



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

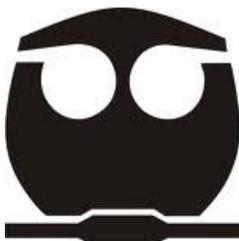
APROVECHAMIENTO DE PROTEÍNAS DE PESQUERÍA
DEL GÉNERO *EPINEPHELUS* PARA LA OBTENCIÓN DE
PELÍCULAS MODIFICADAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTAN

**SANDRA GRANADOS NAVARRETE
CECILIA MARTÍNEZ GARCÍA**



MÉXICO, D.F.

2010



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: Prof. Ma. De Los Ángeles Valdivia López
VOCAL: Prof. Ma. De Los Ángeles Martínez Olmedo
SECRETARIO: Prof. Jorge Alejandro Flores Maldonado
1er SUPLENTE: Prof. Hiram Ramírez Cahero
2do SUPLENTE: Prof. Lorena De Anda Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 322-323, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

Ma. De Los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTES

Sandra Granados Navarrete

Cecilia Martínez García

A la profesora Ma. De Los Ángeles Martínez Olmedo y al profesor Jorge Alejandro Flores Maldonado por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

A Sandra Granados N. por su amistad y tolerancia, lo que evitó conflictos durante el proyecto.

Agradezco también a mis amigos Mariel, Jacky, Sandra, Rod, Edgar, Pablo, Brenda, Yamani (T.V.), Ulises C., Ana Laura, Ulises S., Gabriel, Ángel y Cinthya. *Gracias chicos*, ustedes hicieron que mi vida escolar fuera más placentera, a cada uno de ustedes los quiero a mi manera, pero los quiero. Ivan Daniel gracias por tu apoyo y comprensión.

A mis súper amigas de la prepa Nancy, Norma, Dafne, Carlita, Shoshana y Nelly, las quiero mucho GSA.

Doy gracias infinitas a Dios por darme unos padres maravillosos, Ofelia y Claudio al igual que a mi gran hermano Oscar, a los cuales les agradezco su apoyo incondicional durante toda mi vida. Ustedes, mi familia siempre serán la motivación más importante para ser mejor cada día.

Toda esta etapa es aún mejor que en los sueños que tenía de pequeña, por eso también le agradezco a Dios por hacer de mis sueños algo maravilloso.

Mamita hermosa, gracias por ser tan linda y comprensiva, todo lo que soy, lo debo a ti. Y es a ti Ofelia preciosa a quien dedico este trabajo, eres mi inspiración madre, sin ti no sé que sería de mi vida.

¡Gracias!

Cecilia Martínez García

INDICE

Introducción	1
Objetivos	4
Objetivos particulares	4
Capítulo 1. Antecedentes	5
1.1 Pez mero	5
1.1.1 Descripción	5
1.1.2 Distribución y captura	5
1.2 Producción pesquera	7
1.2.1 Producción pesquera mundial y nacional	7
1.2.2 Producción Nacional de Pescado Mero	8
1.3 Empaques biodegradables	10
1.3.1 Generalidades	10
1.3.2 Películas	12
1.3.3 Películas de proteínas	14
1.3.4 Películas modificadas	15
1.4 Tendencias en empaques alimentarios	17
Capítulo 2. Materiales y Métodos	21
2.1 Diagrama general de investigación	21
2.2 Piel de pescado mero. Análisis composicional de macrocomponentes	22
2.3 Obtención del concentrado proteínico	22
2.3.1 Extracción del concentrado de proteína de la piel de pescado	22
2.3.2 Rendimiento proteínico de la extracción	23
2.3.3 Caracterización del concentrado proteínico	24
2.3.4 Determinación de la solubilidad del concentrado proteínico a distintos pHs	25
2.4 Desarrollo de películas a partir del concentrado proteínico	26
2.5 Evaluación de la influencia de la variación del tipo y concentración de plastificantes	27
2.6 Formación de películas modificadas	27
2.7 Evaluación de las propiedades de barrera y mecánicas de las películas modificadas	28
2.7.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	28
2.7.2 Permeabilidad al oxígeno (PO ₂)	30
2.8 Propiedades mecánicas	32
2.8.1 Acondicionamiento de las películas	32
2.8.2 Fuerza de fractura a la extensión	32

Capítulo 3. Resultados y discusión	35
3.1 Análisis composicional de macrocomponentes de la piel de pescado Mero	35
3.2 Obtención del concentrado proteínico	36
3.2.1 Rendimiento proteínico de la extracción	36
3.2.2 Caracterización del concentrado proteínico	40
3.2.2.1 Determinación de proteína cruda total (Método Kjeldahl) y Soluble (Método Lowry)	40
3.2.2.2 Determinación del intervalo de pesos moleculares de las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE	41
3.2.3 Determinación de la solubilidad del concentrado proteínico a distintos pHs	43
3.3 Desarrollo de películas a partir del concentrado proteínico	45
3.3.1 Evaluación de la influencia de la variación del tipo y concentración de plastificante	46
3.4 Evaluación de las propiedades de barrera	50
3.4.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	50
3.4.2 Permeabilidad al oxígeno (PO ₂)	59
3.5 Evaluación de las propiedades mecánicas	62
3.5.1 Prueba de fractura a la extensión	62
Conclusiones	72
Bibliografía	74

Aprovechamiento de proteínas de pesquería del género *Epinephelus* para la obtención de películas modificadas

INTRODUCCIÓN

México posee un extenso litoral, encontrándose entre los primeros 20 países de producción pesquera (FAO, 2007); la parte aprovechable que se obtiene del pescado para la alimentación se encuentra aproximadamente entre el 40% y el 50% de su peso original, según la especie y el tamaño de ésta (Beltrán, 2006), ya que no se utilizan las cabezas, esqueletos, vísceras, escamas y piel, y en algunos casos estos desperdicios son vertidos a los cuerpos de agua, pudiendo ser aprovechados en alguna actividad productiva por su alto valor proteínico.

Los peces son animales capturados en grandes cantidades; constituyen un recurso casi inagotable pero su aprovechamiento es ineficiente ya que solo en casos aislados los desperdicios son utilizados para producir aceites, harinas o fertilizantes, sin embargo estas no son las únicas formas en que se pueden aprovechar los desechos del pescado y con este estudio se pretende contribuir con una nueva alternativa para la utilización de la piel, la cual es una excelente fuente de proteínas que pudieran ser extraídas para evaluar la formación de películas protectoras de alimentos.

En México se capturan alrededor de 11,300 toneladas anuales de Mero (CONAPESCA, 2008), una de las principales pesquerías nacionales que es consumido en forma de filete fresco y congelado. La piel constituye aproximadamente el 10% de su peso y no es utilizada, lo que significa que alrededor de 1100 toneladas de piel obtenida de esta pesquería se

desecha, con lo anterior, en este estudio se propone aprovechar este desperdicio dando una opción de explotación de este recurso poco o nada utilizado, como fuente de biopolímeros (proteínas) para la formación de películas biodegradables, procurando que el equilibrio ecológico no se rompa y aprovechando una gran parte de los desechos generados por la industria pesquera.

La finalidad de diseñar películas biodegradables no es reemplazar empaques de materiales sintéticos derivados del petróleo, que a pesar de garantizar protección a los alimentos durante su manipulación, han generado serios problemas ecológicos, contribuyendo a la contaminación ambiental provocada por desechos sólidos no degradables, lo que ha impulsado a la búsqueda de biopolímeros naturales, amigables con el medio ambiente, y que tengan la capacidad de mejorar la calidad general del alimento y extender su tiempo de vida de anaquel.

La utilización de películas biodegradables es un interesante avance en la industria alimentaria, ya que presentan propiedades que ayudan a mantener al alimento en óptimas condiciones durante el transporte y el almacenamiento. En general las características mecánicas y de barrera son elementos fundamentales para definir el tipo de empaque que se requiere para determinado producto.

Dentro de las propiedades de barrera más estudiadas para conocer la capacidad de las películas para proteger al alimento del medio ambiente y de su entorno, es la permeabilidad al oxígeno, asociada con el desarrollo de microorganismos; respiración de frutas y vegetales; y con la oxidación de lípidos, la cual disminuye la calidad del alimento y acorta la vida de anaquel de éste; otra propiedad de barrera de gran importancia es la permeabilidad al vapor de agua, que es uno de los

más serios problemas en la conservación de los alimentos, ya que puede causar efectos adversos en la textura, valor nutritivo y estabilidad del producto.

Las propiedades mecánicas como fuerza a la extensión y la elongación son de vital importancia en la valoración de cualquier material plástico sintético ó biodegradable, pues permiten caracterizar al material contra el abuso mecánico.

Las películas elaboradas a partir de proteínas, polisacáridos y/o lípidos han tenido un amplio potencial para incrementar la calidad del alimento; sin embargo se ha encontrado que las películas obtenidas a partir de proteínas, poseen buenas propiedades mecánicas pero presentan una alta permeabilidad al vapor de agua (PVA).

Estudios realizados a películas de concentrado de soya, modificadas con sales de calcio y glucono- δ -lactona (GDL), disminuyeron la PVA al haber un mayor entrecruzamiento de las proteínas, por lo que también se desea evaluar si las películas de proteínas de piel de Mero mejorarán sus propiedades mecánicas y de barrera al ser modificadas con estas sales.

Este estudio tiene como propósito fundamental evaluar la propiedad de las proteínas de piel de pesquería del género *Epinephelus* (Mero) para formar películas, y conocer sus características mecánicas y de barrera que establezcan su funcionalidad como protectoras de alimentos.

OBJETIVOS

Desarrollar películas a partir de un concentrado proteínico de piel de pesquería del género *Epinephelus*, y conocer sus características mecánicas y de barrera.

OBJETIVOS PARTICULARES

Establecer las condiciones de extracción para obtener el concentrado proteínico.

Evaluar el efecto de la naturaleza de los plastificantes en la formación de películas, y seleccionar aquel que permita obtener películas con mejor propiedad de formación.

Conocer el efecto que tienen las distintas concentraciones de CaCl_2 , CaSO_4 y GDL sobre la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno de las películas, para determinar su resistencia al intercambio gaseoso.

Conocer el efecto que tienen las distintas concentraciones de CaCl_2 , CaSO_4 y GDL sobre las propiedades mecánicas de las películas, para establecer su resistencia a la fractura.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 PEZ MERO

1.1.1 Descripción

La familia de los *Serranidae* incluye 449 especies repartidas en 62 géneros y tres subfamilias (*Serraninae*, *Anthiinae* y *Epinephelinae*). En la subfamilia *Epinephelinae*, se distinguen cinco tribus, de las cuales la tribu *Epinephelini* agrupa a todas las especies conocidas bajo el término general de meros o chernas (Pisantry, 2004).

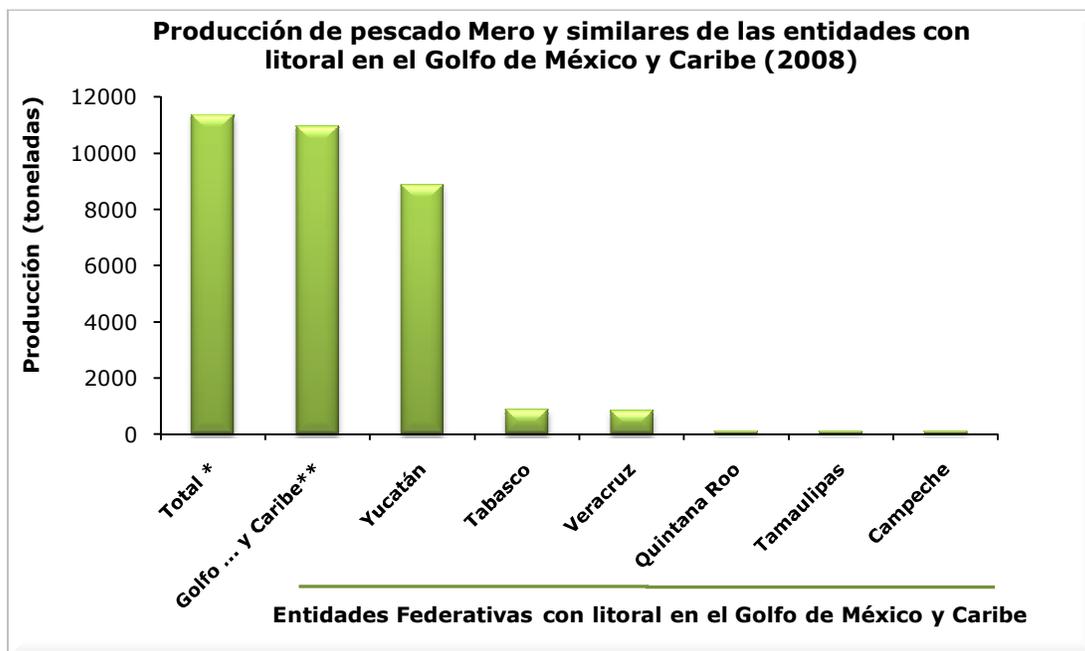
Este pez es conocido como "mero" en México, "cherna americana" en Cuba, y "red grouper" en Estados Unidos.

Presenta un cuerpo robusto, con una cabeza grande en la que resaltan los ojos globosos y unas grandes mandíbulas. Su hábitat son las zonas rocosas de aguas templadas y tropicales, principalmente en el fondo rocoso y coralino de la plataforma continental, a profundidades de 3 a 122 metros. Los ejemplares más grandes pueden llegar a alcanzar más de 1 metro de longitud y más de 40 kg de peso (Salcedo & Chu, 2005).

1.1.2 Distribución y captura

Son peces de arrecifes de gran importancia comercial a lo largo de la costa sureste de los Estados Unidos de América, en las Bermudas, en el Golfo de México y en el Caribe (Pisantry, 2004).

En México se captura de marzo a diciembre a profundidades entre los 20 y 33 metros; del total de la producción nacional de esta especie, 10,926 toneladas provienen del Golfo y el Caribe, principalmente de la península de Yucatán (8,876 t), región en la cual se obtendría la mayor cantidad de desechos de esta pesquería; aunque existe en cantidades menores en otras localidades como Veracruz, Tabasco y Quintana Roo (CONAPESCA 2008) (Figura 1).



*Total de la producción nacional de pescado Mero (11,364 t)
 **Producción de pescado Mero procedente del Golfo de México y Caribe (10,926 t)

Figura 1. Producción de pescado Mero y similares en peso desembarcado de las entidades con litoral en el Golfo de México y Caribe (CONAPESCA, 2008)

En el Pacífico, la mayor parte de las capturas proceden de Sinaloa, Nayarit, Sonora y Baja California, y con frecuencia se pescan como fauna de acompañamiento en las redes camaroneras.

Representa la pesca de escama de mayor valor comercial en el sureste del país. En general se procesa en forma de filetes congelados que en su mayor parte se envían a Estados Unidos donde es muy estimado y sólo superado por el guachinango, también se comercializa entero eviscerado, y en menor proporción se expende como producto seco y salado (Cifuentes, 2000). En el mercado nacional, gran parte de la captura se consume en forma de filetes frescos y congelados, aprovechando del 38% al 50% de su peso entero, dependiendo de la especie, tamaño del pez y en la habilidad del corte (SFA, 2000), generando gran cantidad de desechos como cabezas, esqueletos, vísceras, escamas y piel.

1.2 PRODUCCIÓN PESQUERA

1.2.1 Producción pesquera mundial y nacional

México posee 11 mil 593 kilómetros de costas, de los cuales 73 por ciento corresponden al océano Pacífico y el 27 por ciento restante al Golfo de México y Mar Caribe. Se encuentra entre los primeros 20 países en producción pesquera, con alrededor de 1.5 millones de toneladas anuales que significan el 1.1% de la captura mundial, comprendida en dos grandes segmentos, la captura (1 340 000 t), que es una actividad esencialmente extractiva de los recursos marinos, y la acuicultura (156,002 t) que se refiere a la producción pesquera en ambientes controlados (FAO, 2007) (Tabla 1).

En 1997 se alcanzó la producción pesquera más alta de la historia del país, con un millón 570 mil toneladas, la cual se ha mantenido casi estable en los últimos años (CONAPESCA, 2006).

Tabla 1. Producción pesquera mundial, por acuicultura y captura, de los principales productores en 2007.

