

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

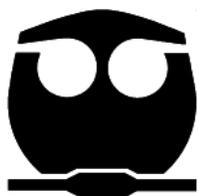
ESTUDIO PARA EVALUAR BIOPELÍCULAS PROTEINICAS COMO
BARRERAS PROTECTORAS DE ALIMENTOS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

LUIS ANGEL ALVARADO SUÁREZ



MÉXICO D.F.

2008



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: Ma. de los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Hermilo Leal Lara

SECRETARIO: Alberto Tecante Coronel

1er SUPLENTE: Luz Sandra Sánchez del Ángel

2° SUPLENTE: Armando Conca Torres

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio 322-323 del Edificio E de la Facultad de Química

ASESOR DEL TEMA Ma. de los Ángeles Valdivia López

SUPERVISOR TÉCNICO Alberto Tecante Coronel

SUSTENTANTE Luis Ángel Alvarado Suárez

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. María de los Ángeles Valdivia López, por ser un pilar muy importante en mi formación como profesional, así como por su apoyo y confianza durante la realización de este proyecto. Muchas gracias

A la Q.F.B. Julieta Sandoval Guillen, por brindarme un gran apoyo académico, así como su amistad y confianza.

Al Dr. Alberto Tecante Coronel, por haber sido siempre un apoyo constante en la realización del proyecto.

Al Dr. Hermilo Leal Lara, por las horas de atención en la revisión de este trabajo, así como el conocimiento brindado

A todos mis profesores de la facultad de química, por sus conocimientos compartidos. Me llevo un poco de cada uno de ellos y espero usarlo para ser un buen profesionalista.

A la DGAPA-UNAM por el apoyo financiero brindado para participar en el proyecto IN204306-3 "Estudio y evaluación de las propiedades funcionales de empaque y recubrimiento de membranas de hidrogeles de polisacáridos"

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar desde hace ya mucho tiempo, y por que jamás dejara de serlo.

"POR MI RAZA HABALARA EL ESPÍRITU"

DEDICATORIAS

A la persona más importante de mi vida, a mi mamá, este logro es debido a ti y a ti va dedicado, así como mi esfuerzo diario. Gracias por hacer de mí una persona muy feliz. Te amo muchísimo y mi vida no se podría explicar sin tu presencia.

A mis adorados abuelos, Natividad y Ángel, por que siempre me han cuidado y visto como si fuera su hijo. A ustedes les debo gran parte de mis logros, los amo mucho.

A Gabriela, por cambiarme la vida, gracias a ti soy una mejor persona, por compartir conmigo todas las tristezas y alegrías. Eres mi musa y el amor de mi vida, gracias por venir.

A mi hermano Daniel, por que quiero ser un gran ejemplo para ti, así como tú lo eres para mí, por la gran responsabilidad que muestras día con día, y esa gran amistad que nos une. Te amo mucho hermano.

A mi tía Alicia, por siempre confiar en mí e impulsarme a conseguir todas mis metas, por tu cariño incondicional y ejemplo como una gran persona. Gracias

A Marco por ser una persona fundamental en mi formación como persona, por que me has dado mucho y siempre estaré agradecido. Gracias

A mis tías Leticia, Laura, Blanca y Pilar que son como mis hermanas mayores y que siempre han cuidado de mí y están ahí en las buenas y en las malas, a ustedes todo mi cariño y agradecimiento.

A mis tíos, Miguel, Luis, José y Alfonso, gracias por su apoyo y cariño.

A mi primo Toño, mi cómplice y compañero de juegos en muchas ocasiones. Además de mi primo eres un gran amigo. Gracias.

A mis primos y primas que hacen que nuestra familia sea tan divertida, Lalo, Vane, Laura, Mónica, Gabriela, Angélica, Sonia, Fernanda, Diego. Gracias, en especial a Laura, Mónica y Angélica por ayudarme en la ardua labor de recolectar semillas de limón.

A Rubén, Manuel, Adriana, gracias por brindarme su valiosa amistad y hacer tan divertido este paso en mi vida.

A todos mis compañeros de trabajo en el laboratorio 322-323, Grissel, Evelin, Nayeli, Claudia, Paola, Diego, Miguel, Fanny, Adriana, Aida, Lucy, Laura, Berenice, Norma, Geovanny, Juan, Miguel y Mónica, por ser una gran compañía durante los momentos de trabajo.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS	8
Objetivo general.....	8
Objetivos particulares.....	8
Capítulo 1. ANTECEDENTES	9
1.1 El Limón.....	9
1.1.1 Descripción.....	9
1.1.2 Producción de Limón.....	10
1.2 La semilla de chía.....	12
1.2.1 Descripción.....	12
1.2.2 Aplicaciones.....	13
1.2.3 Distribución.....	13
1.3 Propiedades funcionales de las proteínas.....	14
1.4 Empaques.....	16
1.4.1 Generalidades.....	16
1.4.2 Empaques biodegradables.....	17
1.5 Electroforesis.....	20
1.6 Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR).....	21
Capítulo 2. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1 Diagrama general.....	23
2.2 Semilla de limón mexicano.....	24
2.3 Molienda y desengrasado de	24
2.4 Obtención de un concentrado de proteína.....	24
2.5 Caracterización del concentrado proteínico.....	25
2.5.1 Determinación de la concentración de proteína total ...	25

2.5.2 Determinación de la concentración de proteína soluble.....	
25	
2.5.3 Determinación de la concentración de carbohidratos solubles ...	25
2.5.4 Determinación Electroforética de las fracciones de proteína..	
25	
2.6 Elaboración de las biopelículas.....	27
2.7 Examen de las biopelículas con microscopia electrónica.....	28
2.8 Determinación de las propiedades mecánicas de las biopelículas....	29
2.8.1 Acondicionamiento de las biopelículas	30
2.8.2 Fuerza de fractura a la punción.....	30
2.8.3 Fuerza de fractura a la extensión.....	30
2.8.4 Tratamiento de datos.....	31
2.9 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	32
2.10 Permeabilidad al oxígeno	34
2.11 Evaluación de la funcionalidad de las biopelículas.....	36
2.12 Determinación de radicales libres.....	39
Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
3.1 Obtención de un concentrado proteínico de semilla de limón..	40
3.2 Caracterización del concentrado de proteína de semilla de limón..	40
3.2.1 Determinación de proteína total, método de Kjeldahl.....	40
3.2.2 Determinación de proteína soluble, método de Lowry.....	41
3.2.3 Determinación de carbohidratos totales método, fenol sulfúrico..	41
3.2.4 Determinación de fracciones proteínicas, electroforesis.....	42
3.3 Micrografías de las biopelículas con microscopia electrónica.....	45
3.3.1 Determinación de fibra en películas elaboradas con CPCh	
50	
3.4 Propiedades mecánicas de las biopelículas	51
3.4.1 Fuerza de fractura a la punción.....	51
3.4.2 Fuerza de fractura a la extensión.....	55
3.5 Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA).....	61

3.6 Permeabilidad al oxígeno.....	64
3.7 Evaluación de la funcionalidad de las biopelículas, empleándola como empaque de un sistema alimenticio.....	66
3.7.1 Primer ensayo.....	66
3.7.2 Segundo ensayo.....	70
3.7.3 Tercer ensayo.....	72
3.7.3.1. Determinación de radicales libres por EPR	76
CONCLUSIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	82

RESUMEN

La proteína de la semilla de limón (*Citrus aurantifolia swingle*) se utilizó para fabricar películas protectoras de alimentos, usando sorbitol y glicerol como plastificantes. La semilla de limón se deshidrató, se molió, se desengrasó y se obtuvo un concentrado proteínico con 87% de proteína. La electroforesis del concentrado proteínico mostró, que está formado principalmente por péptidos de bajo peso molecular, los cuales participan de manera importante en la formación de películas. Para elaborar las películas se adicionó el plastificante al concentrado proteínico, posteriormente fue sometido a un calentamiento a 70° C y un ajuste a pH 11. El gel formado se vació en un recipiente de teflón y se secó a temperatura ambiente (20° C) por 24 horas.

Las películas obtenidas mediante esta metodología fueron sometidas a pruebas mecánicas de punción y extensión, así como de permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua. De acuerdo con los resultados se considera que las películas de proteína de semilla de limón pueden actuar como una barrera eficiente para proteger alimentos.

Se evaluó la protección que ofrecen las películas de Concentrado proteínico de semilla de limón (CPSL) y las películas elaboradas con concentrado proteínico de semilla de chia (CPCh), las cuales se elaboraron siguiendo el mismo protocolo bajo el cual se elaboraron las películas de CPSL. Se seleccionó el jamón serrano como matriz alimentaria a proteger, ya que es un producto susceptible al deterioro oxidativo y en menor medida al deterioro microbiano. Para conocer el grado de deterioro se realizaron las pruebas de peróxidos y de índice de Kreis, en estas pruebas se encontró que las películas de origen proteínico (de limón y de chíá) retardan la oxidación de los lípidos presentes en el jamón serrano. Posteriormente se incluyó también un determinación de radicales libres utilizando para esto la

Resonancia Paramagnética Electrónica, con la cual se corroboraron los resultados.

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes en la industria de los alimentos es la conservación y tiempo de vida útil que éstos puedan tener. La conservación de un alimento va a depender de que tan susceptible sea al deterioro. Para retardar o evitar el deterioro en los alimentos existen diversas combinaciones de métodos de conservación dentro de los cuales se encuentra la tecnología de barreras, y dentro de estos podemos encontrar los envases en los alimentos.

Los envases protegen al alimento del daño físico durante el almacenamiento y distribución; así como de una posible contaminación ya sea química o microbiológica. Evita también en parte el intercambio gaseoso como puede ser vapor de agua, bióxido de carbono, pérdidas de volátiles que imparten aroma y oxígeno. En alimentos, los envases son importantes para prevenir la oxidación y en este mismo rubro es importante que el alimento no sea sometido a la luz del sol, por lo que el envase debe actuar como una barrera.

Una nueva alternativa para la elaboración de envases son las biopelículas. Éstas son hidrocoloides con una base acuosa y una mezcla que puede ser de proteínas o de polisacáridos. De las proteínas empleadas para elaborar biopelículas, se encuentran las proteínas del suero de leche, los caseinatos, proteínas de soya, de maíz y algunas otras de origen vegetal. También se han desarrollado biopelículas a partir de proteína de origen animal, como pescado, suero de leche.

Por otra parte los polisacáridos más empleados para la elaboración de biopelículas son derivados de celulosa y pectinas.

El empleo de biopelículas como empaque de alimentos tiene una gran cantidad de ventajas tecnológicas, reduce la migración de agua de la

matriz alimentaria, evita la difusión de gases, así como de solutos y aromas. Actúa como contención del alimento y en algunos casos puede mejorar su apariencia, es un vehículo para incorporar al alimento diversos aditivos, como conservadores, antioxidantes, pigmentos y saborizantes.

En México existe hoy en día una producción importante de limón, *Citrus aurantifolia swingle*, del cual no se aprovecha el residuo que se genera de semilla. La semilla de limón fresca tiene una concentración de 15% de proteína la cual se puede aprovechar en la elaboración de biopelículas protectoras de alimentos. Se conoce por estudios previos, que la proteína de chia, tiene la capacidad de formar películas, y existe el interés de conocer su potencial como protectoras de alimentos.

Con base en lo anterior es importante realizar un estudio mediante el cual se conozca el potencial que tiene la proteína de semilla de limón como formadora de biopelículas. Así como la capacidad que tienen las películas de origen proteínico (semilla de limón y chia), como protectoras de alimentos.

La utilización de estos recursos, permitirá la explotación de un residuo hasta su aplicación, considerando que México es un país con una producción importante de limón. Y por otra parte la revaloración del cultivo de chia, que hoy en día es de carácter regional y poco difundido

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Conocer las propiedades funcionales, mecánicas y de barrera de las biopelículas elaboradas a partir de concentrado de proteína de limón mexicano (*Citrus aurantifolia swingle*), para establecer su potencial como protectoras de alimentos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Conocer las características mecánicas de las biopelículas elaboradas a partir de concentrado de proteína de semilla de limón Mexicano probando el esfuerzo requerido para fracturarlas mediante pruebas de punción y elongación, para establecer su resistencia mecánica
- Conocer la permeabilidad que presentan las biopelículas elaboradas a partir de concentrado de proteína de semilla de limón Mexicano y de concentrado de proteína de Chía, al vapor de agua y al oxígeno, para establecer su resistencia de intercambio gaseoso.
- Conocer el efecto protector de las biopelículas elaboradas a partir de concentrado de proteína de semilla de limón Mexicano y de Chía, frente al deterioro químico oxidativo en matrices alimentarias para evaluar su uso potencial como material de recubrimiento para prolongar la vida de anaquel

CAPÍTULO 1.-ANTECEDENTES

1.1.- EL LIMÓN

1.1.1 Descripción

El limón *Citrus aurantifolia* Swingle, (Figura 1) es uno de los principales tipos de cítricos en conjunto con la naranja agria, naranja dulce, lima, toronja, pomelo y mandarina. Los limoneros son árboles sensibles a las bajas temperaturas, son vigorosos, de crecimiento erecto, tupido y exuberante; miden entre 3 y 6 m de altura y están cubiertos de follaje, su fruto es el limón, el cual pertenece a la familia Rutaceae, género Citrus y especie Citrus limón. Es una baya de color amarillo-verde, de forma esférica, variando la cantidad de semilla en cada fruto; estas semillas son pequeñas, con cubiertas lisas. (Kaji, 2005)



Figura 1. Limón Mexicano

El limón está compuesto morfológicamente por:

- Flavedo: es la porción colorida de la piel contiene una concentración alta de carotenoides y clorofila que le otorgan el color característico, así como glándulas oleosas que producen aceite esencial.
- Albedo: se encuentra debajo del flavedo es una capa blanca esponjosa, está formada por células parenquimatosas rica en

sustancias pécticas y hemicelulosa, sirve de protección al endocarpio.

- Endocarpio: está compuesto por segmentos donde se localizan las vesículas del jugo. El jugo dentro de las vacuolas, contiene ácidos, aminoácidos, sales como oxalato de calcio, hespiridina y limonin.
- Semillas: tienen una cubierta dura, lignocelulósica, generalmente localizada en dos filas en el endocarpio, alrededor de la base central. Contiene una gran cantidad de aceite y proteína (globulina) la cual se puede encontrar en concentraciones de hasta 16% en base seca. Las semillas se encuentran en una concentración de 0.2-1% en el limón.

La producción de limón se realiza en zonas subtropicales semiáridas y áridas con temperaturas mínimas de -4° C, aunque su temperatura óptima es de $18-30^{\circ}$ C. Es un fruto no climatérico.

El fruto se produce a lo largo del año en la mayoría de las regiones de cultivo, se recolecta verde, casi a punto de madurar entre 6 y 10 veces al año y se deja madurar a temperatura moderadamente cálida, un árbol rinde entre 1000 y 2000 frutos por año (Kaji,2005)

1.1.2 Producción de limón

El limón ha registrado un incremento en la producción mundial los últimos años, debido a la reciente preferencia retomada por los consumidores. Se ha registrado principalmente en países en vías de desarrollo, debido a condiciones climatológicas idóneas y un importante mercado en expansión, el cual ha logrado la creación de un sector más productivo. Los principales países productores de limón son México, India, y Argentina con 14.7, 11, 9.6% respectivamente le siguen España, Irán, Brasil, y Estados Unidos con una producción de 8.6, 8.4, 7.6, y 7.5% logrando el 67.4% de la producción mundial total; cabe

mencionar que México muestra la mayor tasa de crecimiento anual a nivel mundial (Kaji, 2005)

A nivel nacional, la producción de limón genera un empleo directo a tres millones de campesinos anualmente y se manifiesta como un cultivo en auge, ya que su producción aumenta cada año. En el 2006 se produjeron en México 1,076,813.6 toneladas de limón, tomando en cuenta que la semilla del limón equivale de entre 0.7 y 1% del limón, se estima que se produjo un residuo de 10,768 toneladas de semilla de limón (SAGARPA, 2006)

El limón es un producto del cual se pueden aprovechar la cáscara, la pulpa, el bagazo y la semilla para la obtención de subproductos. Sin embargo muy pocos países lo explotan en su totalidad.

Algunos de los subproductos que se pueden obtener a partir de limón son:

- Pectina: La pectina está integrada por moléculas de ácido galacturónico unida por enlaces glucosídicos (1-4), en el cual algunos carboxilos pueden estar esterificados con metilos o en forma de sal. Existen dos clases principales de sustancias pécticas: los ácidos pectínicos que tienen parte de sus ácidos galacturónicos como ésteres metílicos y ácidos pécticos que sólo contienen moléculas del ácido sin esterificación. En el área alimenticia se usa por su capacidad de gelificar, en la estabilización de bebidas, emulsificación de aceites y en la elaboración de helados y gelatinas.
- Vitamina C: El jugo de limón contiene de 45-75 mg de ácido ascórbico, el cual se usa en el área farmacéutica (Fennema, 1993)
- Aceite esencial. Se usa como saborizante en bebidas, en el área de perfumería y farmacia.
- Enzimas: La pectina esterasa se obtiene del albedo y flavedo del limón. Se usa para la conversión de pectina a ácido péctico.

Además, junto con una enzima glucosidasa puede usarse como clarificante en jugos.

- Ácido cítrico: Se utiliza en alimentos para la preparación de bebidas, alimentos, dulces y en su forma de citrato de sodio como agente emulsificante. También se usa en platería, grabado, tintas e impresión
- Concentrado de jugo: Se utiliza para la elaboración de bebidas.
- Cáscara escarchada: Como un dulce típico mexicano.

En México su explotación a nivel industrial es baja, ya que se aprovecha principalmente para la obtención de aceite esencial y pectinas (Kaji, 2005)

1.2.- LA SEMILLA DE CHÍA

1.2.1 Descripción

El término Chía se refiere a un grupo de plantas anuales pertenecientes a la familia Lamiaceae, nativas del suroeste de California, México y América Central.

Son características de la especie hispánica poseer plantas anuales con un metro de altura, con periodo de florecimiento en julio y agosto; crecen en suelos arcillosos que estén bien drenados incluso en zonas áridas. En nuestro país esta planta es originaria de las áreas montañosas del oeste central. Las formas silvestres se dispersan a través de la Sierra Madre Occidental de Sonora y Chihuahua.

La *Salvia hispánica* cuenta con varios nombres comunes como: salvia española, artemisa española, chía mexicana, o simplemente chía (Beltrán & Romero, 2002)

El fruto de la planta de chía contiene cuatro semillas ovales de unos dos milímetros de largo por uno y medio de ancho, lisas, brillantes, de color oscuro, con manchas irregulares de color rojizo. Esta semilla oleaginosa está compuesta de tres capas, la exterior no se diferencia hasta el

momento en que la semilla tiene contacto con agua y se observa una capa de gel conocida como mucílago; este polisacárido está constituido por ácido urónico y xilosas (Hernández Jardón, 2007)

Las semillas de chía contienen entre 32-39% de aceite, el cual es rico en ácidos grasos α - linolénico, posee de 19-23% de proteína, por lo que se compara favorablemente con otros granos, como el trigo, el maíz y el arroz (Beltrán & Romero, 2002)

1.2.2 Aplicaciones

En la actualidad, la semilla de chía se utiliza en la preparación de una bebida refrescante llamada "chía fresca", tiene un alto contenido proteínico, por lo que se usa como alimento para ganado. En el ámbito industrial la chía es usada como espesante debido a su alto contenido de fibra y el mucílago que contiene (Beltrán & Romero, 2002) El aceite de chía se utiliza para pinturas o como sustituto del aceite de linaza. El aceite es claro, por lo que es un conservador excelente para los colores en lona, cerámica y madera (Beltrán & Romero, 2002)

1.2.3 Distribución

Es una especie de hábito terrestre, crece en bosques de pino, encino y pino-encino, a una altitud de 1900 m sobre el nivel del mar, el aprovechamiento de este cultivo es generalmente doméstico.

Su cultivo está distribuido en los estados de: Jalisco, Michoacán y Sinaloa. El área total cultivada asciende a 450 hectáreas por año, con un rendimiento de 300 toneladas por hectárea.

