



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE FUNCIONALIZACIÓN DE COLÁGENO DE MERO (*EPINEPHELUS
MORIO*) CON OPCIÓN A USARSE COMO EMPAQUE ACTIVO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

César Alejandro Villeda Peñaloza.



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



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: María de los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Profesor: Alberto Tecante Coronel.

SECRETARIO: Profesor: Hiram Fernando Ramírez Cahero.

1er. SUPLENTE: Profesor: Alejandro Zavala Rivapalacios.

2° SUPLENTE: Profesor: Gustavo Lozano Vazquez.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 323, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

María de los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTE (S):

Villeda Peñaloza César Alejandro

Contenido	
Resumen	i
Introducción	1
Objetivo general	2
Objetivos particulares	2
Capítulo I Antecedentes	3
1.1 Mero	3
1.2 Colágeno	4
1.2.1 Estructura del colágeno	4
1.3 Formación de Películas	7
1.4 Películas comestibles	8
1.4.1 Definición de películas comestibles	8
1.4.2 Películas de proteína	8
1.4.3 Películas de colágeno	10
1.4.4 Películas activas.....	10
1.5 Unión covalente de antioxidantes vía enzimática	11
1.6 Pruebas mecánicas	11
1.6.1 Aspectos generales de las pruebas mecánicas.....	11
1.6.2 Fuerza de tensión	12
1.6.3 Fuerza de punción	12
1.7 Pruebas de permeabilidad	12
1.7.1 Permeabilidad al vapor de agua	13
1.7.2 Permeabilidad al oxígeno	13
1.8 Estudios Previos	14
1.8.1 Extracción de proteína en piel de cazón (<i>Galeorhinus galeus</i>)	14
Capítulo II Desarrollo Experimental	15
2.1 Extracción de proteína	16
2.2 Determinación de polifenoles	18
2.3 Determinación de poder antioxidante por el método de capacidad secuestradora sobre el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) [ABTS]	19
2.4 Pruebas mecánicas	20
2.4.1 Acondicionamiento	20
2.4.2 Prueba de resistencia a la tensión.....	20

2.4.3 Prueba de resistencia a la punción	20
2.5 Permeabilidad al vapor de agua	22
2.6 Permeabilidad al oxígeno	23
2.7 Electroforesis.....	25
2.8 Secuenciación de aminoácidos	26
2.9 Espectrometría de masas	26
2.10 Procesamiento de datos e identificación de proteína	28
2.11 Resonancia Magnética Nuclear	28
2.12 Análisis estadístico	28
Capitulo III Resultados	30
3.1 Análisis Químico Proximal	30
3.2 Rendimientos de Extracción.....	31
3.3 Electroforesis.....	32
3.4 Secuenciación de aminoácidos	34
3.5 Elaboración de películas.....	35
3.6 Capacidad antioxidante.....	36
3.7 Pruebas mecánicas (Extensión)	37
3.7.1 Esfuerzo Máximo.....	37
3.7.2 Módulo de Young	38
3.8 Pruebas mecánicas (punción).....	40
3.8.1 Esfuerzo Máximo.....	40
3.8.2 Módulo de Young	41
3.9 Pruebas de permeabilidad al vapor de agua (PVA)	42
3.10 Permeabilidad al oxígeno	44
3.11 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-H)	45
4. Conclusiones	47
5 Bibliografía.....	49

Resumen

El presente estudio consistió en la elaboración de películas con base en extractos de proteína (colágeno) de mero (*Epinephelus morio*) con el uso de los plastificantes glicerol y sorbitol, a las que se añadió en su preparación, por separado, los antioxidantes ácido gálico y quercetina, mediante una reacción enzimática, con el objetivo de obtener películas con potencial uso como empaque de alimentos, evaluándose propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y oxígeno. También se elaboraron películas con ácido gálico y quercetina adicionados sin utilizar la reacción enzimática.

Las películas se compararon con una película control, que se preparó a partir del mismo concentrado proteínico sin antioxidante, así como con una muestra comercial (bolsa Ziploc), y con una película con el antioxidante *terc*-butilhidroquinona (TBHQ) adsorbido. Finalmente se comparó el efecto de los antioxidantes respecto a la resistencia a la penetración física, así como sus propiedades de permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua.

En conclusión las películas adicionadas con antioxidantes ya sean de manera adsorbida (TBHQ) o unido químicamente por medio de reacción enzimática (ácido gálico y quercetina) presentan mayor resistencia a la deformación y a la ruptura que la bolsa ziploc así como, menor permeabilidad al oxígeno pero con propiedad antioxidante por lo cual se consideran como un material con potencial a utilizarse como empaque primario en la industria alimenticia

Introducción

En la actualidad, se observa una tendencia mundial hacia el uso de materiales biodegradables, a causa de la alta cantidad de desechos plásticos y la disminución de las reservas petroleras.

Una alternativa es la síntesis de empaques utilizando como materia prima diferentes biopolímeros que cumplan con las mismas características que un empaque convencional utilizado en la industria alimenticia, pero con el beneficio de ser biodegradables, evitando o minimizando posibles daños ambientales.

Las películas activas representan una manera innovadora de empacar productos alimenticios, debido a que, además de actuar como barrera protectora, pueden ofrecer beneficios o funciones adicionales tales como la inhibición de la oxidación lipídica y del crecimiento microbiano. Los empaques antioxidantes se clasifican como empaques activos y constituyen una técnica muy prometedora para la preservación y extensión de la vida de anaquel de diferentes productos alimenticios (López-De-Discastillo et al., 2012).

Para la obtención de películas activas, actualmente se están realizando diversas investigaciones a partir de macromoléculas como lípidos, carbohidratos y proteínas, además de la adición de plastificantes como polioles y de diversas sustancias que les brindan una mejor funcionalidad como barrera física y permeabilidad al vapor de agua y oxígeno, empezando a ser, progresivamente, de mayor interés económico para la industria alimenticia, por ello, en este estudio se plantea desarrollar una película proteínica con actividad antioxidante que permita la protección física y química de productos alimenticios.

Objetivo general

Elaborar un biopolímero a base de proteína de mero (*Epinephelus morio*) con adición de un antioxidante por medio de una reacción enzimática, para evaluar sus propiedades mecánicas, de permeabilidad y su posible uso como empaque activo primario en alimentos.

Objetivos particulares

- Evaluar la formación de las películas a partir de proteína de mero y antioxidantes con adición de sorbitol y glicerol como agentes plastificantes, para determinar las concentraciones de sorbitol y glicerol necesarias para la formación de las películas.
- Medir las propiedades mecánicas: fuerza de fractura en punción y fuerza de fractura en tensión de las películas de mero con antioxidante añadido mediante reacción enzimática, para compararlo con referencias comerciales y controles sin antioxidante y con antioxidante adsorbido *tert*-butilhidroquinona (TBHQ).
- Medir las propiedades de permeabilidad al vapor de agua y oxígeno de las películas obtenidas, para conocer sus propiedades de barrera a estos componentes.

Capítulo I Antecedentes

1.1 Mero

La familia *Serranidae* incluye peces óseos de hábitos marinos, por lo común son carnívoros y hermafroditas, y varían entre tallas de menos de 10 cm y más de 2 m. Existen más de trescientas cincuenta especies, repartidas en dos subfamilias: *Epinephelinae*, que incluye peces de talla pequeña o muy grande, y *Serraninae* para numerosas formas de talla pequeña a mediana.

El mero (*Epinephelus morio*) es uno de los serránidos más comunes del Golfo de México, con dos centros de abundancia: uno en la costa occidental de la Florida y otro en la península de Yucatán. El mero de las costas de México es una de las especies de importancia comercial; su captura anual promedio es de 7769 toneladas. Es un recurso compartido internacionalmente por las flotas mexicanas (mayor y menor) y cubana, y su pesquería constituye el medio de vida de muchos pescadores de la costa de Yucatán. *Epinephelus morio*, como otros serránidos de importancia comercial, desempeña el papel de máximo depredador en la trama alimentaria, pues consume una amplia variedad de presas, sobre todo peces y crustáceos. La mayoría de estos serránidos habitan en substratos duros de relieve alto y complejo, lugar donde se encuentran sus alimentos preferidos. (Smith, 1978; Johnson, 1983; Nelson, 1984).

1.2 Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante de origen animal (Muyonga et al., 2004), que constituye aproximadamente 25–30% de todas las proteínas de los organismos animales (Bae et al., 2008). Es un componente importante de todos los tejidos conectivos del cuerpo (músculos, dientes, huesos y piel), pero se concentra especialmente en los tejidos asociados a la piel y los huesos, también se encuentra en el tejido intersticial de prácticamente todos los órganos, y su función es mantener su estructura e integridad (Gelse et al., 2003).

1.2.1 Estructura del colágeno

El colágeno se caracteriza por tener una estructura interna de triple hélice llamada tropocolágeno, que interaccionan entre sí mediante puentes de hidrogeno, de ahí su alta resistencia y propiedades de retención de humedad. La principal función del colágeno es, como se ha indicado, sostener la estructura de los tejidos animales y mejorar la fuerza, resistencia y flexibilidad de los tejidos. Cuando el colágeno va perdiendo la calidad y cantidad disminuye su elasticidad, también se presenta fragilidad en uñas, pérdida de la elasticidad del cabello, aparición de manchas tipo lunar en brazos y manos, endurecimiento de los tejidos y las válvulas cardiacas, fragilidad de los discos intervertebrales y desgaste de meniscos. (Vasudevan et al., 2011)

El tropocolágeno tiene un peso molecular de 285 kDa. Está formado por tres cadenas polipeptídicas, que pueden ser de tipo α o β . Dependiendo de las variaciones de aminoácidos, hay 19 tipos de colágeno. El tipo I es la forma más abundante. Se observa en los tejidos conectivos de casi todas las regiones del

cuerpo humano. El tipo II es principalmente visto en el cartílago y en el humor vítreo, el tipo III es visto en la piel, pulmón y tejido vascular y el tipo IV es visto en las membranas basales. Otros son vistos en cantidades menores. Cada cadena polipeptídica del colágeno tiene cerca de 1000 residuos de aminoácidos. La composición de éstos es característica: glicina 33%, prolina 12-20%, 4-hidroxi prolina 10%, y 5-hidroxisilina, generalmente en menor proporción, carece de cisteína y su proporción de triptófano es muy pequeña. En cuanto a la estructura primaria de las cadenas polipeptídicas que forman el tropocolágeno, es muy regular y periódica: uno de cada tres residuos es Glicina (Gly); y además la secuencia Glicina-Prolina-Hidroxi prolina (Gly-Pro-Hyp) se repite con frecuencia. (Figura 1) Esto es así porque el interior de la superhélice dextrógira del tropocolágeno es muy compacta, el único residuo que puede situarse en una posición interior es la glicina. (Garrido et al., 2006)