<i>País</i>	<i>Producción por Acuicultura (toneladas)</i>	<i>Producción por captura (toneladas)</i>
Producción total	50 329 007	90 063 851
China	31 420 275	14 659 036
India	3 354 754	3 953 476
Vietnam	2 156 500	2 121 400
Indonesia	1 392 904	4 936 629
Tailandia	1 390 031	2 468 784
Bangladesh	945 812	1 494 199
Chile	829 842	3 806 085
Japón	315 628	1 174 393
Egipto	635 516	372 491
USA	526 281	4 767 596
China, Taiwán	315 628	1 174 393
Brasil	289 648	783 177
España	281 240	808 682
Francia	237 618	512 276
Italia	178 992	286 645
Ecuador	171 020	383 725
Canadá	168 769	1 005 966
Irán	158 789	403 635
México	156 002	1 340 000
Turquía	140 021	632 450
Pakistán	130 092	440 190

FAO, 2007

1.2.2 Producción Nacional de Pescado Mero

Entre las principales pesquerías nacionales se encuentran, sardina, camarón, atún, ostión, pulpo, cazón y mero (Figura 2), de las cuales el mero, además del tiburón y cazón, es uno de las principales fuentes de piel como desecho, ya que regularmente se comercializa fileteado. A nivel nacional se captura alrededor de 11,364 toneladas de este pez (CONAPESCA, 2008), de las cuales se obtiene aproximadamente el 10% de piel, lo que equivaldría alrededor de 1100 toneladas de este desperdicio pesquero, razón por la cual es importante dar alternativas de explotación de este recurso poco o nada utilizado, y que la investigación se aplique en mayor grado para aprovechar al máximo los organismos marinos y así evitar que se desperdicie gran parte de ellos.



Figura 2. Producción de principales pesquerías nacionales en peso desembarcado (CONAPESCA, 2008)

Una alternativa de explotación de la piel de Mero es la formación de películas biodegradables a partir del concentrado proteínico (CP) extraído de ésta, si se obtiene un rendimiento del 6 % de concentrado proteínico (expresado en gramos de CP por cien gramos de piel) basándose en lo que reportan autores como Karim & Bath (2009) quienes mencionan que el rendimiento de extracción de gelatina a partir de pescado se encuentra aproximadamente entre el 6% y el 19% (expresado en gramos de gelatina seca por 100 g de piel limpia); y se considera la formación de una película de 100 cm², utilizando 50 mL de una solución con 5 g de CP por cada 100 mL de solución formadora de película (Park, Rhee, Bae, & Hettiarachchy, 2001; Jardón, 2007), se obtendrían aproximadamente 24 películas por cada kilogramo de piel de Mero, lo equivalente a 26 millones 400 mil películas de 100 cm² por año.

1.3 EMPAQUES BIODEGRADABLES

1.3.1 Generalidades

La producción y el uso de plásticos en el mundo ha incrementado enormemente, que están basados comúnmente en productos petroquímicos como el tereftalato de polietileno (PET), policloruro de vinilo (PVC), polietileno (PE), polipropileno (PP) y poliestireno (PS); sin embargo su uso provoca efectos adversos al ambiente, causando riesgos al ecosistema y a la salud; además del alto uso de energía en el proceso de manufactura, y a la difusión de polímeros y de aditivos en los materiales alimenticios, por estos motivos ha aumentado el uso de materiales biodegradables (Mahalik & Nambir, 2010).

El término material biodegradable es usado para describir aquellos que pueden ser degradados por la acción enzimática de organismos vivos,

tales como bacterias, levaduras y hongos; dando como productos finales de la degradación CO_2 , H_2O y biomasa, bajo condiciones aeróbicas; y a hidrocarburos, metano y biomasa, bajo condiciones anaeróbicas (Avella, De Vlieger, Errico, & Fischer, 2005).

En los últimos años las películas biodegradables han atraído mucho la atención, para ser utilizadas en empaques de alimentos y medicamentos, debido a que pueden sustituir parcialmente a películas de plásticos tradicionales, no biodegradables (Cao, Yang, & Yuhua, 2009). La función más importante de estas películas es la reducción de la pérdida de humedad, debido a que se deben de mantener ciertos niveles de a_w , siendo éste un factor de suma importancia en la calidad y seguridad del alimento (Labuza & Contrera-Medellin, 1981).

Estas películas pueden ser utilizadas para limitar la absorción de oxígeno, disminuir la migración de lípidos, mejorar las propiedades de manejo del alimento, proporcionar la protección física, o para ofrecer una alternativa a los materiales de embalaje comerciales (Iwata, Ishizaki, Handa, & Tanaka, 2000); por lo cual es importante conocer las propiedades que éstas presentan, como la permeabilidad al vapor de agua, que está definida como la transmisión de vapor de agua en un tiempo determinada por unidad de superficie de un material plano de espesor conocido, bajo cierta temperatura y humedad relativa (ASTM E 96-95 (2002)). Las películas de proteínas y polisacáridos al ser de naturaleza hidrofílica presentan permeabilidad al vapor de agua elevada que influye en la pérdida de calidad del alimento, sin embargo pueden actuar como barreras efectivas al transporte de gases, como son el dióxido de carbono y el oxígeno (Cuq, Gontard, Guilbert, & Guilbert, 1997). La protección de los alimentos contra el oxígeno es uno de los requerimientos más importantes de los materiales de empaquetamiento, buenas propiedades de barrera al oxígeno de las películas son

importantes para mantener la calidad inicial de los productos (Hong & Krochta, 2006).

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

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

1.3.2 Películas

Las películas comestibles se definen como una o varias capas delgadas de un material que puede ser consumido por los seres vivos y que a la vez pueden actuar como barrera a la transferencia de agua, gases y solutos hacia el alimento. También se define como capas continuas y delgadas elaboradas a partir de materiales comestibles (Krochta, Balwin, & Nisperos-Carriedo, 1994).

La formación de películas, generalmente consiste de al menos dos componentes: un polímero de alto peso molecular (ej. Polisacáridos o proteínas) y un plastificante (Cuq et al., 1997).

Un plastificante es definido como una molécula pequeña, poco volátil y de naturaleza química similar al del polímero formador de la película.

La adición del plastificante al material polimérico lleva a la modificación de la estructura molecular, a la disminución de las fuerzas intermoleculares atractivas, y a un incremento en el volumen libre y en la movilidad de las cadenas polipeptídicas (Bourtoom, Chinnan, Jantawat, & Sanguandeeikul, 2006).

Los biopolímeros utilizados para materiales de empaques se dividen en tres categorías, dependiendo de su origen y producción (figura 3), los más utilizados son las proteínas, carbohidratos y lípidos (Weber, 2000).

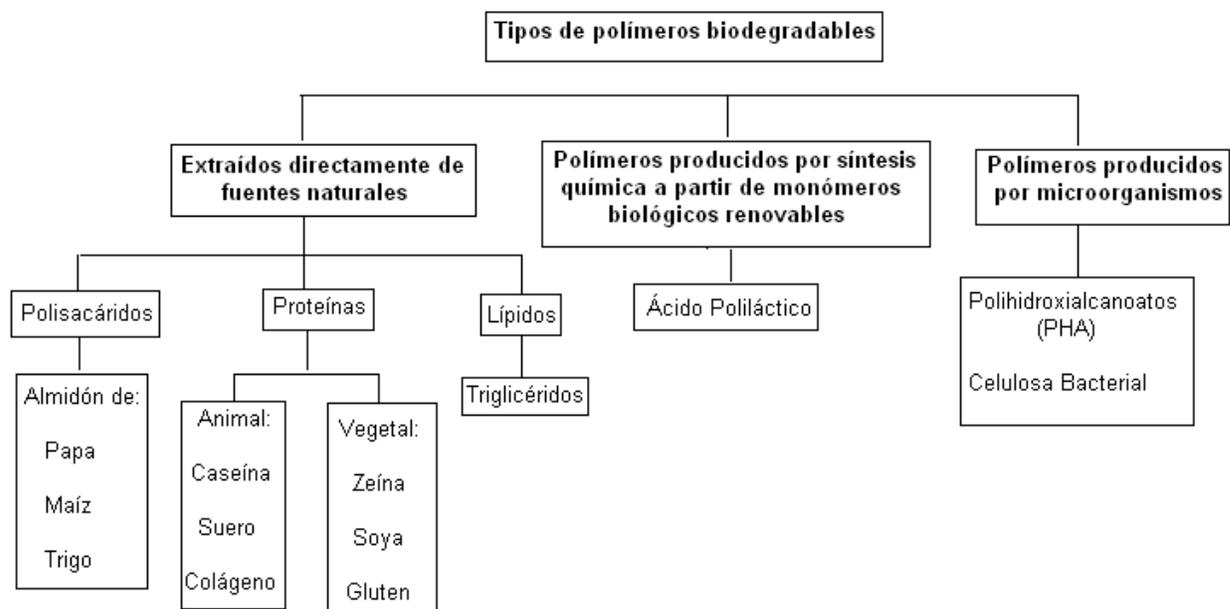


Figura 3. Categoría de los polímeros biodegradable.

Entre los materiales utilizados para la elaboración de películas, las proteínas han sido ampliamente seleccionadas debido a su abundancia, y a la propiedad y habilidad para formar películas biodegradables.

En general este tipo de películas poseen buenas propiedades mecánicas y de barrera, esto se debe a que las proteínas tienen una estructura específica (basada en 20 diferentes monómeros), los cuales le confieren un amplio intervalo de propiedades funcionales, especialmente alto potencial de unión intermolecular, vía enlaces covalentes, propiedad que no poseen la películas hechas a base de polisacáridos (homopolímeros) (Cuq, Aymard, Cuq, & Guilbert, 1995).

1.3.3 Películas de proteínas

La habilidad de las proteínas para formar matrices continuas se ha conocido durante mucho tiempo, debido a esta razón varias proteínas de origen animal y vegetal han recibido gran atención en la tecnología de películas biodegradables (Vanin, Sobral, Menegalli, Carvalho, & Habitante, 2005).

En estado nativo las proteínas generalmente existen en fibrosas y globulares, de las proteínas fibrosas el colágeno y la gretina han tenido una mayor atención en la producción de películas (Damodaran et al., 1997), normalmente extraídas de desperdicios generados durante el sacrificio animal (Cuq et al., 1997).

Las proteínas son interesantes como biomateriales, debido a su estructura específica basada en 20 aminoácidos, los cuales le confieren un amplio rango de propiedades funcionales y de formación de películas, como una función de distintas condiciones intrínsecas y extrínsecas, como la concentración y el tipo de plastificantes (Vanin et al., 2005).

Las proteínas deben ser desnaturalizadas para obtener una estructura extendida, la cual permita la formación de películas; una vez extendidas, las proteínas pueden asociarse mediante puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes.

La interacción cadena-cadena que produce una película cohesiva es afectada por el grado de extensión de la cadena, y la naturaleza y secuencia de los residuos de aminoácidos. La uniforme distribución de los grupos polares, hidrofóbicos y/o tioles entre las cadenas del polímero incrementan una mejor interacción.

Polímeros que pueden ser asociados mediante puentes de hidrógeno, como las proteínas, son el resultado de películas con excelentes barreras al oxígeno pero susceptible a la humedad. Debido a esto se espera que las películas a base de proteína sean buenas barreras al oxígeno pero deficientes a la permeabilidad al vapor de agua (Damodaran et al., 1997).

1.3.4 Películas Modificadas

La migración de humedad es uno de los más serios problemas en la conservación de los alimentos, ya que puede causar efectos adversos en la calidad, alterando la textura, el valor nutritivo, la estabilidad y seguridad del producto; las películas de proteínas, por su naturaleza hidrofílica, que permiten la interacción con las moléculas de agua, se han reportado como ineficientes barreras a la humedad (Hernández-Izquierdo & Krochta, 2008).

Con la finalidad de mejorar las características mecánicas y de barrera al vapor de agua de películas de soya, Park et al. (2001) realizaron modificaciones con sales de calcio (CaSO_4 y CaCl_2) y glucono- δ -lactona (GDL) a estas películas.

Los puentes de calcio entre las proteínas que componían las películas de soya contribuyeron a una menor permeabilidad al vapor de agua (PVA) y a mejores características mecánicas, en comparación con las películas sin ninguna modificación; explicando que el incremento en la hidrofobicidad de las proteínas de soya puede ser atribuido a la formación de enlaces entre las cargas negativas de los grupos carboxilos con los cationes divalentes de calcio, y así reduciendo los sitios de interacción con el agua e incrementando la estabilidad de las proteínas. En el caso de las películas de soya modificadas con GDL también mostraron menor permeabilidad al vapor de agua, debido a que el GDL promueve la agregación de las proteínas desplegadas al incrementar la hidrofobicidad y la insolubilización de éstas.

Concluyeron que películas de proteínas de soya con cierta concentración de sales de calcio y GDL tienen la propiedad de disminuir la permeabilidad al vapor de agua y mejorar sus propiedades mecánicas, para emplearse como agentes de recubrimiento en alimentos (Park et al., 2001).

Este tipo de tratamientos con sales de calcio también han sido estudiados en películas de alginato. Zactiti & Kieckbusch (2006) al estudiar este tipo de películas a las que se les agregó cloruro de calcio obtuvieron especímenes con menor capacidad de elongación, mayor fuerza de tensión y una considerable reducción de la solubilidad en agua y de la permeabilidad al vapor de agua; las películas que no fueron tratadas con esta sal presentaron una PVA de 14.01 g mm/m² d kPa* y a las que se les agregó cloruro de calcio la PVA disminuyó hasta 6.89 g mm/m² d kPa, esto fue atribuido al entrecruzamiento entre los grupos carboxilos del alginato y el Ca²⁺, provocando un engrosamiento en el llamado modelo "caja de huevo".

Olivas, Gustavo, & Barbosa-Cánovas (2007), estudiaron películas de alginato sumergidas en una solución de CaCl_2 al 10% en distinto tiempo, concluyendo que las películas que fueron sumergidas en esta solución durante tres minutos lograron reducir hasta un 50% la permeabilidad al

*(*g = gramo, mm = milímetros, m² = metros cuadrados, d = días, kPa = kiloPascales)*

vapor de agua en comparación con las películas de alginato sin este tratamiento, atribuido a una insolubilización de la película debido a un entrecruzamiento entre el alginato y el calcio.

Otra manera de modificar las propiedades de barrera a la humedad de las películas hidrofílicas puede ser mediante la incorporación de materiales hidrofóbicos como ceras o ácidos grasos de cadenas saturadas. La adición de lípidos en la formulación de las películas sirve como una efectiva barrera al vapor de agua, mientras que los hidrocoloides imparten barrera al oxígeno y al dióxido de carbono (Liu, Kerry, & Kerry, 2006).

1.4 TENDENCIAS EN EMPAQUES ALIMENTARIOS

Existe un desarrollo continuo de tecnologías de envasado bajo la presión de dos factores: por un lado, un aumento de la demanda de nuevos tipos de materiales de embalaje, y por el otro, la cuestión de la contaminación ambiental y el reciclado de residuos (Daraba, 2008).

Dentro de los bioplásticos utilizados en la industria de empaques se encuentran los de celulosa, almidón que actúan como complemento y agente adherente para crear una mezcla entre almidón y plástico (almidón-polietileno), beta polihidroxicanoatos (PHB) el cual es 100% biodegradable y resistente al agua, y los de ácido poliláctico (PLA) que

tienen mejores propiedades de barrera a luz ultravioleta que el polietileno de baja densidad (LDPE) (Mahalik et al., 2010). El mercado global de polímeros biodegradables excede de 51 mil toneladas y se espera un crecimiento anual del 12.6 % en 2010 (Auras, Harte, & Selke, 2003).

Nuevas tecnologías de embalaje de alimentos se están desarrollando como respuesta a la demanda de los consumidores y a la tendencia de la producción industrial hacia alimentos con vida útil prolongada y calidad controlada.

En las últimas décadas uno de los más innovadores desarrollos en el área de embalaje de alimentos son los empaques "activos e inteligentes". El propósito de los "empaques activos" es extender la vida útil de los alimentos y de mantener o incluso mejorar la calidad de éstos, mientras que el propósito de los "empaques inteligentes" es indicar y monitorear la frescura del alimento durante la distribución y el almacenamiento (Dainelli, Gontard, Spyropoulos, Zondervan-van den Beuken, & Tobback, 2008).

Un empaque puede ser inteligente a través de sus atributos funcionales que provee beneficios a los alimentos y por lo tanto beneficie a los consumidores.

Es esencialmente un método de integración, que utiliza funciones mecánicas, químicas, eléctricas, que mejoran el uso o la eficiencia de los productos alimenticios de una manera segura.

Algunos de los aspectos de los envases inteligentes son las etiquetas de calidad que indican tiempo-temperatura del alimento; el uso de contenedores con auto-calefacción o auto-enfriamiento, y empaques con pantallas electrónicas que indique el uso del producto por fecha y con la información sobre la calidad nutricional del producto en varios idiomas (Mahalik et al., 2010).

Los envases activos se basan en las propiedades intrínsecas del polímero utilizado, así como en los mismos materiales de embalaje o en la introducción de sustancias determinadas en el interior del polímero.

La naturaleza de los agentes activos que se pueden agregar son muy diversos (ácidos orgánicos, enzimas, bacteriocinas, fungicidas, extractos naturales, iones, etanol, etc.), así como la naturaleza de los materiales en los cuales son incluidos: papel, plástico, metales o combinaciones de éstos (Dainelli et al., 2008).

Los envases activos pueden ser clasificados en dos tipos: Empaque activo no-migratorio, no permiten la migración de componentes del empaque hacia el alimento, y los envases activos que permiten la liberación controlada de agentes no volátiles, o la emisión de compuestos volátiles a la atmosfera que rodea al alimento (Tabla 2) (Kerry, O'Grady, & Hogan, 2006).

