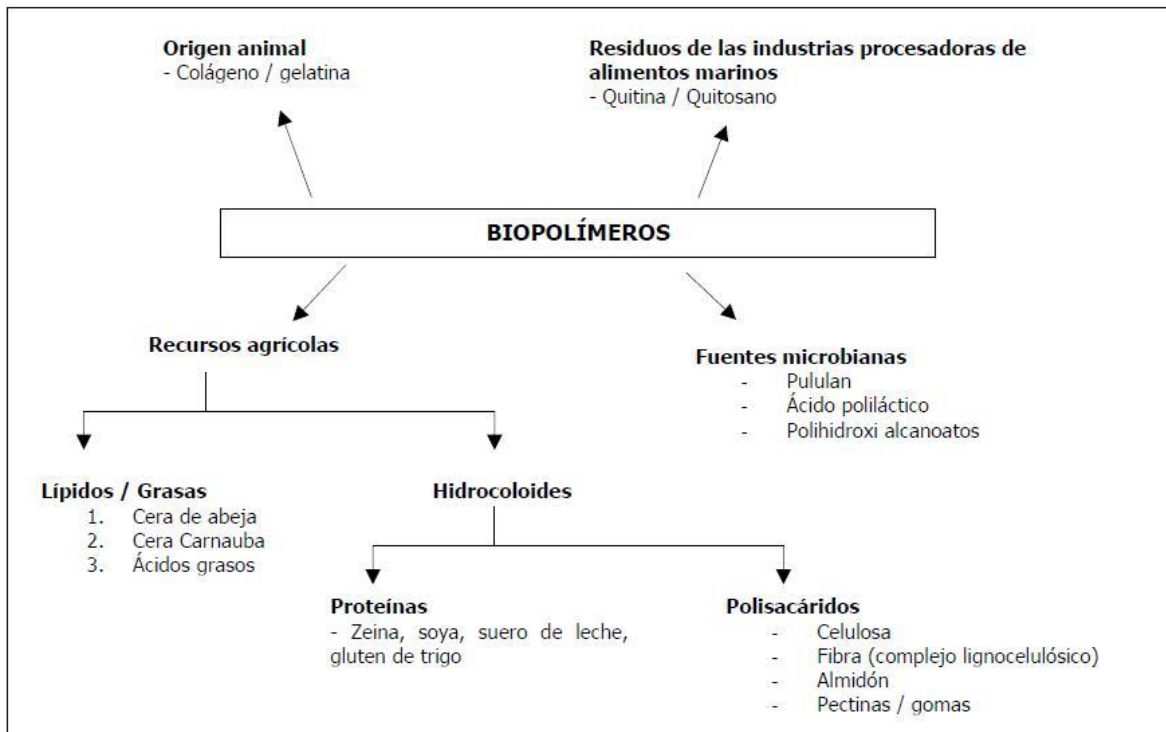


Figura 3.6. Biopolímeros de uso en el desarrollo de películas para empaques y recubrimientos biodegradables (Tharanathan, 2003)

Las películas de proteínas y polisacáridos al ser de naturaleza hidrofílica presentan elevada permeabilidad al vapor de agua que influye en la pérdida de calidad del alimento, sin embargo, pueden actuar como barreras efectivas al transporte de gases, como son el dióxido de carbono y el oxígeno (Cuq et al., 1997).

La elaboración de estas películas requiere al menos una molécula capaz de formar una matriz continua con una cohesión adecuada. Un componente importante de las películas comestibles es el plastificante, así como, el polímero formador de la película. La adición de un agente plastificante a las películas comestibles se requiere para superar la fragilidad provocada por las elevadas fuerzas intermoleculares. Los plastificantes reducen estas fuerzas y aumentan la movilidad de las cadenas poliméricas, por lo tanto aumentan la flexibilidad y

extensibilidad de la película. Por otro lado, los plastificantes generalmente reducen la permeabilidad al gas y vapor de las películas y pueden disminuir la elasticidad y la cohesión. La influencia del plastificante depende de su concentración, estructura química, grado de dispersión en la película y el grado de interacción con el polímero (Gontard et al., 1993).

Entre los plastificantes más usados en la industria de alimentos (McHugh & Senesi, 2000) son:

- Mono, di y oligosacáridos (glucosa, jarabes de fructosa o glucosa, miel)
- Polioles (sorbitol, glicerol, polietilenglicol y los derivados del glicerol)
- Lípidos y derivados (ácidos grasos, monoacilgliceroles, derivados de éster, fosfolípidos, aceites, acetoglicéridos, lecitina, ceras)

Los plastificantes utilizados deben ser compatibles con el polímero, de solubilidad similar al solvente utilizado y estables en el sistema polímero-disolvente, entre otras propiedades también deben tomar en cuenta su estabilidad química, higroscopicidad, color y sabor (Guzmán-Venegas, 2003).

3.4.3 Películas de proteínas

Las proteínas son polímeros altamente complejos y su diversidad funcional depende mayoritariamente de su estructura química. Por ejemplo, mientras otros biopolímeros, tales como polisacáridos y ácidos nucleicos, están conformados por uno o pocos monómeros, las proteínas y polipéptidos están conformados por combinaciones diferentes de 20

aminoácidos (19 α -aminoácidos y 1 iminoácido), unidos mediante enlaces amida, también conocidos como enlaces peptídicos (Damodaran & Paraf, 1997).

Las películas biodegradables de proteínas con adecuadas propiedades mecánicas y buena apariencia son alternativas potenciales y ecológicas para sustituir los empaques sintéticos actualmente usados en la industria alimentaria.

Las proteínas deben ser desnaturalizadas para obtener una estructura extendida, la cual permita la formación de la película, las proteínas pueden asociarse mediante puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes. La interacción cadena-cadena que produce una película cohesiva es afectada por el grado de extensión de la cadena y la naturaleza y secuencia de los residuos de aminoácidos. La uniforme distribución de los grupos polares, hidrofóbicos o tioles entre las cadenas del polímero promueven una mejor interacción (Damodaran & Paraf, 1997).

Las propiedades finales de las películas se ven afectadas por propiedades intrínsecas de los componentes y factores extrínsecos del proceso. Las propiedades intrínsecas incluyen la composición de aminoácidos, cristalinidad (de la proteína o del plastificante), qué tan hidrofóbico/hidrófilico es, la carga, el tamaño molecular y la forma tridimensional. Los factores extrínsecos incluyen la temperatura de procesamiento, las condiciones de secado, pH, fuerza iónica, humedad relativa durante el proceso y el almacenamiento (Embuscado & Huber, 2009).

Estas películas de proteínas usualmente son transparentes, flexibles, resistentes al agua e impermeables al oxígeno (Parra et al., 2004). Pueden usarse en diversos productos alimenticios para reducir la pérdida de humedad, restringir la absorción de oxígeno, disminuir la migración de lípidos, para mejorar las propiedades de manejo del alimento, proporcionar protección física o para ofrecer una alternativa a los materiales de embalaje actuales.

Aunque las películas de proteínas son generalmente más débiles y tienen una menor elongación que las películas sintéticas, pueden ser empleadas como empaques individuales (Hernández-Izquierdo & Krochta, 2008).

3.4.4 Degradación

La degradación de plásticos se puede lograr por microorganismos (biodegradación) y luz ultravioleta (UV) (fotodegradación). La biodegradación (Figura 3.7) es un proceso natural en el cual los compuestos orgánicos (como polímeros naturales) en el ambiente se convierten en compuestos simples como carbono, nitrógeno y ciclos de sulfuro mediante la acción de microorganismos (Sun-Lee et al., 2008).

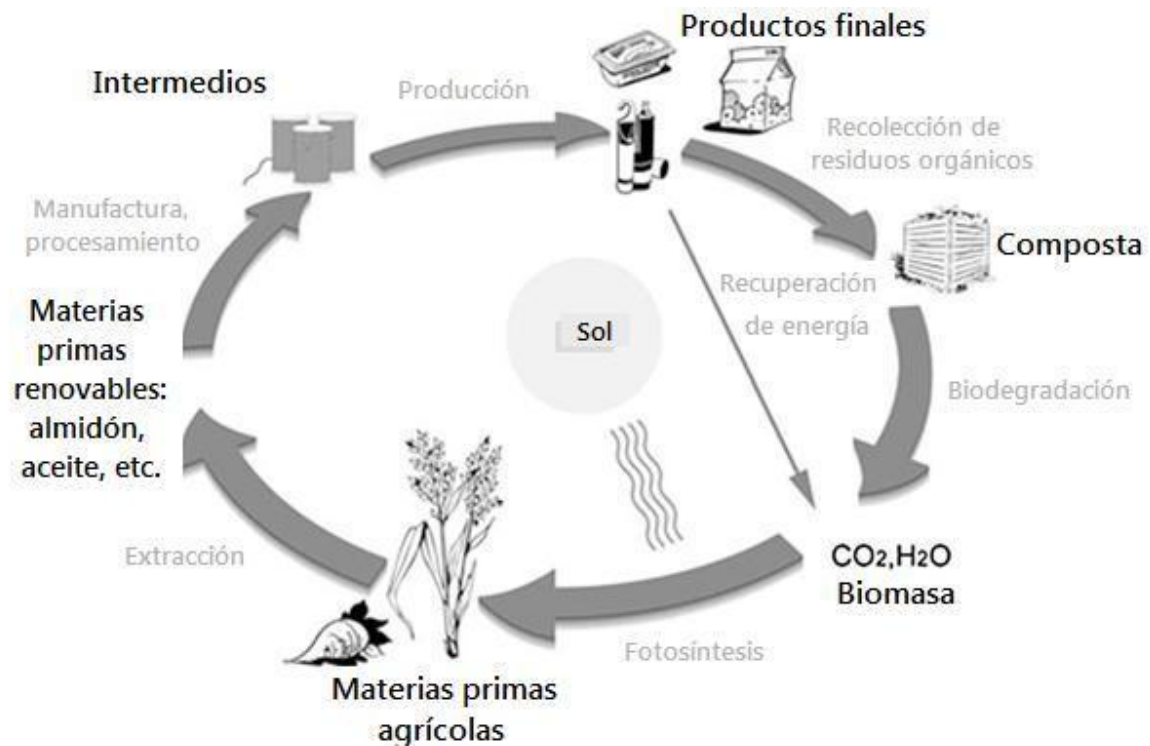


Figura 3.7. Ciclo vital (Siracusa et al., 2008)

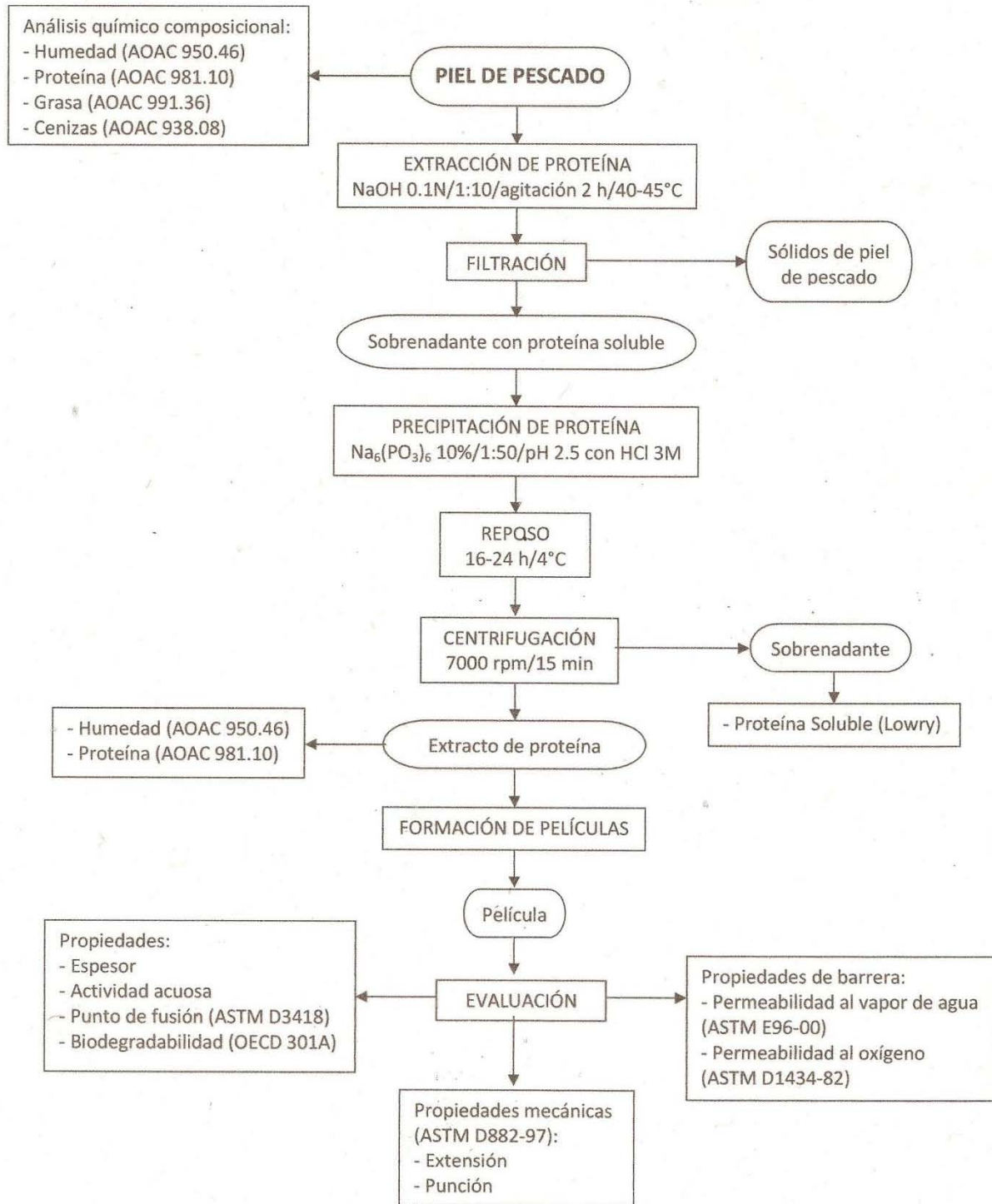
El empaque biodegradable ha ganado gran interés y el composteo se está convirtiendo en una opción más atractiva para el manejo de residuos. Un empaque biodegradable se define como un material que debe ser capaz de degradarse físicamente, químicamente, térmicamente o biológicamente de tal manera que este material usado como composta finalmente se descomponga totalmente en dióxido de carbono y agua (Sun-Lee et al., 2008).