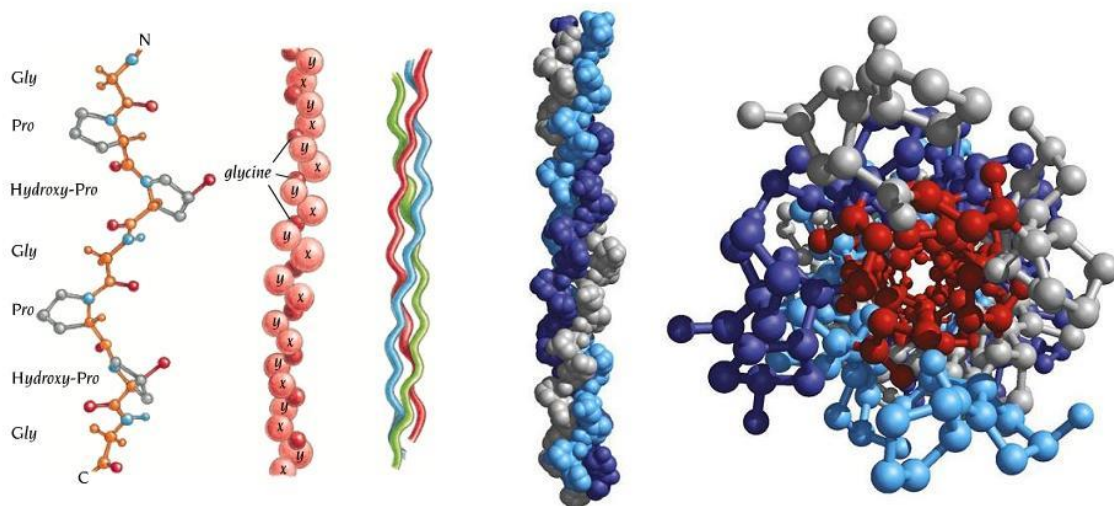


Figura 1. Estructura del colágeno.

En virtud de sus características, el colágeno es de gran importancia en el campo de los biomateriales y en la industria farmacéutica y cosmética. En el campo de los biomateriales, resaltan las propiedades mecánicas del colágeno por su aplicabilidad en la ingeniería de tejidos, demostrándose mediante algunos estudios que las esponjas de colágeno permiten la adhesión celular y proliferación de células específicas (Lu et al., 2004). En el sector cosmético se ha utilizado para la prevención y tratamiento de arrugas, en la producción de parches para heridas y en el desarrollo de medicamentos con liberación de principios activos.

Inicialmente, el colágeno se obtenía de origen porcino y bovino, pero la comunidad científica buscó nuevas fuentes de extracción de la proteína debido al rechazo generado por las enfermedades bovinas que pueden transferirse a los humanos, y las creencias de carácter religioso. Una fuente que actualmente se estudia es la piel de pescado, producto del proceso de fileteo de diferentes especies marinas como *Epinephelus morio*, entre otras. Los piscicultores y comerciantes consideran estas pieles como desechos (Serrano, 2011), sin embargo, pueden ser aprovechadas para la síntesis de películas proteínicas a base de colágeno para sustituir capas de otros polímeros, con el fin de cuidar el medio ambiente que, como se ha mencionado, es hoy una de las principales preocupaciones de las industrias que evitan generar materiales contaminantes.

1.3 Formación de Películas

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

Los plastificantes son un factor muy importante en la formulación de películas comestibles ya que afectan sus propiedades mecánicas y su permeabilidad. Éstos reducen las fuerzas intermoleculares entre las cadenas de polímeros e incrementan el volumen libre, en consecuencia, existe más espacio para que las moléculas de agua migren, produciendo un decremento en la fuerza de cohesión y en la tensión. El plastificante debe de ser miscible con el polímero (Bertuzzi, 2002).

Un plastificante es definido como una molécula de bajo peso molecular, de baja volatilidad y de naturaleza química similar a la del polímero formador de la película. La adición del plastificante al material polimérico lleva a la modificación de las fuerzas intermoleculares atractivas, y a un incremento en el volumen libre y en la movilidad de las cadenas polipeptídicas (Bourtoom et al., 2006).

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

Las proteínas son interesantes como biomateriales, debido a su estructura específica basada en veinte aminoácidos, que les confiere una amplia diversidad de propiedades funcionales, entre ellas la formación de películas.

1.4 Películas comestibles

1.4.1 Definición de películas comestibles

Una película comestible es una capa delgada y continua, hecha a partir de materiales que pueden ser ingeridos por los seres humanos, además proveen una barrera física contra la humedad, oxígeno y dispersión de solutos hacia el material que está en el interior del empaque. Las películas biodegradables hechas a partir de polímeros naturales ofrecen protección y conservación a los alimentos y también se han utilizado como una alternativa para la disminución de la contaminación y problemas ambientales (Guilbert, 1986).

Las películas comestibles pueden ser aplicadas a una gran variedad de alimentos, utilizándose también para prevenir el deterioro de los componentes, mezclas y migración de solutos en alimentos como pizzas, pavs y dulces. Estas películas pueden funcionar con agentes añadidos como antibacterianos y agentes antioxidantes.

1.4.2 Películas de proteína

En su estado natural las proteínas, se clasifican como proteínas fibrosas, que son insolubles en agua y sirven como el principal material estructural de tejidos animales, y en proteínas globulares, las cuales son solubles en agua o en simples soluciones salinas o ácidas (Scope, 1994).

Las proteínas fibrosas extensas están asociadas fuertemente unas con otras generalmente mediante enlaces de hidrógeno, para formar fibras. Las proteínas globulares se pliegan en estructuras esféricas complejas unidas entre sí por la combinación de interacciones de hidrogeno, iónicas, hidrofóbicas y covalentes tales

como puentes disulfuro (Scope, 1994). Sus propiedades físicas y químicas dependen de la cantidad e identidad de los aminoácidos constituyentes y de su ubicación dentro de las cadenas de proteína. Algunas proteínas globulares incluyendo las del gluten de trigo, zeína de maíz, proteínas de soya y proteínas del suero lácteo se han estudiado por su propiedad de formar películas.

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

Generalmente las proteínas deben ser desnaturalizadas por acción del calor, ácido, base y/o solventes con el objetivo de extender las estructuras que son requeridas para la formación de películas. Una vez extendidas las cadenas de proteína, pueden asociarse nuevamente mediante interacciones de puentes de hidrógeno, iónicas, hidrofóbicas y covalentes. Las interacciones cadena-cadena son afectadas por el grado de extensión de la cadena proteínica, y por la naturaleza y secuencia de los aminoácidos. La distribución uniforme de interacciones polares, hidrofóbicas, y puentes disulfuro a lo largo de la cadena, incrementa la afinidad de estas interacciones. Mientras más fuertes sean las interacciones a lo largo de la cadena se tendrá como resultado una película más fuerte, pero menos flexible y menos permeable a gases, vapor de agua, y líquidos (Kester y Fennema, 1986). Los polímeros que contienen grupos que se pueden asociar mediante puentes de hidrógeno o interacciones iónicas, dan como resultado películas que son excelentes barreras al oxígeno pero susceptibles a la humedad (Salame, 1986). Así, se ha pensado que estas películas proteínicas son buenas barreras contra el oxígeno,

pero a baja humedad. En consecuencia, varios tipos de proteína se han utilizado en la fabricación de películas comestibles, tal es el caso de gelatina, caseína, proteínas de suero de leche, zeína de maíz, proteína de soya, gluten de trigo y proteína de cacahuete (Gennadois et al., 1993; Bourtoom, 2008).

1.4.3 Películas de colágeno

Las películas obtenidas a partir de colágeno se han utilizado también para embutidos, ya que presentan una buena barrera frente a los gases y buenas propiedades mecánicas (Lacroix y Cooksey, 2005). Con la hidrólisis alcalina parcial del colágeno con temperaturas de aproximadamente 60°C, se obtiene la gelatina, que también puede ser utilizada para obtener películas comestibles (Hoque et al., 2011). Este tipo de películas se caracteriza por ser claras, flexibles e impermeables al oxígeno; sin embargo, son muy hidrofílicas, por lo tanto, no presentan buena permeabilidad al vapor de agua (Bourtoom, 2008). De acuerdo con Limpisophon et al. (2010), las películas que se obtienen generalmente presentan elevada permeabilidad al vapor de agua y no muy buenas propiedades mecánicas, por lo cual se deben someter a un proceso de desnaturalización proteínica previo a la formación de la película comestible.

1.4.4 Películas activas

La incorporación de antioxidantes en películas alimentarias se ha vuelto muy popular desde que la oxidación se convirtió en uno de los principales problemas en la descomposición de alimentos (Morales-Aizpurua et al., 2005; Byun et al., 2010). Los antioxidantes butilhidroxianisol (BHA) y el 2,6-di-*terc*-butilhidroxitolueno (BHT) han sido usados en empaques activos. Sin embargo, muchos consumidores no

aceptan su uso porque son compuestos sintéticos, su toxicidad y su supuesto potencial carcinogénico (Bonilla, et al. 2012). Así, los antioxidantes naturales como extractos de plantas son más atractivos para los consumidores. Por lo anterior, la síntesis de empaques activos constituye el principal enfoque o área de interés en el desarrollo de nuevos empaques alimenticios.

1.5 Unión covalente de antioxidantes vía enzimática

La unión covalente del antioxidante a la cadena proteínica se favorece gracias a la participación de la enzima peroxidasa, la cual forma un radical libre en una o varias partes de la proteína y otro radical en la molécula de antioxidante, los cuales se estabilizan mediante una reacción de terminación de radicales libres generando una estructura más estable, y que aún tiene grupos funcionales que pueden actuar como secuestradores o ligantes de radicales libres.

1.6 Pruebas mecánicas

1.6.1 Aspectos generales de las pruebas mecánicas

El comportamiento mecánico de un material refleja la relación entre la fuerza aplicada y la respuesta del material, es decir, su deformación. Algunas de las propiedades mecánicas más importantes son la resistencia, dureza, fragilidad y elasticidad. El método más común para medirlas es aplicar una fuerza y evaluar la deformación (Zaldo et al., 1996).

1.6.2 Fuerza de tensión

La fuerza de tensión se define como la fuerza requerida para que un material se deforme hasta su punto de ruptura, mediante su evaluación también es posible determinar la fuerza aplicada por unidad de área, así como la resistencia a la deformación del espécimen estudiado (Bourne, 1982).