En países como Gran Bretaña se cultiva en pequeña escala (Beltrán & Romero, 2002)



Figura 2. Semilla de chía

1.3.- PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas son polímeros muy complejos, constituidos por hasta 20 aminoácidos diferentes, unidos por enlaces peptídicos. Como los aminoácidos contienen un grupo carboxílico (ácido) y un grupo amino (básico), se comportan como anfóteros. A pHs próximos a la neutralidad tanto el grupo amino como el grupo carboxílico están ionizados y la molécula, es un ion bipolar. El pH al que el ion bipolar es eléctricamente neutro se le denomina punto isoeléctrico. Las propiedades funcionales de las proteínas se ven frecuentemente afectadas por la solubilidad proteínica, las más afectadas son las propiedades espesantes, espumantes, emulgentes y gelificantes. Las proteínas insolubles tienen un uso muy limitado. La solubilidad de una proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio entre las interacciones proteína-proteína y proteína-disolvente; dentro de estas interacciones las que influyen de manera más destacada son las iónicas y las hidrofóbicas, las primeras promueven las interacciones proteína-agua y las segundas la interacción proteína-proteína.

A valores de pH inferiores o superiores a su punto isoelectrico las proteínas adquieren cargas netas positivas o negativas respectivamente, la repulsión electrostática que se produce fomenta las interacciones con el disolvente y por tanto la disolución de la proteína. La mayor parte de las proteínas de los alimentos son ácidas, es decir exhiben una solubilidad mínima a pH 4-5 y máxima a pH alcalino. Como la mayoría de las proteínas son muy solubles a pHs alcalinos, la extracción de proteínas de fuentes naturales se lleva a cabo a estos pHs y luego se recupera el extracto por precipitación isoelectrica (pH = 4-5). Esta propiedad es determinante para obtener un concentrado proteínico a partir de un alimento, y una vez aislado se puede trabajar en base a sus propiedades funcionales.

La gelificación proteínica consiste en la transformación de una proteína del estado de "sol" al estado de "gel" por desnaturalización. Esta transformación se ve facilitada por el calor, las enzimas y los cationes adecuados que inducen la formación de una red tridimensional. El "progel" suele ser un líquido viscoso en el que ha tenido lugar cierto grado de polimerización; en esta etapa la proteínica se despliega y se expone un número crítico de grupos funcionales de forma que permita el inicio de la segunda etapa, es decir la constitución de la red tridimensional proteínica. Las fuerzas implicadas en la formación de la red son, fundamentalmente, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Las redes de geles que están soportados por interacciones no covalentes son reversibles, es decir al calentarlos se funden al estado de progel.

En la elaboración de una biopelícula a partir de proteína, dicha propiedad gelificante es determinante para la obtención de ésta, ya que el proceso de elaboración propicia la formación de la red tridimensional,

al desnaturalizar la proteína por la acción de la temperatura (70) y la interacción de las proteínas con el agua (Fennema, 1993)

1.4.- EMPAQUES

1.4.1 Generalidades

La industria del empaçado tiene hoy en día un valor aproximado de 345 millones de Euros a nivel mundial y se prevé que continúe creciendo en tamaño e importancia (Ahvenanien, 2003)

Dentro del proceso de elaboración de alimentos a nivel industrial, sin importar que exista o no un método de conservación durante su elaboración, su tiempo de vida útil va a depender de un eficiente proceso de empaçado.

Procesos tales como el secado y la congelación serían ineficientes sin un empaçado, esto para controlar los efectos producidos por el oxígeno, la luz, vapor de agua, microorganismos y otros posibles contaminantes.

Hoy en día los empaques no juegan un rol pasivo dentro de la conservación de alimentos, se ha incrementado su papel en la conservación y en mantener la calidad y la seguridad de los alimentos a través de la cadena de distribución. Los empaques activos son aquellos que pueden intervenir o tener un control sobre procesos fisiológicos (respiración de frutas frescas y vegetales), procesos químicos (deterioro de los lípidos), procesos físicos (deshidratación), aspectos microbiológicos, y contaminación.

Dentro de los empaques activos, se tienen tres categorías: absorbentes, con sistema de liberación de aditivos (antioxidantes, conservadores, saborizantes) y otros sistemas. Los absorbentes son aquellos que retienen compuestos no deseados tales como el oxígeno el bióxido de carbono, el etileno, o agua en exceso, y evitan que entren en contacto con los alimentos. Los empaques con sistema de liberación, añaden o emiten compuestos hacia el alimento, como pueden ser antioxidantes o conservadores (Ahvenanien, 2003)

Así mismo la creciente demanda por alimentos procesados en el mercado, aumenta la cantidad generada de desechos provenientes de empaques de alimentos, lo que genera una preocupación por el impacto ambiental que el aumento de desechos trae consigo.

Hace apenas veinte años todos los desechos de empaque eran enviados a rellenos sanitarios o a incineración, ya que sólo se reciclaban el vidrio y el papel. Sin embargo, con el incremento en la producción de plásticos surge la necesidad de reciclar este material también.

La complejidad se da en la recolección de este material, así como la tecnología necesaria para reciclarlo, en adición, la preocupación por la salud obliga a rehusar estos plásticos reciclados en productos no alimenticios.

Recientemente el PET se ha tratado de rehusar como empaque de alimentos, esta aplicación requiere un conocimiento mayor sobre la

posible contaminación esto con el fin de disminuir los riesgos de salud al consumidor.

1.4.2 Empaques biodegradables

Los plásticos han tenido un crecimiento importante a lo largo del siglo XX. Se producen aproximadamente 220 millones de toneladas por año, esto se debe en parte a la alta demanda de empaques flexibles que se originó a principios de los noventa. El desarrollo de polímeros biodegradables ha sido objeto de investigación como una alternativa a los polímeros derivados del petróleo. Dentro de los polímeros biodegradables que se han desarrollado sobresalen los que se elaboran a partir de polisacáridos, y en menor medida los que se elaboran a partir de proteínas. Aún cuando las cualidades tecnológicas y de producción que ofrecen estos biopolímeros no equiparan a las que se pueden obtener con un polímero tradicional, estos pueden entrar en el mercado por la gran demanda que existe por parte de la sociedad de tener empaques que sean amigables con el medio ambiente, esta tendencia se presenta principalmente en países europeos (Ahvenanien, 2003)

De las proteínas empleadas para la elaboración de biopelículas las más estudiadas han sido la gretina, la proteína del suero, la de trigo, maíz, soya y proteína miofibrilar de pescado. Como la mayoría de los polímeros las biopelículas requieren modificadores para mejorar las propiedades mecánicas y físicas, en estos casos se incorporan plastificantes. Los plastificantes más comunes son los polialcoholes, mono, di, u oligosacáridos (Bamdad et al, 2005)

La elaboración de una biopelícula a partir de proteínas, depende de la concentración de las proteínas, del pH, y de la temperatura. La proteína debe estar soluble para formar la biopelícula. Dependiendo del origen de la proteína y su composición (aminoácidos que la conforman) el valor

de pH al cual la proteína estará soluble será diferente. Por ejemplo, las proteínas de marlín, con las cuales se elaboran biopelículas se llevan a un pH de 7 para que éstas se encuentren solubles (Yuca et al. 2005). Por otra parte las proteínas de origen vegetal generalmente tienen una solubilidad mayor a pHs alcalinos, por lo que se requiere elevar el pH para elaborar las biopelículas.

Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de materiales biodegradables para proteger alimentos, es que estos ofrezcan una permeabilidad óptima al vapor de agua, oxígeno y bióxido de carbono. El oxígeno está involucrado en múltiples reacciones de deterioro de los alimentos, como son la rancidez oxidativa, el crecimiento de algunos microorganismos, oscurecimiento enzimático, y pérdida de la calidad nutrimental. Por otra parte en algunos casos como el de frutas frescas y vegetales es necesario que exista un intercambio gaseoso con el medio, el cual es esencial en tejidos vegetales. (Ayranci & Tunc, 2002)

Se ha encontrado que la permeabilidad al vapor e agua está relacionada directamente con el plastificante (Fang et al. 2002) y también con el espesor. Mientras que la permeabilidad al oxígeno está relacionada con el tamaño de los polímeros que componen la red formadora de las películas y de la hidrofiliidad que pueda presentar tanto el polímero como el plastificante empleados (Sothornvit & Pitak, 2006) La incorporación de plastificante modifica la organización molecular haciendo la estructura menos densa y como consecuencia más permeable. El incremento de la permeabilidad en el contenido de plastificante puede estar relacionado a la hidrofiliidad de las moléculas del plastificante (Bertuzzi et al. 2002)

Por otra parte las pruebas mecánicas son referentes a la fractura o ruptura de un material; este es un fenómeno complicado desde el punto de vista de la alteración que sufre la estructura de la materia. Es posible

describir de manera global, el comportamiento del material frente a fuerzas que provocan deformaciones que en casos límite llegan a la modificación estructural que lleva a la fractura.

De las pruebas que se realizan frecuentemente a las biopelículas elaboradas de proteína se encuentra la extensión. Esta prueba se refiere a la extensión a la cual se somete el material sujeto por sus extremos y es estirado a una velocidad constante. En general las biopelículas elaboradas con proteínas presentan una menor elasticidad y una mayor rigidez, lo cual es contrario a lo encontrado en polímeros sintéticos.

1.5.- ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica que permite mediante el uso de geles de acrilamida la separación de proteínas con diferentes pesos moleculares o carga eléctrica. Este procedimiento resulta muy útil para la identificación de los componentes de una mezcla de proteínas o fracciones de ésta, así como en otros casos para la purificación de proteínas.

Existe una gran diversidad de sistemas electroforéticos en cuanto al soporte que le da forma, a las condiciones en que la proteína migra (geles nativos, desnaturalizantes, reductores). Sin embargo, cualquier

sistema de electroforesis aprovecha una característica inherente de las proteínas, que es la carga eléctrica, mas precisamente la carga eléctrica neta, ya que es ésta la que hace que las proteínas puedan migrar en un campo eléctrico, y este movimiento se ve influenciado por sus interacciones con la matriz del gel y las sustancias presentes en ésta.

Los componentes de un gel de acrilamida son:

- Acrilamida: es la molécula que es polimerizada para dar largas cadenas que al ser entrecruzadas constituyen una matriz en estado de gel, la cual conforma el soporte mecánico y también el filtro a través del cual migran las proteínas.
- Mutilen bis acrilamida: esta molécula entrecruza químicamente las cadenas lineales de acrilamida originando la malla consistente y porosa
- Persulfato de amonio (iniciador): forma radicales libres los cuales reaccionan con los monómeros de acrilamida para propiciar la polimerización.
- TEMED: El dimetilamino propionitrilo existe en forma de radicales libres, es un catalizador para la polimerización

Además del gel, un sistema electroforético consta de otros dos componentes:

- Solución amortiguadora de ensayo con un pH cercano a 9, cumple con dos funciones, mantener el pH en los reservorios y conducir la corriente para formar el campo eléctrico.
- Sistema de electrodos. Un ánodo y un cátodo, que al estar conectados a una fuente eléctrica generan un campo eléctrico (Gavilanes, 1989)

1.6 RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (RPE)

La Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) o Resonancia de Espín Electrónico (REE) es una técnica [espectroscópica](#) sensible a [electrones](#) desapareados. Esto es, generalmente, un [radical libre](#), para [moléculas orgánicas](#) o un [ion](#) de un [metal de transición](#), si es un [compuesto inorgánico](#). Como la mayoría de las moléculas estables tienen una configuración de [capa cerrada](#), con todos los [espines](#) emparejados, esta técnica tiene menos aplicación que la [resonancia magnética nuclear](#) (RMN). La Resonancia Paramagnética electrónica, apareció en 1945 cuando Zavoiski publicó un trabajo en el cual dio cuenta de la detección de una absorción de radiofrecuencias (133 MHz) en una muestra de CuCl_2 bajo un campo magnético de 4.75 mT. Inmediatamente se identificó este experimento como una transición de resonancia paramagnética electrónica (Alonso, 2002)

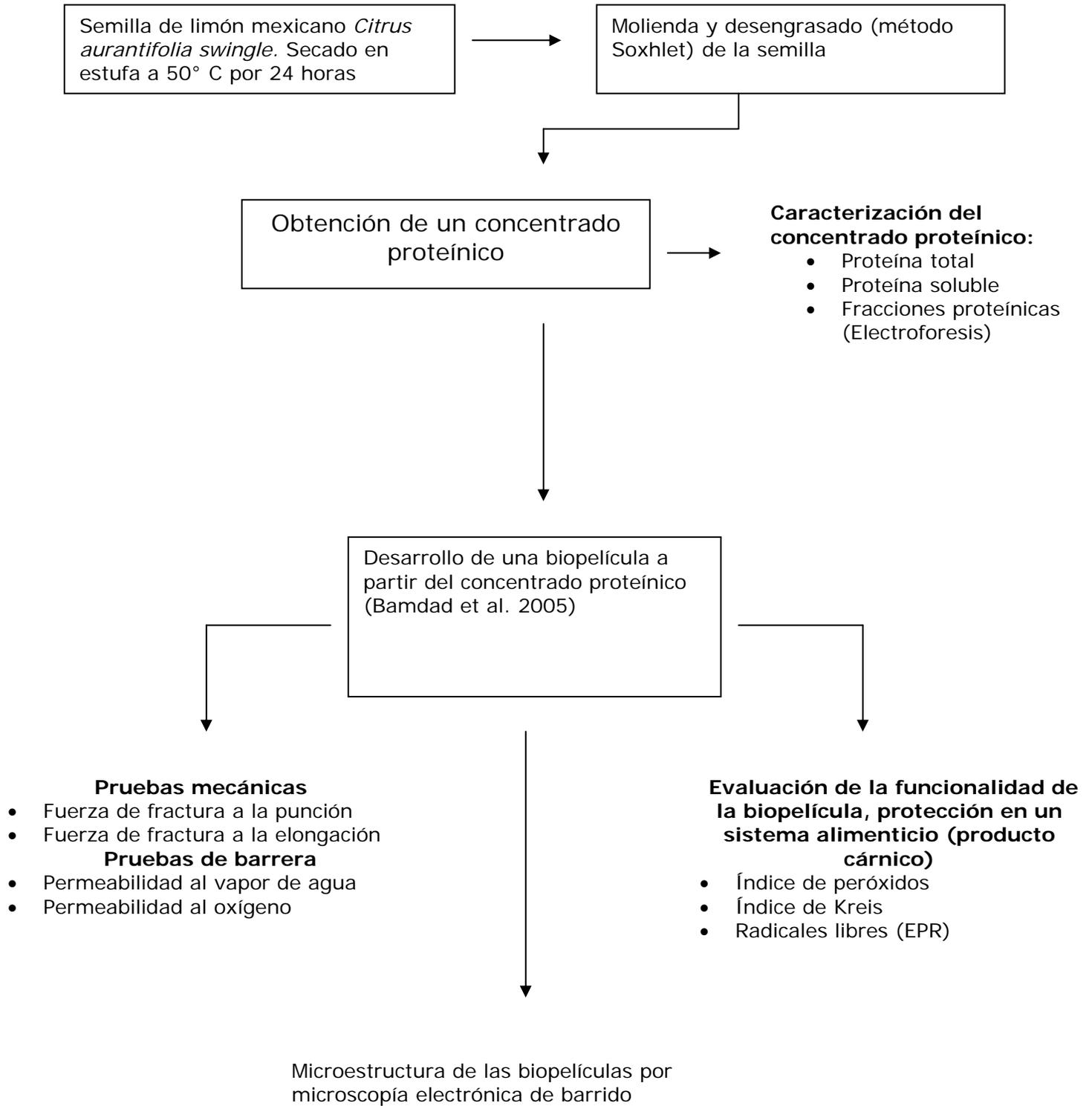
La RPE es una herramienta para el estudio de entidades paramagnéticas, además de tener una sensibilidad muy alta, por lo que se pueden estudiar sistemas con baja concentración de centros activos, ejemplo de ellos son materiales con radicales libres o defectos producidos por irradiación. El principio de operación de un equipo de resonancia paramagnética electrónica es muy similar al de resonancia magnética nuclear, es preciso señalar que existen dos grandes diferencias, entre estos dos espectros, la RMN realiza barridos en la zona de radiofrecuencias, y la RPE en la de microondas, en segundo lugar la RMN el campo magnético externo permanece constante, mientras que en RPE el campo electromagnético se varia linealmente. La detección directa de una señal de absorción, sólo es posible en muestras que contienen una alta concentración de electrones desapareados. En caso contrario, el ruido que acompaña a la señal hace muy difícil su detección. En la mayoría de los equipos la fuente de radiación y el detector se encuentran en un accesorio denominado "puente de

microondas". Los principios físicos de esta técnica son análogos a los del RMN, pero se excitan espines electrónicos, en lugar de nucleares. La energía de interacción con el [campo magnético](#) de los electrones es mucho mayor que la de los núcleos, de forma que se usan campos magnéticos externos más débiles, y [frecuencias electromagnéticas](#) más altas. En un campo magnético de 0.3 [Tesla](#), la resonancia de espín electrónico ocurre alrededor de 10 [GHz](#).

La RPE se usa en [física del estado sólido](#), para identificar y cuantificar radicales (esto es, moléculas con electrones desapareados), así como en [biología](#) y [medicina](#) para seguir sondas de espín biológicas. Estas sondas son moléculas con electrones desapareados especialmente diseñadas para estabilizar a estos electrones, y acoplarse a sitios específicos en una célula, de forma que se pueda obtener información de este sitio al medir el entorno de estos electrones (Alonso, 2002)

CAPÍTULO 2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diagrama general



2.2 SEMILLA DE LIMÓN MEXICANO

Para obtener un concentrado proteínico se colectaron semillas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle). Las semillas se retiraron directamente de los limones exprimidos, los cuales se obtuvieron de un comercio dedicado a la elaboración de jugos en un mercado local.

2.3 MOLIENDA Y DESENGRASADO

Las semillas se extendieron sobre una charola y se sometieron a secado en estufa (MAPSA modelo HDT-27) a 40 ° C por un lapso de 24 horas.

- a) Las semillas se molieron a 5500 rpm en un molino (IKA WERKE modelo MF 10 Basic) con el fin de reducir el tamaño de partícula y facilitar el proceso de desengrasado.
- b) Se desengrasó usando el método de Soxhlet (James, 1999)
- c) La muestra desengrasada se molió en un molino (IKA WERKE modelo MF 10 Basic) a 5000 rpm.
- d) El harina obtenida se tamizó usando un tamizador (MONTINOX mallas del no. 10 al 100) y las mallas del número 10, 20, 30, 40. El tamizado se consideró la fracción rica en proteínas. Se procedió a la extracción de las proteínas para obtener el concentrado proteínico

2.4 OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO DE PROTEÍNA

Para obtener el concentrado de proteína, se realizó el procedimiento de acuerdo con Bamdad et al. (2005), con algunas modificaciones.

- a) La fracción rica en proteína, se disolvió en agua alcalina (pH 11) en una concentración de 1:10 y se ajustó el pH con NaOH 0.1N de nuevo a pH 11.

- b) La mezcla se agitó por una hora y se mantuvo en refrigeración (4 ° C) por 24 horas, con el fin de sedimentar los constituyentes no proteínicos.
- c) Después de las 24 horas se centrifugó a 5000 rpm (Centrifuga marca Beckman, modelo M2) por 20 minutos a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y se ajustó el pH a 5.4 con HCl 0.1N. Se dejó sedimentar en refrigeración (4 °C) por 24 horas.
- d) El precipitado se colectó centrifugando a 5000 rpm (Centrifuga marca Beckman, modelo M2) por 20 minutos y se secó empleando una estufa con vacío a 50° C por 24 horas
- e) El precipitado seco, se colectó y se molió en un molino pequeño para obtener un concentrado proteínico de partícula fina.

2.5 CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO PROTEÍNICO

2.5.1 Determinación de la concentración de proteína

Se determinó, la proteína cruda total utilizando el método de Kjeldhal (AOAC 981.10).

2.5.2 Determinación de la concentración de proteína soluble

Se determinó, la proteína soluble por el método de Lowry (Nielsen et al., 1951).

2.5.3 Determinación de la concentración de carbohidratos solubles

Se determinó la concentración de los carbohidratos solubles totales, por el método de Fenol sulfúrico (Dubois et al. 1956)

2.5.4 Determinación electroforética de las fracciones de proteína en el concentrado

Con el fin de conocer las fracciones de proteína en el concentrado, se hizo una electroforesis empleando el método de Tricita-SDS-PAGE, el cual puede separar péptidos de bajos pesos moleculares.

