



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y FACTOR
COMBINADO DE TEMPERATURA Y pH EN LAS PROPIEDADES MECÁNICAS
Y DE BARRERA EN PROTEÍNAS EXTRAÍDAS DE PIELES DE PESCADERÍA**

TESIS

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

PRESENTA

BRENDA MURIEL MEJÍA RESÉNDIZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE Profesor: Francisca Aida Iturbe Chiñas

VOCAL Profesor: María de los Ángeles Valdivia López

SECRETARIO Profesor: Hermilo Leal Lara

1er. SUPLENTE Profesor: Alberto Tecante Coronel

2° SUPLENTE Profesor: Mariana Ramírez Gilly

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA, CONJUNTO E, EDIFICIO DE BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTOS, LABORATORIO 322 Y 323.

ASESOR DEL TEMA

M.C. María de los Ángeles Valdivia López

SUPERVISOR TÉCNICO

Mariana RAMÍREZ GILLY

SUSTENTANTE

Brenda Muriel Mejía Reséndiz

Índice

1. Introducción	1
1.1. Justificación	1
1.2. Objetivos	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos particulares	2
2. Antecedentes	3
2.1. Películas de biopolímeros	3
2.2. Aplicación de altas presiones hidrostáticas en extracción de proteínas	4
3. Marco teórico.	5
3.1. Producción pesquera en México	5
3.1.1. Producción de cazón en México	7
3.1.2. Producción de robalo en México	8
3.2. Características biológicas de cazón y robalo	9
3.2.1. Cazón	9
3.2.2. Robalo	10
3.3. Películas biodegradables	11
3.3.1. Definición	11
3.3.2. Uso de películas comestibles	11
3.3.3. Películas elaboradas a partir de una fuente proteica	13
3.4. Desnaturalización proteica	14
3.4.1.1. Agentes desnaturalizantes	15
3.4.1.2. Efecto de la temperatura en las proteínas	15
3.4.1.3. Efecto del pH en las proteínas	15
3.5. Alta presión hidrostática (APH)	16
3.5.1. Definición	16
3.5.2. Aplicación de altas presiones en los alimentos	16
3.5.3. Efecto de las altas presiones en los alimentos	16

3.5.3.1. Agua	17
3.5.3.2. Lípidos	17
4. Materiales y métodos	18
4.1. Diagrama general de trabajo	18
4.2. Caracterización de las pieles de cazón y robalo	19
4.3. Extracción de la proteína soluble total extraída de las pieles	19
4.4. Obtención del precipitado	20
4.4.1. Precipitación isoelectrica	20
4.4.2. Caracterización del precipitado	20
4.4.3. Determinación de proteína soluble extraída	20
4.4.4. Determinación de proteína soluble residual	21
4.5. Formación de las películas	21
4.6. Evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera en las películas	22
4.6.1. Acondicionamiento de las películas	22
4.6.2. Medición del espesor	22
4.6.3. Propiedades mecánicas	22
4.6.3.1. Prueba de extensión	24
4.6.3.2. Prueba de punción	24
4.6.3.3. Tratamiento de datos	24
4.6.4. Propiedades de barrera	26
4.7. Aplicación de altas presiones hidrostáticas en pieles de cazón y robalo	28
4.8. Análisis estadístico	29
5. Resultados y discusión	30
6. Conclusiones	53
7. Referencias	56

Índice de tablas, gráficas y figuras

Gráfica 1. Principales entidades de México en producción pesquera	5
Tabla 1. Principales países pesqueros a nivel mundial en años del 2009 y 2010	6
Gráfica 2. Principales países en producción pesquera en los años 2009 y 2010	7
Gráfica 3. Principales entidades del país en producción de cazón	8
Gráfica 4. Principales entidades del país en producción de robalo	9
Figura 1. Transferencias que pueden ser controladas por barreras comestibles	12
Figura 2. Biopolímeros de origen natural para uso en películas biodegradables	13
Figura 3. Equipo SINTECH 1/S evaluación de pruebas mecánicas de extensión y punción	23
Figura 4. Esquema donde se observa la señal típica en pruebas de extensión y punción	25
Figura 5. Desecador en condiciones estándar para la prueba de PVA	27
Tabla 2. Análisis composicional en pieles de cazón y robalo	30
Tabla 3. Efecto de la temperatura sobre los rendimientos de extracción de proteína en las pieles	32
Tabla 4. Propiedades mecánicas de extensión en películas elaboradas de proteínas extraídas a distintas temperaturas	34
Tabla 5. Efecto de la variación de pH en la extracción de proteínas en pieles de robalo	36
Tabla 6. Efecto de la variación del pH en las propiedades de barrera. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	37
Tabla 7. Efecto de la variación presión – tiempo en la extracción de proteína en pieles de cazón y robalo	40
Tabla 8. Propiedades mecánicas de películas elaboradas de proteínas de pescado y películas de plásticos no comestibles de uso común	42

Tabla 9. Efecto de las propiedades mecánicas de extensión en películas elaboradas con proteínas extraídas con altas presiones	43
Gráfica 5. Evaluación de las películas de cazón en sus propiedades mecánicas de extensión	44
Gráfica 6. Evaluación de las propiedades mecánicas de extensión en películas de robalo	45
Tabla 10. Efecto de la aplicación de la APH en las propiedades mecánicas de punción	46
Gráfica 7. Evaluación de las propiedades mecánicas de punción en películas de cazón	47
Tabla 11. Características físicas de a películas formadas a partir del precipitado de las pieles de cazón y robalo sometidas a APH	48
Tabla 12. Efecto de APH en la formación de películas de cazón en las propiedades de PVA	50
Gráfica 8. Evolución de la PVA en películas de cazón	51

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación

En México se ha encontrado que la mayor parte de las especies marinas son consumidas en forma de filete, y el residuo no es aprovechado en su totalidad, ya que en el 2011 se registró un total de 1, 092, 518 ton de pescado vivo de los cuales 12, 935 ton fueron destinadas para aceite y 133, 237 ton destinadas para harina, obteniendo 84, 866 ton de desperdicio pesquero (CONAPESCA, 2011).

Entre el desperdicio se encuentran las pieles, de las que se han hecho investigaciones sobre la realización de películas a partir de sus proteínas; las cuales además de ser biodegradables, podrían agregar un valor nutricional a los alimentos, ya que estas películas están compuestas principalmente de proteínas y carbohidratos.

Una de las desventajas con las que se han enfrentado en estos últimos años las investigaciones realizadas sobre la extracción de proteínas de las pieles de pescado, son los bajos rendimientos de extracción que se obtienen; que van desde 6 % hasta 12 % y estos valores varían según lo tipos de pieles de pescado que se utilizaron, siendo las más estudiadas tiburón, raya (Castañeda, 2011) y mero (Granados y Martínez, 2010).

Por lo que es necesario investigar si al modificar algunas de las condiciones de extracción de proteína de pieles de pescado, permiten un efecto en los rendimientos y en las propiedades de las proteínas; evaluando las variables presión, tiempo y temperatura en pieles de cazón y robalo.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Conocer el efecto de la temperatura y las altas presiones hidrostáticas en los rendimientos de extracción de proteínas de piel de pescado y en las propiedades para la elaboración de películas.

1.2.2. Objetivos particulares

- ❖ Conocer y establecer la temperatura óptima en la extracción alcalina de proteínas en pieles de pescadería.
- ❖ Conocer el efecto de la temperatura de extracción sobre las propiedades mecánicas de extensión que presentan las películas.
- ❖ Conocer el efecto del pH en la extracción de proteínas de pieles de pescado y el efecto en las propiedades de barrera de las películas.
- ❖ Identificar si las altas presiones hidrostáticas modifican los rendimientos de extracción al aplicar distintas dosis y tiempo en pieles de pescado.
- ❖ Conocer el efecto de las altas presiones hidrostáticas en las propiedades mecánicas de extensión y punción de las películas.
- ❖ Conocer el efecto de las altas presiones hidrostáticas en las propiedades de barrera que presentan las películas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Películas de biopolímeros

El interés en las películas de biopolímeros ha ido en aumento durante la última década, debido a que son una alternativa al uso de películas no biodegradables; favoreciendo al medio ambiente.

Básicamente, las películas biodegradables se preparan a partir de polisacáridos, proteínas y lípidos. Entre estos materiales, las proteínas han sido ampliamente estudiadas debido a su abundancia, a su capacidad de formación de película y a sus cualidades nutricionales (Gennadios et al., 1994; Krochta, 2002).

Las películas elaboradas de proteínas son las más atractivas a diferencia de aquellas películas hechas de polisacáridos y lípidos; porque las películas de proteína tienen un excelente bloqueo a gases así como sus propiedades físicas (Jun-Yeon et al., 2011).

Las películas y recubrimientos a base de proteínas pueden ser comestibles y biodegradables, esto dependerá de la formulación y el método de elaboración; los cambios que se dan en las proteínas se debe al efecto de la temperatura utilizada, modificación del pH, contenido de sal, modificación enzimática y eliminación de agua presente, lo cual determinará si la película o el recubrimiento resultante es comestible (Krochta y De Mulder-Johnston, 1996).

A pesar de que no es factible el reemplazó total de las películas sintéticas, las películas de biopolímeros tienen el potencial de reducir y sustituir químicamente las películas sintéticas en algunas aplicaciones en el futuro.

Investigaciones realizadas en la Facultad de Química entorno al desarrollo de películas formadas a partir de fuentes proteicas como piel de pescado de mero, raya, cazón y de ave que presentan una fuerza de extensión, fuerza de punción y barrera al vapor de agua aceptable, comparándola con materiales sintéticos como

polietileno de baja densidad. Sugieren que el utilizar estas películas como parte de los empaques podría traer un beneficio al ambiente, económico y nutricional.

2.2. Aplicación de altas presiones hidrostáticas en extracción de proteínas

El uso de alta presión hidrostática para extraer el colágeno de la piel de pescado es una alternativa útil al procedimiento convencional. Su utilidad reside básicamente en que la etapa más larga del tratamiento puede ser acortado drásticamente, por lo que es posible producir colágeno de alta calidad en pocos minutos.

El punto de aplicación de alta presión en el proceso de extracción del colágeno en pieles de pescado es principalmente reducir los tiempos de tratamiento y/o para mejorar la calidad de la gelatina producida (Gómez-Guillén et al., 2005).

Se ha demostrado que las altas presiones por arriba de 150 MPa inducen la desnaturalización de las proteínas, alterando el equilibrio de las interacciones no covalentes que estabilizan la conformación nativa de muchas proteínas (Masson P. et al., 1992). Sin embargo, se ha informado que el colágeno es apenas afectado por la alta presión, dado que los puentes de hidrógeno son insensibles a estas condiciones (Gekko y Koga, 1968; Heremans, 1995).

No se observaron efectos significativos en el tratamiento de alta presión alrededor de 300-400 MPa, en la solubilidad del colágeno en la carne de res (Suzuki et al., 1993) y en la bacaladilla (Fernández-Martín et al., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que la solubilidad del colágeno bovino aumenta con la presión aplicada a 200 MPa, mientras que a 400 MPa se reduce esta característica (Kwiatkowska et al., 2001).

Se estudió que la desnaturalización proteica de la clara de huevo se produce de forma irreversible a partir de 300 MPa y se intensifica con el aumento de la presión y el tiempo de tratamiento.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Producción pesquera en México

México posee una extensión territorial de 1, 964,375 Km², con una superficie continental de 1, 959,248 Km² y una insular de 5, 127 Km². También ostenta gran variedad de sistemas costeros y marinos dentro de sus aguas territoriales: 12,500 Km² de superficie de lagunas costeras y esteros y 6,500 Km² de aguas interiores como lagos, lagunas, represas y ríos.

En la gráfica 1 se muestra el volumen de la producción pesquera en el año 2011, la producción en peso vivo desembarcado asciende a 1,660 mil toneladas, siendo Sonora y Sinaloa, las entidades con mayor producción pesquera con una participación del 37% y 20% respectivamente, seguidas por la Baja California Sur con un 9% y Baja California con un 8%.

Participación porcentual de la producción pesquera por principales entidades, 2011



CONAPESCA, 2011

Gráfica 1. Principales entidades en México en producción pesquera, 2011

Los volúmenes de la producción pesquera reportados para el 2011 fueron de 1,092,58 toneladas de materia prima procesada, más del 34% fue de congelado, cerca del 18% para enlatado donde el atún fue la principal especie, el 47% aproximadamente para reducción, siendo la sardina la principal especie y el 1% restante para otros procesos. En cuanto a producto terminado este fue de 564,370 toneladas.