La velocidad de degradación depende de la temperatura (50-70°C), la humedad y el número y tipo de microorganismos. La degradación es rápida solo si los tres requisitos están presentes. En la composta industrial los bioplásticos se convierten en masa, agua y dióxido de carbono en alrededor de 6 a 12 semanas (Siracusa et al., 2008).

Una ventaja adicional de los empaques o películas formados a partir de proteína es que, cuando se degradan, proveen una fuente de nitrógeno que aporta un beneficio fertilizante, el cual no está disponible con otras películas no proteínicas (Embuscado & Huber, 2009).

Capítulo 4. Materiales y métodos

4.1 Diagrama general de la investigación



4.2 Caracterización de la piel

La piel de cazón así como la de raya se obtuvieron del mercado “La Nueva Viga” de la Ciudad de México.

Con el fin de conocer su composición y posteriormente para evaluar el rendimiento de la extracción se les realizó un análisis químico composicional que incluyó humedad, proteína total, grasa y cenizas. Cada determinación se realizó a dos lotes de ambas pieles y por triplicado. Se emplearon los siguientes métodos:

- Humedad (AOAC 950.46, 1995)
- Proteína total (AOAC 981.10, 1995; empleando el factor 6.25)
- Grasa (AOAC 991.36, 1995)
- Cenizas (AOAC 938.08, 1995)

4.3 Obtención del extracto proteínico

4.3.1 Extracción de la proteína de la piel del pescado

La extracción de la proteína de la piel de las pesquerías de cazón y raya se realizó de acuerdo al procedimiento de Batista (1999) con algunas modificaciones. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

1. La piel cortada en trozos pequeños se remojó en una solución de NaOH 0.1 N (pH \approx 12) en una relación piel de pescado:solución alcalina de 1:10 (w/v) con agitación constante por 2 horas y temperatura de 40 a 45 °C. Posteriormente se filtró al vacío para separar los restos sólidos de la piel del pescado.

2. Para la precipitación de la proteína se agregó al sobrenadante $\text{Na}_6(\text{PO}_3)_6$ al 10% en una relación sobrenadante:polifosfatos de 1:50 (v/v) y se ajustó el pH a 2.5 ± 0.5 con HCl 3 M. Se dejó reposar toda la noche a 4°C para sedimentar la proteína.
3. Centrifugando el sedimento a 7000 rpm por 15 min se obtuvo el extracto de proteína (EP) de la piel de pescado (cazón/raya).

4.3.2 Caracterización del extracto proteínico

Una vez que se obtuvo el extracto de proteína de la piel de pescado se le realizaron las siguientes determinaciones:

- Humedad (AOAC 950.46, 1995)
- Proteína total (AOAC 981.10, 1995; empleando el factor 6.25)

Al sobrenadante resultante se le determinó:

- Proteína soluble

4.3.3 Evaluación del rendimiento

Para evaluar el rendimiento de la extracción proteínica de las pieles de cazón y raya se realizó un balance de materia. La Figura 4.1 muestra los datos requeridos así como la etapa del proceso de donde se obtienen.

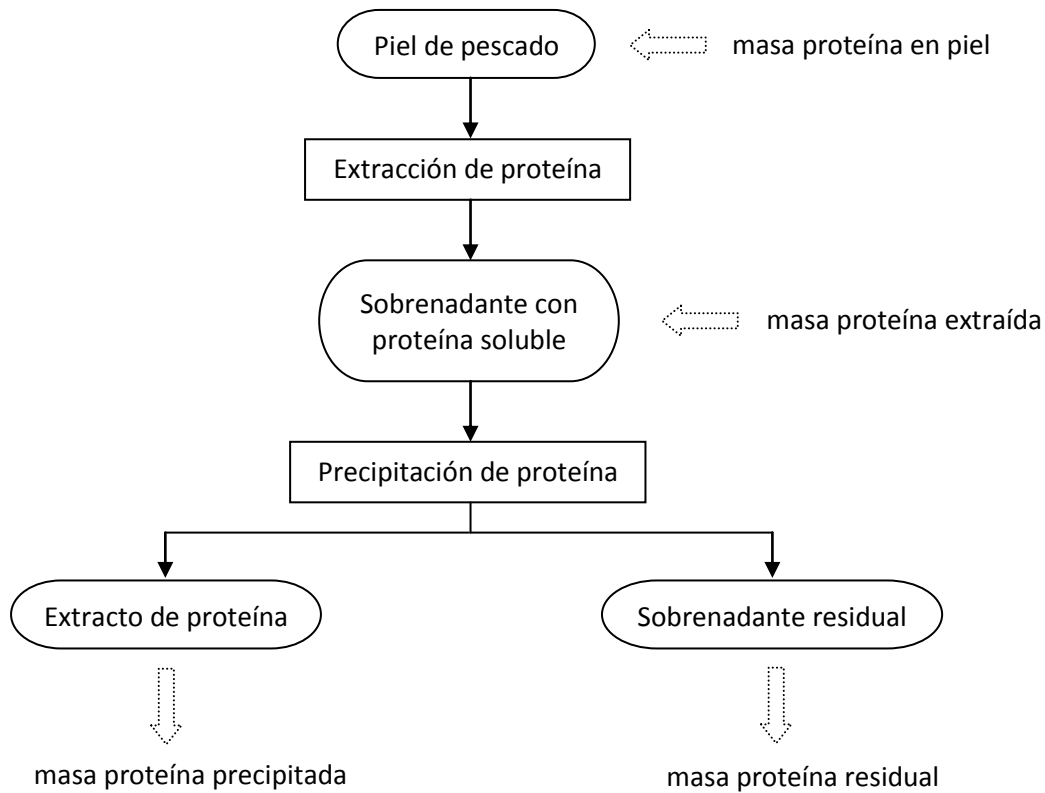


Figura 4.1. Diagrama para la evaluación del rendimiento

Entonces con la masa de proteína en la piel, en el extracto proteínico y en el sobrenadante residual se obtienen los rendimientos de proteína extraída, proteína precipitada y proteína residual, respectivamente, como se indica a continuación:

$$masa (g)piel \left(\frac{masa (g)proteína}{100 g piel} \right) = masa (g) proteína en piel$$

$$masa (g)extracto \left(\frac{masa (g)proteína}{100 g extracto} \right) = masa (g) proteína precipitada$$

$$mL sobrenadante \left(\frac{masa (g) proteína}{mL sobrenadante} \right) = masa (g) proteína residual$$

$$\begin{aligned} & \text{masa (g) proteína precipitada} + \text{masa (g) proteína residual} \\ & = \text{masa (g) proteína extraída} \end{aligned}$$

$$\% \text{ proteína extraída} = \frac{\text{masa (g) proteína extraída}}{\text{masa (g) proteína en piel}} \times 100$$

$$\% \text{ proteína precipitada} = \frac{\text{masa (g) proteína precipitada}}{\text{masa (g) proteína en piel}} \times 100$$

$$\% \text{ proteína residual} = \frac{\text{masa (g) proteína residual}}{\text{masa (g) proteína en piel}} \times 100$$

4.4 Formación de las películas a partir del extracto proteínico

La película fue preparada disolviendo el extracto de proteína (EP) en agua destilada bajo constante agitación de tal forma que la concentración final de proteína fuera 5% (w/v). Como plastificante se utilizó sorbitol, el cual fue agregado al 75% con respecto a la cantidad de proteína en el EP (w/w) y se agitó hasta disolución completa. Posteriormente se ajustó el pH de la solución a 11.5 ± 0.2 con NaOH 1N y la solución fue calentada en un baño de agua a 70°C por 10 min, filtrada y calentada en el baño a 70°C por otros 10 min; se eliminaron las burbujas en un sonicador (Branson modelo 3510) por 15 min. Finalmente la solución (65 mL) se vació en sartenes con teflón (18 cm de diámetro) y se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 48 horas para después despegar las películas manualmente.

4.5 Evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera de las películas

4.5.1 Acondicionamiento

Las películas obtenidas se colocaron en un desecador para acondicionarlas de acuerdo al método ASTM D618-00 (2003) en ambiente de humedad relativa y temperatura constantes (60 ± 5 %HR y 20 ± 5 °C) obtenidos con una solución saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; la temperatura y humedad relativa fueron medidas con un termohigrómetro (Oakton, Japón). Las películas se mantuvieron de esta forma por 48 horas antes de realizar las pruebas mecánicas y de barrera.

4.5.2 Medición del espesor

El espesor de las películas fue medido con un micrómetro en posiciones aleatorias en el perímetro y en el centro de la película. Las propiedades de barrera y mecánicas fueron calculadas tomando en cuenta este valor.

4.6 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas evaluadas fueron fuerza de fractura a la extensión y fuerza de fractura a la punción. Estas pruebas fueron realizadas en un equipo para pruebas mecánicas (Sintech 1/S, MTS, USA) el cual está conectado a una computadora que da información en tiempo real del comportamiento de la película durante las pruebas. Se utilizó una celda de carga de 100 N variando entre las dos pruebas (extensión y punción) la abrazadera utilizada.

Las pruebas mecánicas (extensión y punción) fueron realizadas de acuerdo al procedimiento estándar aplicado para este tipo de materiales (ASTM D882-97, 2003).

4.6.1 Fuerza de fractura en la punción

La Figura 4.2 es una representación del equipo y la forma en que se llevó a cabo la prueba de fractura en la punción.

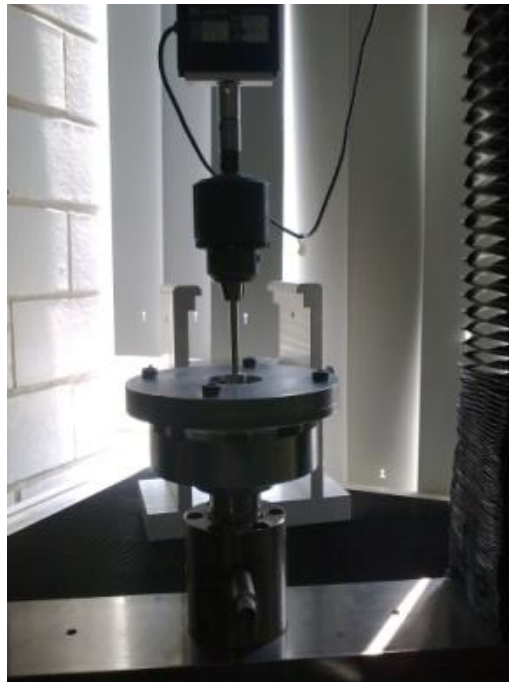


Figura 4.2. Prueba de fractura en la punción

Las películas de proteína de cazón y raya cortadas en círculos de aproximadamente 8 cm de diámetro se sujetaron entre dos placas circulares con un orificio en el centro donde posteriormente una punta lisa de 13 mm de diámetro descendía perpendicularmente a una velocidad constante de 50 mm/s. Mientras en la computadora se registró en tiempo real la fuerza requerida para penetrar o fracturar las películas.

4.6.2 Fuerza de fractura en la extensión

La Figura 4.3 es una representación del equipo y la forma en que se llevó a cabo la prueba de fractura en la extensión.

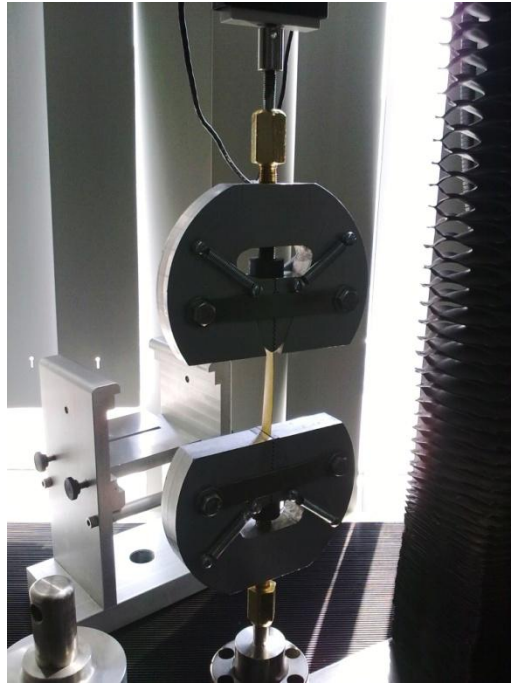


Figura 4.3. Prueba de fractura en la extensión

En esta prueba las películas de proteína de cazón y raya fueron cortadas en tiras de 1 cm de ancho por 8 cm de largo. Dichas tiras se sujetaron de los extremos por medio de abrazaderas conectadas al equipo con una separación inicial de 5 cm para posteriormente estirarlas a una velocidad constante de 500 mm/s. Mientras que en la computadora se registró en tiempo real la fuerza necesaria para romper o fracturar las películas.

