



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE PELÍCULAS PROTEÍNICAS MULTIFUNCIONALES
COMO EMPAQUE PRIMARIO A PARTIR DE PIEL DE CAZÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

RAQUEL AGUIRRE ALBO



CDMX

2018



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 María de los Ángeles Valdivia López
VOCAL:	Profesor Juan Carlos Ramírez Orejel
SECRETARIO:	Profesor Alejandro Rafael Zavala Rivapalacios
1er SUPLENTE:	Profesor Tania Gómez Sierra
2do. SUPLENTE:	Profesor Jonathan Trápala Reyna

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorios 322 y 323, Conjunto "E", Edificio de Biotecnología y Alimentos, Facultad de Química. Ciudad universitaria, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTE:

Raquel Aguirre Albo

Contenido

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	4
Objetivo general	4
Objetivos particulares.....	4
1. Marco teórico	5
1.1.Cazón	5
1.2. Colágeno.....	6
1.2.1. El colágeno en la industria	7
1.3. Empaque.....	8
1.3.1. Empaque activo	10
1.3.1.1. Empaques activos con efecto antioxidante.....	11
1.3.1.2. Empaques activos con efecto antimicrobiano.....	11
1.3.2. Plastificantes en empaques activos.....	13
1.4. Biopolímeros para empaques.....	14
1.4.1. Empaques proteínicos.....	15
1.5. Biodegradación	15
1.5.1. Empaques biodegradables.....	16
1.6. Aditivos alimentarios	16
1.6.1. Agentes antioxidantes	16
1.6.1.1. Antioxidantes en los alimentos	17
1.6.1.1.1. Quercetina.....	17
1.6.2. Agentes antimicrobianos	18
1.6.2.1. Bacteriocinas.....	19

1.6.2.1.1. Nisina	19
1.6.2.1.1.1. Mecanismo de acción de la nisina	20
1.7. Enzima Peroxidasa	22
1.7.1. Catálisis de la HRP y estados redox	22
1.7.2. Secuencia del ciclo catalítico de la HRP.....	23
1.8. Deterioro en la calidad de los alimentos	24
1.8.1. Reacciones de oxidación lipídica.....	24
1.9.1.1. Factores que influyen en la oxidación de lípidos	25
1.10. Avances en el desarrollo de películas biopoliméricas.....	26
2. Metodología	27
2.1. Caracterización fisicoquímica de la piel de cazón y del extracto proteico (pellet) 28	
2.2. Extracción del concentrado proteínico (pellet).....	28
2.3. Elaboración de películas a partir de concentrado proteínico	29
2.3.1.1. Película con actividad antioxidante.....	29
2.3.1.2. Película con actividad antimicrobiana.....	30
2.3.1.3. Película con actividad antioxidante y antimicrobiana (multifuncional)	30
2.4. Evaluación de la capacidad protectora, deterioro microbiano y oxidativo	31
2.4.1. Determinación directa de la carga microbiana (método del 2,3,5-trifeniltretazolio).....	32
2.4.2. Extracción del aceite	32
2.4.2 A) Determinación del índice de Peróxidos (método colorimétrico).....	32
2.4.2 B) Determinación del índice de Kreis	33
2.5. Análisis estadístico.....	34
3. Resultados y discusión.....	35

3.1. Caracterización de la piel de cazón	35
3.2. Caracterización del concentrado proteínico (pellet)	36
3.3. Rendimiento de la extracción	38
3.4. Formación de películas	39
3.5. Pruebas de vida de anaquel y pruebas de deterioro microbiano y oxidativo..	41
3.5.1. Deterioro microbiano	43
3.5.2. Seguimiento de índice de peróxidos.....	46
3.5.2.1. Análisis cinético del índice de peróxidos	51
3.5.3. Seguimiento del índice de Kreis	53
3.5.3.1. Análisis cinético del índice de Kreis.....	56
3.6. Humedad	59
4. Conclusiones	61
5. Referencias.....	62

Índice de tablas

<i>Tabla 1.1 Distribución anatómica de algunos tipos de colágeno</i>	7
<i>Tabla 1.2 Las características principales de los materiales de empaque para alimentos</i>	10
<i>Tabla 1.3 Algunos agentes antimicrobianos utilizados en la formación de películas activas</i>	12
<i>Tabla 2.1 Métodos de cuantificación</i>	28
<i>Tabla 2.2 Formulación de películas</i>	31
<i>Tabla 3.1 Composición química porcentual de la piel de cazón</i>	35
<i>Tabla 3.2 Composición química porcentual del concentrado proteínico (pellet) de dos lotes</i>	37
<i>Tabla 3.3 Rendimiento de extracción</i>	38
<i>Tabla 3.4 Queso Edam, pan multigrano y croquetas para gato empacados en películas de cazón y bolsa de polietileno</i>	42
<i>Tabla 3.5 Análisis estadístico de comparación múltiple Formazan en Pan</i>	44
<i>Tabla 3.6 Análisis estadístico de comparación múltiple de Formazan en Queso</i> ..	45
<i>Tabla 3.7 Análisis estadístico de comparación múltiple de IP en Pan</i>	47
<i>Tabla 3.8 Análisis estadístico comparación múltiple de IP en Queso</i>	48
<i>Tabla 3.9 Análisis estadístico de comparación múltiple de IP en Croquetas para gato</i>	49
<i>Tabla 3.10 Permeabilidad al oxígeno, tabla acoplada (Juárez, 2016)</i>	50
<i>Tabla 3.11 Análisis estadístico de comparación múltiple de IK en Pan</i>	54
<i>Tabla 3.12 Análisis estadístico de comparación múltiple de IP en Queso</i>	55
<i>Tabla 3.13 Análisis estadístico de comparación múltiple de IK en Croquetas para gato</i>	56
<i>Tabla 3.14 Contenido de humedad promedio del pan multigrano y queso Edam empacado en películas de proteína de cazón</i>	60

Índice de figuras

<i>Figura 1-1</i>	<i>Cazón</i>	5
<i>Figura 1-2</i>	<i>Estructura química del sorbitol</i>	13
<i>Figura 1-3</i>	<i>Estructura química del glicerol</i>	14
<i>Figura 1-4</i>	<i>Estructura química de la quercetina</i>	18
<i>Figura 1-5</i>	<i>Mecanismo de acción de nisina</i>	21
<i>Figura 1-6</i>	<i>Reacción de catálisis de peroxidasa</i>	22
<i>Figura 1-7</i>	<i>Ciclo catalítico de HRP</i>	23
<i>Figura 2-1</i>	<i>Ciclo catalítico de HRP</i>	27
<i>Figura 3-1</i>	<i>Piel de cazón</i>	35
<i>Figura 3-2A</i>	<i>Concentrado proteínico (pellet)</i>	36
<i>Figura 3-2B</i>	<i>Concentrado proteínico (pellet)</i>	36
<i>Figura 3-3</i>	<i>Película de cazón</i>	40
<i>Figura 3-4</i>	<i>Película de cazón con quercetina</i>	40
<i>Figura 3-5</i>	<i>Película de cazón con nisina</i>	40
<i>Figura 3-6</i>	<i>Película de cazón con quercetina y nisina</i>	40
<i>Figura 3-7</i>	<i>Seguimiento de crecimiento microbiano del pan multigrano empacado en películas de proteína de cazón</i>	44
<i>Figura 3-8</i>	<i>Seguimiento de crecimiento microbiano del queso Edam empacado en películas de proteína de cazón</i>	45
<i>Figura 3-9</i>	<i>Seguimiento de índice de peróxidos del pan integral empacado en películas de proteína de cazón</i>	47
<i>Figura 3-10</i>	<i>Seguimiento de índice de Peróxidos del queso Edam empacado en películas de proteína de cazón</i>	48
<i>Figura 3-11</i>	<i>Seguimiento de índice de peróxidos de croquetas para gatos empacadas en películas de proteína de cazón</i>	49
<i>Figura 3-12</i>	<i>Cinética de formación de peróxidos en pan multigrano del pan integral empacado en películas de proteína de cazón</i>	51
<i>Figura 3-13</i>	<i>Cinética de formación de peróxidos de queso Edam empacados en películas de proteína de cazón</i>	52

<i>Figura 3-14 Cinética de formación de peróxidos de croquetas para gato empacadas en películas de proteína de cazón</i>	<i>52</i>
<i>Figura 3-15 Seguimiento del índice de Kreis del pan integral empacado en películas de proteína de cazón</i>	<i>54</i>
<i>Figura 3-16 Seguimiento del índice de Kreis en el queso Edam empacado en películas de proteína de cazón</i>	<i>555</i>
<i>Figura 3-17 Seguimiento del índice de Kreis en croquetas para gato empacadas en películas de proteína de cazón</i>	<i>56</i>
<i>Figura 3-18 Cinética del índice de Kreis del pan integral empacado en películas de proteína de cazón</i>	<i>57</i>
<i>Figura 3-19 Cinética del índice de Kreis del queso Edam empacado en películas de proteína de cazón</i>	<i>58</i>
<i>Figura 3-20 Cinética del índice de Kreis del pan integral empacado en películas de proteína de cazón</i>	<i>58</i>
<i>Figura 3-21 Seguimiento del contenido de humedad en pan multigrano empacado en películas de proteína de cazón</i>	<i>59</i>
<i>Figura 3-22 Seguimiento del contenido de humedad en queso Edam empacado en películas de proteína de cazón</i>	<i>59</i>

Acrónimos

°C: grados Celsius

AOAC: Asociación de Comunidades Analíticas (Association of Analytical Communities)

ATP: trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate)

AQP: análisis químico proximal

aw: Actividad de agua

BAL: Bacterias ácido-lácticas

BHT: Butil hidroxitolueno

BHA: hidroxibutilanisol

EtOH: Etanol

HRP: enzima peroxidasa de rábano picante

FDA: Food and Drug Administration

IP: índice de peróxidos

IK: índice de Kreiss

NaOH: Hidróxido de sodio

N/A: No aplica

ppm: partes por millón

PVA: Permeabilidad al vapor de agua

TDPA: tiodipropiónico

Resumen

Un empaque activo se define como aquel sistema que interactúa positivamente con el producto, extendiendo su vida de anaquel, manteniendo su calidad microbiológica y nutrimental y mejorando la seguridad y sus atributos sensoriales (Ozdemir, 2010). En el presente trabajo se utilizaron proteínas de piel de cazón, que es un desecho de la industria pesquera, a las cuales se unió, vía enzimática, quercetina con adición de nisina para obtener películas activas con actividad antioxidante y antimicrobiana y así evaluar su potencial uso como empaque primario activo en la industria alimentaria. Asimismo, se evaluaron sus propiedades mecánicas y de barrera. La actividad antioxidante y antimicrobiana fue evaluada mediante pruebas en tres diferentes matrices alimentarias: pan multigrano, queso Edam y croquetas para gato. Estos alimentos fueron empacados con las películas activas y se almacenaron para posteriormente ejecutar pruebas de almacenamiento. Con las pruebas realizadas, se evaluó el desempeño de las películas en el retardo de la velocidad en la oxidación de lípidos y en el crecimiento microbiano. Esto se logró a través del seguimiento de las reacciones de oxidación lipídica y de crecimiento microbiano durante un periodo de 28 días a una temperatura de 20-22°C y con una humedad relativa de 60%. Las películas activas obtenidas a base de proteínas, principalmente colágeno de pescado, presentaron efectividad en el retardo oxidativo y microbiano. De igual manera, presentaron buenas propiedades mecánicas, por lo que el uso como empaques primarios para alimentos de actividad de agua (a_w) baja o intermedia, es recomendable. Las películas activas presentaron mayor difusión al vapor de agua comparadas con las bolsas de polietileno.

Introducción

En la industria alimentaria, los empaques son una herramienta que debe satisfacer los requerimientos del mercado, siendo la barrera de protección durante la distribución del alimento y alargando con ello su vida de anaquel. Un empaque se define, precisamente, como una barrera pasiva que retarda los efectos adversos del ambiente sobre el alimento almacenado. En la industria alimentaria existen empaques primarios, secundarios y terciarios, siendo el empaque primario al cual se hace alusión en este proyecto. Este empaque es el que tiene contacto directo con el alimento y que, por ende, debe ser atóxico, compatible con el alimento y debe también evitar el inducir cambios a su color, olor y sabor. El uso indiscriminado de empaques en la industria ha ocasionado ciertos problemas ecológicos, por lo que surge la necesidad de reducir el uso de materiales no renovables para la manufactura de empaques. Para ello, se han promovido las investigaciones respecto a empaques con menor impacto ambiental, impulsando industrialmente la búsqueda de alternativas para la elaboración de empaques “amigables con el ambiente”. En este sentido, en los últimos años el uso de biopolímeros como el colágeno, la celulosa y el quitosano para la fabricación de películas se ha visto en aumento, debido a su bajo costo y a que son biodegradables. La biodegradabilidad se refiere a todo proceso irreversible que produzca cambios en las propiedades de un polímero debido a las acciones de microorganismos, tales como bacterias, hongos y algas. La velocidad de degradación depende, además, de la composición del alimento, la temperatura, la humedad y del número y el tipo de microorganismos. En trabajos anteriores se estudió la biodegradación de empaques activos a base de cazón, y se observó que el tiempo de degradación es menor en las películas de cazón en comparación con las películas plásticas. Los empaques creados a partir de biopolímeros dan un enfoque innovador, al ser ecoamigables con el ambiente por su capacidad de biodegradarse con mayor velocidad que los empaques sintéticos. Los empaques activos a partir de biopolímeros se obtienen a partir de un material bioplástico y adicionándole un agente químico con el fin de prolongar su vida de útil y la seguridad de los alimentos al proveer una barrera inerte a las condiciones externas, que de otra manera interactuarían con el alimento. Por tanto,

la producción de empaques activos con actividad antioxidante o antimicrobiano a través de proteínas obtenidas de la piel de cazón resulta beneficioso para la industria alimentaria, ya que la piel de cazón se considera como un subproducto en la industria pesquera. El aprovechamiento de este residuo para la elaboración de empaques activos no solo tendría un importante impacto ambiental al reducir la cantidad de desechos pesqueros y disminuir el uso de plásticos en la industria alimentaria, sino que también se lograría un empaque innovador con doble función.

Objetivos

Objetivo general

Obtener una película proteínica multifuncional con capacidad antioxidante y antimicrobiana a partir de la piel de cazón, para usarla como empaque primario activo en alimentos.

Objetivos particulares

- Conocer el efecto antioxidante que presentan las películas activas unidas covalentemente por vía enzimática a la quercetina.
- Conocer el efecto antimicrobiano que presentan las películas activas con la adición de nisina.
- Establecer el efecto sinérgico del antioxidante y del antimicrobiano en las películas activas.

1. Marco teórico

1.1. Cazón

El cazón es tiburón de talla pequeña (Figura 1-1), generalmente menor de 1.50 m y que habita en el océano Atlántico. Esta especie se distribuye desde la costa del norte de Estados Unidos hasta el sureste de Brasil, incluyendo las Bahamas y Cuba (Compagno, 1984).



Figura 1-1 Cazón

Referencia: <https://www.lukor.com/wp-content/uploads/2015/09/Caz%C3%B3n.jpg>
(marzo,2018)

El cazón habita aguas costeras y eventualmente penetra aguas interiores para el alumbramiento. Según las estadísticas pesqueras oficiales, 62% de las capturas de tiburón y cazón provienen del litoral del Pacífico Mexicano y 38% del Golfo de México y Caribe mexicano (NOM-029, 2007).

En México, la captura de tiburón constituye una importante actividad económica, social y alimenticia. El tiburón y cazón, por sus volúmenes, se encuentran posicionados en el lugar 10 de la producción pesquera en México. El cazón es una de las especies más explotadas por la pesquería en México, particularmente en los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche y Yucatán (Márquez, 1998), (CONAPESCA, 2014).

En los últimos años, de 2014 a 2016, en el estado de Nayarit la producción pesquera aumentó, destacando la captura de tiburón y cazón, al pasar de 2,038 tons. en 2014 a 7,058 tons. en 2016 (CONAPESCA, 2014).

1.2. Colágeno

El colágeno es el principal componente del tejido conectivo y es la proteína más abundante en el organismo. El colágeno garantiza la cohesión, elasticidad, textura y la regeneración de la piel (Bailey, 1972). La cantidad de colágeno muscular depende de factores genéticos, nutrición, edad del animal y localización anatómica de los músculos.

