



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

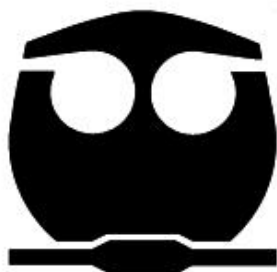
**DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS A
PARTIR DE PROTEÍNAS DE PIEL DE
TIBURÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

SERGIO URIEL JUÁREZ FLORES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2016

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: María de los Ángeles Valdivia López.

VOCAL: Lorena de Anda Aguilar.

SECRETARIO: Hiram Fernando Ramírez Cahero.

1er SUPLENTE: Alejandro Zavala Rivapalacios.

2do SUPLENTE: Gustavo Lozano Vázquez.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**LABORATORIO 322 Y 323, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

María de los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTE:

Sergio Uriel Juárez Flores

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
Objetivo general	2
Objetivos particulares.....	2
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	3
1.1 El tiburón en México.....	3
1.2 Producción Nacional y Consumo	4
1.3 Uso de desperdicios pesqueros	6
1.4 Colágeno.....	7
1.4.1 Colágeno en la pescadería	9
1.5 Empaques activos.....	9
1.5.1 Películas.....	10
1.5.2 Películas de proteína	11
1.5.3 Películas activas	12
1.5.4 Antioxidantes.....	13
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 Diagrama General.....	14
2.2 Obtención del concentrado proteínico.....	15
2.2.1 Caracterización química de la piel	15
2.2.2 Extracción del concentrado proteínico	15
2.3 Concentrado proteínico	17
2.3.1 Caracterización química del concentrado proteínico.....	17
2.3.2 Caracterización electroforética SDS-PAGE del Concentrado Proteínico	18
2.4 Elaboración de las películas a partir del concentrado proteínico	20
2.5 Elaboración de películas activas	20
2.6 Evaluación de la actividad antioxidante en las películas activas.....	21
2.6.1 Determinación de polifenoles	21
2.6.2 Capacidad secuestradora sobre el radical <i>1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)</i>	22
2.6.3 Capacidad secuestradora sobre el radical ácido <i>2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ABTS⁺</i>	23

2.7 Evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera de las películas Control y activas.....	24
2.7.1 Acondicionamiento y medición del espesor	24
2.8 Propiedades mecánicas	24
2.8.1 Fuerza de fractura a la extensión.....	26
2.8.2 Fuerza de fractura a la punción.....	26
2.9 Propiedades de Barrera	27
2.9.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	27
2.9.2 Permeabilidad al oxígeno (PO)	29
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1 Análisis químico composicional de la piel de cazón y del concentrado proteínico	32
3.2 Caracterización electroforética SDS-PAGE del concentrado proteínico .	33
3.3 Rendimiento de la extracción de proteína	36
3.4 Elaboración de películas a partir del extracto proteínico	37
3.5 Formación de películas activas	38
3.6 Capacidad secuestradora sobre el radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (Moure et al., 2000).....	41
3.7 Capacidad secuestradora sobre el radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ABTS ⁺	42
3.8 Evaluación de propiedades mecánicas	43
3.8.1 Fuerza de fractura a la extensión.....	43
3.8.2 Fuerza de fractura a la punción.....	47
3.9 Propiedades de barrera.....	49
3.9.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	49
3.9.2 Permeabilidad al oxígeno.....	51
3.10 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	53
CAPITULO IV CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	58

INTRODUCCIÓN

A la par del desarrollo de la industrialización en la producción de alimentos, se ha presentado un aumento en el uso de polímeros sintéticos para protegerlos. Los envases son utilizados para la conservación y comercialización de los alimentos, teniendo como función principal ofrecer protección frente a cambios físicos, químicos y contaminación microbiana. La utilización de polímeros sintéticos en los envases genera residuos que representan un gran problema ecológico a nivel mundial. Por tal motivo, con la finalidad de reducir las consecuencias ambientales (Arvanitoyannis et al., 1997), se han empleado polímeros a base material biodegradable como polisacáridos, proteínas y lípidos.

Actualmente se han desarrollado empaques alternativos utilizando películas de proteínas de piel de tiburón, las cuales presentan propiedades mecánicas que las hacen adecuadas para actuar como barreras protectoras alternativas frente a los plásticos sintéticos en buena parte de lenta biodegradación. Para la formación de estas películas es necesario tener un componente capaz de construir una matriz estructural con suficiente cohesión como son las moléculas de proteína, los polisacáridos y los lípidos, además de la adición de plastificantes como polioles y diversas sustancias que les brindan una mejor funcionalidad como barrera física y de permeabilidad.

En el presente trabajo se plantea la elaboración de películas a partir de proteínas de piel de cazón, que además presenten actividad antioxidante. La importancia principal de la elaboración de películas activas es la incorporación de antioxidantes, moléculas que poseen la capacidad de retardar la oxidación, y que en este caso son de origen natural. Estas películas tienen como principal función alargar la vida de anaquel de los alimentos debido a la reducción de la velocidad de la oxidación lipídica, la regulación de la concentración de oxígeno y el control de la permeabilidad al vapor de agua.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar películas activas a partir de un concentrado proteínico proveniente de la piel de pesquería de tiburón para utilizar como envase primario de sistemas alimentarios.

Objetivos particulares

- Elaborar películas activas a partir del concentrado proteínico mediante la adición de antioxidantes, por medio de una reacción enzimática.
- Determinar las propiedades mecánicas de las películas control y de las películas activas: fuerza de fractura en la extensión y fuerza de fractura a la punción.
- Evaluar las propiedades de barrera de las películas control y de las activas: permeabilidad al vapor de agua y permeabilidad al oxígeno.
- Evaluar el efecto antioxidante que presentan las películas activas.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 El tiburón en México

El cazón (*Galeorhinus galeus*) es un tiburón de talla media, con el cuerpo moderadamente alargado y esbelto, nariz con pequeños pliegos nasales, cinco aberturas branquiales, de las cuales las dos últimas están situadas sobre la base de la aleta pectoral. Ojos ovalados situados a los lados de la cabeza, boca grande y arqueada con pliegues labiales moderadamente largos. Habita en mares tropicales y templados, en aguas libres, arenosas o de fangos cercanos a la costa en zonas con profundidades de 20 a 200 m, durante los meses de verano migra solo o en pequeños grupos a las aguas litorales. Son vivíparos, paren sus crías después de 10 meses de gestación durante los meses de verano, las cuales miden unos 40 cm. En la **Figura 1.1** se muestra la morfología del cazón.

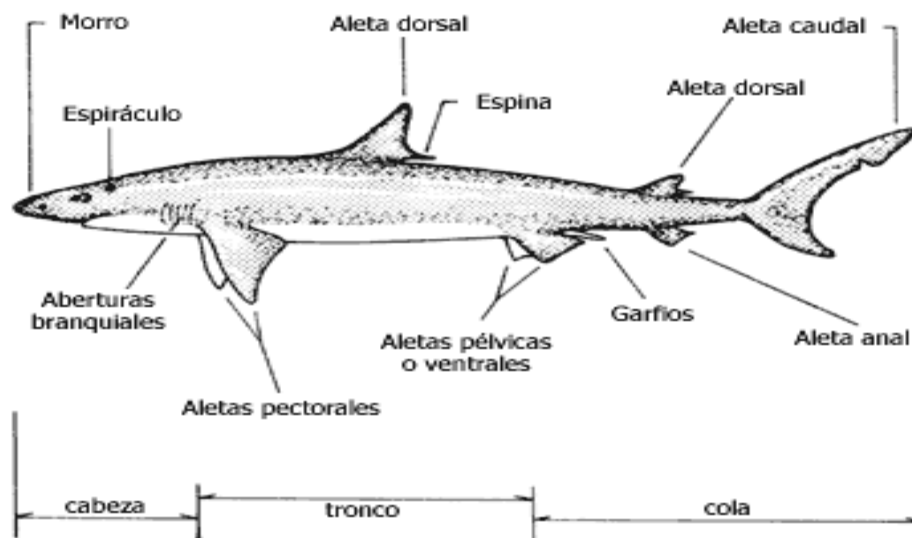


Figura 1.1 Morfología del cazón (*Galeorhinus galeus*) (Cifuentes et al., 1997).

Tanto en el Golfo de México como en el Océano Pacífico existen zonas de pesca de cazón donde la captura anual presenta una clara tendencia a la baja.

1.2 Producción Nacional y Consumo

Las entidades mexicanas con mayor producción anual de cazón se muestran en la **Figura 1.2**. Por su parte, en la **Figura 1.3** se muestra la producción de tiburón y cazón en la última década, observándose un decremento en su producción.



Figura 1. 2 Zonas costeras productoras de cazón en México (CONAPESCA, 2014).

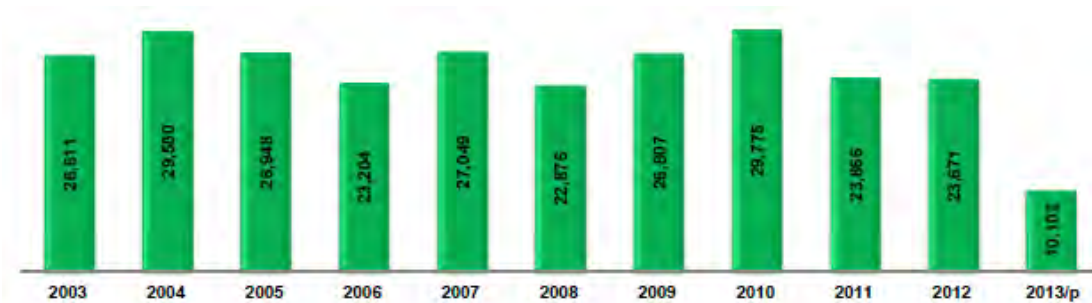


Figura 1.3 Serie histórica de producción de tiburón y cazón (peso en toneladas) (CONAPESCA, 2014).

En la **Figura 1.4** se muestra la participación porcentual de la producción de tiburón o cazón de las principales entidades de la República Mexicana.



Figura 1.4 Participación porcentual de la producción de tiburón y cazón de las principales entidades de la República Mexicana (CONAPESCA, 2014).

El cazón es una especie consumida frecuentemente en México, ya que, según un estudio de mercado realizado por CONAPESCA, se encuentra en el séptimo lugar de consumo de pescados y mariscos de la dieta de los mexicanos, sólo por debajo del camarón, mojarra, atún, sierra, pulpo y huachinango (CONAPESCA, 2014).



Figura 1.5 Cantidad porcentual de pescados o mariscos consumidos con mayor frecuencia a nivel nacional (CONAPESCA, 2014).

1.3 Uso de desperdicios pesqueros

El procesamiento de pescado genera enormes cantidades de desechos. Se estima que los residuos de procesamiento después del fileteado representan aproximadamente el 30% del peso total de pescado entre piel y huesos restantes del fileteado (Shahidi, 1994).

En México existe una gran problemática con respecto al manejo de desechos de pesquería. Una razón es la falta de una cultura de sustentabilidad para el manejo de residuos, la ausencia de políticas para el aprovechamiento integral de los productos pesqueros, lo que ocasiona que los residuos no reciban un manejo apropiado y sean desechados en el mar, playas, en tiraderos a cielo abierto o rellenos sanitarios, sin tratamiento previo. El problema se complica por las malas prácticas de manejo dentro de la cadena productiva e infraestructura inadecuada para su tratamiento y disposición (SEMARNAT, Simposium Internacional de Residuos, 2012).

Con la finalidad de utilizar estos residuos, se han desarrollado métodos para la conversión de desperdicio pesquero en productos para el consumo humano, alimentos de origen animal y otros productos de importancia comercial. Entre los usos actuales más importantes de los desechos de pescado están la producción de harina, la extracción de colágeno y antioxidantes. La utilización de desechos de pescado ayuda a eliminar aspectos nocivos ambientales y a mejorar la calidad en su procesamiento de pescado.

1.4 Colágeno

Es la familia de proteínas fibrosas que forma parte de la matriz extracelular del tejido conectivo; es la proteína más abundante de origen animal (Muyonga et al., 2004). El colágeno es un componente importante de todos los tejidos conectivos del cuerpo, se encuentra en la piel, huesos, tendones, cartílagos, vasos sanguíneos, dientes, córnea, pero en especial en los tejidos asociados a la piel y los huesos, también se encuentra en el tejido intersticial de prácticamente todos los órganos. En cada uno de estos tejidos tiene una estructura característica acorde con la función que desempeña, la cual es, principalmente, mantener su estructura e integridad (Gelse et al., 2003). Constituye aproximadamente del 25-30% de las proteínas de los organismos animales (Bea et al., 2008).

La unidad fundamental del colágeno es una molécula de estructura interna de triple hélice llamada tropocolágeno, la cual tiene un peso molecular de 285 kDa; está formado por tres cadenas polipeptídicas de igual tamaño, cada una de las cuales es una hélice levógira, que pueden ser de tipo α o β , dependiendo de las variaciones de aminoácidos. Las tres cadenas se enrollan para formar una triple hélice dextrógira con tres residuos de aminoácidos por vuelta, de aproximadamente 300 nm de longitud; la cadena tiene un peso molecular de aproximadamente 105 kDa. La molécula de colágeno se estabiliza por puentes de hidrógeno entre las cadenas y por las interacciones de los residuos de aminoácidos que se extienden radialmente con moléculas de agua, de ahí su alta resistencia y propiedades de retención de humedad (Gelse et al., 2003).

Existen 21 variantes de colágeno, denominadas tipo I-XIX (Bea et al., 2008). Por ejemplo; los tipos I, II, III y V son los colágenos fibrosos. El colágeno tipo I se encuentra en todos los tejidos conectivos, incluyendo huesos y piel, es la forma más abundante. Este es un heteropolímero de dos cadenas de α -1 y una cadena α -2, se compone de un tercio de glicina, no contiene triptófano o cisteína y la concentración de tirosina e histidina son muy bajas.

El tipo II es principalmente encontrado en el cartílago y en el humor vítreo, el tipo III es visto en la piel, pulmón y tejido vascular y el tipo IV está presente en las membranas basales.

Cada cadena polipeptídica de colágeno tiene cerca de 1000 residuos de aminoácidos. La composición que presentan es característica: glicina 33%, prolina de 12-20%, 4-hidroxi prolina 10% y 5-hidroxisilina, la cual generalmente en menor proporción, carece de cisteína y la proporción de triptófano es muy pequeña. Hay veinte aminoácidos diferentes en cada cadena α y se encuentran en un patrón específico repetido: (Glicina-X-Y), donde frecuentemente "X" es prolina y "Y" hidroxiprolina. Debido a que el interior de la superhélice dextrógira del tropocolágeno es muy compacto, el único residuo que puede situarse interiormente es la glicina. (Garrido et al., 2006).