Para la electroforesis se prepararon dos geles de poliacrilamida. En la Tabla 1 se muestran los componentes utilizados para la elaboración de los geles de poliacrilamida. Este tipo de geles se utilizaron por su sensibilidad para separar proteínas de bajo peso molecular (desde 5 kDa). (Schägger y Von Jagow, 1987)

Tabla 1. Componentes utilizados para preparar dos geles de poliacrilamida para el sistema Tricina-SDS-PAGE

Componente	Gel separador 15%	Gel concentrador 4%
Agua	0.9 mL	4.67 mL
Solución de acrilamida 30%, bisacrilamida 2.7%	7.5 mL	0.972 mL
Buffer Tris- HCl/SDS	5 mL	1.86 mL
Glicerol 80%	1.58 mL	----
Persulfato de Amonio 10%	75 μ L	40 μ L
N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED)	10 μ L	4.5 μ L

En este método la muestra utilizada fue una solución de CPSL de 10mg/mL llevada a pH 11, posteriormente se aplicó un tratamiento térmico por 3 minutos en un baño María y se corrió la electroforesis en una cámara Bio-Rad Mini protean III a 100 volts por 120 minutos, cargando la muestra en los geles junto con los marcadores de peso molecular (Sigma Aldrich 26-100 kDa).

Posteriormente los geles se colocaron en un recipiente de plástico para teñirlos con azul de Comassie durante toda la noche y se destiñeron con la solución I (50% metanol, 10% ácido acético en agua) por dos horas y luego con la solución II (5% metanol, 1% ácido acético en agua) por dos horas más.

2.6 ELABORACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS (Bamdad et al. 2005)

El concentrado proteínico se disolvió bajo constante agitación en agua destilada a una concentración de 5% w/v.

- a) A un primer lote se añadió glicerol como plastificante en una concentración de 50% (w/w) con respecto al concentrado proteínico.
- b) Al segundo lote se añadió sorbitol como plastificante en una concentración de 75% (w/w) con respecto al concentrado proteínico.
- c) Se ajustó el pH de la disolución a 11.5 ± 0.01 con NaOH 1N.
- d) La solución se calentó en un baño de agua a 70°C por 20 minutos.
- e) Pasados los 20 minutos la solución se filtró usando papel filtro grueso y se sonicó por 15 minutos.
- f) La solución ya filtrada y sonicada se vertió sobre un recipiente (caja de Petri o con base de teflón). Una vez que la solución se secó a temperatura ambiente ($20\text{-}25^\circ\text{C}$), la película se retiró para después someterla a las diferentes pruebas.
- g) La película obtenida se muestra en la Figura 3



Figura 3. Película elaborada a partir de CPSL.

2.7 EXAMEN DE LAS BIOPELÍCULAS CON MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Con el fin de conocer la estructura de las biopelículas elaboradas con CPSL, y con CPCh, se realizaron observaciones en microscopía electrónica de barrido.

Se tomaron dos lotes diferentes de películas:

- El primer lote se observó bajo condiciones normales de presión. Las películas empleadas fueron de CPSL/glicerol, CPSL/sorbitol, CPCh/glicerol. Se cortaron en pequeños cuadros y se observaron en un microscopio de barrido electrónico con las siguientes características:

Equipo: JEOL JSM 5410-LV (Bajo Vacío)

Magnificación 15 - 200 000x

Resolución aprox. 4 nm

Detectores electrones secundarios y dispersos

Almacenaje de imágenes: en forma digital (resolución 512 x 512 píxeles)

cámara de placas (formato 4 x 5")

- El segundo lote conformado por las mismas películas se sometió a un tratamiento para soportar las condiciones de vacío utilizando el siguiente equipo:

Ionizadora JEOL JFC 1100. Para recubrir muestras con oro para microscopía electrónica de barrido (baño de oro)

Una vez que las muestras fueron recubiertas de oro se observó en el mismo microscopio electrónico de barrido utilizado en el primer lote de películas.

2.8 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS BIOPELÍCULAS

Todas las propiedades mecánicas evaluadas sobre las películas de origen proteínico se realizaron con un equipo para pruebas mecánicas y de textura (Sintech 1/S, MTS, EUA) (Figura 4), el cual está conectado a una computadora que suministra la información del comportamiento de las películas durante las pruebas.

Las pruebas mecánicas que se realizaron a las películas fueron las de fuerza de fractura a la punción y la fuerza de fractura a la extensión, esto conforme al procedimiento estándar aplicado para este tipo de materiales (ASTM D 882, 2002). En cada una de las pruebas se evaluó

el esfuerzo verdadero, la deformación de fractura y el módulo de Young. La celda de carga utilizada fue de 100 N.



Figura 4: Maquina de pruebas mecánicas Sintech 1/s

2.8.1 Acondicionamiento de las biopelículas

Antes de realizar las pruebas mecánicas sobre las películas elaboradas con proteína de semilla de limón, se realizó un acondicionamiento de éstas. Se sometieron a una humedad relativa de $62 \pm 2\%$ y a $23 \pm 2^\circ \text{C}$ por 48 horas. La humedad relativa se logró con una solución saturada de $(\text{NO}_3)_2\text{Mg} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y se midió con un higrómetro (Oakton, Japón).

2.8.2 Fuerza de fractura a la punción

Para realizar esta prueba, las películas elaboradas a partir de proteína de semilla de limón, se cortaron en forma circular con un diámetro

aproximado de 10 cm. Se midió el espesor en 5 diferentes puntos, 4 mediciones se hicieron en el perímetro y una se hizo en el centro, utilizando para esto un micrómetro análogo (Mitutoyo, Japón). Las películas se colocaron en un soporte formado por discos metálicos con un diámetro de 9 cm, los cuales se unen por medio de tornillos. La película ya montada en el soporte se colocó sobre el equipo. La prueba comenzó cuando un objeto cilíndrico con superficie plana y lisa se desplazó de manera perpendicular hacia la película, a una velocidad de 100 mm/s hasta lograr la fractura de la película.

Las condiciones de trabajo para esta prueba fueron:

- Velocidad de compresión 100 mm/s
- Deformación relativa 50%

2.8.3 Fuerza de fractura a la extensión

Para realizar esta prueba las películas elaboradas a partir de proteína de semilla de limón, se cortaron en tiras uniformes de 1 cm de ancho por 8 cm de largo. Posteriormente se midió el espesor en tres diferentes puntos, utilizando un micrómetro análogo (Mitutoyo, Japón). Las tiras de la película se sujetaron de cada extremo a unos sujetadores montados en el equipo, y se procedió a estirarlas a una velocidad constante de 100 mm/s hasta que las películas se fracturan.

2.8.4 Tratamiento de datos

Los datos obtenidos con el equipo Sintech fueron: fuerza (lbf) y tiempo (min) los cuales se trataron de la siguiente manera:

- Esfuerzo nominal (σ):

$$\sigma = F/A \longrightarrow \text{Pa}$$

Donde A es el área de la punta usada (para pruebas de punción) y A es el espesor de la película X el ancho de la tira (para pruebas de extensión).

Con la fórmula de la velocidad ($v = L/t$) se calculó el valor de L (longitud final) al tiempo t en cualquier momento de la prueba $L = v * t$ donde v es igual a 100mm/s para ambas pruebas.

Conociendo el valor de L se puede obtener la deformación relativa nominal (e)

$$e = (L - L_0) / L_0$$

Donde L_0 es la longitud inicial de la película.

- Esfuerzo verdadero (σ_v):

El esfuerzo verdadero se calculó usando los valores de σ y e

$$\sigma_v = \sigma (1 + e)$$

El valor de e se usa también para calcular el valor de la deformación relativa verdadera o Deformación de Hencky (ϵ_H):

$$\epsilon_H = \ln (1 + e)$$

Con los valores de esfuerzo verdadero (σ_v) y de deformación relativa verdadera (ϵ_H) se construyeron las gráficas de la relación esfuerzo-deformación que presentan las películas durante las pruebas mecánicas.

- El modulo de Young es el valor de la pendiente de la zona inicial de la curva esfuerzo-deformación.

2.9 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (PVA)

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua que tienen las biopelículas elaboradas a partir de concentrado de proteína de semilla de limón Mexicano, se realizaron varios ensayos del método ASTM E96-95 (2002) (Figura 5)

Este método consistió en determinar gravimétricamente la cantidad de agua que absorbe el cloruro de calcio anhidro. El cloruro de calcio se colocó dentro de una cámara que se cubre con la biopelícula siendo éste el único paso para el vapor de agua. La cámara se sometió a condiciones estándar de humedad relativa $62 \pm 2\%$. La humedad relativa se logró con una solución saturada de $(\text{NO}_3)_2\text{Mg} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y se midió con un higrómetro (Oakton, Japón). La ganancia en peso en las celdas se monitoreó cada 24 horas por un lapso de cinco días.



Figura 5. Celdas para determinar la PVA.

La PVA se obtuvo luego del siguiente tratamiento de datos:

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

$$\text{TVA} = (\text{G}/\text{t})/\text{A}$$

Donde G es la ganancia de peso durante la prueba, t es el tiempo que duró la prueba y A es el área total de película que cubre la celda.

- Permeanza

$$\text{Permeanza} = \text{TVA}/(\text{S} * \text{R})$$

Donde S es la presión de vapor del agua a la temperatura de prueba y R es la humedad relativa.

- Permeabilidad al vapor de agua

$$\text{PVA} = \text{Permeanza} * \text{espesor}$$

- Unidades de la permeabilidad al vapor de agua: ng/Pa*s*m

2.10 PERMEABILIDAD AL OXÍGENO

La permeabilidad al oxígeno fue determinada en las películas de origen proteínico (CPSL Y CPCh) de acuerdo con el método ASTM D1434, siguiendo el procedimiento volumétrico. Con este método se obtuvo el

coeficiente de transmisión de oxígeno de cada una de las películas, monitoreando el cambio de volumen generado por la transferencia de moléculas de oxígeno a través de la película. Es con el coeficiente de transmisión de oxígeno con el cual se obtiene la permeabilidad.

Los materiales utilizados fueron:

- Cilindro de gas comprimido de oxígeno (Marca Infra, extra seco 99.5%)
- Líquido capilar – 4-metil-2-pentanona ($\rho = 0.801 \text{ g/mL}$)
- Papel filtro de retención media
- Celda de transmisión de gas (Figura 6)
- Capilar de precisión



Figura 6. Celda de transmisión de gas.

El procedimiento seguido fue el siguiente: Se colocaron dos piezas de papel filtro en la parte superior de la celda de prueba, se colocó el espécimen de prueba en la parte superior de la celda previamente

acondicionado a una humedad relativa constante (50% HR) y cortadas de forma circular con un diámetro aproximado de 9 cm (Figura 6)



Figura 7. Parte interior de la celda de transmisión de gas.

Posteriormente se sellaron los dos compartimientos de la celda de transmisión usando un aro de teflón ligeramente engrasado y se fijaron utilizando cuatro tornillos colocados de manera simétrica.

Se aplicó una presión de gas positiva por un lapso de 10 minutos, por medio de las válvulas de gas abiertas, con el fin de purgar la celda de aire y saturarla de oxígeno. Se introdujeron aproximadamente 20 mm de líquido capilar en el capilar y se cerró la válvula de escape superior. Se ajustó la presión de acuerdo al espécimen de trabajo, previamente se revisó la celda para detectar cualquier tipo de fuga. Se tomaron las lecturas del desplazamiento del líquido con cronómetro.

2.11 EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS, EMPLEÁNDOLA COMO EMPAQUE DE UN SISTEMA ALIMENTICIO

Con el fin de evaluar la funcionalidad que las películas pueden ofrecer como un empaque de alimentos, se llevaron a cabo diferentes ensayos usando dichas películas para proteger una matriz alimentaria.

El alimento que se escogió para estas pruebas fue el jamón serrano, ya que tiene una baja actividad acuosa, lo que impide la proliferación de microorganismos que pudieran afectar el monitoreo de la oxidación de los lípidos, que fue el proceso de deterioro que se siguió.

En estas pruebas se usaron las biopelículas elaboradas con proteína de semilla de limón, y las biopelículas elaboradas con proteína de chia, utilizando dos diferentes plastificantes, sorbitol y glicerol. Como control se emplearon plásticos de origen sintético (Egapack y Ziploc), y fundas para cárnicos de origen natural (celulosa).

El jamón serrano se pesó (60 g) y se colocó dentro de las diferentes películas protectoras, las cuales se sellaron térmicamente (Figuras 8 y 9). Se monitoreó el tiempo cero, para conocer el posible deterioro inicial de las muestras. Posteriormente se llevan a cabo dos monitoreos más, a los 10 días y finalmente a los 24 días, los tiempos fueron establecidos de manera arbitraria.



Figura 8. Jamón Serrano empacado en película de CPCh



Figura 9. Jamón Serrano empacado en película deCPSL

El monitoreo de las muestras consistió en una extracción de la grasa de la matriz alimentaria, para después realizar pruebas de índice de peróxidos y de índice de Kreis. Adicionalmente se realizó una prueba cualitativa de cantidad de radicales libres medidos con Resonancia Paramagnética Electrónica en el último ensayo.

- Extracción de lípidos por el Método de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, 1959)

Se pesó de 2 a 20 g de la muestra y previamente se determinó la humedad en un vaso mezclador. Se adicionó agua destilada para llevar a un total de 16 mL junto con 40 mL de metanol y 20 mL de diclorometano. Se maceró por dos minutos y se le agregó 20 mL de diclorometano, se homogenizó por 10 segundos en un homogenizador a alta velocidad. Se agregaron 20 mL de agua destilada y se maceraron por 30 segundos más; Se centrifugó por 10 minutos a 2000 rpm. Se extrajo la capa de diclorometano sin perturbar lo demás, se filtró a través de un papel filtro grueso y se eliminó el disolvente.

- Determinación de Índice de peróxidos, micrométodo (Kirk et al. 1996)

Se pesó 0.5 ± 0.05 g de grasa en un matraz Erlenmeyer de 125 o 250 mL y se adicionaron 2.5 mL de una mezcla de diclorometano-ácido acético (2:3). Se agregaron 0.05 mL de una solución de KI saturada y se dejó reposar en la oscuridad por 60 segundos. Se añadieron 7.5 mL de agua y 0.1 mL de almidón como indicador. Si se presentaba una coloración azul oscura, se titula con tiosulfato de sodio 0.001 N hasta la desaparición del color azul.

- Índice de Kreis (Kirk et al. 1996)

Se disolvieron de 50 a 500 mg de grasa en 5 mL de diclorometano, se añadieron 10 mL de ácido tricloroacético al 30% en ácido acético y 1 mL de fluoroglucinol al 1% en ácido acético. Se agitó e incubó por 15 minutos a 45° C. Se enfrió y se agregaron 4 mL de etanol. Se midió a 540 nm frente a un blanco.

2.12 DETERMINACIÓN DE RADICALES LIBRES POR RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

Para llevar a cabo la determinación de radicales libres, la extracción de la grasa de la matriz cárnica se realizó por el método de Bligh y Dyer (Balarezo, 1998)

Una vez que se obtuvo la grasa en forma de aceite, se pesó 1g y se adicionaron 3 mg del atrapador de spin electrónico (N-T-butil-fenil-nitrona)(Papadimitriu et al. 2006).

El aceite se vertió en un tubo capilar de 2 mm de diámetro, usando una micro pipeta de 1 mL

Se realizó la determinación de radicales libres en un equipo de Resonancia Paramagnética Electrónica modelo Elexys E500, marca Broker bajo las siguientes condiciones:

Intensidad: doble

Campo: doble

Rango del campo [G]: 3462.7 a 3562.7, 1024 pts

Centro 3512.7

Parámetros disponibles

Promedio de escaneos: 6

Resonador SHQE

Estado de agregación: Líquido

Tiempo de muestreo [s] 0.02048

Amplitud 0.0007

Frecuencia [Hz] 100000

Frecuencia de microondas [Hz] 9.857561e+09

Potencia de microondas [W] 0.0201

CAPÍTULO 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO PROTEÍNICÓ A PARTIR DE SEMILLA DE LIMÓN MEXICANO

La semilla de limón presentó una cantidad importante de proteína como se puede ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis proximal de la semilla de limón mexicano

Componente	%
Lípidos	30-35
Proteínas	20-25
Carbohidratos	40-45

Con base en estos resultados se decidió utilizar la proteína de semilla de limón para obtener un concentrado a partir del cual se elaboraron biopelículas.

A partir de la fracción proteínica, se llevó a cabo la obtención del concentrado.

3.2 CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SEMILLA DE LIMÓN

3.2.1 Determinación de proteína cruda total, método de Kjeldhal

La primera parte de los resultados obtenidos, corresponde a la caracterización del concentrado proteínico obtenido a partir de la semilla de limón. Parte de esta caracterización, comprende la determinación del contenido de proteína total del concentrado, en este caso se empleó el método de Kjeldhal. El promedio de proteína obtenido fue de 86.81% (Tabla 2). Tomando en cuenta que se utilizó el factor de conversión estándar que es de 6.25, ya que se desconoce el contenido de nitrógeno

total en la proteína de la semilla de limón. Este porcentaje de proteína total es el que se esperaba teniendo en cuenta que se trabajó con un concentrado proteínico que indicó que el proceso de obtención fue el correcto.

Tabla 2. Contenido de proteína cruda total del concentrado proteínico de semilla de limón (CPSL) método de Kjeldhal

	%Proteína
Promedio	86.81
CV	0.3726

Se empleó el factor 6.25

3.2.2 Determinación de proteína soluble, método de Lowry

Con el fin de utilizar el concentrado para la elaboración de películas, la proteína debe encontrarse en solución. La cuantificación de proteína soluble se realizó por el método de Lowry, solubilizando primero el concentrado, para luego llevar a cabo la determinación. En la Tabla 3 se muestra que el resultado obtenido fue de 85.01% en promedio, este valor es bastante bueno considerando que el resultado de proteína total es apenas superior, esto quiere decir que casi toda la proteína es soluble en las condiciones ya señaladas. Por tanto el concentrado se aprovechó casi en su totalidad para formar la película.

Tabla 3. Contenido de proteína soluble del CPSL método de Lowry

	Abs.	% Proteína soluble
Promedio	0.1908	85.01
CV	1.6294	1.97

3.2.3 Determinación de carbohidratos totales, método fenol sulfúrico

El resto de los componentes en el concentrado, se puede ver en la Tabla 4. Se encontró que el 7.39% corresponde a carbohidratos solubles, este parámetro se determinó por el método de fenol sulfúrico. El resto de los componentes del concentrado de proteína de semilla de limón corresponde entonces a fibra insoluble.

Tabla 4. Contenido de carbohidratos presentes en el CPSL, método fenol sulfúrico

	%Carbohidratos
Promedio	7.39
CV	1.84

La evaluación de estos componentes resultó importante para caracterizar el concentrado, ya que la presencia de otros componentes en el concentrado podría afectar la funcionalidad de la proteína para poder formar la película, así como las propiedades mecánicas y de barrera que presente.

3.2.4 Determinación de fracciones proteínicas por electroforesis

Con el fin de conocer la influencia que tiene el peso molecular de la proteína sobre la formación de las películas y posteriormente en las propiedades que ésta va a presentar, se realizó una electroforesis. Con esta técnica es posible conocer no solamente el peso molecular de la proteína de la semilla de limón, sino también las fracciones que la componen (Schäger & Von Jagow, 1987)

Una vez que se realizó la electroforesis se encontró lo siguiente: La proteína de la semilla de limón está compuesta básicamente por 5 fracciones proteínicas de bajo peso molecular. En la Tabla 5, se muestran los pesos y fracciones proteínicas promedio. La más grande tiene un peso de 48.34 kDa en promedio y corresponde al 5.86% del total de la proteína, la siguiente tiene un peso de 38.05 kDa en promedio y representa el 8% del total de la proteína, la tercera

representa solamente el 2%. Es tal vez por esta razón que no aparece en el primer carril de la electroforesis, siendo este carril el que tenía una mayor concentración de proteína soluble, y por lo tanto la definición de las bandas no es muy clara. El peso molecular correspondiente a la tercera fracción proteínica es de 30.4 kDa en promedio. Las últimas dos fracciones proteínicas de la semilla de limón son las de menor tamaño, pero las más abundantes, 21.1 kDa que equivalen a 31.2 % y 13.5 kDa al 26.5%.