4.7 Propiedades de barrera

4.7.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua se determinó de acuerdo al método ASTM E96-00 (2003). De esta forma se puede obtener la permeabilidad mediante la determinación del coeficiente de transmisión de vapor de agua al registrar el peso ganado debido a la transferencia de humedad a través de la película en un tiempo determinado.

Las películas de proteína de cazón y raya fueron fijadas en celdas acrílicas a peso constante, las cuales se llenaron con una cantidad conocida de CaCl_2 anhidro secado a peso constante. Las películas se sujetaron a la celda usando cuatro tornillos localizados alrededor de la celda que permiten sellarla herméticamente mediante una capa de silicón.

A las celdas ensambladas se les determinó el peso inicial para posteriormente colocarlas en un desecador con una humedad relativa de 62 ± 2 %HR lograda con una solución saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y temperatura de prueba de 25 ± 2 °C, ambas condiciones fueron medidas con un termohigrómetro. De esta manera la presión de vapor de agua en ambos lados de la película proporciona la fuerza que impulsa el vapor de agua a través de ésta.

La ganancia de peso se midió cada 24 horas por 5 días.

4.7.2 Permeabilidad al oxígeno (PO_2)

La permeabilidad al oxígeno se determinó de acuerdo al método ASTM D1434-82 (2003), con el procedimiento volumétrico. De esta forma se puede obtener la permeabilidad a partir del coeficiente de transmisión de oxígeno siguiendo el cambio con el tiempo del volumen generado por la transferencia de oxígeno a través de la película.

Se colocaron dos piezas de papel filtro en la parte superior de la celda volumétrica para después colocar las películas cortadas circularmente entre los dos compartimentos de la celda. Las películas se sujetaron a la celda para mantener las condiciones de hermeticidad con ayuda de cuatro tornillos colocados simétricamente.

Una vez ensamblada, la película fue sometida a una presión positiva durante 10 minutos con la válvula de escape abierta para purgar el aire en la celda y una vez hecho esto se cerró la válvula y se colocó en el centro de la celda el capilar ajustando a la presión de prueba a 29 psi (200 kPa) manométrica. Se tomó el tiempo con un cronómetro, de tal forma que la prueba tuvo una duración de 4 horas.

4.8 Actividad de agua (a_w)

La determinación de la actividad de agua se realizó en un equipo AquaLab modelo Serie 3 y se basa en el empleo de la técnica de medición del punto de rocío en un espejo enfriado. De tal forma que la muestra se equilibra con el ambiente de la cámara sellada que contiene el espejo y se detecta la condensación sobre dicho espejo. En el equilibrio, la humedad relativa del aire es igual a la actividad de agua de la muestra (Decagon Devices, 2003).

El AquaLab es un equipo automatizado cuya operación es sumamente sencilla. La película troceada en pedazos de alrededor de 0.5 cm x 0.5 cm se colocó en un porta muestra tratando de cubrir el fondo completamente. Se abrió el cajón, se colocó la muestra y se cerró para finalmente girar la perilla a la posición READ y comenzar la medición.

Los datos que se obtienen en este equipo son la a_w y la temperatura de la muestra.

4.9 Punto de fusión

La determinación del punto de fusión de las películas de cazon y raya se llevó a cabo en un calorímetro diferencial de barrido (Perkin Elmer modelo DSC7) siguiendo el procedimiento estándar ASTM D3418 (2003).

El equipo se calibró con Indio, a una velocidad de barrido de 10 °C/min, en un intervalo de temperatura de 25-145 °C, en atmósfera inerte creada con nitrógeno a un flujo de 21.4 mL/min.

Se tomaron muestras de alrededor de 5 mg que fueron encapsuladas en charolas herméticas de aluminio. La prueba se llevó a cabo a las condiciones utilizadas para la calibración, excepto el intervalo de temperatura que en este caso fue de 25-200 °C.

4.10 Biodegradabilidad

Se hizo un análisis cualitativo de la biodegradabilidad de las películas de proteína de cazón y raya basándose en el deterioro de las películas debido al desarrollo bacteriano. Esta prueba se realizó de acuerdo a las pruebas estándar de biodegradabilidad y toxicidad (OECD, 1993) con algunas modificaciones.

Con el fin de obtener una población bacteriana variada para realizar la prueba, se tomaron muestras de tierra de al menos cinco lugares diferentes las cuales se mezclaron y se suspendieron en agua.

Después se preparó agar al 1.5% y una vez que tuvo una temperatura de alrededor de 40-45 °C se le agregó la película molida en una concentración de 2% y se vació en cajas Petri desechables. Entonces de la suspensión de microorganismos se tomó una alícuota que se colocó sobre el agar; las cajas fueron incubadas durante 72 horas a 37 ± 2 °C.

Posteriormente las colonias presentes se aislaron en agar BHI y se incubaron. Una vez que las colonias fueron aisladas, se sembraron en caldo BHI para usarlas en la prueba.

En condiciones asépticas se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, 100 mL de medio mineral y la película a evaluar cortada en círculo de 5 cm aproximadamente. A cada uno de los matraces se le agregó 1 mL de suspensión de microorganismos en una concentración de 0.5 en la escala Mc Farland equivalentes a 1.5×10^8 microorganismos por mL.

Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 7 días sacándolas cada 24 horas para observarlas así como para medir la densidad óptica, la cual nos indica el crecimiento microbiano.

4.11 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron examinados con el software Statgraphics por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA). Una prueba de comparación múltiple (prueba de rangos) fue usada para determinar la diferencia significativa entre las medias a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

Capítulo 5. Resultados y discusión

5.1 Caracterización de la piel

Las Figuras 5.1 y 5.2 muestran las pieles de cazón y de raya, troceadas y empaquetadas al vacío en bolsas de polipropileno para ser utilizadas en este estudio.



Figura 5.1. Piel de cazón empaquetada al vacío



Figura 5.2. Piel de raya empaquetada al vacío

Mediante el análisis químico composicional se determinó humedad, proteína, grasa y cenizas a dos lotes de cada piel, cazón y raya, cada uno por triplicado; siendo el agua el componente mayoritario como se muestra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Contenido promedio de humedad en la piel de cazón y raya (n = 3)

	Humedad (g/100 g piel)	
	Cazón	Raya
Lote 1	55.0 ± 0.390	72.7 ± 0.14
Lote 2	68.6 ± 1.55	73.8 ± 1.90

En el caso de la piel de cazón, el contenido de agua que es de 55-69%, coincide con el estudio realizado por Kittiphattanabawon et al. (2010), el cual es 61.96%.

Por otro lado, la humedad de la piel de raya es similar a la que reportan Mardiah et al. (2008) de 79.10%; y también cabe mencionar que entra en el intervalo de 71-80% para peces de agua salada (Puwastien et al. 1999).

En la Tabla 5.2 se encuentran los resultados de las determinaciones de proteína, grasa y cenizas.

Tabla 5.2. Contenido promedio de proteína, grasa y cenizas en la piel de cazón y raya (n = 3)

	Proteína (g/100 g piel)		Grasa (g/100 g piel)		Cenizas (g/100 g piel)	
	Cazón	Raya	Cazón	Raya	Cazón	Raya
Lote 1	34.4±0.531 ^{ay}	24.1±1.18 ^{az}	0.48±0.02 ^{ay}	0.56±0.06 ^{az}	4.40±0.17 ^{ay}	0.95±0.01 ^{az}
Lote 2	26.2±0.974 ^{by}	23.7±1.61 ^{az}	0.35±0.17 ^{ay}	0.13±0.09 ^{bz}	3.28±0.23 ^{by}	0.65±0.03 ^{bz}

Diferente letra en columna (a, b) indica diferencia significativa entre los lotes con $\alpha = 0.05$

Diferente letra en fila (y, z) indica diferencia significativa entre las especies con $\alpha = 0.05$

Los resultados del análisis composicional (Tabla 5.1 y 5.2) muestran que los componentes principales tanto de la piel de cazón como de raya, son agua y proteína.

Según el estudio realizado por Oakland et al. (2005), el contenido de proteína de varias especies de rayas y tiburones se encuentra en el intervalo de 10.1-22.6%. Sin embargo, en la Tabla 5.2 se observa que en este caso, los resultados obtenidos están ligeramente por encima de este intervalo siendo el cazón el que más proteína contiene. El valor de la proteína de cazón incluso está por encima del reportado por Kittiphattanabawon et al. (2010) de 24.75%.

Con estos resultados se puede decir que ambas pieles, cazón y raya, son fuente de materia prima para la extracción de proteínas y la posterior elaboración de películas biodegradables, ya que de acuerdo con Mardiah et al., (2008), el contenido de proteína es considerado alto.

Ambas pieles poseen bajo contenido de grasa y presentan diferencia significativa incluso en lotes de la misma especie. Esta característica se atribuye a factores ambientales, la temporada del año y la ubicación geográfica (Rao et al., 1995).

El contenido de grasa de otras especies de tiburón varía, por ejemplo, del *Centrophorus squamosus* es de 0.99% (Oakland et al., 2005) mientras que del *Prionace glauca* (Limpisophon et al., 2009) es de 0.50%, ambos por encima de los resultados obtenidos para el cazón. Sin embargo, si se compara con el 0.19% del *Chiloscyllium punctatum* (Kittiphattanabawon et al., 2010), el cazón tiene mayor contenido de grasa.

En cuanto a la raya, los valores también varían, sin embargo, el valor reportado por Mardiah et al., (2008) de 0.42%, se encuentra entre el intervalo obtenido en este estudio (0.13-0.56%).

El contenido de cenizas en la piel de raya fue de 0.65-95%, que es similar al obtenido por Maridiah et al., (2008) de 0.83%. Mientras que en el caso del cazón, los valores obtenidos estuvieron muy por encima del 0.99% reportado por Oakland et al., (2005) y aún más del 0.07% que obtuvo Limpisophon et al., (2009) pero por debajo del 12.12% que reporta Kittiphattanabawon et al. (2010).

A pesar de que ambas especies tienen un alto contenido de cenizas, sí existe diferencia, se puede observar que la piel de cazón tiene de tres a cuatro veces más minerales que la piel de raya.

En este caso, el contenido de minerales de la piel no impide la formación de las películas pero sí podría influir en algunas de sus propiedades físicas como su color y flexibilidad, entre otras; así como el espesor que afecta las propiedades mecánicas y de barrera.

El análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas entre especies e incluso entre lotes de la misma piel, debido a que la composición química de los peces varía aun entre individuos de la misma especie. Esto se puede deber a la edad, sexo, medio ambiente, alimentación y estación del año; sin embargo, esta variación no influyó en la obtención del extracto proteínico ni en la formación de las películas.

5.2 Obtención del extracto proteínico

5.2.1 Caracterización del extracto proteínico

La proteína de las pieles de cazón y raya se extrajo siguiendo el procedimiento de Batista (1999) con algunas modificaciones. Esta extracción se realizó en medio básico para proceder a la precipitación isoeléctrica en medio ácido, siguiendo con una centrifugación para obtener así el extracto proteínico y por otro lado un sobrenadante con proteína aún soluble.

El extracto de proteína de ambas pesquerías se caracterizó a través de la determinación de humedad y de proteína total.

La determinación de humedad se realizó por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Contenido promedio de humedad en el extracto proteínico de cazón y raya (n = 3)

	Humedad (g/100 g extracto)
Cazón	86.2 ± 0.195 ^a
Raya	85.1 ± 0.288 ^b

Diferente letra (a, b) indica diferencia significativa con $\alpha = 0.05$

En la Tabla 5.4 se muestra la determinación de proteína cruda, realizada por triplicado.

Tabla 5.4. Contenido promedio de proteína en el extracto proteínico de cazón y raya (n = 3)

	Proteína (g/100 g extracto)
Cazón	11.6 ± 0.363 ^a
Raya	11.7 ± 0.268 ^a

Diferente letra (a, b) indica diferencia significativa con $\alpha = 0.05$

Como se observa en la Tabla 5.4, los extractos poseen alrededor del 12% de proteína. El resto corresponde a agua y componentes no proteicos, principalmente minerales como ya se había mencionado anteriormente.

Según autores como Kittiphattanabawon et al., (2010), este extracto está compuesto por proteínas no colágenas, en este caso sarcoplásmicas, así como de algunas provenientes del colágeno. El colágeno constituye el principal elemento estructural de todos los tejidos conectivos (Bae et al., 2008).

A pesar de que la piel de raya tiene menor cantidad de proteína en relación a la piel de cazón, se extrae mayor cantidad en el caso de la raya. Esto no se puede explicar en función de los aminoácidos hidrófilos o hidrófobos presentes en las pieles, ya que estudios realizados por Limpisophon et al. (2009) y Bae et al. (2008) muestran que la proporción entre estos es prácticamente la misma (28% y 72% respectivamente). Entonces puede ser que los minerales presentes en la piel de cazón disminuyan la solubilidad de proteínas debido a que algunos de ellos también se disuelven y así se reduce la cantidad de agua disponible para las proteínas.