En la **Figura 1.6** se representa la triple hélice de colágeno y se indica el tipo de cadena polipeptídica constituyente de los colágenos I, II y III.

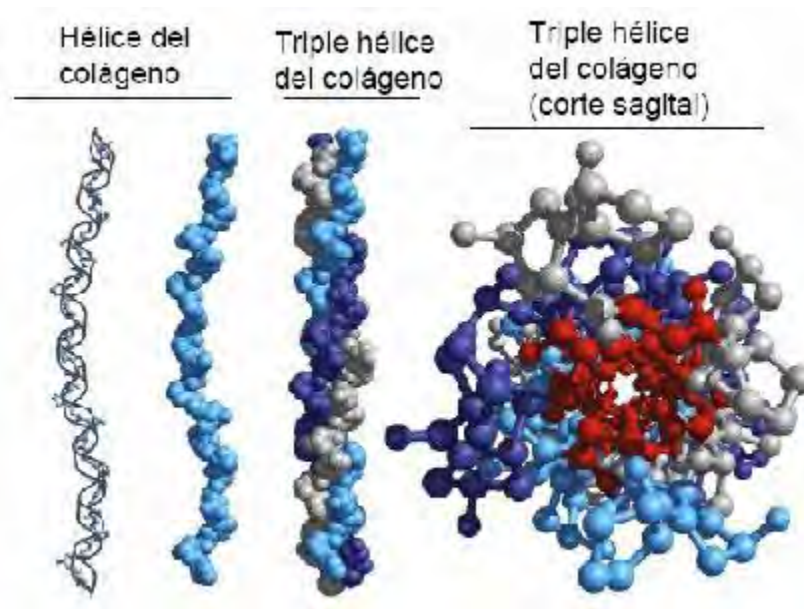


Figura 1.6 Representación de la estructura del colágeno.

1.4.1 Colágeno en la pescadería

En la mayoría de tipos de colágeno de pescado se han encontrado dos variantes de la cadena A, que normalmente son designados como α -1 y α -2. A pesar de tener aproximadamente el mismo peso molecular (95 Da), estas variantes pueden separarse por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) debido a su diferente afinidad por este surfactante. Las cadenas α -2 en presencia de SDS sufren una mayor desnaturalización en comparación con las cadenas α -1 (Ninan, 2009).

El colágeno de pescado varía ampliamente en su composición de aminoácidos. En particular, los niveles de prolina e hidroxiprolina varían significativamente entre especies de peces. La proporción de hidroxiprolina, depende de la temperatura ambiental en el hábitat del pescado y afecta la estabilidad térmica del colágeno. Los peces que viven en entornos fríos tienen menor contenido de ésta y presentan menor estabilidad térmica que aquellos que viven en entornos cálidos. El colágeno de peces de agua fría contiene niveles más altos de aminoácidos con grupo hidroxilo: serina y treonina (Ninan, 2009).

1.5 Empaques activos

Los alimentos con base lipídica se deterioran al sufrir diversas reacciones de degradación tanto por calentamiento como durante un almacenamiento prolongado y en condiciones no óptimas de almacenamiento. Los procesos principales de deterioro son las reacciones de oxidación, ésta es la forma de deterioro de los alimentos más importante luego de la producida por microorganismos.

Algunas formas de controlar y reducir la oxidación son la exclusión del oxígeno del alimento: envasado al vacío, el uso de materiales impermeables al oxígeno, el empleo de bajas temperaturas de almacenamiento, la protección frente a la luz o la incorporación de antioxidantes.

Con la finalidad de reducir la oxidación en los alimentos y el deterioro de los mismos, se ha desarrollado la tecnología de empaques activos, los cuales tienen como finalidad proteger los alimentos con un alto contenido de lípidos. Se llaman activos porque se les ha incorporado un antioxidante, mediante el cual los empaques activos son capaces de retrasar la oxidación (Jongjareonrak et al., 2008).

1.5.1 Películas

Una película o recubrimiento 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 transferencia de gases, vapores y solutos, ofreciendo también protección física. La formación de películas generalmente consiste de al menos dos componentes: un polímero de alto peso molecular (ejemplo, polisacáridos o proteínas) y un plastificante (Cuq et al., 1997). Un plastificante es definido como una molécula de bajo peso molecular, poco volátil y de naturaleza química similar a la del polímero que contribuye a la formación de la película. Un plastificante debe de ser miscible con el polímero (Bertuzzi, 2002).

La elaboración de películas requiere de al menos una molécula capaz de formar una matriz continua con una cohesión adecuada. La adición de un agente plastificante a las películas comestibles se requiere para superar la fragilidad provocada por las elevadas fuerzas intermoleculares entre las cadenas de polímeros. Los plastificantes reducen estas fuerzas y aumentan la movilidad de las cadenas poliméricas, por lo que se incrementa la flexibilidad y extensibilidad de la película.

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) y la permeabilidad al oxígeno (PO) son las propiedades de barrera más investigadas para conocer la capacidad de las películas para proteger los alimentos frente a factores ambientales (Damoradan y Paraf, 1997). Además de las propiedades de barrera, se deben considerar las propiedades mecánicas de las películas, a fin de

caracterizar la protección que brindan contra un abuso mecánico durante la manipulación y almacenamiento. Las pruebas de extensión y de punción proveen información acerca de la flexibilidad y elongación del material de empaque, propiedades que son resultado de la interacción cadena-cadena de los polímeros que conforman la película; si se incrementan estas interacciones se obtienen películas más fuertes, pero menos flexibles.

1.5.2 Películas de proteína

Las proteínas son polímeros altamente complejos y su diversidad funcional depende mayoritariamente de su estructura química. Por ejemplo, mientras otros biopolímeros, tales como los polisacáridos y ácidos nucleicos, están conformados por uno o pocos tipos de monómeros, las proteínas y los polipéptidos están conformados por combinaciones de 20 aminoácidos diferentes (19 α -aminoácidos y un iminoácido) unidos mediante enlaces amida denominados enlaces peptídicos (Damodaran y Paraf, 1997).

Entre las proteínas fibrosas, el colágeno y la gelatina han tenido mayor importancia en la producción de películas (Damodaran y Paraf, 1997). Estas proteínas han sido normalmente extraídas de desperdicios generados del sacrificio animal (Cuq et al., 1997). Las moléculas de proteína fibrosa extensas están asociadas fuertemente unas con otras generalmente mediante enlaces de hidrogeno. Las proteínas globulares se pliegan en estructuras esféricas complejas unidas entre sí por la combinación de interacciones de hidrogeno, iónica, hidrofóbicas y covalentes tales como los puentes de disulfuro (Scope, 1994). Sus propiedades físicas y químicas dependen de la cantidad e identidad de los aminoácidos constituyentes y de su ubicación dentro de las cadenas de proteína.

Las películas de proteína se forman generalmente a partir de soluciones de proteína solubilizada o dispersada en disolventes o acarreadores volátiles. Los solventes o acarreadores volátiles son por lo general agua, etanol o mezclas etanol/agua en diferentes proporciones (Kester y Fennema, 1986).

Las proteínas generalmente se desnaturalizan por acción del calor, ácido, base y/o solvente con el objetivo de obtener una estructura extendida, la cual permite la formación de películas. Una vez extendidas las cadenas de proteína su asociación se puede dar mediante puentes de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes. La interacción cadena-cadena que produce una película cohesiva se ve afectada por el grado de extensión de la cadena proteínica, por la naturaleza de aminoácidos y la estructura primaria.

La distribución uniforme de los grupos polares, hidrofóbicos y puentes disulfuro entre las cadenas de proteína favorecen una mejor interacción. Mientras más fuertes sean las interacciones a lo largo de la cadena se tendrá como resultado una película más fuerte pero menos flexible y menos permeable a gases, vapor de agua y líquidos (Kester y Fennema, 1986).

1.5.3 Películas activas

Una película activa es un sistema en el que el empaque, el producto y el medio interactúan para prolongar la vida de anaquel, aseguran la inocuidad y las propiedades sensoriales, las cuales determinan la calidad del producto. Hay básicamente dos tipos:

- Empaque antimicrobiano, tiene como objetivo aplicar sistemas de liberación en forma controlada de un agente antimicrobiano de la película al alimento (Huit et al., 2006).
- Empaque activo, tiene como objetivo utilizar compuestos que remueven el oxígeno, absorban la humedad y generen CO₂, y compuestos con acción antioxidante que estabilizan los radicales libres producidos durante la oxidación lipídica.

En la actualidad, la tecnología de empaques activos utilizada para la alimentación, incluye removedores de oxígeno, que son sustancias capaces de eliminar el oxígeno presente entre el envase y el producto durante su

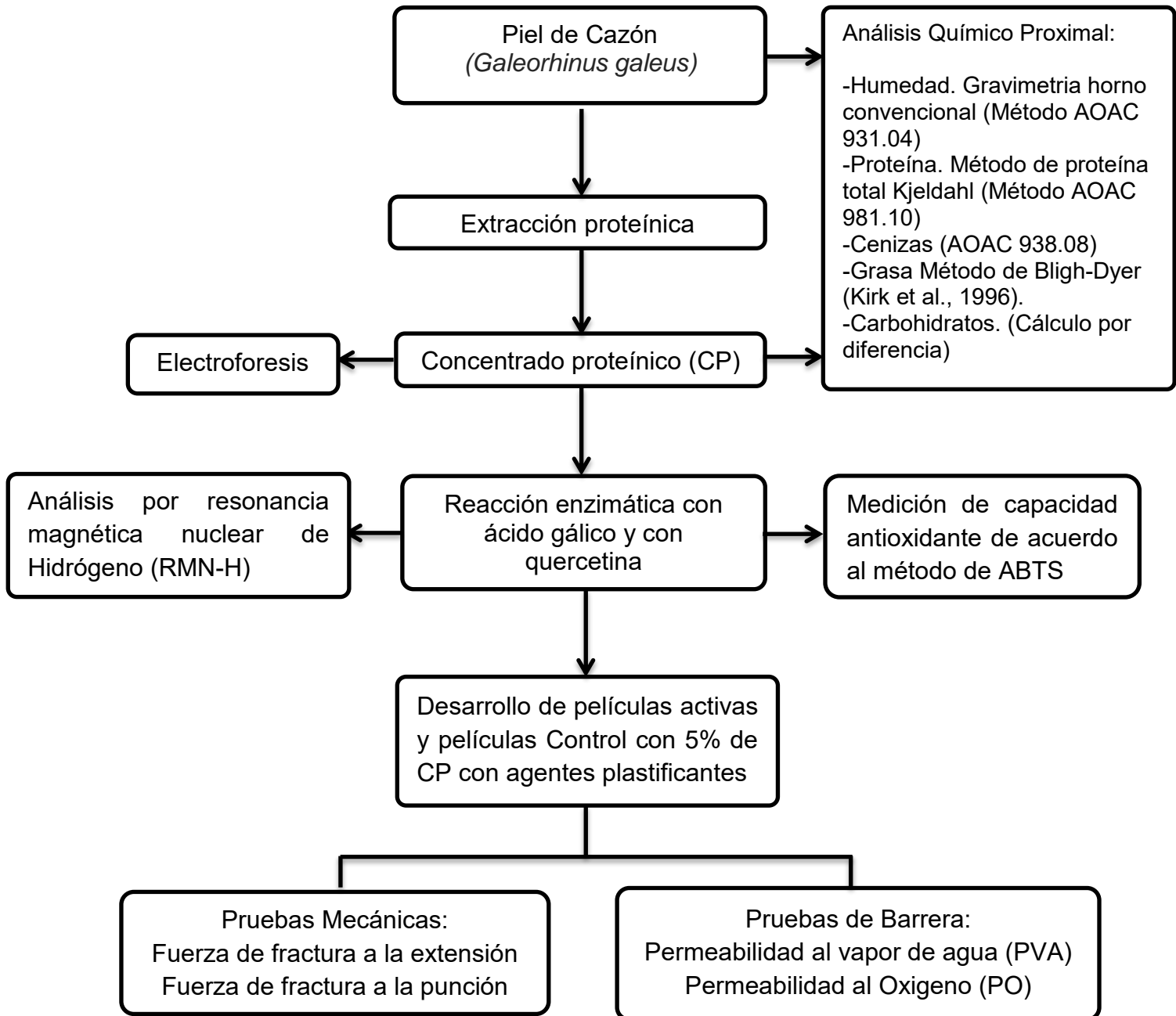
almacenamiento (Charles et al., 2006). Puesto que la oxidación inicia en general en la superficie de los alimentos, la incorporación de antioxidantes en los empaques representa una manera prometedora de proteger a los alimentos de la oxidación de lípidos (Jongjareonrak et al., 2008)

1.5.4 Antioxidantes

Un antioxidante es una sustancia que cuando se presenta en bajas cantidades comparada con el sustrato oxidable, previene significativamente la oxidación de dicho sustrato. Durante el almacenamiento de grasas y aceites, así como de otros alimentos que contienen grasas, la oxidación lipídica es la mayor causa de deterioro de calidad de los alimentos e implica el uso de diversos antioxidantes. Existen cientos de compuestos tanto naturales como sintéticos, con propiedades antioxidantes. No obstante, su empleo en alimentos requiere de ciertas condiciones, siendo el más importante la inocuidad (Belitz et al., 2009). En la formación de películas activas el antioxidante se debe unir a la cadena proteínica por medio de un enlace covalente, reacción que se lleva a cabo con la participación de la enzima peroxidasa, la cual forma un radical libre en una o varias partes de la proteína y otro en la molécula del antioxidante, los cuales se estabilizan mediante una reacción de terminación de radicales libres.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diagrama General



2.2 Obtención del concentrado proteínico

2.2.1 Caracterización química de la piel

La piel de cazón se obtuvo del mercado de pescado “La Nueva Viga” Ubicado al Oriente de la Ciudad de México.

Se realizó un Análisis Químico Proximal (AQP). Cada determinación se realizó a tres lotes por triplicado, empleando los siguientes métodos:

- Humedad (AOAC 931.04)
- Proteína (AOAC 981.10, 1995; utilizando el factor 6.25)
- Cenizas (AOAC 938.08, 1995)
- Grasa, método Bligh y Dyer (Kirk et al., 1996).

2.2.2 Extracción del concentrado proteínico

La extracción de proteína de la piel de cazón se realizó de acuerdo con el procedimiento del método de extracción selectiva para colágeno, llevado a cabo por Limpisophon et al. (2009), con algunas modificaciones.

- Se pesó 1 kg de piel de cazón, y se realizaron lavados a la piel para eliminar el exceso de materia inorgánica, posteriormente se troceó en 5x3 cm aproximadamente (**Figura 2.1**).