Los polipéptidos se designan como α entrelazados entre sí, formando finalmente una estructura de triple hélice de 280 nm de largo y 1.4-1.5 nm de ancho. Esta estructura se encuentra unida mediante enlaces de hidrogeno, constituyendo una unidad macromolecular denominada tropocolágeno, en donde los residuos de glicina se agrupan en el centro (Devlin, 1988).

La proporción de los aminoácidos del colágeno es bastante particular. La glicina representa, en moles, aproximadamente 1/3 de los aminoácidos presentes. También contienen cantidades muy elevadas de prolina y de hidroxiprolina (hasta el 10%), y contiene hidroxilisina. Una característica notable del colágeno es la presencia de residuos de glicina en cada tercera posición de la parte de triple hélice de la cadena alfa (Garrido, 2006). Esto es necesario porque la glicina es el único aminoácido suficientemente pequeño como para adecuarse en el espacio limitado disponible en el centro de la triple hélice.

Los aminoácidos mencionados se caracterizan por su hidrofobicidad y, en consecuencia, las fibras de colágeno son insolubles en agua. La molécula de colágeno posee dos aminoácidos poco frecuentes en las proteínas. La hidroxiprolina es el residuo de aminoácidos producto de la hidroxilación de la prolina, que incrementa la estabilidad térmica del colágeno por sus cadenas adyacentes,

siempre y cuando esté en la posición Y del triplete (Ramshaw, 1998). La prolina y la hidroxiprolina confieren rigidez a la molécula de colágeno.

Se han identificado 26 tipos de colágeno, constituidos por más de 30 cadenas polipeptídicas que se caracterizan por diferencias en sus propiedades físicas, debidas a la secuencia de aminoácidos (Sato, 2002). Algunos de ellos solo están presentes en pequeñas proporciones, pero tienen funciones importantes en determinadas funciones físicas. En la Tabla 1.1 se observan algunos ejemplos y su distribución.

Tabla 1.1 Distribución anatómica de algunos tipos de colágeno

Fuente: tabla acopla de (Pedraza, 2008)

Tipo	Distribución
I	Es la forma más abundante. Se observa en casi todas las regiones del cuerpo humano. Dermis, hueso, tendón y cornea.
II	Cartílago y humor vítreo.
III	Piel, pulmón y tejido vascular.
IV	Membranas basales.

1.2.1. El colágeno en la industria

El colágeno es la proteína más abundante en los vertebrados, ya que constituye al menos 30 % de las proteínas totales (Gelse, 2003). Sus aplicaciones han aumentado en los últimos años, principalmente como recubrimiento de alimentos, emulsificante y cicatrizante de heridas.

Las principales materias primas de la industria del colágeno son la piel de cerdo, el cuero de bovino y los huesos de estos animales. Sin embargo, la utilización de tales precursores presenta dificultades porque existe la posibilidad de transmisión de

enfermedades como encefalopatía espongiiforme bovina (Wong, 1999), (Nagai, 2004). Por ello, surge la necesidad de buscar alternativas para su obtención.

La producción de colágeno a partir de organismos acuáticos se ha incrementado considerablemente, ya que por su origen representan una fuente alternativa a los animales terrestres. En la industria pesquera, a partir del proceso de fileteo, se generan residuos como piel, escamas y espinas que tienen impacto ambiental porque genera desechos. A pesar de ello, el colágeno proveniente de pieles de pesquería presenta características apropiadas para elaborar películas. Esto ha motivado estudios para obtener colágeno de estos residuos. Sin embargo, se tiene que tomar en cuenta que la concentración de colágeno y de aminoácidos en músculo varía dependiendo de la región de la cual provenga el pescado, afectando la estabilidad térmica del colágeno (Sikorski, 1984). Un mayor contenido de colágeno fue encontrado en especies con temperaturas más elevadas. También se ha reportado que los niveles de colágeno insoluble son mayores que el soluble (Ando, 2001).

1.3. Empaque

Un empaque es todo producto fabricado con materiales de diversa naturaleza que se utiliza para contener, proteger, manipular, distribuir y presentar mercancías (Povea, 2015). La función más importante de un empaque es proveer al consumidor productos diversos en excelentes condiciones de conservación; en el caso de los alimentos, se trata de proporcionar un alimento de igual calidad a la de los productos frescos o recientemente preparados. Debido a su excesivo uso en la industria de la alimentación, los envases constituyen casi dos tercios del volumen total de sus residuos.

La elección de un empaque apropiado depende de varios principios básicos y, entre estos, es necesario tomar en cuenta la composición química del producto, las condiciones climáticas (humedad, temperatura, luz, aire), el riesgo de contaminación (bacterias, roedores), el riesgo de daños físicos (manipulación,

transporte, almacenamiento, ruptura) y otros factores (precio, disponibilidad de materiales de envasado, asuntos legales) (Povea, 2015).

Los empaques pueden clasificarse de acuerdo con su nivel, en primarios, secundarios y terciarios (Povea, 2015).

- Empaques primarios, aquel que se encuentra en contacto directo con el alimento, destinado a contenerlo desde su fabricación con la finalidad de protegerlo de agentes externos.
- Empaques secundarios, es el artículo diseñado para dar protección adicional al alimento en envase primario o para agrupar un número determinado de envases primarios.
- Empaques terciarios, fue diseñado para facilitar la manipulación y el transporte de varias unidades de envases primarios o secundarios para proteger durante la manipulación física y que el producto llegue al mercado destino.

Cualquier elección de material de empaque debe basarse en el conocimiento exacto de las sensibilidades específicas del producto. Las características mecánicas que deben poseer los materiales de empaque se enlistan en la Tabla 1.2. Su función es la de evitar alteraciones como reacciones oxidativas, pérdida o ganancia de humedad, pérdida o absorción de compuestos volátiles, contaminación por microorganismos, absorción, migración y problemas por acción de la luz (Rodríguez , 2007).

Tabla 1.2 Las características principales de los materiales de empaque para alimentos

Fuente: (Rodríguez, 2007)

Características de los empaques
Grado alimenticio
Permeabilidad al vapor de agua
Permeabilidad al agua
Permeabilidad a los gases
Permeabilidad a los aromas (no debe de impartir aromas, ni sabores)
Protección a la luz
Permeabilidad a los gases
Características mecánicas adecuadas

1.3.1. Empaque activo

Un empaque activo se define como aquel sistema que además de dar protección al alimento, interactúa positivamente con el producto al aumentar su vida de anaquel, mantiene su calidad microbiológica y nutricional, mejora la seguridad y sus atributos sensoriales (Ozdemir, 2010). La demanda de empaques activos se encuentra en crecimiento debido a las necesidades que se generan en la actualidad.

Como beneficio a la logística y a la distribución de los productos, un empaque aumenta su vida de anaquel. Los empaques activos de los últimos años presentan propiedades antimicrobianas y, con ello, permiten controlar el crecimiento microbiano, especialmente de patógenos. En algunos casos también se han presentado empaques con efectos antioxidantes, retardando la oxidación de lípidos y alargando la vida de anaquel de los productos.

1.3.1.1. Empaques activos con efecto antioxidante

La incorporación de antioxidantes a las películas tiene como función producir empaques activos que permitan mejorar la estabilidad, funcionalidad y seguridad de los alimentos recubiertos con estos materiales, conservando la calidad del producto. Cuando se forma la película activa con efecto antioxidante, el antioxidante se debe unir a la cadena proteínica por medio de un enlace covalente. Esta reacción se lleva a cabo por medio de la enzima peroxidasa, que provoca la activación mediante la formación de un radical libre en una o varias partes de la proteína y otro en la molécula del antioxidante, y estos se estabilizan mediante una reacción de terminación de radicales libres (Jongjareonrak, 2008).

Existen dos mecanismos de acción que explican los efectos de los empaques con antioxidantes. En el primero, el antioxidante secuestra a los componentes que producen la oxidación, como los radicales libres o iones metálicos. Los secuestradores son sustancias que no están involucradas en ningún paso del proceso de oxidación y no se liberan hacia el alimento. El segundo se debe a la adición de antioxidantes en las películas biopoliméricas, que, pueden migrar hacia los alimentos líquidos y sólidos, protegiéndolos al retardar la oxidación lipídica (Han, 2013).

1.3.1.2. Empaques activos con efecto antimicrobiano

La adición de agentes antimicrobianos en los empaques tiene el propósito de, además de proteger al alimento del ambiente externo, mejorar su calidad y seguridad del alimento, inhibiendo o retrasando el crecimiento de microorganismos. Estos agentes pueden ser incorporados de manera directa en los materiales de empaque (Han, 2013).

El tipo de microorganismos que producen la alteración de los alimentos depende principalmente del medio ambiente porque ésta depende de manera importante del pH y humedad del alimento en cuestión. En la Tabla 1.3 se muestran diferentes agentes antimicrobianos utilizados en películas activas.

Tabla 1.3 Algunos agentes antimicrobianos utilizados en la formación de películas activas

Fuente: Tabla acoplada de (Suppakul, 2003).

Clase	Ejemplos
Ácidos orgánicos	Benzoatos, sorbatos,
Bacteriocitas	Nisina
Extractos de especies	Timol, p-cimeno
Tiosulfínatos	Alicina
Enzimas	Peroxidasa, lisozima
Proteínas	Conalbumina
Isotiocianatos	Isotiocianato de alilo
Antibióticos	Imidazol
Fungicidas	Benomil
Agentes quelantes	EDTA, Lactoferrina, Citrato
Metales	Plata
Parabenos	Etil parabeno
Alcoholes	Etanol

La incorporación de agentes antimicrobianos en las películas cambia significativamente las características funcionales de los materiales de empaque (Ouattara, 1997). Esto no quiere decir que se afecten las propiedades de barrera en las películas, como la permeabilidad a los gases y al vapor de agua (Maizura, 2007).

Para la utilización de un agente antimicrobiano en una película se debe de cumplir con ciertos requisitos:

- El revestimiento debe tener una buena adherencia al sustrato de la película para evitar que se pierda, en todo o parte, durante la manipulación y el almacenamiento.
- La interacción molecular biopolímero-antimicrobiano debe permitir la liberación gradual del agente.

1.3.2. Plastificantes en empaques activos

Los plastificantes son componentes importantes en la formación de empaques activos, y estos son sustancias no volátiles con alto punto de fusión que, cuando son adicionadas a un material, modifican sus propiedades físicas o mecánicas (Banker, 1996). El plastificante debe de ser miscible con el polímero (Bertuzzi, 2002).

Los plastificantes más usados en la elaboración de filmes y revestimientos comestibles son el sorbitol y el glicerol, que interactúan con los puentes de hidrogeno, reduciendo las fuerzas intermoleculares a lo largo de las cadenas del polímero y mejorando en ellos sus propiedades mecánicas como la flexibilidad, la fuerza y la resistencia (Kester, 1986), (McHught, 1994).

El sorbitol (Figura 1-2) es un poliol, estructuralmente cuenta con seis carbonos y seis grupos hidroxilo. En la industria alimentaria se emplea para controlar la aw, actúa como humectante, mejora la rigidez y plasticidad y también se caracteriza por tener gran resistencia frente a microorganismos. El glicerol (Figura 1-3), es el plastificante más utilizado para la elaboración de películas debido a que es muy estable, mejora la flexibilidad y elongación de la película y le imparte una permeabilidad mayor al vapor de agua (Jogjareonrak, 2006).

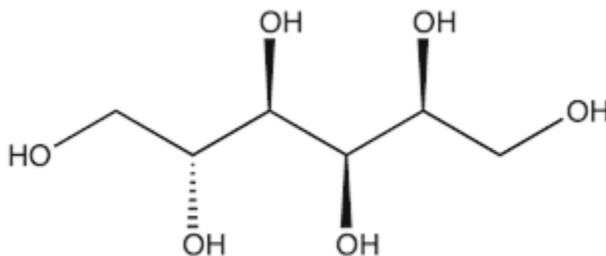


Figura 1-2 Estructura química del sorbitol

Fuente: http://www.sweetenerbook.com/sorbitol_2.html (marzo,2018)

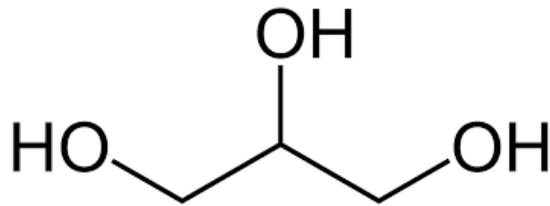


Figura 1-3 Estructura química del glicerol

Fuente: <https://www.bekiabelleza.com/tratamientos/beneficios-glicerina/>

(marzo,2018)

Si bien el sorbitol, combinado con el glicerol, aumenta la permeabilidad al vapor de agua y la resistencia mecánica de los empaques, se busca un efecto intermedio y equilibrado para que el sorbitol no reduzca completamente la flexibilidad que aporta el glicerol (Chick, 1998).

1.4. Biopolímeros para empaques

Se entiende como biopolímeros a todos aquellos polímeros producidos por la naturaleza, siendo, de la misma forma, biodegradables y biocompatibles (Luengo, 2003). Los biopolímeros usados en los empaques deben de cumplir con la legislación de alimentos y empaques, manteniendo la calidad del alimento y sin afectar la inocuidad y los factores nutricionales y sensoriales del producto.

Los materiales de fuentes renovables deben mantener sus propiedades mecánicas y de barrera, así como funcionar adecuadamente durante el almacenamiento. Idealmente, debe biodegradarse eficientemente.

Dependiendo de su procedencia, los biopolímeros forman estructuras continuas que pueden ser cristalinas o amorfas. Éstas actúan de distinta manera, evitando que diversas sustancias interactúen con el alimento y previniendo algún deterioro del mismo. Los biopolímeros se clasifican en dos tipos: los provenientes directamente de organismos vivos y los que requieren ser sintetizados, pero cuya procedencia es

de un recurso renovable (Tang, 2012). El primer tipo incluye a proteínas, polisacáridos y lípidos. En el segundo tipo se encuentra el ácido poliláctico (PLA), así como algunos poliésteres producto del metabolismo de bacterias (polihidroxicarbonos).

1.4.1. Empaques proteínicos

Las proteínas fibrosas, particularmente el colágeno y la gelatina, han tenido mayor importancia en la producción de películas. Generalmente, se forman a partir de soluciones proteínicas en concentraciones de 5-10 %, solubilizadas o dispersas en solventes volátiles, tales como agua, etanol o mezclas etanol-agua (Krotcha, 2002).

Los biopolímeros proteínicos forman redes macromoleculares tridimensionales que se estabilizan mediante interacciones electrostáticas, puentes de hidrogeno y fuerzas de Van de Waals. Las propiedades de cada uno dependerán de la cantidad de aminoácidos constituyentes y de su ubicación dentro de las proteínas. (Mauri, 2008).

1.5. Biodegradación

La American Society for Testing and Materials (ASTM D- 5488-944) define a la biodegradabilidad como a la capacidad de un material de descomponerse en CO₂, metano, agua y componentes orgánicos, o biomasa, en donde el mecanismo predominante es la acción enzimática de microorganismos.

Los polímeros biodegradables pueden ser definidos como aquellos que experimentan, por inducción microbiológica, una ruptura de la cadena principal por oxidación, e hidrólisis. Estas modificaciones son la razón del cambio en el polímero durante el proceso de degradación.

1.5.1. Embalajes biodegradables

Los embalajes biodegradables provienen de fuentes renovables, con características de barrera semejantes a los plásticos derivados del petróleo. La biodegradación de un material depende de su estructura química. Los biopolímeros, como los obtenidos de la soja, se degradan rápidamente en comparación con los plásticos con una tasa estimada de 10 a 33 días (Dalev, 2000), (González, 2011) y la de un plástico derivado del petróleo es superior a los 30 años (Yamada-Onodera, 2001).

Los embalajes biodegradables fortalecen o sustituyen capas naturales del alimento para prevenir pérdidas por humedad y, además, permiten el intercambio controlado de gases. La naturaleza de los recubrimientos depende en parte de la naturaleza de los compuestos y estos embalajes suelen activarse mediante la adición de compuestos activos o bioactivos (Campos, 2011).

1.6. Aditivos alimentarios

Se define como aditivo alimentario a cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, ya sea que tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento es con fines tecnológicos.

1.6.1. Agentes antioxidantes

Los antioxidantes son definidos como agentes externos, presentes en una concentración menor al sustrato oxidable y que actúan en diferentes pasos de la oxidación, dependiendo de su mecanismo de acción, pueden retrasar significativamente la oxidación del sustrato e incluso corregir el daño causado por la oxidación.

Pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura química y a su origen bioquímico (Delgado, 2010). Los antioxidantes se separan en dos grupos: los primarios y los secundarios.

- Antioxidantes primarios: este grupo dona radicales hidrógenos a los radicales libres con el fin de terminar la cadena de reacciones formando compuestos estables. Entre estos se encuentran compuestos fenólicos (BHT, BHA, Tocoferoles, Flavonoides).
- Antioxidantes secundarios o sinergistas: tienen la función de descomponer los lipoperóxidos en compuestos más estables o finales. Entre ellos se encuentran el ácido tiodipropiónico (TDPA) y ésteres de TDPA.

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes o por adsorción de radiación UV (Shahidi, 1996).

1.6.1.1. Antioxidantes en los alimentos

Los antioxidantes utilizados en la industria de alimentos deben de contar con una serie de requisitos: deben de ser efectivos a concentraciones bajas, compatibles con el sustrato, no deben afectar sensorialmente al producto, deben de ser inocuo y no deben de afectar a las características físicas del alimento.

1.6.1.1.1. Quercetina

La quercetina (3,3,4,5,7- pentahidroxi flavonoide) es un flavonoide caracterizado como polifenol debido que contiene varias unidades estructurales de fenol como se muestra en la Figura 1-4. La quercetina tiene una presencia abundante plantas, diversos vegetales, frutas y semillas.

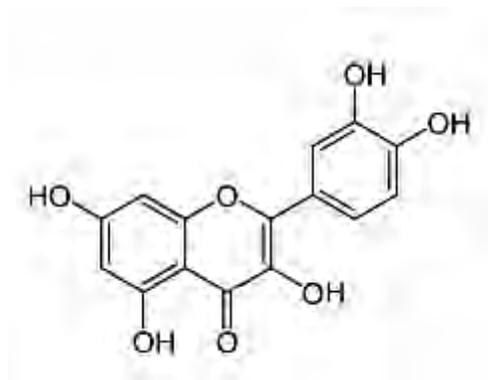


Figura 1-4 Estructura química de la quercetina

Fuente (Marunaka, 2017)

Entre los beneficios que los flavonoides aportan a la salud se encuentran actividades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, cardiotónicas, vasculares, que disminuyen el colesterol y contribuyen a la protección del hígado. (Robards, 1999). La quercetina muestra actividad antioxidante a través de la quelación de metales de iones metálicos, de la eliminación de radicales libres, protegiendo contra la oxidación lipídica y modulando la actividad de ciertas enzimas (Laughton, 1991).

1.6.2. Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son empleados con la finalidad de mejorar la calidad y la seguridad del alimento mediante la reducción de la contaminación superficial, pero no son sustituto de las buenas prácticas de manufactura e higiene.

Cabe destacar que, sin ellos, la mayoría de los alimentos sufriría alguna clase de deterioro. La mayoría de los agentes antimicrobianos inhiben el crecimiento sin matar a los microorganismos, debido a que amplían la fase de adaptación.

Los agentes antimicrobianos en ocasiones son llamados conservantes. Sin embargo, un conservante es un término más amplio que un antimicrobiano. Los conservantes incluyen agentes antipardeamiento, conservadores, estabilizadores, etc (Matthews, 2009).

1.6.2.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo relativamente heterogéneo de proteínas de secreción, sintetizadas a nivel ribosómico por bacterias con actividad antimicrobiana. (Papagianni, 2003). Están conformadas por puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres y cuentan con puntos isoeléctricos en un intervalo de pH de 8.6 a 10.4 (Cotter, 2005). La mayoría de las bacteriocinas son efectivas contra microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos. Las bacteriocinas son transportadas al exterior de la célula por proteínas del sistema ABC, que usan ATP como fuente de energía.

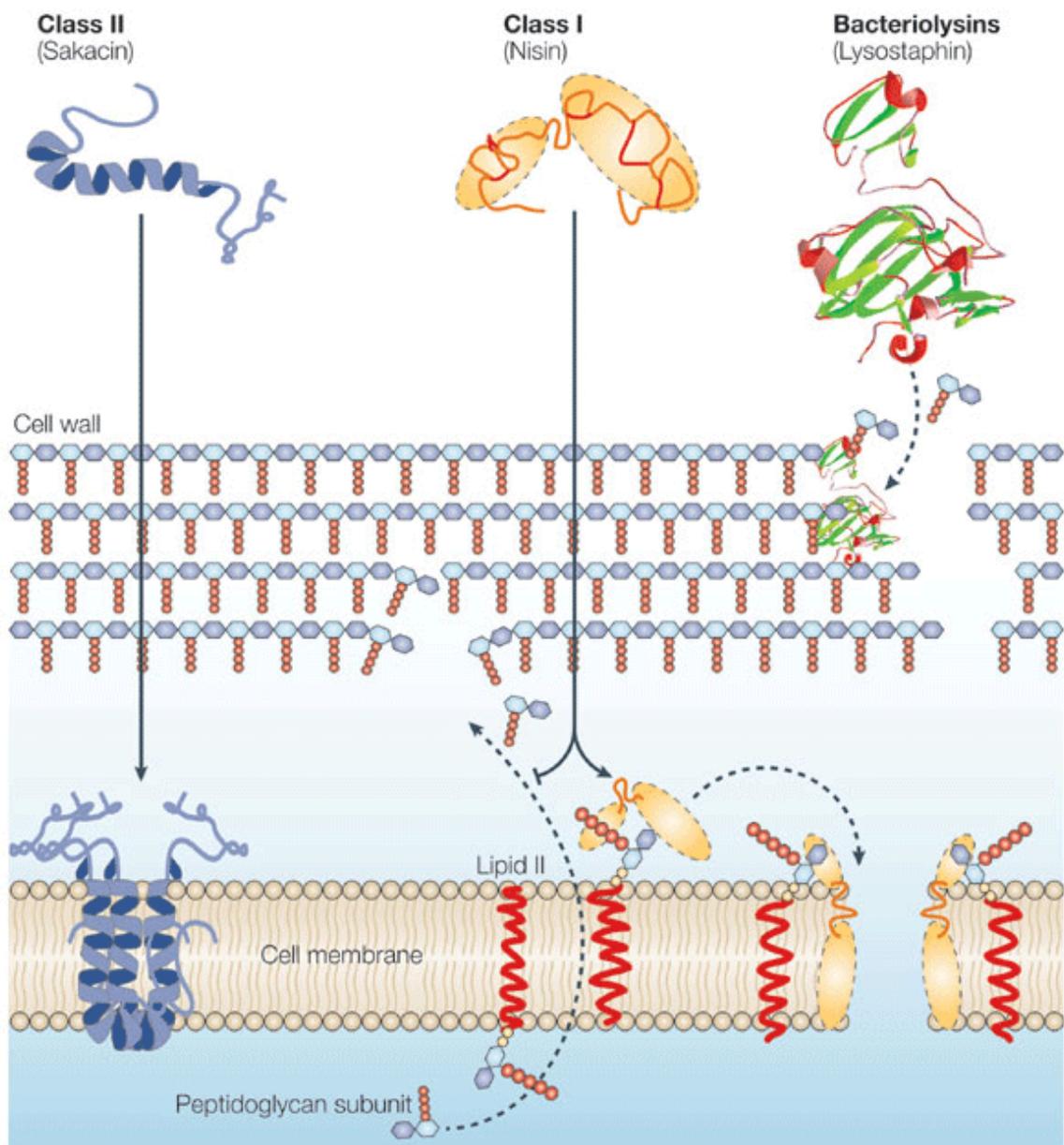
1.6.2.1.1. Nisina

La nisina es la primera bacteriocina BAL (Bacterias Ácido Lácticas), reportada en 1928 (Rogers, 1928). Se trata de una bacteriocina clase I (Lantibiótico), y esta clasificación hace referencia a los péptidos activos a nivel membrana. En general, la nisina es un polipéptido que contiene 34 aminoácidos de bajo peso molecular (menor a 5 kDa) y contiene aminoácidos pocos comunes como β -metil-lantotionina y dehidroalanina. Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos como un aditivo en procesos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas (Daeschel, 1969).

El uso de la nisina en los materiales de empaque ha tenido mucho interés en los últimos años (Ming, 1997). Es la única bacteriocina que posee el estatus de GRAS, que significa que es un organismo generalmente reconocido como seguro para la salud, debido a la inhibición que ejerce sobre las esporas botulínicas en muchos alimentos.

1.6.2.1.1.1. Mecanismo de acción de la nisina

El mecanismo de acción de la nisina (Figura 1-5) apunta a una perturbación en la membrana celular de los microorganismos sensibles, ocasionada por la unión de la nisina a la pared celular mediante atracciones electrostáticas. Esto se facilita por la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente, la nisina se une al lípido II, el transportador principal de las subunidades de peptidoglicano desde el citoplasma hasta la pared celular. Por tanto, previene la síntesis correcta de la pared celular y provoca la formación de un poro transmembranal, permitiendo la salida de aminoácidos y, en algunos casos, moléculas de adenosina 5'-trifosfato (ATP). El desequilibrio de compuestos a través de la membrana destruye los gradientes requeridos para numerosas funciones celulares vitales, lo que conduce a la muerte celular (Cotter *et al.*, 2005).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Figura 1.5 Mecanismo de acción de nisina

Fuente: (Cotter, 2005)

1.7. Enzima Peroxidasa

Las peroxidasas corresponden al grupo de enzimas oxidorreductasas que se encuentran en una gran variedad de organismos y se involucran en diversos procesos biológicos. Las peroxidasas catalizan múltiples reacciones oxidativas en donde los electrones se transfieren a especies de peróxido (a menudo H_2O_2) y las moléculas de sustrato se oxidan. (Krainer, 2015).

La enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) es una enzima de clase III que, como su nombre lo indica, se aísla de la raíz de rábanos picantes. Esta enzima se halla en diversos compuestos inorgánicos y orgánicos y es una de las enzimas más estudiadas por el potencial que se le puede dar comercialmente en la industria, en la medicina, en la biorremediación y como un producto natural, siendo además de fácil escalamiento (Nigel, 2004).

1.7.1. Catálisis de la HRP y estados redox

La catálisis peroxidativa de la HPR es un proceso cíclico, que puede ser descrito por tres reacciones consecutivas. En la Figura 1-6, HRP-I y HRP-II representan la enzima en su estado oxidativo de HRP, y también hacen referencia a los compuestos I y II, respectivamente, en donde AH_2 es el sustrato reductor y AH^* es un producto de radicales libres.

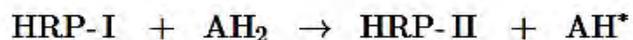
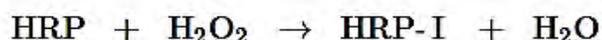


Figura 1-6 Reacción de catálisis de peroxidasa

Fuente: (Krainer, 2015)

1.8. Deterioro en la calidad de los alimentos

Los factores que influyen en la percepción de la calidad del alimento por parte del consumidor incluyen atributos sensoriales, contenido nutricional, precio del alimento y seguridad, esta última relacionada directamente con las alteraciones microbiológicas.

Los cambios químicos que ocurren en los alimentos son los causantes principales de los cambios en la calidad de estos, e incluyen reacciones de obscurecimiento, oxidación, lipólisis y proteólisis. El crecimiento microbiano es el segundo causante del deterioro de la calidad, produciendo un ablandamiento o endurecimiento del producto. Finalmente, los cambios físicos incluyen también el ablandamiento, endurecimiento, pérdida de la capacidad de retención de agua y rompimiento de las emulsiones.

El uso de aditivos en los alimentos es aceptado para mantener o mejorar su inocuidad, su frescura, conservar la calidad nutricional, entre otros, controlando así el deterioro de su calidad que se produce durante el almacenamiento.

1.8.1. Reacciones de oxidación lipídica

La oxidación lipídica es una de las causas principales del deterioro de los alimentos, disminuyendo la calidad nutritiva de estos y limitando su vida de anaquel (Fennema, 2000). La reacción de oxidación de los ácidos grasos insaturados ocasiona enranciamiento y se le considera como el proceso más común e importante de todos, puesto que la sufren prácticamente todas las grasas y aceites comestibles que en su composición incluyan ácidos grasos insaturados (Bello, 2000).

El enranciamiento produce olores y sabores desagradables cuando se descomponen los ácidos grasos polinsaturados, que suelen incluir compuestos secundarios como aldehídos, cetonas y ácidos grasos de cadena corta. Los compuestos formados durante la oxidación pueden ocasionar problemas toxicológicos.

La oxidación lipídica es un término general que se usa para referirse a una secuencia compleja de transformaciones que resultan de la interacción de los lípidos con el oxígeno, la luz, el calor, ciertos metales (hierro y cobre) y algunas enzimas. La oxidación puede darse tanto en ácidos grasos libres como en grupos acilo. La ruta de oxidación comprende tres pasos generales: iniciación, propagación y terminación (Kamal, 2003), que se describen a continuación:

- **Iniciación:** Esta etapa comienza con la substracción de un hidrogeno de un ácido graso para formar un radical de ácido graso conocido como radical alquilo (L^\bullet). Una vez formado, el radical libre se estabiliza por deslocalización a través del o los dobles enlaces, dando como resultado un doble enlace móvil, que en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados conduce a la formación de dobles enlaces conjugados.
- **Propagación:** Consiste en la adición de oxígeno al radical alquílico. El oxígeno triplete es un birradical porque contiene dos electrones con la misma dirección de spin que no pueden coexistir en el mismo orbital.
- **Terminación:** Esta reacción comprende la combinación de dos radicales para formar especies no radicalarias (productos estables que no son radicales). En presencia de oxígeno, la radical libre dominante es el peróxido, ya que el oxígeno se adicionará a los grupos alquilo a velocidades de difusión limitadas.

La oxidación lipídica de los alimentos se puede retardar por medio de la adición de antioxidantes (Yoshida, 1999).

1.9.1.1 Factores que influyen en la oxidación de lípidos

Los alimentos presentan limitaciones en cuanto a su vida útil debidas a diversos factores como la oxidación, crecimiento microbiano y la actividad enzimática. La vida útil no es un periodo fijo y depende de las condiciones en las que se almacene el producto tales como: ambiente, tiempo y propiedades del empaque (Labuza, 1995).

Algunos promotores de la oxidación son: las altas temperaturas, la luz, radiaciones ionizantes, la presión de oxígeno, metales como Cu, Fe y Co y grasas oxidadas (Badui, 2013).

1.10. Avances en el desarrollo de películas biopoliméricas

El desarrollo de películas a partir de materiales biopoliméricos ha ido en aumento durante los últimos años por su biodegradabilidad, por ser compuestos no tóxicos y por ser biocompatibles con otros polímeros (Dutta, 2009). El quitosano, el almidón, la celulosa, proteínas de suero y el colágeno son algunos de los polisacáridos más estudiados en los últimos años debido a sus propiedades mecánicas. La mayoría de ellos provienen de residuos industriales (Martins, 2012), (Hua Xang, 2014). Los antioxidantes naturales y sintéticos son usados en el desarrollo de empaques activos con la finalidad de disminuir su adición a los alimentos directamente, prolongando la vida de anaquel y aumentando la calidad del producto. (Siripatrawan, 2012). La extracción de colágeno de residuos pesqueros no es novedosa, sin embargo, se han optimizado procesos para que el rendimiento de la extracción sea mayor (Rizo, 2014). Por otra parte, se han elaborado películas con diversos antioxidantes, comparando la capacidad antioxidante y haciendo una caracterización de éstas. En la Facultad de Química de la UNAM no solo se han evaluado películas a partir de residuos pesqueros, también, de extractos proteínicos de semillas de cártamo y girasol con actividad antioxidante (García, 2017), piel de pollo y extractos proteicos de semilla de chía con actividad antioxidante.