1.6.3 Fuerza de punción

Se define como la fuerza requerida para punzar o traspasar la cubierta de un alimento. La prueba se caracteriza por el empleo de un instrumento midiendo la fuerza, la penetración del alimento que implica un rompimiento irreversible y siendo la profundidad de la penetración generalmente constante. En las pruebas de punción se emplea uno de los instrumentos más simples para medir la textura y es uno de los más usados (Bourne, 1982).

1.7 Pruebas de permeabilidad

La función de una película es actuar como barrera para evitar el intercambio de gases, principalmente oxígeno y vapor de agua, propiedad fundamental para la conservación del alimento, ya que se evita el deterioro del alimento y, por ende, la pérdida de propiedades sensoriales como color, sabor y apariencia. Por ello, dos de las pruebas fisicoquímicas más frecuentes en este tipo de películas son la permeabilidad al vapor de agua (PVA) y la permeabilidad al oxígeno (PO).

1.7.1 Permeabilidad al vapor de agua

La filtración de vapor de agua en el empaque puede causar un aumento en la humedad, lo que puede provocar empañamiento, o incluso crecimiento microbiano en el alimento. Y, por otro lado, si el vapor se escapa del empaque, pueden presentarse pérdidas de humedad del alimento que se reflejarán en cambios no deseados en la textura (Castañeda, 2011).

1.7.2 Permeabilidad al oxígeno

El oxígeno, como se mencionó anteriormente, juega un papel fundamental en lo que al deterioro químico de alimentos se refiere, pero también favorece el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, y aún más preocupante es el hecho de que propicia el crecimiento de microorganismos patógenos. En cuanto al deterioro químico, propicia reacciones de oxidación de lípidos y la propagación de radicales libres, fenómeno conocido como autoxidación, afectando la composición y calidad del alimento (Belitz et al., 2009). Por ello un empaque debe brindar una barrera eficiente que impida el intercambio de oxígeno entre el alimento y el entorno.

1.8 Estudios Previos

1.8.1 Extracción de proteína en piel de cazón (*Galeorhinus galeus*)

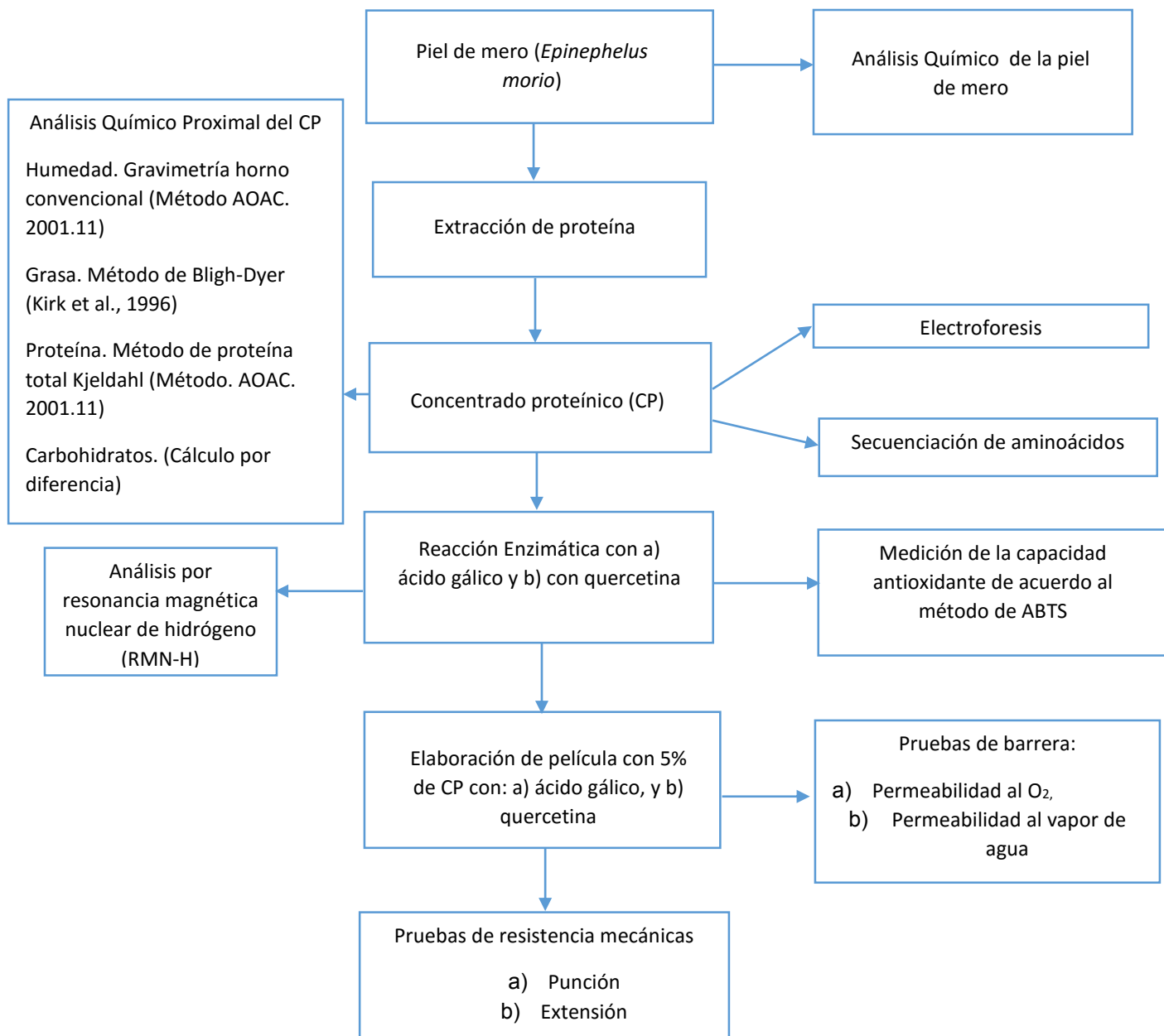
En el grupo de trabajo del laboratorio 323 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM, se realizaron previamente estudios con la piel de cazón. Por ejemplo, Rizo (2014) comparó la influencia de diversos factores extrínsecos como pH, temperatura y fuerza iónica, sobre el proceso de extracción, con la finalidad de incrementar el rendimiento de la proteína de cazón (*Galeorhinus galeus*). En este estudio se concluyó que el método de precipitación isoelectrónico a 45°C y pH 12 fue el tratamiento más eficiente para precipitar la proteína, con un rendimiento de 6.28% respecto a la proteína de la piel. Dicho estudio sin duda representó una base sólida para la realización de la presente investigación, ya que las condiciones óptimas de extracción se tomaron como base.

1.8.2 Obtención de películas modificadas

En otro estudio, realizado por Granados y Martínez (2010), se extrajo selectivamente colágeno de acuerdo con el método informado por Batista (1999), que obtuvo la proteína de piel de mero (*Epinephelus morio*), y evaluó el efecto de los plastificantes en la formación de películas modificadas con sales de calcio como CaSO₄ y CaCl₂ y con D-glucono-δ-lactona.

Capítulo II Desarrollo Experimental

Diagrama general de trabajo



Metodología

2.1 Extracción de proteína

Se pesó 1 kg de piel de mero (*Epinephelus morio*), se lavó hasta eliminar restos de sangre y escamas y se troceó en cuadros de aproximadamente 6 cm por lado. Se realizó la extracción de colágeno por un método que consiste en lavados en NaOH, CH₃COOH y agua a 50 °C informado por Batista (1999) al que se le hicieron algunas modificaciones de pH y tiempo.

Una vez obtenido el concentrado proteínico (CP) se realizó el análisis químico proximal correspondiente. Con base en el contenido total de nitrógeno se realizan los cálculos para llevar a cabo la reacción enzimática, la relación es la cantidad equivalente a 1 g de proteína disuelto en 24 mL de agua, a los que se agrega 1 mg del antioxidante quercetina o ácido gálico, según sea el caso, disuelto en 6 mL de etanol y 1 mL de peroxidasa 0.1 mg/mL; al final, a toda la mezcla se le adicionaron 30 µL de H₂O₂ al 5% (v/v) como catalizador. Los reactivos se colocaron en un matraz bola que se calentó a 50°C con agitación constante durante 1 h.

Una vez terminada la reacción se añadió glicerol y sorbitol a una concentración de 4.5% cada uno y se filtró para evitar grumos en la película. La solución se dejó en un baño de agua caliente a temperatura constante de 60°C para evitar la solidificación. Después de verificar que la solución no contenía grumos, se vertió en moldes de plástico y se dejó reposar de 24 a 72 h, tiempo necesario para que se eliminara el exceso de agua y solvente de las películas.

Los cálculos realizados para hacer las películas se presentan a continuación.

Para elaborar una película es necesario llenar un molde plástico con una cantidad de 40 mL de la mezcla de reacción de proteína y antioxidante más plastificante, es por ello que se parte de la fórmula mostrada, sabiendo que las películas requieren una concentración de 5% de proteína, y el contenido promedio de proteína en el CP es 25.04 %:

$$\text{Ecuación 1) } 40 \text{ mL} \left(\frac{5 \text{ g de proteína}}{100 \text{ mL}} \right) \times \left(\frac{100 \text{ g de CP}}{25.04 \text{ g de proteína}} \right) = 8 \text{ g de CP o pellet}$$

En la Ecuación 1 se necesitan 8 g de CP para la realización de una película de colágeno al 5%.

Esta cantidad de CP se solubilizó en 24 mL de agua destilada y se hizo reaccionar con 0.1 mg de antioxidante (quercetina o ácido gálico), que se disolvió en 6 mL de etanol. La reacción se llevó a cabo durante 60 minutos, como se menciona en la sección de metodología y posteriormente se plantea la ecuación 2) para el cálculo de plastificante utilizado en la formación de la película. Si la proporción a utilizar es 9 g de plastificante por cada 100 g de CP, de acuerdo con la Ecuación 2, se obtiene:

$$\text{Ecuación 2) } 8 \text{ g de pellet} \left(\frac{9 \text{ g de plastificante}}{100 \text{ g de CP}} \right) = 0.72 \text{ g de plastificantes.}$$

Se utilizaron 0.72 g de mezcla de plastificantes (glicerol y sorbitol) en proporción 50:50 por cada película de colágeno de mero.

2.2 Determinación de polifenoles

Curva patrón

Se disolvió ácido gálico, 0.5 g, en 10 mL de etanol y después se aforó con 100 mL de agua destilada, y se obtuvo una concentración final de 5 g/L. De esta solución se obtuvieron las concentraciones 50, 100, 150, 250 y 500 mg/mL.

Preparación de las muestras.