Figura 2.1. Troceado y lavado de la piel de cazón.

•Posteriormente la piel se sumergió en una solución alcalina con agitación constante. Después en una solución ácida en proporción 1:10 (p/v) con agitación constante. A continuación, la piel se sometió a un tratamiento térmico en agitación constante. En la **Figura 2.2** se muestra el aparato empleado para realizar la extracción en medio básico y ácido.



Figura 2.2 Extracción proteínica en medio básico.

▪Para realizar la precipitación de la proteína, se agregó a la parte acuosa hexametáfosfato de sodio (NaPO_3)₆ al 10% y mL de HCl 2 M por cada 100 mL de extracto, posteriormente se dejó reposar por un periodo de 12 horas para permitir la precipitación de la proteína.

En la **Figura 2.3** se muestra la precipitación del concentrado proteínico (CP).



Figura 2.3 Precipitación de la proteína con hexametáfosfato de sodio (NaPO_3)₆ al 10%.

2.3 Concentrado proteínico

2.3.1 Caracterización química del concentrado proteínico

Una vez obtenido el concentrado de proteína se le realizaron las siguientes determinaciones:

- Humedad (AOAC 931.04)
- Proteína (AOAC 981.10, 1995; utilizando el factor 6.25)
- Cenizas (AOAC 938.08, 1995)
- Grasa, método Bligh y Dyer (1959).

2.3.2 Caracterización electroforética SDS-PAGE del Concentrado Proteínico

Se determinó el intervalo de pesos moleculares de la proteína por medio de una electroforesis en gel SDS-PAGE. En las **Tablas 2.1, 2.2 y 2.3** se indica la concentración respectiva que contiene el gel de las soluciones I, II y III.

Solución I	
Componente	100 mL
Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g
Agua	Bp-100 mL

Tabla 2.1 Cantidades utilizadas para preparar la solución I.

Solución II	
Componente	100 mL
Tris-HCl	9.075 g
SDS	0.2 g
Agua	Bp-100 mL

Tabla 2.2 Cantidades utilizadas para preparar la solución II.

Solución III	
Componente	100 mL
Tris-HCl	3.03 g
SDS	0.2 g
Agua	Bp-100 mL

Tabla 2.3 Cantidades utilizadas para preparar la solución III.

Las concentraciones utilizadas fueron 10% de gel separador (inferior) y 5% de gel concentrador (arriba). **En la Tabla 2.4** se indican las cantidades.

Tabla 2.4 Cantidades utilizadas de cada componente para la formación de dos geles de placas de 1 mm.

Componente	Gel Concentrador 5%	Gel Separador 10%
Solución I	530 μ L	3.7 mL
Solución II	-----	5.5 mL
Solución III	2500 μ L	-----
Agua	1615 μ L	1.8 mL
10% APS	50 μ L	50 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L

APS: Persulfato de amonio.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina.

Se tomó una muestra aproximadamente de 0.05 g de concentrado proteínico, la cual se disolvió en 1 mL de una solución para desnaturalizar proteínas, buffer IEF, que es una mezcla de detergentes y proteasas, posteriormente se centrifugó y se tomaron 10 μ L del sobrenadante (30 mg/mL) y se colocaron en un tubo Eppendorf, se añadieron 900 μ L del buffer de muestra y 10 μ L de β -mercaptoetanol. Posteriormente, se elaboró un gel de acrilamida para electroforesis (PAGE) en cuyos pozos se colocó un volumen de 5 μ L de un marcador Bio-Rad de amplio rango: 15-240 kDa. En uno de los pozos se colocaron 10 μ L de muestra y se dejaron correr en una celda para electroforesis marca Bio-Rad a 120 Volts hasta alcanzar todo el frente de carga. Posteriormente los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie durante 12 horas que se mantuvo en agitación constante, posteriormente se destiñeron con agua destilada también en agitación constante hasta observar bandas claras. Los geles destiñidos se escanearon con un densitómetro marca Bio-Rad, y se utilizó el programa para la determinación de los pesos moleculares de las bandas detectadas.

2.4 Elaboración de las películas a partir del concentrado proteínico

La elaboración de las películas se realizó de acuerdo con el procedimiento llevado a cabo por Limpisophon et al. (2009), con modificaciones en temperatura y tiempos de extracción alcalina, ácida y en temperatura.

Se colocó una parte del concentrado de proteína (pellet) en un vaso con agua destilada, de tal forma que la concentración de proteína fuese 5% (m/v); se colocó en baño de agua caliente con agitación constante, se agregó NaOH 1 M hasta alcanzar un pH de 10.5 ± 0.5 para la disolución total del concentrado proteínico. Se agregó como plastificante una mezcla en proporción 50:50 de sorbitol y glicerol al 9% (v/v) con respecto a la cantidad de proteína del extracto obtenido y se agitó hasta su completa disolución. Una vez disuelto el concentrado proteínico y los plastificantes, se ajustó de nuevo el pH de la solución a 10.5 ± 0.5 con NaOH 1 M, se colocó de nuevo en baño de agua caliente, y se vació en un molde circular de 10 cm de diámetro, se dejó secar a temperatura ambiente aproximadamente durante 3 días, para después despegar las películas manualmente.

2.5 Elaboración de películas activas

Una vez elaboradas las películas de extracto proteínico con plastificante (películas Control), se desarrollaron las películas activas. Para la obtención de estas últimas se emplearon dos metodologías, en la primera la proteína se disolvió con la mezcla de plastificantes, mientras que el antioxidante se unió a la proteína con la participación de la enzima; y en la segunda se añadió el antioxidante en una concentración de 200 ppm a la mezcla de proteína y plastificante. Para la unión del antioxidante a la proteína vía la reacción enzimática, se colocó una parte del concentrado de proteína (pellet) en un vaso con 34 mL de agua destilada, de tal forma que la concentración de proteína fuese 5% (m/v), posteriormente se colocó en un baño de agua caliente con agitación constante y se agregó NaOH 1 M hasta alcanzar un pH de 10.5 ± 0.5 para la total disolución del concentrado proteínico. Se agregó

como plastificante una mezcla de sorbitol y glicerol en proporción 50:50, de 9% (v/v) con respecto a la cantidad de proteína en el extracto proteínico y se agitó hasta su disolución completa, posteriormente se disolvió 1 mg de antioxidante en 6 mL de EtOH. Los antioxidantes fueron quercetina y ácido gálico; se disolvió 0.1 mg de enzima en 1 mL de agua. Los antioxidantes y la enzima se colocaron en un matraz de bola que contenía la mezcla acuosa de proteína y los plastificantes. La reacción inició al agregar 30 μ L de H₂O₂ (5%) cada 10 minutos durante aproximadamente 1 hora. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vació en un molde circular de 10 cm de diámetro, se dejó secar a temperatura ambiente aproximadamente durante 3 días, para después despegar las películas manualmente.

Para la unión del antioxidante con la proteína por la vía no enzimática a la proteína mezclada con los plastificantes, se agregó y mezcló el antioxidante *tert*-butilhidroquinona (TBHQ) en una concentración de 200 ppm el cual estaba previamente disuelto en etanol, posteriormente se vació en un molde circular de 10 cm de diámetro, se dejó secar a temperatura ambiente aproximadamente por 3 días, las películas se despegaron manualmente.

2.6 Evaluación de la actividad antioxidante en las películas activas

2.6.1 Determinación de polifenoles

Con el fin de conocer la cantidad de polifenoles, dato necesario para saber cuánta muestra se utilizaría para la determinación de la capacidad secuestradora de los radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2'-azino-*bis*-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). De acuerdo con (Matthäus 2002), se realizó la determinación de polifenoles al extracto proteínico unido con antioxidante por medio de reacción enzimática y también a la película a la que se le adicionó el antioxidante.

La metodología fue la siguiente:

1. Se tomaron 40 μL de muestra y se colocaron en tubos de ensayo.
2. Se adicionaron 3.16 mL de agua, 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló e incubó de 1 a 8 minutos a temperatura ambiente.
3. Se adicionaron 600 μL de una solución de Na_2CO_3 al 2%, posteriormente se mezcló bien e incubó por 2 horas a temperatura ambiente.
4. Se leyó en un espectrofotómetro (BeakmanDU-65) a una longitud de onda de 765 nm

* La concentración de polifenoles se calculó a partir de una curva patrón de ácido gálico.

2.6.2 Capacidad secuestradora sobre el radical *1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH)*

Como informa Moure et al. (2000), este método se basa en la reducción del radical DPPH por un antioxidante mediante la donación de un hidrógeno o un electrón para formar una molécula diamagnética estable, lo que se ve reflejado en un decremento en la absorbancia a 515 nm y un cambio de coloración de violeta a amarillo (Matthäus, 2002). Para este propósito, en una celda de cuarzo se colocaron 2 mL de una solución $3.6 \times 10^{-5}\text{M}$ de DPPH, a la cual se agregaron 50 μL del extracto proteínico con antioxidante estandarizado a 200 ppm, se midió el decremento en la absorbancia a 515 nm, el cual fue registrado cada minuto durante 16 minutos.

Los resultados se expresaron en porcentaje de capacidad secuestradora sobre el radical DPPH y se compararon con la misma capacidad que presentó el antioxidante comercial Trolox.

El porcentaje de la capacidad secuestradora sobre el radical DPPH se calculó como lo muestra **la fórmula 2.1:**

$$\%CS_{DPPH} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=16}}{Abs_{t=0}} \times 100$$

Donde

%CS= Capacidad secuestrante

Abs= Absorbancia a 515nm

Fórmula 2.1 %Capacidad Secuestradora de DPPH.

2.6.3 Capacidad secuestradora sobre el radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) ABTS⁺.

De acuerdo con Kuskoski et al. (2005), la capacidad secuestradora es un método de proyección de la actividad antioxidante aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos. La preformación del radical monocatiónico del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) (ABTS⁺) transcurre por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de antioxidantes. El radical ABTS⁺, a diferencia del DPPH, se puede generar tras una reacción química, enzimática o electroquímica. En este caso, el ABTS⁺ se obtuvo mediante una reacción química en la que 10 mL de una solución ABTS 7 mM se hicieron reaccionar con 5 mL de persulfato de potasio 2.45 mM, la reacción se dejó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical se diluyó con etanol hasta generar una absorbancia de 0.7±0.1 a 754 nm (Kuskoski et al., 2005), posteriormente se agregaron 80 µL del extracto proteínico con antioxidante, así como del estándar Trolox en concentración de 200 ppm y se midió el decremento de absorbancia cada minuto durante 6 minutos, o hasta alcanzar un valor constante. El porcentaje de la capacidad secuestradora sobre el radical ABTS se calculó mediante la **fórmula 2.2**.

$$\%CS_{ABTS} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=6 \text{ min}}}{Abs_{t=0}} \times 100$$

Donde:

%CS= Capacidad secuestradora

Abs= Absorbancia a 754 nm

Fórmula 2.2 %Capacidad secuestradora de ABTS⁺.

2.7 Evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera de las películas Control y activas

2.7.1 Acondicionamiento y medición del espesor

Antes de realizar las pruebas mecánicas y de barrera, las películas obtenidas se acondicionaron siguiendo el método ASTM D618-00 (2003); por 48 h se colocaron en un desecador con una solución saturada de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, para mantenerlas en condiciones estándar de humedad relativa (HR) y temperatura constante ($60 \pm 5\%$ HR y $24 \pm 3^\circ C$), por último, se midió la temperatura y humedad relativa con un termohigrómetro (Oakton, Japón). El espesor de las películas fue medido con un micrómetro análogo marca Mitotuyo (Japón) en diferentes posiciones aleatorias del perímetro y del centro de las películas. Para el cálculo de las propiedades de barrera y mecánicas se tomó en cuenta el valor del espesor.

2.8 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se evaluaron con un equipo de pruebas mecánicas y de textura SINTECH 1/S (MTS, EUA.), el cual se encuentra conectado a una computadora que proporciona información en tiempo real del comportamiento de las películas. La celda de carga utilizada fue de 500 N, teniendo como variación la abrazadera utilizada. Las pruebas mecánicas de extensión y punción se realizaron conforme al procedimiento estándar (ASTM D882-97 2003) aplicado para este tipo de materiales.

En la **Figura 2.4** se muestra un gráfico típico obtenido en pruebas mecánicas de extensión y punción.

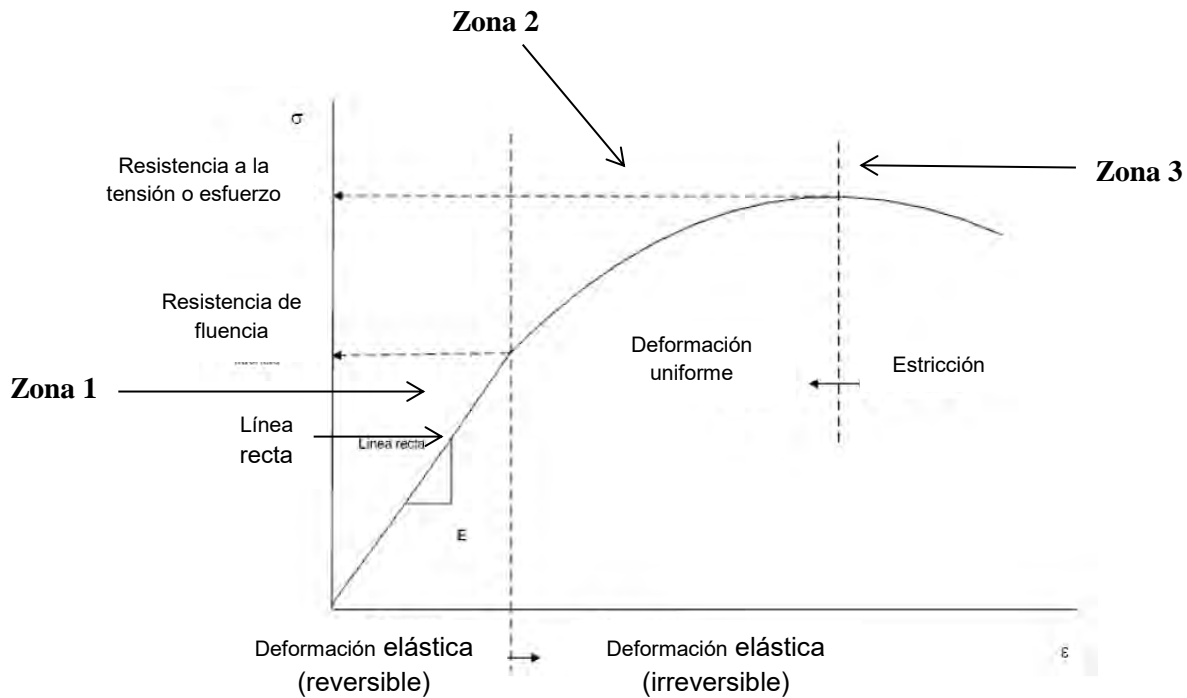


Figura 2.4 Gráfico típico obtenido en las pruebas mecánicas.