En el extracto proteínico se encuentran las proteínas extraídas y precipitadas de las pieles, pero en el sobrenadante que queda aún hay proteínas que no precipitaron. Es por esto que en la Tabla 5.5 se encuentran las determinaciones de la cantidad de proteína soluble en el sobrenadante, obtenidas por el método de Lowry.

Tabla 5.5. Contenido promedio de proteína soluble en el sobrenadante de extracción de cazón y raya (n = 3)

	Proteína soluble (mg/mL sobrenadante)
Cazón	2.1 ± 0.07 ^a
Raya	4.7 ± 0.30 ^b

Diferente letra (a, b) indica diferencia significativa con $\alpha = 0.05$

Los valores obtenidos en las Tablas 5.4 y 5.5 son importantes para evaluar el rendimiento de la extracción.

5.2.2 Evaluación del rendimiento

El rendimiento de la extracción de proteína de las pieles de cazón y raya se obtuvo como se indica en el capítulo anterior; los resultados se encuentran en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6. Rendimiento de proteína extraída, precipitada y residual de la extracción de cazón y raya

	Proteína extraída (g/100 g proteína en piel)	Proteína precipitada (g/100 g proteína en piel)	Proteína residual (g/100 g proteína en piel)
Cazón	25.78	19.01	6.77
Raya	39.72	22.56	17.16

Se logró extraer la proteína de ambas pieles (cazón y raya) con el medio básico empleado. El rendimiento de extracción fue mayor en caso de la piel de raya (Tabla 5.6), sin embargo, solo se precipitó un poco más de la mitad de esta proteína dejando una cantidad importante en el sobrenadante. Por otro lado, en el caso del cazón aunque se extrajo menor cantidad de proteína, la eficiencia de la precipitación fue más alta al quedar poca proteína solubilizada.

De esta forma, sólo se probó la capacidad de formación de películas de la fracción precipitada mientras que la proteína soluble en el sobrenadante fue considerada como residuo a pesar de la alta cantidad presente, sobre todo en el caso de la raya.

Lo anterior nos lleva a buscar otras opciones, ya sea para aumentar el rendimiento de la extracción o para aprovechar toda la proteína extraída. Por ejemplo, Leerahawong et al. (2011) emplea otro método de extracción, donde las proteínas se disuelven en una solución buffer

20mM de tris-HCl a pH 7.0 y posteriormente se agrega cloruro de sodio o sales orgánicas como citrato de trisodio dihidratado, benzoato de sodio, acetato de sodio o tartrato de sodio dihidratado para preparar la solución formadora de películas. Entonces, esta podría ser otra opción para extraer las proteínas y determinar cuál permite un rendimiento mayor.

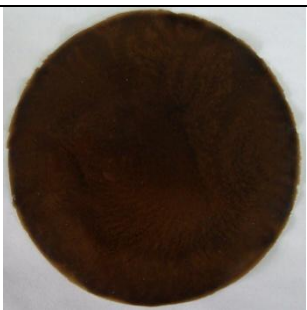

5.3 Formación de las películas a partir del extracto proteínico

En trabajos anteriores se han podido formar películas a base de proteínas extraídas de Sardina atlántica (*Sardina pilchardus*) (Cuq et al., 1995), Tilapia del Nilo (*Paschoalick et al., 2002*), Halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Carvalho et al., 2008) y pesquerías del género *Ephinephelus* (Granados-Navarrete & Martínez-García, 2010) entre otras; aunque también se han hecho a partir de semillas como la chía (Hernández-Jardón, 2007).

Para la formación de las películas se empleó la formulación que consta de una disolución del extracto de proteína con una concentración final del 5% (w/v) y sorbitol como plastificante al 75% respecto a la cantidad de proteína en el extracto de proteína.

Esta formulación fue adecuada para la formación de las películas, cuyas características físicas fueron las siguientes:

Tabla 5.7. Características físicas de las películas de cazón y raya.

Película		Observaciones
Cazón		Opaca, color Black 3 de la escala Pantone, flexible pero quebradiza en las orillas, gruesa al tacto, nada translúcida, los lados de la película se distinguen, con olor a pescado.
Raya		Opaca, color 4505 de la escala Pantone, más flexible que la de cazón, poco gruesa al tacto, poco traslúcida, los lados se distinguen, con ligero olor a pescado.

De la Tabla 5.7 se puede observar que existieron diferencias entre las películas de proteína de cazón y de raya, siendo las de cazón menos flexibles y con mayor coloración. Si bien, esto no afecta en la elaboración de la película sí influye en las características físicas.

Las propiedades de las películas se ven altamente influenciadas por el plastificante empleado. El sorbitol es una molécula con bajo peso molecular que puede acomodarse fácilmente entre las cadenas proteínicas y establecer puentes de hidrógeno con los grupos reactivos de las proteínas. Juntando plastificante y proteína, se induce la formación de interacciones proteína-plastificante que disminuyen las interacciones proteína-proteína. Como consecuencia, la densidad de las interacciones moleculares se ve disminuida y el volumen libre entre las cadenas de polímero aumenta (Cuq et al., 1997). Es decir, un incremento en la flexibilidad de la película (Limpisophon et al., 2009).

Por otro lado, dado el color de las películas de cazón es posible que se impida el paso de luz, por lo que podría funcionar como un empaque fotoprotector. Esto sería importante para alimentos con alto contenido de grasa donde la luz favorece la oxidación.

En cuanto a la alta cantidad de minerales en las películas de cazón se puede resolver dando un tratamiento de diálisis para eliminarlos y obtener una película más traslúcida siendo más agradable a la vista. Sin embargo, debido al cambio en la composición de la película es probable que sus propiedades se modifiquen. De esta manera sería necesario evaluar las propiedades de la película resultante.

Estas propiedades, barrera a la luz, transparencia y opacidad, pueden ser medidas. Tal es el caso de autores como Leerahawong et al. (2011), que determinaron las propiedades de barrera a la luz visible y ultravioleta y la transparencia de películas de calamar. Por otro lado, la opacidad de películas de Tilapia fue determinada por Carvalho et al. (2008). Por tanto, se sugiere que para trabajos posteriores sobre el estudio de películas de piel de cazón y raya, se realicen las mediciones de barrera a la luz, transparencia y opacidad.

Finalmente, en esta primera parte del estudio, se demostró que las proteínas de la piel de cazón y de raya poseen la capacidad de formar películas, creando una red tridimensional ordenada donde quedan retenidos el plastificante y el agua.

5.4 Evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera de las películas

El conocimiento de las características físicas de los materiales de empaque es muy útil para controlar el proceso de fabricación del envase, el diseño y el uso del mismo. Es por esto que es importante realizar una caracterización de las películas de cazón y raya.

5.4.1 Medición del espesor

En la Tabla 5.8 se muestran los resultados promedio del espesor de las películas de cazón y raya.

Tabla 5.8. Espesor promedio de las películas de cazón y raya

Película	Espesor (μm)
Cazón	225 \pm 47.8 ^a
Raya	184 \pm 29.2 ^a

Diferente letra (a) indica diferencia significativa con $\alpha = 0.05$

Siguiendo el procedimiento de formación de las películas descrito anteriormente, no se encontró diferencia significativa en el espesor. Estos resultados son importantes ya que las pruebas de propiedades mecánicas y de barrera están relacionadas con esta propiedad.

5.5 Propiedades mecánicas

Las propiedades que describen la forma en que un material responde a la aplicación de fuerza (particularmente su comportamiento bajo cargas mecánicas) son llamadas propiedades mecánicas. Estas propiedades son

útiles en el diseño y producción de empaques, transporte y distribución así como la predicción de la vida de anaquel del producto (Sun-Lee, et al., 2008). Es por esto que es importante evaluar estas propiedades en las películas de proteína de piel de cazón y de raya, para así determinar su funcionalidad como envase para alimentos.

La Figura 5.3 corresponde a una señal típica obtenida de la máquina de pruebas mecánicas SINTECH 1/S durante la evaluación de una película en extensión o punción; donde los valores primarios registrados por el equipo son fuerza (N) y tiempo (min).

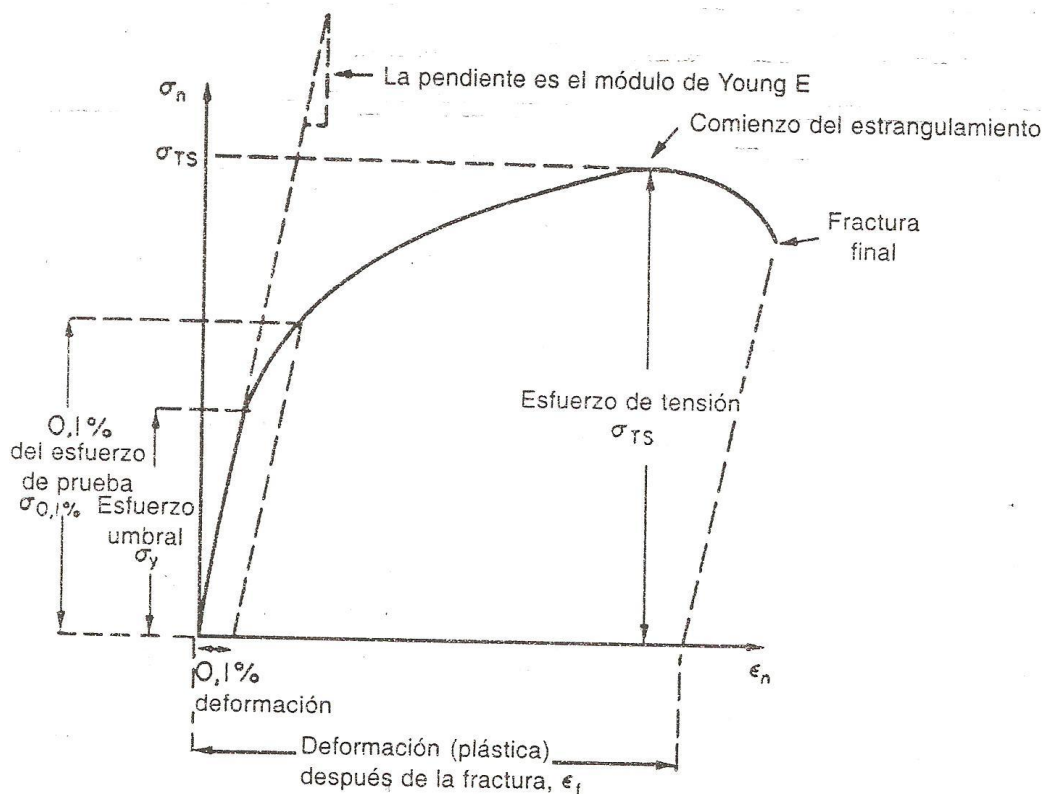


Figura 5.3. Señal típica durante una prueba de fractura en la punción y/o extensión (Rosenthal, 2001)

En la Figura 5.3, la curva que se observa en la gráfica puede ser dividida en tres regiones. En la primera, la región elástica, se observa una linealidad en la gráfica (módulo de Young o elástico) debido a que el esfuerzo y la deformación relativa son proporcionales, aquí el material se comporta elásticamente y la deformación es reversible. Esto significa que cuando la carga se libere la muestra recuperará su configuración original, aunque en la práctica no necesariamente ocurre debido a que ha ido ocurriendo una disipación de energía así que el material puede recuperar solo parcialmente su forma original. La segunda, región plástica, donde la deformación es no lineal hasta un límite elástico corresponde al comportamiento del material durante la compresión o extensión. Finalmente la última región de la gráfica corresponde a la ruptura inicial de la película así como la ruptura subsecuente de ésta; a partir de este punto la película ya no puede recuperar ni parcialmente su forma original.

Los parámetros que permiten evaluar estas propiedades son dos: el módulo de Young o elástico y el esfuerzo de tensión. El módulo de Young está representado gráficamente por la pendiente de la parte lineal; así, mientras más grande sea el valor del módulo de Young mayor será su resistencia a la deformación. Mientras que el esfuerzo de tensión indica el estrés máximo que puede soportar el material hasta su ruptura (Sun-Lee, et al., 2008).

Las pruebas mecánicas (extensión y punción) fueron realizadas de acuerdo al procedimiento estándar aplicado para este tipo de materiales (ASTM D882-97, 2003).

5.5.1 Fuerza de fractura en la punción

Las Figuras 5.6 y 5.7 son un ejemplo de las gráficas que se obtienen de los datos durante la prueba de punción. Corresponden al esfuerzo aplicado a la película y la deformación que este esfuerzo provoca.