Tabla 2. Ejemplos de aplicaciones de envases activos para uso en la industria alimentaria.

Propiedad de barrera	Oxígeno, dióxido de carbono, humedad, etileno, sabores y a la luz ultravioleta
Propiedad de liberación/emisión	Etanol, dióxido de carbono, antioxidantes, conservantes, dióxido de azufre, sabores y plaguicidas
Propiedad de eliminación	Eliminación de componentes que participan en la catálisis de alimentos: Lactosa, colesterol.

Los ejemplos más conocidos de los empaques activos no migratorios son lo que absorben humedad, basados principalmente en la adsorción del agua por medio de zeolita, celulosa y sus derivados; empaques que absorben el oxígeno, basado en la oxidación del hierro, en la oxidación

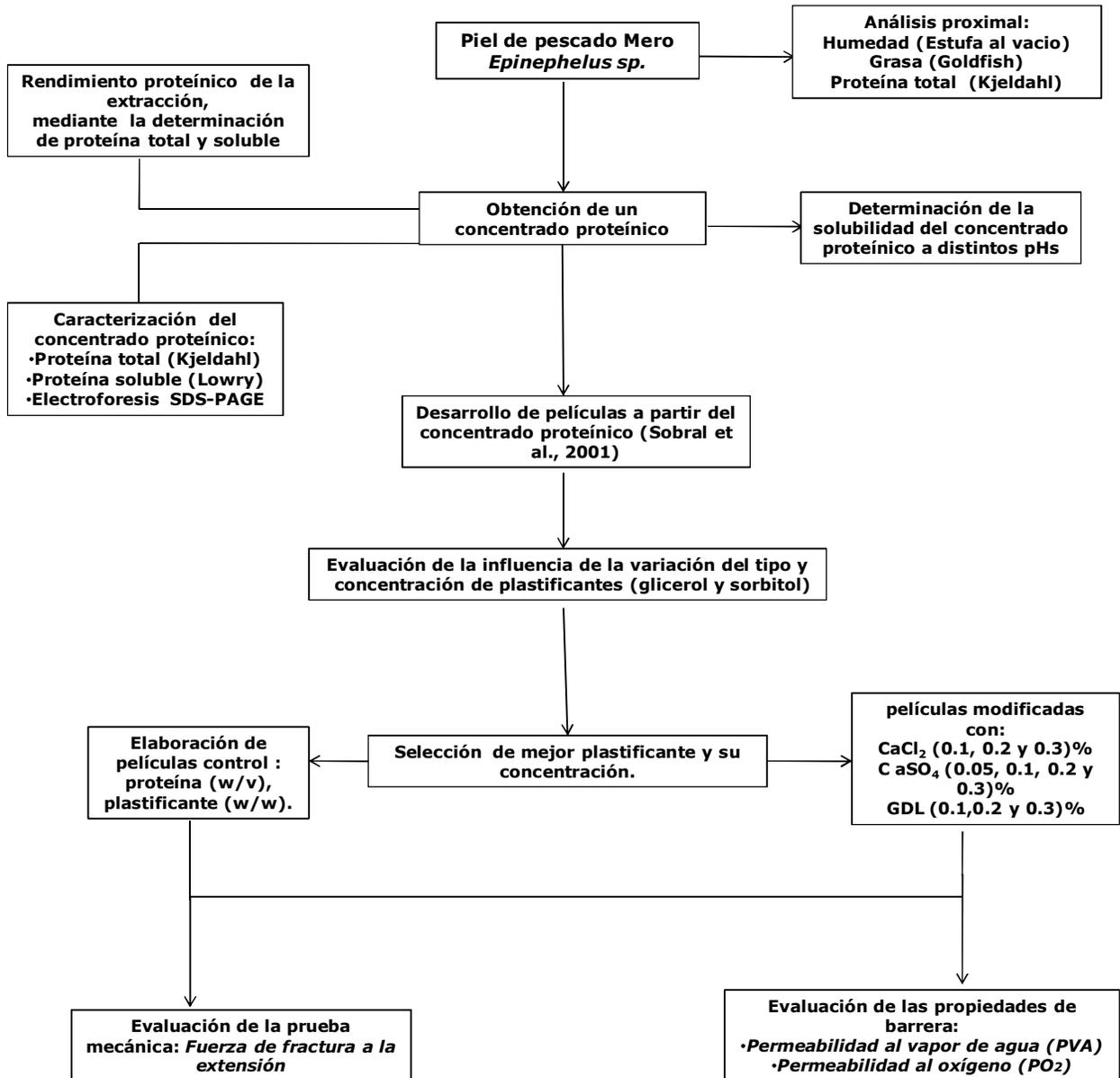
del ácido ascórbico o por medio de catálisis enzimática, y los que sirven como barrera al etileno, utilizados frecuentemente para disminuir la maduración de las frutas climatéricas, característica importante para la exportación de frutas frescas y vegetales.

Dentro de los empaques activos de liberación, es muy conocido la liberación de etanol, que permite disminuir el crecimiento de moho y por lo tanto aumentar la vida útil de los productos de panadería.

Además en los últimos años se han utilizado métodos alternativos para controlar la contaminación microbiana en los alimentos mediante la incorporación de sustancias antimicrobianas en los materiales de empaques (Dainelli et al., 2008).

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diagrama general de investigación



2.2 Piel de pescado mero. Análisis composicional de macrocomponentes

La piel de la pesquería mero (*Epinephelus sp*) se obtuvo del mercado "La Nueva Viga" ubicado en la ciudad de México.

La piel fue sometida a un análisis proximal que incluyó humedad, grasa y proteína total, cada determinación fue realizada a tres lotes distintos de piel; el ensayo se realizó por triplicado, empleando los siguientes métodos:

- Humedad. Gravimetría, horno de vacío (AOAC 931.04)
- Grasa. Método Goldfish (AOAC 920.85)
- Proteína cruda total. Método Kjeldahl (AOAC 981.10)

2.3 Obtención del concentrado proteínico

2.3.1 Extracción del concentrado de proteína de la piel de pescado

La extracción de la piel de pescado mero se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento de Batista (1999), con algunas modificaciones.

La piel cortada en trozos pequeños fue sumergida en una solución de NaOH 0.1 M (pH 12) en una relación de 1:10 (p/v), esta mezcla se agitó durante 60 minutos a 45 °C. Posteriormente la piel fue molida en una licuadora convencional, con la finalidad de disminuir el tamaño de partícula, y de esta manera obtener un mejor rendimiento de extracción. Hecho lo anterior, nuevamente se retrocedió a las condiciones iniciales, las cuales consistían en dejar la solución en calentamiento y agitación por otros 60 minutos; transcurrido el tiempo estipulado, la suspensión fue centrifugada en una centrifuga marca Beckman J2-M2, en frío (4 °C) a 5000 rpm durante 15 minutos,

obteniéndose un desecho y un sobrenadante. Al sobrenadante se le agregó una solución de hexametáfosfato de sodio al 10% en una relación de 1 mL de esta solución por cada 50mL de sobrenadante, posteriormente se ajustó el pH a 2.5 utilizando HCl 2M, subsecuentemente se dejó la solución en reposo por 2 horas en refrigeración con la finalidad de permitir que las proteínas precipitaran por completo.

Después de las 2 horas de reposo se centrifugó nuevamente a 5000 rpm por 15 minutos para obtener el concentrado proteínico, este precipitado fue congelado hasta su uso; después de la descongelación se realizó la determinación de humedad, para realizar el ajuste de este concentrado en base seca.

2.3.2 Rendimiento proteínico de la extracción

La determinación de rendimiento se realizó en cada una de las fracciones resultantes de la extracción mediante la determinación de proteína total por el método Kjeldahl y proteína soluble por el método de Lowry (Lowry, Rosenbrough, Farr, & Randall, 1951); la piel de pescado y el concentrado proteínico fueron pesados y los sobrenadantes medidos volumétricamente.

Las fracciones estudiadas fueron las siguientes:

- Piel de pescado, previamente secada en estufa de vacío a 80°C
- Líquido de extracción, sobrenadante obtenido después del calentamiento de la piel en la solución de NaOH 0.1 M

- Sobrenadante resultante de la precipitación con hexametáfosfato de sodio
- Concentrado proteínico procedente de la piel (Se empleará para la formación de películas)

2.3.3 Caracterización del concentrado proteínico

Una vez obtenido el concentrado de proteína de la piel de pescado se realizaron las siguientes determinaciones:

- Determinación de proteína cruda por el método de Kjeldahl: El precipitado obtenido después de la centrifugación fue secado en estufa de vacío Modelo National appliance company 5831, a 80°C y posteriormente utilizado para la determinación de proteína total.
- Determinación de proteína soluble por el método de Lowry.
- Determinación del intervalo de pesos moleculares de las proteínas, mediante electroforesis SDS-PAGE:

Con el fin de conocer las fracciones de proteína en el concentrado, se realizó una electroforesis empleando el método SDS-PAGE.

El método SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate-polyacrilamide gel electrophoresis) se realizó de acuerdo con Laemmli (1970) y para ello se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida (Tabla 3), el gel separador de concentración de acrilamida al 10% fue utilizado para determinar proteínas de alto peso molecular (Marcador Sigma 36-200kDa) y el de 12% de acrilamida para las de bajo peso molecular (Marcador Sigma 20-66kDa).

Se preparó una solución del CP de 1 mg/mL y 2 mg/mL (pH 12), ésta fue mezclada con buffer de tratamiento (1:1 v/v) y sometida a un tratamiento térmico por 3 minutos en un baño de agua en ebullición.

Tabla 3. Cantidades utilizadas en la preparación de dos geles de poli(acrilamida).

	Gel concentrador	Gel separador	
	5% acrilamida	10% acrilamida	12% acrilamida
Sln. Acrilamida	415 µL	2.83 mL	3.40 mL
Tris 1M pH 6.8 Tris 2M pH 8.8*	250 µL	1.91 mL*	1.91 mL*
SDS 10%	25 µL	85 µL	85 µL
H ₂ O	1.81 mL	3.66 mL	3.10
TEMED	1.75 µL	4.3 µL	4.3 µL
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 10%	17.5 µL	43 µL	43 µL

Los geles cargados con la muestra tratada (20µL) y con los marcadores de peso molecular (4 µL) se corrieron en una cámara de electroforesis de la marca Bio-Rad a 100 volts durante 90-120 min. Posteriormente los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie durante toda la noche y desteñidos con una solución metanol/acido acético/agua (10:10:80, v/v/v).

Los geles desteñidos se escanearon con el densitómetro modelo GS700 Bio-Rad y se utilizó el programa Quantity-One para la determinación de los pesos moleculares de las bandas detectadas.

2.3.4 Determinación de la solubilidad del concentrado proteínico a distintos pHs

De acuerdo al método propuesto por Saeed & Cheryan (1988), se realizó una curva de solubilidad en función del pH, dando como resultado el porcentaje de solubilidad.

El método consistió en preparar doce soluciones acuosas (10mL) que contenían 3 % (p/v) de concentrado proteínico (CP), que fueron ajustadas a diferentes valores de pH (variando de 1.0 a 12.0) mediante la utilización de NaOH y HCl 1.0 N, el valor de pH se registró con un potenciómetro marca Thermo electron corporation, previamente calibrado. Las soluciones proteínicas permanecieron en agitación durante 30 minutos, posterior a esto se tomó nuevamente la lectura de pH de cada una de las soluciones con la finalidad de corroborar que mantuvieran el pH adecuado, o bien para realizar el ajuste; enseguida, se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos en una centrifuga marca Labtronic Scientific (Modelo H-1650).

El contenido proteínico del sobrenadante fue determinado a través del método de Lowry.

2.4 Desarrollo de películas a partir del concentrado proteínico (Sobral, Menegalli, Hibinger, & Roques, 2001)

Las películas se elaboraron siguiendo la metodología propuesta por Sobral et al. (2001).

Por medio de una continua agitación se disolvió el concentrado proteínico de piel de pescado mero en agua destilada (5g CP pescado/100mL H₂O), ajustando la solución a pH 11.5 ± 0.2 con NaOH 1N. El plastificante, en este caso sorbitol, fue adicionado al 50% p/p con respecto a la cantidad del CP; la solución se mantuvo en agitación hasta disolver completamente (aproximadamente 10 min).

Se calentó a baño de agua a 70°C durante 20 minutos, transcurrido el tiempo se filtró y sonicó por 15 minutos. Finalmente la solución (50 mL) se vació en recipientes de teflón (12 cm de diámetro), dejando secar a

temperatura ambiente y despegándolas manualmente después de 48 h aproximadamente.

2.5 Evaluación de la influencia de la variación del tipo y concentración de plastificantes

Con el objetivo de conocer el efecto del tipo y concentración del plastificante sobre la formación de las películas, se prepararon soluciones con el CP al 5% p/v, a pH de 11.5 ± 0.2 , y se utilizaron como plastificantes glicerol y sorbitol a distintas concentraciones, que han sido utilizadas con frecuencia por otros autores, la concentración de plastificante fue del 50 y 75 % con respecto al peso del CP, además de una mezcla de estos 15% glicerol:15% sorbitol (4% CP).

Después del secado se observó cuál de las soluciones preparadas había permitido la formación de películas, y se seleccionó el tipo y concentración de plastificante que permitió que las películas formadas fueran manejables y pudieran ser despegadas de la superficie de secado con facilidad.

A las películas con mejores propiedades de formación y flexibilidad se seleccionaron para realizarles modificaciones con sulfato de calcio (CaSO_4), cloruro de calcio (CaCl_2) y glucono- δ -lactona (GDL).

2.6 Formación de películas modificadas

Una vez seleccionadas las películas con la concentración y el tipo de plastificante con mejores propiedades de formación (películas control) se

desarrollaron películas modificadas, empleando concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.3% p/p de sales de calcio (CaSO_4 y CaCl_2) y glucono δ -lactona, respecto a la cantidad de proteína.

Las sales fueron adicionadas a la formulación después de agregar el plastificante; se preparó una solución de sal de concentración conocida y fue agregada dependiendo de la cantidad de proteína presente en la formulación, esto se hizo con la finalidad de minimizar el error al pesar la cantidad de sal.

Estas películas al igual que las películas control fueron sometidas a pruebas de permeabilidad al vapor de agua (PVA), permeabilidad al oxígeno (PO_2) y pruebas de fractura a la extensión.

2.7 Evaluación de las propiedades de barrera y mecánicas de las películas modificadas

2.7.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua de las películas control y las modificadas se realizaron pruebas utilizando el método de la ASTM E96-95 (2002). Este método consiste en determinar gravimétricamente la cantidad de agua que absorbe un desecante como lo es el cloruro de calcio anhidro.

Para el ensayo se emplearon celdas de acrílico a peso constante, en las cuales se depositó una cantidad conocida de cloruro de calcio anhidro (35g aproximadamente), dejando un espacio de cabeza de aproximadamente 1 cm. Posteriormente se colocaron las películas entre el anillo y la boca de la celda, siendo ésta el único paso para el vapor de

agua (Fig. 4a). Estas celdas fueron colocadas en una cámara a condiciones estándar de humedad relativa del $62 \pm 2\%$ (Fig. 4b). La prueba se llevo a cabo por 5 días haciendo mediciones cada 24 horas, registrando el aumento de peso de cada celda, la humedad relativa y la temperatura. Las determinaciones se hicieron por triplicado.



(a)

(b)

Figura 4. a) Celda de acrílico para determinar PVA, b) Cámara a condiciones estándar de humedad relativa.

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se obtuvo con el siguiente tratamiento de datos:

a) Transmisión de Vapor de Agua ($\text{g/h}\cdot\text{m}^2$)

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

G= Ganancia en peso durante la prueba (g)

t= Tiempo de duración de la prueba (h)

A= Área de la boca de las celdas (m^2)

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

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

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

R= Humedad relativa.

c) Permeabilidad al Vapor de Agua ($\text{ng/Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}$)

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

El espesor es el correspondiente a las películas sometidas a prueba, dicho espesor fue medido con micrómetro.

2.7.2 Permeabilidad al oxígeno.

Para evaluar la permeabilidad al oxígeno en las películas a base de proteína de pescado, se siguió el método volumétrico de la ASTM D1434 (1998). Con este método se obtiene el coeficiente de transmisión de oxígeno de cada una de las películas a través del seguimiento del cambio de volumen generado por la transferencia de moléculas de oxígeno dentro de la película.

El procedimiento consistió en situar la película con un diámetro aproximado de 9 cm en la parte inferior de una celda (CSI-135 Permeability Cell Tester), la cual posee un teflón que al estar ligeramente engrasado se adhiere fácilmente a la muestra; sobre la película se asentaron dos piezas de papel filtro que sirvieron como

medio de retención. Posteriormente se colocó la parte superior de la celda y se sellaron los dos compartimentos de la celda de transmisión con cuatro tornillos colocados de manera simétrica.

Para purgar la celda de aire y saturarla de oxígeno se aplicó una presión de gas positiva con un cilindro de gas comprimido de oxígeno marca Infra, extra seco 99.5%, por un lapso de 10 minutos, dejando las válvulas abiertas (válvula de escape superior, inferior y de capilar).