*La zona 1 o zona inicial es una línea recta con una pendiente positiva, llamada Módulo de Young. Debido a que el esfuerzo y la deformación relativa son proporcionales en esta zona la película puede regresar a su forma original.

*Zona 2, en esta zona la deformación no es lineal e indica hasta qué punto la película se puede seguir estirando sin romperse y sin regresar a su forma original.

*En la zona 3 o punto de ruptura la película no resiste más la fuerza aplicada y se rompe. En este punto el material muestra el esfuerzo máximo verdadero que puede soportar, que es la medida en la que un material puede estirarse antes del quiebre, es decir, el punto máximo del gráfico.

2.8.1 Fuerza de fractura a la extensión

Para esta prueba las películas se cortaron en tiras de 8 cm de largo x 1 cm de ancho, mismas que se sujetaron de los extremos por medio de unas mordazas conectadas al equipo con una separación entre ellas de 5 cm, posteriormente se procedió a estirarlas a una velocidad constante de 500 mm/s. Durante el estiramiento el equipo registró la fuerza necesaria para romper o fracturar la tira (fuerza de fractura a la extensión). El equipo, de la marca SINTECH 1/S (MTS, EUA), se muestra en la **Figura 2.5**. Además, en la **Figura 2.6** se muestra el mismo equipo realizando una prueba de fractura a la extensión.



Figura 2.5 Equipo SINTECH 1/S (MTS, EUA).



Figura 2.6 Prueba de fractura a la extensión.

2.8.2 Fuerza de fractura a la punción

En esta prueba las películas fueron cortadas en círculos de aproximadamente 10 cm de diámetro y se colocaron entre dos placas circulares conectadas al equipo, las cuales tenían un orificio central. Posteriormente, una punta lisa de 13 mm de diámetro comenzó a descender perpendicularmente a una velocidad constante de 250 mm/min y el equipo fue registrando la fuerza necesaria para lograr penetrar o fracturar la película, conocida como fuerza de fractura a la punción, cuyo equipo se muestra en la

Figura 2.7. Las placas empleadas para realizar la prueba se exponen en la **Figura 2.8.**

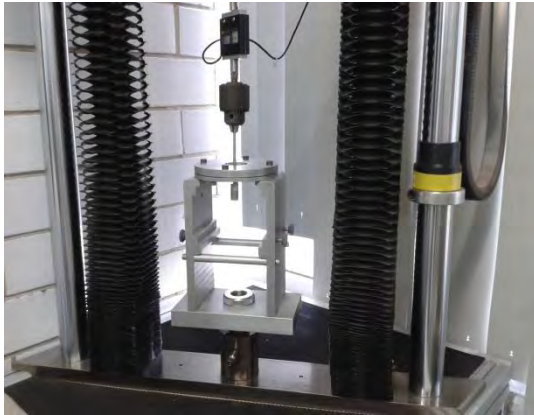


Figura 2.7 Prueba de fractura a la punción.



Figura 2.8 Placas circulares para la prueba de fractura a la punción.

2.9 Propiedades de Barrera

2.9.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua de las películas control y activas se determinó de acuerdo con el método gravimétrico ASTM E96-10 (2010), que consiste en determinar la cantidad de agua que pasa a través de la película y que es absorbida por un desecante (CaCl_2 anhidro) en un tiempo determinado.

Para realizar esta prueba se utilizaron celdas de acrílico con un diámetro de 5 cm que contenían una cantidad conocida de CaCl_2 anhidro (35 g aproximadamente) secado a peso constante. Las películas fueron colocadas entre el anillo y la boca de la celda colocando cuatro tornillos alrededor de la celda, lo que permitió sellarla herméticamente por medio de una capa de silicón. Las celdas se colocaron en un desecador en condiciones estándar de humedad relativa (HR) de $45 \pm 5\%$, controlada por la presencia de una solución saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, parámetros medidos con un termohigrómetro.

Se realizó una evaluación a cinco películas cada 24 horas por un periodo de 5 días, haciendo un registro del aumento de peso de cada celda, la HR y la temperatura.



Figura 2.9 Películas colocadas en las celdas con el desecante CaCl_2 anhidro.

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se obtiene de la siguiente manera:

a) Transmisión de vapor de agua ($\text{g/s}\cdot\text{m}^2$)

$$\text{TVA} = \frac{G/t}{A}$$

G = Ganancia de peso durante la semana de prueba (g)

t = Tiempo de duración de la prueba (horas)

A = Área de película (m^2)

b) Permeanza ($\text{g/s}\cdot\text{m}^2\cdot\text{Pa}$)

$$\text{Permeanza} = \frac{\text{TVA}}{S \cdot (R1 - R2)}$$

S = Presión de vapor de agua (Pa) a la temperatura de la prueba.

R1 = Porcentaje de humedad relativa.

R2 = Humedad relativa de la precipitación del vapor de agua.

c) Permeabilidad al vapor de agua. (g/Pa*s*m)

PVA = Permeanza * espesor (medido para cada película)

2.9.2 Permeabilidad al oxígeno (PO)

La permeabilidad al oxígeno se determinó por el método volumétrico ASTM D1434-82 (2009), con el que se puede obtener el coeficiente de transmisión de oxígeno siguiendo el cambio del volumen generado por la transferencia del gas a través de la película con respecto al tiempo. La prueba se realizó colocando una película con un diámetro de 10 cm en la parte inferior de una celda de transmisión (CSI-135 Permeability CellTester), la cual previamente se engrasó para una mayor adherencia de la película a la celda, se colocaron dos piezas de papel filtro en la parte superior de la celda y se sellaron los compartimentos de la misma para así mantener las condiciones de hermeticidad con ayuda de cuatro tornillos colocados de manera simétrica. Una vez colocada la celda, se procedió a purgarla de aire y saturarla con oxígeno (extracto seco 99.5%) por 3 minutos, dejando abiertas las válvulas (válvula de salida de baja presión, de alta presión y de capilar). Al transcurrir el tiempo de purga se cerró la válvula de alta presión y después de 30 s se cerró la válvula del capilar y se colocó el capilar, mismo que contenía 5 µL de 4-metil-2-pentanona, cuando éste se encontró en equilibrio se cerró la válvula de salida de baja presión, ajustando la presión manométrica de prueba a 10 psi (68 kPa). En estas condiciones se dejó operar en un lapso de 24 horas hasta obtener datos de desplazamiento del líquido, lo que indica la existencia de permeabilidad del oxígeno.

La permeabilidad al oxígeno se obtiene de la siguiente manera:

a) Velocidad de transmisión de gas (GTR, mol/m²*s)

$$GTR = \frac{(10^{-6})(\rho_0)(Vr)}{(A)(R)(T)}$$

Donde:

A = área de transmisión del espécimen (mm²)

P0 = Presión ambiental (Pa)

R = constante universal del gas ideal (8.314X10³ L*Pa/mol*K)

T = temperatura ambiente (K)

Vr = volumen del líquido en el capilar (mm³)

b) Permeanza: (mol/m²*S*kPa)

$$P = \frac{GTR}{\Delta P}$$

ΔP= Diferencia de presión parcial de gas en ambos lados de la película (kPa)

c) Permeabilidad al oxígeno (cm³*μm/m²*d*kPa)

PO = P*espesor (medido para cada película)

En la **Figura 2.10** se muestra el esquema del equipo de transmisión volumétrica de gas con el que se determinó la permeabilidad al oxígeno de las películas.

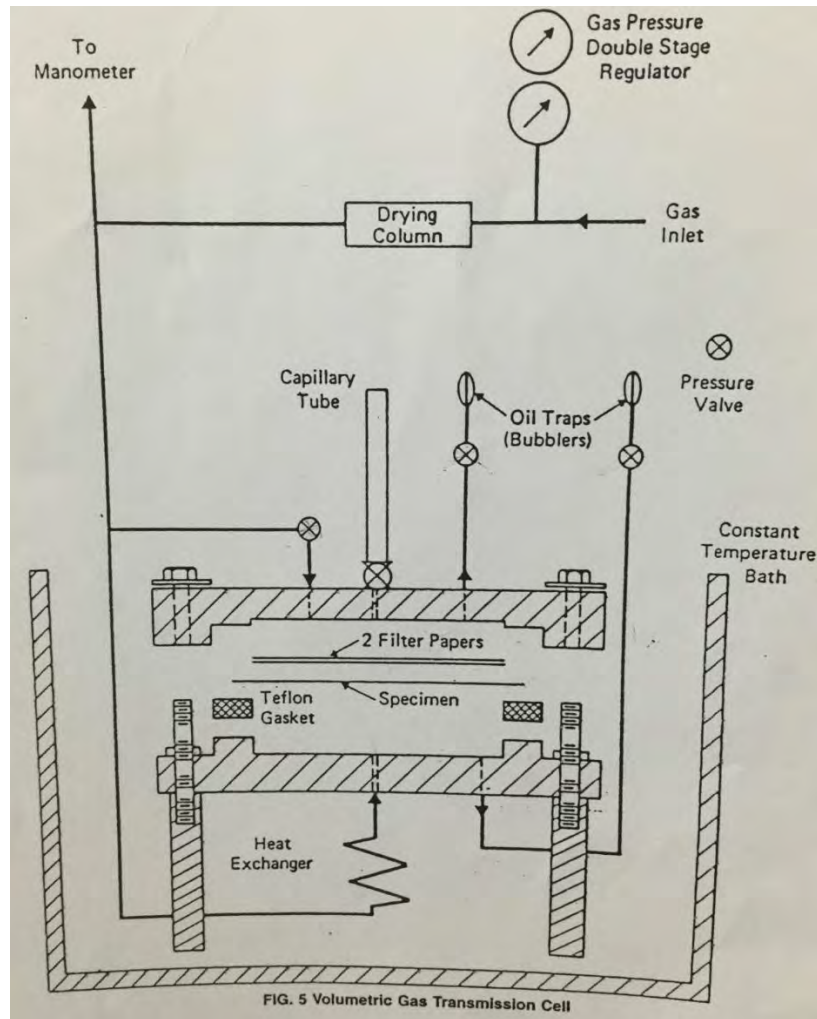


Figura 2.10 Esquema del equipo de transmisión volumétrica de gas.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis químico composicional de la piel de cazón y del concentrado proteínico

Con la finalidad de conocer el perfil composicional de la piel de tiburón, se le determinó humedad, proteína, grasa y cenizas, realizando la determinación por triplicado a cada uno de los lotes. En la **Tabla 3.1** se muestran los resultados del análisis químico. Se observa que el componente mayoritario en los tres lotes es el agua y el componente minoritario es la grasa.

Tabla 3.1. Análisis químico de la piel de tiburón (g/100 g piel).

Determinación	%Humedad	% Proteína	% Grasa	% Cenizas	% Carbohidratos
Lote 1	62.29	30.07	0.187	3.011	4.442
Lote 2	60.02	33.59	0.149	3.07	3.17
Lote 3	61.32	31.65	0.161	3.08	3.789
Promedio	61.21±1.138	31.77±1.763	0.165±0.019	3.053±0.037	3.800±0.636

El análisis composicional muestra que el componente mayoritario es la humedad, con un 61.21±1.138%, contenido similar al que informa Castañeda (2010) de 61.8%, y Granados (2011), de 65.21%, para la piel de Cazón. La proteína es el segundo componente mayoritario. El contenido de proteína cruda total es de 31.77±1.76 y fue determinado por medio del método de Kjeldhal utilizando el factor de conversión estándar 6.25.

Existe diferencia entre los lotes de piel, ya que la composición química puede variar entre individuos de la misma especie debido a la edad, sexo, medio ambiente, alimentación y época del año en que es pescado, sin embargo, no se observó variación en la obtención del concentrado proteínico ni en los parámetros medidos a las películas.

La extracción de proteína de la piel de cazón se realizó de acuerdo con el procedimiento del método de extracción selectivo para colágeno, llevado a cabo por Limpisophon et al. (2009), con algunas modificaciones.

En la **Tabla 3.2** se observan los resultados del perfil composicional del concentrado de proteína. El componente mayoritario fue la humedad y componente minoritario la grasa.

Tabla. 3.2 Análisis químico del concentrado de proteína (g/100 g pellet).

Determinación	% Humedad	% Proteína	% Grasa	% Cenizas	%Carbohidratos
Lote 1	75.141	19.54	0.026	2.08	3.213
Lote 2	75.827	19.16	0.023	2.17	2.82
Lote 3	76.212	18.692	0.03	1.928	3.138
Promedio	75.726±0.542	19.130±0.424	0.0263 ± 0.003	2.059 ± 0.122	3.057 ± 0.208

El concentrado presentó un contenido de proteína de 19.130±0.424%. Los extractos proteínicos presentaron un nivel bajo de cenizas, inferior al máximo reportado de 2,6% (Ninnan, 2009). Así, al utilizar este método de extracción se espera obtener una gelatina de alta calidad, ya que los valores de impurezas (cenizas) se encuentran por debajo del contenido máximo recomendado, que es de 2.6% (Jones, 1977).

3.2 Caracterización electroforética SDS-PAGE del concentrado proteínico

Con la finalidad de conocer el intervalo de pesos moleculares de las proteínas del concentrado proteínico, se realizó una electroforesis por medio de la técnica SDS-PAGE. Se prepararon dos geles de acrilamida al 12.5% para separar proteínas de alto, medio y bajo peso molecular, utilizando como referencia un marcador de amplio rango de 6-200 kDa.

Las cadenas α colágeno presentan un peso aproximado de 100 kDa y los componentes β colágeno tienen un peso de alrededor de 200 kDa, típicas del colágeno de tipo I (Ninnan, 2009). Se denomina componente β cuando dos hebras simples de colágeno (unidades α) forman enlaces cruzados entre sí de tipo covalente (Fennema, 2000). Limpisophon et al. (2009) también determinó estas dos bandas al caracterizar gelatina extraída de tiburón azul (*Prionace glauca*). En la **Figura 3.1** y la **Tabla 3.3** se muestran las bandas y los pesos moleculares obtenidos en la caracterización electroforética SDS-PAGE del concentrado proteínico.