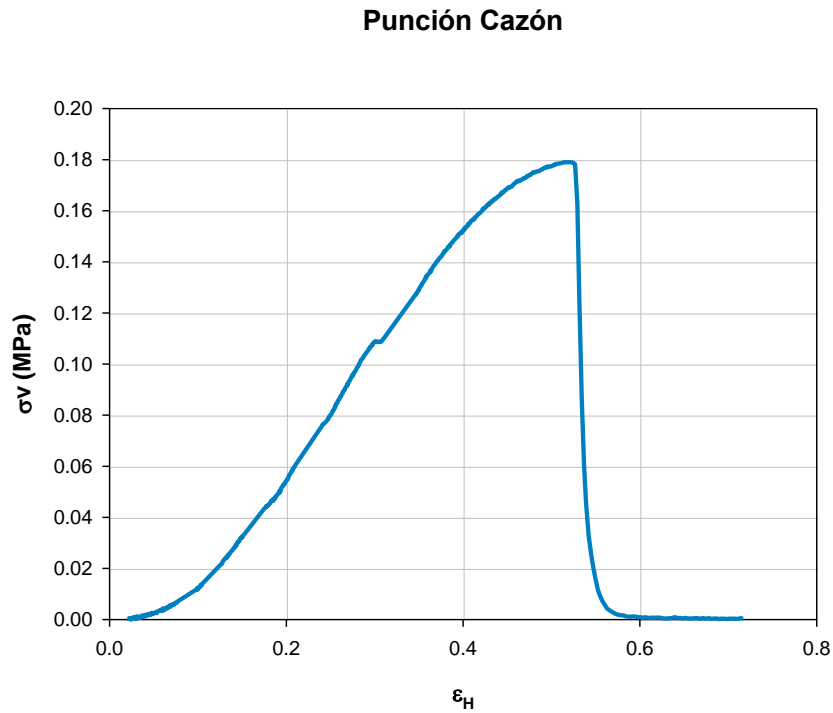


Figura 5.6. Relación esfuerzo-deformación de Hencky durante la prueba de punción de las películas de cazón

Punción Raya

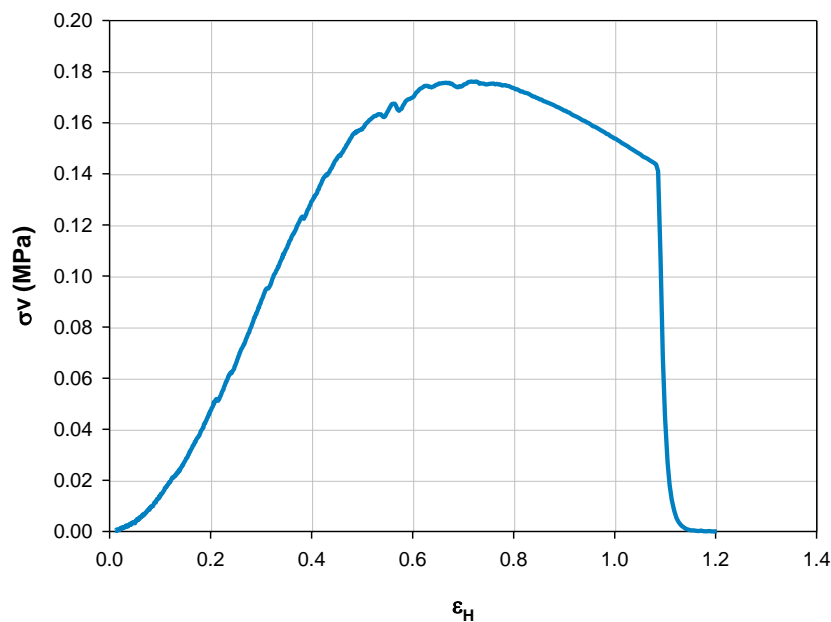


Figura 5.7. Relación esfuerzo-deformación de Hencky durante la prueba de punción de las películas de raya

Las Figuras 5.6 y 5.7 muestran comportamientos diferentes en las películas al ser sometidas a pruebas de punción. La Figura 5.6 corresponde a la película de cazón, donde se observa que una vez que llega a su estrés máximo la película se rompe, entonces, su deformación plástica es poca. Por el contrario, la película de raya (Figura 5.7) no se rompe inmediatamente después del esfuerzo máximo de tensión, sino que presenta mayor flexibilidad y tiene una mayor deformación plástica. Una vez que se llega al esfuerzo máximo, la fuerza comienza a disminuir y tiene lugar una deformación plástica localizada y no uniforme, es decir, es inestable hasta que finalmente se rompe.

En la Tabla 5.9 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de fractura en la punción.

Tabla 5.9. Propiedades mecánicas de punción de las películas de cazón y raya

Película	Espesor (μm)	Esfuerzo máximo de tensión (kPa)	Esfuerzo de fractura (kPa)	Módulo de Young (kPa)	Deformación máxima (%)
Proteína de cazón (5% proteína, 75% sorbitol)	225 ± 47.8^a	192 ± 18.4^a	192 ± 18.4^a	455 ± 49.5^a	40.6 ± 0.224
Proteína de raya (5% proteína, 75% sorbitol)	184 ± 29.2^a	191 ± 20.5^a	96 ± 17^b	378 ± 43.8^a	61.6 ± 6.36

Diferente letra (a, b) indica diferencia significativa con $\alpha=0.05$

Al realizar el análisis estadístico de las propiedades de punción de las películas de cazón y raya, se observa que no existe diferencia significativa entre ellas excepto en el esfuerzo de fractura, el cual es mayor en el caso de la película de cazón.

Ambas películas tienen el mismo comportamiento elástico a deformaciones bajas, es decir, que si se detiene el esfuerzo en el intervalo de 0.378-0.455 MPa, regresarán a sus dimensiones originales.

En cuanto al esfuerzo máximo de tensión tampoco existe diferencia significativa, sin embargo, la diferencia entre ellas es que las de cazón llegan a su deformación máxima (41%) al aplicar este esfuerzo (192 kPa); mientras que las de raya después de este esfuerzo (191 kPa) aún se deforman hasta llegar al 62%.

En la Tabla 5.9 se observa que en el caso de las películas de cazón el esfuerzo de fractura corresponde al esfuerzo máximo de tensión, es decir, que al llegar al este punto (192 kPa) la película se deforma al máximo y se fractura. Por otro lado, en las películas de raya, estos valores son diferentes, ya que al llegar al esfuerzo máximo (191 kPa) la deformación plástica continua pero el esfuerzo disminuye y se desestabiliza hasta que la película se rompe, entonces el esfuerzo de fractura es de 96 kPa.

Según Jung (2005), las películas elaboradas con proteína de chícharo, huevo o trigo, entre otras; con un esfuerzo de fractura menor a 1 MPa, son materiales que ofrecen muy pobre resistencia al rompimiento, por lo que las películas de cazón y raya entran en esta clasificación. Es decir, cuando son sometidas a punción, se rompen con facilidad.

5.5.2 Fuerza de fractura en la extensión

Las Figuras 5.9 y 5.10 corresponden a las gráficas que se obtienen al someter a las películas a una prueba de extensión.

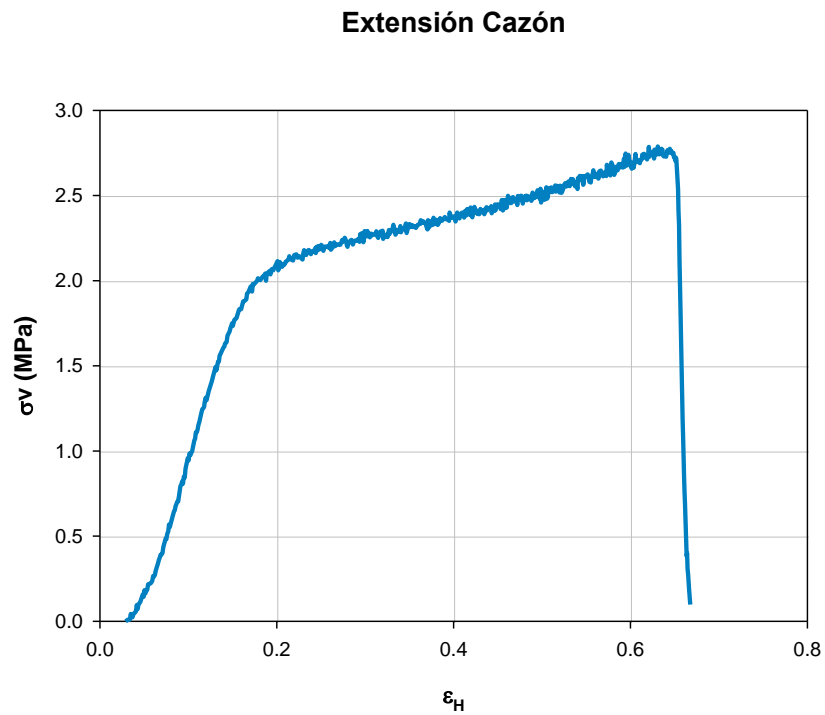


Figura 5.9. Relación esfuerzo-deformación de Hencky durante la prueba de extensión de las películas de cazón

Extensión Raya

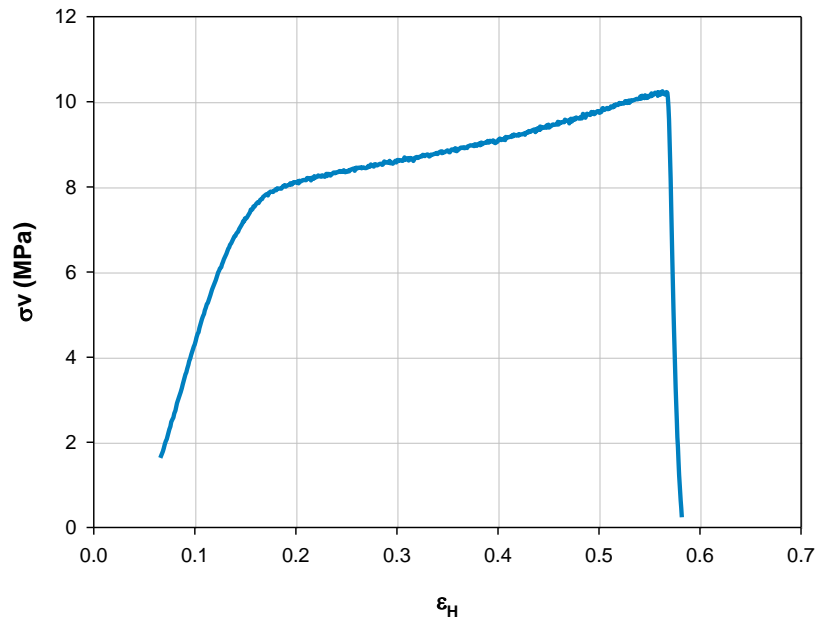


Figura 5.10. Relación esfuerzo-deformación de Hencky durante la prueba de extensión de las películas de raya

En el caso de la extensión, las películas se comportan de la misma manera (Figuras 5.9 y 5.10), en ambos casos las películas tienen una deformación considerable (región plástica) antes de llegar al punto de estrés máximo donde finalmente se rompen. En este caso la diferencia es que las de raya resultan más resistentes a la fractura ya que se requiere un esfuerzo mayor para llegar a este punto.

Además, se observa que en el caso de la extensión el esfuerzo que se requiere para romper las películas es mayor que en la punción. Lo mismo ocurre con la deformación plástica.

Los resultados obtenidos de la prueba de fractura en la extensión se muestran en la Tabla 5.10 y se incluyen valores reportados para películas hechas a base de proteína de mero (Granados-Navarrete y

Martínez-García, 2010), asimismo se incluyen valores típicos reportados para polietileno de baja densidad (LDPE).

Tabla 5.10. Propiedades mecánicas de extensión de las películas de cazón y raya y de otras películas de origen proteínico y sintético.

Película	Espesor (μm)	Esfuerzo de tensión (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Deformación máxima (%)
Proteína de cazón (5% proteína, 75% sorbitol)	225 \pm 47.8	2.74 \pm 0.316 ^a	16.89 \pm 2.589 ^a	80.0 \pm 14.6
Proteína de raya (5% proteína, 75% sorbitol)	184 \pm 29.2	9.19 \pm 1.14 ^b	64.29 \pm 7.705 ^b	65.9 \pm 7.73
Proteína de mero\diamond (5% proteína, 75% sorbitol)	326 \pm 17.0	1.79 \pm 0.304	20.30 \pm 1.024	---
LDPE \dagger	---	8-12	200-400	---

LDPE Polietileno de baja densidad

\diamond Granados-Navarrete & Martínez-García, 2010

\dagger Jung, 2005

Diferente letra (a, b) indica diferencia significativa con $\alpha=0.05$

Como indica la Tabla 5.10, si existe una diferencia en el esfuerzo de tensión de las películas de cazón y de raya. El esfuerzo de tensión es tres veces más grande en las películas de raya respecto a las de cazón, es decir, las películas de raya resisten más la elongación ya que requieren un mayor esfuerzo para provocar su ruptura al extenderlas.

Al observar los valores del módulo de Young (Tabla 5.10), se puede decir que a deformaciones bajas las películas de raya son más resistentes a la deformación en comparación a las de cazón.

En ambos casos, la ruptura se presenta al alcanzar su esfuerzo de tensión, sin embargo, las películas de cazón tienen una deformación del 80% de su tamaño original con un esfuerzo de tensión bajo (2.7 MPa). Mientras que las películas de raya se deforman menos (66%) pero se requiere un esfuerzo 3 veces mayor que el de las de cazón. Por lo tanto, las películas de raya son menos flexibles pero más resistentes a la fractura por elongación.

Al comparar con otras películas proteínicas, por ejemplo con películas a base de proteína de mero se observa que la resistencia a la fractura (1.79 MPa), es mejor en las películas de cazón (2.8) y raya (9 MPa).