Tabla 5. Cantidades relativas de las distintas fracciones proteínicas del CPSL

Bandas	Peso molecular (kDa)	Cantidad relativa %
1	48.343	5.87
2	38.052	8.03
3	21.099	31.2
4	13.583	26.5
5	30.465	2.09

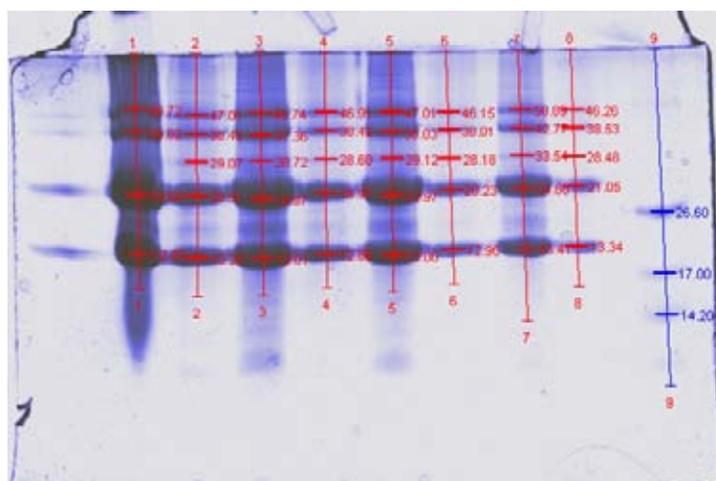


Figura 10. Gel de Electroforesis del CPSL.

En la Figura 10, se observa el gel de electroforesis correspondiente a las fracciones de la proteína de semilla de limón. En el carril # 9 se encuentran las bandas del marcador de peso molecular, y en los carriles 1, 3, 5, 7 se encuentran las fracciones que componen la proteína

de semilla de limón. En los primeros carriles la resolución de las bandas es pobre, debido a que se encuentran en mayor concentración, en los carriles finales, la concentración de proteína es menor y la resolución aumenta. Es en éstas donde se observan claramente las cinco fracciones y su cantidad relativa.

El conocimiento de las fracciones proteínicas que componen a la proteína total de la semilla de limón puede ayudar a explicar el proceso de formación de las películas. Este proceso se puede dividir en dos pasos (Yong y Rhee, 2004), el primero es aquél donde la proteína es sometida a una desnaturalización en un medio alcalino, con el fin de exponer los grupos funcionales presentes en el péptido, así como facilitar la solubilización de éste en el medio acuoso. El segundo corresponde a una deshidratación de la superficie, es durante la segunda parte de la formación de la película que las proteínas desdobladas pueden formar una red, esto se debe a las interacciones que se dan entre proteínas, como pueden ser puentes de hidrógeno, enlaces disulfuro, e interacciones hidrofóbicas. Para el caso de algunas películas proteínicas, como la de soya, se conoce también que es esencial la presencia del arreglo β -plegada (Yong & Rhee, 2004)

En el caso de las películas elaboradas con proteína de semilla de limón, las cinco fracciones proteínicas van a interaccionar de la misma forma para poder formar la red, teniendo en cuenta que esta proteína cuenta con tres fracciones con un peso mayor a 30 kDa que son la parte minoritaria y dos fracciones de menor tamaño, que conforman la parte mayoritaria. Es posible establecer que durante la formación de la red para la formación de la película, el papel de las proteínas de menor peso molecular es unirse mediante interacciones hidrofóbicas, puentes disulfuro y de hidrógeno a las proteínas de mayor peso molecular, para aumentar el tamaño de la red, aunado a esto se debe considerar la presencia del plastificante. Generalmente éste se agrega para evitar que

la película se torne quebradiza. El plastificante interfiere debilitando las interacciones del polímero, en este caso de las proteínas, como consecuencia aumenta la flexibilidad y la extensibilidad de las películas, pero disminuye la resistencia mecánica y de barrera. Usualmente se usan como plastificantes polialcoholes, mono, di y oligosacáridos (Gounga, et al. 2007) En este caso usamos glicerol como plastificante por sus propiedades, como son: alto punto de ebullición, solubilidad en agua, polaridad, su miscibilidad con las proteínas y el no ser volátil. El proceso de formación, en el cual intervienen las fracciones de proteínas serán determinantes en las propiedades mecánicas, de barrera y el potencial uso como recubrimiento de la película elaborada a partir de proteína de semilla de limón.

3.3 MICROGRAFÍAS DE LAS BIOPELÍCULAS

Se llevó a cabo la captura de micrografías de la película de proteína de chíá con microscopía electrónica de barrido.

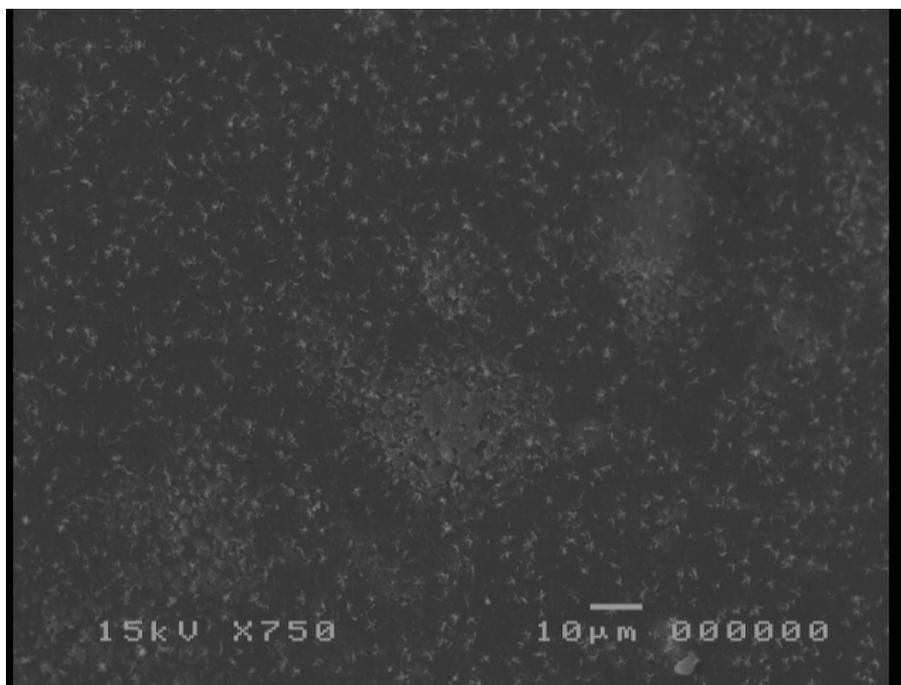


Figura 11. Micrografía de película de CPCh/sorbitol

750X

La primera micrografía (Figura 11) tiene un aumento de 750 X y presenta la superficie de una película elaborada con proteína de chí. Se ve claramente en la superficie una gran cantidad de puntos blancos, estos puntos blancos aparecen en la siguiente fotografía, la cual tiene un aumento mayor, y se ve que tienen una apariencia como de un asterisco, o una estrella, dado que es una parte minoritaria en el grueso de la película se puede suponer que se trata de algo ajeno a la proteína y el plastificante que son la parte mayoritaria. Entonces podría tratarse de fibra que estuviera presente en la película.

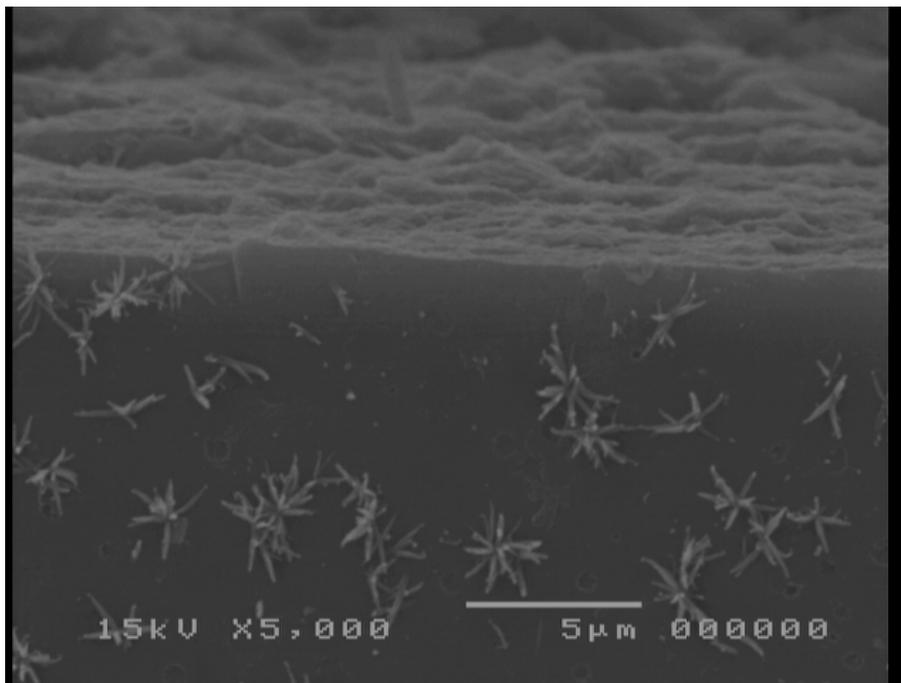


Figura 12. Micrografía de película de CPCh/sorbitol 5000X

En esta segunda micrografía (Figura 12), se presenta la superficie de la película elaborada con CPCh/glicerol. El aumento de esta es de 5000 X, por lo que se aprecian de manera clara los "puntos blancos" sobre la superficie. Por su apariencia se puede suponer que es fibra la cual no debería estar presente en la película, por lo que para tener evidencia de

que se trata de este componente se realizó la determinación de fibra en el concentrado.

Las Figuras 13 y 14 presentan un corte transversal de la película de proteína de chíá, en estas fotografías se aprecia claramente que existen conglomerados amorfos, que pueden estar compuestos por proteína o por plastificante, y que dan soporte a la estructura de la película en forma de capas.

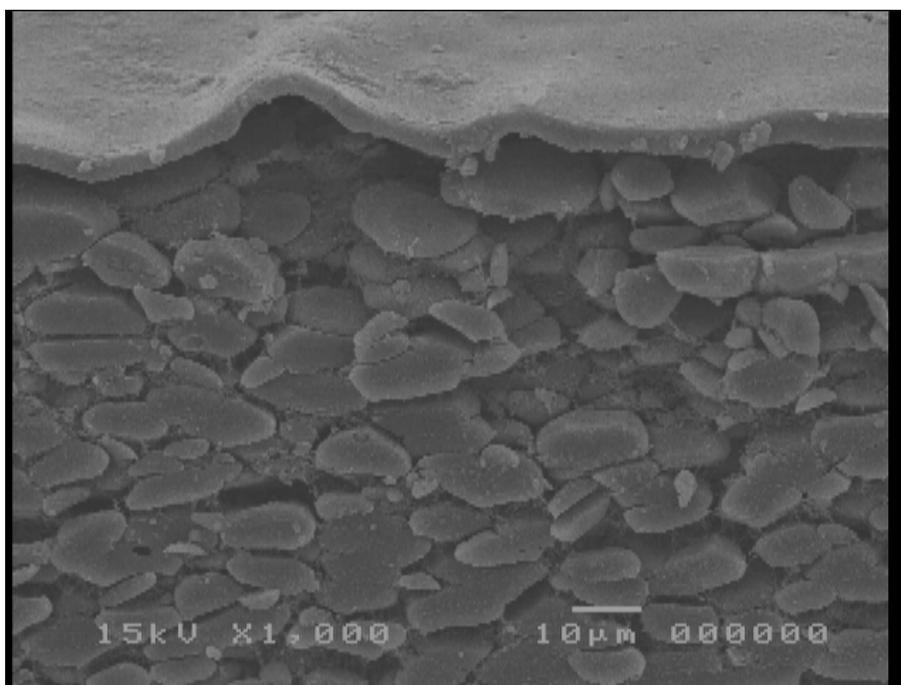


Figura 13. Micrografía de película de CPCh/sorbitol 1000X

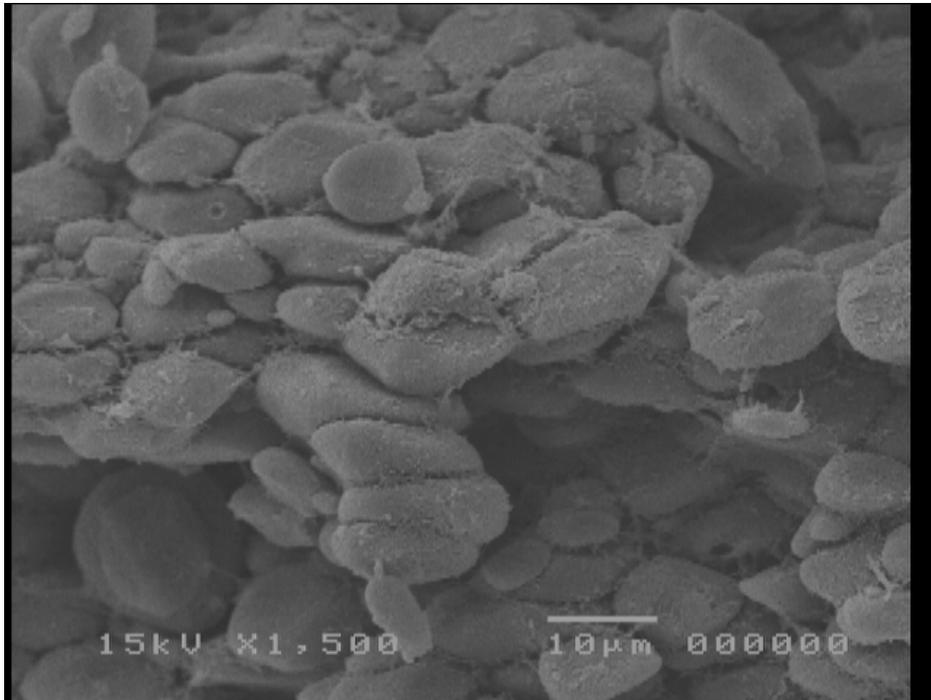


Figura 14. Micrografía de película de CPCh/sorbitol 1500X

En cuanto a las micrografías tomadas a las películas elaboradas con CPSL, estas son de apariencia similar, excluyendo la posible presencia de fibra en la Figura 15 se muestra una película de chía con un aumento de 500 X.

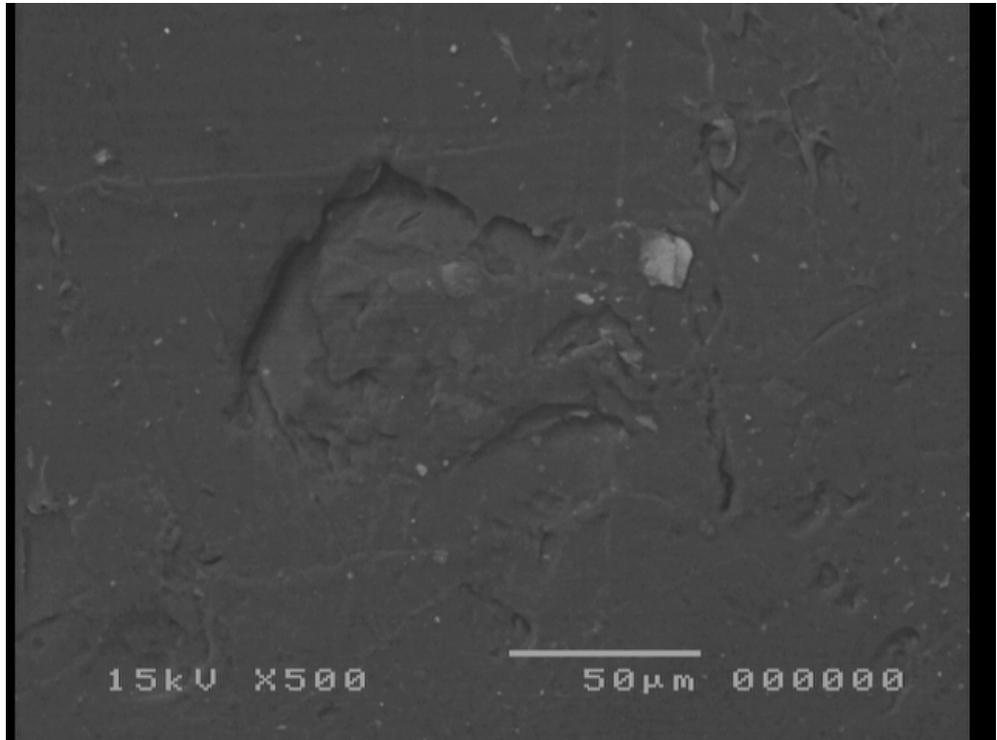


Figura 15. Micrografía de película de CPSL/sorbitol 500X

En esta Figura se ve la superficie de una película de semilla de limón. Se puede ver claramente que es homogénea, sin poros, ni se ven señales de presencia de fibra.

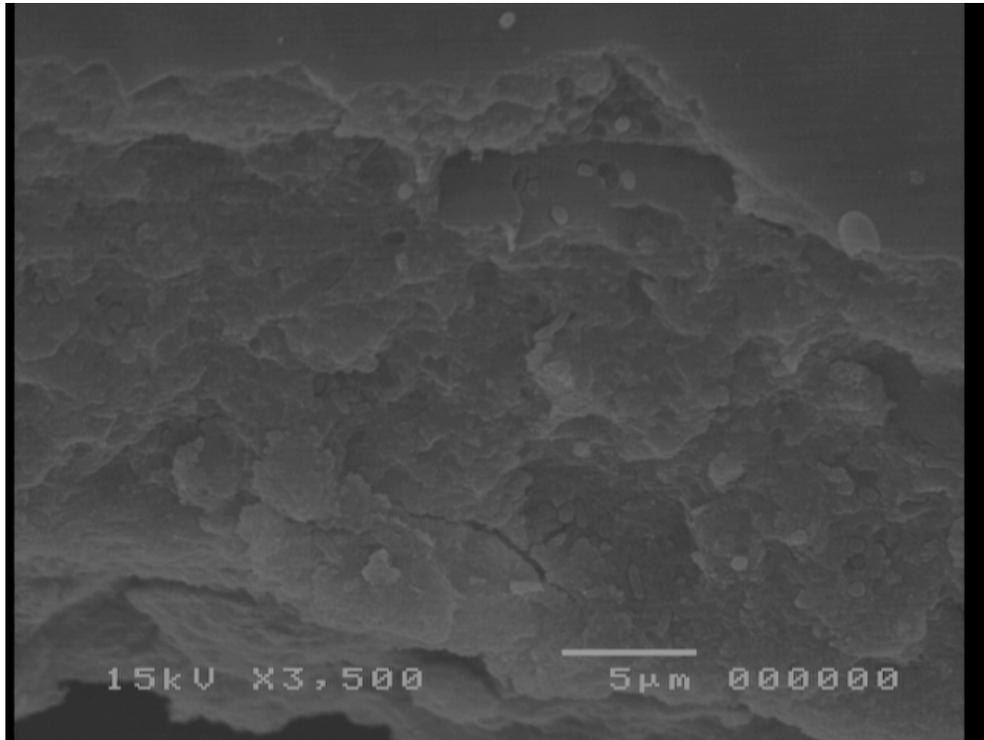


Figura 16. Micrografía de película de CPSL/sorbitol

3500X

En la Figura 16 se ve un acercamiento de la película, aunque no fue posible lograr un corte transversal sí se repiten las estructuras que se encontraron en las fotografías de chía, por lo que se puede decir que esas estructuras son las proteínas interactuando con el plastificante para formar la película. Es decir, la película elaborada con CPSL, está formada por capas en las cuales se da la interacción del plastificante con la proteína.

3.3.1 Determinación de fibra en las películas elaboradas con CPCh

Se realizó la determinación de la fibra total en las biopelículas (Mañas et al. 1994), dio como resultado la presencia de un 8.47% de fibra total presente en la película, lo cual podría explicar la presencia de los puntos blancos en las fotografías. La fibra presente está dentro de un porcentaje posible, por que aproximadamente el 80% del concentrado de proteína de chíá corresponde a proteína, y por lo tanto dentro del 20% restante es posible que haya una cantidad considerable de fibra y que al elaborar la película, un porcentaje de la fibra esté presente.