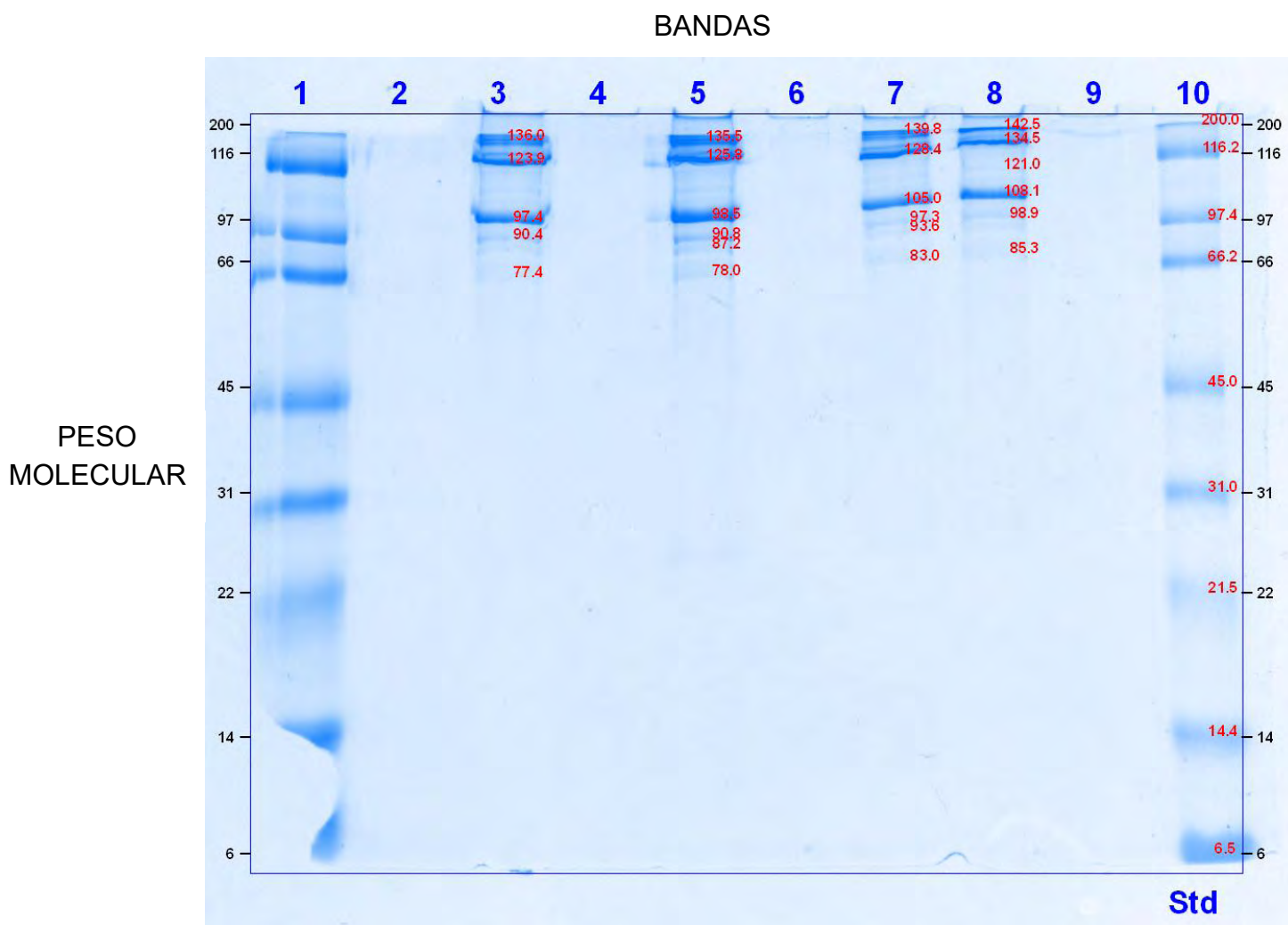


Figura 3.1 Gel de electroforesis SDS-PAGE de acrilamida al 12.5%, teñido con Azul de Coomassie. Std = estándar de pesos moleculares.

Tabla 3.3 Pesos moleculares obtenidos del concentrado proteínico.

Banda 3 Concentrado Proteínico (kDa)	Banda 5 Concentrado Proteínico (kDa)	Banda 7 Concentrado Proteínico (kDa)	Banda 8 Concentrado Proteínico (kDa)	Banda 10 marcador (kDa)
136.0	135.5	139.8	142.5	200
123.9	125.8	128.4	134.5	116.2
97.4	98.5	105.0	121.0	97.4
90.4	90.8	97.3	108.1	66.2
77.4	87.2	93.6	98.9	45
	78	83	85.3	31
				21.5
				14.4
				6.5

El gel de la **Figura 3.1** muestra que se obtuvieron proteínas de medio y de alto peso molecular, entre las cuales pueden encontrarse cadenas α debido a los pesos 98.5 y 125.8 kDa. No se observan cadenas β , ya que presentan un peso molecular de alrededor de 200 kDa, y en la electroforesis sólo se encontraron bandas hasta de máximo 143 kDa, resultado que puede explicarse por el arrastre de proteína soluble por parte de las cadenas α . En este sentido, se debe tomar en cuenta que las gelatinas de mamíferos y pescado tienen una distribución poli-dispersa del peso molecular que está relacionada con la estructura particular del colágeno y el proceso de producción. Además de diferentes oligómeros de las subunidades α , también están presentes algunas cadenas α intactas y parcialmente hidrolizadas, dando lugar a una mezcla que contiene moléculas de diferentes pesos moleculares (Schrieber y Gareis, 2007).

3.3 Rendimiento de la extracción de proteína

Con el objetivo de conocer el rendimiento de extracción de la proteína, se determinó su cantidad presente en el pellet como se indica a continuación:

$$\left(\frac{\text{g de Proteína en la piel}}{100 \text{ g piel}}\right) (1000 \text{ g piel}) = \text{g de proteína en la piel}$$

$$(\text{g de pellet obtenido}) \left(\frac{\text{g de Proteína en el pellet}}{100 \text{ g pellet}}\right) = \text{g de proteína en el pellet}$$

$$\frac{\text{g de proteína en pellet}}{\text{g de proteína en piel}} \times 100\% = \text{rendimiento de extracción}$$

En la **Tabla 3.4** se presenta la cantidad de pellet que se obtuvo en la extracción en dos lotes de piel, así como el contenido de proteína en la piel y su rendimiento de extracción.

Tabla 3.4 Rendimiento de la extracción de proteína

# Lote	Proteína contenida en la piel (g/100 g piel)	Cantidad de pellet obtenido en 1 kg de piel	Proteína contenida en el pellet (g/100 g pellet)	Rendimiento de la extracción
1	30.07	396 g	19.54	25.72%
2	33.59	636 g	19.16	36.27%
3	31.65	434 g	18.69	25.62%

La diferencia que existe en el porcentaje de extracción de los tres lotes puede deberse a condiciones intrínsecas en cada uno, que se deben a diferencias en la edad y el sexo del pez, así como el estado de desnaturalización de las proteínas durante la congelación, almacenamiento y la descongelación del pescado antes de su venta y en el laboratorio.

El rendimiento de extracción fue superior al obtenido por Granados y Martínez (2010) en la extracción de proteína de piel de mero, que fue de 5.7%, así como el obtenido por Limpisophon (2009), quien extrajo gelatina de piel de tiburón, obteniendo entre 4.33 y 5.20% de rendimiento como valor máximo.

3.4 Elaboración de películas a partir del extracto proteínico

En trabajos realizados con anterioridad se logró la formación de películas a base de proteína, como las formadas a partir de sardina atlántica (*Sardina pilchardus*) (Cuq et al., 1995), pesquerías del género *Ephinephelus* (Granados–Navarrete, 2010), Tiburón azul (*Prionace glauca*) (Limpisophon, 2009).

Las películas se pueden formar a partir de biopolímeros como los polisacáridos, proteínas y lípidos, los cuales deberán ser previamente disueltos en un disolvente, generalmente agua, para posteriormente ser vertidas y secadas a la temperatura deseada (Kowalczyk y Baraniak, 2011). Dentro de las proteínas fibrosas, el colágeno ha recibido una gran atención en la formación de películas (Villada et al., 2007)

Para la elaboración de las películas en el presente estudio, se utilizó una solución del extracto proteínico con una concentración final del 5% (p/v) y una mezcla de plastificantes sorbitol y glicerol, la cual se agregó al extracto proteínico en una concentración al 9% (v/v) con respecto a la cantidad de proteína. La formulación utilizada en el presente estudio permitió la formación de películas que en el caso del Control presentaron textura lisa, fueron homogéneas, delgadas, no quebradizas, translúcidas y flexibles, las cuales se muestran en la **Figura 3.2**.



Figura 3.2 Películas Control.

Los polímeros naturales como las proteínas ofrecen una amplia gama de propiedades para utilizarse como materia prima en la elaboración de películas, debido a sus características biodegradables y por el potencial que tienen para formar enlaces intermoleculares (Bourtoom, 2009). La probabilidad de formar enlaces intermoleculares depende de la forma de la proteína y de las condiciones de elaboración.

Las propiedades de las películas se ven influenciadas por el plastificante empleado. Al combinar el plastificante y la proteína se induce la formación de interacciones proteína-plastificante, mismas 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, aumenta la flexibilidad de la proteína (Limpisophon et al., 2009).

En esta primera parte del estudio, se logró demostrar que las proteínas de la piel de cazón poseen la capacidad de formar películas, se obtuvieron películas flexibles. Dicha capacidad está determinada por la interacción entre proteína-proteína y agua-proteína, que pueden estar controladas por la concentración y/o el tipo de plastificantes, ya que el uso de éstos reducen las interacciones intermoleculares entre las cadenas adyacentes del biopolímero, incrementando su movilidad y flexibilidad, es decir, las propiedades elásticas y de textura de las películas (Paschoalick et al., 2003).

3.5 Formación de películas activas

Una vez que se elaboraron las películas de extracto proteínico con plastificante (películas control), se desarrollaron las películas activas, es decir, aquellas en las que se da la unión proteína-antioxidante. Para la unión de quercetina y ácido gálico, se llevó a cabo una reacción enzimática.

En la **Figura 3.3** se muestran las películas activas formadas por la unión de una porción del concentrado proteínico y ácido gálico por medio de una reacción enzimática, las cuales muestran una textura lisa, homogénea, delgada, quebradiza en las orillas, translúcida y flexible.

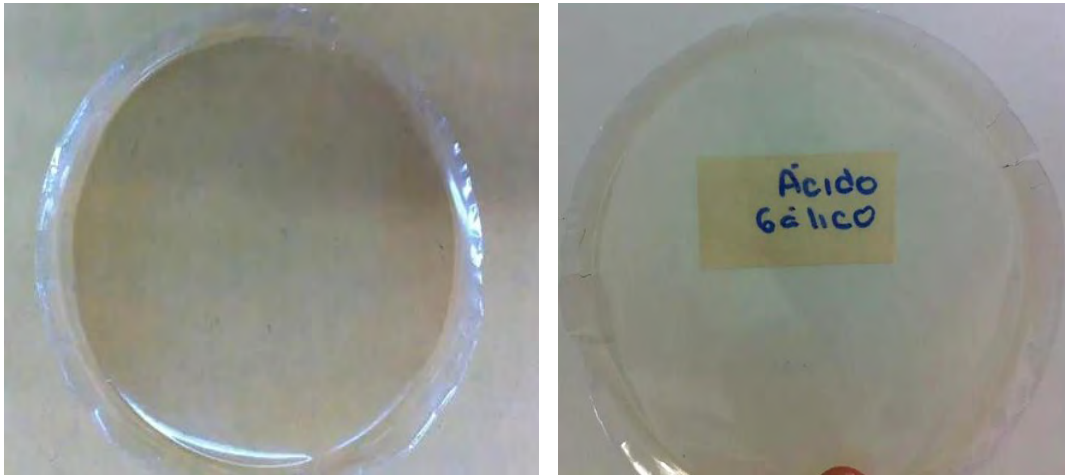


Figura 3.3 Película activa con ácido gálico.

En la **Figura 3.4** se observa la película activa formada por la unión de una porción del concentrado proteínico y la quercetina por vía enzimática, donde se tienen películas homogéneas, delgadas lisas, con una pequeña coloración amarilla, quebradiza en la orilla y flexible.

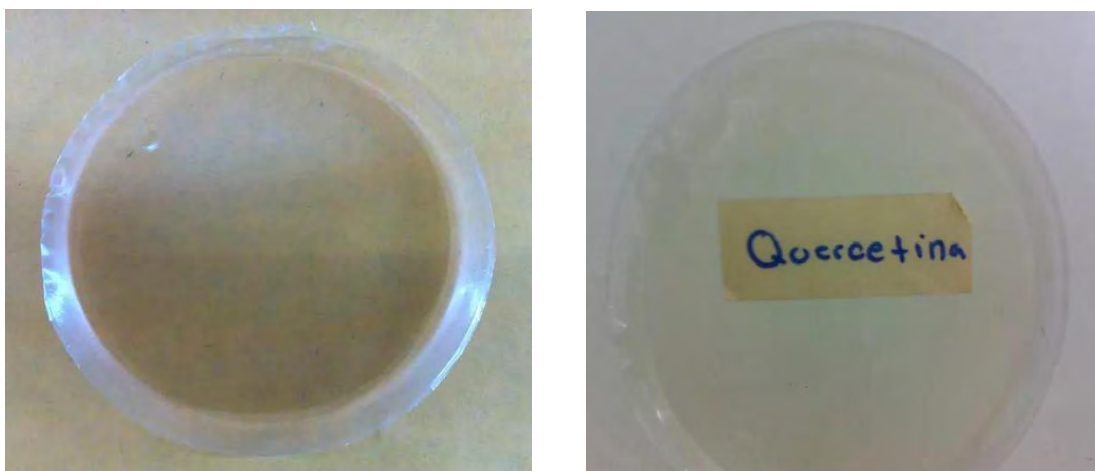


Figura 3.4 Película activa con quercetina.

En la **Figura 3.5** se observan las películas activas formadas por la unión de una porción del concentrado proteínico y la adición de TBHQ a 200 ppm; se obtuvo una textura lisa, delgada, flexible, poco translúcida, no homogénea y con coloración roja.