Al cerrarse las válvulas de escape capilar y superior, se introdujeron 10 μ L de 4-metil-2-pentonona en el capilar de precisión, cuando el líquido se encontró en equilibrio dentro del manómetro, se cerró la válvula de escape superior e inmediatamente se ajustó la presión a 20psi. Se dejó en estas condiciones hasta obtener datos de desplazamiento del líquido, lo que indicó la permeabilidad del oxígeno.

La permeabilidad al oxígeno se obtiene con el siguiente tratamiento de datos:

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

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

Donde:

A = Área de transmisión del espécimen (mm²)

ρ_o = Presión ambiental (Pa)

R = Constante universal del gas ideal (8.314x10³L*Pa/mol*K)

T = Temperatura ambiente (K)

Vr = Velocidad del líquido en el capilar (mm³/s)

b) Permeanza ($\text{mol/m}^2 \cdot \text{s} \cdot \text{kPa}$)

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

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

c) Permeabilidad al oxígeno ($\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}$)

$$PO = P * \text{espesor}$$

El espesor corresponde al de las películas evaluadas, el cual fue medido con micrómetro.

2.8 Propiedades mecánicas

2.8.1 Acondicionamiento de las películas.

Previo a las evaluaciones, las películas fueron acondicionadas a una humedad relativa (HR) de $62 \pm 2\%$ y a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. La HR se logró con una solución saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y fue medida con un higrómetro marca Oakton, Japón.

2.8.2 Fuerza de fractura a la extensión.

Las propiedades mecánicas evaluadas en este estudio incluyeron el esfuerzo verdadero, la deformación de fractura y el Módulo de Young.

Dichas propiedades se determinaron mediante la fuerza de fractura a la extensión. Las pruebas hechas a las películas se realizaron en el equipo para pruebas mecánicas y de textura marca Sintech 1/S, MTS, E.U.A., el cual está conectado a una computadora que proporciona la información del comportamiento de las películas durante las pruebas. La celda de carga utilizada fue de 100N. Las pruebas se determinaron conforme al procedimiento estándar aplicado para este tipo de materiales (ASTM D 882, 2002).

La película se cortó en tiras de 8 cm de largo por 1 cm de ancho y a cada una se le midió el espesor con un micrómetro en tres puntos diferentes (en los dos extremos de la tira y uno en el centro), tomando el promedio como el valor del espesor.

Las tiras fueron sujetadas de los extremos por medio de unas mordazas conectadas al equipo, y se procedió a estirarlas a una velocidad de 250 mm/min, hasta que la película sufrió una ruptura. Durante el estiramiento, el equipo iba midiendo la fuerza que la película ejerció, dando como resultado final la fuerza de fractura a la extensión.

El tratamiento de los datos obtenidos por el equipo Sintech 1/S, fue el siguiente:

a) Fuerza nominal $\sigma =$ (N/m²) \rightarrow Pa

$$\sigma = \frac{F}{A_0}$$

F = Fuerza (N)

A₀ = Área inicial (m²) [espesor de la película * ancho de la tira]

b) Longitud final al tiempo t en cualquier momento de la prueba:

$$L = v * t$$

Donde v fue igual a 250 mm/min.

c) Deformación relativa nominal (e):

$$e = \frac{(L - L_0)}{L_0}$$

L_0 = Longitud inicial de la película.

d) Esfuerzo verdadero (σ_v):

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

e) Deformación de Hencky (ϵ_H):

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

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

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

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis composicional de macrocomponentes de la piel de pescado Mero.

Con la finalidad de conocer el perfil composicional que posee la piel de pescado Mero, principalmente la cantidad de proteína que servirá para el estudio de películas biodegradables, se realizó el análisis de macrocomponentes a distintos lotes.

Las determinaciones realizadas fueron; humedad, componente mayoritario, con un valor de $65.21\% \pm 2.85$ (promedio obtenido de la determinación por triplicado de cada uno de los lotes), proteína y grasa; los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Análisis químico proximal de piel de pescado Mero

LOTE	DETERMINACIÓN (g/100 g piel b.s)	
	GRASA	PROTEÍNA
1	4.79 ± 0.19^a	74.45 ± 3.11^a
2	4.38 ± 0.18^a	76.43 ± 1.96^a
3	7.14 ± 0.02^b	76.51 ± 4.54^a

a, b: en cada columna, con la misma letra no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$)

Si no se considera la cantidad de agua presente en la piel, el componente mayoritario que la constituye son las proteínas, como se observa en la tabla anterior no hubo diferencia significativa en los lotes

estudiados; sin embargo la cantidad de grasa determinada fue diferente significativamente en el lote tres, debido a que la composición química de los peces puede variar considerablemente, aún entre individuos de la misma especie, dependiendo de la edad, sexo, medio ambiente y estación del año. La diferencia que presentó uno de los lotes en la cantidad de grasa presente en la piel no fue considerada como un factor que pudiera afectar en la obtención del concentrado proteínico empleando distintos lotes.

3.2 Obtención del concentrado proteínico.

3.2.1 Rendimiento proteínico de la extracción.

Con el objetivo de determinar el rendimiento de la extracción y conocer en que operaciones del proceso existen pérdidas, se realizó un balance proteínico en cada una de las fracciones resultantes, las cuales van desde la piel del pescado hasta la obtención del concentrado proteínico.

Este balance se realizó a distintos lotes de piel para saber si afectaría de manera considerable en el rendimiento al trabajar con diferentes muestras (adquiridas en distintos días); debido a que no se pudo obtener el concentrado proteínico suficiente para la elaboración de las películas de un solo lote.

En el primer paso de la extracción, que consiste en calentar la piel en solución alcalina, se obtiene un sobrenadante denominado líquido de extracción (L.E) al que se le determinó la cantidad de proteína total y soluble extraída de la piel, y se obtiene un primer residuo compuesto de escamas y piel molida.

En esta etapa del proceso se obtuvo una gran pérdida de proteína, ya que en los tres lotes se extrajo menos del 50% de la proteína total (P.T) presente en la piel. En el lote uno se reporta un rendimiento de extracción de P.T del 36.30% (tabla 5); la cantidad de proteína que se pierde en esta etapa se encuentra en el residuo, mostrando una pérdida del 57.3%, determinada experimentalmente.

El porcentaje de extracción de las proteínas de la piel en el líquido de extracción fue de entre 36 y 49 % de proteína total y de 24 a 28 % de proteína soluble; la diferencia que existe entre éstas dos determinaciones puede ser atribuida a que la proteína total determinada por el método de Kjeldahl está contemplando compuestos nitrogenados no proteínicos como la trimetilamina, dimetilamina (producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación), amoníaco (producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos) y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros.

La diferencia en el porcentaje de extracción entre los tres lotes, puede deberse a condiciones intrínsecas en cada uno, como la edad y el sexo del pez; así como el estado de desnaturalización de las proteínas que se lleva a cabo durante la congelación, el almacenamiento y/o la descongelación del pescado antes de su venta, causada por la concentración de sales minerales y sustancias orgánicas dentro de la células que comienza a aumentar cuando el agua presente en ellas se convierte en cristales de hielo. El incremento de la concentración de soluto, con el correspondiente cambio en la fuerza iónica y pH, produce la disociación y desnaturalización de las proteínas, ocurriendo un cambio en la carga neta de la proteína haciendo el medio más hidrofóbico y por lo tanto menos soluble, disminuyendo de esta manera la concentración de proteína extraída (FAO, 1999); otro factor importante puede ser el grado de agregación de las proteínas causada por el incremento

progresivo de enlaces cruzados intermoleculares debido a la formación de puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, enlaces hidrofóbicos y enlaces de sulfuro durante el almacenamiento en congelación y que afecte la solubilidad de éstas con el método empleado en este estudio; el rendimiento de extracción también depende de las características estructurales de las proteínas, principalmente del colágeno, que puede variar dependiendo del nivel de entrecruzamiento que presente la molécula (Torres, Pacheco, Sotelo, Rouzaud, & Ezquerro, 2008).

Tabla 5. Porcentaje de proteína total (P.T) y soluble (P.S) extraída de la piel de Mero, presente en el sobrenadante después del calentamiento de la piel.

LOTE	PIEL	LIQUIDO DE EXTRACCIÓN (SOBRENADANTE DESPUES DEL CALENTAMIENTO DE LA PIEL EN NaOH 0.1 M)			
	P.T (g/100g piel b.s)	P.T (g/100g piel b.s)	% Extracción (g P.T/100g P.T piel)	P.S (g/100 g piel b.s)	% Extracción (g P.S/100g P.T piel)
1	74.46 ^a ± 3.11	27.03 ^a ± 1.18	36.30 %	17.79 ^a ± 0.83	23.90 %
2	76.43 ^a ± 1.96	31.21 ^b ± 1.72	40.83 %	18.54 ^a ± 0.43	24.25 %
3	76.51 ^a ± 4.54	37.99 ^c ± 1.31	49.65 %	21.95 ^b ± 1.39	28.69 %

La segunda operación de la extracción para obtener el concentrado proteínico (CP) que se utilizará para el estudio de películas biodegradables, consistió en realizar una precipitación isoeléctrica (PI) de las proteínas presentes en el líquido de extracción, obteniéndose el CP y un segundo residuo (sobrenadante obtenido después de la precipitación de las proteínas).

En esta operación se realizó un balance proteínico, considerando la cantidad de proteína soluble extraída en la primera etapa (líquido de extracción), como se observa en la tabla 6, en esta parte del proceso hubo la mayor pérdida de proteína ya que bajo las condiciones de trabajo del método de extracción (pH 2.5 agregando 0.2 % p/v de hexametáfosfato de sodio), solo precipitaron entre el 22 y el 29% de las proteínas solubles extraídas en el L.E, y alrededor del 70-75 % permanecieron solubles en el sobrenadante.

Tabla 6. Balance proteínico de la extracción después de la precipitación isoelectrica (PI) y rendimiento final de la extracción de proteína soluble respecto a la proteína total presente en la piel.

LOTE	LIQUIDO DE EXTRACCIÓN (L.E)	SOBRENADANTE (S.PI) (RESIDUO DESPUES DE LA PRECIPITACIÓN ISOELECTRICA)		CONCENTRADO PROTEÍNICICO (CP)		RENDIMIENTO FINAL
	P.S (g/100 g piel b.s)	P.S (g/100 g piel b.s)	% PERDIDO EN EL S.PI	P.S (g/100 g piel b.s)	% EXTRAÍDO DEL L.E	% (g P.S / 100 g P.T piel)
1	17.79 ^a ± 0.83	12.39 ^a ± 0.14	69.64 %	5.01 ^a ± 0.19	28.16 %	6.73 %
2	18.54 ^a ± 0.43	14.19 ^b ± 0.28	75.54 %	4.18 ^b ± 0.179	22.55 %	5.47 %
3	21.95 ^b ± 1.39	15.27 ^c ± 0.46	69.57 %	6.52 ^c ± 0.19	29.70 %	8.52 %

Autores como Jamilah & Harvinder (2002) reportan un rendimiento de 5.39% de contenido proteínico de tilapia, así mismo Limpisophon, Tanaka, Weng, Abe, & Osako, (2009) extrajeron gelatina de piel de tiburón obteniendo entre 4.33 y 5.20%.

Para el estudio de esta pesquería (Mero) se obtuvo un rendimiento final del 5 al 8% de proteína soluble empleando distinto lotes de piel, presentando un rendimiento mayor respecto al de tilapia y tiburón.

3.2.2 Caracterización del concentrado proteínico.

3.2.2.1 Determinación de proteína cruda total (Método Kjeldahl) y Soluble (Método Lowry).

Durante el proceso de extracción no se realizó ningún paso de purificación que asegurara la obtención de un concentrado proteínico completamente puro, por lo que se obtuvo un bajo rendimiento de proteína total y proteína soluble en el CP, el cual fue de 63.81% y de 45.33 % respectivamente (tabla 7). Las impurezas presentes en éste pueden ser sales propias de la piel y/o el hexametáfosfato de sodio (sal que facilitó la precipitación), que posiblemente solubilizaron y precipitaron al igual que las proteínas.

Tabla 7. Porcentaje de proteína total y soluble en el concentrado proteínico de piel de pescado (CP).

% Proteína Total (g/ 100 g CP b.s)	% Proteína Soluble (g/100 g CP b.s)
63.81 ± 1.66	45.33 ± 0.74

Como consecuencia de un bajo rendimiento y demasiado tiempo en la extracción del CP, se decidió evaluar la formación de películas sin realizar alguna purificación previa a este concentrado.

3.2.2.2 Determinación del intervalo de pesos moleculares de las proteínas, mediante electroforesis SDS-PAGE

Con el fin de determinar el intervalo de pesos moleculares de las proteínas que conforman el CP y que intervendrán en la formación de películas, se decidió realizar electroforesis mediante la técnica SDS-PAGE. Se prepararon dos geles desnaturalizantes con distintas concentración de acrilamida; al 12% para la determinación de proteínas de bajos pesos moleculares de entre 20-66 kDa y al 10% para determinar proteínas de alto peso molecular, utilizando como referencia marcadores de 36-200 kDa.

En la Figura 5, se muestran las proteínas de bajo peso molecular presente en el CP, en la que se muestran varias bandas por arriba de los 31 kDa, las bandas de mayor intensidad son cinco, es decir las proteínas de bajo peso molecular que están en mayor concentración en el CP, están en un intervalo de 33-48 kDa.

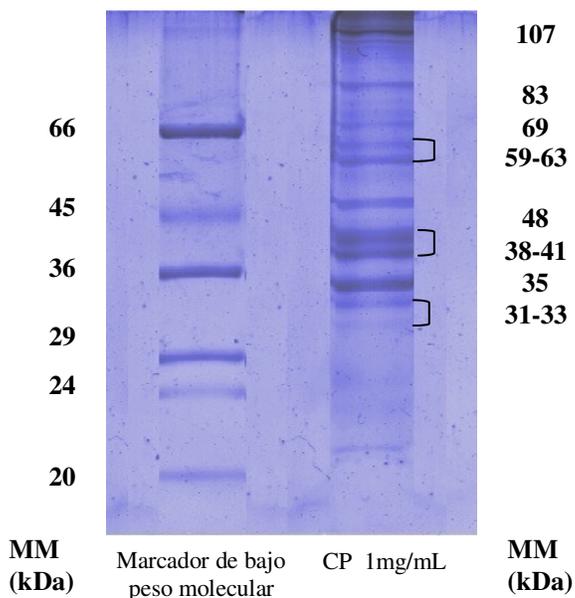


Figura 5. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 12 %, teñido con azul de Coomassie. CP: concentrado proteínico, solución de 1mg/mL.

En el gel SDS-PAGE al 10% (Fig. 6), se observan con mayor resolución las bandas que están por debajo de los 30 kDa, bandas que no son percibidas en el gel de 12% de acrilamida (Fig. 5), se aprecia que el CP no está compuesto por proteína de pesos moleculares menores de 23kDa, y que al igual que en la figura anterior las bandas de bajo peso molecular que se encuentran en mayor concentración también están en el intervalo de 31-48 kDa.

Muyonga, Cole, & Duodu (2004) concluyeron que la gelatina de la piel del perca del Nilo (*Lates niloticus*) contenía péptidos de bajo peso molecular, cuando la gelatina era extraída con altas temperaturas.

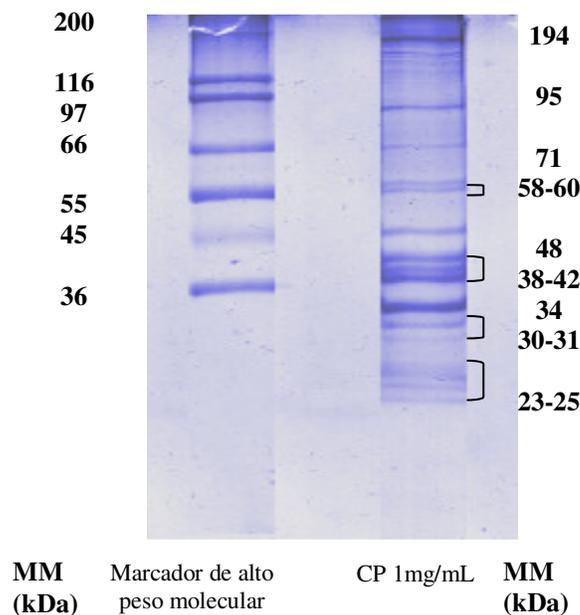


Figura 6. Gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 10 %, teñido con azul de Coomasie. CP: concentrado proteínico, solución de 1mg/mL.

En la figura 6 las bandas de alto peso molecular que presentan mayor nitidez son las de 95 kDa y 194 kDa, aunque se observan en menor concentración que las proteínas de bajo peso molecular; Norziah, Al-

Hassan, Mordi, & Norita (2004) quienes caracterizaron gelatina de pescado obtenida de desechos del proceso de surimi, determinan dos bandas de pesos moleculares similares, las cuales las caracterizan como α colágeno (100 kDa) y β colágeno (200 kDa). Se le denomina componente β cuando dos hebras simples de colágeno (unidades α) forman enlaces cruzados entre sí de tipo covalente (Fennema, 2000).