- 1) Se tomaron 40 μ L de muestra o de solución patrón y se colocaron en tubos de ensayo.
- 2) Se adicionaron 3.16 mL de agua, y posteriormente 200 μ L del reactivo de Folin, se mezcló e incubó de 1 a 8 min a temperatura ambiente, cuidando no rebasar este tiempo.
- 3) Se adicionaron 600 μ L de la solución de Na_2CO_3 , se mezcló e incubó durante 2 h a temperatura ambiente.
- 4) Se leyó a una absorbancia de 765 nm.

De la curva patrón se obtuvo la ecuación 3) para la determinación de polifenoles:

$$\text{Ecuación 3) Absorbancia} = 1.064184 \times 10^{-3} [\text{Polifenoles}] - 0.05032$$

De la ecuación 3 se despeja [polifenoles], se sustituye la absorbancia de la muestra, y se multiplica por el factor de dilución correspondiente en caso de haberla:

$$\text{Despeje, [polifenoles]} = \left(\frac{\text{Abs} + 0.05032}{1.064184 \times 10^{-3}} \right) (\text{Factor de dilución})$$

2.3 Determinación de poder antioxidante por el método de capacidad secuestradora sobre el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) [ABTS]

Obtención del radical [ABTS]

El radical ABTS se obtiene mediante una reacción con 10 mL de una solución de ABTS 7 mM, y 3 mL de K₂S₂O₈ 2.45 mM, se midió la absorbancia y se estandarizó a un valor de 0.7 ± 0.1 y una longitud de onda de 754 nm y se dejó reaccionar a temperatura ambiente en obscuridad.

Análisis de la muestra

Se agregaron 80 µL de un extracto etanólico de la muestra y estándares *terc-butilhidroquinona* (TBHQ) y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2 carboxílico (TROLOX) en una celda reducida para 1 mL, y se leyó el decremento de la absorbancia cada minuto durante 6 min, o hasta obtener un valor de absorbancia constante.

El cálculo se realizó con la ecuación 4) que se presenta a continuación:

$$\text{Ecuación 4) } \left[\frac{\text{Absorbancia Inicial} - \text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia inicial}} \right] \times 100 = \text{C. antioxidante}$$

2.4 Pruebas mecánicas

Método ASTM E 882 (2002)

2.4.1 Acondicionamiento

Antes de la realización de las pruebas mecánicas se realizó un acondicionamiento que consistió en colocar las películas en un desecador en condiciones de humedad relativa (HR) de $60 \pm 2 \%$ y de temperatura ambiente (aproximadamente $25\text{--}27^\circ\text{C}$) por un tiempo mínimo de 48 h antes de la prueba, con el objetivo de mantener a todas las películas a una humedad relativa constante.

2.4.2 Prueba de resistencia a la tensión

Las propiedades mecánicas evaluadas incluyen el esfuerzo máximo verdadero (Pa) y el módulo de Young (Pa). Las pruebas de tensión se realizaron en un equipo Syntech 1/S, MTS, EUA; que medía estas propiedades cuando se sujetaba una tira de 8 cm de largo y 1 cm de ancho a dos mordazas, una superior y otra inferior, procurando que la longitud de la película entre las dos mordazas fuera de 5 cm. La película se estiró con una velocidad de 250 mm/min hasta que el equipo detectó una fractura aplicando una fuerza en los dos extremos sujetados por las tenazas, la celda utilizada para esta prueba es de 500 N.

2.4.3 Prueba de resistencia a la punción

En esta prueba, de la misma manera, se utilizó el equipo Syntech 1/S, y se detectó el esfuerzo máximo verdadero (Pa) y módulo de Young (Pa).

Para esta prueba se colocó una película circular de radio 5 cm, la cual se colocó en medio de dos platos metálicos atornillados con un círculo de menor radio en el centro, sobre el cual se aplicó una fuerza haciendo descender una punta metálica

circular con 0.0119 cm de diámetro con una velocidad de 250 mm/min, el equipo detectó la ruptura del material. El tratamiento de datos para la resistencia a la extensión y resistencia a la punción fue el mismo y consta de lo siguiente:

a) Esfuerzo Nominal $\sigma = \frac{F}{A_0} = (\text{Pa})$

Donde:

F = Fuerza (N)

A₀ = Área inicial (m²) (espesor de la película) * (ancho de la película).

b) Deformación Unitaria (ϵ)

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

Donde:

L₀ = Longitud inicial de la película

L = longitud a cada instante de la prueba

c) Esfuerzo Nominal Verdadero (σ_v)

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

d) Deformación de Hencky (ϵ_H)

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

Posteriormente, con los valores de esfuerzo nominal verdadero (σ_v) y de la deformación de Hencky (ϵ_H) se construyeron gráficas en las que el punto máximo encontrado sobre la curva se denomina Esfuerzo Máximo Verdadero y el módulo de Young, que es la pendiente que se presenta al inicio del gráfico esfuerzo – deformación.

2.5 Permeabilidad al vapor de agua

Para esta determinación se siguió el protocolo de la ASTM E96-95 (2002), que consiste en la determinación gravimétrica de la cantidad de agua absorbida por una celda acrílica con un agente higroscópico como CaCl_2 , que previamente se puso a peso constante y en presencia de 35 g de la sal, posteriormente las películas se colocaron entre la celda que contenía el agente higroscópico y una tapa atornillada a la celda, siendo la película la única entrada de vapor de agua. Estas celdas con las películas fijas se colocaron dentro de un desecador con una humedad relativa (HR) de $60 \pm 2 \%$ y $25-27^\circ\text{C}$. Se evaluó la masa de las celdas durante una semana. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se obtuvo de la siguiente manera:

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

$$\text{TVA} = \frac{G/t}{A} \text{ (pendiente de la gráfica ganancia de peso vs tiempo)}$$

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

t = Tiempo de duración de la prueba (horas)

A = Área de película (m^2)

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

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

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

R1 = Porcentaje de humedad relativa inicial expresada como fracción

R2 = Porcentaje de humedad relativa del vapor de agua expresada como fracción

- c) Permeabilidad al vapor de agua. ($\text{mg}/\text{Pa} \cdot \text{S} \cdot \text{m}$)

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

*El espesor corresponde al medido para cada película.

2.6 Permeabilidad al oxígeno

Método ASTM D 1434-82

El procedimiento consistió en situar la película con un diámetro de 11 cm en la parte inferior de una celda (CSI-135 Permeability Cell Tester), la cual tiene una banda circular de teflón que se adhiere a la muestra. Sobre la película se asentaron dos piezas de papel filtro que sirvieron como medio de retención. La celda se conecta a un tanque de oxígeno y cuenta con 4 válvulas de escape de oxígeno, una de ellas corresponde al capilar en donde se mide el volumen de 4-metil-2-pentanona, otra al flujo del tanque (presión atmosférica), otra de escape (inferior) y una más de entrada de flujo menor (salida del capilar). Para purgar la celda se aplicó una presión positiva mayor a la atmosférica (válvula superior) y se cerraron las válvulas de entrada de flujo menor y la de escape (inferior). Al purgar la celda de aire y saturarla de oxígeno se aplicó una presión positiva de gas por 10 min, dejando abiertas todas las válvulas del equipo, transcurrido el tiempo de purga se cerraron la válvula de escape superior e inferior y del capilar, y se agregaron 3 μL de 4-metil-2-pentanona en el capilar, se cerró la válvula del capilar y se dejó estabilizar el mismo hasta un estado de equilibrio. Una vez alcanzado éste, se cerró la válvula de escape superior y se tomó la lectura del desplazamiento de la 4-metil-2-pentanona.

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

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

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

Donde:

A= Área de transmisión del espécimen (mm²)

ρ_0 = Presión ambiental (Pa)

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

T = Temperatura ambiente (K)

Vr = Volumen del líquido en el capilar (mm³)

b) Permeanza : (mol/m²*s*Pa)

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

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

c) Permeabilidad al oxígeno (mol/m * s * Pa)

PO= P * espesor

El espesor corresponde al de las películas evaluadas, el cual se midió con un micrómetro.

2.7 Electroforesis

Se tomó una muestra aproximada de 0.5 g de CP, se colocó en un vial y se disolvió en 1 mL de solución para desnaturalizar proteínas *IEF*, que es una mezcla de detergentes y proteasas, posteriormente se centrifugó y se tomaron 10 μ L del sobrenadante (30 mg/mL) y se colocaron en un segundo tubo Eppendorf y se añadieron 900 μ L de buffer de muestra y 100 μ L de β -Mercaptoetanol.

Se elaboró un gel SDS Page de acrilamida en cuyos pozos se colocó un volumen de 5 μ L de un marcador Marca Biorad de amplio intervalo (15-240 kDa), en uno de los pozos se colocaron 10 μ L de muestra, y se dejó correr en una celda para electroforesis marca Biorad a 120 Volts, en un tiempo aproximado de 60–90 min. Una vez terminada la separación de las fracciones proteínicas se procedió al desmontado de los geles de la celda, se colocaron en un refractario y se tñieron con una solución de Azul de Coomassie G de 12–24 h en agitación constante. Posteriormente, los geles se destñieron con agua destilada, igualmente con agitación constante, para realizar a continuación la interpretación en un equipo quantity-one de Biorad, donde se determinaron los pesos moleculares de las bandas detectadas.

2.8 Secuenciación de aminoácidos

Manejo y preparación de la muestra

Las bandas de proteína fueron extraídas de geles 2D teñidos con Azul de Coomassie, desteñidos con soluciones acuosas de CH₃OH al 50% (v/v) y CH₃COOH 5 % (v/v) durante 12 h. Los geles desteñidos fueron lavados con agua destilada y remojados por 10 min en NH₄HCO₃ 100 mM y cortados en piezas pequeñas, que se deshidrataron completamente con CH₃CN y fueron secadas al vacío. La digestión se realizó en el gel con la adición de 30 µL de una solución que contenía 20 ng/µL de tripsina porcina modificada (promega, Madison, WI, USA) en 50 mM de NH₄HCO₃, seguida de una incubación menor a 20°C durante más de doce horas. Los péptidos fueron extraídos con soluciones acuosas de CH₃CN 50% (v/v) y HCOOH 5% (v/v) dos veces con sonicación durante 30 min c/u. El volumen de extracto obtenido fue reducido por evaporación en una centrifuga de vacío y ajustada a 20 µL con HCOOH acuoso al 1% (v/v).