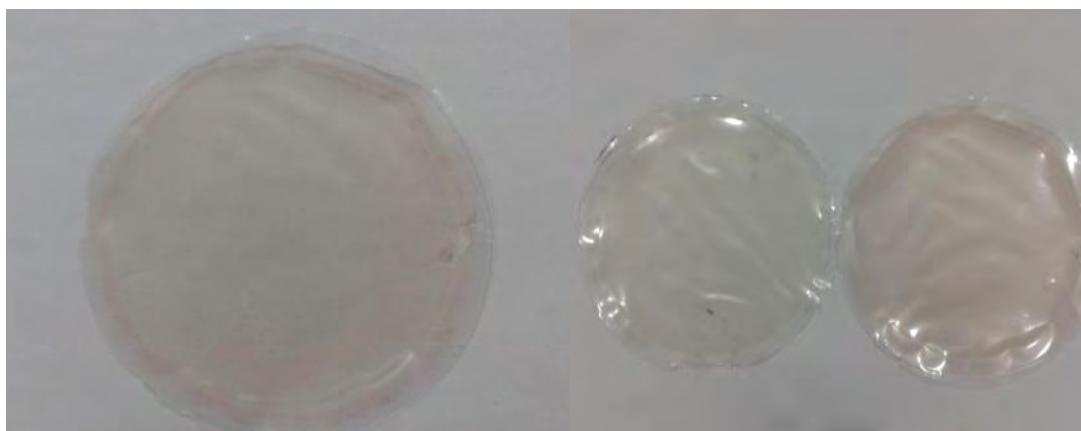


Figura 3.5 Películas activas que incluyeron la adición de TBHQ.

3.6 Capacidad secuestradora sobre el radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (Moure et al., 2000)

Se realizó la medición a partir de la reacción del extracto proteínico con ácido gálico, quercetina y plastificante. Con el fin de evaluar la concentración a utilizar en la síntesis de las películas se realizaron pruebas empleando concentraciones de 200 y 600 ppm. En la Tabla 3.5 se muestra la actividad secuestradora del radical DPPH, prueba que se basa en la capacidad del radical para reaccionar con donadores de protones como lo son los polifenoles.

Tabla 3.5 Capacidad secuestradora sobre el radical DPPH.

MUESTRA	%
Trolox (control)	84.80
Proteína unida con quercetina por medio reacción enzimática (200 ppm)	4.65
Proteína unida con quercetina por medio de reacción enzimática (600 ppm)	2.56
Proteína y ácido gálico unido por medio de reacción enzimática (200 ppm)	5.68
Proteína y ácido gálico unido por medio de reacción enzimática (600 ppm)	3.34
Proteína con adición de antioxidante TBHQ (200 ppm)	3.08

En la **Tabla 3.5** se observa que el antioxidante trolox reduce el porcentaje de DPP, y captura aproximadamente el 84.80%. Para los extractos se obtuvo una captura de DPPH muy baja, lo cual indica que no hubo la donación del H o electrón del antioxidante al radical. Comparando la actividad del trolox con los extractos utilizados en concentración de 200 y 600 ppm con lo informado por Silva (2009), donde la chía capturó el 82.3% de DPPH, tanto los extractos de 200 como los de 600 ppm de antioxidante muestran una actividad menor en el presente estudio, esta prueba no es un indicio de que se une o no el antioxidante a la proteína, sólo es para verificar si los extractos presentan esta actividad.

3.7 Capacidad secuestradora sobre el radical ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ABTS⁺.

Se realizó la medición a partir de la reacción del extracto proteínico con ácido gálico, quercetina y plastificante. En la prueba de ABTS se utilizaron los extractos sólo de 200 ppm, y se siguió la metodología descrita por Kuskoski et al. (2005).

Tabla 3.6 Capacidad secuestradora sobre el radical ABTS⁺.

MUESTRA	%
Trolox	73.21
Proteína unida con quercetina por medio de una reacción enzimática (200 ppm)	36.7
Proteína y ácido gálico unido por medio de una reacción enzimática (200 ppm)	38.51
Proteína con adición de antioxidante TBHQ (200 ppm)	34.14

Los radicales DPPH y ABTS, en solución tienen un color característico, sin embargo al ser capturadas por los extractos polifenólicos, se presenta un cambio en la coloración que se puede monitorear espectrofotométricamente (Roginsky, 2005). En la **Tabla 3.6** se observa la capacidad secuestradora que presentaron los extractos de proteína frente al radical ABTS⁺. De acuerdo con los resultados con DPPH, el trolox fue el que capturó el mayor porcentaje del radical, alcanzando un 73.21%, mientras que los extractos con quercetina y ácido gálico mostraron una mejor capacidad secuestradora que el extracto con TBHQ, siendo capturado de manera respectiva 36.7, 38.51 y 34.14%.

Con esta prueba se puede confirmar que el extracto de proteína unido tanto a quercetina como a ácido gálico presenta actividad antioxidante, pero se necesita un mayor número de estudios con el fin de comprobar que la película activa puede ayudar en la inhibición de la oxidación lipídica en una matriz alimentaria, actuando como donadores de hidrógeno o como aceptores de radicales libres.

3.8 Evaluación de propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas son un indicador de la integridad de las películas bajo condiciones de estrés que pueden ocurrir durante la transformación, manipulación y almacenamiento de los alimentos.

Las propiedades que describen un material corresponden a la aplicación de fuerza, particularmente su comportamiento bajo cargas mecánicas, son llamadas propiedades mecánicas. Éstas son útiles en el diseño y producción de empaques, transporte y distribución, así como en la predicción de la vida de anaquel del producto (Sun-Lee et al., 2008).

3.8.1 Fuerza de fractura a la extensión

La fuerza de extensión se define como la fuerza de tensión requerida para que un material se deforme hasta romperse. Mediante la fuerza de extensión es posible determinar el esfuerzo aplicado (fuerza aplicada por unidad de área); asimismo, la deformación es el cambio de tamaño o forma de un cuerpo debido a la aplicación de una o más fuerzas.

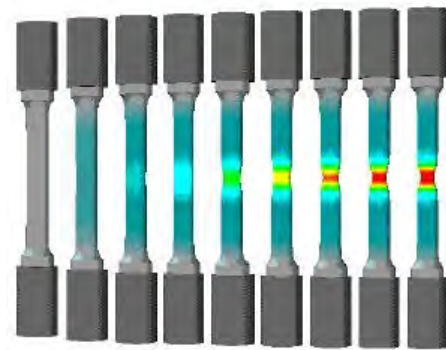


Figura 3.6 Evolución de las tiras rectangulares durante el ensayo de extensión (la zona central es la que soporta mayor deformación, y por esa zona se romperá la tira).

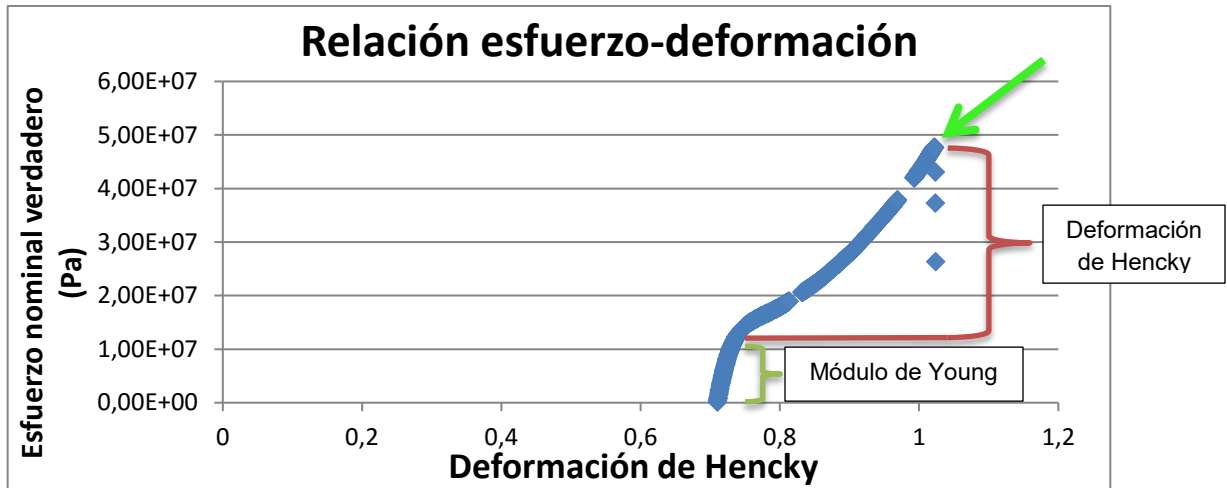


Figura 3.7 Relación esfuerzo-deformación Hencky durante la prueba de extensión

La **Figura 3.7** corresponde a un ejemplo de gráfico obtenido al someter una de las películas a la prueba de fractura a la extensión. El gráfico representa a la película de reacción con ácido gálico. Se puede observar que la película presenta una deformación considerable (región plástica, la cual se indica con el corchete verde y rojo) antes de llegar al punto máximo en el cual se rompe la película. La deformación es un número adimensional que compara la forma antes y después de que ocurra dicha deformación. Cuando ésta es muy grande, la deformación de Hencky suele ser una mejor definición, ya que se basa en el incremento del cambio en las dimensiones con respecto a la longitud instantánea durante el estiramiento (Bourne, 2002). Dicho gráfico muestra el esfuerzo máximo verdadero, en el cual se muestra la fuerza que se necesita aplicar para que la película se rompa al momento de estirla, en el gráfico se muestra con la flecha verde el punto máximo.

En la **Figura 3.8** se muestra el valor para el Módulo de Young (kPa), estos datos se obtienen en la zona lineal del gráfico de esfuerzo-deformación (**Figura 3.7**).

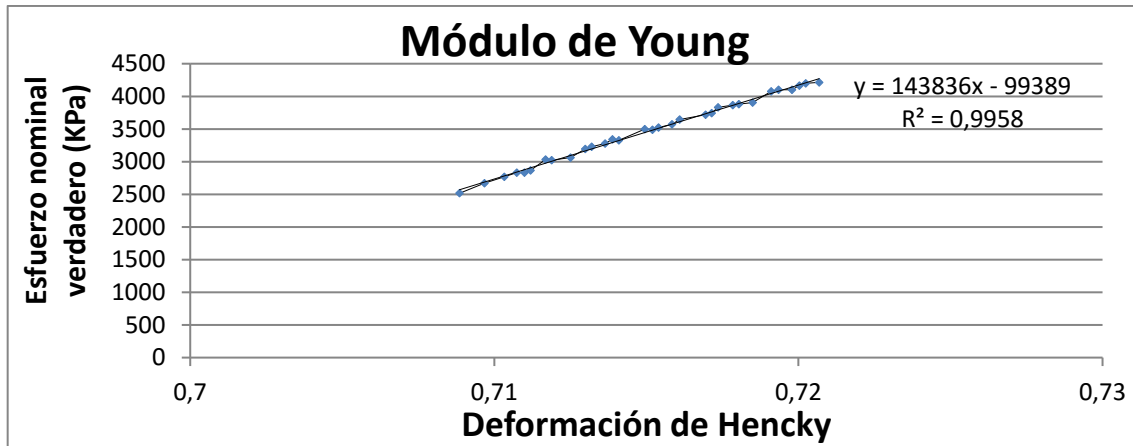


Figura 3.8 Módulo de Young obtenido en la prueba de extensión

El valor del Módulo de Young (pendiente) de la **Figura 3.8** significa que mientras no se supere este valor las películas se comportarán elásticamente, es decir, al dejar de aplicar esta fuerza recuperarán su forma inicial, mientras que rebasándolo quedarán estiradas y sufrirán una deformación permanente.

En la **Tabla 3.7** se indica qué películas requirieron mayor esfuerzo de ruptura.

Tabla 3.7 Propiedades de extensión de las películas de tiburón y de una sintética.

Película	Esfuerzo máximo verdadero (MPa)	Módulo de Young (MPa)
Película Control	91.50±21.054	1,100.17±90.032
Proteína y ácido gálico unido por medio de una reacción enzimática	28.12±10.782	117.87±30.574*
Proteína unida con quercetina por medio de una reacción enzimática	46.49±20.244	731.71±106.091*
Proteína con adición de antioxidante TBHQ	90.42±20244	1,032.30±145.194
Ziploc	7.05±2.32	96.68±20-35*

*Diferencia significativa de acuerdo con el Análisis de Varianza (ANOVA, $\alpha=0.05$).

En la **Tabla 3.7** se muestran los resultados de las propiedades mecánicas de las películas estudiadas, las cuales muestran diferencia significativa, excepto las películas Control y las películas con adición de antioxidante TBHQ, siendo las únicas que no muestran diferencia significativa. La película Control fue la que requirió mayor esfuerzo de ruptura teniendo como resultado un promedio de 91.50 MPa, seguida de la película con adición de antioxidante TBHQ, con 90.42 MPa. Éstas muestran una similitud en el esfuerzo de ruptura. Además, para las películas con quercetina y ácido gálico se requirieron 46.49 y 28.12 MPa para su ruptura.

Cabe mencionar que la adición de antioxidantes no genera un efecto positivo en la prueba, ya que hace que la resistencia a la fractura sea menor, sin embargo, se observa que las películas con adición de quercetina, ácido gálico y TBHQ agregado, son más resistentes en comparación con la referencia Ziploc, lo que indica que se pueden ser utilizadas como empaque.

La película Control es la que presentó mayor resistencia a la deformación, con un valor de 1,100.17 MPa, seguida de la película con adición de TBHQ, con 1,032.30 MPa, seguidas de las películas con quercetina y ácido gálico con 731.71 y 117.87 MPa, de manera respectiva.

La película Control y las películas con antioxidante presentaron mayor resistencia que las bolsas Ziploc, la cual tuvo un valor de 96.68 MPa, por lo que se puede afirmar que son mejores materiales en lo que respecta a esta propiedad, ya que no se deforman con facilidad y pueden llegar a resistir acciones físicas que causan la ruptura del empaque.

3.8.2 Fuerza de fractura a la punción

La **Figura 3.9** corresponde al gráfico que se obtiene al someter las películas a la prueba de fractura a la punción.

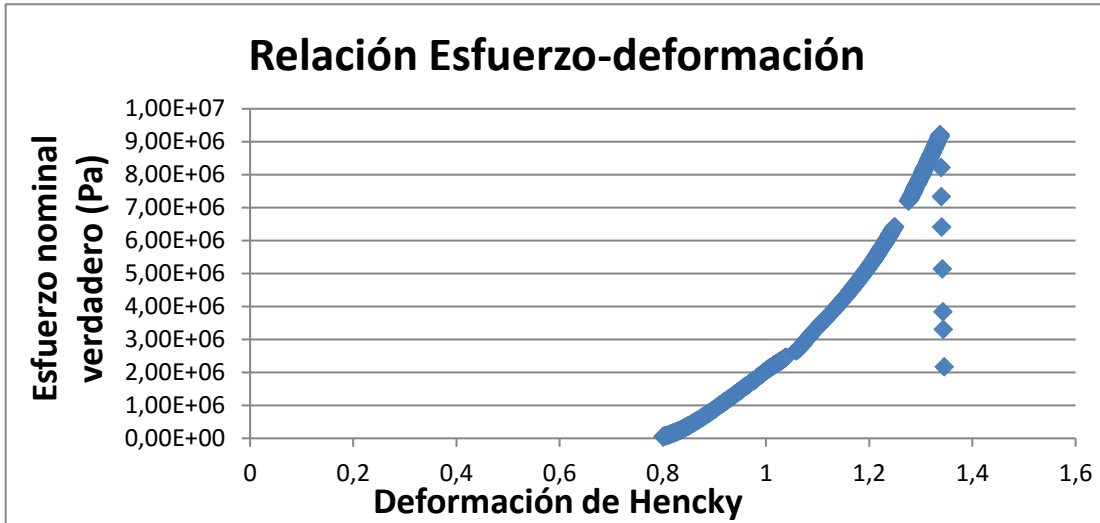


Figura 3.9 Relación esfuerzo-deformación de Hencky durante la prueba de punción.