Limpisophon et al. (2009) también determinaron estas dos bandas al caracterizar gelatina extraída de tiburón azul (*Prionace glauca*).

3.2.3 Determinación de la solubilidad del concentrado proteínico a distintos pHs

La solubilidad requiere de separación de moléculas del disolvente, en este caso agua, separación de moléculas de proteína y dispersión de las últimas en las primeras. Esta propiedad depende fundamentalmente del pH; a valores de pH superiores o inferiores al punto isoelectrico (pI), la proteína arrastra una carga eléctrica positiva o negativa y las moléculas de agua pueden interaccionar con estas cargas, contribuyendo así a la solubilización.

En la figura 7 se muestran las curvas de solubilidad del concentrado proteínico del mero realizada a dos lotes, esto en función del pH en un rango de 1 a 12. Ambas curvas presentaron una tendencia similar, el pI de esta proteína se encuentra en el intervalo de pH de 2 a 4, en esta zona las moléculas proteínicas exhiben interacciones mínimas con el agua, y sus cargas netas son lo suficientemente bajas como para permitir la formación de algunos agregados, lo que conduce a la precipitación (Fennema, 2000).

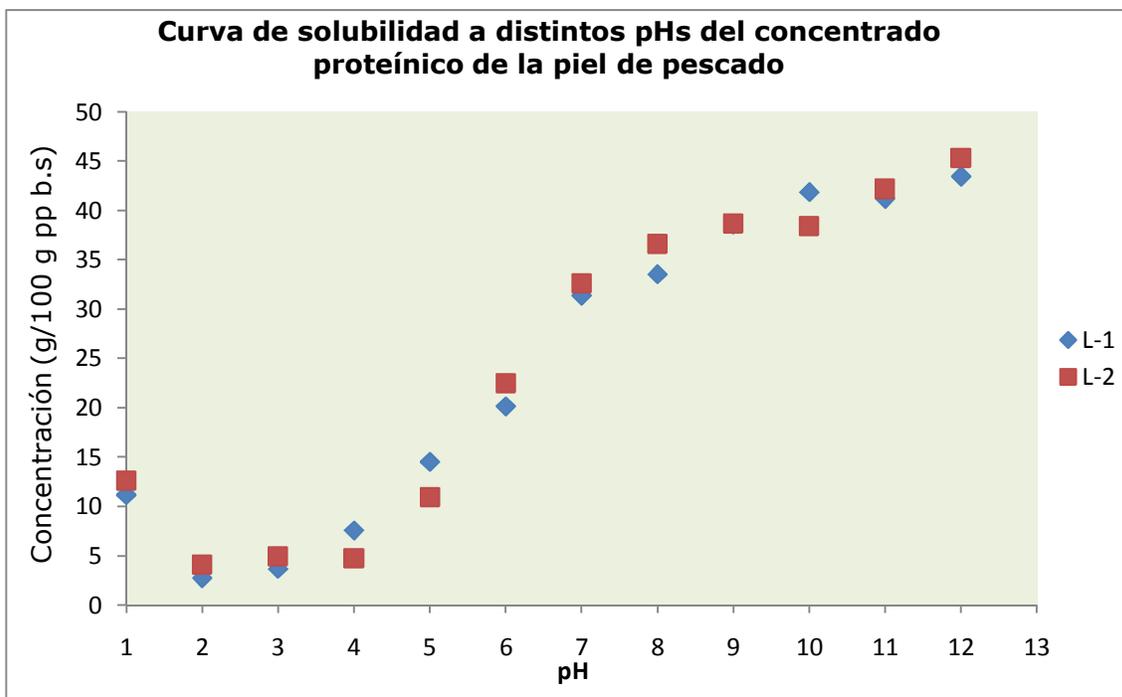


Figura 7. Curva de solubilidad al 3 % p/v del CP. Se reporta el porcentaje de proteína soluble determinado por el método de Lowry.

A medida que el pH aumenta, la solubilidad del concentrado proteínico incrementa, hay mayor número de cargas negativas, lo que permite una repulsión electrostática con el disolvente, encontrándose así el máximo de solubilidad a pH 11 y 12, con un porcentaje del 43.17% de solubilidad.

La finalidad de conocer la solubilidad de este CP fue establecer las condiciones de pH para la elaboración de películas, ya que una de las condiciones que se requieren para que éstas se formen es la solubilidad de la proteína en el disolvente utilizado; con los datos obtenidos en esta prueba se estableció un pH de 11.5 para su desarrollo.

3.3 Desarrollo de películas a partir del concentrado proteínico.

Con la finalidad de conocer si las proteínas de pesquería del género *Epinephelus* tienen la propiedad de formar películas, como aquellas extraídas de Sardina atlántica (*Sardina pilchardus*) (Cuq et al., 1995), Pargo Rojo (*Lutjanus vitta*) (Jongjareonral, Benjakul, Visessanguan, Prodpran, & Tanaka, 2006) y Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Paschoalick, Garcia, Sobral, & Habitante, 2003), entre otras; se decidió estudiar su formación utilizando 5% de proteína (5g CP/100 mL agua) y sorbitol como plastificante al 50 % (50 g/100g proteína) (Sobral et al., 2001).

Con esta formulación fue posible la formación de las películas (Figura 8), sin embargo estas no presentaron características apropiadas para las evaluaciones posteriores, ya que en el momento de desprenderlas de la superficie de secado se quebraban con facilidad, mostrando una flexibilidad deficiente.



Figura 8. Película elaborada con 5% p/v de CP y 50 % p/p de sorbitol como plastificante

La flexibilidad de las películas está determinada principalmente por la interacción entre proteína-proteína y proteína-agua, las cuales pueden estar controladas por la concentración y el tipo de plastificante, ya que éste reduce las interacciones intermoleculares entre las cadenas adyacentes del biopolímero, incrementando la movilidad de las moléculas y aumentando la flexibilidad de las películas, previniendo la ruptura de éstas durante su manejo y almacenamiento (Paschoalick et al., 2003).

En esta parte experimental se demuestra que las proteínas de la piel de Mero, poseen la capacidad de ser formadoras de películas, creando una red tridimensional ordenada, en la cual quedan retenidos el plastificante y el agua.

3.3.1 Evaluación de la influencia de la variación del tipo y concentración de plastificantes.

El objetivo principal de esta parte experimental es seleccionar las películas con mejores propiedades de formación, por lo tanto se decidió evaluar el efecto del tipo y concentración del plastificante sobre la formación de éstas, ya que éste tiene un papel importante al ser insertado dentro de las matriz polimérica (Rodríguez, Osés, Ziani, & Maté, 2006).

Los plastificantes estudiados fueron glicerol y sorbitol al 50 y 75 % p/p con respecto al peso de la proteína, utilizando 5% p/v del concentrado proteínico.

Tabla 8. Efecto de la variación y tipo de plastificante sobre la formación de las películas elaboradas con CP de piel de pescado Mero.

Concentrado proteínico	Tipo de plastificante	Concentración del plastificante % (g/100 g CP)	Formación de película	Observaciones
(5gCP/100 mL)	Sorbitol	50♣	Si	Película opaca, rígida, ligeramente quebradiza
		75♠	Si	Es muy fácil separarla de la superficie de secado, es poco brillante, y muy flexible.
	Glicerol	50♦	Si	Dificultad al despegarla después del secado, pegajosa y fácil de deshacer.
		75♠	No	No fue posible despegarla del área de secado
(4gCP/100 mL)	Glicerol: Sorbitol	15:15*	Si	Se desprende fácilmente de la superficie, con un ligero brillo y poca flexibilidad.

*Sobral et al., 2001

♠Jardón, H.G., 2007

♦Limpisophon et al., 2009

♣Vanin et al., 2005

En la tabla 8 se observan las características de las películas estudiadas, en las formulaciones en las que se empleó sorbitol se observa que las películas con 50% p/p de este plastificante, eran rígidas, quebradizas y muy poco flexibles por la falta de plastificante, a diferencia de las películas con 75% sorbitol (Figura 9), las cuales eran flexibles, fáciles de desprender del área de secado y con una elasticidad aceptable para manejarlas sin que sufrieran alguna ruptura; el alto contenido de plastificante que se requiere para elaborar este material indica que la fuerza de atracción intermolecular de las proteínas que forman esta red tridimensional, mediante puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, es muy grande ya que se requiere de mayor cantidad de plastificante para disminuir los enlaces de la matriz polimérica (Vanin et al., 2005).



Figura 9. Película elaborada con 5 % p/v CP y 75 % p/p sorbitol.

También fue posible formar películas con 50 % p/p de glicerol, sin embargo éstas presentaron dificultad al desprenderlas del área de secado, ya que eran pegadizas y se deshacían con facilidad. En la formulación que se empleó 75% p/p de glicerol no fue posible la formación de las películas, esto fue por un exceso de plastificante el cual provocó que permanecieran humectadas por muchos días sin posibilidad de desprenderlas de las superficie donde se encontraban.

La concentración de plastificante que se requiere para formar películas con características aceptables depende del tipo de plastificante que se utilice, ya que las películas de proteínas de ésta pesquería necesitaron de mayor concentración de sorbitol que de glicerol para su formación.

La diferencia en el efecto que provocaron estos plastificantes sobre la formación de las películas, se atribuye a que las moléculas de glicerol tienen un peso molecular menor que el sorbitol, lo cual provoca que puedan ser incorporadas con mayor facilidad a la matriz polimérica y por

lo tanto tengan un mayor efecto sobre la formación de las películas (Bourtoom et al., 2006).

Buscando una formulación adicional que cumpliera con las características de formación y manejabilidad aceptables para su posterior evaluación, se realizó una prueba independiente en la que se utilizó 4% p/v de CP y una mezcla de plastificantes 15:15% p/p glicerol:sorbitol (Vanin et al., 2005). Estas películas se formaron y fueron desprendidas con facilidad del área de secado, sin embargo fueron menos maleable y flexibles que las películas con 75% p/p sorbitol (5% CP), atribuido a la menor concentración de plastificante.

La finalidad de esta parte experimental fue seleccionar las películas con mejores propiedades de formación, para posteriormente modificarlas al incorporarles sales de calcio (CaSO_4 y CaCl_2) y glucono- δ -lactona (GDL) (Park et al., 2001) que tienen como propósito mejorar sus propiedades mecánicas y de barrera.

Las películas seleccionadas para ser modificadas fueron las de 5% p/v de concentrado proteínico utilizando 75% p/p de sorbitol como plastificante (5% CP/sorbitol), y las películas formadas con 4% p/v de CP empleando mezcla de plastificantes, glicerol y sorbitol al 15:15% p/p (4% CP/glicerol:sorbitol).

Las modificaciones se realizaron agregando sales de calcio y GDL (0.1, 0.2 y 0.3 % p/p) a la solución formadora de películas, para posteriormente realizarles pruebas de permeabilidad al vapor de agua, permeabilidad al oxígeno y pruebas de fractura a la extensión.

3.4 Evaluación de las propiedades de barrera.

3.4.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).

Una de las propiedades de barrera de una película es la permeabilidad al vapor de agua. La permeabilidad es la propiedad que tienen las películas, de permitir el paso de fluidos, ya sean gases, vapores o líquidos a través de su estructura molecular.

Existen dos mecanismos generales para la transferencia de gases y vapores, por permeación a través de materiales de empaque: Flujo capilar y difusión activa; el primero implica el movimiento de pequeñas moléculas a través de medios porosos o con perforaciones. La difusión activa comprende básicamente tres etapas: Adsorción, cuando la moléculas se solubiliza en la superficie de la película expuesta a la región de mayor concentración; difusión, que se da por un movimiento al azar de las moléculas a través de la matriz de la película por efecto de un gradiente de concentración y la desorción, donde la molécula se evapora en la superficie opuesta a la adsorción.

La PVA se ve afectada directamente por varios factores, dentro de los que se encuentran: La proteína, el contenido mayor de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica evitará la migración de agua; tipo y concentración de plastificante, y la humedad relativa (Olivas et al., 2007).

La permeabilidad al vapor de agua fue determinada a las películas con mejores propiedades de formación, éstas fueron las elaboradas con 5% p/v de concentrado proteínico utilizando 75% p/p de sorbitol como plastificante (5% CP/sorbitol), y las películas formadas con 4% p/v de

CP empleando glicerol y sorbitol al 15:15% p/p (4% CP/glicerol:sorbitol), siendo designadas como películas control.

La permeabilidad también fue determinada a las películas antes mencionadas modificadas con CaSO_4 , CaCl_2 y GDL (0.1, 0.2 y 0.3 % p/p). Al observar que la permeabilidad disminuía a menores concentraciones de sulfato de calcio, se decidió incluir una nueva formulación, adicionando 0.05% de CaSO_4 , para evaluar su efecto ante la PVA.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de la formulación 5% CP/sorbitol; se observa que el CaCl_2 disminuye la PVA de éstas películas, y que a mayor concentración de esta sal el efecto es mayor, disminuyendo la PVA de 0.164 ng/Pa*s*m (película control) hasta 0.094 ng/Pa*s*m (modificada con 0.3% de CaCl_2). Al comparar los valores obtenidos de estas películas con los resultados de las películas modificadas con CaSO_4 , se observa que esta última tiene mayor impacto sobre la PVA, ya que a menor concentración de CaSO_4 la PVA es menor, disminuyendo en una cifra significativa la permeabilidad con respecto a la control y a las modificadas con CaCl_2 , siendo las de 0.05% de CaSO_4 las que presentaron menor PVA, con un valor 0.024 ng/Pa*s*m (Figura 10).

Esto indica que para obtener un resultado similar al obtenido con el CaSO_4 , quizás se requiera aumentar la concentración de CaCl_2 .

Park et al. (2001) quienes experimentaron con películas de proteínas de soya, reportaron que las películas que fueron modificadas con CaSO_4 lograron disminuir la PVA significativamente, sin embargo las modificadas con CaCl_2 no mostraron un decremento significativo respecto a las películas control; explicando que el pH (pH 9.0) de la solución formadora de películas que contenía las sales de calcio se

encontraba por arriba del punto isoeléctrico de las proteínas, predominando las cargas negativas de la cadena polimérica, principalmente de los grupos carboxilo ($-\text{COO}^-$) los cuales permitían la unión con los cationes divalentes de Ca^{2+} , formando una red tridimensional con mejor interacción y estabilidad que sin estas sales. Estas interacciones iónicas no solo reducen la movilidad de segmentos de proteínas, sino también incrementan la hidrofobicidad de éstas, ya que al haber interacción entre el Ca^{2+} y los grupos carboxilos cargados negativamente, previenen que estos últimos interactúen con el agua, reduciendo la solubilidad de las proteínas y así la permeabilidad al vapor de agua a través de la matriz polimérica.

La diferencia entre el efecto que causa el CaCl_2 y el CaSO_4 sobre la permeabilidad al vapor de agua de las películas de CP de piel de pescado, se puede explicar mediante la serie de Hofmeister, la cual está más asociada con los aniones como el Cl^- y SO_4^{2-} , que con los cationes, ya que algunos comportamientos físicos que obedecen a esta serie están asociados con la estabilidad de las proteínas, interacciones proteína-proteína y cristalización de éstas (Zhang & Paul, 2006).

Esta serie fue desarrollada originalmente como una medida de la eficiencia de varios aniones para precipitar proteínas globulares; el efecto de los iones normalmente está relacionada con la posición que ocupan en esta serie ($\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^-$); mostrando que el ion sulfato provoca una mayor estabilidad de las proteínas y menor solubilidad de éstas, como resultado de una mayor atracción proteína-proteína, que el ion cloruro (Curtis et al., 2006).

El mayor efecto que causa el CaSO_4 que el CaCl_2 sobre la PVA de las películas de proteínas, puede ser atribuido a que el ión SO_4^{2-} secuestra con mayor facilidad las moléculas de agua presentes en el medio,

previniendo la formación de enlaces de hidrógeno en la superficie de las proteínas, y por lo tanto las proteínas prefieran formar interacciones intermoleculares entre ellas mismas (Curtis et al., 2006), resultando en una efectiva interacción proteína-proteína que conlleve a la menor solubilidad de éstas y por lo tanto a una menor difusión del agua a través de la matriz proteínica.

Las películas 5% CP/sorbitol modificadas con Glucono- δ -lactona, también lograron disminuir la PVA en una cifra significativa con respecto a las películas sin ninguna modificación, los valores resultantes de esta determinación fueron de 0.034, 0.032 y 0.031 ng/Pa*s*m para las de 0.1, 0.2 y 0.3 % de GDL respectivamente (tabla 9), no mostrando diferencia significativa entre los valores obtenidos (Figura 10).

El GDL es un éster cíclico, gradualmente hidrolizado en agua para formar ácido glucónico, ampliamente utilizado en la industria alimentaria como un acidulante (Trop & Kushelevsky, 1985).