2.9 Espectrometría de masas

Metodología. LC/MS/MS. El análisis de espectrometría de masas de péptidos triptico fue realizado e integrado con un sistema nano-LC_ESI_MS/MS. (cuádrupolo/tiempo de vuelo, Synapt G2 espectro de masas de alta definición, Waters Corporation), equipado con fuente NanoLockSpray ion. El instrumento fue acoplado en línea con un equipo NanoAcquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC), Waters Corporation. El sistema binario de solventes utilizado fue CH₃CN al 2% en agua desionizada en equipo Millipore con HCOOH en agua al 1% (fase móvil A) y CH₃CN 98% en agua desionizada en equipo Millipore

con al HCOOH 1% (fase móvil B). Las muestras fueron concentradas y desalinizadas por inyección en una columna de captura UPLC Symmetry C₁₈ (5 µm, 180 µm X 20 mm, Waters Corporation) y lavado con fase A 100% con flujo de 15 µL/min. Después de 3 min la columna de captura fue conmutada en línea con la columna analítica. Los péptidos fueron separados en una columna UPLC BEH C₁₈ (1.7 µm, 75 µm X 100 mm, Waters Corporation) usando un gradiente lineal al 40%, durante 30 min, con flujo de 0.3 µL/min, seguido por un enjuague de 10 min de fase A al 98%.

El espectrómetro de masas fue calibrado con una solución de NaCl y operado en ESI modo V- positivo con una resolución de 10000 Full width at half height (FWHH). Los espectros fueron adquiridos en modo automático usando el software Data-Dependent Acquisition (DDA). La solución B (100 fmol / UI) de fibrinopéptido [Glu¹] fue incorporada a través de la referencia atomizada en la fuente NanoLockSpray a un flujo de 500 nL/min y fue muestreada durante intervalos de 30 s durante la adquisición.

Las exploraciones de encuestas MS de 1 s por arriba del intervalo de 300-1600 m/z fueron usadas para la detección de péptidos y fueron seguidas de dos escaneos MS/MS de 2 s c/u (m/z 50 a 2000) para los precursores detectados. Las energías de colisión fueron automáticamente ajustadas basándose en el estado de carga del ion y la masa. Los cinco precursores iónicos más intensos fueron analizados por MS/MS - evento de conmutación. La exclusión dinámica por 60 s fue usada para disminuir eventos múltiples MS/ MS por el mismo precursor.

2.10 Procesamiento de datos e identificación de proteína

Los datos crudos DDA fueron procesados y convertidos a archivos pkl usando el servidor ProteinLynx Global Server versión 2.4 (PLGS) software (Waters corporation). Los archivos pkl después fueron buscados en la base de datos por PLGS. Las búsquedas fueron conducidas por Uniprot. Se utilizó tripsina como proteasa específica, y se permitió, de manera respectiva, una pérdida por escisión con tolerancias de masa de 50 y 0.05 Da para el precursor fragmento-ion. Modificaciones variables incluyen oxidación de metionina y desaminación glutamina–asparagina.

Los fragmentos se compararon con registros de PLGS excediendo el 95 % de nivel de confianza y fueron aceptados como comparaciones correctas.

El registro ion es $-10 * \text{Log}(P)$, donde P es la probabilidad de que el empalme sea un evento al azar. El umbral de búsqueda con las mejores condiciones fue 52 con $p < 0.05$

2.11 Resonancia Magnética Nuclear

Una vez realizada la reacción de acoplamiento enzimático, a la muestra se le extrajo el disolvente (etanol) y se liofilizó, posteriormente se pesó 0.1 mg y se disolvió en 1 mL de ácido trifluoroacético deuterado (CF_3COOD). El espectro de RMN-H se realizó en un espectrómetro Broker AC 200 a 200 MHz para ^1H a 298 K.

2.12 Análisis estadístico

Los resultados de las mediciones se presentan como el promedio de las determinaciones realizadas con su respectiva desviación estándar, solo los valores

indicados con un subíndice “b” se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un $\alpha = 0.05$.

Capítulo III Resultados

3.1 Análisis Químico Proximal

En la Tabla 1 se muestran los resultados del análisis químico proximal promedio de piel de mero (*Epinephelus morio*):

Tabla 1. Resultados de análisis químico proximal realizado a piel de mero.

%Humedad	%Proteína	%Cenizas	%Grasa	%Carbohidratos
64.04	24.87	0.012	6.62	4.56
62.07	25.70	0.009	6.52	5.70
63.05±0.985	25.29±0.415	0.1005±0.0001	6.57 ± 0.104	5.13

*Todos resultados expresados en porcentaje, g /100 g, de piel de mero en base húmeda. La concentración de carbohidratos se determinó por diferencia.

Como se puede observar en la Tabla 1, la proteína es un componente mayoritario después de la humedad en la piel; por lo tanto, fue posible extraer selectivamente el colágeno para el posterior análisis del concentrado proteínico (CP), al cual se le realizó otro análisis químico proximal para evaluar el rendimiento obtenido con base en la concentración de proteína.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis químico proximal realizado al extracto o concentrado proteínico denominado CP:

Tabla 2. Resultados del análisis químico proximal realizado al CP.

%Humedad	%Proteína	%Cenizas	%Grasa	%Carbohidratos
81.12	13.17	0.057	3.34	2.31
83.97	15.04	0.059	3.64	0
82.55±1.42	14.10±0.94	0.058 ± 0.03	3.49 ± 0.15	2.31

*Todos resultados expresados en porcentaje, g /100 g de pellet en base húmeda.

Se realizaron extracciones de la proteína proveniente de mero y se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 2, en la cual se observa que el contenido promedio de colágeno contenido en el CP es de 14.10 ± 0.935 %, cantidad que permitió la síntesis de biopelículas.

3.2 Rendimientos de Extracción

El rendimiento de extracción de piel de mero *Epinephelus morio*, obtenido fue del 47% en relación piel de mero / Concentrado proteínico. El rendimiento se mejoró de acuerdo con lo informado por Jamilah y Harvinder (2002), quienes documentan 5.39% de proteína en tilapia; por otro lado, Limpisophon et al. (2009) indica 4.33 y 5.20% como valor máximo en tiburón, y Navarrete y Granados (2010) obtuvieron entre 5 y 8% de proteína soluble en mero. Los resultados encontrados en este estudio se pueden explicar por las adecuaciones que se realizaron al método de extracción, esencialmente en los tiempos de tratamiento ácido. La proteína se precipitó con hexametáfosfato de sodio, $(\text{NaPO}_3)_6$, con lo que se logró posteriormente la extracción de colágeno. Cabe resaltar que el método de Kjeldahl cuantifica nitrógeno total en la muestra y no la cantidad de colágeno, pero para fines

prácticos, de acuerdo con el contenido de este elemento, se consideró que en el CP hay una cantidad suficiente de colágeno para la elaboración de las películas.

En la cantidad de proteína extraída pueden influir múltiples factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, tales como la variabilidad en la piel de mero, tamaño, edad y el tiempo de congelación de la piel en el laboratorio.

Es necesario aclarar que el rendimiento se determinó considerando la cantidad de nitrógeno total inicial en piel y la cantidad de nitrógeno total en el pellet. No obstante, podría haber otro tipo de compuestos nitrogenados interviniendo en la medición indirecta de la cantidad de proteína como lo son bases nitrogenadas, amoníaco y productos de descomposición de la misma proteína, como putrescina y cadaverina, principales compuestos que indican un mal estado de la proteína.

3.3 Electroforesis

El principio básico de la electroforesis consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo con su tamaño o peso molecular (Grace, 1997).

Con la finalidad de conocer el intervalo de pesos moleculares aproximado de las proteínas que contiene el CP y que intervinieron en la formación de la biopelícula, y en la reacción enzimática, se realizó una prueba cualitativa en la cual se obtuvo el gel que se muestra en la Figura 2.

Se utilizó un marcador de amplio intervalo Biorad que permitió la identificación, en las bandas 2,3 y 4, de dos fragmentos proteínicos de peso molecular de 186.3 y 147.5 kDa (Figura 2). De acuerdo con la literatura, el peso molecular del colágeno es de aproximadamente 285 kDa, por ello puede ser que los fragmentos que se observan en este gel SDS Page correspondan a colágeno, a su vez, Limposophon y col. (2009) informaron que dos bandas, una en 110 y otra en 200 kDa, correspondían con cadenas de α y β colágeno respectivamente, al caracterizar gelatina extraída de tiburón azul, por lo que no se puede descartar que en este caso las bandas 2, 3 y 4 mostradas en el intervalo de 186-187 y 147.5-148.5 kDa correspondan de igual manera a cadenas de α y β colágeno.

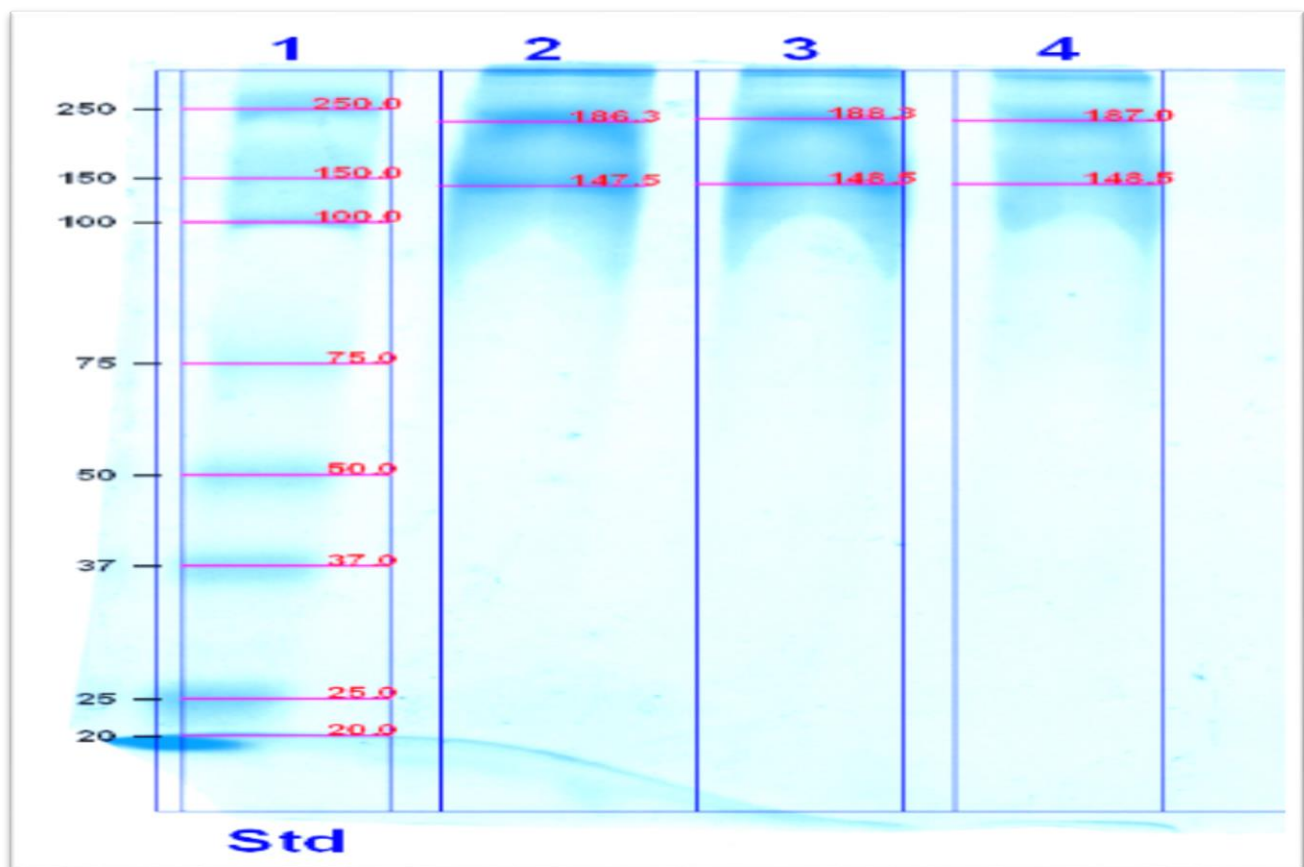


Figura 2. Gel SDS Page al 12% de acrilamida.