En la **Figura 3.9** corresponde a la prueba de punción de la película de reacción con ácido gálico. Se puede observar una deformación considerable (región plástica) antes de llegar al punto máximo de ruptura.

En la **Figura 3.10** se muestra el módulo de Young para la prueba de punción a la que fue sometida la película de reacción con ácido gálico.

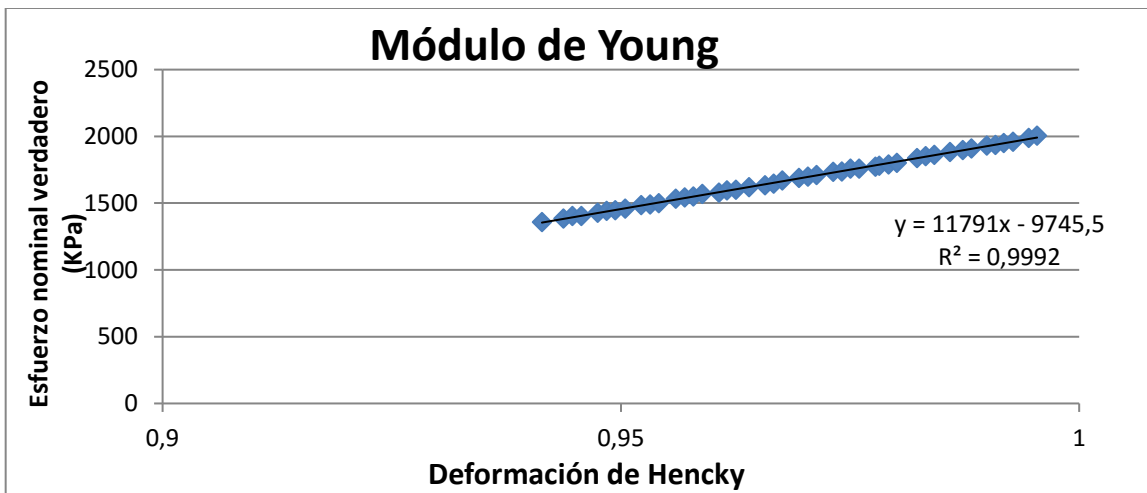


Figura 3.10 Módulo de Young obtenido en la prueba de punción.

El hecho de que las películas hayan resistido a la punción puede deberse a la presencia de plastificante, ya que las películas a base de proteína pueden ser muy quebradizas debido a las interacciones extensivas entre las moléculas poliméricas, es aquí donde los plastificantes actúan posicionándose entre las moléculas poliméricas e interfiriendo con la interacción polímero-polímero, incrementando la flexibilidad (Han, 2005).

La **Tabla 3.8** muestra las propiedades mecánicas de las películas estudiadas en la prueba de punción.

Tabla 3.8 Propiedades mecánicas de punción de las películas de tiburón.

Película	Esfuerzo máximo verdadero (MPa)	Módulo de Young (MPa)
Película Control	10.141±1.558	52.83±15.688
Proteína y ácido gálico unido por medio de una reacción enzimática	9.041±0.328	11.474±0.216
Proteína unida con quercetina por medio de una reacción enzimática	0.091±0.016	0.592±0.569
Proteína con adición de TBHQ	7.372±0.368	18.278±1.532
Ziploc	1.131±0.045	4.261±0.427

Según los resultados de la **Tabla 3.8**, todas las películas que presentaron diferencia estadística significativa ($\alpha=0.05$) en lo que se refiere al Esfuerzo Máximo Verdadero y al Módulo de Young. Las películas Control son las más elásticas ya que presentan el mayor Módulo de Young, y también son las que requieren mayor fuerza para su ruptura (Esfuerzo máximo verdadero). Las películas elaboradas a base de proteína unida con quercetina son las que presentan una diferencia en valor numérico menor en el esfuerzo máximo y en el Módulo de Young con respecto a las demás, siendo éstas las menos resistentes a la prueba de punción.

Tomando en cuenta que películas elaboradas con otros materiales como proteínas de huevo o de trigo son materiales que ofrecen una pobre resistencia al rompimiento, con un esfuerzo menor a 1 MPa (Han, 2005), se puede afirmar que las películas de tiburón pueden cumplir como barrera protectora, porque cuando se someten a la prueba de punción no se rompen con facilidad, ya que requiere más de 1 MPa para lograr esta ruptura.

3.9 Propiedades de barrera

Existen dos mecanismos por los cuales el vapor o el gas pueden ser transportados 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 (Sun-Lee et al., 2008). La permeabilidad de vapor de agua (PVA) y al oxígeno (PO) son propiedades de barrera más comúnmente investigadas para evaluar la capacidad de las películas de proteína para proteger alimentos frente a las condiciones ambientales.

3.9.1 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 haber una pérdida de humedad que se verá reflejada en cambios indeseables en la textura del alimento (Castañeda, 2011).

La **Tabla 3.9** muestra los valores de permeabilidad al vapor de agua que presentan las películas control, activas mediante reacción con ácido gálico y quercetina y con adición de TBHQ.

Tabla 3.9 Permeabilidad al vapor de agua de las películas y de otras películas sintéticas/comerciales.

Tipo de película	PVA ($\eta\text{g}/\text{Pa}\cdot\text{S}\cdot\text{m}$)
Película control*	$1.448 \times 10^{-3} \pm 3.12 \times 10^{-4}$
Película unida con antioxidante quercetina	$2.70 \times 10^{-3} \pm 8.88 \times 10^{-5}$
Película unida con antioxidante ácido gálico*	$3.503 \times 10^{-3} \pm 4.50 \times 10^{-4}$
Proteína con adición de antioxidante TBHQ	$4.488 \times 10^{-4} \pm 2.37 \times 10^{-5}$
Ziploc	5.71×10^{-2}
PVC	2×10^{-4}
LDPE	20×10^{-4}
HDPE	2×10^{-4}

PVC; Policloruro de vinilo (Granados-Navarrete, 2009)

LDPE; Polietileno de baja densidad

HDPE; polietileno baja densidad

*Diferencia significativa con $\alpha=0.05$.

De acuerdo con la **Tabla 3.9** las únicas películas que no presentan diferencia significativa ($\alpha=0.05$) son la Control y las activas, y que la proteína con adición de antioxidante TBHQ es la única que presenta valores menores de permeabilidad, seguida de la película Control, que es aproximadamente tres veces más permeable en valor numérico, siendo las películas de reacción con quercetina y ácido gálico las que presentaron mayor permeabilidad al vapor de agua. Por su parte, las películas activas con adición de antioxidante y la película Control mostraron valores menores de permeabilidad al vapor de agua en comparación con la bolsa Ziploc.

En la **Tabla 3.9** también se muestran valores para otros materiales sintéticos como el cloruro de polivinilo (PVC) y el polietileno de baja densidad (HDPE), que brindan una mejor barrera contra la permeabilidad en comparación con la película adicionada con TBHQ, la cual presentó la menor permeabilidad de las películas.

A pesar de que los materiales sintéticos brindan una adecuada barrera contra la permeabilidad, éstos no poseen capacidad antioxidante que proteja a los alimentos en caso de que sean altos en grasa saturada y tengan una gran probabilidad de enranciamiento, por lo que las películas activas elaboradas en el presente estudio cobran relevancia como materiales protectores frente a este deterioro.

3.9.2 Permeabilidad al oxígeno

La permeabilidad a diferentes gases de los materiales plásticos es de considerable importancia en muchas aplicaciones. Frecuentemente es deseable para lograr un cierto grado de permeabilidad, en lugar de producir un empaque completamente impermeable (Ninan, 2009). La permeabilidad al oxígeno de las películas de proteína es un aspecto fundamental para poder establecer su funcionalidad como barreras protectoras de alimentos, ya que la vida útil de muchos productos perecederos es afectada por la presencia o ausencia de este gas, que también es responsable de la mayoría de las reacciones de oxidación en los alimentos y favorece el crecimiento de microorganismos (Damodaran y Paraf, 1997; Ninan, 2009). Se ha encontrado que polímeros que contienen grupos que pueden asociarse mediante puentes de hidrogeno o enlaces iónicos, como las proteínas, son el resultado de películas con excelentes barreras al oxígeno (Damodaran y Paraf, 1997), fuerzas inter e intramoleculares que también pueden estar implicadas en el enlazamiento de los antioxidantes de las películas estudiadas.

En la **Tabla 3.10** se muestran los resultados de permeabilidad al oxígeno que presentaron las películas a estudiar.

Tabla 3.10 Permeabilidad al oxígeno de las películas estudiadas y otras sintéticas.

Tipo de película	Permeabilidad al Oxígeno ($\eta\text{mol}/m^*Pa*s$)
Película control	1.254×10^{-4}
Película con antioxidante quercetina	2.331×10^{-4}
Película con antioxidante ácido gálico	2.924×10^{-4}
Ziploc	No permeable con las condiciones de trabajo
LDPE	3.1×10^{-4}

La **Tabla 3.10** muestra que las películas Control y activas son permeables al oxígeno, siendo la película Control la que menos permeabilidad presentó y la película activa con ácido gálico la de mayor permeabilidad. La muestra de polietileno de baja densidad (LDPE) mostró mayor permeabilidad al oxígeno que las películas activas y que la película Control. La bolsa Ziploc no presentó permeabilidad al oxígeno bajo las condiciones de trabajo.

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, dificultando la difusión del oxígeno a través de la matriz polimérica. De los resultados de la **Tabla 3.10** se puede decir que las películas activas y la Control pueden emplearse como barreras protectoras en alimentos con el fin de evitar el deterioro a causa de reacciones oxidativas.

3.10 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

En la **Figura 3.11** se muestra el espectro de RMN del concentrado proteínico, en el cual se puede observar un patrón de señales ente 0 y 5 ppm, desplazamiento característico de la presencia de una gran cantidad de aminoácidos con cadenas alifáticas (Bruice, 2008).

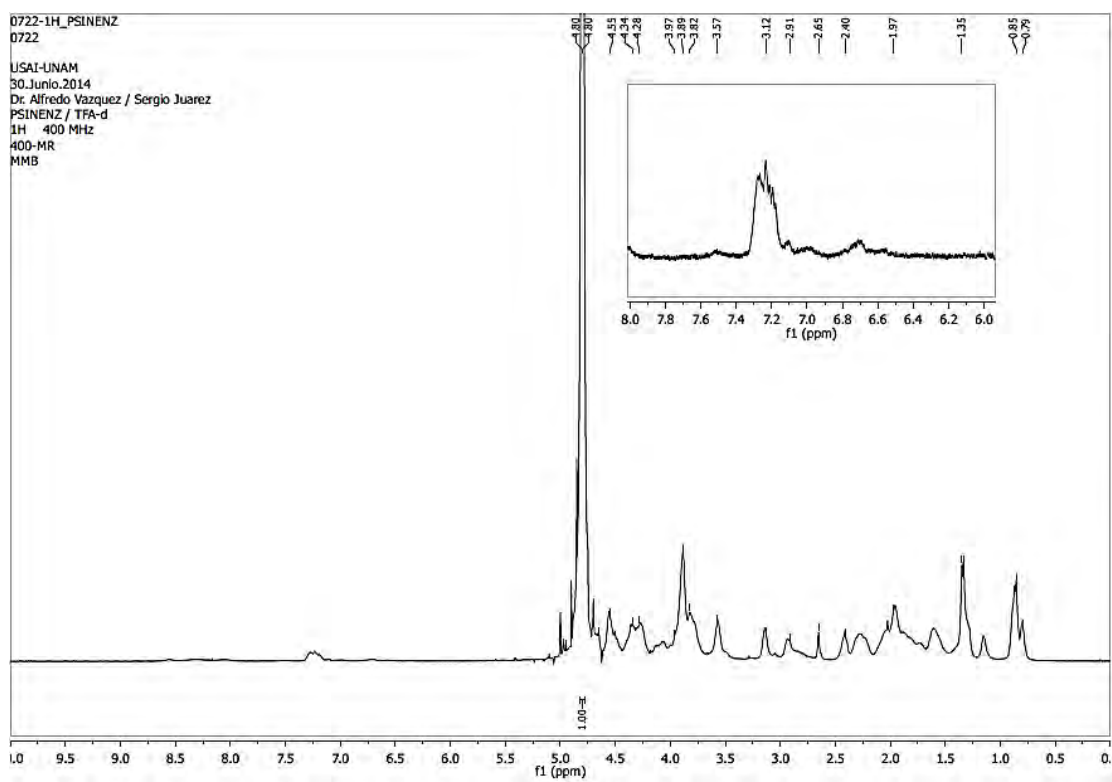


Figura 3.11 Espectro de RMN de la proteína.

La **Figura 3.12** se muestra el espectro de RMN obtenido de la proteína con ácido gálico por medio de la reacción enzimática. Se observa que entre 6.5 y 8.5 ppm existen señales aromáticas que podrían corresponder al ácido gálico, por lo que hay evidencia de que se une el antioxidante a la proteína.