El resultado de la disminución de la permeabilidad al vapor de agua de las películas modificadas con GDL puede deberse a un incremento en la hidrofobicidad e insolubilización de éstas (Park et al., 2001), atribuido a que los grupos carboxilos cargados negativamente disminuyen por la acción de los protones producidos por el GDL, por lo tanto las moléculas de proteínas neutralizadas pueden agregarse debido a la disminución de la repulsión electrostática (Dybowska & Fujio, 1998), además de prevenir que estos grupos carboxilos interactúen con el agua.

Tabla 9. Permeabilidad al vapor de agua de películas CP de pescado mero: películas control (5% CP/sorbitol y 4% CP/Glicerol:sorbitol) y películas modificadas.

TIPO DE PELÍCULA			Espesor de la película (m)	PVA (ng/Pa*s*m)
Concentrado De proteína	Plastificante	Modificación (% p/p)		
Concentrado proteínico de piel de pescado mero 5%(p/v)	Sorbitol 75%(p/p)	----- (control)	3.26E-04 ± 1.70E-05	0,164 ^a ± 7,23E-05
		CaCl ₂ 0.1%	3.39E-04 ± 1.96E-05	0,132 ± 8,10E-03
		CaCl ₂ 0.2%	2.14E-04 ± 2.65E-05	0,122 ± 9,22E-03
		CaCl ₂ 0.3%	3.10E-04 ± 6.26E-05	0,094 ± 7,28E-03
		CaSO ₄ 0.05%	2.76E-04 ± 2.79E-05	0,024 ^b ± 2,34E-03
		CaSO ₄ 0.1%	3.64E-04 ± 3.59E-05	0,039 ^c ± 2,22E-03
		CaSO ₄ 0.2%	2.72E-04 ± 8.75E-05	0,049 ± 4,00E-05
		CaSO ₄ 0.3%	3.13E-04 ± 1.47E-05	0,071 ^b ± 3,94E-03
		GDL 0.1%	2.06E-04 ± 2.08E-05	0,034 ^c ± 1,00E-03
		GDL 0.2%	2.35E-04 ± 4.61E-05	0,032 ^c ± 1,09E-03
		GDL 0.3%	2.69E-04 ± 3.52E-05	0,031 ^c ± 9,20E-04
Concentrado proteínico de piel de pescado 4% (p/v)	Glicerol:Sorbitol 15:15% (p/p)	----- (control)	1.80E-04 ± 1.76E-05	0,158 ^a ± 6,91E-03
		CaSO ₄ 0.05%	2.28E-04 ± 2.27E-05	0,053 ± 1,70E-03
		GDL 0.1%	1.70E-04 ± 1.96E-05	0,033 ^c ± 2,30E-03

a-c Letras iguales significa que no hay diferencia significativa entre una formulación y otra

Las películas de 5% CP/sorbitol que presentaron menor permeabilidad al vapor de agua fueron la modificadas con 0.05% de CaSO_4 y las formulaciones modificadas con GDL (0.1, 0.2 y 0.3 %), éstas últimas no presentaron diferencia significativa en los valores obtenidos.

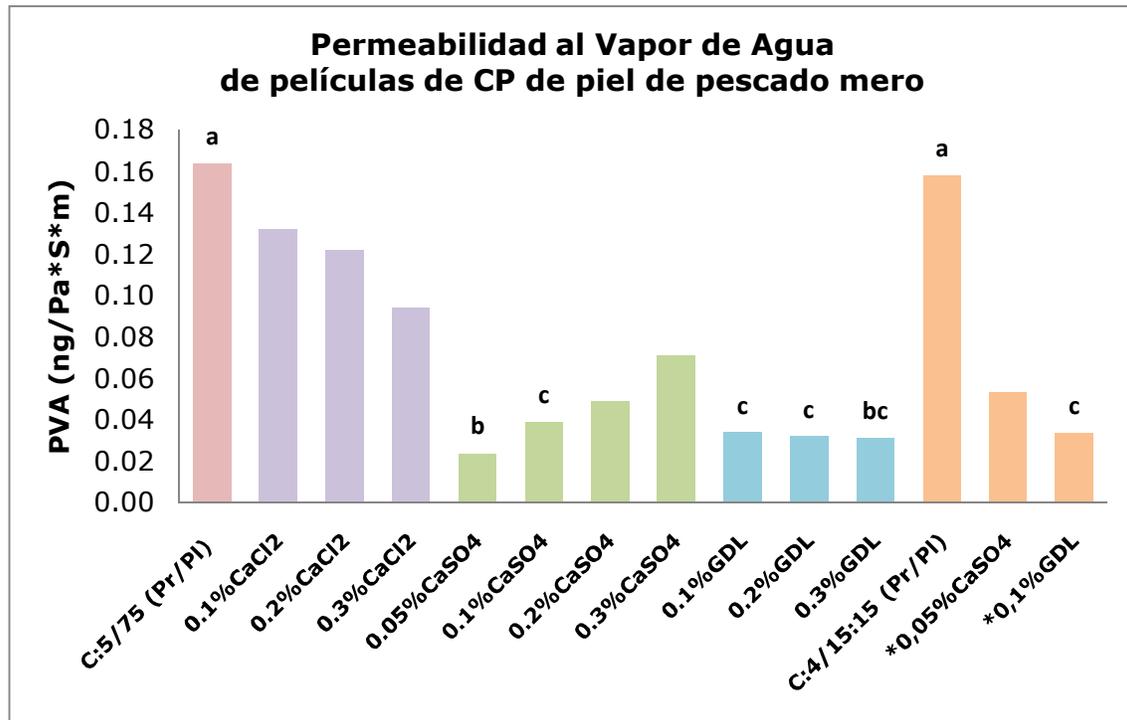


Figura 10. Permeabilidad al vapor de agua de películas 5% CP/sorbitol (C:5/75 (Pr/PI)) y 4% CP/glicerol:sorbitol*(C:4/15:15 (Pr/PI)) y sus respectivas modificaciones con CaCl_2 , CaSO_4 y GDL (*a-c* letras iguales indican que no hay diferencia entre formulaciones).

Con la finalidad de saber si las modificaciones con sales de calcio y GDL tendrían el mismo efecto sobre la PVA al cambiar la concentración de proteína y plastificante en las películas, fueron realizadas dos modificaciones a las películas de 4% CP/glicerol:sorbitol, utilizando la sal y su respectiva concentración que tuvo mayor efecto sobre la PVA en las películas 5% CP/sorbitol (0.05% CaSO_4 y 0.1 % GDL).

Los resultados obtenidos también se muestran en la tabla 9, la PVA de las películas control (4% CP/glicerol:sorbitol) fue de 0,158ng/pa*s*m, aunque es un valor menor al de las películas control de 5% CP/sorbitol no existe diferencia significativa entre estas dos formulaciones, esto quizá se deba a que a pesar de que la formulación 4% CP/glicerol:sorbitol posee menor concentración de proteína, también contiene menor cantidad de plastificante, lo cual provoca interacciones similares al de las películas con 5% CP/sorbitol.

Las películas de 4% CP/glicerol:sorbitol modificadas con 0.05% de CaSO_4 y 0.1 % de GDL, disminuyeron considerablemente la permeabilidad al vapor de agua con respecto a su control, presentando valores de 0.053 ng/Pa*s*m para sulfato de calcio y de 0.033 ng/Pa*s*m para GDL.

Comparando los resultados de todas las películas analizadas, se determinó que las películas con mejor propiedad de barrera contra el vapor de agua fueron: Las de 5% CP/sorbitol modificadas con 0.05% de CaSO_4 , y las modificadas con GDL a distinta concentración, independientemente de la concentración de proteína y plastificante utilizados en este experimento (Tabla 10).

En la tabla 10 se muestran valores de PVA reportados en la literatura de algunas películas en las cuales se emplearon sorbitol o glicerol como plastificante; de películas de soya modificadas con CaCl_2 , CaSO_4 y GDL; además de mostrar los valores de PVA de películas sintéticas (LDPE, PE y PVC).

Las películas de soya también tuvieron un efecto positivo sobre la PVA al ser modificadas con sales de calcio y GDL (Park et al., 2001), sin embargo se observa en la tabla 10 que los valores de PVA son mucho

mayores que los que se obtuvieron con las películas de CP de piel de pescado Mero. Al igual que las películas analizadas en este estudio, las de soya modificadas con CaCl_2 presentaron un efecto deficiente sobre esta propiedad de barrera; siendo las de GDL a una concentración de 0.3 % las que presentaron una menor PVA para las películas de soya, misma consecuencia que con las películas 5% CP/sorbitol.

Tabla 10. Permeabilidad al vapor de agua de películas de proteínas de otras fuentes.

TIPO DE PELÍCULA		Espesor de la película (m)	PVA (ng/pa*s*m)
Concentrado De proteína			
Concentrado Proteínico de Soya ^a	-----	8,4E-05 ± 8.2 E-06	2.46 ^a ± 0.31
	CaCl ₂ 0.3%	1.28 E-04 ± 6.3 E-06	2.12 ^a ± 0.23
	CaSO ₄ 0.3%	1.24 E-04 ± 5.6 E-06	1.73 ^b ± 0.21
	GDL 0.3%	9.8 E-05 ± 4.7E-06	1.43 ^c ± 0.24
Proteínas de la piel del pez Salmón rosa de Alaska (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>) ^b		-----	0,169 ± 0.028
Proteínas extraídas de desechos de surimi ^c		-----	0.923
Proteínas del pez Marlin azul (<i>Makaira mazara</i>) ^d		-----	0.119
Películas Sintéticas ^e	LDPE	-----	0.002 ± 0.0006
	PE	-----	0.0198 ± 0.0015
	PVC	-----	0.0002 ± 0.0000
CP de piel de pescado mero 5% (p/v) (75% Sorbitol)	CaSO ₄ 0.05%	2.76E-04 ± 2.79E-05	0.024 ± 2.34E-03
	GDL 0.3%	2.69E-04 ± 3.52E-05	0.031 ± 9.20E-04
CP de piel de pescado mero 4% (p/v) (15:15 % Glicerol:Sortitol)	GDL 0.1%	1.70E-04 ± 1.96E-05	0.033 ^c ± 2.30E-03

LDPE: Polietileno de baja densidad, PE: poliestireno, PVC: Cloruro de polivinilo.

a Park et al., 2001

b Chiou et al., 2009

c Bourtoom et al., 2006

d Tanaka et al., 2001

e Shiku et al., 2003

La permeabilidad al vapor de agua de las películas de CP de pescado Mero sin ninguna modificación fueron del mismo orden de magnitud que las películas de proteínas de otras pesquerías, por ejemplo la PVA de películas hechas a base de proteínas de piel de salmón rosa de Alaska

fue de 0.169 ng/pa*s*m (Chiou, Avena-Bustillos, Bechtel, Imam, Glenn, & Orts, 2009), muy similar a la formulación 5% CP/sorbitol (control), la cual fue de 0.164 ng/pa*s*m; sin embargo los valores obtenidos para las películas modificadas con CaSO₄ y GDL son menores en uno o dos órdenes de magnitud comparados con los de películas a base de otros concentrados proteínicos, reportados en la tablas 10.

La PVA de películas de polímeros sintéticos, a excepción del poliéster, sigue siendo menor en uno o dos órdenes de magnitud, comparado con las películas modificadas en este estudio.

Estas modificaciones indican un gran avance y ventaja si se aplican como protectoras de alimentos, ofreciendo una mayor resistencia a la migración de agua hacia la matriz que están cubriendo, que aquellas películas que son elaboradas solamente con proteína y plastificante.

3.4.2 Permeabilidad al oxígeno (PO₂)

El gas de mayor importancia en alimentos es el oxígeno, dado que la vida útil de muchos productos perecederos es afectada por la presencia o ausencia de este gas; juega un papel crucial en la vida de anaquel de los alimentos, ya que es el responsable de la mayoría de las reacciones de oxidación, participa en el desarrollo de microorganismos, cambios de color en el alimento, y en la respiración de frutas y vegetales (Robertson, 2006). Por lo tanto la permeabilidad al oxígeno de las películas de proteínas es un aspecto fundamental para establecer su funcionalidad como protectoras de alimentos.

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

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos de permeabilidad al oxígeno de las películas de pescado Mero, así como la PO₂ de películas de otras fuentes de proteína y las de polietileno de baja densidad (LDPE).

Tabla 11. Permeabilidad al oxígeno de las películas elaboradas con CP piel de pescado Mero y de otras películas de origen proteínico y sintético.

Tipo de película	Plastificante (g/gProteína)	Permeabilidad al oxígeno (cm ³ µm/m ² dkPa)
Concentrado Proteínico de pescado Mero (<i>Epinephelus marginatus</i>)		No hay PO en 24h
Abadejo de Alaska (<i>Theragra chalcogramma</i>)	Glutaraldehído 0.50(g/g)	3.608±0.990 [▼]
Salmon Rosa de Alaska (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>)	Glutaraldehído 0.50(g/g)	4.145±0.536 [▼]
Concentrado de proteína de chíá	Glicerol50% (p/p)	17.79 [♣]
Concentrado de proteína de semilla de limón	Glicerol50% (p/p)	19.37 [♣]
Proteína de Soya	-----	47.6±9.5 [•]
Plástico Ziploc (LDPE)	---	57.85 [▼]

▼ Chiou et al., 2008

♣ Alvarado S., 2008

• Denavi et al., 2009

Como se observa en la tabla 11, en la evaluación de PO₂ de las películas de CP de pescado Mero, no se encontró permeabilidad al oxígeno en un tiempo de 24 horas a una presión de 20 psi, equivalentes a 1.36 atm.

La excelente propiedad de barrera contra el oxígeno de estas películas se puede atribuir a la formación de una matriz homogénea por medio de las proteínas que la componen, con suficientes interacciones

intermoleculares, como puentes de hidrógeno e interacciones iónicas (COO^- con Ca^{2+}) las cuales impiden la movilidad de las cadenas polipeptídicas, además de escasos sitios de disolución para la molécula de O_2 y por lo tanto una difícil difusión de éstas moléculas a través de la matriz polimérica (Tihminlioglu, Atik, & Özen, 2010).

Polímeros con buena barrera al oxígeno son aquellos que tienen valores de PO_2 inferiores a $38.9 \text{ cm}^3 \mu\text{m}/\text{m}^2 \text{dkPa}$ a 23°C (Hong & Krochta, 2006); como ya se mencionó anteriormente las películas de CP de pescado Mero resultaron ser excelentes barreras al oxígeno ya que no fueron permeables a este gas.

En general las películas a base de proteínas se han reportado como buenas barreras al oxígeno. Como se observa en la tabla 11, la PO_2 que se reporta para películas de diversas proteínas es inferior a $38.9 \text{ cm}^3 \mu\text{m}/\text{m}^2 \text{ d kPa}$; siendo las proteínas de Abadejo y Salmón rosa de Alaska (Chiou et al., 2009), con valores de $3.608 \pm 0.990 \text{ cm}^3 \mu\text{m}/\text{m}^2 \text{ d kPa}$ y $4.145 \pm 0.536 \text{ cm}^3 \mu\text{m}/\text{m}^2 \text{ d kPa}$ respectivamente las que presentan menor PO_2 en comparación con las proteínas de Chía y limón.

Por último se observa que la permeabilidad de las películas sintéticas a base de LDPE, presentan una alta PO_2 ($57.85 \text{ cm}^3 \mu\text{m}/\text{m}^2 \text{ d kPa}$), ya que esta supera en gran medida a lo estipulado como un polímero con buena barrera al oxígeno.

Los resultados obtenidos en esta parte experimental llevan a la conclusión que estas películas pueden ser una estupenda alternativa como empaques de alimentos, ayudando a incrementar la vida de anaquel del alimento para el cual será empleado.

3.5 Evaluación de las propiedades mecánicas.

3.5.1 Prueba de fractura a la extensión.

Las propiedades mecánicas de las películas protectoras de alimentos proporcionan una indicación de la integridad de la película bajo condiciones de estrés, que pudiera ocurrir durante la transformación, manipulación, y el almacenamiento.

La fuerza de fractura a la extensión es un fenómeno complicado, desde el punto de vista de la alteración que sufre la estructura de la materia. En la figura 11 se describe de manera global el comportamiento del material frente a fuerzas que provocan deformación, exponiendo las características del flujo plástico en un ensayo de tensión.