2. Metodología

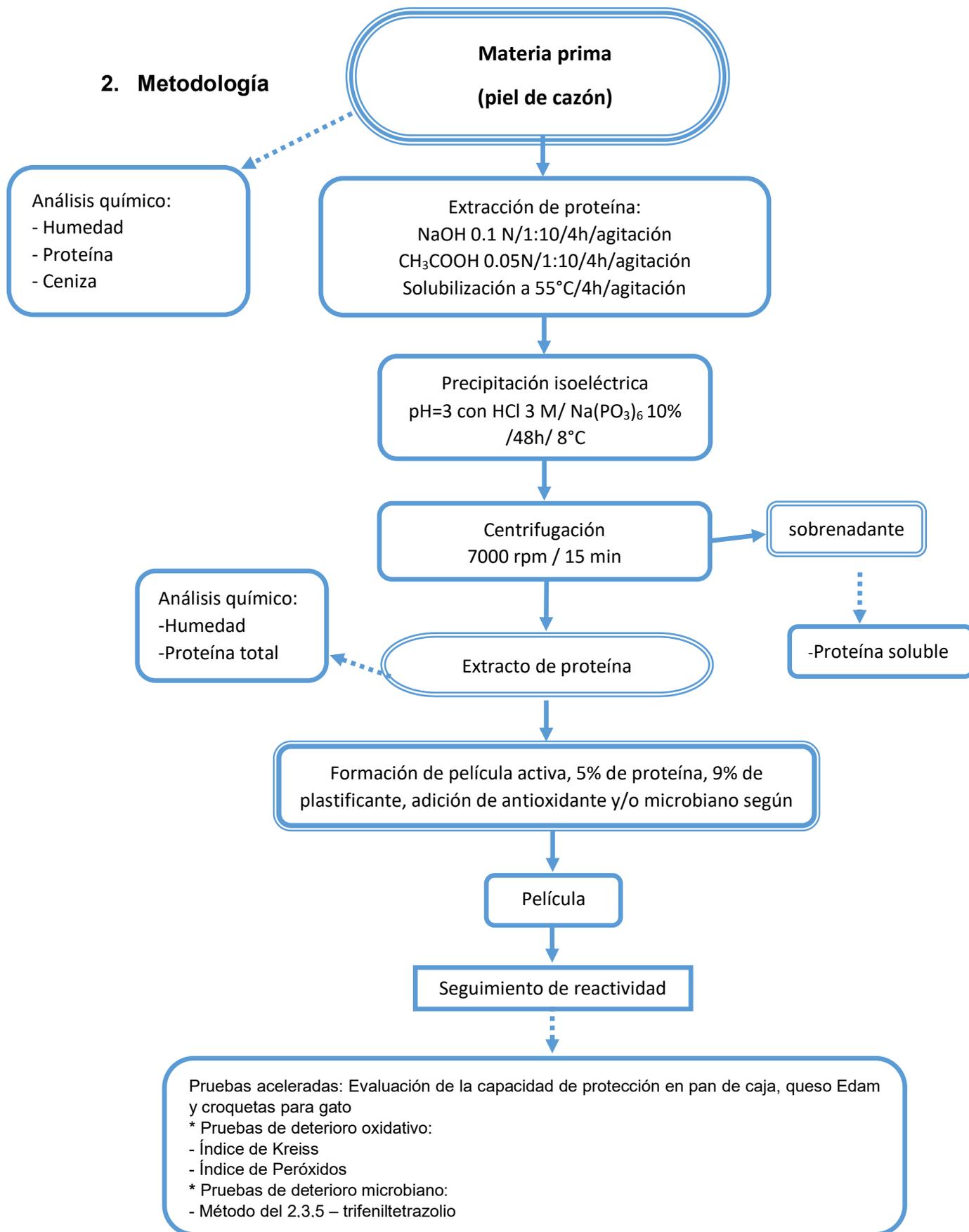


Figura 2-1 Diagrama general

2.1. Caracterización fisicoquímica de la piel de cazón y del extracto proteico (*pellet*)

Con el fin de caracterizar la materia prima inicial y posteriormente evaluar el rendimiento de extracción, se realizó un análisis químico proximal a dos lotes por triplicado. Las pieles fueron cortadas en trozos de 5 x 5 cm, y almacenadas en congelación (-18 °C) hasta el momento de realizar los análisis.

Tabla 2.1 Métodos de cuantificación

Determinación	Método para su cuantificación
Humedad	Estufa al vacío AOAC 925.23
Cenizas totales	AOAC 945.23
Proteína total	Método de Kjeldahl AOAC 920.105

2.2. Extracción del concentrado proteínico (*pellet*)

La extracción de proteína de piel de cazón se realizó según el procedimiento de extracción selectiva para colágeno desarrollado por Limpisophon (Limpisophon, 2009). Se realizaron modificaciones en la temperatura de operación de 69°C a 55°C.

Se pesó 1 kg de piel de cazón, previamente lavada y cortada en trozos de 5 x 5 cm y posteriormente se realizaron lavados a la piel en agua corriente para eliminar el exceso de materia inorgánica.

Posteriormente, la piel se sumergió en una solución alcalina con agitación constante. Esta etapa consistió en eliminar proteínas distintas al colágeno presentes en la piel de pescado. El tratamiento con NaOH concentrado consiste en que el reactivo entre en contacto con las proteínas de los tejidos vivos, produciendo una hidrólisis de los aminoácidos y péptidos más pequeños. Después, se introdujo la piel en una solución de ácido acético (CH₃COOH) al 10% en proporción 1:10 (m/V) con agitación constante. En esta etapa se solubilizó el colágeno presente en la piel, y después se realizó un lavado con agua corriente.

A continuación, la piel se sometió a un tratamiento térmico (55°C) de agua corriente con agitación constante. Se recuperó la parte acuosa y se llevó a un pH=3. Posteriormente, se agregó hexametáfosfato de sodio (NaPO₃)₆ al 10 % y se dejó reposar por un periodo de 12 h para permitir la precipitación de la proteína.

2.3. Elaboración de películas a partir de concentrado proteínico

La elaboración de las películas control se realizó de acuerdo con el procedimiento reportado por Juárez (Juárez, 2016).

Se colocó una parte del concentrado proteínico en un vaso con agua destilada, de tal forma que la concentración de la proteína fuese 5 % (m/V). El vaso se colocó en un baño María con agitación constante y se agregó NaOH 1 M, hasta alcanzar un pH = 8 ± 0.5 para la disolución total del concentrado proteínico. Se agregó una mezcla de plastificantes 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 8 ± 0.5 con NaOH 1 M y se colocó en un baño de agua caliente. Por último, se vació en un molde circular de 20 cm de diámetro y se dejó secar a temperatura ambiente por un periodo de 3 a 5 días.

2.3.1. Elaboración de películas activas

Se desarrollaron tres metodologías para la obtención de las películas activas, que se describen a continuación.

2.3.1.1. Película con actividad antioxidante

En la primera metodología, se desarrollaron las películas mediante la incorporación del antioxidante por vía enzimática, como fue reportado previamente por Juárez S. (2016), cambiando el pH final de la película.

Para la elaboración de la película, se colocó una parte del concentrado de proteína (*pellet*) en un vaso con la mitad de agua del volumen final (70 mL). Posteriormente, esta mezcla se colocó en un baño de agua caliente y se añadió NaOH 1 M hasta llegar un pH de 8 ± 0.5 , para alcanzar la disolución total del concentrado proteínico. Luego, se adicionó el resto de agua y se agregó una mezcla de plastificantes de sorbitol y glicerol al 9 % (V/V) con respecto a la cantidad de proteína del extracto obtenido, agitando hasta su completa disolución. Una vez disuelto, se ajustó nuevamente el pH de 8 ± 0.5 con NaOH 1 M. Posteriormente, se disolvió 1 mg de antioxidante (quercetina) en 6 mL de EtOH. Se disolvieron 0.1 mg de la enzima en 1 mL de agua, el antioxidante, la enzima y la mezcla de proteína y plastificantes en un matraz de bola. La reacción inició al agregar 30 μ L de H₂O₂ (5%) cada 10 minutos, durante 1 h. Transcurrido el tiempo, la mezcla se vació en un molde circular de 20 cm de diámetro y se dejó secar a temperatura ambiente durante una semana.

2.3.1.2. Película con actividad antimicrobiana

En la segunda metodología, se desarrolló con base a lo reportado previamente por Arizmendi (Arizmendi, 2016). Ésta es una película con efecto antimicrobiano en donde la nisina se incorporó en una concentración de 500 ppm a la disolución de plastificantes al 9 % (V/V) y proteína al 5% (m/V). La elaboración de esta película se llevó acabo de la misma forma que la de película control, se aseguró que el pH fuera de 8 ± 0.5 y que la temperatura estuviera en 25 °C, ya que a una temperatura y pH mayores se puede inhibir el efecto antimicrobiano de la nisina. A continuación, se vació la mezcla en un molde circular de 20 cm de diámetro y se dejó secar a temperatura ambiente durante una semana.

2.3.1.3. Película con actividad antioxidante y antimicrobiana (multifuncional)

Para la tercera metodología, se utilizó el mismo procedimiento que para efectuar la película con actividad antioxidante (2.3.1.1). Posteriormente, se almacenó hasta que la temperatura descendiera a 25°C para poder incorporar la nisina en una

concentración de 500 ppm y se vertió sobre un molde circular de 20 cm de diámetro. Al igual que las anteriores, se dejó secar a temperatura ambiente durante una semana.

Tabla 2.2 *Formulación de películas*

Película	Formulación
Control	5 % (m/V) proteína 9 % (V/V) plastificante
Antioxidante	5 % (m/V) proteína 9 % (V/V) plastificante 200 ppm quercetina
Antimicrobiana	5 % (m/V) proteína 9 % (V/V) plastificante 200 ppm nisina
Multifuncional (antimicrobiana y antioxidante)	5 % (m/V) proteína 9 % (V/V) plastificante 200 ppm quercetina 200 ppm nisina

2.4. Evaluación de la capacidad protectora, deterioro microbiano y oxidativo

Se manejaron tres matrices alimentarias: pan multigrano artesanal, queso Edam y croquetas para gatos, que fueron empacadas en los diferentes empaques en porciones de 10 g cada uno y se termosellaron. Los sacos fueron almacenados durante 28 días a una temperatura de 22°C y una humedad de 60%.

2.4.1. Determinación directa de la carga microbiana (método del 2,3,5-trifeniltetrazolio)

Este método se reportó previamente por Arizmendi (Arizmendi, 2016). Se mezclaron 5 g de muestra del producto y 30 mL de agua destilada esterilizada y se homogeneizaron. Posteriormente, se agregaron 0.5 mL de una disolución de trifeniltetrazolio al 0.5% y 5.0 mL de una solución de buffer de fosfatos a pH = 7. Se incubó a 38°C durante 7 h, para extraer el formazán, obtenido por centrifugación con 30 mL de alcohol isobutílico. Finalmente, se determinó su concentración por espectroscopia UV/Vis, mediante absorbancia a una $\lambda = 485$ nm.

La curva de calibración se obtuvo mediante la reacción de reducción de 1 g de trifeniltetrazolio con 1 g de ácido ascórbico. Se añadieron 5 mL de NaOH al 10% y se llevó al aforo con un volumen de 25 mL con agua destilada. Se dejó reposar la disolución durante 20 minutos, se neutralizó, se filtró y se lavó el formazán formado sobre el papel filtro. Se secó a 37°C. Se prepararon las diluciones necesarias en butanol y se leyó la absorbancia a 485 nm.

2.4.2. Extracción del aceite

Se pesaron (5.0-5.5) g de muestra del producto empacado y se agregó hexano en una relación 1:5. Se mantuvo en agitación constante durante 30 min. Se dejó sedimentar y se filtró. Se repitió dos veces más el procedimiento y se recolectaron los filtrados. El disolvente se evaporó en un baño de agua a 40°C en una campana de extracción.

2.4.2 A) Determinación del índice de Peróxidos (método colorimétrico)

El seguimiento de índice de peróxidos se realizó mediante un método colorimétrico basado en la oxidación del Fe(II) a Fe(III) por los peróxidos contenidos en la muestra. Posteriormente, el producto con Fe(III) se cuantificó por su reacción con tiocianato de amonio.

Para el ensayo, se pesaron 0.001-0.1 g del aceite extraído del pan multigrano, del queso Edam y de las croquetas para gato. Cada aceite se disolvió en una mezcla de diclorometano/metanol en una proporción de 70:30. Posteriormente, se adicionaron 0.05 mL de una disolución de tiocianato de amonio al 30% y se determinó la concentración de tiocianato de hierro(III) por espectroscopía UV/Vis, midiendo la absorbancia a $\lambda = 500$ nm, frente a un blanco de los reactivos.

Después, se agregaron 0.05 mL de una disolución de cloruro ferroso (FeCl_2) al 0.35% en HCl 0.2 M. Se mezcló y, después de exactamente 5 min, se realizó una segunda lectura a 500 nm.

2.4.2 B) Determinación del índice de Kreis

En el ensayo del índice de Kreis (IK) se basa en el desarrollo y medición de una coloración roja. Ésta se forma al reaccionar el floroglucinol en medio ácido con las grasas oxidadas y cuya intensidad aumenta con el deterioro de éstas, debido principalmente a la presencia de aldehído malónico y aldehído epihidrínico.

Se disolvieron de 50 a 500 mg de grasa (extraída de cada producto) en 5 mL de diclorometano. Posteriormente, se añadieron 10 mL de una solución de ácido tricloroacético al 30% en ácido acético glacial y 1 mL de floroglucinol al 1% en ácido acético. Se puso en incubación con agitación contante en baño maría a 45 °C durante 15 min. A continuación, se dejó enfriar y se agregaron 4 mL de etanol. Finalmente, se midió la absorbancia de la muestra a $\lambda = 540$ nm frente a un blanco de reactivos.

2.5 Análisis estadístico

Las determinaciones se realizaron por triplicado y se expresaron como valor promedio \pm su desviación estándar.

La evaluación del seguimiento de las capacidades antimicrobiana, antioxidante y sinérgica se efectuó a través de un análisis estadístico utilizando el software StatAdvisor®. Se realizó un análisis de varianza ANOVA y un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras mediante el método (LSD) de Fisher, empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa. Con este método se estableció un riesgo del 5.0% de decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando en realidad no lo son.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de la piel de cazón

Se realizó el análisis químico de la piel de cazón (Figura 3-1), a partir de la cual se extrajo el concentrado proteínico con el fin de conocer su composición y posteriormente evaluar su rendimiento cuando se forme el comprimido de proteína.



Figura 3-1 Piel de cazón

La determinación de humedad, proteína total y cenizas se efectuó por triplicado, mediante la metodología establecida por la AOAC, en el lote 1 y en el lote 2.

Tabla 3.1 Composición química porcentual de la piel de cazón

Componente	Proteína	Humedad	Cenizas
Lote 1	39.7	38.8	6.7
Lote 2	39.2	38.5	5.5
Promedio	39.4 ± 0.3	38.7 ± 0.2	6.1 ± 0.6

En la Tabla 3.1 se observa que el componente mayoritario en la piel de cazón es la proteína, siendo el contenido de proteína total 39.4 ± 0.3 g/100 g y fue determinado por el método de Kjeldhal, utilizando el factor de conversión estándar 6.25. El valor reportado en la literatura para el contenido de proteína de cazón es de 24.75 % (Kittiphattanabawon, 2010). La composición

proximal de la piel de cazón varía por razones intrínsecas, como la edad y el sexo del animal.

3.2. Caracterización del concentrado proteínico (*pellet*)

Los concentrados proteínicos se muestran en la Figura 3-2 A y en la Figura 3-2 B, que fueron obtenidos mediante la extracción proteínica selectiva para colágeno con el método descrito anteriormente. Posteriormente, se caracterizó fisicoquímicamente a través de la determinación de proteína total, cenizas y humedad. Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado. En la Tabla 3.2 se observan los resultados promedio de cada determinación para dos lotes de concentrado.



Figura 3-2 A Concentrado proteínico
(*pellet*)



Figura 3-2 B Concentrado proteínico
(*pellet*)

Por otro lado, tomando en cuenta que para la formación de las películas se requiere de proteína soluble en agua, se evaluó la concentración de ésta en el *pellet* por el método de Biuret. El contenido se indica en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Composición química porcentual del concentrado proteínico (*pellet*) de dos lotes

	Proteína soluble	Humedad	Cenizas
Lote 1	28.6	57.2	1.7
Lote 2	20.6	46.6	2.4
Promedio	24.6 ± 5.70	51.88 ± 7.52	2.1 ± 0.5

En la Tabla 3.2 se observa que el componente mayoritario fue el agua por el alto porcentaje de humedad. El contenido de cenizas fue inferior (2.08%) al valor máximo reportado de 2.6% (Jones, 1977).

El contenido de minerales no impide la formación de la película, pero puede alterar algunas propiedades como el color y la flexibilidad del *pellet*. Sin embargo, el contenido de minerales no tiene que ser considerado como un factor limitante para las aplicaciones del concentrado (Jones, 1977).