El esfuerzo de tensión de las películas de raya (9 MPa) es muy parecido al del polietileno de baja densidad (8-12), pero las de cazón (2.8) se encuentran muy por debajo de éste.

Entonces, debido a las características de extensión de las películas de raya, puede ser que funcionen mejor que las de cazón para proteger al alimento que se va a empacar.

Aunque las películas de cazón y raya sí se oponen a la ruptura, puede ser que no sea suficiente en el momento del manejo mecánico como envase para alimentos, es por esto que se pueden mejorar estas propiedades, por ejemplo, con nanopartículas. Películas de gluten de trigo se mejoraron empleando arcilla montomarillonita, el esfuerzo de ruptura y el módulo de Young se incrementaron con la adición de este material y además la permeabilidad al vapor de agua disminuyó (Olabarrieta et al., 2006).

5.6 Propiedades de barrera

El transporte de gas o vapor a través de un empaque para alimentos puede tener una gran influencia en el mantenimiento de la calidad de la comida empacada. Es por esto, que la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno es un aspecto fundamental de las películas de proteína de cazón y raya.

Existen dos mecanismos por los cuales el vapor o el gas puede ser transportado a través del empaque: permeabilidad y filtración. La permeabilidad involucra el intercambio de gas o vapor a través de la película y la filtración consiste en el intercambio de gas o vapor a través de filtros o canales de filtración.

La Figura 5.11 muestra el mecanismo de permeabilidad que se lleva a cabo debido a un gradiente de concentración en una dirección de mayor a menor concentración. Este mecanismo consiste en tres pasos: adsorción del gas o vapor en el lado de la película con alta concentración, difusión del gas o vapor a través de la película y desorción del gas o vapor en el lado de la película con menor concentración (Sun-Lee et al., 2008).

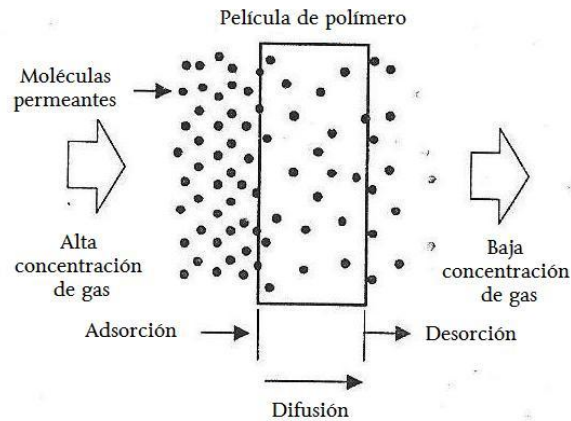


Figura 5.11. Permeabilidad a través de una película

5.6.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La filtración de vapor de agua en el empaque puede causar un aumento en la humedad que puede provocar empañamiento o crecimiento microbiano en el alimento. Mientras que si el vapor de agua se escapa del empaque, puede causar una pérdida de humedad que se verá reflejada en cambios indeseables en la textura del alimento.

Esta prueba se llevó a cabo siguiendo la metodología ASTM E96-00 (2003). En la Tabla 5.11 se muestran los valores de PVA de las películas de cazón y raya y se comparan con otras películas biodegradables así como con algunos plásticos sintéticos.

Tabla 5.11. Permeabilidad al vapor de agua de las películas de cazón y raya y de otras películas de origen proteínico y sintético.

Película	Espesor (μm)	PVA ($\text{ng}/\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}$)
Proteína de cazón (5% proteína, 75% sorbitol)	225 \pm 47.8	8 $\times 10^{-4}$ \pm 4.95 $\times 10^{-7a}$
Proteína de raya (5% proteína, 75% sorbitol)	184 \pm 29.2	16 $\times 10^{-4}$ \pm 7.68 $\times 10^{-5b}$
Proteína de mero ‡ (5% proteína, 75% sorbitol)	326 \pm 17.0	1640 $\times 10^{-4}$ \pm 7.23 $\times 10^{-5d}$
PVC □	---	2 $\times 10^{-4}$ \pm 0.000
LDPE □	---	20 $\times 10^{-4}$ \pm 6 $\times 10^{-4}$

PVC Policloruro de vinilo

LDPE Polietileno de baja densidad

‡Granados-Navarrete & Martínez-García, 2010

□ Shiku et al., 2001.

Diferente letra (a-d) existe diferencia significativa con $\alpha=0.05$

De la Tabla 5.11 se puede observar que los valores de permeabilidad al vapor de agua que presentan las películas elaboradas a partir de proteína de cazón y raya son mayores que el valor reportado para el PVC pero menores que el del LDPE, ambos plásticos sintéticos.

En general, la resistencia a la transmisión de vapor de agua de las películas proteínicas está limitada debido a la naturaleza hidrófila de las proteínas (Leerahawong et al., 2011). Y por otro lado, la transmisión de vapor de agua se facilita debido a la presencia del sorbitol, un plastificante hidrófilo, que favorece la adsorción de las moléculas de agua (Cuq et al., 1995).

Sin embargo, si comparamos solo entre películas proteínicas, podemos observar que las películas de cazón y raya presentan una menor permeabilidad al vapor de agua en comparación a aquellas de proteína de mero a pesar de tratarse también de un producto proveniente del mar. La diferencia en la permeabilidad entre las películas de mero es muy grande respecto a las de cazón y raya.

Las películas a base de proteína de piel de cazón y raya proporcionan una barrera al vapor de agua aceptable, ya que sus valores de PVA se encuentran entre los del PVC y los de LDPE. Es decir, la protección que brindan contra el vapor de agua es mejor respecto al LDPE pero no respecto al PVC.

En cuanto a los valores de PVA de las películas de cazón y raya, se observa que presentan una diferencia significativa entre ellos, siendo mejor barrera al vapor de agua las de cazón.

Estas diferencias radican en varios factores, dentro de los que se encuentran: la proteína, el mayor contenido de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica evitará la migración de agua; tipo y concentración del plastificante así como la humedad relativa (Olivas et al., 2007).

5.6.2 Permeabilidad al oxígeno (PO_2)

El oxígeno es el responsable de la mayoría de las reacciones de oxidación en alimentos, incluyendo el crecimiento de microorganismos, oscurecimiento enzimático y oxidación de moléculas específicas como proteínas, vitaminas, ácidos grasos, etc (Sundaresan & Ludescher, 2008).

Se ha encontrado que polímeros que contienen grupos que pueden ser asociados mediante puentes de hidrógeno o enlaces iónicos, como las proteínas, son el resultado de películas con excelentes barreras al oxígeno (Damodaran & Paraf, 1997).

En la Tabla 5.12 se encuentran los resultados de permeabilidad al oxígeno obtenidos siguiendo la metodología ASTM D1434-82 (2003) de las películas de cazón y raya, así como de otras películas de origen proteínico y sintético.

Tabla 5.12. Permeabilidad al oxígeno de las películas de cazón y raya y de otras películas de origen proteínico y sintético.

Película	Espesor (μm)	PO₂ ($\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m} / \text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}$)
Proteína de cazón (5% proteína, 75% sorbitol)	225 ± 47.8	No hay
Proteína de raya (5% proteína, 75% sorbitol)	184 ± 29.2	No hay
Proteína de chía †	---	17.79
Proteína de mero ◇ (5% proteína, 75% sorbitol)	326 ± 17.0	No hay
Salmón Rosa de Alaska □ (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>)	---	4.15 ± 0.536
LDPE †	---	57.85

LDPE Polietileno de baja densidad

†Alvarado-Suárez, 2007

◇Granados-Navarrete & Martínez-García, 2010

□ Chiou et al., 2009

Como se observa en la Tabla 5.12, no se encontró permeabilidad al oxígeno en las películas de cazón y raya siguiendo la metodología ASTM D1434-82 (2003) en varios ensayos en un tiempo de 4 horas y una presión de 29 psi (200kPa).

Las películas de cazón y raya poseen una excelente propiedad de barrera contra el oxígeno. En general, los polímeros con buena barrera son aquellos que tienen valores de permeabilidad inferiores a $38.9 \text{ cm}^3\mu\text{m}/\text{m}^2\text{d kPa}$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ (Hong & Krochta, 2006).

Esta propiedad de barrera se puede atribuir a la formación de una matriz homogénea por medio de las proteínas que la componen, con suficientes interacciones intermoleculares que impiden la movilidad de las cadenas polipeptídicas, además de escasos sitios de disolución para la molécula de oxígeno y por lo tanto una difícil difusión de estas moléculas a través de la matriz polimérica (Tihminlioglu et al., 2010).

Respecto a permeabilidad del polímero sintético, LDPE, presenta una alta permeabilidad al oxígeno, superando por mucho a lo estipulado como un polímero con buena barrera al oxígeno.

Estos resultados, como estudios previos realizados por Hong & Krotcha (2006) han demostrado que las películas de proteína presentan una baja permeabilidad al oxígeno, por lo que tienen un gran potencial para sustituir en parte a los costosos polímeros sintéticos ya que presentan ventajas como recubrimientos de alimentos susceptibles a la oxidación (Sothomvit & Pitak, 2007).

5.7 Actividad de agua (a_w)

La disponibilidad del agua se expresa en términos físicos como actividad de agua (a_w) y es el cociente entre la presión de vapor del alimento y la presión de vapor del agua pura a una temperatura dada (Belitz et al., 2009).

$$a_w = P/P_0 = ERH/100$$

P = presión de vapor del alimento a temperatura T

P₀ = presión de vapor del agua pura a temperatura T

ERH = humedad relativa de equilibrio a temperatura T

La actividad de agua es un factor importante que en la naturaleza determina el crecimiento de los microorganismos. Es por esto que se determinó esta propiedad a las películas de cazón y raya porque necesita estar por debajo de ciertos valores (reportados en la Tabla 5.13) para evitar el crecimiento de microorganismos y así evitar que contaminen al alimento a empacar.

Tabla 5.13. Actividad de agua y crecimiento microbiano (Beuchat, 1981)

Actividad de agua (a_w)	Microorganismos
1.00-0.95	<i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> , algunas levaduras
0.95-0.91	<i>Salmonella</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>C.</i> <i>botulinum</i> , <i>Serratia</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , algunos mohos, levaduras

	(<i>Rhodotorula, Pichia</i>)
0.91-0.87	Muchas levaduras (<i>Candida, Torulopsis, Hansenula</i>), <i>Micrococcus</i>
0.87-0.80	La mayoría de los mohos (penicilios micotoxigénicos), <i>Staphylococcus aureus</i> , mayoría <i>Saccharomyces (bailii) spp.</i> , <i>Debaryomyces</i>
0.80-0.75	La mayoría de las bacterias halófilas, aspergilos micotoxigénicos
0.75-0.65	Mohos xerófilos (<i>Aspergillus chevalieri, A. candidus, Wallemia Sebi</i>), <i>Saccharomyces rouxii</i> , algunos mohos (<i>Aspergillus equinulatus, Monascus bisporus</i>)
0.50-0.20	No hay proliferación bacteriana

En la Tabla 5.14 se muestran los valores obtenidos de la determinación de la actividad de agua:

Tabla 5.14. Actividad de agua de las películas de cazón y raya

	Activad de agua (a_w)	Temperatura (°C)
Cazón	0.402 ± 0.003 ^a	20.6
Raya	0.430 ± 0.003 ^b	20.9

Diferente letra en columna (a, b) existe diferencia significativa con $\alpha=0.05$

Los microorganismos no son capaces de crecer en condiciones de baja actividad de agua (escasa disponibilidad de agua), por debajo de valores de a_w de 0.50 ya no existe proliferación bacteriana (Tabla 5.13). En el caso de las películas de cazón y raya, como se observa en la Tabla 5.14, el valor de a_w se encuentra por debajo del 0.50. Entonces, se puede decir que las películas de proteína de cazón y raya son inocuas para el

uso como envases de alimentos, ya que en éstas no existirá proliferación de microorganismos que pueda contaminar el alimento empacado.

5.8 Punto de fusión

Las propiedades térmicas de un empaque describen el comportamiento del material en condiciones de pérdida o ganancia de calor y dentro de éstas se encuentra el punto de fusión. Es importante evaluarlo porque este fenómeno de transferencia de calor puede ocurrir durante el tratamiento térmico o en almacenamiento por periodos prolongados con variaciones de temperatura así como durante la fabricación del empaque.

Los puntos de fusión de las películas de proteína de cazón y raya obtenidos mediante DSC (ASTM D3418, 2003), así como los de algunos plásticos sintéticos, se muestran en la Tabla 5.15.

Tabla 5.15. Punto de fusión de las películas de proteína de cazón y raya

	Punto de fusión (°C)
Cazón	131.0 ± 0.283 ^a
Raya	129.7 ± 0.537 ^b
PP †	176 ^c
LDPE †	120 ^d
HDPE †	137 ^e

PP Polipropileno

LDPE Polietileno de baja densidad

HDPE Polietileno de alta densidad

†Sun Lee et al., 2008

Diferente letra (a-e) indica diferencia significativa con $\alpha=0.05$

Los puntos de fusión de las películas de cazón y raya, aunque parecen similares, estadísticamente presentan diferencia significativa entre ellos y a su vez con los plásticos sintéticos citados. Sin embargo, los de cazón y raya se encuentran por encima del punto de fusión del LDPE, que es el que generalmente se utiliza como bolsas para alimentos y muy cercano al HDPE.