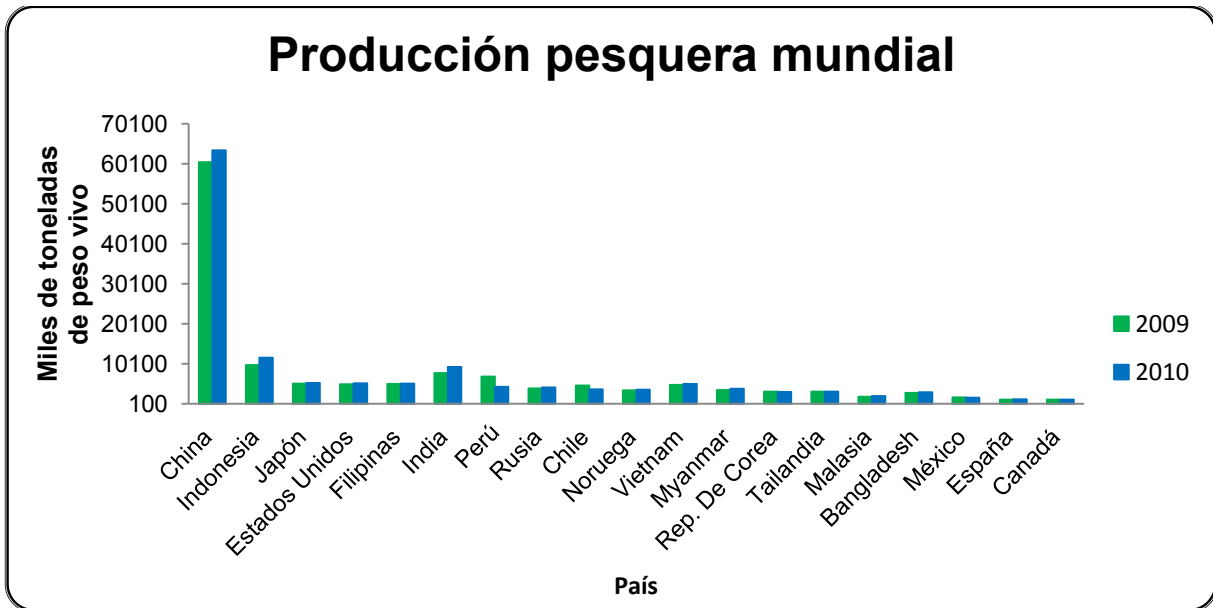
Con el propósito de identificar la situación relativa de México en el contexto pesquero mundial, se presentan en la tabla 1 y gráfica 2 datos estadísticos de los principales países pesqueros. Cifras de la FAO del 2010 sitúan a México en el lugar 17 de la producción a nivel global, lo que representa un 0.95% del total mundial, que equivale a 1,620 miles de toneladas en peso vivo.

Tabla 1. Principales países pesqueros a nivel mundial en años del 2009 y 2010

País	2009	2010
	<i>Miles de toneladas en peso vivo</i>	
China	60475	63495
Indonesia	9827	11674
Japón	5208	5300
Estados Unidos	5008	5244
Filipinas	5083	5162
India	7845	9348
Perú	6964	4354
Rusia	3956	4202
Chile	4703	3762
Noruega	3495	3689
Vietnam	4842	5131
Myanmar	3545	3914
Rep. De Corea	3200	3124
Tailandia	3164	3145
Malasia	1873	2019
Bangladesh	2886	3035
México	1768	1620
España	1172	1221
Canadá	1161	1193

FAO, 2010

China es el país con mayor producción a nivel mundial, generando 60 veces más que México, también es uno de los países en donde le dan utilidad mayormente a los desperdicios del pescado, generando no solo producto fresco de consumo sino también se utilizan principalmente para la producción de alimentos y fertilizantes.



FAO, 2011

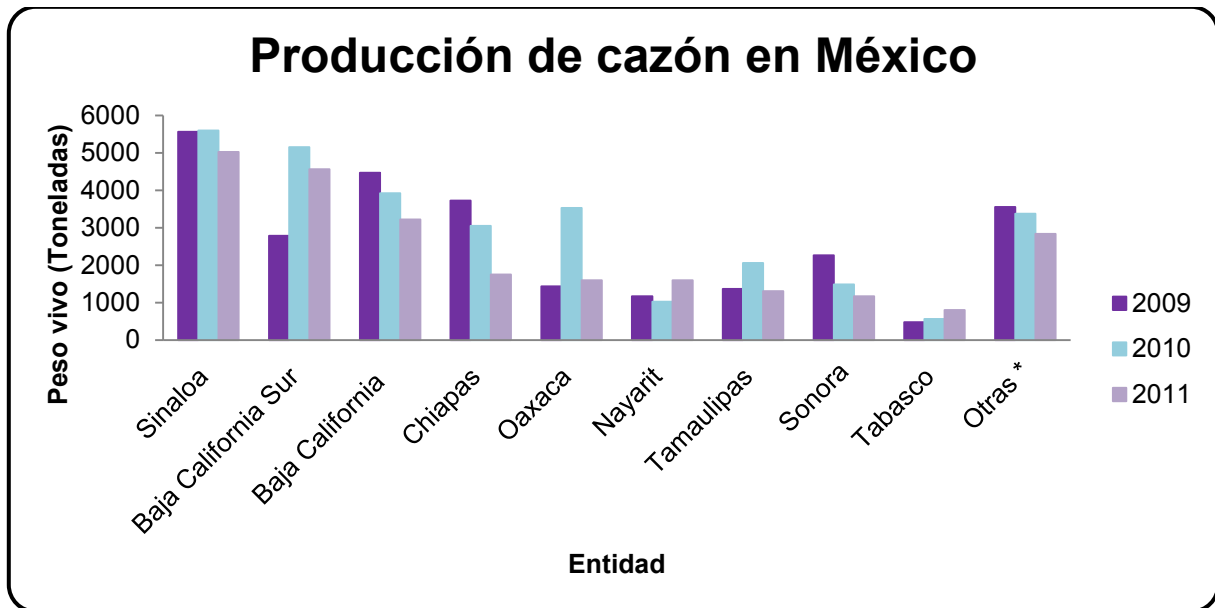
Gráfica 2. Principales países en producción pesquera en los años 2009 y 2010

3.1.1. Producción de cazón en México

El cazón por su volumen se encuentra posicionado en el lugar 10 de la producción pesquera en México; sin embargo, por su valor, lo encontramos en el lugar 9 (CONAPESCA, 2011).

Como se muestra en el gráfico 3 las principales entidades de producción de cazón en México son Sinaloa y Baja California Sur (BCS), teniendo en el 2011 una producción del 21.06% equivalentes a 5,027 toneladas en peso vivo en Sinaloa y una producción del 19.13% equivalentes a 4,565 toneladas en BCS. Comparando con los años anteriores el cazón ha tenido una producción

decreciente pero se mantiene dentro de los peces con mayor producción en México.



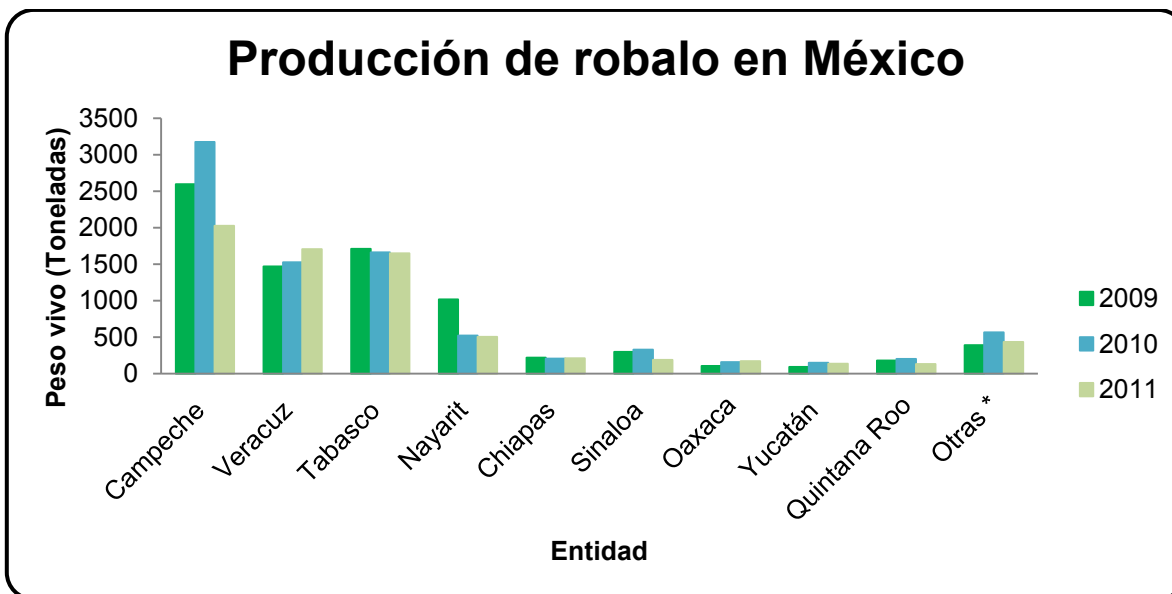
*Campeche, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán.
CONAPESCA, 2011

Gráfica 3. Principales entidades del país en producción de cazón

3.1.2. Producción de robalo en México

El robalo por su volumen se encuentra posicionado en el lugar 23 de la producción pesquera en México; sin embargo, por su valor, lo encontramos en el lugar 10 (CONAPESCA, 2011).

En la gráfica 4 se presenta las principales entidades productoras de robalo, destacando Campeche como la de mayor producción y Veracruz. Estas entidades en producción en el año 2011 fue de 28.36% y 23.88% respectivamente. Estos porcentajes equivalentes en peso vivo para Campeche 2,027 toneladas y en Veracruz 1,707 toneladas.



*Baja California Sur, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Yucatán
 CONAPESCA, 2011

Gráfica 4. Principales entidades del país en producción de robalo

3.2. Características biológicas de cazón y robalo

3.2.1. Cazón

Pez elasmobranquio. Presenta esqueleto cartilaginoso y características morfológicas, bien definidas entre las que destacan la presencia en la parte ventral de la cabeza de un par de orificios llamados “narinas” que corresponden a la parte externa del olfato; disposición vertical de 5 aberturas branquiales situadas a ambos lados del cuerpo, cola o aleta caudal.

Son organismos ovíparos o vivíparos de fecundación interna. En aguas tropicales, durante agosto son depredadores en el sentido de que se alimentan siempre de animales, son peces zoófagos. Su dieta consiste en peces, crustáceos y moluscos. La coloración característica de esta especie es dorso café o grisáceo; las aletas dorsal y caudal tiene márgenes oscuros; el vientre es blanco.

Pez oceánico, en su gran mayoría de aguas tropicales, y subtropicales. Se encuentran a profundidades que varían de 30 – 500 metros, cuando alcanzan agua someras de la costa se aproximan mucho a las playas y algunos llegan a invadir las aguas salobres. Su pesquería se realiza durante todo el año en forma complementaria a la de otras actividades pesqueras que operan en la costa. Se consume la carne fresca, congelada y a veces seca, salada.

3.2.2. Robalo

Pez de la familia *Centropomidae* agrupa a especies de gran semejanza morfológica. Comprende, a escala mundial, cuatro géneros y 23 especies. Pez similar a los túnidos, macarelas y sierras. Se caracteriza por presentar el cuerpo fuerte y fusiforme adelgazándose en forma pronunciada hacia el pedúnculo caudal, el cual es bastante estrecho; que es un indicador de la gran capacidad de nado de esta especie. El género *Centropomus spp* comprende especies tropicales y subtropicales eurihalinas, con una marcada tendencia a alimentarse y crecer en cuerpos de agua de baja salinidad.

Presentan un perfil cóncavo en el hocico o morro. Logran longitudes de cerca de dos metros y constituye un grupo de peces de gran importancia alimentaria y comercial en el mundo (Nelson, 1994).

Su distribución y abundancia parece estar en estrecha relación con la presencia de lagunas costeras y estuarios, en donde las fluctuaciones de salinidad son notables. Los robalos son organismos típicamente eurihalinos, soportan amplias variaciones de salinidad en el agua, ya que su ciclo de vida está estrechamente ligado a los ambientes estuarinos, es decir, a las zonas de las desembocaduras de los ríos, esteros y lagunas litorales. De hecho, se les considera como animales cuasi catádomos, es decir como peces que desovan en el mar y que maduran en agua dulce.

Se alimentan principalmente de especies como sardinas, lacha y anchoveta, aunque también camarones y algunos moluscos. Se distribuyen en el Golfo de

México, especialmente en Campeche y Veracruz. Se consume principalmente fresco, congelado o salado.

3.3. Películas biodegradables

3.3.1. Definición

Las películas son recubrimientos que forman una fina capa sobre el alimento y se caracterizan por constituir una barrera semipermeable a los gases, compuestos volátiles y al vapor de agua que retrasa el deterioro de los alimentos, estas pueden mejorar las propiedades mecánicas, a retener la integridad estructural del producto que envuelven y actuar como vehículo de aditivos alimentarios (Saavedra y Algecira, 2010).

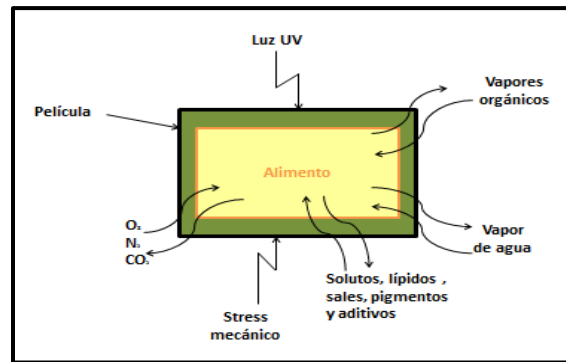
3.3.2. Uso de películas comestibles

La utilización de películas comestibles sobre productos alimenticios no es un tratamiento innovador ya que se realiza desde hace años, con los objetivos de aumentar el tiempo de almacenamiento y mejorar el aspecto de muchos alimentos. Como ejemplo se puede mencionar el empleo de ceras para retrasar la deshidratación de los cítricos que se realiza en China desde los siglos XII y XIII.

Actualmente el uso de películas comestibles se ha extendido a muchos alimentos: productos cárnicos, pescados y carne de ave, tanto frescos como congelados, frutas y hortalizas enteras o en trozos y quesos entre otros.

Esto se debe al desarrollo de formulaciones innovadoras respecto a los biopolímeros utilizados para su composición. Según el tipo de biopolímeros (proteínas, polisacáridos y lípidos) que componga la película comestible o recubrimiento comestible, sus características y funciones serán diferentes, ya que están ligadas a la composición química y estructural del mencionado biopolímero.

Dichas funciones están asociadas a la preservación de la calidad de los alimentos sobre los cuales se aplica y consisten principalmente en servir como barrera en la transferencia de distintas sustancias como se muestra en la figura 1, que va desde el alimento hacia el exterior y viceversa.