Tabla 6. Contenido de la fibra dietética total en las películas elaboradas con CPCh

	% FD Total
PROMEDIO	8.47
CV	3.20

3.4 PROPIEDADES MECÁNICAS DE LAS PELÍCULAS DE CPSL

3.4.1 Fuerza de fractura a la punción

Las pruebas mecánicas son referentes a la fractura o ruptura de un material. Este es un fenómeno complicado desde el punto de vista de la alteración que sufre la estructura de la materia. Es posible describir de manera global el comportamiento del material frente a fuerzas que provocan deformaciones que en casos límite llegan a la modificación estructural que lleva a la fractura (Figura 17)

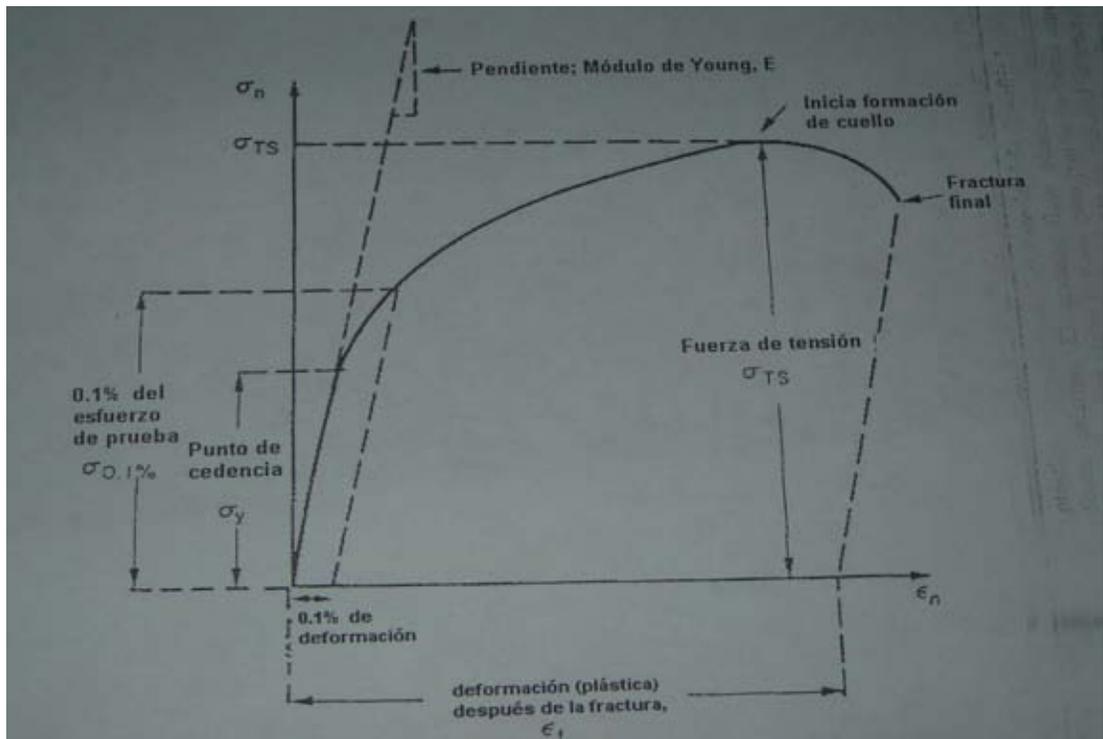


Figura 17. Esquema del comportamiento de un cuerpo ante el esfuerzo

En la Figura 17 se muestra un esquema que representa de manera general el comportamiento de un cuerpo ante el esfuerzo. Al inicio la deformación es mínima y el comportamiento del material es lineal, es en

este punto cuando el material aún no sufre una deformación tal, que no pueda regresar a su estado original, pasando este punto inicia una deformación plástica, en la cual el material no se fractura pero sufre modificaciones irreparables, es decir no puede volver a su forma original. Finalmente llega al punto de fuerza de tensión y de fractura.

De las películas elaboradas a partir de CPSL/ (glicerol y sorbitol) se determinaron sus propiedades mecánicas, dentro de las cuales se encuentra la de resistencia a la punción; ésta se realizó utilizando una maquina de pruebas mecánicas Sintech 1/s. La resistencia a la punción da una idea de la resistencia que tiene la red compuesta por las fracciones proteínicas de la semilla de limón y el plastificante. Estos dos componentes juegan un papel relevante, porque como se ha mencionado, al aumentar la concentración del plastificante, disminuye la resistencia de la película, debido a que se reducen las interacciones entre proteínas. Por otra parte si no estuviera presente el plastificante, la película sería quebradiza y por tanto también disminuye la resistencia. En la Figura 18 se muestra un ejemplo del esfuerzo verdadero al cual está sometida la película, en función de la deformación de Hencky que es la deformación que sufre la película por la fuerza ejercida sobre ésta. Como se ve en la gráfica la deformación llega al punto en el cual la película no logra soportar en su estructura el esfuerzo y por lo tanto se fractura. La película se sigue deformando pero ya no soporta ningún esfuerzo.

Tabla 7. Determinación de las propiedades mecánicas de las películas elaboradas con CPSL: punción

TIPO DE PELÍCULA		PROPIEDADES MECÁNICAS		
		EN PUNCIÓN		
Concentrado de proteína 5% (W/V)	Plastificante	Esfuerzo verdadero (kPa)	Deformación de fractura	Módulo de Young (kPa)
semilla de limón	Glicerol 50% (w/w)●	518.35 ± 116.a (22.44%)	1.46 ± 0.15a (18.32%)	83.33 ± 18.94a (30.21%)

	Sorbitol 75% (w/w)●	492.02 ± 75.6^a (15.37%)	$1.35 \pm 0.07a$ (5.21%)	$79.45 \pm 16.73a$ (21.05%)
chía	Glicerol 50% (w/w)■	$1774.7 \pm 449b$ (25.3%)	$1.9 \pm 0.2a$ (11%)	$76.9 \pm 23.6a$ (30.7%)
	Sorbitol 75% (w/w)■	$1283.2 \pm 221b$ (17.2%)	$1.5 \pm 0.1a$ (10%)	$72.9 \pm 14.2a$ (19.5%)

*Promedio \pm desviación estándar y CV; cuando las letras son iguales no existe diferencia significativa entre ellas ($\alpha=0.05$)

● n = 8

■ Hernández Jardón, 2007

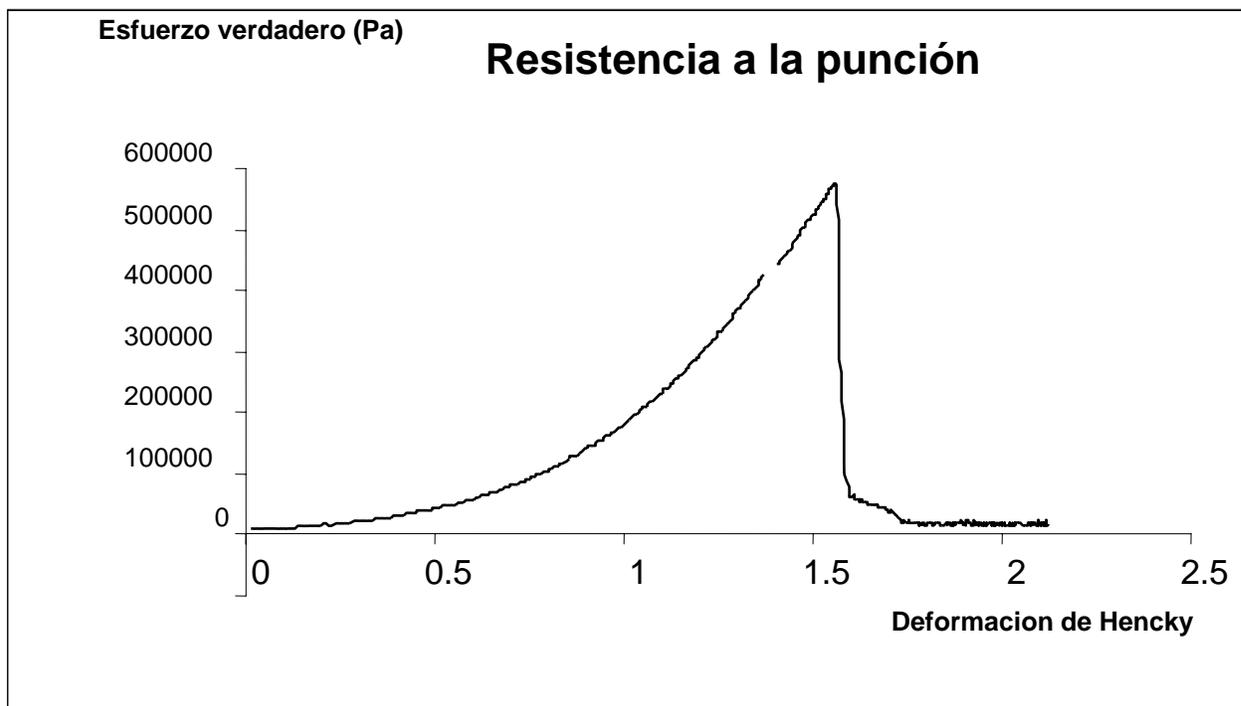


Figura 18. Comportamiento de las películas elaboradas con CPSL/ (glicerol/y sorbitol)

Los valores obtenidos para resistencia a la punción se muestran en la Tabla 7 y son en promedio de 14.6 N con un espesor de 133 μm para las películas de CPSL/glicerol y de 13.75 N con el mismo espesor promedio para las elaboradas con CPSL/ sorbitol, que comparado con la resistencia a la punción que ofrece, por ejemplo un película elaborada a partir de proteína de lenteja, que es de 1.55 N para un espesor de 150 μm ; (Bamdad, et al. 2005) se ve que la resistencia es mayor, esto se puede explicar por las interacciones que se dan entre las fracciones de

proteína de la semilla de limón y las de chía respectivamente. Es necesario señalar, que hay diferencia en las condiciones de prueba para las películas con las que se está comparando, por lo que esta comparación, nos sirve solo como parámetro. Las interacciones entre las fracciones proteínicas, se dan durante la primera parte del proceso de elaboración de la película, es decir en la parte donde la proteína se desdobla (por efecto de la desnaturalización) y en condiciones alcalinas, la proteína expone sus grupos funcionales para formar interacciones de puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, e interacciones hidrofóbicas, al estar compuesta esta proteína por tres fracciones de peso molecular elevado y dos de peso molecular más bajo, las fracciones de menor peso interactúan con las de mayor peso formando una red más resistente. Por otra parte, los valores de Esfuerzo verdadero presentan una diferencia entre las películas elaboradas con semilla de limón en comparación con las de chía, las de chía ofrecen una resistencia mayor al esfuerzo mecánico. En cuanto a la deformación de fractura y módulo de Young, las películas no presentan diferencia significativa entre sí; lo que indica que las películas elaboradas a partir del concentrado proteínico de Chía tienen una resistencia mayor al manejo mecánico, que las hace más resistentes que las películas de concentrado proteínico de semilla de limón.

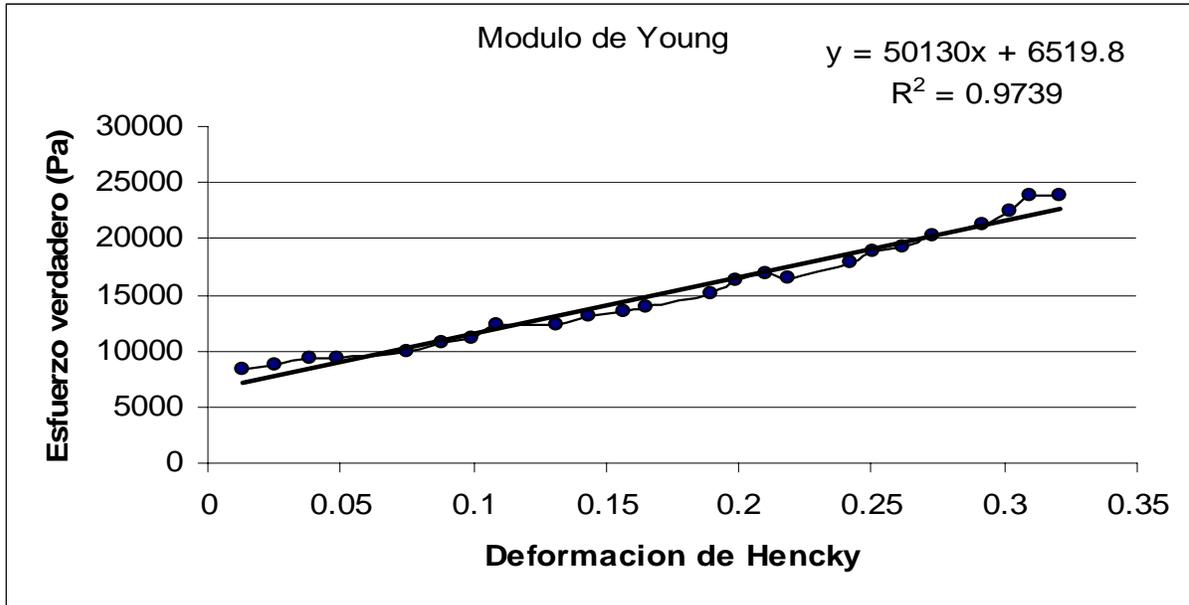


Figura 19. Módulo de Young de las películas elaboradas con CPSL/(glicerol/sorbitol)

En la Figura 19, se observa un ejemplo del módulo de Young correspondiente a la misma película. Esta es la parte inicial donde se observa una linealidad, es en esta parte donde se presenta el módulo de Young, que representa el esfuerzo al cual puede ser sometida la película sin que ésta pierda su forma.

Las películas elaboradas con concentrado proteínico de semilla de limón no presentan una diferencia significativa al variar los plastificantes. Haciendo una comparación con las películas elaboradas a partir del concentrado de Chía se encontró que no existe diferencia significativa. Mientras no se supere este módulo las películas pueden ser deformadas, pero al dejar de aplicar la fuerza que está deformándola, la película regresará a su forma inicial.

3.4.2 Fuerza de fractura a la extensión

De las pruebas que se realizan frecuentemente a las biopelículas elaboradas de proteína se encuentra la extensión. Esta prueba se refiere

a la extensión a la cual se somete el material sujeto por sus extremos y es estirado a una velocidad constante. En general las biopelículas elaboradas con proteínas presentan una menor elasticidad y una mayor rigidez, lo cual es contrario a lo encontrado en polímeros sintéticos.

En el Figura 20, se muestra un ejemplo del comportamiento de una película de proteína de semilla de limón ante una fuerza de tensión. Se puede ver que el esfuerzo que soporta la película está relacionado con la deformación provocada por la fuerza de tensión. Al inicio se puede observar un comportamiento lineal, cuando éste se pierde se ha rebasado el módulo de Young del material y por lo tanto aunque se deje de ejercer la fuerza ya no podrá regresar a su estado original. Finalmente se llega al punto en que el material se fractura, y es en este punto donde el material muestra el esfuerzo verdadero máximo que puede soportar. Es precisamente en este punto donde se determinan todos los demás parámetros a considerar, como son la fuerza de tensión y la extensión máxima que alcanzó el material justo antes de fracturarse.

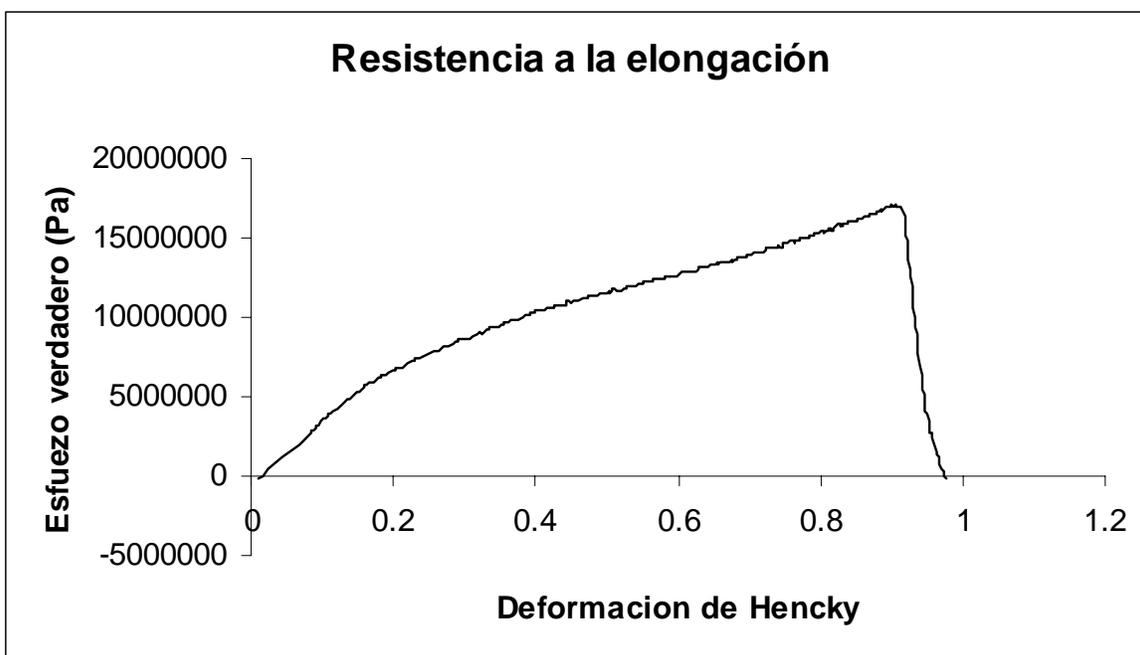


Figura 20. Comportamiento de las películas elaboradas con CPSL/ (glicerol/y sorbitol)

De las películas elaboradas a partir de CPSL/(glicerol y sorbitol) se determinó la fuerza de tensión y la elongación. En la tabla 8 se muestran los valores obtenidos, en promedio son de: 19.93 MPa para las elaboradas con glicerol y de 9.295MPa para las elaboradas con sorbitol. Existe diferencia significativa entre los dos tipos de películas. La diferencia que se encontró se puede explicar desde el punto de vista del plastificante empleado para la elaboración de cada una de estas diferentes películas. Estudios previos (Rodríguez, et al; 2006) han encontrado que a mayor concentración de plastificante disminuyen las interacciones entre el polímero formador de película, en este caso las proteínas, dando como resultado una película menos rígida y por lo tanto menos resistente. En el caso de las películas elaboradas con proteína de semilla de limón, en las que se utilizó sorbitol tienen un 75% de plastificante, lo que da como resultado una película con una menor resistencia mecánica ante la tensión.

Tabla 8. Determinación de las propiedades mecánicas de las películas elaboradas con CPSL: extensión

TIPO DE PELÍCULA		PROPIEDADES MECANICAS		
		EN EXTENSIÓN		
Concentrado de proteína 5%(W/V)	Plastificante	Esfuerzo verdadero (kPa)	Deformación de fractura	Módulo de Young (kPa)
semilla de limón	Glicerol 50% (w/w)•	19923.83 ± 54ac (27.22%)	0.9634 ± 0.17ac (18.32%)	41250 ± 12464^a (30.21)
	Sorbitol 75% (w/w)•	9295.46 ± 774a (8.32)	0.6110 ± 0.05b (8.37)	35334 ± 5773.50^a (16.49%)

chía	Glicerol 50% (w/w)■	17719.8 ± 5850bc (33%)	0.8 ± 0.3ac (41.4%)	34371.2 ± 14141.4^a (41.1%)
	Sorbitol 75% (w/w)■	13081 ± 789.6b (6%)	0.4 ± 0.04b (7.9%)	61421 ± 5855.2b (9.5%)

*Promedio ± desviación estándar y CV; cuando las letras son iguales no existe diferencia significativa entre ellas ($\alpha=0.05$)

● n = 4

■ Hernández Jardon, 2007

En la tabla 8, se reportan los resultados obtenidos para Módulo de Young de las películas elaboradas con proteína de semilla de limón.

En la Figura 21, se muestra un ejemplo del módulo de Young de la misma película, como ya se mencionó éste muestra el punto hasta el cual la película puede soportar un esfuerzo y luego regresar a su estado original.