Pensando en una función del empaque, una acción muy común es calentar los alimentos en el microondas, por lo que si dichos alimentos están contenidos en una de las películas, sea cazón o raya, al sufrir este calentamiento, es menos probable que exista alguna modificación en la película en comparación con una película de LDPE, ya que el punto de fusión de las películas obtenidas es mayor al de este plástico sintético.

Por otro lado, el análisis de las películas con DSC permite obtener información de la morfología del polímero; el cual puede tener estructura amorfa o semi-cristalina. Los polímeros amorfos constan solo de regiones amorfas con algunas cadenas poliméricas dispuestas al azar. Mientras que los polímeros semi-cristalinos cuentan no solo con regiones amorfas sino también con regiones cristalinas donde las cadenas poliméricas están dispuestas en forma ordenada. Esta morfología tiene propiedades deseables que combinan la fuerza de la región cristalina con la flexibilidad de la región amorfa (Sun-Lee, 2008).

Se puede decir que ambas películas, de cazón y de raya, tienen características de una morfología semi-cristalina, tales como: la opacidad ya que la región cristalina dificulta la transmisión de luz, puntos de fusión específicos, son relativamente fuertes, y tienen buena barrera a los gases, en este caso al oxígeno.

5.9 Biodegradabilidad

Las películas de proteína de piel de cazón y raya se elaboraron a base de materiales naturales renovables por lo que se supone son biodegradables. Sin embargo, no existía ningún estudio que lo confirmara, es por esto, que en este trabajo se hizo una evaluación cualitativa de esta propiedad para así poder comprobar su biodegradabilidad.

Como ya se había mencionado, este procedimiento se realizó de acuerdo a las pruebas estándar de biodegradabilidad y toxicidad. (OECD, 1993) Las películas de cazón y raya se colocaron en matraces con medio mineral y una mezcla de microorganismos para después incubar a 37 °C por 7 días. Cada día se observaban y se medía la turbidez en un espectrofotómetro contra un blanco en las mismas condiciones pero sin inóculo, las lecturas se expresan en unidades de densidad óptica (DO).

A simple vista, a partir de las 24 horas de incubación se observó turbidez en todas las muestras, la cual fue aumentando con el tiempo (Figura 5.12-5.15).



Figura 5.12. Película de cazón sin inóculo en el día 1 y en el día 7

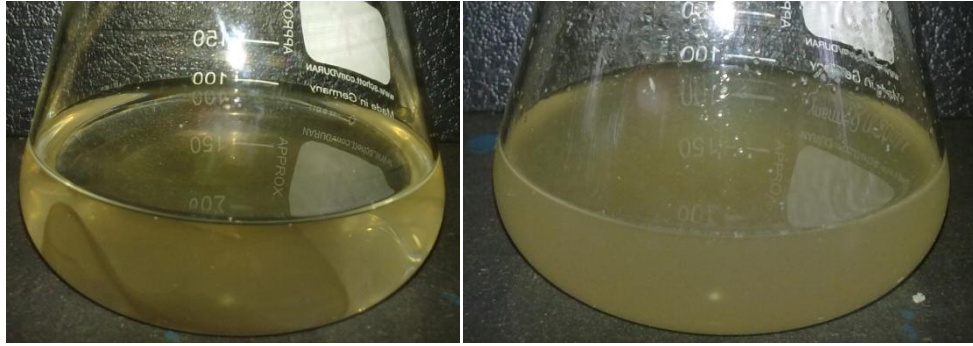


Figura 5.13. Película de cazón con inóculo en el día 1 y en el día 7

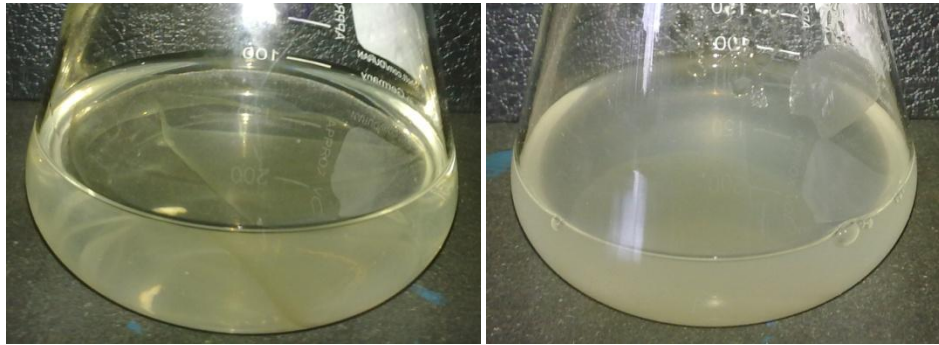


Figura 5.14. Película de raya sin inóculo en el día 1 y en el día 7



Figura 5.15. Película de raya con inóculo en el día 1 y en el día 7

La turbidez es un parámetro que proporciona una estimación del número de células de microorganismos, puesto que, una suspensión celular aparece turbia a la vista porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuantas más células estén presentes mayor será la luz dispersada, y por tanto, mayor la turbidez. Es por esto que para confirmar lo observado a simple vista, se leyeron las muestras en

un espectrofotómetro, las lecturas obtenidas para ambas películas se muestran en las Figuras 5.16 y 5.17.

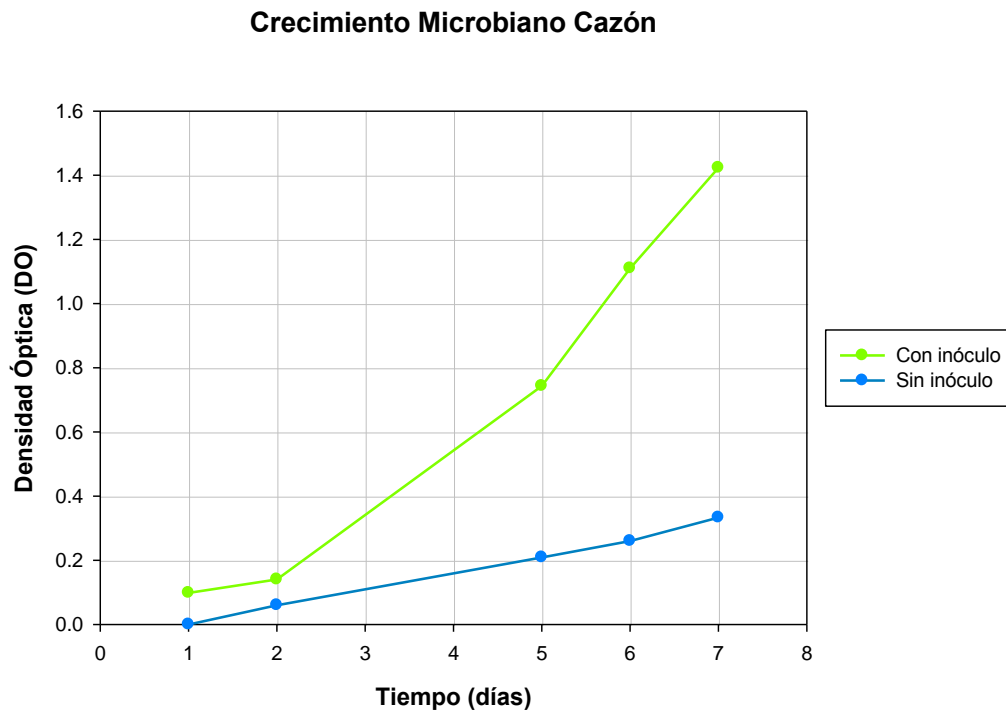


Figura 5.16. Turbidez en medio mineral con película de cazón

Crecimiento Microbiano Raya

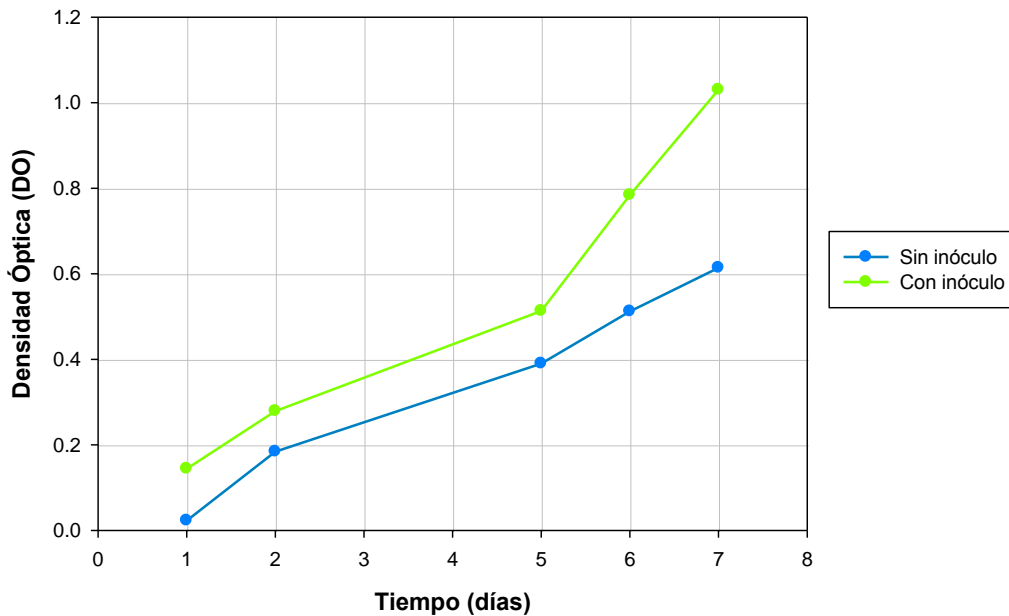


Figura 5.17. Turbidez en medio mineral con película de raya

En las Figuras 5.16 y 5.17 se observa un aumento en la turbidez del medio, es decir, que sí existe degradación aun en las muestras que no fueron inoculadas, debido a que los componentes de las películas (proteínas y sorbitol) tienen afinidad con el agua. Entonces, al estar en contacto con ésta se van disolviendo lentamente.

Por otro lado, en las muestras con inóculo se observa que la degradación es mayor y con el fin de comparar la degradación de las películas de cazón y raya y tener una idea más real de la acción de los microorganismos, en la Figura 5.18 se muestra la turbidez despreciando aquella producida por la acción del agua.

Crecimiento Microbiano

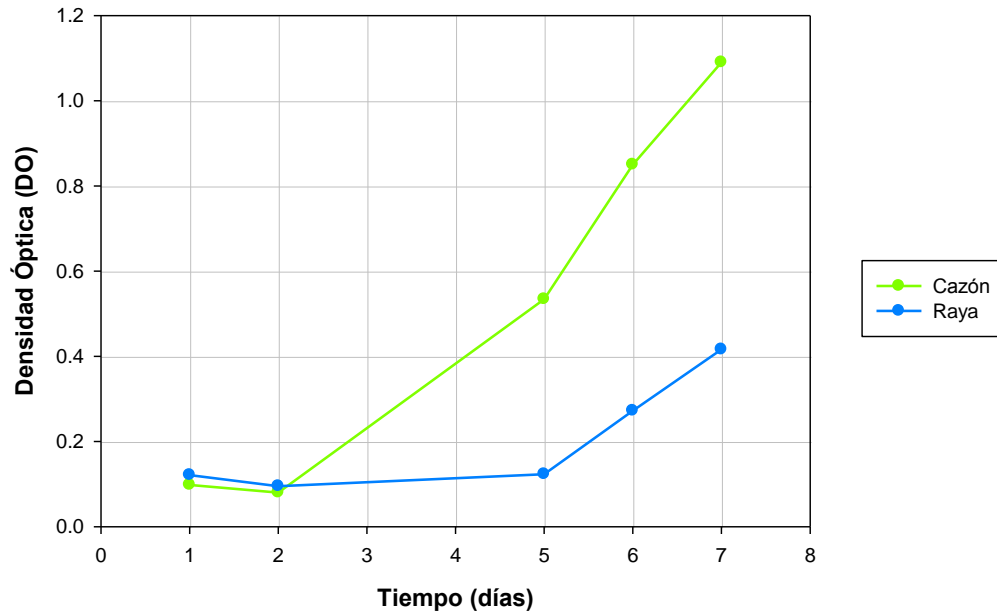


Figura 5.18. Crecimiento microbiano en medio mineral con películas de cazón y raya

El medio mineral en que se realizó esta prueba es un medio que no cuenta con una fuente de carbono, de tal forma que la única fuente de carbono presente son los materiales de las películas, proteínas y sorbitol, por lo que los microorganismos se ven forzados a consumir el carbono proporcionado por las películas para poder sobrevivir. Es decir, estos microorganismos son capaces de degradar las películas de cazón y raya (Figura 5.18).

En cuanto al grado de degradación, en la Figura 5.18 se observa que es mayor en el caso de las películas de cazón que en las de raya, posiblemente porque la biodisponibilidad de los materiales de las películas de cazón sea mayor debido a la diferencia en la estructura de las películas así como de las proteínas presentes.

Con estas evidencias se procedió a hacer una tinción de Gram (Figura 5.19). Las observaciones microscópicas con un aumento de 100x en un microscopio de campo claro revelaron una gran diversidad, se observaron bacilos cortos y largos y cocos, Gram negativos y Gram positivos, predominando los negativos.