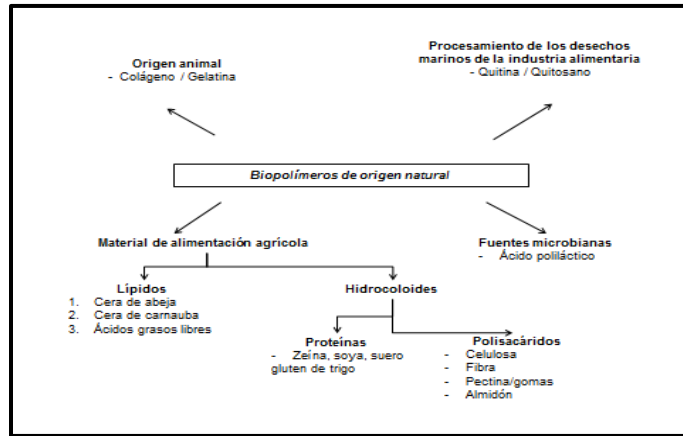


(Daoudi, 2004)

Figura 1. Transferencias que pueden ser controladas por barreras comestibles.

Una funcionalidad importante de las películas comestibles es su habilidad para incorporar ingredientes activos, ya que pueden servir como soporte de aditivos capaces de conservar y mejorar la calidad del producto.

Los diversos biopolímeros con los que se realizan las películas compuestas y formulaciones de revestimiento se muestran en la figura. 2. La composición de los recubrimientos sobre la base de dichos biopolímeros han traído un aumento en los nuevos materiales de empaque en uso. Estos biopolímeros son compatibles con hidrocoloides, agentes tensoactivos y aditivos.



Tharanathan, 2003

Figura 2. Biopolímeros de origen natural para uso en películas biodegradables.

Es importante destacar que las características funcionales de las películas comestibles son consecuencia directa de la materia prima utilizada para su fabricación, la cual debe ser obtenida de fuentes naturales para asegurar su biodegradabilidad. Estos componentes que forman parte de la formulación de las películas se clasifican en tres categorías:

- Polisacáridos (almidones, alginatos, pectinas, quitosano, carragenanos y derivados de celulosa).
- Proteínas (caseína, suero lácteo, colágeno y zeína).
- Lípidos (ceras, resinas y ácidos grasos).

3.3.3. Películas elaboradas a partir de una fuente proteica

El colágeno es el mayor constituyente de la piel, tendones y tejidos conectivos, y se encuentra extensamente distribuido en las proteínas fibrosas de los animales. La gelatina resulta de la hidrólisis parcial del colágeno, produce una película flexible y gruesa y las propiedades mejoran cuando se utiliza cloruro de sodio (NaCl) en concentraciones bajas (Lee et al., 2004). Las películas de colágeno también son usadas tradicionalmente en la preparación de envolturas comestibles (Tharanathan, 2003). Los beneficios que presentan este tipo de recubrimientos

son evitar la pérdida de humedad y dar un aspecto uniforme al producto mejorando sus propiedades estructurales.

El reemplazo total de los plásticos sintéticos por materiales biodegradables para la elaboración de empaques no se ha logrado hasta el presente, no obstante si se han sustituido algunos polímeros sintéticos por otros naturales, en aplicaciones específicas. Tales reemplazos han permitido el desarrollo de productos con características específicas relacionadas con las propiedades de barrera, mecánicas y térmicas en determinados empaques como películas protectoras espumas, envolturas, platos, tasas, cucharas, bolsas, etc., (Avérous y Boquillon, 2004; Wang et al., 2003).

La prioridad principal de los empaques es la preservación y protección de todo tipo de productos, siendo los alimentos y las materias primas el campo de mayor prioridad (Villada et al., 2007).

3.4. Desnaturalización proteica

El estado nativo es el estado termodinámicamente más estable. Cualquier cambio de este ambiente como modificaciones en el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la composición del disolvente, etc., forzará a la molécula a asumir una nueva estructura. La desnaturalización implica una pérdida de la estructura ordenada. Dependiendo de las condiciones de desnaturalización, las proteínas pueden hallarse en diversos estados desnaturalizados.

3.4.1. Agentes desnaturizantes

3.4.1.1. Efecto de la temperatura en las proteínas

El calor es el agente más frecuente empleado para la conservación y procesado de los alimentos. Cuando se calienta gradualmente una proteína en disolución, por encima de una temperatura crítica, sufre una transición abrupta del estado nativo al desnaturizado.

Los enlaces que sufren una modificación son los enlaces no covalentes primordialmente, los enlaces de hidrógeno, las interacciones electrostáticas y las fuerzas de van der Waals se desestabilizan a temperaturas altas y ganan estabilidad a temperaturas bajas. Sin embargo, los puentes de hidrógeno peptídicos están en su mayoría en el interior de la estructura, por lo cual permanecen estables en un amplio intervalo de temperaturas.

Por el contrario las interacciones hidrófobas, por ser endotérmicas, son más estables a temperaturas elevadas y se desestabilizan a temperaturas bajas. La fuerza máxima de las interacciones hidrófobas está alrededor de 60 – 70 °C.

3.4.1.2. Efecto del pH en las proteínas

Las proteínas son más estables frente a la desnaturización en su punto isoeléctrico que en ningún otro pH. A valores de pH extremos, las fuertes repulsiones electrostáticas intermoleculares causadas por la elevada carga neta determinan el hinchamiento y el desplegamiento de las moléculas proteicas. El grado de desplegamiento es mayor en pHs extremos alcalinos que en pHs extremos ácidos.

3.5. Alta presión hidrostática (APH)

3.5.1. Definición

Se entiende por altas presiones comprendidas entre 100 y 1000 MPa; ya que normalmente el medio utilizado para transmitir la presión es el agua, este tratamiento se le conoce como altas presiones hidrostáticas.

3.5.2. Aplicación de altas presiones en los alimentos

La tecnología de las altas presiones es un método empleado en la conservación de los alimentos, en donde el alimento es sometido a elevadas presiones, con la finalidad de inactivar microorganismos y enzimas deteriorativas, y crear atributos que sean deseables en los alimentos.

El uso de las altas presiones como método de conservación de alimentos ha ganado ímpetu en varias partes del mundo como una alternativa a los métodos térmicos tradicionales, ya que las altas presiones tienen poco efecto en el sabor, olor y valor nutrimental del alimento (Messens et al., 1997).

3.5.3. Efecto de las altas presiones en los alimentos

Las proteínas sufren cambios en su estructura cuando se someten a procesos que involucren presión, ya que la presión favorece la disociación de las proteínas oligoméricas y así mismo provocan desdoblamiento de sus cadenas.

Una proteína en su estado nativo está estabilizada por enlaces covalentes incluyendo a los enlaces disulfuro; interacciones electrostáticas; puentes de hidrogeno e interacciones hidrofílicas. La presión afecta la estructura cuaternaria (a través de las interacciones hidrófobas), a la estructura terciaria (provocando

desdoblamiento que muchas veces son reversibles), y a la secundaria (provocando desdoblamiento irreversible) (Ludikhuyze y Hendricks, 2000).

En general la aplicación de presiones superiores a 100-200 MPa a temperatura ambiente, provocan la disociación de macroestructuras en subunidades, así como, el despliegue y desnaturalización de estructuras monoméricas, probablemente debido al debilitamiento de las interacciones hidrófobas y la separación de los puentes salinos inter o intramoleculares (Heremans, 1995).

Se ha observado que los enlaces covalentes tienen baja compresibilidad y no se ven afectados por presiones inferiores a 1000 – 2000 MPa (Hayashi et al., 1992). De esta manera la estructura de las biomoléculas de bajo peso molecular no se modifican (Chefel et al., 1992). La alta presión también contribuye a la disociación de los grupos ácidos de la cadena lateral de los aminoácidos.

3.5.3.1. Agua

El volumen de agua disminuye un 4 % a 100 MPa y un 15 % a 600 MPa a una temperatura de 22 °C (Chefel, 1992). La compresión adiabática del agua causa un aumento de 2 a 3 °C por cada 100 MPa, aumento que depende de la temperatura inicial del agua y de la velocidad de compresión. Este cambio es irreversible cuando sucede la descompresión ya que se produce una baja de la temperatura de la misma magnitud (Chefel y Culioli, 1997).

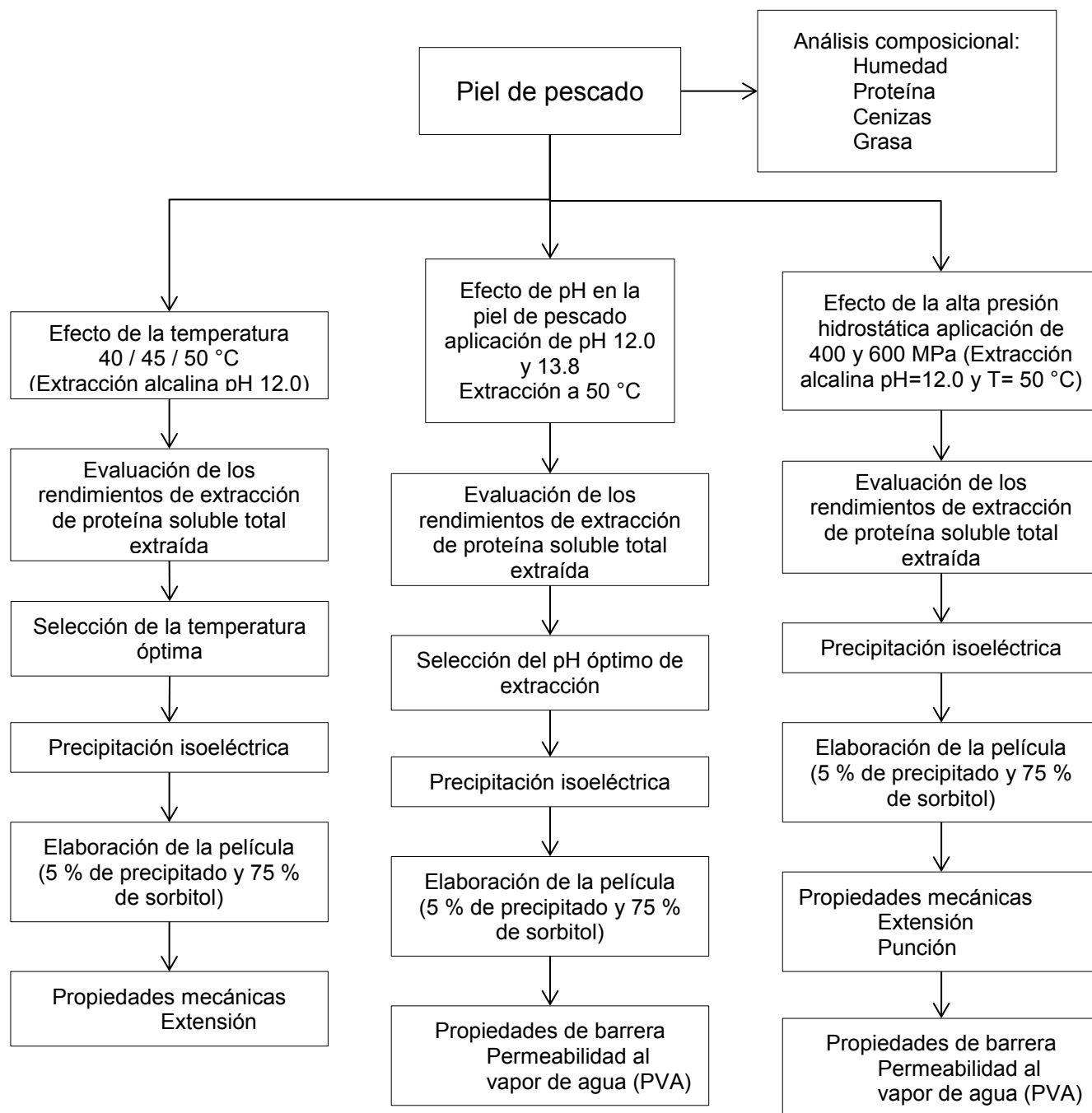
3.5.3.2. Lípidos

El aumento de la presión puede producir un aumento de la oxidación de los lípidos insaturados del alimento. Se ha observado que el tratamiento de altas presiones en alimentos de alto contenido proteico como la carne y pescado produce un incremento de la oxidación lipídica, se cree que este aumento de oxidación está relacionado con la desnaturalización de las proteínas, quedando iones metálicos libres que catalizarán la oxidación lipídica (Beltrán et al., 2002).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En el siguiente diagrama se sintetiza el trabajo experimental realizado en las pieles de pescado.

4.1. Diagrama general de trabajo



4.2. Caracterización de las pieles de cazón y robalo

Las pieles de cazón y robalo, se obtuvieron del mercado “La Nueva Viga” ubicada en la Ciudad de México.

Para determinar la composición de las pieles se realizó un análisis composicional que incluyó humedad, proteína, cenizas y grasa. Para estas determinaciones las pieles se cortaron previamente en piezas de 1x1x1 cm y se realizaron con los siguientes métodos:

- Humedad (AOAC 950.46)
- Proteína (AOAC 981.10) Factor 6.25
- Cenizas (AOAC 938.08)
- Grasa (AOAC 991.36)

4.3. Extracción de la proteína soluble total extraída de las pieles de *pescado*

La extracción de proteína soluble en las pieles de cazón y robalo se realizó de acuerdo al procedimiento de Granados y Martínez, 2010. La piel se cortó en cubos de 3x3x3 cm, se sumergieron en una solución de NaOH 0.1 N a pH 12.0 en una relación 1:10 (p/v); se agitó esta mezcla por una hora a 50 °C. Transcurrida una hora de agitación la piel se trituró en una licuadora convencional, con la finalidad de tener una superficie mayor de contacto y así obtener más cantidad de proteína extraída de la piel. Realizado lo anterior, la piel triturada se agitó durante una hora más a 50 °C.