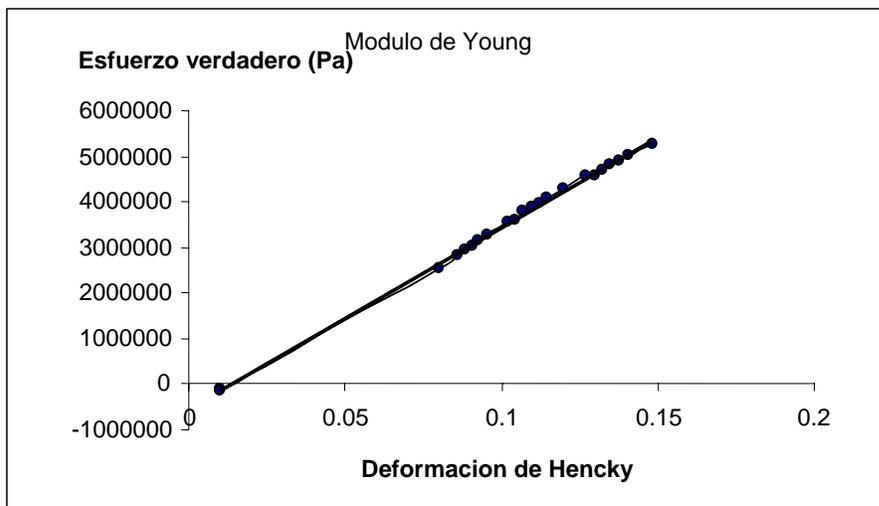


Figura 21. Comportamiento de las películas elaboradas con CPSL/ (glicerol/y sorbitol)

Los valores para el módulo de Young de las películas de proteína de semilla de limón están entre 35 y 40 MPa, y no existe una diferencia significativa, lo que indica que las interacciones proteína-proteína prevalecen en este comportamiento. Comparando estos valores con los obtenidos en las películas de proteína de Chía no se encontró diferencia significativa con respecto a las elaboradas con glicerol como plastificante, no así con las elaboradas con sorbitol.

En cuanto a la fuerza de tensión, en la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos para las películas elaboradas con proteína de semilla de limón, así como otras películas de origen proteínico. Se encontró un valor de 7.09 MPa de fuerza de tensión para las películas elaboradas con glicerol como plastificante y de 7.81 MPa para las elaboradas con sorbitol, estos valores son muy parecidos a los que presentan otras películas elaboradas a partir de proteínas. Por ejemplo: proteína de lenteja 4.24 MPa, proteína de soya 8.5 MPa, proteína de suero 6.9 MPa, proteína de chícharo 7.3 MPa. Se puede ver entonces que la fuerza de tensión que tiene la proteína de limón es bastante buena, teniendo además un porcentaje de elongación que se mostró en la Tabla 7 el cual es mucho mayor al de las proteínas ya mencionadas. En este caso el de semilla de limón es de 171% mientras que los valores para las películas de proteína de lenteja, soya, suero, y chícharo son: 58, 32, 41 y 46% respectivamente. La película que tiene una elongación cercana es la de Chía con un 131%, siendo claramente el de proteína de semilla de limón el que tiene un valor más alto. Cabe señalar, que las condiciones de prueba no son las mismas, y se realiza la comparación, solo como un parámetro general del comportamiento de las películas. Para ambos parámetros el coeficiente de variación es menor al 20% considerando las dificultades para la obtención de películas completamente homogéneas este es un buen coeficiente de variación (Bamdad, et al. 2005)

Tabla 9. Fuerza de tensión (TS) y elongación de las películas elaboradas con CPSL comparadas con otras películas de origen proteínico

Película	TS(MPa)	Elongación (%)
Concentrado de proteína de semilla de limón – glicerol ●	7.1 ± 1.4^a	171.7 ± 32.4^a
Concentrado de proteína de semilla de limón – sorbitol ○	7.8 ± 0.7^a	84.6 ± 9.5^b
Concentrado de proteína de chía – glicerol ▲	7.7 ± 1^a	131.5 ± 74.4^a

Concentrado de proteína de chíá – sorbitol▶	8.4 ± 0.4^a	56.3 ± 5.2^b
Concentrado de proteína de lenteja – glicerol■	4.2 ± 1.3	58.2 ± 12.9
Concentrado de proteína de chícharo – glicerol♦	7.3 ± 0.4	46.8 ± 5.8
Proteína muscular de pescado – glicerol▲	2.9 ± 0.4	74.3 ± 8.1
Aislado de proteína de soya – glicerol▼	3.3	100

● pH 11 5% CPSL/ 50% glicerol (w/w)

▲ pH 11 5% CPCh/ 50% glicerol (w/w)

■ pH 11 5% CPL / 50% glicerol (w/w); Bamdad et al. 2006
Han, 2001

♣ pH 11 2% PMP / 50% glicerol (w/w); Hamaguchi et al. 2007
&Paraf, 1997

○ pH 11 5% CPSL / 75% sorbitol (w/w)

▶ pH 11 5% CPCh / 75% sorbitol (w/w)

♦ pH 9 10% CPC / 45% glicerol (w/w); Choi &

▼ pH 11 APS: glicerol (1.7:1); Damodaran

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa $\alpha = 0.05$

La razón del elevado valor de elongación en comparación con las otras películas de proteína se puede explicar por las diferentes fracciones proteínicas. En un estudio realizado en proteína de soya, se encontró que cuando se elaboran películas a partir de fracciones proteínicas éstas pierden resistencia a la tensión, así como a la elongación. Mientras que las películas elaboradas a partir de todas las fracciones tienen una resistencia y una elongación mayor (Yong, & Rhee, 2004)

En el caso de la semilla de limón, se emplea la totalidad de las fracciones proteínicas, lo que puede propiciar que aún cuando algunas interacciones se debiliten o se fracturen por la fuerza ejercida, otras se mantengan y se conserve unida la red, por lo tanto la integridad de la película, dando como resultado una mayor elongación. Se puede asumir entonces, que es precisamente el hecho de que la película está formada en su mayoría por dos fracciones de bajo peso molecular, lo que le da estas propiedades de elongación, porque al ser en su mayoría proteínas pequeñas, el número de interacciones proteína-proteína aumentan y así también su resistencia a la fractura por elongación (Yong, & Rhee, 2004)

Este fenómeno se puede extrapolar a las películas elaboradas con proteína de semilla de chía que también tienen un alto porcentaje de elongación comparándolas con otras películas proteínicas, y se conoce que está compuesta por fracciones proteínicas de bajo peso molecular (Hernández Jardón 2007).

3.5 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (PVA)

Dentro de las características que debe presentar la proteína para tener una baja permeabilidad al vapor de agua están:

El tamaño del polímero, en este caso quedó establecido que las películas de proteína de semilla de limón están compuestas más bien por cadenas cortas como lo establece el bajo peso molecular, por lo que se vuelve relevante que se den una gran cantidad de interacciones proteína – proteína, esto aumentará el tamaño de las cadenas, y de esta forma disminuirá la permeabilidad. Otro parámetro a considerar es el balance de los aminoácidos presentes en las fracciones proteínicas de la semilla de limón. Una cantidad mayor de aminoácidos hidrofóbicos propiciará una repulsión mayor con el agua y por tanto una menor permeabilidad. Es importante, luego de lo anterior, conocer el perfil de aminoácidos que componen las fracciones proteínicas de la semilla de limón. Un contenido mayor de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica evitará la migración de agua (Yong & Rhee, 2004)

El método para determinar la permeabilidad al vapor de agua fue basado en la metodología ASTM E96-95 (2002). Consiste en conocer la ganancia de peso de una matriz cubierta con la película, esto bajo condiciones de humedad relativa controladas y temperatura conocida. Una de las propiedades de barrera de una película es: la permeabilidad al vapor de agua y ésta se ve afectada directamente por varios factores, dentro de los que se encuentran: la proteína, el plastificante, y la humedad relativa (Oliva, et al. 2007)

En la Tabla 10, se muestra la permeabilidad promedio de las películas elaboradas a partir de CPSL y se comparan con otras películas de origen proteínico, así como con la permeabilidad obtenida de dos polímeros sintéticos comerciales. Es claro que la permeabilidad que presenta la película de proteína es mayor en comparación a los plásticos sintéticos. Sin embargo, si tomamos en cuenta la permeabilidad reportada de otras películas elaboradas a base de proteína como por ejemplo: películas de

proteína de lenteja tienen una permeabilidad de 0.3095 ng/Pa*s*m, la zeína de maíz tiene una permeabilidad de 0.116 ng/Pa*s*m y la proteína de soya de 0.85 ng/Pa*s*m (Bamdad, et al. 2005) Se puede ver que la permeabilidad presentada por las películas elaboradas con CPSL, ya sea con glicerol o sorbitol, es menor. Cabe destacar que las películas de chía son las únicas de origen proteínico que tienen valores muy parecidos a los de las películas elaboradas con CPSL. Comparando la permeabilidad de esta película con otras similares se observa que tiene una permeabilidad menor, es decir ofrece una resistencia mayor a la migración de agua hacia la matriz que está cubriendo, esto puede tener muchas ventajas si se aplica como barrera protectora.

Tabla 10. Permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas con CPSL y de otras películas de origen proteínico

Tipo de película		PVA ng/Pa*s*m 10 ³	CV (%)	PVA relativa con respecto a LDPE
Concentrado de proteína de semilla de limón 5%(w/v)	Glicerol 50% (w/w)	2.12■a	13.18	11.6
	Sorbitol 75% (w/w)	0.54■a	18.803	3
Plásticos sintéticos	Ziploc (LDPE)	0.18▲a	2.61	1
	Egapack (PVC)	0.28▲a	5.67	1.5
Concentrado de proteína de chía 5%(w/v)	Glicerol 50% (w/w)	1.32●	16.92	7.3
	Sorbitol 75% (w/w)	1.00●	15.12	5.5
Concentrado de proteína de lenteja (CPL)		309.5◇	--	1719
Concentrado de proteína de chícharo (CPC)		1.14♣	--	6100
Para embutidos	Sintética	0.3▼	2.19	1.6
	Natural	0.63▼	38.87	3.5

■ Promedio de 3 replicas

● Hernández, 2007; pH 11 CPchía

♣ Choi and Hain, 2001; pH 9 7% CPC/3% glicerol

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa $\alpha=0.05$

▲ Promedio de 5 replicas

◇ Bamdad et al., 2006; pH 11 5%CPL/2.5glicerol

▼ Hernández, 2007

La variación del plastificante al elaborar las películas, provocan una diferencia significativa, en el valor de permeabilidad obtenido. Para las películas de CPSL/sorbitol fue de $0.00054 \text{ ng/Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}$, este valor es muy cercano a los valores que presentan los plásticos sintéticos, y por lo tanto mucho más bajo que el que presentan las películas elaboradas a partir de diferentes fuentes proteínicas.

Por lo anterior se puede decir que el sorbitol tiene la ventaja de disminuir la permeabilidad en las películas elaboradas con proteína de semilla de limón.

El por qué de esta variación se puede explicar de varias formas, aunque es conocido que al aumentar la concentración del plastificante se reducen las propiedades de barrera, es decir aumenta la permeabilidad, y en el caso del sorbitol se agrega en 75% en relación a la cantidad de proteína, debido a que se ha observado que con una menor cantidad de plastificante las películas resultan muy quebradizas.

A diferencia de las películas que son elaboradas con glicerol que tienen una concentración de plastificante del 50% con respecto al peso de la proteína, se esperaría que las películas con sorbitol al 75% tuvieran una permeabilidad mayor pero resultó lo contrario. Una de las posibles explicaciones para este efecto es el tamaño del plastificante, el glicerol es un polialcohol de tres carbonos mientras que el sorbitol es un polialcohol de seis carbonos, siendo el tamaño del sorbitol más grande, reduce el número de burbujas. Además por el tamaño puede que exista un impedimento estérico que le impida formar una mayor cantidad de puentes de hidrógeno con las proteínas, y de esta forma se reducen los espacios por los cuales el agua puede migrar. También se ha reportado que en general las películas elaboradas con sorbitol como plastificante

presentan una menor permeabilidad al vapor de agua que aquellas elaboradas con glicerol (Olivas, et al. 2007; Sobral, et al. 2001)

3.6 PERMEABILIDAD AL OXÍGENO

Las películas de origen proteínico tienen como ventaja el hecho de ser biodegradables, lo cual es un factor muy importante considerando que la cantidad de residuos generados hoy en día es muy alta y esto puede traer consecuencias riesgosas por el impacto que genera en el medio ambiente.

Para que las películas de origen proteínico puedan funcionar de manera eficiente como protectoras de alimentos, deben tener una buena permeabilidad al oxígeno, y de esta forma reemplazar las películas sintéticas (Hong & Krochta, 2006)

Es conocido que tanto las propiedades mecánicas como de barrera que pueda ofrecer una película dependen directamente de la naturaleza de la cual provenga. Generalmente los compuestos hidrofílicos presentes en una película le confieren una permeabilidad al oxígeno baja, pero por otra parte hacen que aumente la permeabilidad al vapor de agua (Sothornit & Pitak, 2006) Otro punto a considerar es la naturaleza del polímero del cual está hecha la película, en este caso está hecha de proteínas, las cuales pueden tener residuos hidrofílicos e hidrofóbicos. La permeabilidad que pueda ofrecer, va a depender entonces del balance de aminoácidos. Otro aspecto importante es la movilidad de la cadena, si ésta se incrementa aumentará la permeabilidad al oxígeno porque facilita el transporte de materia a través de la película, y la movilidad de la cadena tiene que ver directamente con la humedad. Así

como de las interacciones que se establecen entre las proteínas y de las proteínas con el plastificante.

En la Tabla 11, se muestran los resultados obtenidos para permeabilidad al oxígeno de las películas elaboradas con CPSL y CPCh ambas con glicerol y sorbitol como plastificantes, así como la permeabilidad al oxígeno de un plástico de origen sintético y otras películas de origen proteínico.

Tabla 11. Permeabilidad al oxígeno de diferentes películas de origen proteínico y sintético

Tipo de película		PO (cm ³ μm/ m ² d KPa)	CV %	PO relativa con respecto a metilcelulosa
Concentrado de proteína de semilla de limón 5%(w/v)	Glicerol 50% (w/w)	19.37■a	7.74	2.84
	Sorbitol 75% (w/w)	17.6■a	5.39	2.58
Concentrado de proteína de chía 5%(w/v)	Glicerol 50% (w/w)	17.79▲a	1.58	2.61
	Sorbitol 75% (w/w)	16.27▲a	5.77	2.39
LDPE (polietileno de baja densidad "Ziploc")		57.85●	5.68	8.5
Metilcelulosa		6.8◇	36	1
Concentrado de proteína de suero de leche		31.3♣	--	4.6

Cuando las letras son iguales no hay diferencia significativa ■ Promedio de 3 replicas

▲ Promedio de 3 replicas

● Promedio de 3 replicas

♣ Hong & Krochta; 2005

◇ Sothornit & Pitak; 2006

En la Tabla 11 se observa que las películas elaboradas con CPCh y CPSL no presentan una diferencia significativa en cuanto a la permeabilidad al oxígeno, y se puede considerar que los valores obtenidos son bajos, en comparación con los que presenta una película de origen sintético como el LDPE y que tienen una permeabilidad muy similar a la ofrecida

por otras películas de origen proteínico (cabe señalar que el valor presentado en la Tabla 11 para el plástico sintético, fue obtenido experimentalmente y presenta una amplia diferencia con valores encontrados en la literatura que son de hasta 1870 ($\text{cm}^3 \mu\text{m} / \text{m}^2 \text{ d kPa}$)). En estudios previos (Hong & Krochta; 2006), se ha demostrado que las películas elaboradas con proteína presentan una baja permeabilidad al oxígeno, lo que las hace una estupenda alternativa como cubiertas de alimentos.

3.7 EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE LAS BIOPELÍCULAS, EMPLEÁNDOLAS COMO EMPAQUE DE UN SISTEMA ALIMENTICIO

Finalmente se evaluó la funcionalidad de las películas elaboradas de CPSL y de concentrado de proteína de chíá (CPCh) empleándola como recubrimiento de una matriz alimentaria susceptible al deterioro oxidativo. Para este fin se seleccionó el jamón serrano, por la cantidad de grasa que tiene, así como su bajo contenido de agua y evitar que el desarrollo microbiano interfiriera en las determinaciones de deterioro por oxidación de las grasas.

3.7.1 Primer ensayo

Para el primer ensayo se evaluó la capacidad como barrera protectora de cuatro diferentes películas: dos se elaboraron con concentrado de proteína de semilla de limón, variando el plastificante, (glicerol y sorbitol), una más se elaboró con otra proteína, la de semilla de chíá, usando glicerol como plastificante, y finalmente una película de origen sintético.

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el ensayo fueron las siguientes: temperatura ambiente y un lapso de 24 días. En la Tabla 12 se observan los resultados del deterioro oxidativo.

Tabla 12. Velocidad de formación de peróxidos (1er ensayo) de las muestras protegidas con películas proteínicas

Tipo de Empaque		meq de peróxido/kg de grasa		
		Tiempo de almacenamiento		
Fuente de proteína	Plastificante	0 días	10 días	24 días
CPSL	Glicerol	0	1.25 (17.3%)	12.43 (14.63%) a
CPSL	Sorbitol	0	0	6.46 (14.31%) b
CPCh	Glicerol	0	0	9.86 (21.4%) a
Plástico sintético		0	4.26 (7.17%)	18.26 (12.54%) c

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa $\alpha= 0.05$, (CV)

Para el tiempo cero no hay una presencia de peróxidos en ninguno de las muestras. A los 10 días se observan diferencias entre la velocidad de formación de peróxidos en las muestras, mostrando un mayor avance en el deterioro la muestra protegida con plástico sintético (4.26 meq de peróxidos/Kg de grasa), seguida por la muestra protegida con la película elaborada con CPSL/glicerol (1.25 meq de peróxidos/Kg de grasa). Las muestras restantes, protegidas con películas elaboradas con CPSL/sorbitol y CPCh/glicerol, no evidencian aún la presencia de peróxidos.

En el tercer monitoreo, el cual se llevó a cabo luego de 24 días, las cuatro muestras presentaron peróxidos, siendo la muestra protegida con el plástico sintético la más deteriorada al presentar 18 meq de peróxidos/kg de muestra. Las dos muestras que mostraron le siguen en formación de peróxidos fueron las protegidas con películas elaboradas

con CPSL/glicerol y CPCh/glicerol, con 12.4 y 9.8 meq de peróxidos/Kg de grasa, respectivamente. Cabe señalar que entre estas dos muestras no se encontró diferencia significativa. Finalmente, la muestra que mostró una menor formación de peróxidos para este tiempo fue la muestra protegida con una película elaborada con CPSL/glicerol, con solamente 6.4 meq de peróxidos/kg de grasa.

Se determinó la presencia de compuestos carbonílicos mediante el índice de Kreis (Tabla 13). En el monitoreo del tiempo cero, se observó un valor muy bajo, el segundo monitoreo se realizó luego de diez días, en este segundo monitoreo, se aprecia un aumento en el contenido de compuestos carbonílicos, destacando el de la muestra protegida con plástico sintético que es un valor muy alto en comparación con los presentados para las otras tres muestras. Para el último monitoreo, a los 24 días, la tendencia es muy similar, siendo el jamón protegido por la cubierta sintética el que presenta un mayor contenido de compuestos carbonílicos, seguido de las muestras protegidas con películas de CPSL, de las cuales, la elaborada con glicerol, es la que presenta una concentración mayor de compuestos carbonílicos.

Tabla 13. Determinación del Índice de Kreis (1er ensayo) de la muestra protegida con las películas proteínicas

Tipo de Empaque		Índice de Kreis		
Fuente de proteína	Plastificante	Tiempo de almacenamiento		
		0 días	10 días	24 días
CPSL	Glicerol	0.35 (4.1%)	1.36 (6.5%)	4.74 (10.38%)
CPSL	Sorbitol	0.35 (4.1%)	1.35 (12.1%)	1.57 (10.8%)
CPCh	Glicerol	0.35 (4.1%)	ND	ND
Plástico sintético		0.35 (4.1%)	6.04 (0.7%)	10.97 (3.22%)

(CV), ND: no determinada

Los resultados anteriores se pueden explicar primero desde la perspectiva de que la luz es un factor importante ya que cataliza la formación de radicales durante la oxidación y tomando en cuenta que las películas de origen proteínico tienen color (en el caso de las de semilla de limón, el color es ámbar y para la Chía el color es negro), esto podría explicar de manera parcial el por qué las muestras protegidas con estas películas ven retardado el deterioro oxidativo. Por otra parte, la película de origen sintético tiene la desventaja de ser transparente y permitir en su totalidad el paso de la luz, lo que favorece la oxidación y es por eso que en el jamón protegido con esta película encontramos el mayor índice de deterioro.