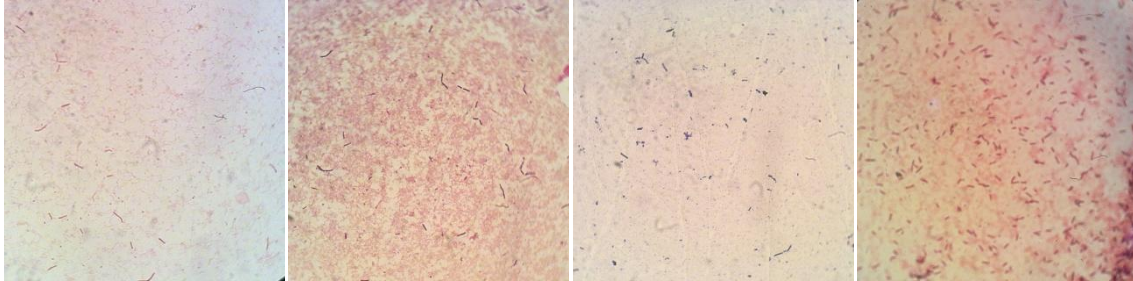


Figura 5.19. Observaciones microscópicas aumentadas 1000 veces en microscopio de campo claro

Es importante resaltar que las pruebas de biodegradabilidad requieren un manejo más prolongado de las muestras y un procedimiento más complejo que entre otras cosas, implica tiempos de prueba mucho más extensos. Este tipo de pruebas no se realizó debido al tiempo requerido; sin embargo el procedimiento aplicado se basó en los principios de las mismas y proporcionaron resultados satisfactorios, no cuantitativos pero si cualitativos, que demuestran que las películas elaboradas a partir de proteínas de piel de cazón y raya pueden ser degradadas por microorganismos.

Capítulo 6. Conclusiones

La extracción de la proteína de la piel de cazón y raya se logró en un medio básico, con un rendimiento de 26% y 40% respectivamente. Sin embargo, de la proteína extraída se logró precipitar el 19% para el cazón y 23% para la raya, ambos extractos con el 12% de proteína.

Las proteínas provenientes de la piel de cazón y de raya tienen la capacidad de formar una red tridimensional ordenada donde quedan retenidos el plastificante y el agua, que se refleja en la formación de las películas.

Las películas se obtuvieron con la siguiente formulación: 5% de concentrado de proteína, 75% de sorbitol y agua como disolvente.

Las características de las películas son diferentes, las de cazón resultaron de color más oscuro, menos flexibles, más opacas y con un olor a pescado más fuerte.

En la prueba de punción, ambas películas resultaron poco resistentes a la fractura, se rompen fácilmente comparados con polímeros sintéticos. En las características de esfuerzo máximo de tensión y módulo de Young no presentaron diferencia significativa, lo que las distingue es la deformación que sufren, las de raya se deforman 61% antes de fracturarse mientras que la deformación de las de cazón es del 41%; es decir, las de raya son más flexibles. Además, en el caso de las películas de raya, el esfuerzo máximo de tensión y el esfuerzo de fractura es diferente ya que continúan deformándose pasado este punto y se desestabilizan hasta fracturarse.

Por otro lado, en la prueba de extensión mostraron comportamientos similares, ambas sufren una deformación considerable, 80% para el cazón y 66% para la raya, sin embargo, se requieren 9 MPa deformatar las películas de raya y 3 MPa para deformatar las de cazón. En cuanto al módulo de Young, se puede decir que a deformaciones bajas las películas de raya son más resistentes a la deformación en comparación a las de cazón (64 MPa y 17 MPa respectivamente). Entonces las películas de raya son más resistentes al extenderlas que aquellas de cazón.

Ambas películas tienen una protección aceptable contra el vapor de agua, ya que ofrecen mayor protección en comparación con otras películas proteínicas como aquellas obtenidas a partir de piel de mero así como las de polietileno de baja densidad que son sintéticas.

Las películas de cazón tienen un valor de PVA menor (8×10^{-4} ng/Pa·s·m) a las de raya (16×10^{-4} ng/Pa·s·m), es decir, permiten menor paso del vapor de agua. Esto, debido a la composición de la proteína y su interacción con el plastificante.

Respecto a la permeabilidad al oxígeno, ambas películas ofrecen una barrera excelente. En las pruebas realizadas no presentaron permeabilidad al oxígeno.

Los valores de actividad de agua obtenidos para ambas películas son menores a 0.5 y por debajo de este valor no hay proliferación bacteriana. Es decir, las películas son inocuas para su uso como envases de alimentos ya que no favorecerán el crecimiento de microorganismos que puedan contaminar el alimento. Las películas de cazón (0.402)

tienen una menor actividad de agua en comparación con las de raya (0.430).

Los puntos de fusión de las películas de cazón (131 °C) y raya (130 °C), aunque parecen similares, estadísticamente presentan diferencia significativa entre ellos. El del cazón es ligeramente más alto que el de raya.

Se puede decir que ambas películas tienen características de una morfología semi-cristalina, tales como la opacidad (ya que la región cristalina dificulta la transmisión de luz), puntos de fusión específicos, son relativamente fuertes y tienen buena barrera a los gases (en este caso al oxígeno).

En cuanto a la biodegradabilidad, ambas películas son degradadas por los microorganismos, por lo que resultan amigables con el medio ambiente y su tiempo de degradación es considerablemente menor al de los plásticos sintéticos. La película de cazón se degradó con más rapidez que la de raya.

Las películas de cazón y raya, tienen potencial como empaque para alimentos. Poseen una barrera aceptable al vapor de agua, excelente protección al oxígeno, por lo que son capaces de proteger el alimento a envasar, sobre todo aquellos con alta cantidad de grasa, y como consecuencia un alargamiento en la vida de anaquel del producto. Además pueden actuar como vehículos para compuestos activos como antioxidantes, antimicrobianos o nutrientes. Las propiedades mecánicas no son tan buenas como aquellas de las películas sintéticas, sin embargo se pueden hacer modificaciones como la adición de sales o de

nanomateriales, que también mejorarían la permeabilidad al vapor de agua.

Capítulo 7. Referencias

Alvarado-Suárez, L. (2008). Estudio para evaluar biopelículas proteínicas como barreras protectoras de alimentos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

AOAC Official Method 950.46. (1995). Moisture in meat. Drying in vacuo at 95-100°C. AOAC International.

AOAC Official Method 981.10. (1995). Crude protein in meat. Block digestion method. AOAC International.

AOAC Official Method 991.36. (1995). Fat (crude) in meat and meat products. Solvent extraction (submersion) method. AOAC International.

AOAC Official Method 938.08. (1995). Ash of seafood. AOAC International.

ASTM D1434-82. (2003). Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting. Vol. 15.10, 196-207.

ASTM D618-00. (2003). Standard practice for conditioning plastics for testing. Vol. 8.01, 36-39.

ASTM D882-97. (2003). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Vol. 8.0, 163-171.

ASTM E96-00. (2003). Standard test methods for water vapor transmission of material. Vol. 4.06, 868-876.

ASTM D3418. (2003). Standard test method for transition temperatures and enthalpies of fusion and crystallization of polymers by differential scanning calorimetry. Vol 8.02, 66-71.

Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A. & Hara, K. (2008). Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chemistry* 108, 49-54.

Batista, I. (1999). Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. *European Food Research Technology* 210, 84-89.

Belitz, H., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). Food Chemistry. 4° ed. Springer, Berlin.

Beuchat, L. (1981). Microbial stability as affected by water activity. *Cereal Foods World* 26(7), 845-349.

Carvalho, R., Sobral, P., Thomazine, M., Habitante, A., Giménez, B., Gómez-Gillén, M. & Montero, P. (2008). Development of edible films based on differently processed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids* 22, 1117-1123.

Cifuentes, J.L., Torres-García, P. & Frías, M. (1997). El océano y sus recursos X. Pesquerías. 2° ed. Fondo de Cultura Económica, México.

Cuq, B., Aymard, C., Cuq, J.L. & Guilbert S. (1995). Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *Journal of Food Science* 60, 1369-1374.

Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.L. & Guilbert S. (1997). Selected functional properties of fish myofibrillar protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 622-626.

Damodaran, S. & Paraf, A. (1997). Food Proteins: an overview. Food Proteins and their Applications. Marcel Dekker Inc, USA.

Decagon Devices. (2003). Aqua Lab Medidor de actividad de agua. Manual de usuario. Decagon Devices Inc.

Embuscado, M. & Huber, K. (2009). Edible films and coatings for food applications. Springer, EUA.

Gennadios, A. & Weller, C. (1990). Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology* 44, 63-69.

Gontard, N., Guilbert, S. & Cuq, J. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science* 58 (1), 206-211.

Granados-Navarrete, S. & Martínez-García, C. (2010). Aprovechamiento de proteínas de pesquería del género *Ephinephelus* para la obtención de películas modificadas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Guzmán-Venegas, G. (2003). Efecto del tipo de agente plastificante en películas de quitosano. Tesis de Licenciatura, Escuela de Ingeniería, UDLA.

Hernández-Jardón, G. (2007). Proteínas de chía (*Salvia hispanica*): estudio para valorar sus propiedades como formadoras de películas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Hernández-Izquierdo, V. & Krochta, J. (2008). Termoplastic processing of proteins for film formation. *Journal of Food Science* 73 (2), 30-39.

Hong, S. & Krotcha, J. (2006). Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. *Journal of Food Engineering* 77, 739-745.

Iwata, K., Ishizaki, S., Handa, A. & Tanaka M. (2000). Preparation and characterization of edible films from fish water-soluble proteins. *Fisheries Science* 66, 372-378.

Jung, H. (2005). Innovations in Food Packaging. Food Science and Technology. International series, Elsevier. EUA.

Kader, A. (1989). Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Food Science and Nutrition* 28, 1-30.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. & Shahidi, F. (2010). Isolation and characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry* 119, 1519-1526.

Leerahawong, A., Arii, R., Tanaka, M. & Osako, K. (2011). Edible film from squid (*Todarodes pacificus*) mantle muscle. *Food Chemistry* 124, 177-182.

Limpisophon, K., Tanaka, M., Weng, W., Abe, S. & Osako, K. (2009). Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin. *Food Hydrocolloids* 23, 1993-2000.

Mardiah, A., Huda, N., Ahmad, R. & Ariffin, F. (2008). Potential of using stingrays (*Himantura, sp*) as raw material in making "fish flakes". Seminar Nasional Tahunan V Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan, 1-5.

McHugh, T. & Senesi, S. (2000). Apple wraps: a novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *Journal of Food Science* 65 (3), 480-485.

Oakland, H., Stokness, J., Remme, J., Kjerstad, M. & Synnes, M. (2005). Proximate composition, fatty acid and lipid class composition of the muscle from deep-sea teleosts and elasmobranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140, 437-443.

OECD (1993). Guidelines for the testing of chemicals. Ready biodegradability, 301A. Doc Die-away test. Organization for Economic Cooperation and Development. Francia, 1-18.

Olabarrieta, I., Gällstedt, M., Ispizua, I., Sarasua, JR. & Hedenqvist, M. (2006). Properties of aged montmorillonite-wheat gluten composite films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (4), 1283-1288.

Olivas, G., Gustavo, V. & Barbosa-Canovas, L. (2007). Alginate calcium films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *Food Science and Technology* 41, 359-366.

Parra, D., Tadini, C., Ponce, P. & Lugão, A. (2004). Mechanical properties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers* 58, 475-481.

Paschoalick, T., Garcia, F., Sobral, P. & Habitante, A. (2003). Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. *Food Hydrocolloids* 17, 419-427

Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-029-PESC-2004, Pesca Responsable de Tiburones y Rayas. Especificaciones para su aprovechamiento.

Puwastien, P., Judprasong, K., Kettwan, E., Vasanachitt, K., Nakngamanon, Y. & Bhattacharjee, L. (1999). Proximate composition of raw and cooked Thai fresh water and marine fish. *Journal of Food Composition and Analysis* 12, 9-16.

Rao, V., Adhikari, H. & Nair, P. (1995). Fatty acid composition of some Indian fish varieties. *ASEAN Food Journal* 10, 62-65.

Rosenthal, A. (2001). Textura de los alimentos. Medida y percepción. Acribia. Zaragoza, España.

Shiku, Y., Hamaguchi, P. & Tanaka, M. (2003). Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. *Fisheries Science* 69, 1026-1032.

Silva-Navarro, B. (2009). Desarrollo de biopelículas con actividad antioxidante y evaluación del factor de protección en alimentos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Siracusa, V., Pietro, R., Romani, S. & Dalla, M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology* 19, 634-643.

Sothomvit, R. & Pitak, N. (2007). Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. *Food Research International* 40, 365-370.

Sundaresan, K. & Ludescher, R. (2008). Molecular mobility and oxygen permeability in amorphous β -lactoglobulin films. *Food Hydrocolloids* 22, 403-413.

Sun-Lee, D., Yam, K. & Piergiovanni, L. (2008). Food packaging science and technology. CRC Press, EUA.

Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Food Science and Technology* 14, 71-78.

Tihminlioglu, F., Atik, I. & Özen, B. (2010). Water vapor and oxygen barrier performance of corn-zein coated polypropylene films. *Journal of Food Engineering* 96, 342-347.

CONAPESCA (2009) Anuario estadístico de acuicultura y pesca.
http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2009

(Consultado en Marzo de 2010)

FAO (2007) Departamento de pesca y acuicultura.
<http://www.fao.org/fishery/statistics/es> (Consultado en Marzo de 2010)