4.4. Obtención del precipitado

4.4.1. Precipitación isoeléctrica

Después de la agitación de dos horas para la extracción de las proteínas en las pieles de cazón y robalo, se filtró la solución con papel filtro, obteniendo el residuo (piel triturada) el cual se desecha y el sobrenadante (proteína solubilizada), el cual se ocupó para realizar la precipitación de las proteínas.

Al sobrenadante se le agregó 1 mL de una solución de hexametáfosfato de sodio al 10% en una relación 1:50 (v/v). Después se ajustó el pH de la solución a 2.5 con una solución de HCl 2 M, se dejó en reposo 2 horas en refrigeración (+4 °C).

Después del reposo, se centrifuga la solución en un equipo marca Beckman J2-M2 (Alemania). Las condiciones fueron temperatura a 4 °C a una velocidad de 7000 rpm durante 25 minutos. Con la que se obtuvo el precipitado proteico y la proteína soluble residual (proteína solubilizada no precipitada).

4.4.2. Caracterización del precipitado

Al precipitado se le determinó humedad en estufa de vacío (AOAC 931.04) y proteína por método Kjeldahl (AOAC 981.10). La humedad se determinó, ya que se debe ajustar el extracto en base seca para elaborar las películas y la proteína se determinó para conocer el rendimiento de extracción.

4.4.3. Determinación de proteína soluble total extraída

Esta determinación se llevó a cabo para calcular los rendimientos de extracción de la proteína total obtenida de la centrifugación, utilizando el método Kjeldahl (AOAC 981.10).

4.4.4. Determinación de proteína soluble residual

Esta determinación se realiza para calcular los rendimientos de extracción de la proteína soluble residual obtenida de la centrifugación. Se ocuparon dos métodos: proteína soluble por método Lowry (Lowry et al., 1995), y nitrógeno total por método Kjeldahl.

Al tener estos dos valores nos permite conocer el balance real de los rendimientos.

4.5. Formación de las películas

Las películas se elaboraron disolviendo la proteína precipitada en agua destilada con agitación constante, de tal forma que la concentración final fuera 5% (w/v). Como plastificante se utilizó sorbitol, el cual fue agregado en una concentración de 75% con respecto a la proteína (w/w), se mantuvo en agitación constante para posteriormente ajustar el pH de la solución a 11.5 con NaOH 1 N. Después de ajustado el pH se aforó a 55 mL en una probeta con agua destilada, la solución se calentó en un baño de agua a una temperatura de 70 °C por 10 minutos, posteriormente se filtró y por otros 10 min se volvió a poner en el baño maría a 70 °C; para eliminar las burbujas formadas se utilizó un sonicador (Branson modelo 3510, USA) por 15 minutos. La solución se vació en un sartén de teflón con diámetro 14.5 cm y se dejó secar durante 48 horas a temperatura ambiente y una humedad relativa de ± 55 %.

4.6. Evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera en las películas

4.6.1. Acondicionamiento de las películas

Las películas se colocaron en un desecador para acondicionarlas por el método (ASTM D618-00, 2003) a una humedad y temperatura constantes (60 ± 5 HR % y 20 ± 5 °C), esto se obtiene con una solución saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. La humedad relativa y la temperatura se midió con un termohigrómetro (Oakton, Japón), manteniéndose durante 48 horas para posteriormente realizar las pruebas mecánicas.

4.6.2. Medición del espesor

El espesor de las películas fue medido en cinco posiciones aleatorias con un micrómetro marca Fowler (Japón), con una precisión de 0.001 in, este valor se usa para las pruebas de extensión y punción.

4.6.3. Propiedades mecánicas

Una característica importante de las películas es su funcionalidad, la cual está relacionada con sus propiedades mecánicas de extensión (fuerza de fractura y resistencia del material), que se determinan mediante el esfuerzo aplicado al material y la deformación resultante (Rayas y col., 2003).

Las propiedades evaluadas en estas pruebas fueron fuerza de fractura a la extensión y fuerza de fractura a la punción. Estas pruebas se realizaron con un equipo (Sintech 1/S, MTS, USA) como se muestra en la figura 3; de las pruebas se obtuvieron lecturas las cuales son registradas en una computadora. Se utilizó una celda de carga de 100 N cambiando la geometría de la abrazadera para las pruebas de extensión y las de punción.

Estas pruebas fueron realizadas de acuerdo al procedimiento estándar aplicado para estas películas (ASTM D882-97, 2003).



Figura 3. Equipo SINTECH 1/S evaluación de pruebas mecánicas de extensión y punción.

Los datos primarios obtenidos del equipo para determinar las propiedades mecánicas de las películas elaboradas fueron fuerza de fractura (N) y tiempo (min); los parámetros que se calculan con los datos obtenidos es el esfuerzo, el porcentaje de deformación y módulo de Young, siendo estas características las más comúnmente evaluadas.

El esfuerzo indica la tensión máxima que puede soportar una película antes de romperse, dando una idea de la integridad y de la durabilidad de las películas para potenciales aplicaciones, mientras que el porcentaje de deformación permite conocer la elongación que presentan los materiales (Miranda et al., 2003; Rayas et al., 2003; Srinivasa et al., 2007). El módulo de Young es definido como la fuerza

intrínseca e indica la rigidez de la película (Srinivasa et al., 2007), es decir, determina el punto en el cual la película ya no regresa a su estado original.

4.6.3.1. Prueba de extensión

Para ésta prueba las películas se cortaron en tiras de 10 mm de ancho y 80 mm de largo; en cada extremo de la película se dejó un espacio de 15 mm para que con la abrazadera se sujete de ambos extremos, por lo que la película tienen una longitud inicial de 50 mm. Después de colocar la película en la abrazadera, ésta se elonga a una velocidad de ± 100 mm/min, las lecturas obtenidas son registradas por el equipo en tiempo real. Las determinaciones se hicieron al menos por triplicado.

4.6.3.2. Prueba de punción

Para la prueba de punción se requiere que las películas se corten en círculos de 100 mm de diámetro, cada círculo de película se sujeta entre dos anillos de metal, posteriormente un cilindro de base plana de 12.7 mm de diámetro baja perpendicularmente a una velocidad de ± 24 mm/min y las lecturas son registradas por el equipo en tiempo real. Las determinaciones se hicieron al menos por triplicado.

4.6.3.3. Tratamiento de datos

La figura 4 representa la relación esfuerzo- deformación en donde la primera zona muestra la proporcionalidad entre el esfuerzo y la deformación; la pendiente de esta zona es el módulo de elasticidad (Young). En la segunda zona el material se sigue deformando de manera no lineal durante la cual la tira de película pierde la proporcionalidad lineal hasta alcanzar su límite máximo de elasticidad (esfuerzo máximo) y la tercera zona es durante la cual ocurre la fractura final del material (Rosenthal, 2001).

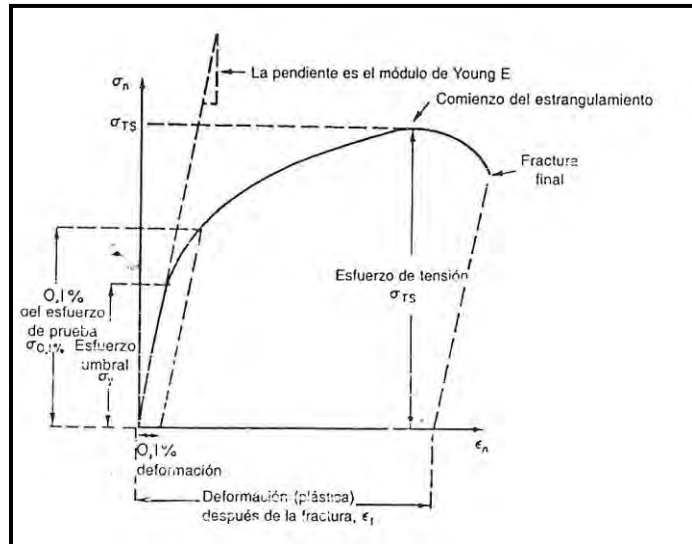


Figura 4. Esquema donde se observa la señal típica en pruebas de extensión y punción (Rosenthal, 2001).

De la señal típica obtenida del equipo durante la evaluación de las pruebas; de éste se obtienen el tiempo (min) y la fuerza (N) con los que se calculan el esfuerzo nominal verdadero (σ_v), deformación de Hencky (ϵ_H) y módulo de Young.

1) *Esfuerzo* (σ) $\sigma = N/m^2 = Pa$
 $\sigma = F / A$

F = Fuerza (N)

A= Área de la película (m^2)

$$A = w * a$$

w = Espesor de la película (m)

a = Ancho de la película (m)

2) *Longitud*

$$L = v * t$$

v = Velocidad durante toda la prueba (± 100 mm/min)

t = Tiempo (min)

3) *Deformación relativa nominal (e)*

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

L = Longitud (mm)

L₀ = Longitud inicial de la película (50 mm)

4) *Esfuerzo nominal verdadero (σ_v)* $\sigma_v = \text{Pa}$

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

5) *Deformación de Hencky (ϵ_H)*

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

Con los datos calculados de esfuerzo nominal verdadero y deformación de Hencky se construyeron gráficas σ_v vs ϵ_H para cada película, se determinaron de éstas los máximos de ruptura, así como los valores del módulo de Young. Para determinar el módulo de Young de cada película, solo se consideraron los datos en donde la proporcionalidad fuera lineal.

4.6.4. *Propiedades de barrera*

Esta prueba se realizó siguiendo el método ASTM E96-95, 2002. Se requieren celdas de acrílico; estas celdas cuentan con una tapa que tiene un orificio por donde se va a llevar a cabo la transferencia de vapor de agua.

Las películas se cortan en círculos de 70 mm de diámetro, los cuales se ponen entre la celda y la tapa. Antes de colocar la película, la celda debe estar a peso constante y posteriormente se agrega a ésta alrededor de 40 g de cloruro de calcio anhidro dejando un espacio de 10 mm aproximadamente, después se coloca la película circular, se cierra la celda y se registra la masa inicial (celda + cloruro de calcio + película). Como se muestra en la figura 4 la celda se introduce en un desecador con una solución saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y se registra la

masa cada 24 horas y así sucesivamente durante 5 días. Las condiciones estándar son 65 % de HR, temperatura ambiente y una solución saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Las determinaciones se hicieron al menos por triplicado.



Figura 5. Desecador en condiciones estándar para la prueba de PVA

Para determinar la permeabilidad de vapor de agua se realizaron los siguientes cálculos:

1) *Transmisión de vapor de agua (g / hm^2)*

$$\text{Transmisión de vapor de agua} = (G/t) / A$$

G = Ganancia en masa durante la prueba (g)

t = Tiempo de duración de la prueba (h)

A = Área de la boca de la celda (m^2)

2) *Permeanza (g / h Pa m²)*

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

TVA = Transmisión de vapor de agua (g / hm²)

S = Presión de vapor de agua a la temperatura de prueba (Pa) = 1.333×10^2 Pa

R = Humedad relativa (%)

3) *Permeabilidad al vapor de agua (PVA)*

$$\text{PVA} = \text{Permeanza} \times \varnothing = (\text{g} / \text{Pa s m}^2)$$

\varnothing = Espesor de la película

4.7. Aplicación de altas presiones hidrostáticas en pieles de cazón y robalo

Para determinar el efecto de las altas presiones en la extracción de proteínas de pieles de pescado, se cortaron las pieles en cubos de 30x30x10 mm aproximadamente, después los cubos se introdujeron en bolsas para vacío y en un equipo para hacer vacío se introdujo la bolsa, este equipo extrae el aire fuera de la bolsa.

Después se introduce la bolsa al equipo de altas presiones (Elmhurst Systems LLC, USA) y las condiciones fueron, la piel de cazón se sometió a las presiones de 400 y 600 MPa durante un minuto; para la piel de robalo las condiciones fueron las mismas, lo que se cambió fue el tiempo: 1, 5 y 10 minutos para cada presión. Estas presiones se seleccionaron porque se ha encontrado que no hay efectos en las proteínas cuando se aplican presiones a partir de 300 MPa (Daoudi, 2004).

Después de someter las pieles a las condiciones de presión y tiempo, se extrajeron las proteína como se explica en el punto 4.3; esto para calcular los rendimientos de extracción y así posteriormente elaborar las películas con la proteína precipitada y realizar las pruebas mecánicas. Las pruebas se realizaron al menos por triplicado.

4.8. Análisis estadístico

Los datos se examinaron con el Software STATGRAPHICS por medio de un análisis de varianza (ANOVA). La prueba de múltiples rangos (LSD) se utilizó para determinar cuáles medias son significativamente diferentes; se trabajó a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de las pieles de cazón y robalo

Se analizaron las pieles de cazón y robalo realizando un análisis químico composicional; en la tabla 2 se reportan los resultados obtenidos en g de componente por 100 g de piel.

Tabla 2. Análisis composicional en pieles de cazón y robalo

Piel	Composición (g / 100 g piel)			
	Humedad	Proteína	Grasa	Cenizas
Cazón	61.76 ± 0.69 ^a	31.29 ± 0.32 ^a	1.48 ± 0.16 ^a	5.38 ± 0.23 ^a
Robalo	65.95 ± 1.45 ^b	26.54 ± 0.17 ^b	5.78 ± 0.29 ^b	1.71 ± 0.06 ^b

* Letras iguales (a,b) no existe diferencia significativa entre las especies con $\alpha = 0.05$

La humedad para la piel de cazón es de 61.76% que se encuentra dentro del rango según lo reportado por Kittiphattanabawon et al. 2010, que es de 55-69%. El robalo presenta una humedad de 65.95% que está por debajo de lo reportado por Erkan et al., 2007 quienes determinaron una humedad de 74.56%.

El contenido de proteína en la piel de la mayoría de los pescados es de 15 – 24 %; el cazón tiene 31.29% de proteína el cual está por arriba de lo reportado por Oakland et al., 2005 que es de 10.1 – 22.6%. El robalo tiene un valor de proteína mayor que el reportado por Erkan et al., 2007, que va de 19.10 – 21.61%.