3.4 Secuenciación de aminoácidos

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la secuenciación de aminoácidos realizados al CP.

Tabla 3. Resultados de la identificación de colágeno.

Description	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Peptides	Theoretical Peptides
Collagen alpha 2 I chain Fragments OS Gallus gallus GN COL1A2 PE 1 SV 2	129624	9.2358	866.9709	35	84
Collagen alpha 2 I chain OS Canis familiaris GN COL1A2 PE 2 SV 2	129321	9.375	47.987	6	88
Collagen alpha 2 I chain OS Homo sapiens GN COL1A2 PE 1 SV 7	129235	9.2183	47.987	4	88
Collagen alpha 2 I chain OS Bos taurus GN COL1A2 PE 1 SV 2	128985	9.4658	47.987	6	89
Collagen alpha 2 I chain OS Rattus norvegicus GN Col1a2 PE 1 SV 3	129485	9.6709	44.6985	3	87
Collagen alpha 2 I chain OS Mus musculus GN Col1a2 PE 2 SV 2	129478	9.4937	44.6985	3	86
Collagen alpha 1 III chain OS Mus musculus GN Col3a1 PE 2 SV 4	138857	6.0747	40.5374	1	85
Collagen alpha 1 III chain OS Homo sapiens GN COL3A1 PE 1 SV 4	138479	6.1743	40.5374	1	83
Collagen alpha 2 I chain OS Rana catesbeiana GN COL1A2 PE 2 SV 1	127567	8.395	7.4496	3	91

Con los resultados de la Tabla 3 se corrobora que en el extracto proteínico se encuentra uno o más tipos de colágeno, por lo tanto se confirma la participación de esta proteína en la formación de las películas, lo que se sabe por los resultados arrojados por la técnica utilizada, que se comparan con la base de datos **PLGS score**, la cual tiene en sus registros miles de proteínas y las califica tomando en cuenta las coincidencias en los fragmentos proteínicos encontrados al hacer la digestión de la proteína. No obstante, no se encuentra el colágeno perteneciente a la especie *Epinephelus morio*. Lo que es contundente es la presencia de diferentes tipos de colágeno en el CP, y se presume su participación en la formación de las películas.

3.5 Elaboración de películas

Las películas control se elaboraron a partir del 5% del concentrado proteínico disuelto en 40 mL de agua a 70°C con agitación, para la posterior adición de plastificantes (sorbitol y glicerol al 4.5% c/u). También se prepararon películas con *tert*-butilhidroquinona (TBHQ), adicionada a la mezcla acuosa de CP y plastificantes. Esta película se elaboró con el fin de comparar sus propiedades, en presencia de un antioxidante, con aquellas de las películas que incluyeron la reacción enzimática entre los antioxidantes quercetina y ácido gálico y el colágeno presente en el CP. Las películas obtenidas se presentan en la Figura 3. Las diferencias se manifiestan cualitativamente debido a que la textura es distinta tanto en apariencia y tacto, así como en color, en otras palabras, se observa que la adición de los antioxidantes tiene un efecto en las características físicas de las películas, hecho que se corrobora en el apartado de pruebas mecánicas y de permeabilidad (sección 3.7). La flexibilidad de las películas está determinada por la interacción entre proteína–proteína y agua–proteína, que pueden estar controladas por la concentración y el o los tipos de plastificante, ya que éstos reducen las interacciones intermoleculares entre las cadenas adyacentes del biopolímero, incrementando su movilidad y flexibilidad, es decir, las propiedades elásticas y de textura de las películas (Paschoalick et al., 2003). De esta manera, considerando el efecto de los antioxidantes, ya sea que se agreguen directamente por adsorción o por medio de la reacción enzimática, afectan las propiedades físicas de las películas.

Como se muestra en las figuras 3 y 4, las respectivas películas de mero con antioxidante agregado y aquellas películas con dicho aditivo añadido mediante la

reacción enzimática muestran diferencias en color, lo que puede deberse a un distinto acomodo molecular.



Figura 3. Película control sin antioxidante.

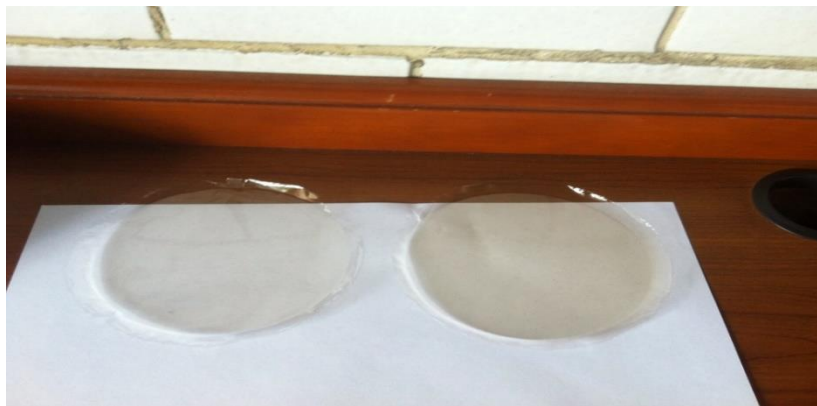


Figura 4. Películas de mero reacción con ácido gálico (izquierda) y quercetina (derecha).

3.6 Capacidad antioxidante

Se realizó la medición de la capacidad antioxidante en las películas elaboradas a partir de la reacción del extracto proteínico con ácido gálico, quercetina y plastificantes para evaluar la concentración apropiada a utilizarse para la síntesis de las películas y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Capacidad antioxidante expresada en porcentaje.

Trolox (control)	Control con TBHQ	ácido gálico	quercetina
73.21%	34.14%	38.51%	36.7%

De la Tabla 4 se puede decir que la concentración apropiada para utilizar en la reacción enzimática es 200 ppm, ya que presenta alta capacidad antioxidante y es soluble en la solución con CP y plastificantes; es decir, no se forman grumos ni hay presencia de partículas de antioxidantes sin disolver.

3.7 Pruebas mecánicas (Extensión)

3.7.1 Esfuerzo Máximo

Como se puede observar en la Tabla 5, la película control requirió más esfuerzo para su ruptura con un promedio de 214.7 MPa, seguida de la película con adición de TBHQ, con 45.25 MPa, y de aquella con ácido gálico, con 39.7 MPa, así que es evidente el efecto de la adición de antioxidantes, por lo tanto la propiedad de extensión se vio afectada negativamente, ya que el esfuerzo necesario para la fractura de las películas adicionadas con los antioxidantes TBHQ agregado y ácido gálico y quercetina disminuyó, pero aun así son más resistentes que la referencia Ziploc, y cumplen por ello con el objetivo primordial de una película utilizada como

empaque: proteger al alimento fungiendo como barreras ambientales, ofreciéndole protección contra el deterioro físico y químico.

Tabla 5. Prueba de esfuerzo máximo verdadero en extensibilidad.

Tratamiento	Extensión Esfuerzo Máximo (MPa)
<i>Bolsa Ziploc</i>	7.05 ± 2.32 ^b
<i>Control de mero</i>	214.7 ± 54.01 ^b
<i>Con adición de TBHQ</i>	45.25 ± 8.24 ^b
<i>Reacción con quercetina</i>	25.93 ± 6.95 ^b
<i>Reacción con ácido gálico</i>	39.7 ± 6.07 ^b

b = todas las películas presentaron diferencia significativa de acuerdo al Análisis de Varianza (ANOVA) con $\alpha = 0.05$.

3.7.2 Módulo de Young

En la Tabla 6 se presentan los resultados de la prueba de módulo de Young para el parámetro de extensibilidad.

Tabla 6. Resultados de la prueba de módulo de Young para extensibilidad.

Tratamiento	Extensión Modulo de Young (MPa)
<i>Bolsa Ziploc</i>	96.68 ± 20.35 ^b
<i>Control de mero</i>	33.20 ± 5.72 ^b
<i>Con adición de TBHQ</i>	23.33 ± 8.63 ^b
<i>Reacción con quercetina</i>	141.56 ± 11.28 ^b
<i>Reacción con ácido gálico</i>	83.60 ± 9.07 ^b

b = todas las películas presentaron diferencia significativa de acuerdo al Análisis de Varianza (ANOVA) con $\alpha = 0.05$.

Físicamente el módulo de Young es la representación de deformación del material pero este cambio aun es reversible, es decir, este esfuerzo es el máximo que el material puede tolerar y posteriormente recuperar su forma; sobrepasando este valor de esfuerzo la deformación sufrida por el material ya no es reversible. En el caso de la extensión la película reacción con quercetina es la que presenta, mayor resistencia a la deformación, con un valor de 141.56 MPa, seguida de la bolsa Ziploc, con 96.68 MPa, que fue más resistente que la película reacción con ácido gálico con 83.60 MPa. Las películas que incluyeron la reacción con quercetina presentan mejores características de resistencia que las bolsas Ziploc, por lo que se puede afirmar que son mejores materiales con respecto a esta propiedad, ya que no se deforman con facilidad, pudiendo resistir embates físicos que puedan causar una ruptura del empaque y exposición del producto al ambiente.

3.8 Pruebas mecánicas (punción)

3.8.1 Esfuerzo Máximo

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la prueba de punción. Con esta prueba se midió la resistencia a la punción provocada por una figura geométrica cilíndrica sobre la superficie de las películas, simulando que la película fuera o pretendiera ser deformada por algún objeto punzocortante como una astilla, una punta de metal o alguna tarima, situación factible durante el manejo de los productos alimenticios en almacenes o incluso anaqueles y durante la manipulación del producto por parte del consumidor.