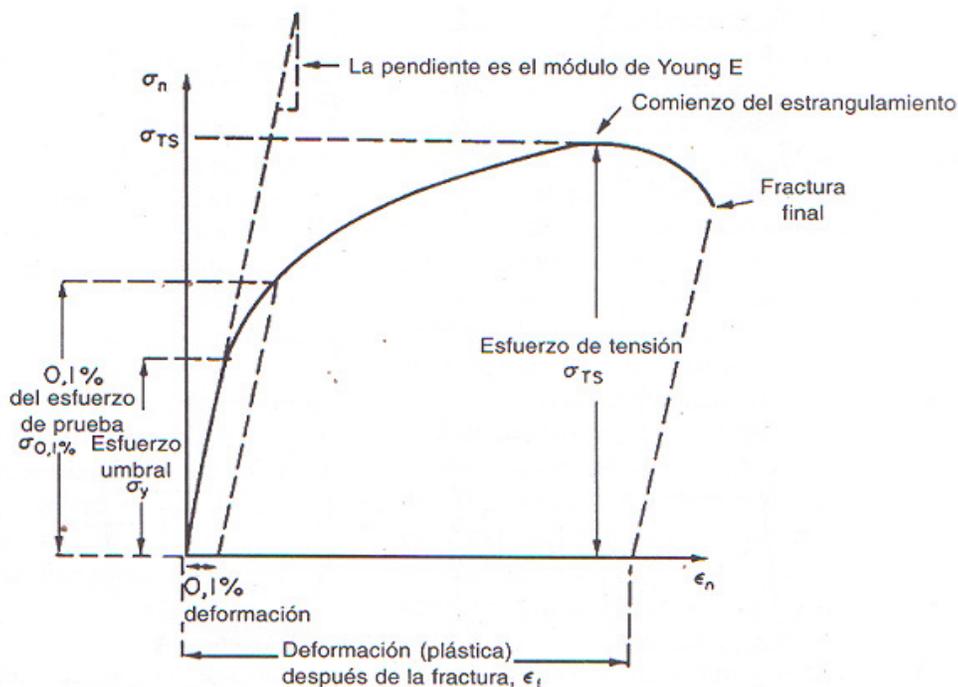


Figura 11. Representación grafica Esfuerzo-Deformación

La linealidad, llamada módulo de Young o módulo elástico, significa que el material se está comportando elásticamente, o que retornará a sus dimensiones originales si se elimina la fuerza; mas allá de éste límite elástico aparente (desvío de la linealidad), el material se deforma plásticamente, y al eliminar la fuerza, el material no retorna a sus dimensiones originales, permaneciendo estirado o deformado permanentemente.

Finalmente se llega al punto en que 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.

En la Figura 12 y 13 se muestran ejemplos del comportamiento de películas elaboradas con CP de piel de pescado ante una fuerza de tensión. Al inicio se puede observar el comportamiento lineal, en el cual es calculado el Módulo de Young; posteriormente las películas son deformadas plásticamente, y finalmente llega al punto en que el material se fractura, esfuerzo verdadero máximo que la película puede soportar.

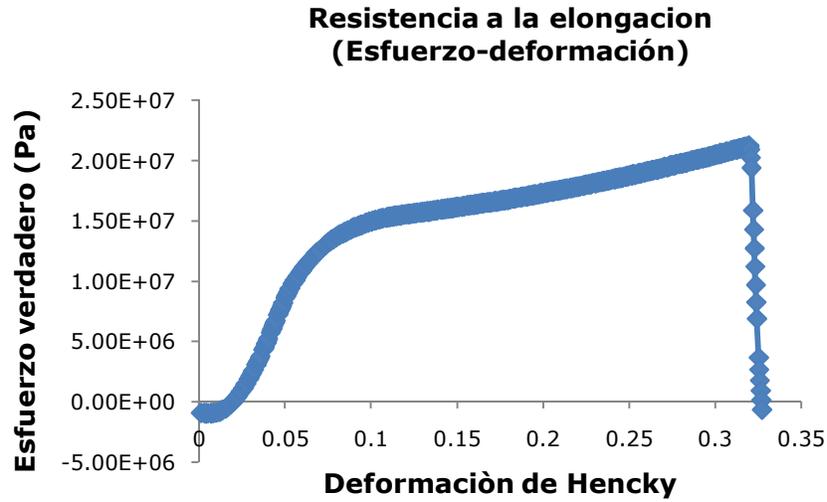


Figura 12. Comportamiento de una de las películas elaborados con CP de piel de pescado mero (película control, 5% CP/Sorbitol).

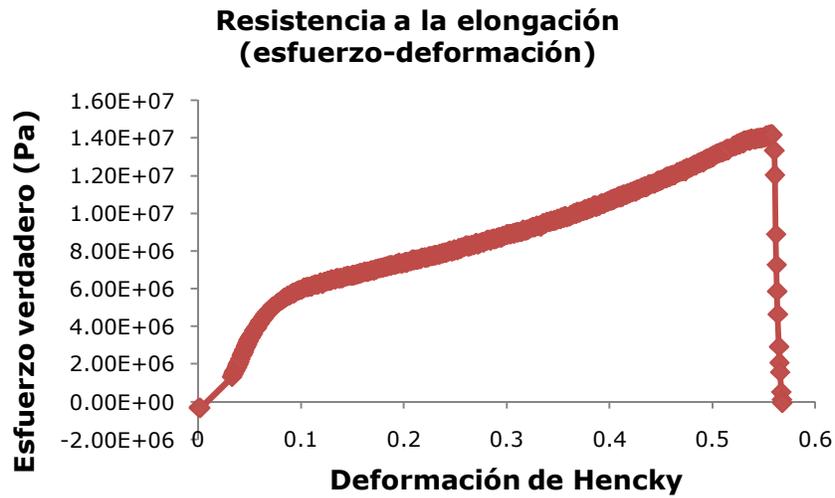


Figura 13. Comportamiento de una de las películas elaborados con CP de piel de pescado mero (película control, 4% CP /glicerol:sorbitol).

En la tabla 12 se muestran las propiedades mecánicas obtenidas en la prueba de extensión de las películas de CP de pescado mero.

Tabla 12. Propiedades mecánicas de extensión de películas de CP de pescado mero, películas control y modificadas.

TIPO DE PELICULA			PROPIEDADES MECANICAS DE EXTENSION			
Concentrado De proteína	Plastificante	Concentración de Sal	Esfuerzo verdadero (MPa)	Deformación de fractura	Módulo de Young (MPa)	Porcentaje de elongación
Concentrado proteínico de piel de pescado 5% (p/v)	75% Sorbitol (p/p)	-----	1,785 ^a ± 0.304	1,028 ^b ± 0.136	20,298 ^{ab} _c ± 1.024	159,765 ^a ± 4.202
		0.1% CaCl ₂	2,964 ^a ± 0.513	1,158 ^b ± 0.181	7,619 ^d ± 0.743	222,088 ^b ± 60.136
		0.2% CaCl ₂	7,444 ^b ± 1.464	1,103 ^{bc} ± 0.215	17,675 ^{ad} _e ± 2.485	232,500 ^b ± 36.150
		0.3% CaCl ₂	7,452 ^b ± 1.273	0,773 ^{de} ± 0.601	29,666 ^b ± 1.903	117,052 ^{cd} ± 13.041
		0.05% CaSO ₄	4,790 ^c ± 0.151	0,960 ^{cf} ± 0.042	27,414 ^{be} ± 1.550	153,527 ^a ± 4.192
		0.1% CaSO ₄	5,235 ^c ± 0.287	0,851 ^{df} ± 0.115	21,950 ^{be} _{fg} ± 2.507	149,452 ^{ac} ± 13.521
		0.2% CaSO ₄	2,392 ^a ± 0.102	0,857 ^{dfg} ± 0.009	11,764 ^{cd} _f 0.403	135,791 ^{cae} ± 2.092
		0.3% CaSO ₄	2,458 ^a ± 0.220	0,811 ^{def} ± 0.143	11,136 ^{cd} _g ± 2.076	139,85 ^{acf} ± 24.317
		0.1% GDL	17,784 ^d ± 0.085	0,687 ^e ± 0.003	88,127 ± 2.218	98,747 ^d ± 0.498
		0.2% GDL	11,721 ^e ± 0.344	0,776 ^{eg} ± 0.016	56,219 ± 0.596	117,383 ^{efd} ± 3.492
0.3% GDL	14,513 ± 1.149	0,263 ^a ± 0.007	144,724 ± 5.856	30,175 ^{gh} ± 0.898		
Concentrado proteínico de piel de pescado 4% (p/v)	15:15 % Glicerol: sorbitol (p/p)	-----	20,675 ± 1.452	0,633 ^e ± 0.022	126,93 ^h ± 9.786	88,508 ^d ± 3.107
		0.05% CaSO ₄	12,178 ^e ± 0.148	0,341 ^a ± 0.027	126,87 ^h ± 20.100	40,664 ^g ± 2.477
		0.1% GDL	19,1678 ^d ± 0.156	0,251 ^a ± 0.029	189,069 ± 2.774	34,636 ^h ± 5.486

Esfuerzo Verdadero

Los valores de esfuerzo verdadero obtenidos en esta prueba fueron mayores en las películas modificadas con GDL (5% CP/sorbitol) y en las de 4% CP/glicerol:sorbitol (Figura 14).

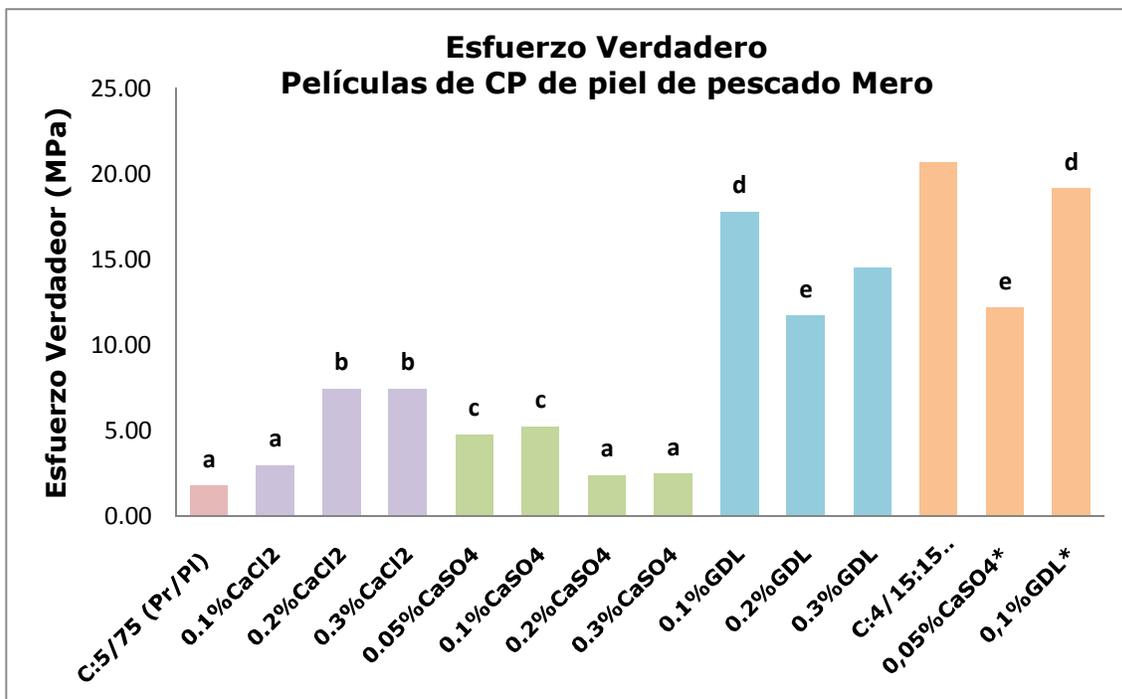


Figura 14. Esfuerzo verdadero (MPa) de películas 5% CP/sorbitol (C:5/75 (Pr/PI)) y 4% CP/glicerol:sorbitol* (C:4/15:15 (Pr/PI)) y sus respectivas modificaciones con CaCl_2 , CaSO_4 y GDL (*a-d* letras iguales indican que no hay diferencia entre formulaciones).

Para el caso de las películas con 5% CP/sorbitol, las que incrementaron considerablemente esta propiedad fueron las modificadas con GDL (0.1, 0.2 y 0.3 %), en las que se obtuvo valores entre 11.721 MPa y 17.784 MPa, este valor indica la fuerza requerida para fracturar al material, lo que sugiere una mayor interacción de las proteínas en las películas de GDL, respecto a las control (1.785 MPa) y a las modificadas con sales de calcio. Park et al. (2001) explican que el GDL promueve la agregación

de proteínas por el incremento de la hidrofobicidad y la insolubilización de éstas, promoviendo películas más resistentes pero menos flexibles.

En la formulación de 4% CP/glicerol:sorbitol, se observaron valores aún mayores que en las de GDL (5% CP/sorbitol), obteniendo el máximo esfuerzo verdadero en las películas control 4% CP/glicerol:sorbitol (20.675 MPa), esto se explica por una mayor interacción cadena-cadena de la proteínas, ya que la concentración de plastificante fue menor que en las películas 5% CP/sorbitol.

Módulo de Young

El modulo de Young fue determinado con la pendiente en la parte lineal de la curva esfuerzo-deformación, éste es un valor que indica la rigidez del material, y es expresado como la razón entre el esfuerzo y la deformación.

En la figura 15, se observa que las películas elaboradas con 4% CP/glicerol:sorbitol, requieren de una gran fuerza para ser deformadas, obteniéndose valores de 189.069 MPa en la formulación con 0.1 % de GDL, y de 126.930 y 126.871 MPa para la control y la modificada con 0.05 % de CaSO_4 respectivamente, no habiendo diferencia significativa en estos últimos valores; estas películas también mostraron valores elevados en el esfuerzo que se requiere para fracturarlas (esfuerzo verdadero), lo que nuevamente se atribuye a la menor concentración de plastificante, haciéndolas más rígidas.

Para el caso de las películas con 5% CP/sorbitol, modificadas con sales de calcio no se muestra un aumento considerable en el módulo de

Young, sin embargo se observa que la película modificada con 0.05% de CaSO_4 , la cual exhibió una menor permeabilidad al vapor de agua, presentó el mayor valor del módulo de Young (27.414 MPa) con respecto a su control y a las modificadas con sales de calcio; confirmando un mayor entrecruzamiento de las proteínas en esta formulación, lo cual la hace menos elástica que las otras modificadas con sulfato y cloruro de calcio.

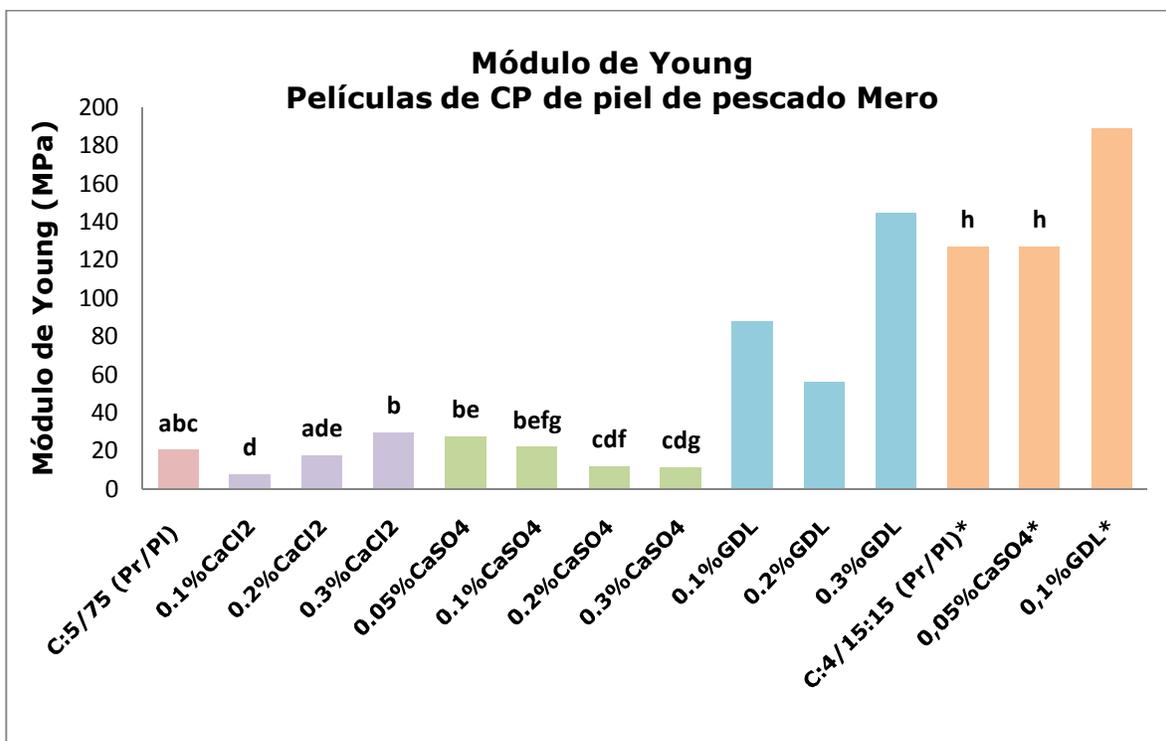


Figura15. Módulo de Young (MPa) de películas 5% CP/sorbitol (C:5/75 (Pr/PI)) y 4% CP/glicerol:sorbitol*(C:4/15:15 (Pr/PI)) y sus respectivas modificaciones con CaCl_2 , CaSO_4 y GDL (*a-h* letras iguales indican que no hay diferencia entre formulaciones).

Deformación de Hencky

La deformación está designada por un número puro, debido a que compara la forma del material antes y después de la deformación, es una característica importante, ya que si un material se puede estirar de manera considerable antes de romperse, indica que podrá sobrevivir a la carga que se le aplicó.