El contenido de grasa en la piel de cazón es de 1.48% lo cual está por arriba de lo reportado por Oakland et al., 2005, de 0.99 %; el robalo contiene 5.78% de grasa que está por arriba de los reportados por Erkan et al., 2007, lo cual va de 1.04 – 4.38 %, aunque hay valores por debajo, que van de 0.8 – 2% de grasa (Kyrana et al., 2002).

El contenido de cenizas en el cazón es de 5.38% que está por arriba de lo reportado por Oakland et al., 2005 de 0.99%, pero menor a lo reportado por

Kittiphattanabawon et al., 2010 de 12.12%. Estas variaciones dependen del tipo de cazón, la estación y el lugar de donde se captura. El robalo presenta un contenido de cenizas de 1.71% lo cual está por arriba de lo reportado por Erkan et al., 2007 que va de 1.21- 1.26%.

Estas diferencias entre los componentes de las dos pieles se deben a que son distintas especies, al tipo de alimentación, la composición de su dieta (periodos de inanición), la salinidad, estación del año en el que se captura, tipo de actividad que presentan, distintos lotes, etc.

5.2. Evaluación del efecto de la temperatura en las propiedades de las proteínas

5.2.1. Evaluación del efecto de la temperatura en los rendimientos de extracción

Las proteínas comienzan a desnaturalizarse o cambian su estructura a partir de los 40 °C (Fennema, 2002). Para este trabajo se eligieron tres temperaturas, partiendo de los 40 °C y aumentando cada 5 °C, para así evaluar el efecto que produce las variaciones de éstas en la extracción de proteínas.

En la tabla 3 se observa el efecto de la temperatura sobre la cantidad de proteína soluble total extraída, proteína precipitada y la proteína soluble residual (proteína no precipitada que quedo en solución) para cada una de las pieles que se utilizó.

Tabla 3. Efecto de la temperatura sobre los rendimientos de extracción de proteínas en las pieles.

Piel	Temperatura de extracción (°C)	Proteína		Proteína
		soluble total extraída (g/100 g piel)	Proteína en el precipitado (g/100 g piel)	soluble residual (g/100 g piel)
Cazón	40	4.17 ± 0.05 ^a	0.89 ± 0.06 ^a	3.84 ± 0.17 ^a
	45	4.92 ± 0.05 ^b	0.71 ± 0.01 ^b	3.85 ± 0.46 ^a
	50	5.86 ± 0.09 ^c	2.02 ± 0.01 ^c	4.03 ± 0.18 ^a
Robalo	40	2.59 ± 0.01 ^{xy}	1.76 ± 0.01 ^{xz}	0.83 ± 0.01 ^x
	45	2.98 ± 0.19 ^y	2.56 ± 0.01 ^y	0.79 ± 0.01 ^x
	50	3.55 ± 0.39 ^{yz}	1.79 ± 0.01 ^z	0.89 ± 0.12 ^x

*Letras iguales (a,c) no existe diferencia significativa entre las temperaturas por columna en piel de cazón con $\alpha = 0.05$

*Letras iguales (x,z) no existe diferencia significativa entre las temperaturas por columna en la piel de robalo con $\alpha = 0.05$

Para la piel de cazón, se observa que existe diferencia significativa en la cantidad total de proteína extraída y en la cantidad de proteína precipitada al aumentar la temperatura, esto se corrobora con lo escrito por Wong, (1995) y Fennema, (2002), en el cual mencionan que el calor proporciona la energía necesaria para romper las interacciones no covalentes que estabilizan la estructura nativa de las proteínas, éstas interacciones son los puentes de hidrogeno y las interacciones electrostáticas que son de naturaleza exotérmica (se desestabilizan a temperaturas altas) y las interacciones hidrófobas, que son endotérmicas, se estabilizan a medida que aumenta la temperatura; lo que permite mayor interacción con el medio acuoso, produciendo mejores rendimientos de proteína soluble total extraída y proteína precipitada.

El incremento en la cantidad de proteína soluble residual se debe posiblemente, a que el tropocolágeno que es la unidad estructural del colágeno, está estabilizada por puentes de hidrogeno, estos enlaces son de naturaleza exotérmica, por lo que

al aumentar la temperatura hay una desestabilización en las proteínas, presentando un incremento en la cantidad de proteína solubilizada.

También el aumento de la solubilidad de una proteína viene impuesta por la hidrofilia e hidrofobia, tanto las regiones que están en contacto con el agua del entorno, como la hidrofobia promedio y la carga de la molécula en su conjunto, determinaran la solubilidad de las proteínas. Puesto que la mayoría de los restos hidrofóbicos están en el interior de la proteína, únicamente aquellos grupos apolares que se encuentren en la superficie afectaran en la solubilidad, por ello, cuanto menor sea el número de zonas hidrofóbicas de la superficie mayor será la solubilidad y menor la cantidad de proteína precipitada.

La piel de robalo presenta mayor cantidad de proteína soluble total extraída al aumentar la temperatura, pero una menor cantidad de proteína precipitada. Estadísticamente no existe diferencia significativa en la cantidad de proteína solubilizada a las temperaturas de 45 y 50 °C, observando que la proteína solubilizada a 45 °C se obtuvo una mayor cantidad de proteína precipitada.

La disminución de la cantidad de proteína soluble total extraída, puede deberse a que la estabilidad térmica de las fibras de colágeno, está influenciada por el contenido de iminoácidos hidroxiprolina y prolina, ya que los anillos de pirrolidina imponen restricciones conformacionales a las cadenas polipeptídicas y cooperan con la estabilidad de las proteínas.

Los aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina se generan por la hidroxilación de la prolina y lisina, y tienden a aumentar con la edad del pez. La estructura del tropocolágeno está estabilizada por puentes de hidrogeno establecidos entre las tres cadenas que lo conforman y otros puentes de hidrogeno en los que participan los grupos hidroxilo de los restos de hidroxiprolina e hidroxilisina. Las unidades de tropocolágeno son resistentes, esta resistencia en su conjunto depende de los enlaces cruzados, estos enlaces cruzados son uniones covalentes y estos enlaces aumentan conforme el animal envejece.

La proteína soluble residual, que son aquellas proteínas que quedaron solubilizadas después de la precipitación isoelectrica, no existe diferencias significativas para ambas pieles cuando las proteínas fueron extraídas a las diferentes temperaturas. Independientemente de la cantidad de proteína soluble total extraída a las diferentes temperaturas, la cantidad de proteínas solubles residuales es la misma, porque las proteínas aunque estén isoelectricamente neutras en su punto isoelectrico, las proteínas en su superficie tienen cargas negativas y positivas, contribuyendo a la hidrofilia de las proteínas, si la cantidad de éstas son mayor a las interacciones hidrofóbicas (proteína – proteína), las proteínas seguirán siendo solubles.

5.2.2. Evaluación del efecto de la temperatura en las propiedades mecánicas de extensión

En la tabla 4 se presentan los resultados de las pruebas mecánicas de extensión para las películas elaboradas de proteínas extraídas a distintas temperaturas; esta evaluación permite conocer qué tan fuerte es la integración de las proteínas con el plastificante y si existe efecto en la resistencia y deformación de las películas.

Estas determinaciones son complementarias a los rendimientos de extracción, ya que permite seleccionar la temperatura óptima de extracción.

Tabla 4. Propiedades mecánicas de extensión en películas elaboradas de proteínas extraídas a distintas temperaturas

Temperatura de extracción (°C)	Espesor (mm)	Esfuerzo máximo (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Deformación de Hencky (%)
40	0.1257 ± 0.01 ^a	0.42 ± 0.02 ^{ab}	22.42 ± 1.06 ^{ab}	0.88 ± 0.03 ^a
45	0.1205 ± 0.01 ^a	0.43 ± 0.02 ^{ab}	24.23 ± 0.21 ^{ab}	0.96 ± 0.02 ^a
50	0.1319 ± 0.01 ^a	1.64 ± 0.04 ^c	52.23 ± 1.25 ^c	1.09 ± 0.01 ^a

*Letras iguales (a,c) no existe diferencia significativa entre las temperaturas por columna en piel de robalo con $\alpha = 0.05$

Los espesores de las películas no presentan diferencias significativas, esto es importante, ya que si existen variaciones entre los espesores se obtendrían conclusiones erróneas.

En las películas elaboradas con proteínas extraídas a 40 y 45 °C, no existe diferencia significativa en el esfuerzo máximo y el módulo de Young, esto quiere decir que las dos películas requieren la misma fuerza para ser fracturadas y tienen la misma elasticidad (capacidad de la película para regresar a su estado inicial después de aplicarle una fuerza). Las películas elaboradas con proteínas extraídas a 50 °C requieren mayor fuerza para poder ser fracturada y presentan una elasticidad dos veces mayor, en comparación con las películas de 40 y 45 °C.

Estadísticamente no existe diferencia significativa en la deformación máxima de las películas y hay una mayor deformación en las películas elaboradas con proteínas extraídas a 50 °C.

Estas diferencias entre las películas podrían deberse al tipo de proteínas y los grupos terminales de las mismas, formando una matriz más sólida entre las proteínas extraídas a 50 °C con el plastificante, en comparación con las otras dos películas.

La resistencia a ser deformada y el punto de ruptura cuando la película está estirada dependerá principalmente de las fuerzas de las interacciones que existan entre las cadenas de los biopolímeros (proteína extraída de las pieles de pescado); las principales interacciones de estos dos materiales son mediante puentes de hidrógeno, fuerzas iónicas e interacciones electrostáticas (Suyatma y col., 2004).

5.3. Evaluación del pH en las propiedades de las proteínas

5.3.1. Evaluación del efecto del pH en la extracción de proteína en la piel de robalo

Es importante conocer el efecto del pH del medio de extracción, porque determinaremos si al aumentar el valor del pH, solubilizaremos mayor cantidad de proteínas en las pieles. Por ello, para la piel de robalo se evaluó este efecto del pH, trabajando a pH 12.0 y 13.8; a una temperatura de extracción de 50 °C.

En la tabla 5 se muestran los valores experimentales obtenidos, en la extracción y posterior precipitación isoeléctrica de las proteínas.

Tabla 5. Efecto de la variación del pH en la extracción de proteínas en piel de robalo

pH	Proteína soluble total extraída (g/100 g piel)	Proteína del precipitado (g/100 g piel)	Proteína soluble residual (g/100 g piel)
12.0	3.55 ± 0.47 ^a	1.79 ± 0.01 ^a	0.89 ± 0.15 ^a
13.8	25.25 ± 0.01 ^b	6.88 ± 0.35 ^b	18.36 ± 0.35 ^b

*Letras iguales (a,b) no existe diferencia significativa entre los pHs por columna en piel de robalo con $\alpha = 0.05$

Se extrae una mayor cantidad de proteína soluble a pH 13.8, esto posiblemente se deba a que las proteínas se ven afectadas por el pH y hay una mayor solubilidad en general a pH extremos. Tal vez la modificación del medio de extracción, resulta en un mayor desplegamiento de las moléculas de proteínas, porque hay fuertes repulsiones electrostáticas intermoleculares causadas por la elevada carga neta.

A pH por arriba o por debajo del punto isoeléctrico, la repulsión electrostática entre las moléculas de las proteínas aumenta, resultando en una alta solubilidad, teniendo a pH 13.8 siete veces más proteína solubilizada que a pH 12.0.

Aunque a pH 13.8 se obtiene mayor cantidad de proteína soluble, la cantidad de proteína soluble residual es del 72%, esto posiblemente se deba a la relación de

restos (hidrofílicos/grupos apolares), siendo mayoritariamente los restos hidrofílicos los que se encuentran en solución, generando una menor precipitación isoeléctrica. También se podría deber a que no sólo hay colágeno en solución, sino que se tiene presencia de otras proteínas, cuyo punto isoeléctrico tal vez sea diferente al del colágeno, y estas proteínas queden solubles.

No sólo se aplicó un pH extremo alcalino sino también se tiene la temperatura, esto también afecta la solubilidad de las proteínas, ya que con la temperatura habrá desestabilización de los enlaces exotérmicos no covalentes, y esto aumentará la solubilización de las proteínas.

Para determinar el efecto del pH en las proteínas extraídas con las que se formaron las películas, se evaluaron las propiedades de barrera de éstas, en la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6. Efecto de la variación del pH en las propiedades de barrera. Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)

pH	Espesor (mm)	Permeabilidad (ng/ Pa·s·m)
12.0	0.1351 ± 0.01 ^a	1.71 ± 1.56X10 ⁻⁹ ^a
13.8	0.1395 ± 0.02 ^a	12.59 ± 2.06x10 ⁻⁹ ^b

*Letras iguales (a,b) no existe diferencia significativa entre los pHs por columna en piel de robalo con $\alpha = 0.05$

No existe diferencia significativa entre los espesores de las películas.

Se observa que hay una mayor permeabilidad al vapor de agua en las películas formadas con el extracto proteínico a pH 13.8, esto posiblemente se deba a que los restos mayormente expuestos son hidrofóbicos, por tanto estas terminaciones tienen cierto grado de repulsión con el plastificante, generando zonas libres, por lo que estas permiten el paso del agua a través de la película.

Estos restos hidrofóbicos se generan a partir de las regiones expuestas de los aminoácidos de las proteínas; las terminaciones de éstas son hidrofóbicas por la prolina y alanina.

Las películas elaboradas con el extracto proteínico obtenido a pH 12, presentan 7 veces menor permeabilidad al vapor de agua; posiblemente esto se deba a que las proteínas extraídas contengan regiones o restos hidrofílicos, que mejoren la interacción con el plastificante formando así una matriz más compacta.