Tabla 7. Resultados de esfuerzo máximo para la prueba de punción.

Tratamiento	Esfuerzo máximo Punción (MPa)
<i>Bolsa Ziploc</i>	1.12 ± 0.05 _b
<i>Control de mero</i>	5.13 ± 1.10 _b
<i>Con adición de TBHQ</i>	2.41 ± 0.28 _b
<i>Reacción con quercetina</i>	6.21 ± 0.28 _b
<i>Reacción con ácido gálico</i>	6.33 ± 0.95 _b

b = todas las películas presentaron diferencia significativa de acuerdo al Análisis de Varianza (ANOVA) con $\alpha=0.05$.

Así, las películas con mayor resistencia a la punción fueron las de reacción con quercetina y de reacción con ácido gálico, y de nueva cuenta la bolsa Ziploc es la menos resistente, 5.67 veces menos que la película con reacción ácido gálico.

3.8.2 Módulo de Young

En la Tabla 8 se muestran los resultados de módulo de Young para la prueba de punción. De igual manera que en la propiedad de extensión, el módulo de Young representa el máximo esfuerzo al que se puede someter la película con algún objeto punzocortante, sin que éste sufra una deformación irreversible.

Tabla 8. Resultados de módulo de Young para la prueba de punción.

Tratamiento	Punción Modulo de Young (MPa)
<i>Bolsa Ziploc</i>	3.65 ± 0.92 ^b
<i>Control de mero</i>	12.88 ± 3.16 ^b
<i>Con adición de TBHQ</i>	3.06 ± 0.27 ^b
<i>Reacción con quercetina</i>	12.73 ± 2.19 ^b
<i>Reacción con ácido gálico</i>	11.32 ± 2.16 ^b

b = todas las películas presentaron diferencia significativa de acuerdo al Análisis de Varianza (ANOVA) con $\alpha = 0.05$.

Con los resultados mostrados en la tabla 8 se concluye que la película que más resiste el esfuerzo de punción es el control de mero, con un valor de 12.88 MPa, seguida de la de reacción con quercetina y, posteriormente, de aquella de reacción con ácido gálico con 12.73 y 11.32 MPa, de manera respectiva. Las dos películas menos resistentes fueron la bolsa Ziploc, con 3.65 MPa, y por último la película TBHQ, con un valor de 3.06 MPa.

3.9 Pruebas de permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Como se observa en la Tabla 9, la película control presenta una menor permeabilidad al vapor de agua con 0.0284 $\eta\text{g}/\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}$, seguida de la bolsa Ziploc con 0.0593, que es aproximadamente dos veces más permeable, mientras que las películas de reacción con quercetina y reacción con ácido gálico son las que presentan mayor permeabilidad al vapor de agua.

Tabla 9. Resultados de pruebas al vapor de agua.

Tratamiento	Permeabilidad al vapor de agua ($\eta\text{g}/\text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}$)
<i>Bolsa Ziploc</i>	0.0593 \pm 0.0
<i>Control de mero</i>	0.0284 \pm 0.0048
<i>Con adición de TBHQ</i>	0.0840 \pm 0.0003
<i>Reacción con quercetina</i>	0.1004 \pm 0.0146
<i>Reacción con ácido gálico</i>	0.0662 \pm 0.0089

Como era esperada la permeabilidad fue mayor en las películas con antioxidante (Bourtom, 2008) No obstante aunque el objetivo primordial es proveer una capacidad antioxidante a estas películas, mismo que, de acuerdo con los resultados, se ha cumplido, por ello se considera que son aptas para su uso como empaque alimenticio, a reserva de las consideraciones sobre el tipo de alimento que se empastraría con ellas.

En la Tabla 10 se muestran valores informados para otros materiales sintéticos.

Tabla 10. Permeabilidad al vapor de agua de películas sintéticas (Shiku et al., 2003).

<i>Películas sintéticas</i>	PVA ($\eta\text{g}/\text{Pa}^*\text{s}^*\text{m}$)
<i>LDPE</i>	0.002 \pm 0.0006
<i>PE</i>	0.0198 \pm 0.0015
<i>PVC</i>	0.002 \pm 0.0

De acuerdo con la Tabla 10, la película que más se acerca al valor del poliestireno es la control, con un valor de 0.0249 $\eta\text{g}/\text{Pa}^*\text{s}^*\text{m}$, pero cabe resaltar que si bien estos empaques brindan una barrera contra la permeabilidad, no poseen una capacidad antioxidante que proteja los componentes de los alimentos en caso de que sean altos en grasa insaturada y exista una gran probabilidad de enranciamiento.

Una sugerencia al respecto sería no usar directamente como un empaque primario que esté en contacto directo con el alimento, sino como una capa del mismo.

3.10 Permeabilidad al oxígeno

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos experimentalmente al evaluar la permeabilidad al oxígeno de las películas estudiadas.

Tabla 11. Resultados de permeabilidad al oxígeno (pO_2).

Material	Permeabilidad al Oxígeno ($\eta\text{mol/m}\cdot\text{Pa}\cdot\text{s}$)
<i>Bolsa Ziploc</i>	No permeable bajo las condiciones de trabajo
<i>Control de mero</i>	0.00053
<i>Película con quercetina agregada</i>	0.00049
<i>Película ácido gálico agregado</i>	0.00073
<i>Reacción con ácido gálico</i>	0.00040
<i>Reacción con quercetina</i>	0.00041
<i>Polietileno de baja densidad (LDPE)</i>	0.00031

Con los resultados presentados en la Tabla 11 se puede observar que la adición de antioxidantes por medio de la reacción enzimática tiene un efecto positivo en la permeabilidad al oxígeno, ya que disminuye esta propiedad con respecto a las películas control y a aquellas con quercetina y con ácido gálico. Se observa que el valor de permeabilidad está muy cerca de igualar el del polietileno de baja densidad. Para el caso de la bolsa Ziploc, con las condiciones de estudio no presentó permeabilidad al oxígeno. De lo anterior, se puede decir que la película sintetizada podría ser empleada para la protección de alimentos y evitar el deterioro a causa de reacciones oxidativas.

3.11 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN-H)

En las figuras 5, 6 y 7 se presentan de manera respectiva los espectros de resonancia magnética de hidrógeno correspondientes a la proteína blanco (Figura 5) y a la proteína más reacción enzimática con quercetina (Figura 6) y a aquella con ácido gálico adicionado también por vía enzimática (Figura 7), donde se puede observar un patrón de señales entre 0 y 5 ppm, desplazamiento característico para proteínas debido a la presencia de una gran cantidad de aminoácidos con cadenas alifáticas. En el espectro de la Figura 5 se observa una señal que podría tratarse de grupos aromáticos presentes en la proteína, entre 7 y 7.4 ppm.

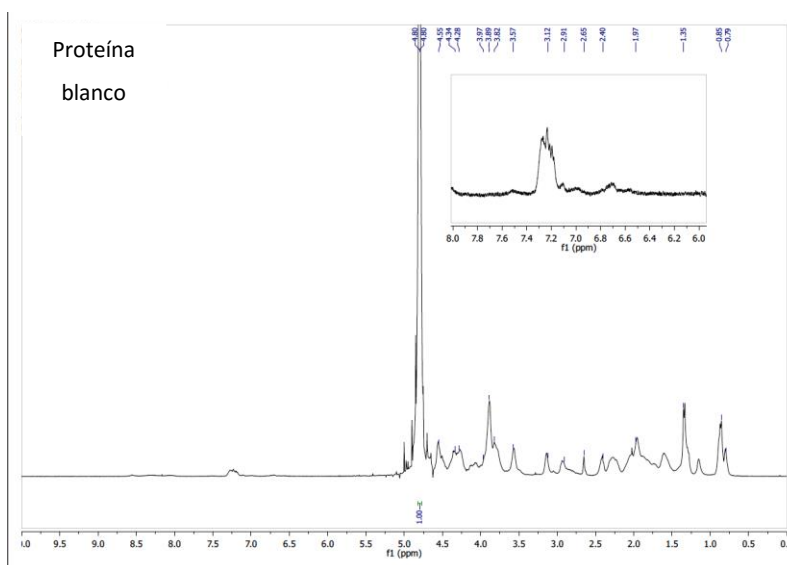


Figura 5. Espectro de resonancia magnética de proteína.

Las figuras 6 y 7 presentan señales de hidrógeno que se pueden encontrar dentro de un compuesto aromático, entre 6.5-6.8 (Bruice, 2008), a diferencia de la Figura 5, donde no se presentan, lo que se puede explicar por la presencia de los

antioxidantes, aunque lo anterior no indica de manera contundente si la reacción enzimática se llevó a cabo ni que los antioxidantes se encuentran, efectivamente, unidos químicamente a la proteína, aunque se sientan bases para una investigación futura que pueda concluirlo y saber cuál es el rendimiento de la reacción y la cantidad de antioxidante unido covalentemente a la proteína.

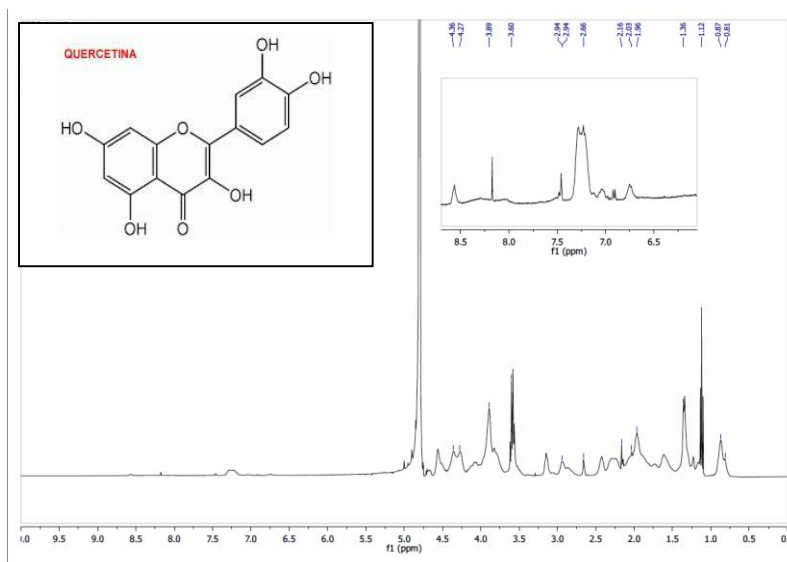


Figura 6. Reacción enzimática de proteína con quercetina.