Los resultados de las pruebas de índice de Kreis son acordes con los de peróxidos, ya que corresponde a un valor elevado de peróxidos un valor elevado de compuestos carbonílicos. Analizando los resultados obtenidos en las otras películas se observa una diferencia entre las películas de CPSL, la que se elaboró con sorbitol, presentó un menor deterioro que la que se elaboró con glicerol. Lo que puede establecer que el plastificante es otro factor importante para determinar la permeabilidad que la película presenta ante el oxígeno como en el caso de la permeabilidad al vapor de agua. Por otra parte las dos películas elaboradas con el mismo plastificante pero diferente proteína (CPSL/glicerol, Chía/glicerol) también presentaron valores diferentes, por lo que se puede establecer que efectivamente el color fue determinante en el grado de deterioro sufrido por la matriz protegida.

En las Figuras 22 y 23 se observa el deterioro del jamón protegido con respecto al tiempo, donde es claro el comportamiento exponencial que presenta el deterioro oxidativo en la grasa presente en el jamón serrano, del tiempo cero al tiempo uno, la cantidad de peróxidos formados así como de compuestos carbonílicos es baja, debido a que se encuentran dentro de la etapa de iniciación, ya para el segundo

monitoreo los niveles de peróxidos y de compuestos carbonílicos son altos, porque el deterioro oxidativo se encuentra en su etapa de propagación.

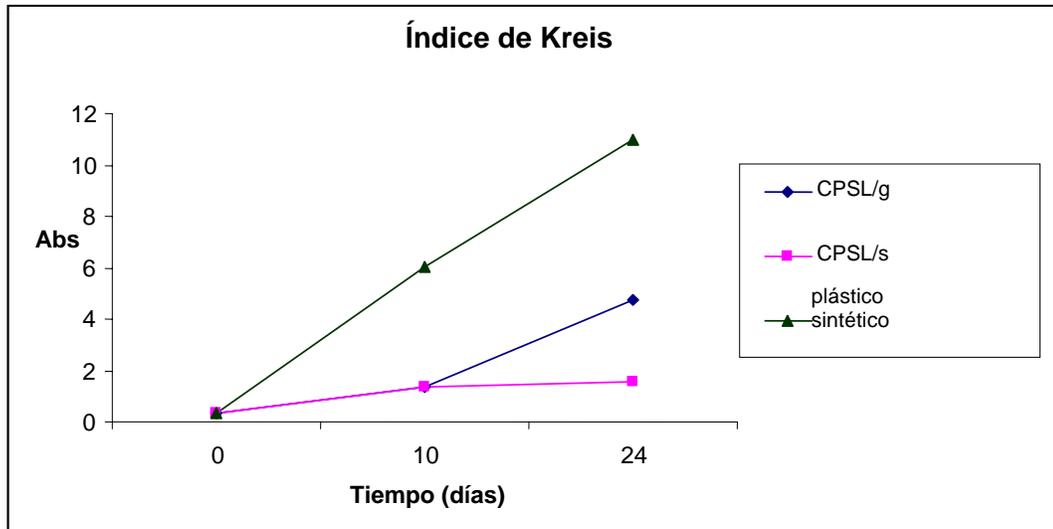


Figura 22. Índice de Kreis (1er ensayo) de muestras protegidas con películas proteínicas

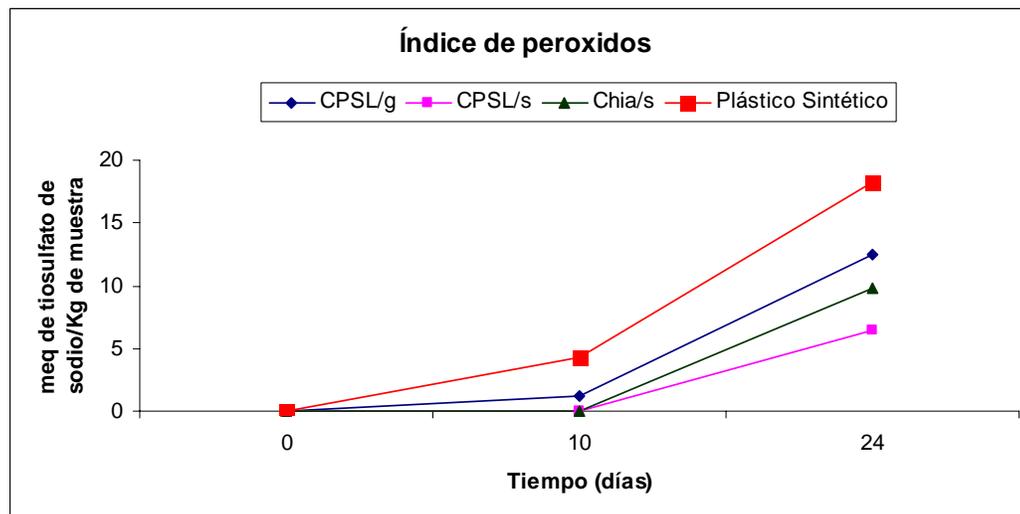


Figura 23. Índice de peróxidos (1er ensayo) de muestras protegidas con películas proteínicas

3.7.2 Segundo ensayo

Posteriormente se realizó un segundo ensayo que involucró el uso de películas de origen proteínico para proteger un alimento susceptible al deterioro. Con base en los resultados obtenidos luego del primer ensayo realizado, se conoce que las películas elaboradas a partir de proteína de chíá presentan buenas características para ser consideradas dentro de

estas pruebas. De las películas elaboradas con CPSL, la elaborada con sorbitol como plastificante resultó ser la más eficiente, por lo que dentro de esta prueba se incorporó una película elaborada con CPCh usando sorbitol. También se incorporaron dos controles más, un plástico de origen sintético más grueso que el Egapack hasta entonces utilizado, para conocer qué tipo de variación podía existir dependiendo del grosor de la película. Finalmente se incluyó también una muestra sin protección. En este segundo ensayo se mantiene la tendencia que indica que los recubrimientos con plásticos de origen sintético ofrecen una protección inferior al deterioro oxidativo en comparación con la que ofrecen las películas de origen proteínico. Además se observa que las películas elaboradas con sorbitol como plastificante retardan más la oxidación que las elaboradas con glicerol (Tabla 14).

Tabla 14. Velocidad de formación de peróxidos (2° ensayo) de las muestras protegidas con diferentes películas

Tipo de Recubrimiento		meq de peróxido/kg de grasa		
Fuente de proteína	Plastificante	Tiempo de almacenamiento		
		0 días	10 días	24 días
CPSL	Glicerol	0	1.06 (19%)a	19.47 (24.22%)b
CPSL	Sorbitol	0	0	6.87 (14.26%)c
CPCh	Glicerol	0	0	10.06 (11.3%)
CPCh	Sorbitol	0	0	4.75 (11.77%)c
Plástico sintético PVC (Egapack)		0	7.89 (14.8%)b	29.43 (6.37%)a
LDPE (Ziploc)		0	6.93 (12.83%)b	27.2 (6.86%)a
Sin recubrimiento		0	4.4 (12.5%)b	21.94 (16.4%)b

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa $\alpha = 0.05$ (CV)

Como se puede ver en la Tabla 14, las muestras protegidas por películas de origen sintético fueron las más deterioradas. Resulta extraño que en segundo lugar de deterioro se encuentre la muestra sin protección, se esperaba que ésta fuera la muestra con un mayor grado de deterioro

pero no lo fue, incluso difiere de manera significativa con respecto a las protegidas con plástico comercial. Es posible que esto sucediera por una variación en la materia prima utilizada, es decir, el jamón utilizado en esta prueba haya sido fresco en comparación con el utilizado en los demás recubrimientos (aunque se compraron el mismo día y de la misma marca).

En la Figura 23 se encuentra el comportamiento del índice de peróxidos con respecto al tiempo del segundo ensayo.

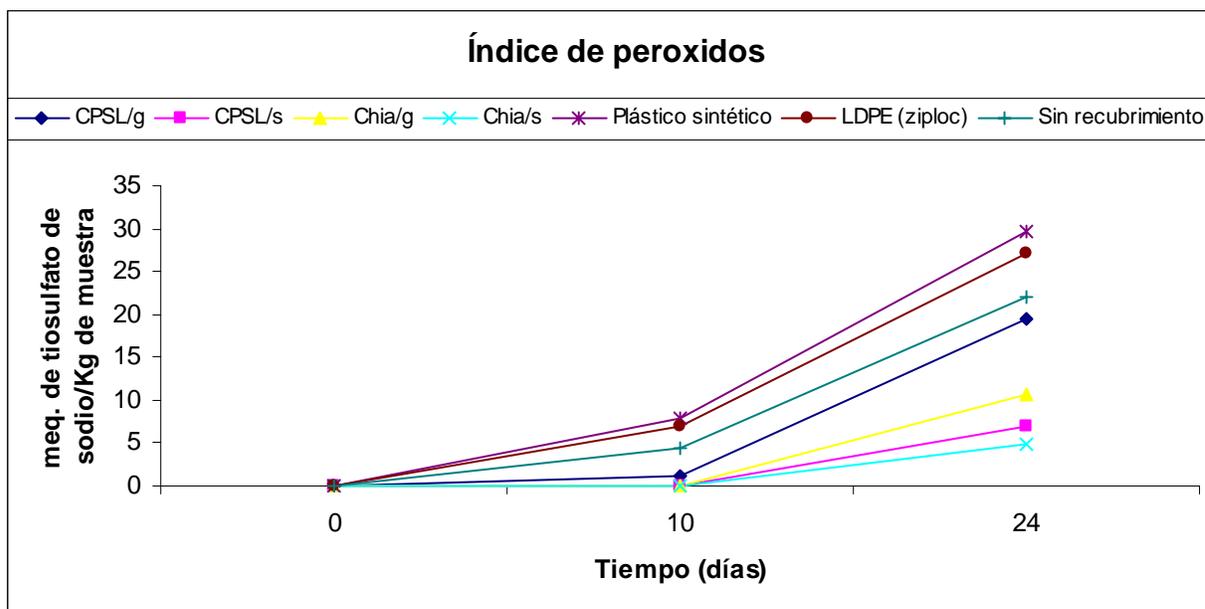


Figura 23. Determinación del índice de peróxidos (2° ensayo) de las muestras protegidas con películas proteínicas

3.7.3 Tercer ensayo

Finalmente se realizó un ensayo usando los recubrimientos de origen proteínico que mejores resultados habían arrojado en los dos ensayos anteriores que fueron el CPSL/s, CPCh/s y se compararon con una cubierta de celulosa que esta diseñada para empacar productos cárnicos, por lo que se supone que debe ofrecer una barrera adecuada para evitar el deterioro lipídico. Para este ensayo se mantuvo la misma cantidad de muestra, así como el tiempo de ensayo. Adicionalmente a las pruebas de índice de peróxidos y de índice de Kreis, se incluyó un monitoreo de la presencia de radicales libres empleando la técnica de Resonancia Paramagnética Electrónica. Para llevar a cabo la resonancia se usó un reactivo comúnmente llamado atrapador de spin electrónico, debido a la inestabilidad de los radicales formados. Los atrapadores son una clase de compuestos que reaccionan con los radicales en transición y los estabilizan, generalmente son del tipo nitrona, y forman nitróxidos cuando atrapan los radicales. Esta técnica se ha utilizado recientemente (Papadimitriu, et al. 2006) para el monitoreo del deterioro lipídico, y es mucho más sensible y rápida para determinar el deterioro en los lípidos que otras como el índice de peróxidos y el índice de Kreis. La desventaja que tiene es que es necesario contar con un equipo altamente especializado, así como de reactivos poco comunes. En la Tabla 15, se muestran los valores obtenidos para el índice de peróxidos en los tres tipos de recubrimientos. Se observa que para el tiempo cero, no hay presencia de peróxidos, y esta se empieza a manifestar a partir de los 10 días.

Tabla 15. Velocidad de formación de peróxidos (3er ensayo) de las muestras protegidas con diferentes películas

Tipo de Recubrimiento		meq de peróxido/kg de grasa		
Fuente de proteína	Plastificante	Tiempo de almacenamiento		
		0 días	10 días	24 días
CPSL	Sorbitol	0	10.72 (17.88%) a	13.23 (1.9%) a
CPCh	Sorbitol	0	6.44 (1.31%) b	10.02 (5.49%) b
Cubierta de celulosa		0	4.88 (17.19%) b	7.24 (13.9%) c

(CV) Letras iguales indican que no existe diferencia significativa $\alpha=0.05$

Como se muestra en la Tabla 15, al finalizar el estudio, la muestra protegida con la película elaborada con CPSL/s es la más deteriorada, seguida de la muestra protegida con película de CPCh/s. Es entonces la muestra cubierta con celulosa la que ofrece una mayor protección.

Con respecto al índice de Kreis (Tabla 16), se tiene una tendencia similar mostrando valores bajos en el tiempo cero y aumentando en el tiempo uno. En el tiempo dos los valores aumentaron manteniendo la tendencia, lo que indica que las películas de origen proteínico ofrecen la misma protección, no siendo así para el recubrimiento de celulosa, el cual ofrece una protección mayor.

En cuanto a la formación de compuestos carbonilo, a los veinte días este también se ve aumentado, lo que indica que el deterioro se encuentra en su etapa de propagación.

Tabla 16. Determinación del Índice de Kreis de la muestra protegida con las películas proteínicas

Tipo de Recubrimiento		Índice de Kreis		
Fuente de proteína	Plastificante	Tiempo de almacenamiento		
		0 días	10 días	24 días
CPSL	Sorbitol	0.487 (6.8%)	2.5 (1%)	4.74 (1.25%)
CPCh	Sorbitol	0.487 (6.8%)	4.03 (22.6%)	5.82 (44%)
Cubierta de celulosa		0.487 (6.8%)	2.8 (11.75%)	6.14 (3%)

En este ensayo, y con el fin de conocer la influencia del color de las películas de origen proteínico ante el deterioro, se expuso un lote a la luz UV. Para lograrlo se usó una lámpara de rayos UV en una cámara oscura.

En la Tabla 17, se muestran los resultados obtenidos para este lote, se puede decir que el deterioro no se ve aumentado por la exposición de la muestra a la luz UV. El comportamiento que esta prueba presentó es muy similar al de la prueba regular.

Tabla 17. Determinación de peróxidos de la muestra protegida con las películas proteínicas (UV)

Tipo de Recubrimiento		meq de peróxido/kg de grasa		
		Tiempo de almacenamiento		
Fuente de proteína	Plastificante	0 días	10 días	24 días
CPSL	Sorbitol	0	5.95 (7.89%)	16.5 (2.5%)^a
CPCh/s	Sorbitol	0	4.32 (4.81%)	14.82 (4.23%)^a
Cubierta de celulosa		0	3.26 (11.58%)	9.023 (14.5%)

El comportamiento del avance con respecto al tiempo de los índices de peróxido y Kreis se pueden ver en las Figuras 24 y 25.

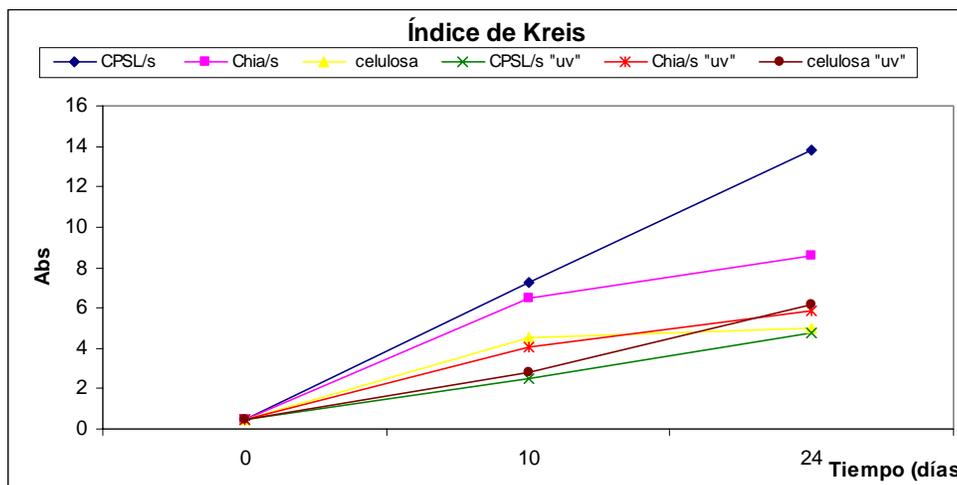


Figura 24. Determinación del índice de Kreis de las muestras protegidas con películas de proteína

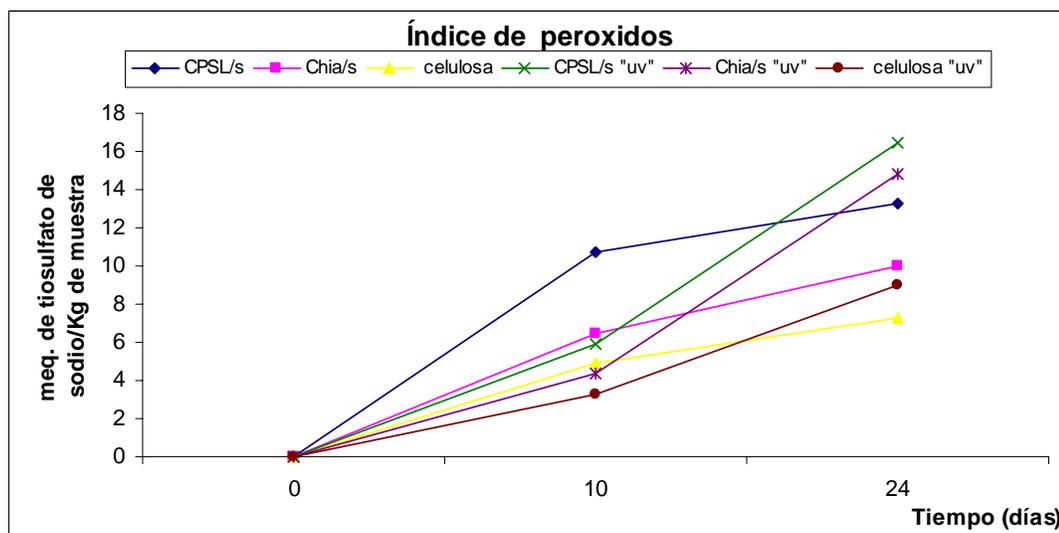


Figura 25. Determinación del índice de peróxidos de las muestras protegidas con películas de proteína

3.7.3.1 Determinación de radicales libres usando Resonancia Paramagnética Electrónica

Los resultados que arroja la determinación de radicales libres son gráficas en las cuales se manifiesta la presencia de éstos. Los radicales orgánicos se presentan siempre en una intensidad de campo constante, que es de entre 3440 y 3500 G y la cantidad de radicales encontrados va a dar como resultado una variación en la intensidad, aunque para considerar un ensayo como cuantitativo debe existir una referencia, es decir una curva patrón. En este ensayo las determinaciones de radicales libres son solamente cualitativas, pero aunado a los índices de Kreis y de peróxidos, da una idea muy cercana de la etapa en la cual se encuentra el deterioro lipídico de las muestras evaluadas.

En la Figura 26, se muestra la presencia de radicales libres en la muestra protegida con películas elaboradas con CPSL/s. Para el tiempo cero, la lectura es sobre la línea base, a los 10 días, aumenta la cantidad de radicales y luego de 24 días disminuye, esto se puede explicar de acuerdo a la cinética de oxidación de los lípidos, ya que en la etapa de iniciación, se generan una gran cantidad de radicales, y en la siguiente etapa, la de propagación, se forman diversos compuestos, los cuales son más estables y la cantidad de radicales libres generados se ve disminuida.