En la figura 16 se muestra la tendencia que tienen las películas de CP de pescado mero ante la deformación; como se ha observado en los parámetros determinados con anterioridad, las películas más rígidas que requieren mayor fuerza para que se logre un cambio irreversible en la película (Modulo Young) y mayor esfuerzo para fracturarlas, fueron las formulaciones a base de 4% CP/glicerol:sorbitol y las modificadas con GDL, 5% CP/sorbitol; estos valores van aunados a la deformación, ya que al ser películas con una rigidez mayor, por una mayor interacción entre las cadenas polipeptídicas, tiene menor movilidad de éstas cadenas y por lo tanto son menos susceptibles a deformarse; siendo las películas con 4%CP/glicerol:sorbitol modificadas con GDL y CaSO_4 las que presentaron menor deformación.

Las películas con mayor deformación antes de romperse fueron las modificadas con 0.1 y 0.2 % de CaCl_2 , obteniéndose valores de 1.158 y 1.103 respectivamente, esto indica que éstas películas tienen mayor volumen libre, lo cual permite que las cadenas poliméricas puedan ocupar esos espacios para poder ser deformadas.

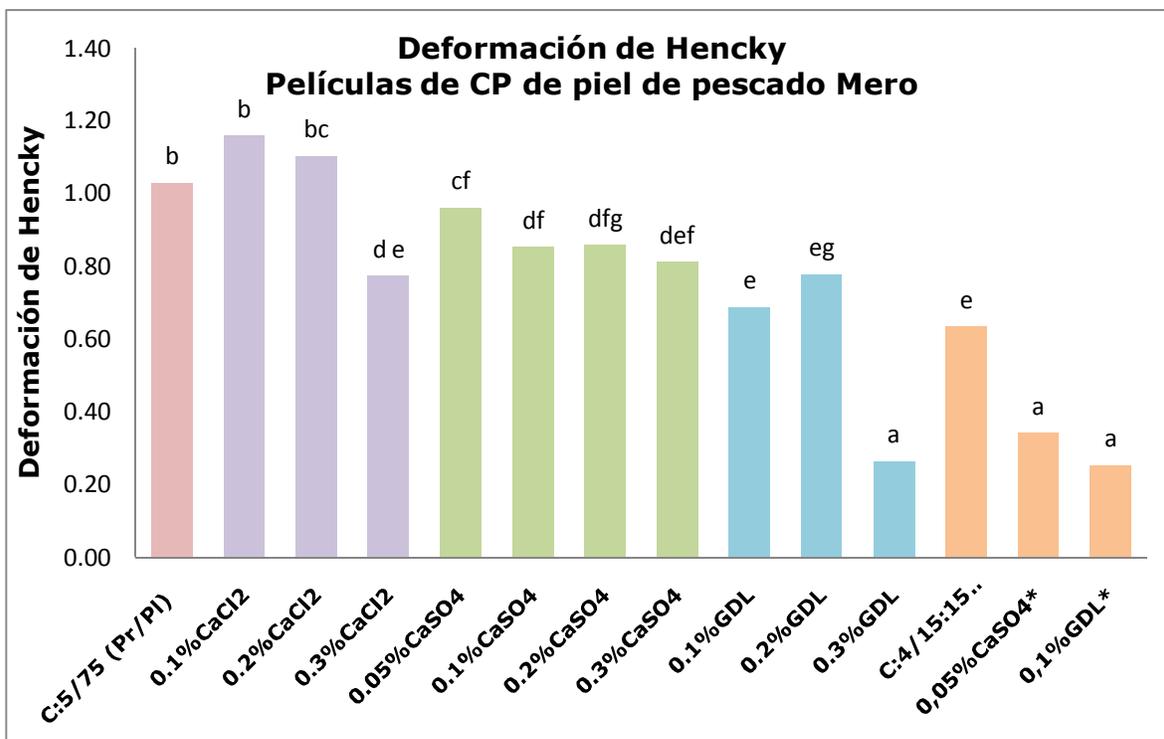


Figura 16. Deformación de Hencky de películas 5% CP/sorbitol (C:5/75 (Pr/PI)) y 4% CP/glicerol:sorbitol*(C:4/15:15 (Pr/PI)) y sus respectivas modificaciones con CaCl₂, CaSO₄ y GDL (*a-g* letras iguales indican que no hay diferencia entre formulaciones).

Porcentaje de Elongación

Al igual que la deformación, la elongación es un parámetro que nos indica la elasticidad de las películas, los valores registrados en la tabla 12 indican que las películas de 5%CP/sorbitol, son capaces de elongarse más del 100 %, obteniéndose el valor máximo de elasticidad de 232% de las películas con 0.2 % de CaCl₂, la cual no muestra diferencia significativa con la de 0.1% de CaCl₂ (Fig. 17).

El porcentaje de elongación de las películas con 4% CP/glicerol:sorbitol modificadas (0.1% GDL y 0.05% CaSO₄) fue inferior al de las películas control (88.50%), presentando valores de 34.36% para las de GDL y no mostrando diferencia significativa con las de 0.05% CaSO₄.

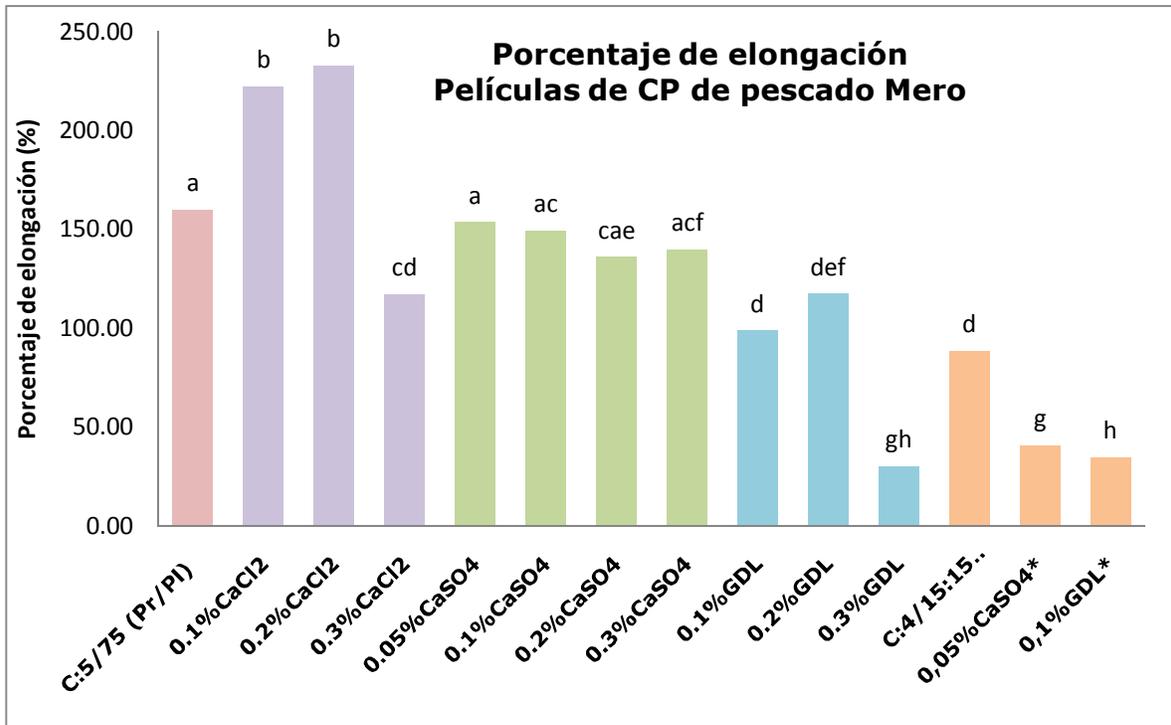


Figura 17. Porcentaje de elongación de películas 5% CP/sorbitol (C:5/75 (Pr/PI)) y 4% CP/glicerol:sorbitol* (C:4/15:15 (Pr/PI)) y sus respectivas modificaciones con CaCl₂, CaSO₄ y GDL (*a-g* letras iguales indican que no hay diferencia entre formulaciones).

Las películas que presentaron mayor esfuerzo verdadero para fracturarlas, mayor rigidez (Módulo de Young) y por lo tanto menor elongación fueron las formulaciones a base de 4% CP/glicerol:sorbitol y las modificadas con GDL (5% CP/sorbitol).

CONCLUSIONES

Se obtuvo un concentrado proteínico de piel de pescado del género *Epinephelus*, con un rendimiento de alrededor del 6% de proteína soluble con respecto a la proteína total en la piel.

Se logró la formación de películas a partir del concentrado proteínico, utilizando sorbitol como plastificante y ajustando la solución a pH de 11.5 .

Al estudiar el efecto del plastificante sobre la formación de las películas, se concluyó que las elaboradas con 5% CP y 75% sorbitol, fueron las que presentaron mejores propiedades de formación para ser modificadas.

Se logró la formación de películas disminuyendo a 4% la concentración de CP y utilizando una mezcla de 15% sorbitol y 15% glicerol como plastificantes, con propiedades aceptables para su modificación y evaluación.

El efecto de las diferentes concentraciones de CaSO_4 y GDL permitió disminuir hasta diez veces la permeabilidad al vapor de agua con respecto a las películas sin ninguna modificación, dando una alternativa de uso para proteger y mantener la calidad del alimento durante su almacenamiento.

Las películas de CP de pescado mero no presentaron permeabilidad al oxígeno, lo cual podría retardar el deterioro químico, físico y

microbiológico al ser empleadas como protectoras de alimentos, dando una buena alternativa en el uso de empaques biodegradables.

Las películas de proteínas de piel de pescado Mero fueron mejores barreras al vapor de agua y al oxígeno comparadas con películas de proteínas de otras fuentes naturales.

En pruebas de extensión las películas que exhiben mayor resistencia contra la fuerza de extensión son las modificadas con GDL (5% CP/sorbitol) y la formulación a base de 4% CP/glicerol:sorbitol, siendo las películas menos deformables y que confieran mayor resistencia a cambios físicos del alimento durante su manipulación.

En general las formulaciones a base de 5% CP y sorbitol como plastificante presentaron mayor elongación que las de 4% CP/glicerol:sorbitol.

Los resultados obtenidos hasta el momento permiten determinar que las películas modificadas con sales de CaSO_4 y GDL presentan excelentes propiedades de barrera y propiedades mecánicas aceptables, ofreciendo la posibilidad de ser protectoras de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

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

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.

Auras, R., Harte, B., & Selke, S. (2004). Effect of Water on the Oxygen Barrier Properties of Poly(ethylene terephthalate) and Polylactide Films. *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 1790–1803.

Avella, M., De Vlieger, J.J., Errico, M., & Fischer, S. (2005). Biodegradable Starch/clay nanocomposite Films for food Packaging applications. *Food Chemistry*, 93, 467-474.

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

Beltrán, D. (2006). Aprovechamiento de los productos pesqueros, Universidad Autónoma de Baja California, México. Pp. 34-36.

Bourtoom, T., Chinnan, M.S., Jantawat, P., & Sanguandeeikul, R. (2006). Effect of Plasticizer Type and Concentration on the Properties of Edible Film from Water-Soluble Fish Proteins in Surimi Wash-Water. *Food Science and Technology International*, 12, 119.

Cao, N., Yang, X., & Yuhua, F. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin film. *Food Hydrocolloids*, 23, 729-735.

Chiou, B.-S., Avena-Bustillos, R.J., Bechtel, P.J., Imam, S.H., Glenn, G.M., & Orts, W.J. (2009). Effects of drying temperature on barrier and mechanical properties of cold-water fish gelatin films. *Journal of Food Engineering*, 95, 327–331.

Cifuentes, L. (2000). El océano y sus recursos: pesquerías. Fondo de Cultura Económica, México, Pp. 130-138

CONAPESCA (2008): Anuario estadístico de acuacultura y pesca. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2008. (Consultado en Mayo de 2010).

Cuq, B., Aymard, C., Cuq, J., & Guilbert, S. (1995). Selected functional properties of Fish Myofibrillar Protein-based films as affected by hydrophilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 622-625.

Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S., & Guilbert, S. (1997). Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based film as affected by Hydrophilic Plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 622-626.

Curtis, R.A., & Lue, L. (2006). A molecular approach to bioseparations: Protein-protein and protein-salt interactions. *Chemical Engineering Science*, 61, 907-923.

Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., & Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 103-112.

Damodaran, S., & Paraf, A. D. (1997). *Food Proteins. An Overview. Food Proteins and their applications.* Marcel Dekker Inc, USA. Pp 529-545.

Daraba, A. (2008). Future trends in packing: Edible, biodegradable coats and films. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 9, 652-664.

FAO (2007): Departamento de pesca y acuacultura. <http://www.fao.org/fishery/statistics/es> (Consultado en Noviembre de 2009).

FAO (1999): FAO Documento técnico de pesca 348, El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. <http://www.fao.org/DOCREP/v7180s/v7180s02.htm#TopOfPage> (Consultado en Febrero de 2010)

Fennema, R. (2000). *Química de los alimentos.* 2ª ed., Acribia S.A., España. Pp. 414-433.

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

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

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

Jamilah, B., & Harvinder, K.G. (2002). Properties of gelatin from skins of fish black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red Tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77 (1), 81-84.

Jardón, H.G. (2007). Proteínas de Chía (*Salvia hispánica*) Estudio para valorar sus propiedades como formadoras de películas. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México, D.F., 39-41.

Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Prodpran, T., & Tanaka, M. (2006). Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. *Food Hydrocolloids*, 20, 492-501.

Karim, A.A., & Bhat, A. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23, 563-576

Kerry, J.P., O'Grady, M.N. & Hogan, S.A. (2006). Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74, 113-130.

Krochta, J., Balwin, E., & Nisperos-Carriedo, M. (1994). Edible Coatings and films to improve Food Quality. CRS Press, U.S.A. Pp. 201-243.

Labuza, TP., & Contrera-Medellin R., 1981. Prediction of moisture protection requirements for food. *Cereal food World* 26, 335-339.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

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

Liu, L., Kerry, J.F., & Kerry, J.P. (2006). Effect of food ingredients and selected lipids on the physical properties of extruded edible films/casings. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 295-302.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Métodos AOAC (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th Edition, Cunniff, P.

Mahalik, N.P., & Nambiar, A.N. (2010). Trends in food packaging and manufacturing systems and technology. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 117-128.

Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., & Duodu, K.G. (2004). Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18, 581-592.

Norziah, M.H., Al-Hassan, A., Mordi, M.N., & Norita, M. (2009). Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. *Food hydrocolloids*, 23, 1610-1616.

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

Park, S.K., Rhee, C.O., Bae, D.H., & Hettiarachchy, N.S. (2001). Mechanical Properties and Water-Vapor Permeability of Soy-Protein Films Affected by Calcium Salts and Glucono- δ -lactone. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 2308-2312.

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

Pisantry, I., Caso, M., Ezcurra, E. (2004). Diagnóstico ambiental del Golfo de México, Instituto Nacional de Ecología. Pp 245-263.

Robertson, G.L. (2006). Food Packaging, Principles and Practice. 2nd ed. CRC Press, U.S.A, Pp. 9-78.

Rodriguez M., Osés, J., Ziani, K., & Maté, J. I. (2006). Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. Food Research International, 39, 840-846.

Saeed, M., & Cheryan, M. (1988). Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphenols and phytate. Journal of Food Science, 53, 1127-1143.

Salcedo, B.S., & Chu, Y.S.(2005). Capacidad de pesca y manejo pesquero en América Latina y el Caribe, Volumen 461 de Documento Tecnicos De Pesca. Food & Agriculture Org., pp. 259-264.

SFI: Southeastern Fisheries Association, 2000.
www. Southeasternfish.org (Consultada en Mayo del 2010)

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

Sobral, P.J.A., Menegalli, F.C., Hibinger, M.D., & Roques, M.A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. Food Hydrocolloids, 15, 423-432.

Tanaka, M., Iwata, M., Sanguandeeikul, R., Handa, A., & Ishizaki, S. (2001). Influence of plasticizers on the properties of edible films prepared from fish water-soluble proteins. Fisheries Science, 67, 346–351.

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

Torres, A.W., Pacheco, A. R., Sotelo, M. R., Rouzaud, S. O., & Ezquerra, B. J. (2008). Partial characterization of collagen from mantle, fin, and arms of jumbo squid (*dosidicus gigas*). Ciencia y Tecnología Alimentaria, 6(2), 101-108.

Trop, M., & Kushelevsky, A. (1985). The Reaction of Glucono Delta Lactone with Proteins. *Journal of Dairy Science*, 68, 2534-2535.

Vanin, F. M., Sobral, P.J., Menegalli, F.C., Carvalho, R. A., & Habitante, A. M. (2005). Plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloids* 19, 899-907.

Weber, J. C. (2000). Biobased Packaging Materials for the Food Industry, A European Concerted Action, Pp . 15-20.

Zactiti, E.M., & Kieckbusch, T.G. (2006). Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*, 77, 462-467.

Zhang, Y., & Cremer, P.S. (2006). Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 658-663.