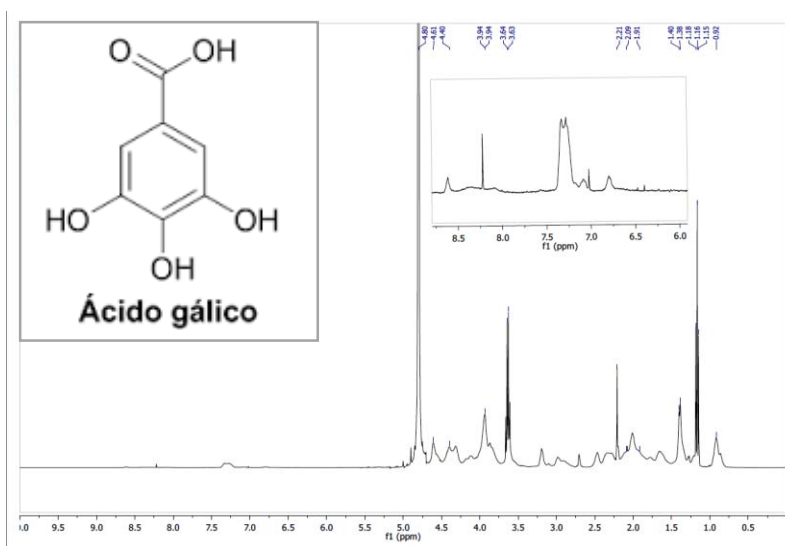


Figura 7. Reacción enzimática de proteína con ácido gálico.

4. Conclusiones

- Se elaboraron películas a partir de la separación de colágeno de la piel de mero (*Epinephelus morio*) con la adición física de antioxidantes y con la unión de éstos mediante una reacción enzimática. De acuerdo con la medición de su capacidad antioxidante, similar al de TBHQ, podrían ser utilizadas como empaques activos para la protección de alimentos contra el efecto químico del oxígeno; además, el resultado de las pruebas mecánicas mostró que el polímero sin adición de antioxidantes o control cumplió con las propiedades mecánicas de un material de referencia: bolsa Ziploc, e incluso las supera.
- Con respecto a las propiedades mecánicas de extensión, la película Control y aquellas adicionadas con antioxidante, ya sea con adición de TBHQ o mediante reacción enzimática con quercetina o ácido gálico, presentaron mayor resistencia a la ruptura (Esfuerzo máximo) que la referencia, la bolsa Ziploc.
- En cuanto a la resistencia a la deformación por extensión (Módulo de Young), la película de reacción con quercetina presentaron mayor resistencia con respecto a la película con adición de TBHQ, la bolsa Ziploc y las películas de reacción con ácido gálico y Control.

- Las películas más resistentes a la deformación por punción (Módulo de Young) fueron aquellas de reacción con quercetina y con ácido gálico, que fueron aproximadamente 5.6 veces más resistentes que la referencia Ziploc. De igual manera, las películas de reacción con quercetina y aquellas con ácido gálico presentaron mayor resistencia a la ruptura por punción (Esfuerzo máximo) que la referencia.
- Por lo anterior, las películas elaboradas tienen un enorme potencial como materiales de empaque de alimentos en lo que respecta a las pruebas mecánicas.
- Por el contrario, las películas de reacción con ácido gálico y con quercetina presentaron valores mayores de permeabilidad al vapor de agua que polímeros sintéticos como LDPE, PE y PVC, y que la bolsa Ziploc, constituyendo barreras menos eficientes respecto a este parámetro.
- En lo que se refiere al oxígeno, las películas de reacción enzimática con ácido gálico y con quercetina constituyen una barrera menos permeable contra el paso de este gas que aquellas con quercetina o ácido gálico agregados, y que la película control.
- El tema de estudio representa una excelente área de oportunidad en la investigación y desarrollo de envases inteligentes para la protección de alimentos, sentando así las bases para futuros estudios de optimización en la elaboración de estas películas.

5 Bibliografía

- I. ASTM D 1434-82 (2010). Determining Gas Permeability Characteristics of Plastic Film and sheeting. In 1998 Annual Book of ASTM standards, ASTM international (USA). Vol. 14.02.
- II. ASTM E 96-95 (2002). Standard test of method for water vapor transmission of materials. In 1995 Annual Book of ASTM Standards, ASTM international (USA). Vol. 14.02.
- III. ASTM E 882 (2002). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In 1997 Annual Book of ASTM standards, ASTM international (USA). Vol. 14.02.
- IV. Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A., & Hara, K. (2008). Biochemical Properties of acid-soluble collagen extracted from the skins of under utilised fishes. *Food Chemistry*, 108, 49–54.
- V. Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4th ed.). Springer, Germany.
- VI. Bertuzzi, M.A., Armada, M., Gottifredi, J.C., Aparicio, A.R., & Jiménez, P. (2002). Estudio de la permeabilidad al vapor de agua en films comestibles para recubrir alimentos. Universidad Nacional de Catamarca.
- VII. Bourne M. C. (1982). Puncture test, tensile test, fracturability. In *Food texture and viscosity: concept and Measurement*, Academic Press (ed.), Food Science and technology, USA.
- VIII. Bonilla, J., Atarés, L., Vargas., M., & Chiralt, A. (2012). Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations, *Journal of Food Engineering*, 110, 208–213.
- IX. Bourtoom T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. In *International Research Journal* 15 (3): 237-248.
- X. Bourtoom, T., Chinnan, M.S., Jantawat, P., & Sanguandeeikul, R. (2006). Effect of plasticizer Type and Concentration on the properties of Edible Film from Water-soluble Fish Proteins in Surimi Wash-Water. *Food science and technology International*, 12, 119.

- XI. Bruice, P. Y. (2008). *Química Orgánica*. 5ª edición. Pearson Educación, México.
- XII. Byun, Y., Kim, Y. T., & Whiteside, S. (2010). Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. *Journal of Food Engineering*, 100, 239–244.
- XIII. Castañeda Pérez, Karla María. (2011) Desarrollo y evaluación de películas proteínicas de pesquerías de la subclase Elasmobranchii. Tesis de licenciatura, FQ-UNAM, p. 59.
- XIV. Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S. (1997). Selected functional properties of Fish Myofibrillar Protein-based film as affected by hydrophilic plasticizer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 662–625.
- XV. Garrido D. A., & Teijon, R. J. M. (2006). Fundamentos de bioquímica estructural. 2ª edición. Tebar SL, Madrid, 2006, pp. 348-355.
- XVI. Gennadios, A., Brandenburg, A. H., Weller, C. L., & Testin, R. F. (1993). Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate film. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1835–1839.
- XVII. Guilbert, S. (1986). Technology and Application of Edible Protective Films. En *Food Packaging and Preservation Theory and Practice*, Mathlouthi, M. (ed.), Elsevier Applied Science, USA.
- XVIII. Granados Navarrete Sandra & Martínez García Cecilia (2010) Aprovechamiento de proteínas de pesquería del género (*Epinephelus morio*) para la obtención de películas modificadas. Tesis de licenciatura, FQ-UNAM, pp. 42-45.
- XIX. Grace, E. S. (1997). "Biotechnology Unzipped. Promises & Realities". Joseph Henry Prees, Washington D.C.
- XX. Hoque, M. S., Benjakul, S., & Prodpan, T. (2011). Effects of partial hydrolysis and plasticizers content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gellatin. *Food Hydrocolloids*, 25 (1): 82–90.

- XXI. Jamilah, B., & Harvinder, K. G. (2002). Properties of gelatin from skins of fish black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77 (1): 81–84.
- XXII. Johnson, G. D. (1983) *Nippon spinosus*: a primitive ephinepheline serranid. With comments on the monophyly and interrelationship of the serranidae. *Copela* 1983 (3): 777–787.
- XXIII. Kester, J. J., & Fennema, O.R. (1986). Edible films and coatings: A review. *Food technology*, 40 (12): 47–59.
- XXIV. Lacroix, M., & Cooksey, K. (2005). Edible films and coatings from animal–origin proteins. In J. H. Han (Eds.). *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, London, UK, pp. 301–317.
- XXV. Limpisophon, K., Tanaka, M., Weng, W., Abe, S., & Osako, K. (2009). Characterization of gelatin films prepared from under–utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1993–2000.
- XXVI. Limpisophon, K., Tanaka, M., & Osako, K., (2010). Characterization of gelatin– fatty acid emulsion films based on blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin. *Food Chemistry*, 122 (4): 1095–1101.
- XXVII. López-De-Dicastillo, C., Pezo, D., Nerín, C., López-Carballo, G., Catalá, R., & Gavara, R., et al. (2012). Reducing oxidation of foods through antioxidant active packaging based on ethyl vinyl alcohol and natural flavonoids. *Packaging Technology and Science*, 25, 457–466.
- XXVIII. Morales–Aizpurúa, I. C., & Tenuta–Filho, A. (2005). Oxidation of cholesterol in mayonnaise during storage. *Food Chemistry*, 89, 611–615.
- XXIX. *Metodos AOAC* (1995). Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Culinif, P.
- XXX. Muyonga, J. H., Cole, C.G.B., & Duodu, K.G. (2004). Extraction and physicochemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin, *Food Hydrocolloids*, 18, 581–592.
- XXXI. Nelson, J.S. (1984). *Fishes of the world* (Second ed.). Wiley, New York, USA.

- XXXII. Paschoalick, T.M., García, F.T., Sobral, P.J.A., & Habitante, A.M.Q.B. (2003). Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile Tilapia. *Food Hydrocolloids*, 17, 419–427.
- XXXIII. Serrano Gaona & Jenifer Carolina (2011). Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp.*) y cachama (*Paractus brachypomus*). Tesis de doctorado Facultad de Ingeniería, Universidad de Colombia, pp. 7-16
- XXXIV. Scope, R. K. (1994). Separation by precipitation. In Scope, R. K. (Ed.), Protein purification. Principles and Practice, pp. 71–101. New York: Springer–Verlag.
- XXXV. Shiku, Y., Hamaguchi, P. Y., & Tanaka, M. (2003). Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. *Fisheries Science*, 69, 1026–1032.
- XXXVI. Smith, C.L. (1978). Serranidae. In Fischer. W. (ed.). FAO. Species identification sheets for fishery purposes. Western Central Atlantic (Fishing area 31). Vols. IV y V, FAO, Roma.
- XXXVII. Vasudevan D. M., Sreekumari S., Kannan, & Vaidyanathan (2011). Texto de Bioquímica, 6ª edición. Jay pee-Highlights. Medical publishers, USA, pp. 551-554.
- XXXVIII. Zaldo, C., Albella, J. M., Cintas, A. M., Miranda, T. & Serratosa, J. M. (1993). Propiedades mecánicas de los sólidos. En *Introducción a la Ciencia de Materiales. Técnicas de Preparación y Caracterización*, CSIC, Madrid, 233–258.