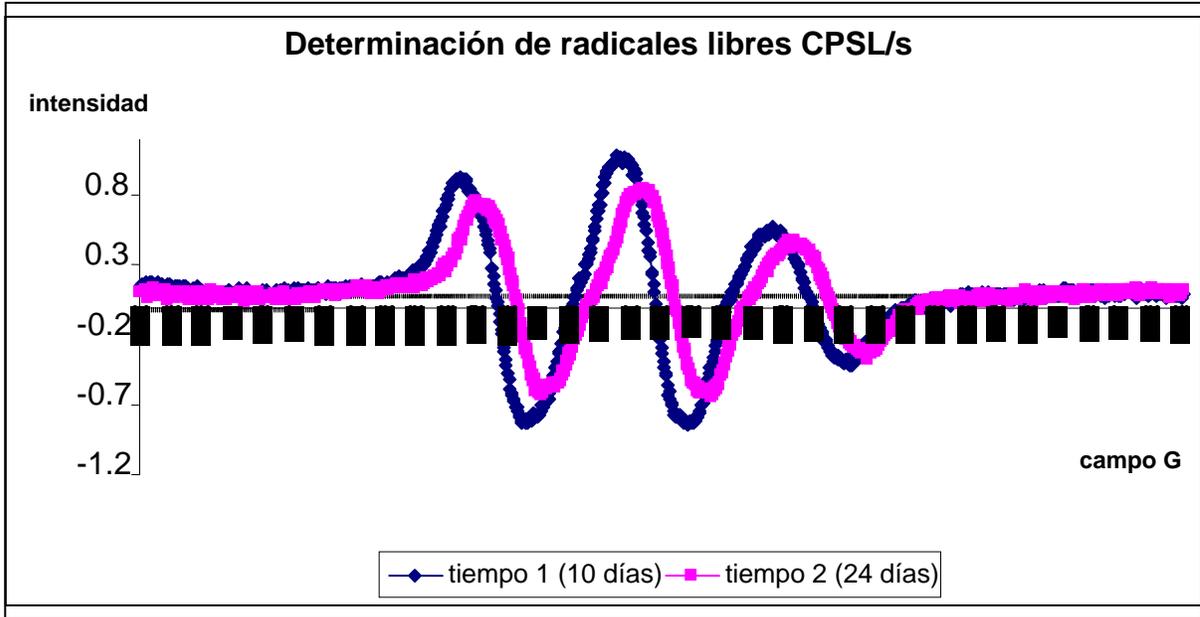


Figura 26. Determinación de radicales libres en la muestra protegida con película elaborada con CPSL/s

En la Figura 27, se muestra el comportamiento de la muestra protegida con una película elaborada con CPSL/s, pero sometida a la luz UV. Al igual que en la determinación de peróxidos y de índice de Kreis, el tiempo en el que se da el deterioro es menor, y eso se corrobora en la gráfica, ya que la cantidad de peróxidos aumenta de los 10 a los 24 días, lo que indica que las películas de origen proteínico impiden el paso de la luz UV, ya que ésta es un factor importante que acelera las reacciones de oxidación.

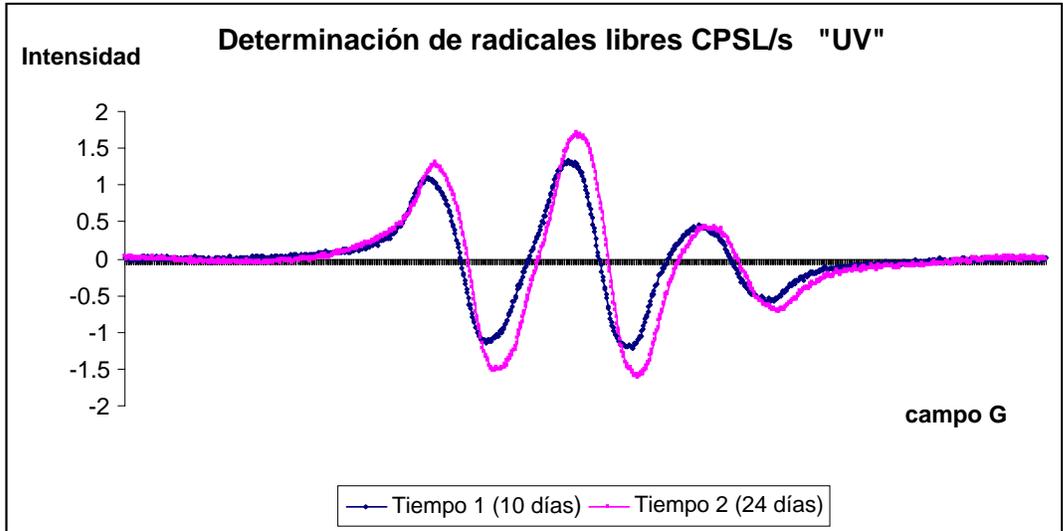


Figura 27. Determinación de radicales libres en la muestra protegida con película elaborada con CPSL/s y expuesta a la luz UV.

En la Figura 28, se muestra el comportamiento de la muestra protegida con película de chía, al igual que las muestras protegidas con películas de CPSL/s el comportamiento indica que este tipo de películas ofrecen una protección contra la luz UV.

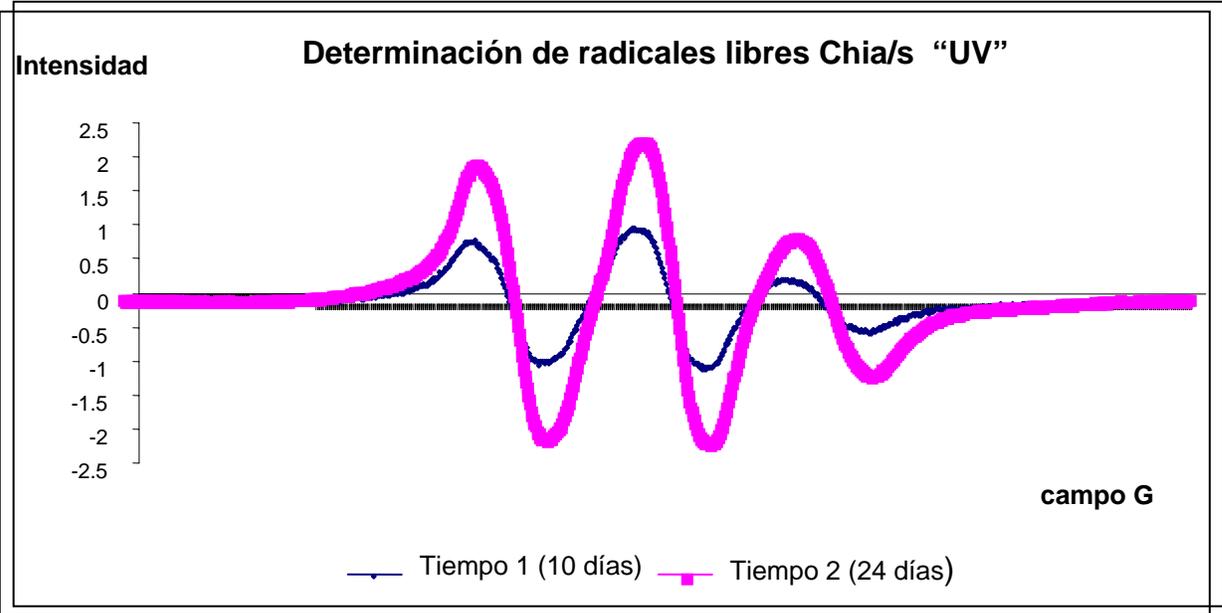


Figura 28. Determinación de radicales libres en la muestra protegida con película elaborada con CPCh/s

En el caso de las películas protegidas por una cubierta celulósica, estas fueron las muestras que presentaron un menor deterioro, tanto en los

índices de Kreis y peróxidos como en la intensidad de señal en la determinación de radicales libres (Figuras 29 y 30). A pesar de que éstas no tienen color, el hecho de estar sometidas a la luz UV no aceleró el deterioro. Lo cual se puede explicar por su baja permeabilidad al oxígeno que ha sido reportada en estudios previos y es menor en comparación a la que ofrecen las películas de origen proteínico. (Sothornit & Pitak, 2006)

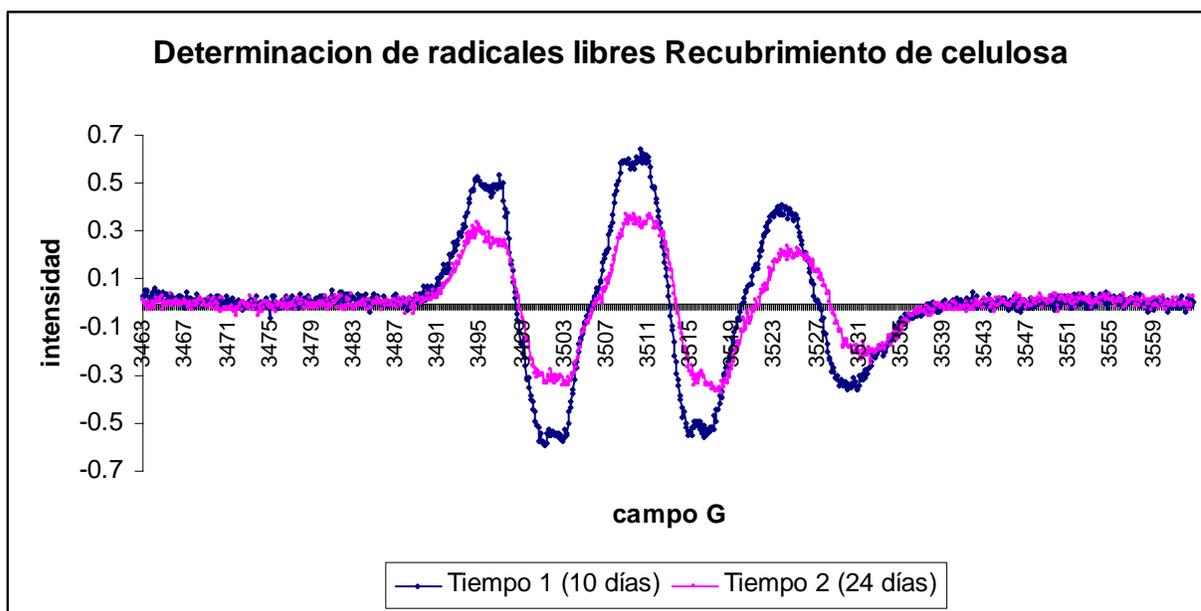


Figura 29. Determinación de radicales libres en la muestra protegida con película elaborada con celulosa

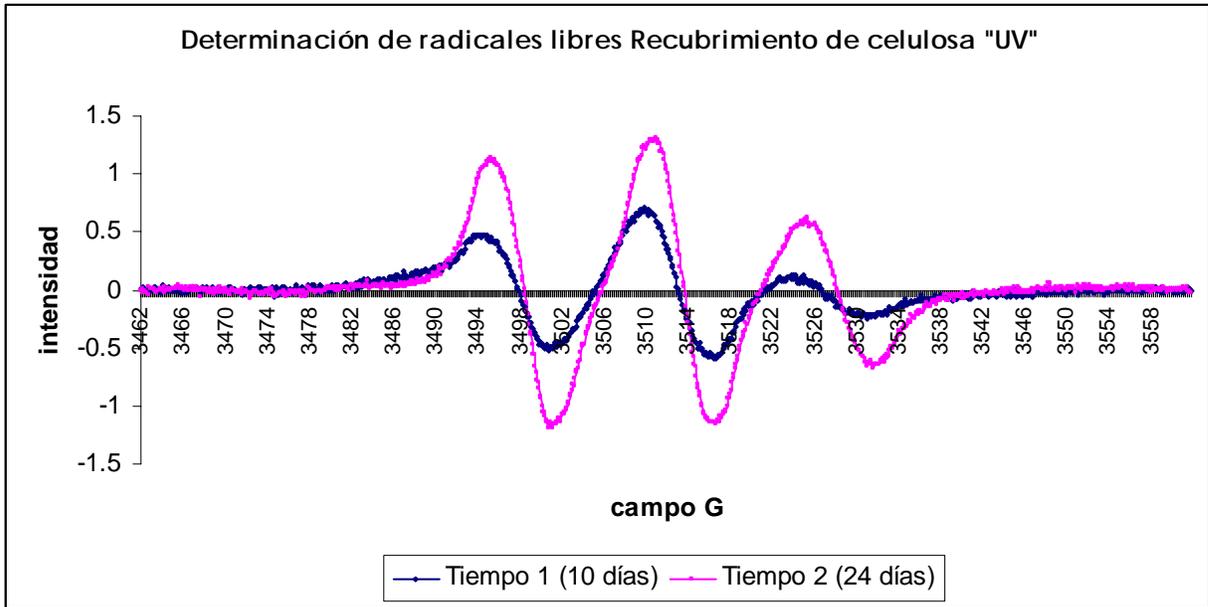


Figura 30. Determinación de radicales libres en la muestra protegida con película elaborada con celulosa y expuesta a la luz UV

De manera global y considerando los ensayos de protección, de barrera y propiedades mecánicas, es posible decir que las películas elaboradas con CPSL, y CPCh son películas adecuadas para la protección de alimentos. Se deben considerar también los beneficios que tiene el usar materiales biodegradables.

CONCLUSIONES

- La semilla de limón, tiene un alto porcentaje de proteína (25%), por lo que es posible obtener un concentrado proteínico con un total de 86.8% de proteína, la cual esta conformada por 5 fracciones proteínicas de bajo peso molecular que tienen la funcionalidad de formar películas para proteger alimentos.
- Las películas elaboradas con proteína de semilla de limón y proteína de chíá, tienen una estructura formada por capas, la cual se observó en la microscopía electrónica de barrido.
- Las propiedades de resistencia a la punción, de fuerza de tensión, y elongación, que presenta la película elaborada a partir de concentrado proteínico de semilla de limón, son superiores a las reportadas para otras películas de origen proteínico.
- La película formada a partir de concentrado proteínico de semilla de limón presenta una baja permeabilidad al vapor de agua en comparación con otras películas de origen proteínico.
- La permeabilidad al oxígeno que presentaron las películas elaboradas con concentrado proteínico de semilla de limón y concentrado proteínico de semilla de chia, es baja y se equipara a la permeabilidad al oxígeno presentada por otras películas de origen proteínico.

- En las propiedades de barrera que presentan las películas elaboradas con concentrado proteínico de semilla de limón, y concentrado proteínico de semilla de chia, las elaboradas con sorbitol como plastificante, resultaron superiores.
- La funcionalidad como barrera que presentaron las películas elaboradas a partir de concentrado proteínico de semilla de limón y concentrado proteínico de semilla de chía resultó ser superior a la de un plástico sintético, en cuanto al retardo del deterioro oxidativo, lo cual fue corroborado usando resonancia paramagnética electrónica, que resultó ser una técnica eficiente para determinar la presencia de radicales libres de una matriz en proceso de deterioro.
- De entre las películas de origen proteínico, las elaboradas con proteína de chía mostraron una mayor eficiencia retardando el deterioro oxidativo, al emplearlas como protectoras de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso; P. (2002) "La resonancia paramagnética electrónica. Una técnica multidisciplinar." Academia de ciencias exactas, físicas, químicas y naturales de Zaragoza.
- AOAC (1995). Method official 981.10. Crude protein in meat. Block digestion method. Official methods of analysis of AOAC international, 16° edition. Cunnif, P.
- ASTM E 96-95 (2002) Standard test method for water vapor transmission of materials en 1995 Annual Book of ASTM Standards, ASTM International (EUA). Vol. 04.06, 868-876.
- ASTM E 882 (2002) Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting en 1997 Annual Book of ASTM Standards, ASTM International (EUA). Vol. 14.02, 161-170.
- ASTM D 1434 (1998) Standar test method for Determining Gas Permeability Characteristics of plastic film and Sheeting en (2003) Annual Book of ASTM Standards, ASTM International (EUA). Vol 15.10, 196-207.
- Ahvenaninen R. "Novel Food Packaging Techniques" edit, Cambridge England Woodehead. 2003. pag. 1-18, 519-530.
- Ayranci, E., Tunc, S. (2002). "A method for the measurement of the oxygen permeability and the development of edible films to reduce the rate of oxidative reactions in fresh food". Food chemistry, 80, 423-431.
- Balarezo, M. P. (1998). "Deterioro químico de lípidos en carne de cerdo y pollo en congelación". Tesis de maestría Universidad Nacional Autónoma de México. pág. 6-8, 39-44.
- Bamdad, F., Hossein, A., & Kadivar, M. (2005). "Preparation and characterization of proteinous film from lentil (lens culinaris)

Edible film from lentil (*lens culinaris*)" Food Research International, 30, 1-6 .

- Beltrán, O., Romero. (2002). "La chia, alimento milenario" Departamento de graduados e investigación en alimentos, E.N.C.B.I.P.N. pág. 1-26.
- Bertuzzi, M.A., Armada, M., Gottifredi, J.C., Aparicio, A.R., & Jiménez, P. (2002). "Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos" Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA 2002, Secretaria de Ciencia y Tecnología , Universidad Nacional de Catamarca. pág. 1-10.
- Bligh, E. G., y Dyer, w. j. (1959). "A rapad method of total lipid extraction and purification" Can . J Biochem and Physiology 17: 3911-917.
- Edible Films and Coating ucce.ucdavis.edu/files/datastore/234-675.pdf Consultado, 20 de febrero de 2007
- Choi, W.S., Han, J.H. (2001). "Physical and mechanical properties of pea-protein-based edible films". Journal of Food Science, 66 (2), 319-322.
- Damodaran, S; Paraf, A.D. (1997). "Food proteins. An overview. Food proteins and their aplications". Marcel Dekker Inc, USA p 1-15, 529-545.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A y Smith, F. (1956)" Colorimetric method for determination of sugars and related substances". Analytical Chemistry, 28: 3, 350-356.
- Fang, Y., Tung, M.A., Britt, I.J., Yada, S., & Dalgleish, D.G. (2002). "Tensile and barrier propieties of edible films made from whey proteins" Journal of Food Science: Food Engineering and Physical Properties, 67 (1), 188-193.
- Fennema, O.R.(1993) Quimica de los alimentos, Madrid: Segunda edición Acribia SA, pag. 440-468.

- Gavilanes Ruiz M. (1989) "Curso de electroforesis y electrotransferencia", Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina UNAM
- Gounga, M., Ying, S., Wang, Z. (2007). "Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation". *Journal of Food Engineering*, 83, 521-530.
- Hamaguchi, P.Y., Yin, W.W., Tanaka, M. (2007). "Effect of pH on the formation of edible films made from the muscle proteins of blue marlin" (*Makaira mazara*). *Food Chemistry*, 100(3), 914-920.
- Hernández, Jardón G. (2007) "Proteína de chia (*Salvia hispanica*): Estudio para valorar sus propiedades como formadoras de películas". Tesis de licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hong, S. & Krochta, J.M. (2005). "Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film, and proteine type". *Food Research Inetrnational*, 77, 739-745.
- James C. S. (1999). *Analytical Chemistry of Foods*. Primera edición. ASPEN Publication. New York pág. 47 – 48.
- Kaji, G.S. 2005 "Estudio de ultrasonido y métodos convencionales sobre la extracción de limonin a partir de semillas de limón mexicano". Tesis de licenciatura Universidad Nacional Autónoma de México. pág. 3-8.
- Klirk R.S., Sawyer, R y Egan H. (1996). "Composición y Análisis de Alimentos de Pearson". Segunda edición. Editorial CECSA. México 1996. pag 28 – 29.
- Mañas, E; Bravo, L; Saura-Calixto, F. (1994) "Sources of error in dietary fibre analysis" *Food Chemistry*, 50, 4690-4699.

- Nielsen, S. (1998) "Food Analysis" Segunda edición. ASPEN Publishers Gaithersburg. Maryland pag. 242.
- Olivas, G., Gustavo, V., Barbosa-Canovas. (2007). "Alginate-calcium films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity" LWT-Food Science and Technology, 41,359-366.
- Papadimitrou, V., Sotiroudis, T.G., Xenaquis, A., Sofikiti, N; Stavyannoudaki, V., Chaniotakis, N.A. (2006). "Oxidative stability and radical scavenging activity of extra virgen oil: An electron paramagnetic resonance spectroscopy study". Analytica Chimica Acta, 573, 453-458.
- Rodriguez, M., Oses, J., Ziani, K., Maté, J.I. (2006). "Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films". Food Research Internacional, 39, 840-846b.
- SAGARPA (2006) <http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/> Consultado, 23 de enero de 2007
- Schägger, H., Van Jagow, G. (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100kDa". Analytical Biochemistry, 166, 368-379.
- Sobral, P., Menegalli, F., Hubinger, M., & Roques, M. (2001). "Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films" Food Hydrocolloids, 15, 423-432.
- Sothornvit, R., Pitak, N. (2007). "Oxygen permeability and mechanical properties of banana films" Food Research international, 40, 365-370.
- Yong, C., Rhee, C. (2004). "Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractioned soy proteins

with ultrafiltration" *LWT-Food Science and Technology*, 37, 833-839.

- Yuca, H.P., Weng, W.Y., & Munehiko, T. (2007) " Effect of pH on the formation of edible films made from the muscle proteins of blue marlin (*Makaira mazara*)" *Food Chemistry*, 100, 914-920.