La humedad en el concentrado proteínico se debe a la capacidad de retención de agua del colágeno. Esta propiedad se da mediante la estabilización del colágeno por medio de puentes de hidrogeno, que se localizan entre las cadenas y los residuos de aminoácidos entre las moléculas de agua.

3.3. Rendimiento de la extracción

Se determinó el rendimiento de la extracción con el propósito de conocer qué tan eficiente era el método de extracción.

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

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

$$\left(\frac{\text{g de proteína en } \textit{pellet}}{\text{g de proteína en piel}}\right) \times 100\% = \text{rendimiento de extracción}$$

Tabla 3.3. Rendimiento de la extracción

	Proteína obtenida en la piel (g/100g piel)	Proteína obtenida en el <i>pellet</i> (g/100g <i>pellet</i>)	Peso del <i>pellet</i> obtenido (g)	Rendimiento de la extracción (%)
Lote 1	39.7	28.6	451	32.6
Lote 2	39.2	20.6	512	26.9
Promedio	39.4±0.4	24.6 ±5.7	481.50±43.5	30.05± 3.7

Tomando en cuenta que el *pellet* tiene una concentración promedio de 24.61% de proteína soluble y que el rendimiento de la extracción fue de 39.42% las pérdidas que se dieron durante el proceso pudieron ocurrir durante la manipulación de la materia prima, extracción básica, ácida y la precipitación mediante el punto isoeléctrico. Sin embargo, el rendimiento de la extracción de proteína de tiburón es mayor al reportado por (Limpisophon, 2009) reportando un valor máximo de 5.20%. Cabe mencionar que el primer lote pasó por un proceso de congelación y

descongelación en el laboratorio. No obstante, como se muestra en la Tabla 3.3, esto no interfirió con la extracción.

La concentración de colágeno en el músculo de pescado depende de la temperatura del agua en el hábitat (Ando, 2001). El colágeno de peces de agua fría contiene niveles más altos de serina y treonina. La serina y la treonina son aminoácidos con grupos hidroxilo, que propician una mayor estabilidad a la temperatura. Estos aminoácidos se encuentran en mayor concentración en peces de agua fría, peces de agua dulce y mamíferos terrestres (Pati, 2010).

3.4. Formación de películas

El objetivo de la primera parte del experimento fue extraer y lograr la formación de películas a partir de la piel de cazón, con una concentración final de 5 % (m/V) y una mezcla de plastificantes sorbitol y glicerol 9 % (V/V) con respecto a la cantidad de proteína. De esta manera, se creó una interacción proteína-proteína donde quedan retenidos el plastificante y el agua, disminuyendo la interacción proteína-proteína mediante una red tridimensional y presentando en la película final una textura lisa, translúcida, flexible y homogénea. El uso de plastificantes (glicerol o sorbitol) para la obtención de películas biopoliméricas a partir de un concentrado modifican las propiedades mecánicas como la flexibilidad y la retención de agua (Bourtoom, 2008.). En la Figura 3-3 se observa la película control (cazón), tal como se esperaba obtener: translúcida, lisa, flexible y homogénea.



Figura 3-3 Película de cazón



Figura 3-4 Película de cazón con quercetina



Figura 3-5 Película de cazón con nisina



Figura 3-6 Película de cazón con quercetina y nisina

En la Figura 3-4 se muestra la película activa formada por la unión entre una porción de concentrado de proteína y la quercetina mediante un enlace covalente vía enzimática. Como resultado, se obtuvo una película lisa, flexible, homogénea y con una ligera coloración amarilla. En la Figura 3-5 se muestra la película activa formada por la unión entre una porción de concentrado de proteína y la adición de nisina, resultando en una película lisa, traslúcida, flexible y con una ligera coloración amarilla.

La película activa formada por la unión entre una porción de concentrado de proteína y la quercetina por vía enzimática junto con la adición de nisina se muestra en la Figura 3-6. Presenta una ligera coloración amarillenta. Dependiendo del uso para el que se destine el concentrado, la turbidez y la transparencia brindarán un valor significativo (Cole, 2013). La turbidez se debe probablemente a la presencia de material en suspensión, como minerales, y a los pigmentos en la piel del cazón. Sin embargo, cabe mencionar que la coloración no es un indicativo de la calidad. La pigmentación en las películas con antioxidante se confiere por el mismo antioxidante, en este caso un flavonoide, que son pigmentos heterocíclicos que confieren coloración amarilla, roja y azul. Con base en lo anterior, la turbidez de la película con antioxidante que presenta una coloración amarilla representa una ventaja, debido a que se le puede dar un uso como barrera a la luz, con posibilidades de que pueda funcionar como un empaque fotoprotector.

3.5. Pruebas de vida de anaquel y pruebas de deterioro microbiano y oxidativo

Durante un periodo de 28 días de seguimiento, ningún empaque sufrió fracturas durante el almacenamiento. En la Tabla 3.4 se muestran el pan multigrano artesanal y el queso Edam, que se utilizaron para monitorear la actividad antioxidante, la actividad antimicrobiana y el efecto sinérgico de ambas en las películas proteínicas. Con respecto a las croquetas mostradas en la Tabla 3.4, únicamente se realizó el seguimiento de la actividad antioxidante de diferentes alimentos empacados en las distintas películas y en la bolsa de polietileno. Posteriormente, se determinó el índice de peróxidos e índice de Kreis cada 7 días para monitorear la oxidación lipídica del alimento empacado. El análisis de oxidación de lípidos resulta difícil de generalizar debido a su naturaleza, inestabilidad y sustancias que interfieren con la cuantificación. También, se monitoreó el crecimiento microbiano bajo el método del 2,3,5-trifeniltetrazolio en el pan multigrano y en el queso Edam.

Tabla 3.4. Queso Edam, pan multigrano y croquetas para gato empacados en películas de cazón y en bolsas de polietileno

Empaque	Queso Edam	Pan multigrano	Croquetas
Película de cazón			
Película de cazón con antioxidante			
Película de cazón con antimicrobiano			N/A
Película de cazón con antioxidante y antimicrobiano			N/A
Bolsa			

3.5.1. Deterioro microbiano

El método del 2,3,5-trifeniltetrazolio se basa en el proceso de transferencia de electrones catalizado por enzimas conocidas como deshidrogenasas, presentes en algunos microorganismos.

Las películas se pueden utilizar como vehículo de aditivos, proporcionando al producto funciones específicas como actividad antimicrobiana, evitando o reduciendo la proliferación de microorganismos en la superficie.

En las Figuras 3-7 y 3-8 se observa que la incorporación de nisina a 500 ppm en las películas activas retardan el crecimiento de bacterias Gram positivas.

Las películas a las que únicamente se les adicionó nisina tiene un efecto mayor en los productos de panificación que las multifuncionales, en las cuales se observó un efecto conjunto menos marcado con el antioxidante, que fue quercetina.

Los productos de panificación, en general, tienen una a_w intermedia para evitar el crecimiento de bacterias. Sin embargo, algunos mohos del pan pueden prosperar, en especial si se libera la humedad por la cristalización del almidón durante el almacenamiento.

En la Figura 3-7, se puede observar que el crecimiento de bacterias Gram positivas aumentó al día 21 de seguimiento, tanto en empaques activos como en la bolsa de polietileno, siendo el empaque control el que presentó los valores más altos. En la tabla 3.5 se observan estos cambios, observando una diferencia significativa que existe entre todos los empaques a partir del día 21. Las bacterias que crecen en los productos de hilado en general y de panificación en particular son el género *Bacillus* ssp, por ejemplo *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. firmus*, *B. pumilus* (Pepe, 2003).

En el caso del queso Edam, el empaque control es el único que muestra un comportamiento diferente en cuanto a la protección de bacterias Gram positivas, como se muestra en análisis estadístico de la tabla 3.6 y la Gráfica 3-8.

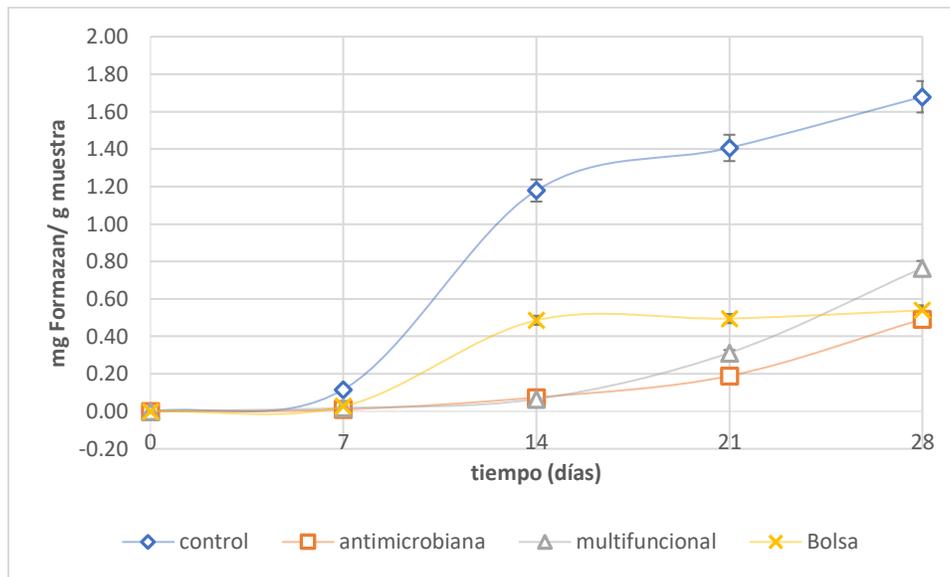


Figura 3-7 Seguimiento de crecimiento microbiano del pan multigrano empacado en películas de proteína de cazón

Tabla 3.5 Análisis estadístico de comparación múltiple de crecimiento microbiano en pan

Contraste	7 días	14 días	21 días	28 días
Antimicrobiano – bolsa	*	*	*	*
Antimicrobiano – control	*	*	*	*
Antimicrobiano – multifuncional			*	*
Bolsa – control	*	*	*	*
Bolsa – multifuncional	*	*	*	*
Control – multifuncional	*	*	*	*

* indica una diferencia significativa.

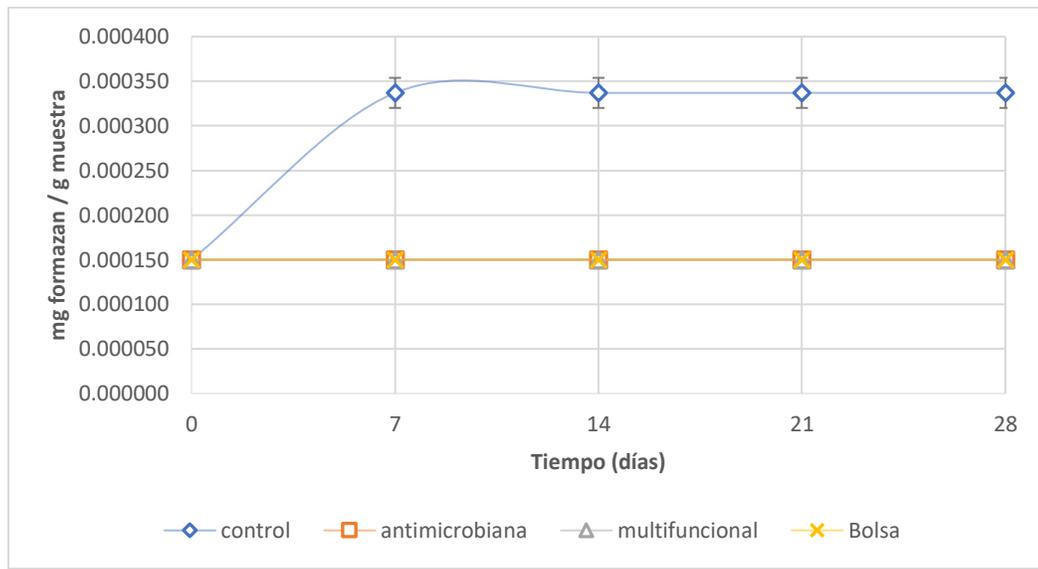


Figura 3-8 Seguimiento de crecimiento microbiano del queso Edam empacado en películas de proteína de cazón

Tabla 3.6 Análisis estadístico de comparación múltiple de crecimiento microbiano en queso

Contraste	7 días	14 días	21 días	28 días
Antimicrobiano – bolsa				
Antimicrobiano – control	*	*	*	*
Antimicrobiano – multifuncional				
Bolsa – control	*	*	*	*
Bolsa – multifuncional				
Control – multifuncional	*	*	*	*

* indica una diferencia significativa.

3.5.2. Seguimiento de índice de peróxidos

El índice de peróxidos (IP) es un indicador del inicio de la oxidación de la fracción lipídica, la cual conforma las fases de iniciación y propagación. Los productos primarios de la oxidación aparecen pronto en el deterioro oxidativo, sin embargo, su concentración disminuye conforme su velocidad de formación se hace más lenta que la de descomposición (Fennema, 2000).

La oxidación se lleva a cabo bajo ciertas reacciones autocatalíticas, que dan como resultado una gran cantidad de nuevos compuestos. Los hidroperóxidos son compuestos producidos durante la primera oxidación, que posteriormente se descomponen y dan lugar a una variedad de productos de oxidación (Marmesat, 2009).

En las Figuras 3-9, 3-10 y 3-11 se muestra el seguimiento del IP de la grasa del queso Edam, del pan y de las croquetas para gato realizado mediante el método colorimétrico, durante 28 días a una temperatura de 22-23°C y una humedad del 60%.

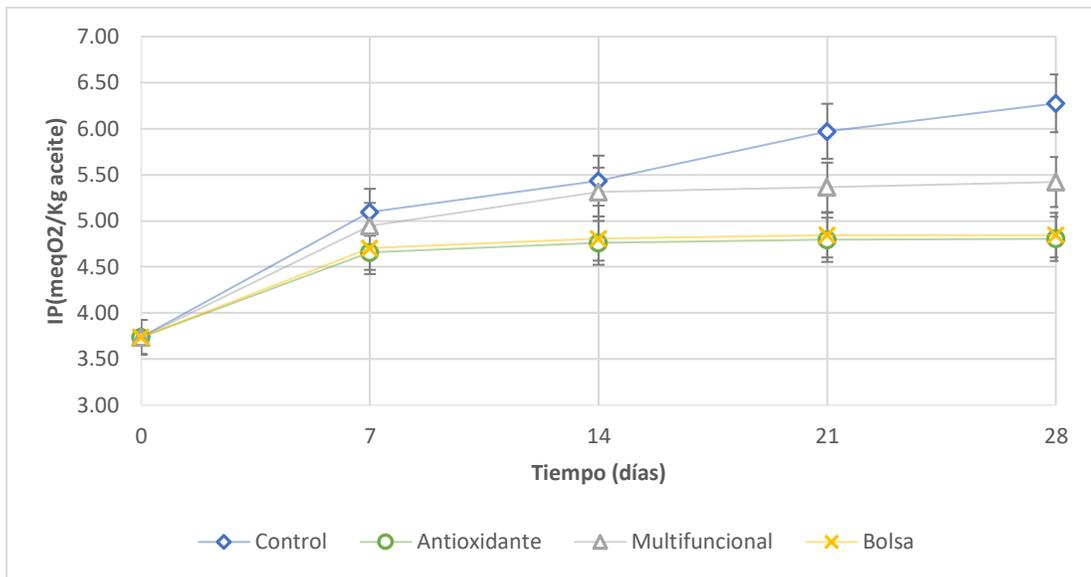


Figura 3-9 Seguimiento de índice de peróxidos del pan integral empacado en películas de proteína de cazón

Tabla 3.7 Análisis estadístico de comparación múltiple de IP en pan

Contraste	7 días	14 días	21 días	28 días
Antioxidante – bolsa	*	*	*	*
Antioxidante – control	*	*	*	*
Antioxidante – multifuncional	*	*	*	*
Bolsa – control	*	*	*	*
Bolsa – multifuncional		*	*	*
Control – multifuncional	*	*	*	*

* indica una diferencia significativa.