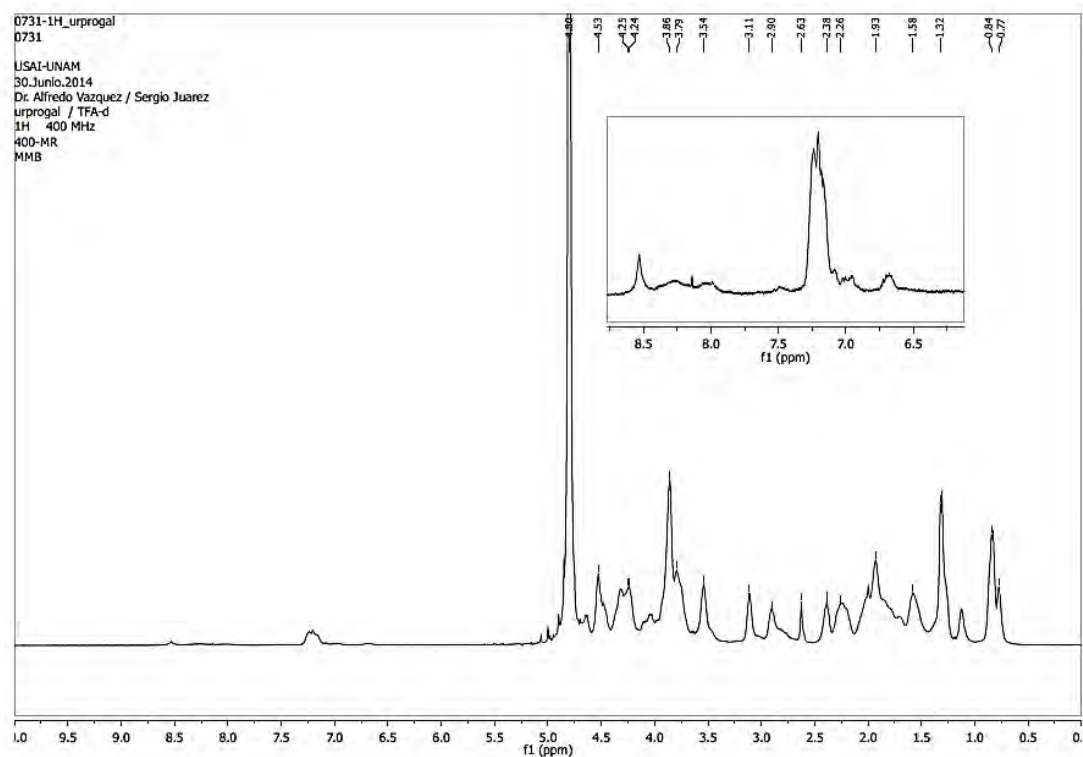


Figura 3.12 Espectro de RMN de ácido gálico unido con la proteína por medio de reacción enzimática.

La **Figura 3.13** muestra el espectro de RMN obtenido del extracto de proteína extraída que contenía 200 ppm de TBHQ, donde se observa que entre 6 y 8 ppm existen señales características de compuestos aromáticos (Bruice, 2008), como lo es este antioxidante, y el resto de señales a la proteína, las cuales se observan entre 1 y 5 ppm, resaltando una señal que se encuentra entre 4.5 y 5 ppm. Lo anterior constituye una evidencia de la unión del antioxidante a la proteína. Cabe mencionar que la presencia de señales de compuestos aromáticos de los antioxidantes no evidencia contundentemente que la reacción enzimática se llevó a cabo ni que los antioxidantes se encuentren unidos químicamente a la proteína, lo que sí se puede afirmar es que el presente estudio sienta las bases para la realización de una investigación futura la cual permita saber si el antioxidante se une químicamente a la proteína, el rendimiento de la reacción y la cantidad de antioxidante unido a la proteína.

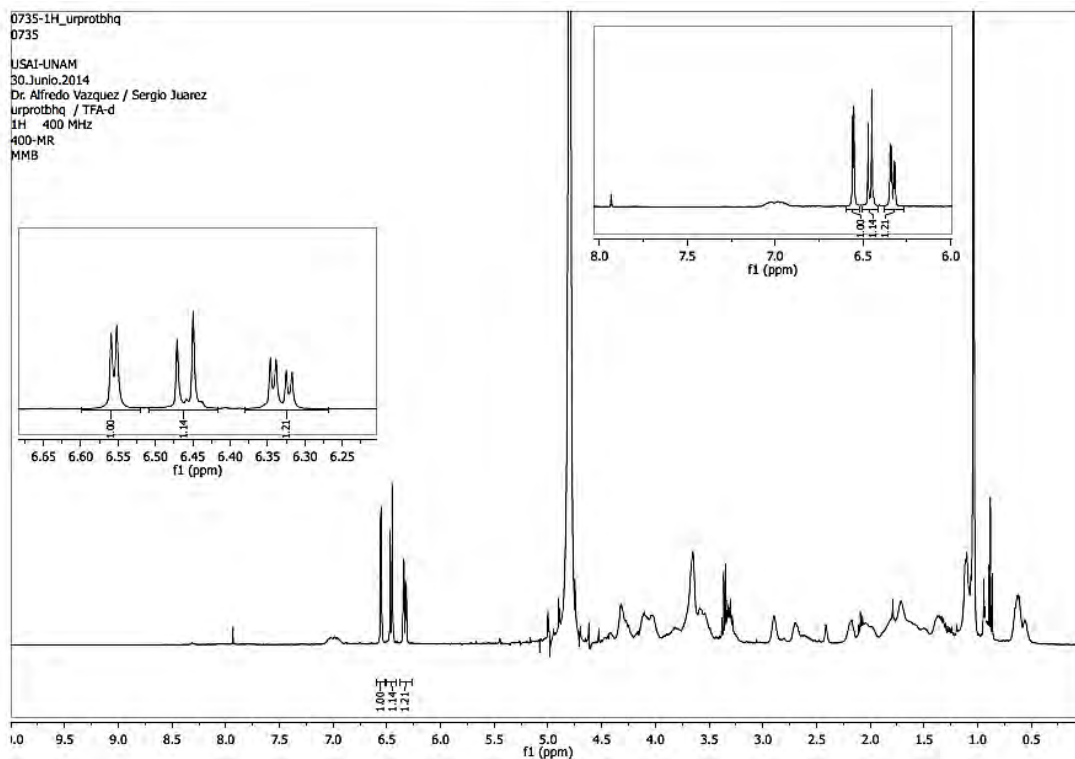


Figura 3.13 Espectro de RMN de TBHQ 200 ppm unido con la proteína por medio de mezclado.

CAPITULO IV CONCLUSIONES

- Se obtuvo un concentrado proteínico con un rendimiento de 36.17% de la piel de tiburón (*Galeorhinus galeus*). La proteína extraída tiene la capacidad de formar una red tridimensional ordenada donde se retiene el plastificante y el agua, lo que se ve reflejado en la formación de las películas.
- Se elaboraron películas activas a partir del concentrado proteínico mezclado con TBHQ, y de películas activas a través de la incorporación separada de los antioxidantes fenólicos ácido gálico y quercetina mediante una reacción enzimática, obteniendo películas lisas, delgadas, homogéneas, translúcidas y flexibles. Las películas con adición de TBHQ fueron poco translúcidas, no homogéneas, lisas, flexibles y con coloración roja.
- Las películas más resistentes a la deformación por extensión fueron la película Control y la de TBHQ, que presentaron mayor resistencia a la ruptura (Esfuerzo máximo) con respecto a la de reacción enzimática y a la bolsa Ziploc.
- La película Control y la de TBHQ fueron las más resistentes a la deformación por extensión (Módulo de Young) en comparación con las películas de reacción enzimática y la bolsa Ziploc.
- La película Control y la de TBHQ fueron las más resistentes a la deformación por punción (Módulo de Young), siendo la primera 13 veces más resistente que la bolsa Ziploc, y la película Control 4.5 veces más resistente en valor numérico.
- Las películas que presentaron mayor resistencia a la ruptura por punción (Esfuerzo máximo) fueron la Control y la de reacción con ácido gálico.

- Los resultados de deformación por punción (Módulo de Young) y ruptura por punción (Esfuerzo máximo) de las películas elaboradas con ácido gálico, quercetina, el Control y con TBHQ, superan a los de la referencia Ziploc, por lo que las películas de piel de tiburón presentan un gran potencial para utilizarse como material de empaque primario en alimentos.
- Las películas presentaron protección contra el vapor de agua, siendo la película con adición de TBHQ la que constituyó una mejor barrera contra el vapor de agua, y la película con ácido gálico la que presentó menor barrera.
- La película con TBHQ y la Control fueron las únicas con valores de permeabilidad al vapor de agua menores que los reportados para polímeros sintéticos como PVC y HDPE.
- Las películas a base de concentrado proteínico y las películas activas, presentan una permeabilidad baja al oxígeno, por lo que muestran un gran potencial para sustituir a los polímeros sintéticos.
- Los estudios de Resonancia Magnética Nuclear aportan evidencia sobre una posible unión del antioxidante a la proteína, pero se requiere de un mayor número de estudios para confirmar si se da la unión, dónde y el rendimiento de la reacción.
- Las películas elaboradas a partir del concentrado proteínico de piel de tiburón, película Control y activas, tienen buenas propiedades mecánicas y de barrera, por lo que podrían constituir una excelente área de oportunidad en la investigación y desarrollo de envases utilizados en la protección de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- ▶ ASTM D882-97 (2003). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Vol. 8, 163-171.
- ▶ ASTM D 1434-82 (2010). Determining Gas Permeability Characteristics of Plastic Film and sheeting. In 1998 Annual Book of ASTM Standars, ASTM Internacional (USA). Vol. 14.02.
- ▶ ASTM E96 / E 96M-10. (2010). Standard test method for water vapor transmission of materials. In 1995 Annual Book of ASTM Standars, ASTM Internacional (USA). Vol. 4.
- ▶ Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aiba, S., & Yamamoto, N. (1997). "Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, part 3". *Food Chemistry*, 60(4), 593-604.
- ▶ Avella, M., De Vlieger, J.J., Errico, M., & Fischer, S. (2005). Biodegradable Starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chesmistry*, 93, 467-474.
- ▶ Batista, I. (1999). Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction, *European Food Research Technology* 2010, pp. 84-89.
- ▶ Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4th Ed.). Springer, Germany.
- ▶ Bourne, M. (2002). *Food texture and viscosity: concept and measurement* (2^a ed.), Elsevier Science & Technology Books.
- ▶ Bourtoom, T., Chinnan, M.S., Jantawat, P., & Sanguandeeikul, R. (2006). Effect of Plasticizer Type and Concentration on the Properties of Edible Film from Water-Soluble Fish Proteins in Surimi Wash-Water. *Food Science and Technology International*, 12, 119.
- ▶ Bruice, P., Y. (2008). *Química Orgánica* (5^a ed.) Pearson Educación, México.
- ▶ Cao, N., Yang, X., & Yuhua, F. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier propierties of gelatin film. *Food Hydrolloids*, 23, 729-735.

- ▶ Castañeda Pérez, Karla M. (2011). Desarrollo y evaluación de propiedades de películas proteínicas de pesquerías de la subclase *Elasmobranchi*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 59-60.
- ▶ Charles F., Sánchez J., & Gontard N. (2006). Absorption kinetics of oxygen and carbón dioxide scavengers as part of active modified atmosphere packaging. *Journal of Food Engineering*, 72, 1-7.
- ▶ Cifuentes, J.L., Torres-Garcia, P. & Frías, M. (1997). El océano y sus recursos X. Pesquerías 2a ed. Fondo de Cultura Económica, México.
- ▶ CONAPESCA (2011). Anuario estadístico de acuicultura y pesca. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_d_e_pesca. Consultado en mayo de 2015.
- ▶ CONAPESCA (2014). Consulta específica por especie. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/consulta_especifica_por_produccion. Consultado en mayo de 2015.
- ▶ 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., & Guilert, 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, USA.
- ▶ Fennema, O. (2009). Química de los Alimentos (4 ed.), Acribia, España, 414-433.
- ▶ Garrido, D. A., & Teijon, R. J. M. (2006). Fundamentos de bioquímica estructural (2ª ed.) Tebar SL, Madrid, 2006, 348-356.
- ▶ Granados-Navarrete, S., & Matínez-García, C. (2010). Aprovechamiento de proteínas de pesquería del género *Ephinephelus* para la obtención de películas modificadas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- ▶ Han, J. (2005). "Innovations in Food Packaging", Elsevier Science & Technology Books, United Kindom, pp. 45-46, 239-259, 301-3018.

- ▶ Hernández, M. (2011). Evaluación de películas de pesquerías modificadas como barreras para alimentos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

- ▶ Hui, Y. H., Guerrero, I., & Rosmini, M. (2006). Ciencia y Tecnología de carnes. Limusa, México.

- ▶ Jones, N.R. (1997). Uses of gelatin in edible products. In A. G. Ward & A. Courts (Eds.). *The Science and Technology of gelatins*, pp. 365-394. New York: Academic Press.

- ▶ Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2008). Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol, *Food Hydrocolloids*, 22, 449-458, 739-745.

- ▶ Kanokrat, L., Munehiko, T., WuYing, W., Shuji, A., & Kazufumi, O. (2008). Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*Prionaceglauca*) skin, *Journal of Dairy Science*, 10, 108-112.

- ▶ Kuskoski E., Asuero A., Troncoso A., Mancini J., & Fett R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, *Ciencia Tecnología Alimentaria Campinas*, pp. 25, 726-732.

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

- ▶ Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3444-3452.

- ▶ Metodos AOAC. (1995). Official methods of Analysis of AOAC international, 16th Edition, Culinif, P.

- ▶ Mc Hugh, T., H., Avena-Bustillos, R., & Kronchta, J. M. (1993). Hydrophilic edible film: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects, *Journal of Food Science*, 4, 899-903.

- ▶ Moure, A., Franco, D., Sineiro J., Domínguez, H., Núñez, M., & Lema, J. (2000). Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3890-3897.
- ▶ Navarro, Silvia, B. (2009). “Desarrollo de biopelículas con actividad antioxidante y evaluación del factor de protección en alimentos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- ▶ Nielsen, S. (2010). “Food analysis (4^a ed.), Springer, USA, 119-125.
- ▶ Olabarrieta, I., Gallstedt, M., Ispizua, I., Sarasua, JR. & Hedenqvist, M. (2006). Properties of aged montomorillonete-wheat gluten composite films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1283-1288.
- ▶ Paschoalick, T. M., Garcia, F. T., Sobral, P. J. A., & Habitante, A. M. Q. B. (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-2005, Pesca Responsable de Tiburones y Rayas. Especificaciones para tu aprovechamiento.
- ▶ Roginsky, V., & Liss E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidants activity in food, *Food Chemistry*, 92, 235-254.
- ▶ Scope, R. K. (1994). Separation by precipitation. In Scope, R.K. (Ed.), *Protein purification. Principles and Practice*, 71-101. New York.
- ▶ Siracusa, V., Prieto, R., Romani, S., & Dalla, M. (2008). Biodegradable polymers for food Packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 634-643.
- ▶ Shahidi, F. (1994). Sabor de la carne y productos cárnicos. Una visión general. En: *sabor de la carne y los productos cárnicos*, Shahidi, F. (Ed.). Blackie Académica y Profesional, Londres, 1-3.
- ▶ Shiku, Y., Hamaguchi, P. Y., & Tanaka, M. (2003). Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins, *Fisheries Science*, 69, 1026-1032.
- ▶ Schrieber, R., & Gareis, H. 2007. *Gelatin handbook. Theory and industrial practice*. Wiley-VCH, Germany.
- ▶ Sun-Lee, D., Yam, K., & Piergiovanni, L. (2008). *Food packaging science and technology*. CRC Press, USA.