Comparando estos valores con películas formadas de extracto proteínico de marlín azul a distintos pH, cuya permeabilidad es 1.49×10^{-10} g/Pa.s.m éstas tienen una menor permeabilidad al vapor de agua y esto se debe a que en condiciones ácidas o alcalinas, las proteínas se despliegan por la desnaturalización y sus grupos hidrófobos están expuestos; el aumento o disminución del valor de pH desde el punto isoelectrico causa un aumento en la hidrofobicidad (Yuca, 2007), por este aumento el agua no pasa a través de las películas.

Las mejores condiciones de extracción es ajustar la solución a pH 12.0, aunque la proteína extraída y proteína precipitada en cantidad fue 7 veces menor en comparación con pH 13.8; la permeabilidad al vapor de agua fue baja, la mayoría de los alimentos requieren esto de un empaque.

5.4. Evaluación del efecto de las altas presiones hidrostáticas en las propiedades de las proteínas

5.4.1. Evaluación del efecto de las altas presiones hidrostáticas en los rendimientos de extracción

Las altas presiones hidrostáticas modifican las estructuras proteínicas, generando el proceso de desnaturalización, estos cambios en las estructuras nos permitirán determinar si se puede obtener una mayor cantidad de proteína y aumentar los rendimientos de extracción.

Se aplicaron dos intensidades de presión a las pieles de cazón y robalo, estas intensidades fueron para la piel de cazón de 400 y 600 MPa durante un minuto de

exposición, y para la piel de robalo, intensidades de 400 MPa durante 1, 5 y 10 minutos y a 600 MPa durante 1, 5 y 10 minutos.

Se realizaron tres tipos de películas de proteína de piel de cazón, la primera película denominada película control, formada a partir de proteína extraída sin aplicación de altas presiones a la piel, la segunda película 400-1 formada de proteína extraída con aplicación de presión a 400 MPa durante un minuto y la tercera película 600-1 formada de proteína extraída con aplicación de presión a 600 MPa durante un minuto.

Para la piel de robalo se realizaron siete tipos de película, la primera película denominada control formada a partir de proteína extraída sin aplicación de altas presiones a la piel; la segunda, tercera y cuarta son películas formadas a partir de proteínas extraídas de la piel, con aplicación de presión a 400 MPa durante 1, 5 y 10 minutos respectivamente para cada película; las tres últimas películas son formadas de proteínas extraídas de la piel, sometida a una presión de 600 MPa durante 1, 5 y 10 minutos respectivamente.

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos, con las condiciones de extracción a la temperatura de 50 °C y a pH 12.0.

Tabla7. Efecto de la variación presión – tiempo en la extracción de proteína en pieles de cazón y robalo

Piel	Presión (MPa) – tiempo (min)	Proteína soluble total extraída (g/100 g piel)	Proteína del precipitado (g/100 g piel)	Proteína soluble residual (g/100 g piel)
Cazón	Control	5.86 ± 0.09 ^x	2.02 ± 0.01 ^x	4.03 ± 0.18 ^x
	400-1	4.48 ± 0.13 ^y	2.98 ± 0.10 ^y	1.40 ± 0.03 ^y
	600-1	3.79 ± 0.02 ^z	2.37 ± 0.02 ^z	1.37 ± 0.11 ^y
Robalo	Control	3.55 ± 0.39 ^a	1.79 ± 0.01 ^a	0.89 ± 0.15 ^a
	400-1	4.22 ± 0.29 ^b	2.87 ± 0.02 ^b	1.32 ± 0.01 ^b
	400-5	3.77 ± 0.34 ^{bc}	2.35 ± 0.02 ^c	0.89 ± 0.31 ^c
	400-10	5.77 ± 0.01 ^d	1.77 ± 0.07 ^d	2.78 ± 0.01 ^d
	600-1	4.58 ± 0.01 ^{be}	2.66 ± 0.02 ^e	1.06 ± 0.01 ^{bce}
	600-5	7.56 ± 0.22 ^f	4.15 ± 0.05 ^f	2.39 ± 0.11 ^f
	600-10	3.51 ± 0.01 ^{acg}	1.86 ± 0.01 ^{dg}	1.28 ± 0.01 ^{beg}

*Letras iguales (x,z) no existe diferencia significativa entre la piel de cazón por columna con $\alpha = 0.05$

*Letras iguales (a,g) no existe diferencia significativa entre la piel de robalo por columna con $\alpha = 0.05$

Para la piel de cazón, existe diferencia significativa en la cantidad de proteína soluble extraída, con un efecto negativo en función con la presión aplicada y sin embargo, aun cuando disminuye la cantidad de proteína solubilizada, se tiene mayor cantidad de proteína precipitada cuando la presión es a 400 MPa.

En la proteína soluble residual, existe diferencia significativa entre el control y las dos presiones, observando que para el control se tiene mayor cantidad de proteína soluble residual y mayor cantidad de proteína soluble total extraída, posiblemente esto se deba a que los grupos terminales de las proteínas son de tipo hidrofílicos y estas tiendan a estar solubilizadas en el medio de extracción, por lo contrario al aplicar las altas presiones los grupos expuestos de las proteínas podrían ser de

tipo hidrófobos lo cual, al estar en presencia del agua formen agregados de manera que se minimice el contacto directo con el agua.

En contraste para la piel de robalo, se tiene un aumento en la cantidad de proteína extraída, esto se da aumentando la presión y los tiempos de exposición, por lo tanto para obtener la misma cantidad de proteína solubilizada en vez de someter la piel a una presión mayor, se puede utilizar una presión menor pero aplicando mayor tiempo de exposición.

Lo anterior posiblemente se deba a que a mayor presión hay mayor cantidad de proteína soluble extraída, pero hay veces que esto no sucede, porque durante el tratamiento de las altas presiones, las subunidades se disocian y luego al aplicar presiones más altas, se desnaturalizan; si la presión cesa, las subunidades pueden volverse a asociar, pero esto sucede durante un periodo largo, si se deja pasar ese tiempo antes de someterla a otro tratamiento ya sea térmico o modificando el medio de extracción; ésta asociación no se dará.

Al comparar los datos con lo reportado por (Gómez-Guillén, 2005) en donde, el rendimiento fue considerablemente más bajo en todos los casos en que la presión se aplicó en la etapa de extracción, el aumento o la prolongación de ésta tendió a reducir el rendimiento, en comparación con lo obtenido para la piel de cazón en la que los rendimientos de extracción de proteína disminuyeron al aumentar la dosis de presión, pero aumento la cantidad de proteína precipitada al incrementar la dosis.

En contraste para la proteína precipitada extraída de piel de robalo hay diferencia significativa entre las presiones, sin embargo a 400-10 y 600-10 se presenta la misma cantidad de proteína en el precipitado, en tanto que para la presión de 600 MPa durante 5 minutos se obtuvo la mayor cantidad de proteína en el precipitado.

Para obtener mayor cantidad de proteína solubilizada y mayor cantidad de proteína precipitable, las mejores condiciones de extracción de proteínas en la piel de robalo son, la presión a 600 MPa durante un periodo de 5 minutos.

5.4.2. *Evaluación del efecto de las altas presiones hidrostáticas en las propiedades mecánicas en películas de proteína de piel de cazón y robalo*

Para comparar el efecto de las altas presiones en las películas elaboradas con proteína de pescado, es importante tener en cuenta los valores de las propiedades mecánicas de algunos de los materiales utilizados en la actualidad para envasar los alimentos, como son: HDPE (Polietileno de alta densidad), LDPE Polietileno de baja densidad), PET (Poliéster), películas a base de proteína animal, etc.

En la tabla 8 se presentan algunos materiales biodegradables y sintéticos para comparar con la tabla 9 en la que se presentan películas formadas de proteínas extraídas con altas presiones.

Tabla 8. Propiedades mecánicas de películas elaboradas de proteínas de pescado y películas de plásticos no comestibles de uso común.

Ejemplos	Espesor (mm)	Esfuerzo máximo (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Deformación de Hencky (%)
Cazón +	0.225 ± 0.04	2.74 ± 0.31	16.89 ± 2.59	80 ± 14.6
Raya +	0.184 ± 0.02	9.19 ± 1.14	64.29 ± 7.70	65.9 ± 7.73
Mero °	0.326 ± 0.02	1.79 ± 0.30	20.30 ± 1.02	159.76 ± 4.20
LDPE *	-----	8.6 – 17.3	-----	500
HDPE *	-----	17.3 – 34.6	-----	300
PET *	-----	175	-----	70 – 100

* Edible coatings and films to improve food quality / + Castañeda, K., 2011 / ° Granados y Martínez, 2010

Tabla 9. Efecto en las propiedades mecánicas de extensión en películas elaboradas con proteínas extraídas con altas presiones

Piel	Presión(MPa) – Tiempo (min)	Espesor (mm)	Esfuerzo máximo (MPa)	Módulo de Young (MPa)	Deformación de Hencky (%)
Cazón	Control	0.1409 ± 0.02 ^a	2.10 ± 0.40 ^a	59.42 ± 1.77 ^{ab}	133.61 ± 4.20 ^a
	400-1	0.1881 ± 0.02 ^a	0.89 ± 0.46 ^b	50.56 ± 7.02 ^b	116.70 ± 0.06 ^b
	600-1	0.1877 ± 0.03 ^a	1.24 ± 0.05 ^{bc}	47.92 ± 3.53 ^{bc}	123.71 ± 1.97 ^{bc}
Robalo	Control	0.1819 ± 0.01 ^x	1.64 ± 0.04 ^x	52.23 ± 1.25 ^x	108.89 ± 0.59 ^x
	400-1	0.2033 ± 0.03 ^x	0.42 ± 0.03 ^y	9.84 ± 0.86 ^y	87.82 ± 3.12 ^{yz}
	400-5	0.2139 ± 0.04 ^x	0.96 ± 0.23 ^z	25.80 ± 3.20 ^z	89.96 ± 12.71 ^z

*Letras iguales (a,c) no existe diferencia significativa entre las películas de cazón por columna con $\alpha = 0.05$

*Letras iguales (x,z) no existe diferencia significativa entre las películas de robalo por columna con $\alpha = 0.05$

Los espesores de las películas de la tabla 9, éstas no presentan diferencia significativa.

Las películas control que son elaboradas a partir de proteínas extraídas sin APH para ambas pieles, presentan un comportamiento similar, ya que presentan una deformación mayor y requieren mayor fuerza para poder ser fracturadas.

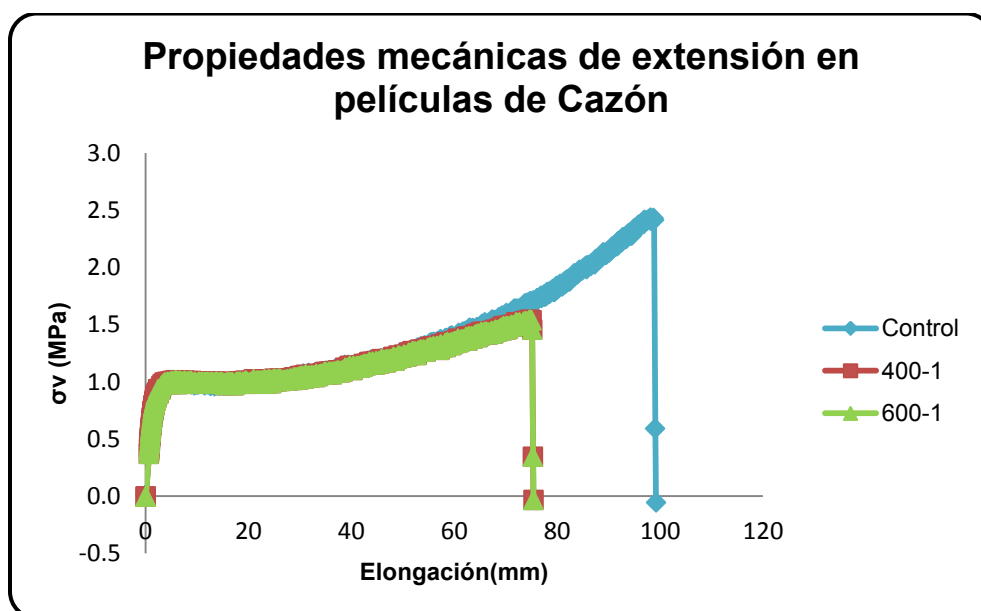
En las películas de cazón, el esfuerzo máximo presenta diferencia significativa entre las películas, esto quiere decir que la película control requiere mayor fuerza para ser deformada y una elongación mayor. Las películas 400-1 y 600-1 presentan la misma elongación y la misma fuerza para ser deformadas. El módulo de Young que es la elasticidad que tiene la película para regresar a su estado inicial, en las tres películas se tiene la misma elasticidad por lo que oponen la misma resistencia a ser deformadas.

En las películas de robalo, la película control requiere mayor fuerza para ser fracturada, tiene una deformación mayor y presenta una resistencia dos veces

mayor en comparación con las películas elaboradas con proteínas extraídas a 400 MPa a tiempos de 1 y 5 minutos.