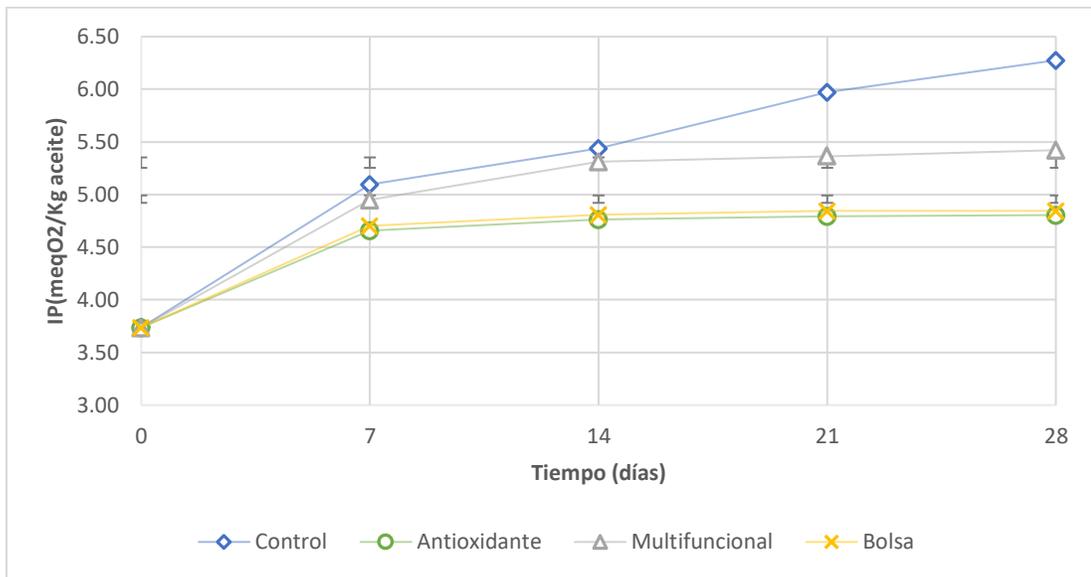


Figura 3-10 Seguimiento de índice de Peróxidos del queso Edam empacado en películas de proteína de cazón

Tabla 3.8 Análisis estadístico de comparación múltiple de IP en queso

Contraste	7 días	14 días	21 días	28 días
Antioxidante - bolsa	*	*	*	*
Antioxidante - control	*	*	*	*
Antioxidante - multifuncional	*	*	*	
Bolsa - control	*	*	*	*
Bolsa - multifuncional	*	*	*	*
Control - multifuncional	*	*	*	*

* indica una diferencia significativa.

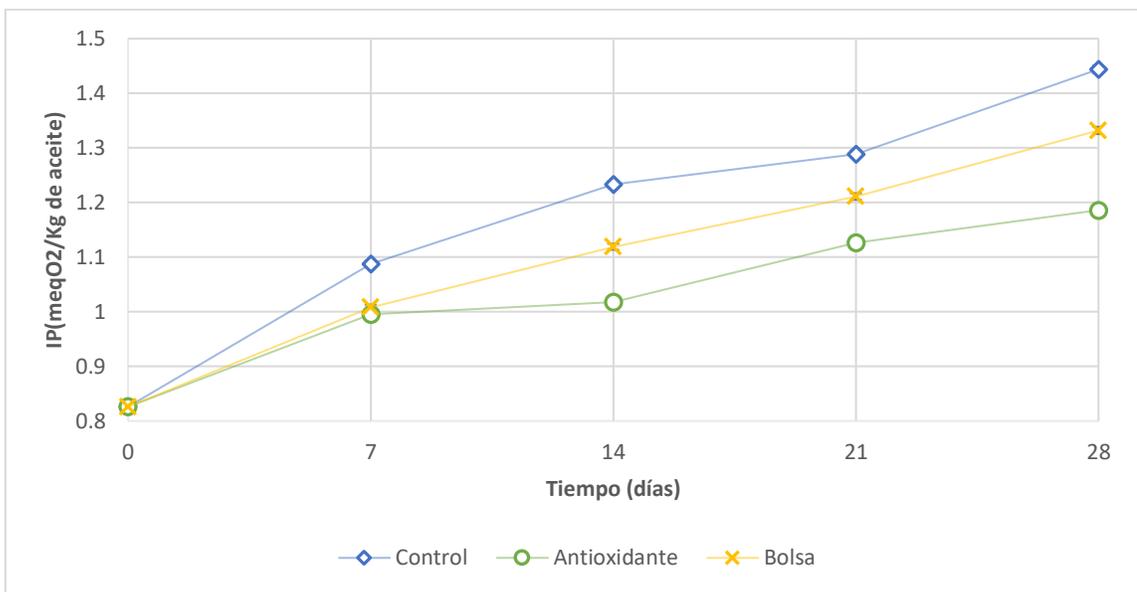


Figura 3-11 Seguimiento de índice de peróxidos de croquetas para gatos empacadas en películas de proteína de cazón

Tabla 3.9 Análisis estadístico de comparación múltiple de IP en Croquetas para gato

Contraste	7 días	14 días	21 días	28 días
Antioxidante - bolsa		*	*	*
Antioxidante - control	*	*	*	*
Bolsa - control	*	*	*	*

* indica una diferencia significativa.

La susceptibilidad de los alimentos a la oxidación tiene una relación con el grado de insaturación de los lípidos que los componen. El uso de antioxidantes no reduce el grado final de enranciamiento, sino que extiende el periodo de inducción. En las figuras 3-9, 3-10 y 3-11, se puede observar el deterioro oxidativo del pan multigrano, el queso Edam y las croquetas para gato, almacenados en los empaques biopolímeros y en la bolsa de polietileno. Estos muestran una relación semejante, y ambos se encuentran en la fase inicial de oxidación lipídica. El incremento de la concentración de IP implica un avance en el enranciamiento por autooxidación.

La oxidación de los lípidos en los productos empacados también se atribuye a la permeabilidad de oxígeno a través de la película, que es un factor importante, ya que el oxígeno promueve la oxidación de lípidos, así como la proliferación de microorganismos.

Tabla 3.10 Permeabilidad al oxígeno, tabla acoplada (Juárez, 2016).

Tipo de película	Permeabilidad al Oxígeno ($\eta\text{mol/m}^*\text{Pa}^*\text{s}$)
Película control	1.254x10 ⁻⁴
Película con antioxidante quercetina	2.331x 0 ⁻⁴
Ziploc®	No permeable bajo las condiciones de trabajo

En la Tabla 3.10 se muestran los resultados obtenidos en estudios anteriores donde fue evaluada la permeabilidad de oxígeno en tres empaques diferentes y se observa que es menor en la película de control (película de cazón). Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en la Figura 3-9, en la Figura 3-10 y en la Figura 3-11, que muestran que la oxidación es mayor en la película control. Esto se atribuye a que la permeabilidad de oxígeno es mayor y a la falta de antioxidante.

Se observa que en el caso del pan multigrano (Figura 3-9) y en el queso Edam (Figura 3-10) se aplaza el efecto del antioxidante por la incorporación del antimicrobiano (nisina) en la misma película en la que el antioxidante. Este enlace entre el antioxidante y la película es de tipo covalente y se produjo vía enzimática.

Existen diferencias significativas entre los empaques que se muestran en la Tabla 3.7, en la Tabla 3.8 y en la Tabla 3.9, lo cual ilustra que las propiedades mecánicas, como la permeabilidad al oxígeno y la permeabilidad al vapor de agua, son factores significativos que influyen al momento de diseñar un empaque activo.

3.5.2.1. Análisis cinético del índice de peróxidos

Diferentes factores fisicoquímicos en los alimentos pueden alterar la velocidad de reacción y el desarrollo de la rancidez lipídica. En el presente trabajo se estudió la estabilidad oxidativa tras añadir quercetina a películas proteínicas, retardando la formación de hidroperóxidos.

Los parámetros graficados son el IP (en mEqO₂/ g aceite) contra el tiempo (en días) para todos los empaques estudiados. En los resultados expuestos en las Figuras 3-12, 3-13 y 3-14, se deducen en cinéticas de orden cero.

Las películas que tuvieron una adición de quercetina se vieron beneficiadas por la capacidad de protección al deterioro oxidativo, reflejado en el valor de la constante de rapidez K, la cual presenta un valor menor en comparación con la de las otras películas y la bolsa de polietileno de baja densidad.

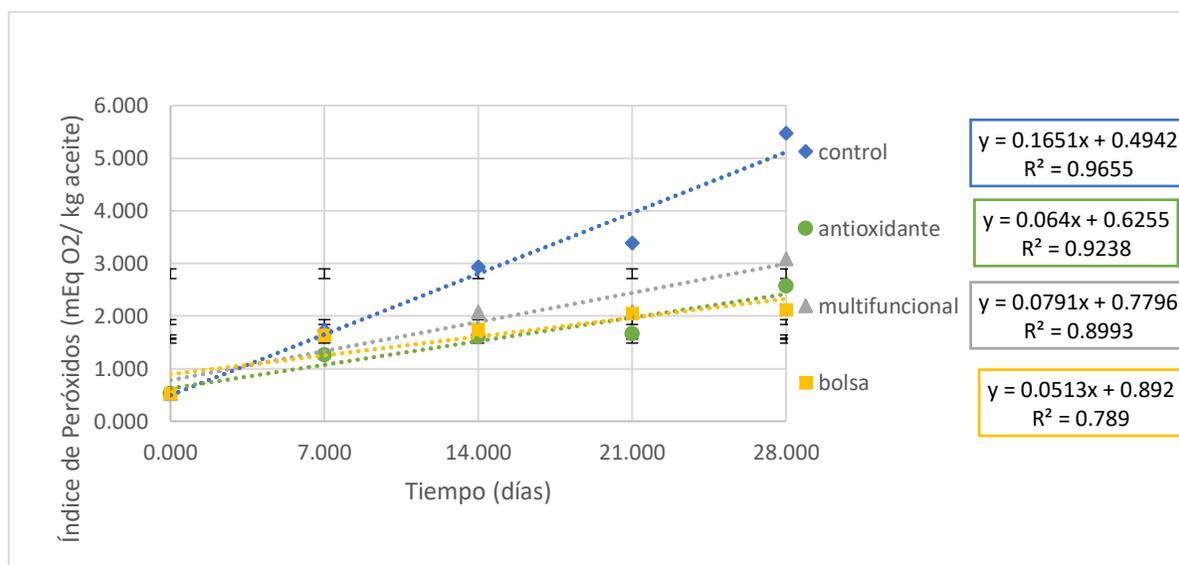


Figura 3.4 Cinética de formación de peróxidos en pan multigrano del pan integral empacado en películas de proteína de cazón

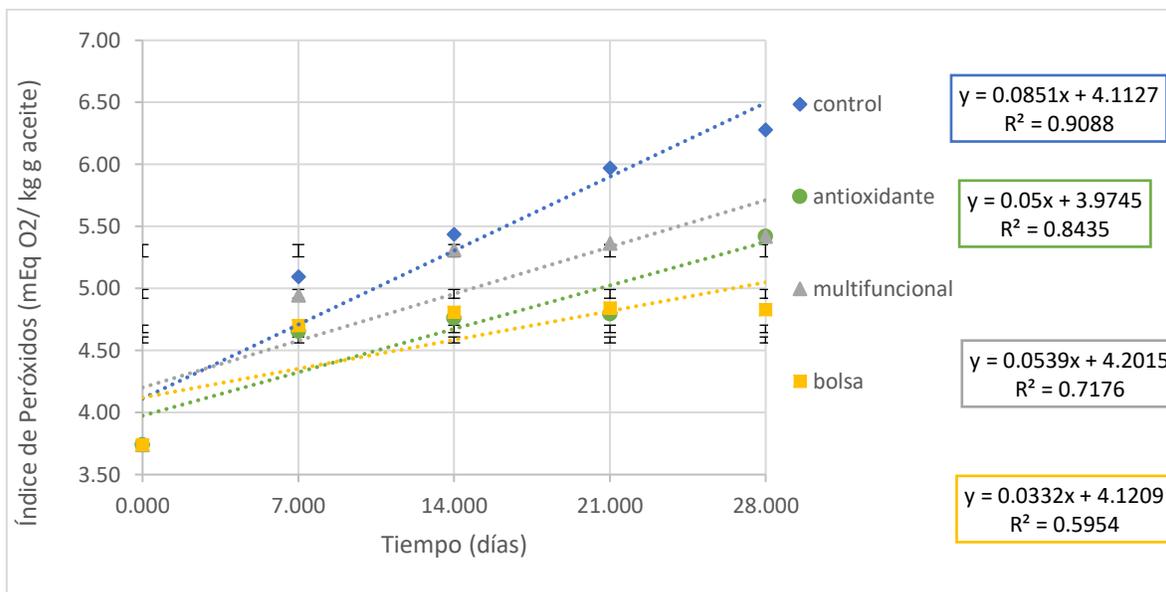


Figura 3-13 Cinética de formación de peróxidos de queso Edam empacados en películas de proteína de cazón

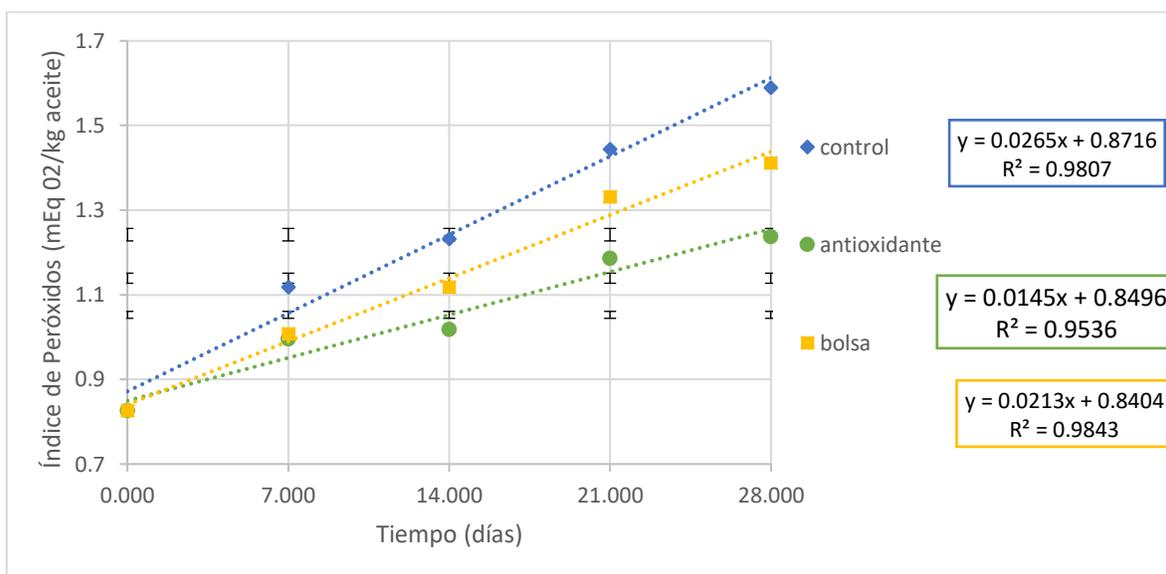


Figura 3.4 Cinética de formación de peróxidos de croquetas para gato empacadas en películas de proteína de cazón

3.5.3. Seguimiento del índice de Kreis

El seguimiento del índice de Kreis (IK) proporciona información sobre la formación de alcoholes, cetonas y aldehídos (malónico y epidrónico), productos finales de la oxidación lipídica que no necesariamente reflejan el grado de oxidación de los lípidos (Decker, 2010).

Los efectos de los agentes antioxidantes adicionados en las películas estabilizan a los radicales libres formados en etapas tempranas de la oxidación lipídica, prolongando de esa forma el periodo de inducción y retardando la oxidación lipídica.

Como se muestra en la Tabla 3.11, se observa que en los primeros 7 días no existe una diferencia significativa entre las películas a las que se les adicionó la quercetina, debido a que las reacciones de oxidación transcurren en una velocidad semejante. Sin embargo, a partir del día 21, se destaca un cambio en el comportamiento en la generación de aldehídos, preponderantemente en las películas control. Dicho cambio no se observó en las que fueron adicionadas con quercetina, en las cuales la etapa de iniciación es más larga. En comparación, las de la bolsa plástica y las de la película control ya se encontraban en la etapa de propagación.

La generación de aldehídos se muestra en la Figura 3-15. Ésta se ve afectada en menor proporción en las películas que fueron adicionadas con el antioxidante y de igual forma en el empaque comercial, sin embargo, se nota una tendencia mayor en la formación de aldehídos en las películas control.

Con los datos conjuntos de la Tabla 3.12 y de la Figura 3-16, se observa que el empaque con antioxidante y la bolsa no tuvieron una diferencia significativa al momento de fungir como protección del queso. Con base en los resultados obtenidos, se puede decir que al actuar como barrera protectora en las croquetas para gato su efecto protector fue menor, como se observa en la Tabla 3.13 y más notablemente en la Figura 3-17. Existió una diferencia significativa entre ambos empaques, siendo la bolsa el que peor ejerció la barrera de protección.