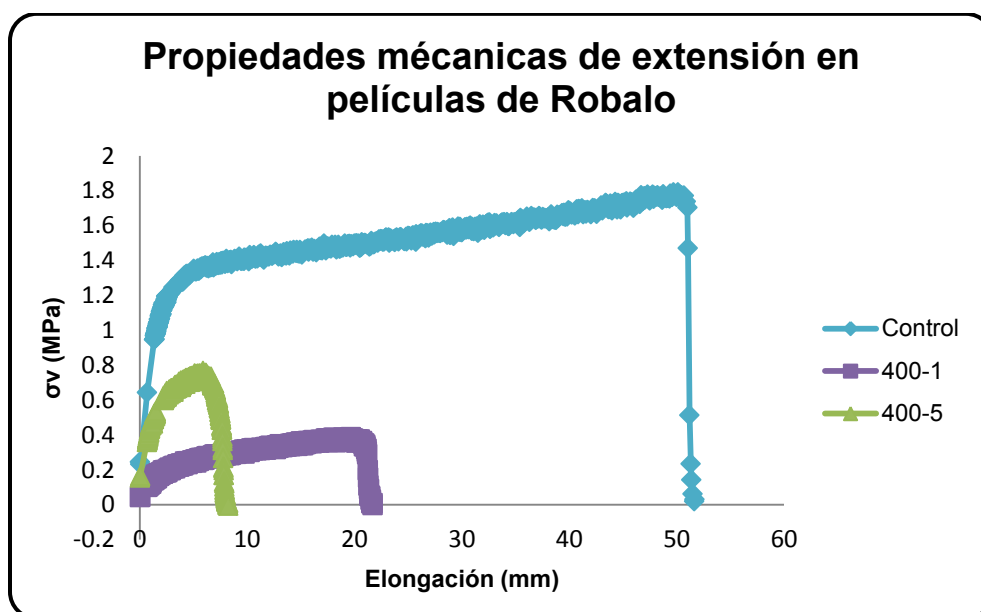
La película 400-1 es la que presenta una menor fuerza para ser fracturada y una elasticidad tres veces menor que la película 400-5 y una elasticidad cinco veces menor que la película control. La deformación entre las películas 400-1 y 400-5 no presenta diferencia significativa por el tiempo utilizado al aplicar las altas presiones.

Al comparar los resultados con los de la tabla 8, las películas de cazón, raya y mero requieren una mayor fuerza para fracturarse en comparación con las películas de la tabla 9. En cuanto a la resistencia que oponen a ser deformadas, las películas tanto de cazón como de robalo (tabla 9), presentan mayor elasticidad, así como una deformación mayor. La película de raya es la única que presenta una deformación mayor, esto tal vez se deba al tipo de piel y a las interacciones de las proteínas con el plastificante.



Gráfica 5. Evaluación de las propiedades mecánicas de extensión en películas de cazón.

La gráfica 5 representa la relación entre el esfuerzo verdadero en MPa como función de la elongación en mm, para las películas formadas de proteínas extraídas de pieles de cazón sometidas a altas presiones hidrostáticas. Se observa que la película control (película formada a partir de la piel de cazón sin aplicación de altas presiones hidrostáticas) tiene mayor elongación y requiere más fuerza para poder ser fracturada en comparación con las películas 400-1 y 600-1, presentando éstas una elongación menor y una menor fuerza para ser fracturadas.



Gráfica 6. Evaluación de las propiedades mecánicas de extensión en películas de robalo.

La gráfica 6 representa la relación entre el esfuerzo verdadero en MPa en función de la elongación en mm, entre las películas formadas de proteína extraída en pieles de robalo sometidas a altas presiones hidrostáticas. Se observa que la película control (película formada a partir de las proteínas de robalo sin aplicación de altas presiones hidrostáticas) tiene mayor elongación y requiere más fuerza para poder ser fracturada. La película de 400-1 presenta una menor elongación y una menor fuerza para ser fracturada en comparación con la película control. Para la película 400-5 se tiene una menor elongación, la fuerza que se necesita para

ser fracturada esta película es mayor que la película a 400- 1 pero menor que la película control.

En la tabla 10 se reportan los resultados de las pruebas de punción obtenidos para las películas formadas a partir de las proteínas extraídas de las pieles de pescado sometida a altas presiones hidrostáticas.

Tabla 10. Efecto de la aplicación de la alta presión hidrostática en las propiedades mecánicas de punción.

Piel	Presión(MPa)		Esfuerzo máximo (kPa)	Módulo de Young (kPa)	Deformación de Hencky (%)
	- Tiempo (min)	Espesor (mm)			
Cazón	Control	0.1140 ± 0.02 ^a	420.36 ± 1.19 ^a	115.50 ± 2.80 ^a	114.94 ± 0.02 ^a
	400-1	0.1247 ± 0.03 ^a	373.43 ± 23.45 ^a	167.47 ± 7.35 ^b	115.06 ± 0.12 ^a
	600-1	0.1498 ± 0.01 ^a	387.60 ± 22.95 ^a	187.93 ± 4.33 ^{bc}	116.67 ± 1.42 ^a
Raya ⁺	-----	0.184 ± 0.03	191 ± 0.21	378 ± 0.43	61.6 ± 0.06
Cazón ⁺	-----	0.225 ± 0.05	192 ± 0.18	455 ± 0.49	40.6 ± 0.22

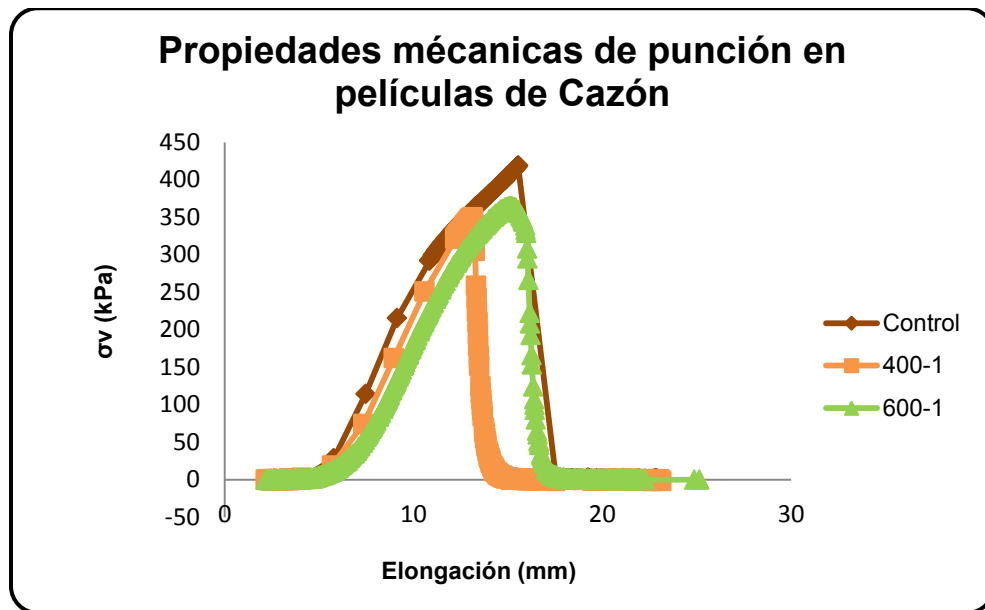
*Letras iguales (a,c) no existe diferencia significativa entre las películas de cazón por columna con $\alpha = 0.05$

⁺ Castañeda, K., 2011

Los espesores de las películas de cazón analizados en esta tabla, no presentan diferencia significativa. En el esfuerzo verdadero entre las tres películas no existe diferencia significativa, por lo que las tres películas requieren la misma fuerza para ser penetradas. Lo mismo sucede con la deformación, ya que ninguna presenta diferencia significativa.

Las películas control, 400-1 y 600-1 estadísticamente presentan la misma elongación y esfuerzo máximo, por lo que las tres películas requieren la misma fuerza para ser penetradas así como su deformación. Las películas 400-1 y 600-1 oponen mayor resistencia a ser deformadas en comparación con la película control.

Comparando con películas de cazón y raya, éstas presentan menor fuerza para ser penetradas y una menor deformación, pero presentan una elasticidad mayor que las películas control, 400-1 y 600-1, estas diferencias tal vez se deban a que los espesores de las películas reportadas en la bibliografía son más gruesas.




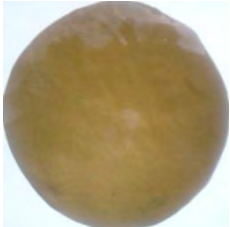



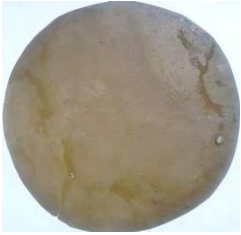
Gráfica 7. Evaluación de las propiedades mecánicas de punción en películas de cazón

En la gráfica 7 se muestra la relación esfuerzo verdadero en función de la elongación de cada película mostrando que la película control presenta un esfuerzo mayor y las tres películas tienen la misma elongación.

En la tabla 11 se presentan algunas imágenes de películas de piel de cazón y robalo, describiendo sus características físicas.

Tabla 11. Características físicas de las películas formadas a partir del precipitado de las pieles de cazón y robalo sometidas a altas presiones hidrostáticas.

Películas	Imagen	Observaciones
Cazón Control		Película de espesor uniforme, translúcida y flexible; de color ámbar y con olor ligeramente a pescado.
Cazón 400-1		Película de espesor uniforme, translúcida y flexible; de color ámbar y con olor ligeramente a pescado.
Cazón 600-1		Película de espesor uniforme, translúcida y flexible de color ámbar, presenta ramificaciones de color café en toda la superficie y con olor ligeramente a pescado.
Robalo Control		Película de espesor uniforme, opaca y ligeramente flexible de color café - grisácea y con olor ligeramente a pescado. Presenta una superficie ligeramente grasosa.
Robalo 400-1		Película de espesor uniforme, opaca, quebradiza y ligeramente flexible, de color café - grisácea y con olor ligeramente a pescado. Presenta una superficie ligeramente grasosa.

<p>Robalo 400-5</p>		<p>Película de espesor uniforme, opaca, quebradiza y ligeramente flexible, de color café- grisácea y con olor ligeramente a pescado. Presenta una superficie ligeramente grasosa.</p>
<p>Definiciones de las características que se les atribuye a las películas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Opaca: Impide el paso a la luz • Flexible: Que tiene disposición a ser deformada fácilmente • Quebradizo: Fácil de fracturarse, menor resistencia a ser deformado • Transparente: Cuerpo a través del cual pueden verse los objetos claramente • Translúcido: Cuerpo que deja pasar la luz, pero que no deja ver nítidamente los objetos. 		

Para las películas de cazón como se observan en la tabla 11, estas son en general de color ámbar lo que permiten el paso de la luz, son flexibles, presentan un ligero olor a pescado el cual es una característica no deseable en las películas. Las películas elaboradas con proteínas extraídas con la aplicación de 600 MPa durante 1 minuto a simple vista se observan ramificaciones las cuales aumentan sus propiedades mecánicas de extensión.

En las películas de robalo son en general opacas, quebradizas, tu textura es lisa pero grasosa, la deformación en general es menor en comparación con las películas de cazón, por lo que tienden a deformarse fácilmente. Son de color café grisáceo lo que no permite el paso de la luz a través de ellas.

5.4.3. Evaluación del efecto de la alta presión hidrostática en las propiedades de barrera en películas de piel de cazón

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es la medida que tiene un material para ser penetrado con facilidad por el vapor de agua. Esta medida es importante conocerla, ya que permite seleccionar películas que tendrá una barrera al vapor de agua aceptable para cierto tipo de alimento.

En la tabla 12, se presentan los datos obtenidos de la prueba de PVA sobre las películas a base de proteína extraída con y sin altas presiones hidrostáticas de piel de cazón, estos datos se comparan con resultados obtenidos en películas formadas de proteínas de piel de pescado de distintas especies .

Tabla 12. Efecto de APH en la formación de películas de cazón en las propiedades de PVA.

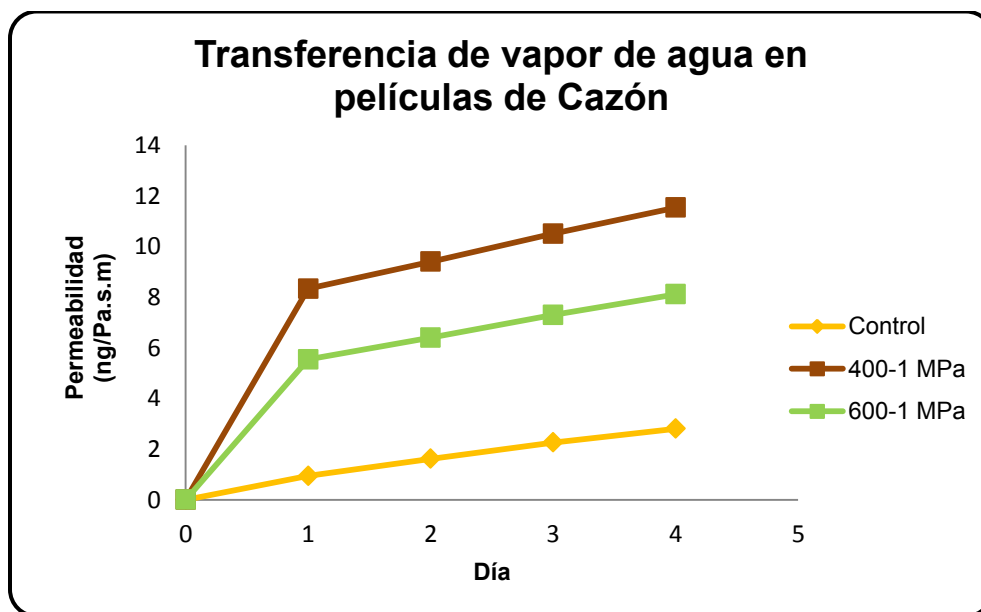
Piel	Dosis	Espesor (mm)	Permeabilidad (ng/ Pa·s·m)
Cazón	Control	0.1351 ± 0.01 ^a	3.12 ± 5.38x10 ⁻¹⁰ ^a
	400-1	0.1237 ± 0.01 ^a	11.54 ± 1.23x10 ⁻⁹ ^b
	600-1	0.1253 ± 0.01 ^a	8.11 ± 2.78x10 ⁻⁹ ^c
Raya +	-----	0.184 ± 0.29	0.0016 ± 7.68x10 ⁻⁵
Mero *	-----	0.326 ± 0.17	0.164 ± 7.23x10 ⁻⁵

*Letras iguales (a,c) no existe diferencia significativa entre las películas de cazón por columna con $\alpha = 0.05$
+ Castañeda, K., 2011

*Granados y Martínez, 2010

El espesor de las películas de cazón no presentan diferencias significativa, en la película control hay menor permeabilidad en comparación con las películas elaboradas con proteínas extraídas con altas presiones, estas películas presentan una mayor permeabilidad al vapor de agua, aumentando la transferencia de vapor de agua en películas a 400-1 en comparación con la película de 600-1.

Para las películas de raya y mero, estas tienen una permeabilidad muy por debajo de las películas de cazón, estas diferencias podrían ser por el tipo de especie, la concentración de iminoácidos, los enlaces no covalentes, la temperatura de extracción, etc. También estas diferencias podrían deberse a que los grupos terminales de las proteínas de cazón tengan una menor afinidad con los grupos OH del plastificante, y esto genere fisuras o poros que permitan el libre paso de las moléculas de agua del medio.



Gráfica 8. Evolución de la permeabilidad al vapor de agua en películas de cazón

En la gráfica 8 se muestra la transferencia de vapor de agua, para las películas de cazón, las cuales tienen un aumento gradual en la permeabilidad, la película control presenta una menor permeabilidad en comparación con las películas de 400-1 y 600-1, siendo la de mayor permeabilidad la película 400-1.

La disminución en la permeabilidad de vapor de agua en las películas control, se puede deber a que los grupos mayoritariamente expuestos son de tipo hidrofílicos, estos grupos tienen una mejor afinidad con el plastificante por los hidroxilos y esto genera un decremento de vapor de agua.

Las películas 400-1, tienen una mayor difusión en la permeabilidad de vapor de agua, y esto puede deberse a que los grupos mayormente expuestos son de tipo hidrofóbicos, los cuales no interaccionan con el hidroxilo del plastificante generando poros en los que haya el paso del vapor de agua.

6. CONCLUSIONES

Las proteínas son el componente primordial para este estudio, por ello se utilizó la piel de pescado, obteniendo un rendimiento para la piel de cazón del 31.29 % y para la piel de robalo 26.54 %.

La temperatura es el primer medio físico que se modificó para la extracción de proteína, obteniendo a 50 °C mayor cantidad de proteína solubilizada y mayor cantidad de proteínas precipitadas. Este aumento en la cantidad de proteína solubilizada mejoró los rendimientos de extracción, para cazón 18.51% y para robalo 13.38%, respecto a los rendimientos de tesis previas en donde los valores van del 6% hasta el 12%.

Para las películas elaboradas con proteínas extraídas a 50 °C, en sus propiedades mecánicas de extensión estas requieren mayor fuerza para ser deformadas, presentan mayor elasticidad (oponen mayor resistencia a ser deformadas) y la deformación máxima es la misma para los tres tipos de películas evaluadas.

La temperatura de extracción, modifica las moléculas proteicas, generando una desnaturalización proporcional al aumento en la temperatura y estas proteínas extraídas alteran las propiedades mecánicas de extensión en las películas formadas.

El aumento en el pH alcalino del medio de extracción para la piel de robalo, incrementa la cantidad de proteína solubilizada de 13.38 % a 21.18 % al pasar de pH 12 a 13.8, estas modificaciones en las estructuras proteicas generan un cambio en las propiedades de barrera de las películas formadas a partir del precipitado obtenido.

Las películas formadas con proteínas extraídas a pH 13.8 presentan un incremento en la permeabilidad de vapor de agua, siete veces mayor que las formadas con proteínas extraídas a pH 12., esto posiblemente generado por las interacciones débiles entre las regiones de las proteínas con los hidroxilos del

plastificante; estas interacciones posiblemente formen poros, los cuales permitan el paso de las moléculas de agua.

La aplicación de altas presiones hidrostáticas incrementan los rendimientos de extracción de la proteína soluble en relación directa, lo mismo pasa con el tiempo de exposición. Las condiciones con mayores rendimientos para la piel de robalo fueron la presión a 400 MPa con la aplicación de 10 minutos (21.76%) y a 600 MPa con un tiempo de exposición de 5 minutos (28.41%) en la piel de robalo.

Para la piel de cazón sucede lo contrario, ya que la aplicación de las altas presiones disminuye los rendimientos de extracción, obteniendo a 400 MPa- 1 minuto 14.33% y a 600 MPa – 1 minuto 12.12 %. Esto posiblemente se deba a que las interacciones en la piel de cazón no se vean modificadas con la aplicación de las altas presiones, ya que tal vez el colágeno presenta una configuración más compacta, en la cual la alta presión no afecta durante la compresión o durante la descompresión exista un reorden de estas proteínas.

Las propiedades mecánicas de las películas formadas con las proteínas precipitadas extraídas con altas presiones, en sus propiedades de extensión se tiene una disminución de la fuerza para ser fracturadas y una menor deformación. Para la prueba de punción las películas con y sin altas presiones requieren la misma fuerza para ser fracturadas y presentan la misma deformación. Lo único que aumenta con la aplicación de las altas presiones es la resistencia que oponen para ser deformadas. En las propiedades de barrera se tiene un incremento en la permeabilidad en películas formadas de proteínas extraídas con altas presiones.

Para obtener una mayor extracción de proteína se debe de aplicar la temperatura de 50 °C con un ajuste del pH 12.0. Con respecto a las altas presiones, si se quiere tener mayor cantidad de proteína precipitada se debe de aplicar una presión de 400 MPa con un tiempo de exposición de 5 minutos.

Para el caso de la piel de cazón no se recomienda trabajar con altas presiones ya que no hay un aumento en la extracción de proteínas o se recomienda que se

apliquen presiones más altas y prolongar el tiempo de exposición para observar un aumento en los rendimientos de extracción de las proteínas.

7. REFERENCIAS

- AOAC Official Method 950.46 (1995). Moisture in meat. Drying in vacuo at 95- 100 °C. AOAC International.
- AOAC Official Method 981.10 (1995). Crude protein in meat. Block digestion method. AOAC International.
- AOAC Official Method 991.36. (1995). Fat (crude) in meat and meat products. Solvent extraction (submersion) method. AOAC International.
- AOAC Official Method 938.08. (1995). Ash of seafood. AOAC International.
- ASTM E96-95 (2002). Standard of method for water vapor transmission of materials, 1995. Annual book of ASTM Standards, ASTM International (EUA). Vol. 04-06.
- ASTM D618-00. (2003). Standard practice for conditioning plastics for testing. Vol. 8.01, 36-39.
- ASTM D882-97. (2003). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Vol. 8.0, 163-171.
- Averous, L., and Boquillón, N., 2004. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours, *Carbohydrate polymer*, 56: 111-112.
- Belitz, H. D. G., W., 1999. *Food Chemistry*. 2nd ed. Berlin, Germany Springer-Verlag.
- Beltrán, E., Pla, R., Yuste, J., and Mor-Mur, M., 2002. Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: Role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat science*, 64:19-25.
- Castañeda, K., 2011. Desarrollo y evaluación de propiedades de películas de proteína de la subclase *Elasmobranchii*. Tesis de la Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
- Cheftel, J. C., 1992. Effect of high hydrostatic pressure on food constituents: An overview. *High pressure and biotechnology*, Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., and Masson, P. (Ed), 195-209.

- Cheftel, J. C., and Culliolli, J., 1997. Effect of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 3: 211-236.
- CONAPESCA, Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, 2011.
- Daoudi, L., 2004. Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el gazpacho y zumo de uva. *Tecnología de los alimentos*.
- El Robalo. Avances tecnológicos para su crianza. Sergio Escarcéga Rodríguez. AGT, 2005. pp 1-12.
- Fernández- Martín, F, Pérez- Mateos, M. and Montero, P., 1998. Pressure / heat combinations on bluewhiting (*Micromesitius poutassou*) thermal and mechanical behaviour. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46 (8), 3257- 3264.
- Granados, S. y Martínez, C. 2010. Aprovechamiento de proteínas se pescadería del género *Epinephelus* para la obtención de películas modificadas. Tesis de la Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.
- Gekko, K., and Koga, S., 1968. The effect of pressure on thermal stability and vitro fibril formation collagen. *Agriculture and Biological Chemistry*, 47: 1027-1033.
- Gennadios, A., McHugh, T. H., Weller, C. L., y Krochta, J. M. 1994. Edible coatings and films based on proteins. In Krochta, J. M. (Ed), *Edible coatings and films to improve food quality* (pp 201-303) Lancaster: Technomic.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., Montero, P., 2005. Extraction of gelatin from fish skins by high pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, 19: 923-928.
- Hamm, R., 1960. Biochemistry of meat hydration. *Advances in Food Research*, 10: 355-423.
- Hayashi, R., 1992. Utilization of pressure in addition to temperature in food science and technology. *High pressure and biotechnology*, 185-193. (Eds), Balny, C., Hayashi, R., Hermans, K., and Masson, P., John Libbey Eurotext, Montrouge.

- Hector, S., Acosta, H., y Velasco, J., 2007. Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. Revisión bibliográfica. Departamento de Agroindustria, Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Heremans, K., 1995. High Pressure effects on biomolecules. In Ledward, D. A., Johnston, D. E., Earnshaw, R. G., and Hasting, P. M. (Eds), High pressure processing of food, (81-97.)
- Ju-Yeon Kim, Cheol-Kyun Jung, Do-Hyeong Kim, and Seon- Bong Kim, 2011. Properties of edible biofilm manufactured from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin. Korean Journal Chemical Engineering, 10: 608-737.
- Kelleher, S. D., Hultin, H. O., Functional chicken muscle protein isolates prepared using low ionic strength, acid solubilization, precipitation. Reciprocal Meat Conf. Proc., 2000, 53: 76-81.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. & Shahidi, F. (2010). Isolation and characterization of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chemistry* 119, 1519-1526.
- Krochta, J. M., and De Mulder, C., 1996. Biodegradable polymers from agricultural products in agricultural materials as renewable resources. American Chemical Society: 120-140.
- Krochta, J. M., 2002. Edible coatings and films to improve food quality. Ed. CRC Press.
- Kwiatkowska, A., Jankowska, B., and Korzeniowski, W., 2001. Changes in solubility of the bovine semitendinosus muscle collagen under the influence of high pressure. Polish Journal of Food Nutrition Science, 10/51(4): 35-39.
- Lee, K., Shim, J., Lee, H., 2004. Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. Carbohydrate polymer: 56: 251-254.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., 1955. Protein measurement with Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275,

- Ludikhuyze, L., Claeys, W., Hendricks, M. E., 2000. Combined pressure temperature inactivation of alkaline phosphatase in bovine milk: a kinetic study. *Journal of Food Science*, 65, 155-160.
- Magali Parzanese. *Tecnología para la industria alimentaria. Películas y recubrimientos comestibles.*
- Masson, P., 1992. Pressure denaturation of proteins. In Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., and Masson, P., *High pressure and biotechnology*, 224: 89-99.
- Messens, W., Van Camp, J. and Huyghebaert, A., 1997. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 8, pp 107-112.
- Miranda, S. P., Cárdenas G., López D., y Lara – Sagahon, V., 2003. Comportamiento de películas de quitosano compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 47.
- Modelo Insumo-Producto. *UJAT*, 2007, pp 402-423.
- Moscoso, J., 2009. Estudio de biopelículas de compositos de colágeno de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y quitosina.
- Oakland, H., Stokness, J., Remme, J., Kjerstad, M. & Synnes, M. (2005). Proximate composition, fatty acid and lipid class composition of the muscle from deep-sea teleosts and elasmobranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140, 437-443.
- *Química de los alimentos.* Owen R. Fennema. Ed. Acribia, segunda edición. pp 384-475. (2002)
- *Química de los alimentos. Mecanismos y teoría.* Dominic W. S. Wong. Editorial Acribia S.A. Zaragoza (España), 1995. pp 53-116.
- Rayas, J. A., Rodríguez, V., y Martínez, A. 2003. Medición de módulo de Young en el hule látex usando ESPI. *Revista Mexicana de Física*, Diciembre.
- Rosenthal, J., 2001. *Textura de los alimentos: Medida y percepción.* Editorial Acribia, Zaragoza (España).

- Suzuki, A., Watanabe, M., Ikeuchi, Y., Saito, M. and Takahashi, K., 1993. Effects of high pressure treatment on the ultrastructure and thermal behaviour of beef intramuscular collagen. *Meat Science*, 35, 17-25.
- Saavedra, N., Algecira, A., Néstor, A., 2010. Evaluación de películas comestibles de almidón de yuca y proteína aislada de soya de la conservación de fresa. *Publicación científica en ciencias biomédicas (8/14):171-182.*
- Sebti, I., Chollet, E., Degraeve, P., Noel, C., y Peyrol, E. 2007. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMO and/or chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3): 693-699.
- Suyatma, N. E., Copinet, A., Tighzert, L., Coma, V. 2004. Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly. *Journal of polymers and the Enviroment* , 12(1): 1-6.
- Srinivasa, P. C., Ravi, R., Tharanathan, R. N. 2007. Effect of storage conditions on the tensil properties of eco-friendly chitosan films by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 80(1): 184-189.
- Tharanathan, R. N., 2003. Biodegradable films and compositte coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology*, 14: 71-78.
- Villada, S., Acosta, A. and Velasco, J., 2007. Biopolymers naturals used in biodegradable packaging. *Temas agrarios*, vol 12:(2), Julio- Dic, pp 5-13.
- Wang, Y., Rakotonirainy, M., Papua, W., 2003. Thermal behavior of zeína base biodegradable films. *Starch/ starke*, 55: 25-29.
- Xiong, Y. L. Structure function relationships of muscle proteins, In *Food Proteins and their applications*; Damodaran, S., Paraf, A. Eds., Markel Pekker: New York, 1997; pp 341-392.
- Yuca, P., Wu Yin, W., and Tanaka, M., 2007. Effect of pH on the formation of edible films made from the muscle proteins of Blue marlin (*Makaira mazara*). *Food Chemistry*, 100: 914-920.
- [http:// www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_MX/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_MX/es)