Al término del seguimiento, las películas que no muestran ningún tipo de protección antioxidante (las de control), presentan una rápida formación de aldehídos, mientras

que las adicionadas con antimicrobiano y antioxidante (las multifuncionales) muestran una protección menor en comparación con las que fueron adicionadas únicamente con antioxidante.

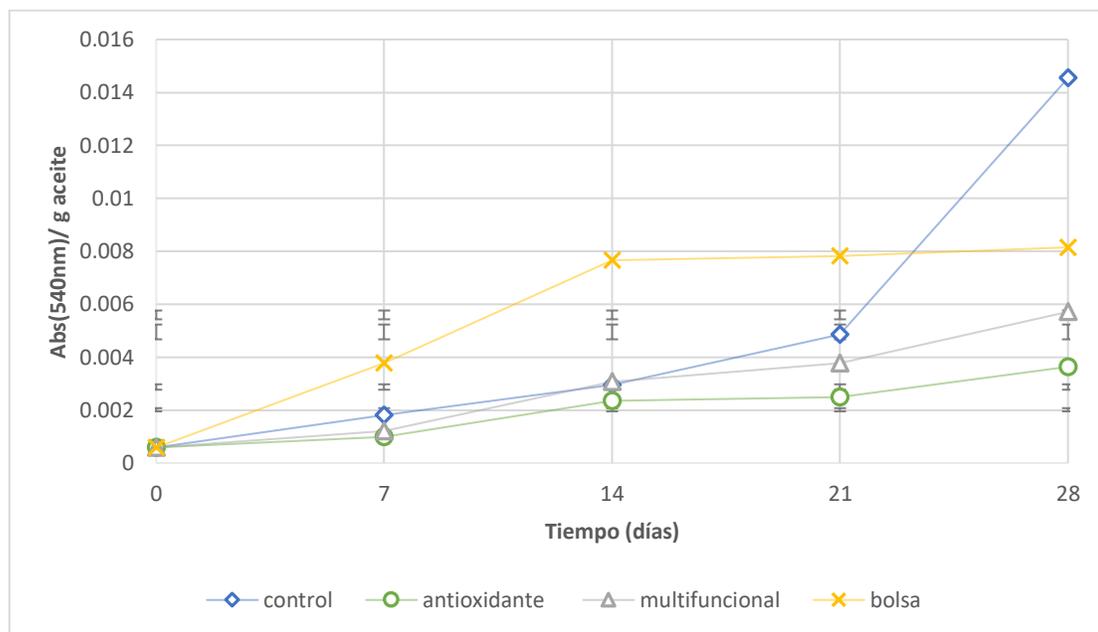


Figura 3-15 Seguimiento del índice de Kreis del pan integral empaçado en películas de proteína de cazón

Tabla 3.11 Análisis estadístico de comparación múltiple de IK en pan

Contraste	7 días	14 días	21 días	28 días
Antioxidante - bolsa	*	*	*	*
Antioxidante - control	*	*	*	*
Antioxidante - multifuncional		*	*	*
Bolsa - control	*	*	*	*
Bolsa - multifuncional	*	*	*	*
Control - multifuncional	*	*	*	*

* indica una diferencia significativa.

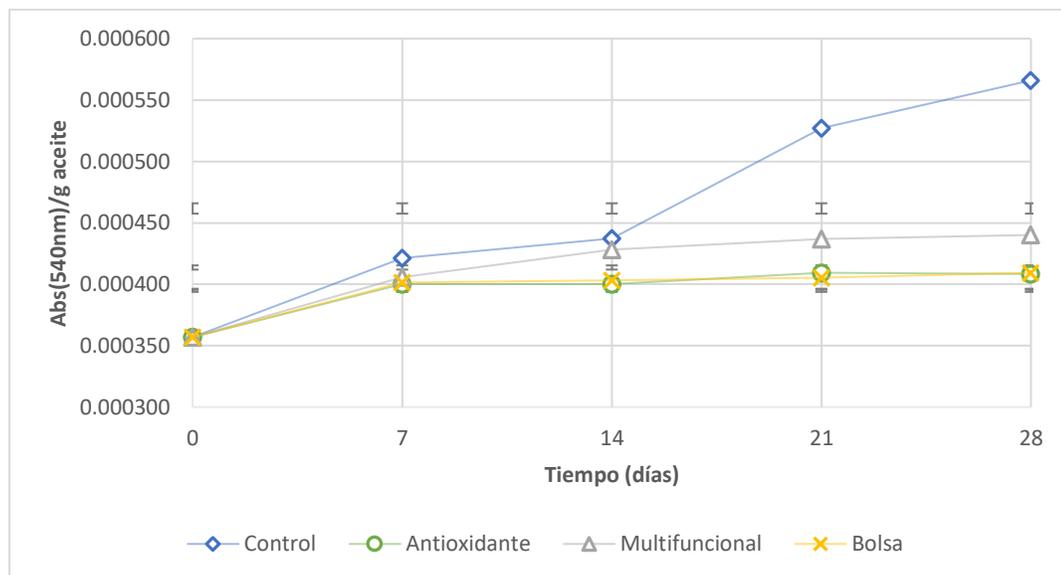


Figura 3-16 Seguimiento del índice de Kreis en el queso Edam empacado en películas de proteína de cazón

Tabla 3.12 Análisis estadístico de comparación múltiple de IP en queso

Contraste	7 días	14 días	21 días	28 días
Antioxidante - bolsa				
Antioxidante - control	*	*	*	*
Antioxidante - multifuncional		*		
Bolsa - control	*	*	*	*
Bolsa - multifuncional		*	*	*
Control - multifuncional	*		*	*

* indica una diferencia significativa.

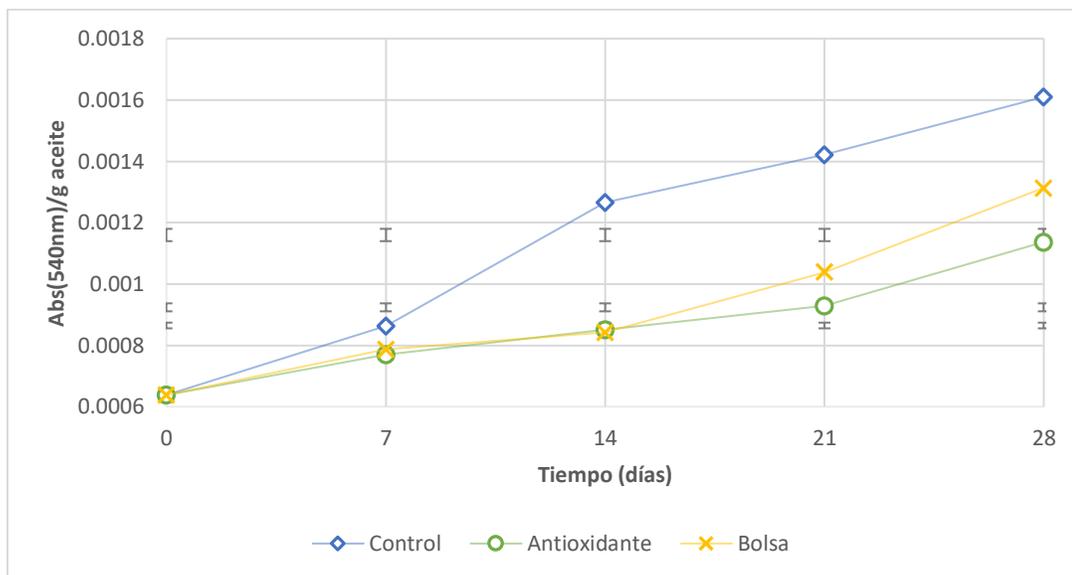


Figura 3-17 Seguimiento del índice de Kreis en croquetas para gato empacadas en películas de proteína de cazón

Tabla 3.13 Análisis estadístico de comparación múltiple de IK en croquetas para gato

Contraste	7 días	14 días	21 días	28 días
Antioxidante - bolsa			*	*
Antioxidante - control	*	*	*	*
Bolsa - control	*	*	*	*

* indica una diferencia significativa.

3.5.3.1. Análisis cinético del índice de Kreis

El comportamiento cinético para las reacciones de deterioro oxidativo en el periodo de prueba de 28 días se ajusta al orden cero, ya que la velocidad de reacción no depende de la concentración de ácidos grasos libres, indicando que será dependiente de factores como la temperatura, el tiempo y el lugar de almacenamiento. Esto se muestra en las Figuras 3-18, 3-19 y 3-20.

En las tres graficas anteriormente mencionadas, se observa una tendencia en la que el valor de la constante de rapidez va en aumento en proporción con la falta de antioxidante, lo cual indica que la película adicionada con quercetina protegió a los alimentos en contra de una generación de productos aldehídicos provenientes de la degradación lipídica.

La variabilidad del valor de la contante de rapidez en cada muestra se debe al contenido de material lipídico en el alimento. A esto se suman también diversos promotores que influyen en la formación de radicales libres durante la oxidación, tales como metales pesados y cambios de temperatura en el ambiente.

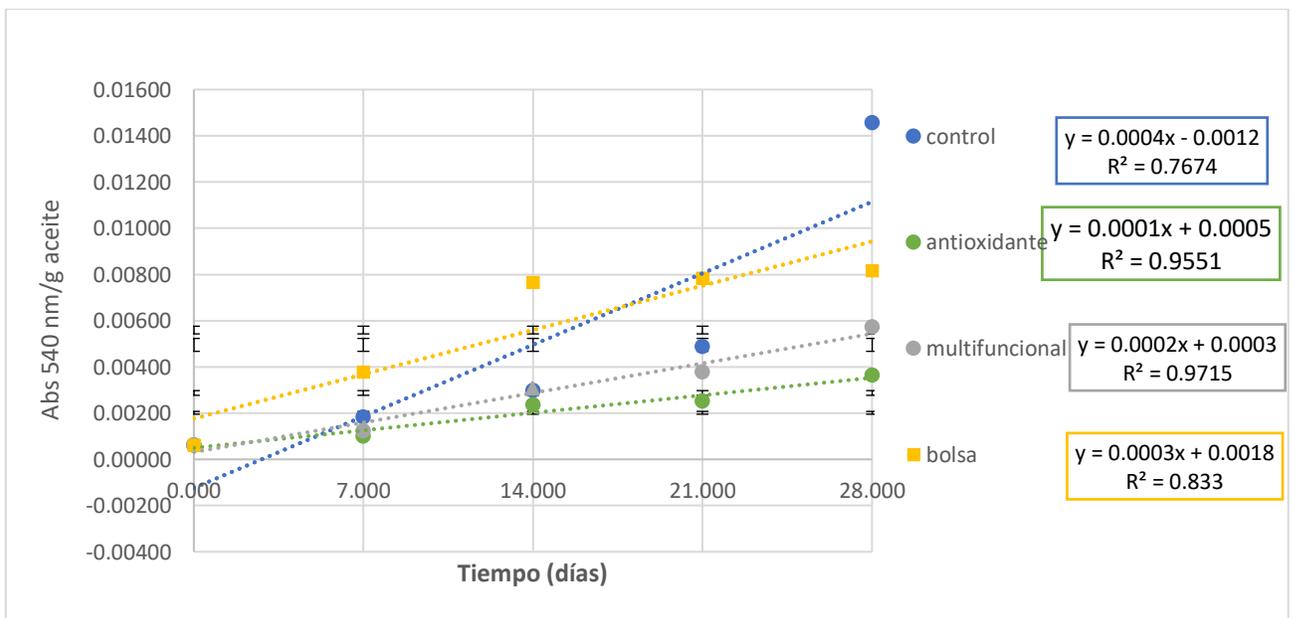


Figura 3-18 Cinética del índice de Kreis del pan integral empacado en películas de proteína de cazón

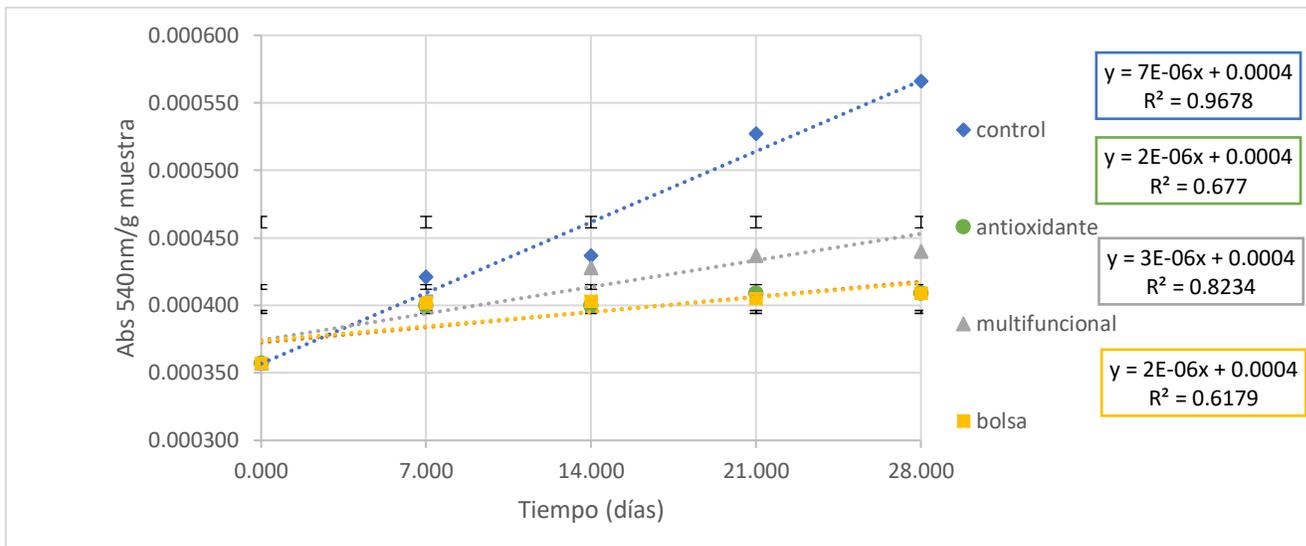


Figura 3-19 Cinética del índice de Kreis del queso Edam empacado en películas de proteína de cazón

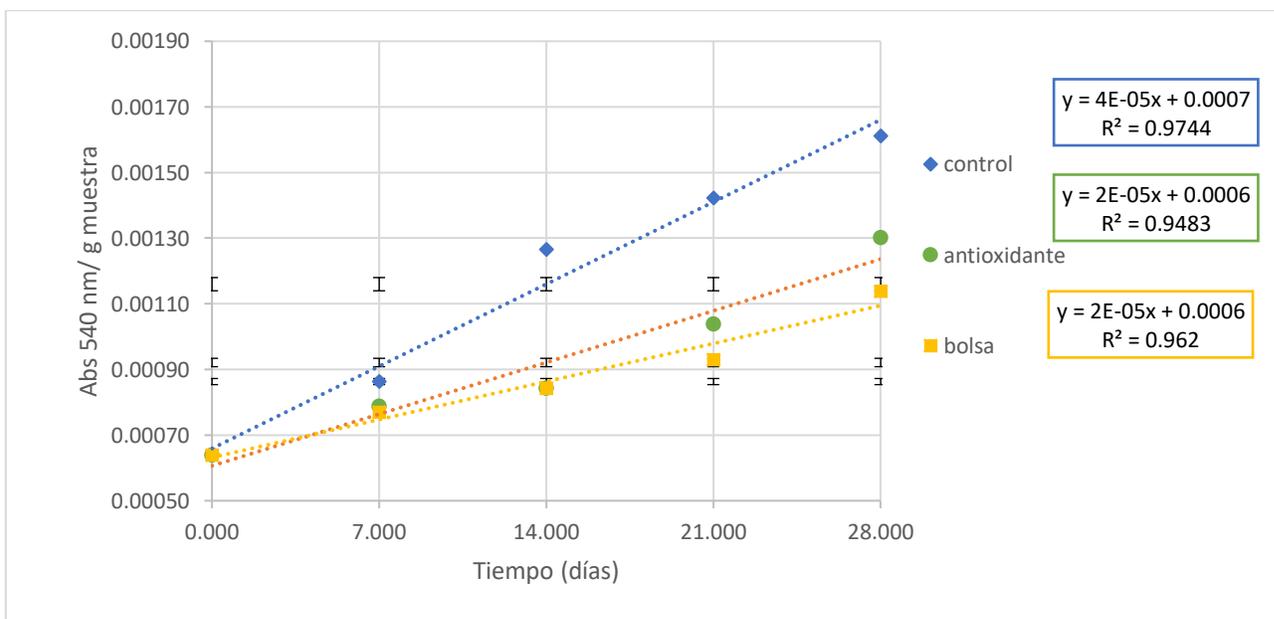


Figura 3-20 Cinética del índice de Kreis del pan integral empacado en películas de proteína de cazón

3.6. Humedad

En las Figuras 3-21 y 3-22 se puede observar el seguimiento en el contenido de humedad del pan de caja y del queso Edam empacado en las películas proteínicas y la bolsa de poliuretano de baja densidad, la cual osciló entre 33-36 %, y 35-39 % respectivamente.

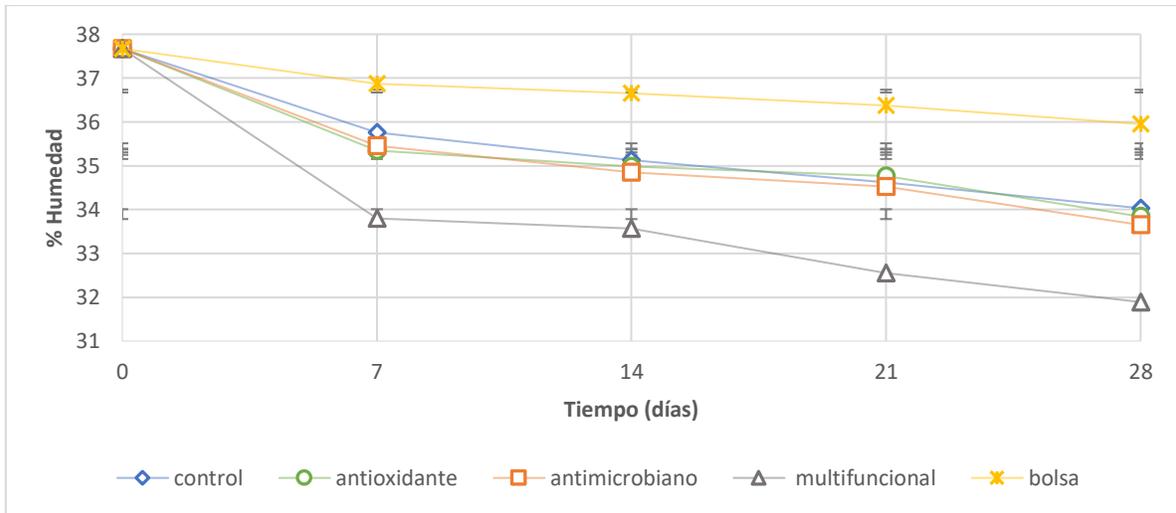


Figura 3-21 Seguimiento del contenido de humedad en pan multigrano empacado en películas de proteína de cazón

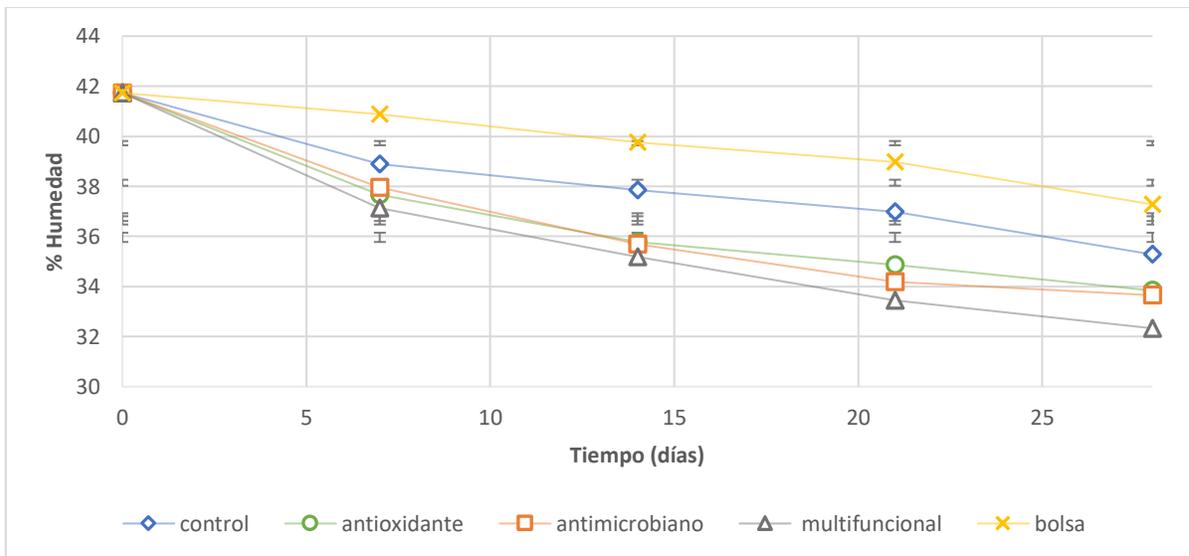


Figura 3-22 Seguimiento del contenido de humedad en queso Edam empacado en películas de proteína de cazón

En esas figuras se puede observar el contenido de humedad promedio del pan y del queso Edam. Este contenido no presenta diferencias destacables, aunque en la bolsa de polietileno de baja densidad la humedad es mayor.

En las películas con acción multifuncional la humedad es menor debido a que, al añadir agentes antioxidantes y antimicrobianos, la permeabilidad al vapor de agua se modifica en los empaques constituidos por polímeros. La difusividad del vapor de agua depende de la relación hidrófoba/hidrofílica de los componentes de la película (Tongnuanchan, 2014). La pérdida de humedad del alimento provoca cambios indeseables en la textura de los alimentos.

Tabla 3.14 *Contenido de humedad promedio del pan multigrano y queso Edam empacado en películas de proteína de cazón*

	Control	Antioxidante	Antimicrobiano	Multifuncional	Bolsa
Pan multigrano	35.4±0.7	35.3±0.6	35.2±0.7	33.9±0.9	36.7±0.4
Queso Edam	38.2±1.5	36.8±1.6	36.6±1.9	36.0±2.1	39.7±1.5

4. Conclusiones

- Con la extracción de las proteínas de la piel de cazón mediante un tratamiento básico, seguido de uno ácido y con la posterior precipitación isoeléctrica de la disolución proteínica se obtienen rendimientos relativamente altos del 30.05% de proteína.
- Las películas activas elaboradas a base del concentrado proteínico del pescado al 10% presentan buenas propiedades mecánicas, por lo que se pueden utilizar como empaques primarios.
- Durante los primeros días, las películas presentan un ligero aroma a pescado que con el tiempo se va atenuando, por lo que no afecta sensorialmente al producto empacado.
- Las películas a las que se les añadió el antioxidante (quercetina) presentan una ligera coloración amarillenta atribuida a los flavonoides y esto retarda la degradación por fotooxidación.
- La unión enzimática del antioxidante (quercetina) presenta una buena capacidad de protección contra la rancidez oxidativa de lípidos.
- La adición del antioxidante (quercetina) disminuye la permeabilidad al vapor de agua en las películas proteínicas de cazón.
- El agregado del antimicrobiano (nisina) por inmersión a la película de cazón inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas.
- El uso nisina como agente antimicrobiano retarda el crecimiento microbiano en la matriz alimentaria en los casos del pan y el queso.
- El agente microbiano (nisina) en el pan retardó el hilado en el pan, evitando el desarrollo de bacterias del género *Bacillus* ssp.
- La mezcla de antioxidante y antimicrobiano en la película tiene un efecto antioxidante favorable sobre la matriz alimentaria, aunque menor en comparación con la película a la cual solo se le añadió el antioxidante.
- El uso de películas activas para la conservación de alimentos con alto contenido de humedad no es recomendable por la difusión de vapor de agua entre el alimento y el ambiente.

5. Referencias

- Ando, M. M. (2001). Interdependence between heat stability and pyridinoline contents of squid mantle collagen. *Journal of Food Science*, 66, 265–269.
- Arizmendi, C. N. (2016). *Desarrollo de películas activas a partir por unión química de colágeno de piel de pollo a polifenoles de chía*. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.: Tesis de licenciatura, .
- Badui, S. (2013). *Química de los alimentos*. Estado de México: Pearson Educación.
- Bailey, A. (1972). The basis of meat texture. *Journal Science Food and Agriculture*, 23, 995-1007.
- Banker, G. (1996). Film coating Theory and practice, . *Journal Pharmacy Science*, 55(1):81-89.
- Bello, G. J. (2000). *Fundamentos de seguridad alimentaria (aspectos higienicos y toxicologicos)*. Eunate.
- Bertuzzi, M. A. (2002). *Estudio de la permeabilidad al vapor de agua en films comestibles para recubrir alimentos*. Universidad Nacional de Catamarca.
- Bourtoom, T. (2008.). Edible and coatings: characteristics and properties. . *Intertational Food Resarch Journal*. , 15(3): 237 – 248.
- Campos, C. G. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technology*, 849-875.
- Chick, J. U. (1998). Mechanical and Barrier Properties of Lactic Acid and Rennet Precipitated Casein-Based Edible Films. *Journal of Food Science*, 1024-1027.
- Cole, C. G. (2013). Gelatin Food Science. Disponible en: <<http://www.gelatin.co.za>>(Revisado 20/03/17).

- Compagno, L. S.-6. (1984). FAO species catalogue. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 2. Carcharhiniformes. FAO Fish. Synop.
- CONAPESCA. (2014). <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca>. Consultado septiembre 2014.
- Cotter, P. H. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. . *Natural Reviews Microbiology* , 3(10):777-788.
- CUNNIF, P. (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. USA: 16th edition.
- Daeschel, M. (1969). Antibacterial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. . *Food Technology* , 43-45.
- Dalev, P. P. (2000). Biodegradation of chemically modified gelatin films in soil. *Journal Applied Polymer Science*, 1341-1347.
- Decker, E. E. (2010). *Oxidation in Food and Beverages and Antioxidant Application*. Philadelphia: Woodhead Publishing.
- Delgado, L. B. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo . *Investigación y Ciencia* , 50. 10-15.
- Devlin, M. T. (1988). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Reverté.
- Dutta, P. ., (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 1173-1182.
- Fennema, O. (2000). *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- García, A. (2017). *Acoplamiento vía enzimática de quercetina a proteínas de semillas de cártamo y girasol, y su aplicación en el desarrollo de películas activas*. Ciudad de México: Tesis de licenciatura.
- Garrido, D. A. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. Madrid: Tebar SL.

- Gelse, K. P. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, 1531-1546.
- González, A. S. (2011). Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering*, 331-338.
- Han, J. H. (2013). Innovations in Food Packaging. *Jordon Hill, GB: Academic Press.*
- Hua Xang, X. G. (2014). Preparation and characterization of collagen foofd packing film. *Journal of chemical and pharmaceutical research*, 1-36.
- Jogjareonrak, A. B. (2006). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research and Technology*, 222(3-4):229-235.
- Jones, N. R. (1977). Uses of gelatin in edible products. In: WARD, A. G.; COURTS, A. (Ed.). *The Science and Technology of Gelatin. London: Academic Pres, 365394.*
- Jongjareonrak, A. B. (2008). Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and a-tocopherol. *Food Hydrocolloids*, 449-458.
- Juárez, F. S. (2016). *Desarrollo de películas activas a partir de proteínas de piel de tiburón.* . Facultad de Química, UNAM, México, D.F.: Tesis de licenciatura, .
- Kamal, E. A. (2003). Lipid oxidation pathways. *American Oil Chemist's Society Publishing*, 1-36.
- Kester, J. F. (1986). Edible films and coatings: A review. *Food Tecnology*, 40(12), 47-59.
- Kittiphattanabawon, P. S. (2010). Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry*, 14 (4):1519-1526.

- Kobayashi, S. R. (2006). *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers*. 7-8.
- Krainer, F. W. (2015). An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1611–1625.
- Krotcha, J. M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunity.
- Labuza, T. (1995). Use of time/ temperature integrators, predictive microbiology, and related technologies for assessing the extent and impact of temperature abuse on meat and poultry products. *Journal of Food Safety*, 201-227.
- Laughton, M. E. (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability Biochem Pharmacol*, 19-25.
- Limpisophon, K. T. (2009). Characterisation of gelatin–fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, Vol. 23, 1993-2000.
- Luengo, J. M. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 251-260.
- Maizura, M. F. (2007). Antibacterial Activity and Mechanical Properties of Partially Hydrolyzed Sago Starch–Alginate Edible Film Containing Lemongrass Oil. *Journal of food science*, C324–C330.
- Marmesat, S. A.-M. (2009). Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *Grasas y Aceites*, 155-160.

- Márquez, F. J.-G. (1998). Fishery biology and demography of the Atlantic sharpnose Shark, *Rhizoprionodon terraenovae*, in the Southern Gulf of Mexico. *Fisheries Research.*, 39: 183-198.
- Martins, J. M. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 220-227.
- Marunaka, Y. M. (2017). Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. *Molecules* , 22-34.
- Matthews, T. J. (2009). *.2009 Microbiología de los alimentos: introducción, 2a edición*. Acribia,: Zaragoza.
- Mauri, A. A. (2008). Mechanical and Physical Properties of Soy Protein Films with pH-Modified Microstructures. *Food Science and technology International*.
- McHught, T. a. (1994). Sorbitol vs Glycerol- Plasticized Whey Protein Edible Films Integrated Oxygen Permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (4), 841- 845.
- Ming, X. W. (1997). Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibits *Listeria monocytogenes* on meats. . *Journal of food Science*.
- Nagai, T. (2004). Characterization of collagen from Japanese sea bass caudal fin as waste material. *European Food Research and Technology*, 218, 424-427.
- Nigel, C. V. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 249–259.
- NOM-029. (2007). Norma Oficial Mexicana nom-029- pesc-2006, Pesca responsable de tiburones y rayas. Especificaciones para su aprovechamiento. *Diario Oficial de la Federación México, 14 de febrero*.
- Ouattara, B. S. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37 (4)155–162.

- Ozdemir, M. y. (2010). Active Food Packaging Technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(3):185-193.
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis structure, function, and applications. *Biotechnol.*, 465-499.
- Pati, F. A. (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource Technology*, 101: 3737-3742.
- Pedraza, M. C. (2008). Respuesta fisiológica del tejido conjuntivo de músculos y tendones tras la aplicación de los agentes físicos. *Elsiver, Fisioterapia*, 279-285.
- Pepe, O. B. (2003). Rope. Producing strains of *Bacillus* spp. From wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. , 69(4):2321-2329.
- Povea, G. I. (2015). *La Función Del Envase En La Conservación De Los Alimentos*. ed:Ediciones Ecoe.
- Ramshaw, J. S. (1998). Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides. *Journal of Structural Biology*, 122(1-2):86-91.
- Rizo, T. C. (2014). *Optimización de las condiciones de extracción de la proteína de la piel de cazon para el desarrollo de películas activas como envases alimentario* . México: UNAM.
- Robards, K. D. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66:401–436.
- Rodríguez , T. (2007). *Manual de ingeniería y diseño de envase y embalaje; para la industria de los alimentos, químico farmacéutico y cosméticos*. México: IMPEE.

- Rogers, L. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 16: 321-325.
- Sato, K. Y. (2002). Type XXVI Collagen, a New Member of the Collagen Family, Is Specifically Expressed in the Testis and Ovary. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 37678-37684.
- Shahidi, F. (1996). Natural antioxidants. *Chemistry, health effects and applications*. AOCS Press, Champaign, Illinois, 18-19.
- Sikorski, Z. S. (1984). The role of collagen in the quality and processing of fish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 301-343.
- Siripatrawan, U. S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 102-108.
- Suppakul, P. M. (2003). Active packaging and its applications. *Journal of Food Science.*, 68(2): 408-420.
- Tang, X. K. (2012). Recent and avances in biololymers and biopolymers and biopolymer- based nanocomposites for food packing materials. . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, , 52. 426-442.
- Tongnuanchan, P. S. (2014). Comparative studies on properties and antioxidative activity of fish skin gelatin films incorporated with essential oils from various sources. *Springerlink*.
- Wong, D. (1999). *Química de los Alimentos: Mecanismos y teoría*.
- Yamada-Onodera, k. M. (2001). Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degradation and Stability*, 323-327.
- Yoshida, H. T. (1999). Antioxidative effects of sesamol and tocopherols at various concentrations in oils during microwave heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 220-226.

