

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

Para la obtención del colágeno, se partió de la cabeza y tentáculos del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) proveniente de 7 especímenes adultos, capturados en Bahía de Kino, Sonora (México) (29°05'N110°57'W) en la temporada otoño-invierno del 2007. Organismos enteros sin eviscerar fueron transportados en hielo al Laboratorio de Productos Marinos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, donde se llevó a cabo el faenado, separando las cabezas y parte de tentáculos para proceder a cortar en trozos pequeños en forma de cubos para ser separados en porciones de 100 g. Las muestras fueron almacenadas a -25°C para su posterior uso.

El quitosano empleado fue comercial el cual provenía de caparazón de cangrejo, 85% deacetilado de alto peso molecular (Sigma Chemicals Co, St. Louis, Mo).

El trabajo experimental se dividió en dos fases (**Figura 8**), el objetivo central de la fase I fue la obtención y caracterización fisicoquímica del colágeno soluble en ácido proveniente de la cabeza y tentáculos del calamar gigante; mientras que el objetivo central de la fase II, fue la de elaborar biopelículas de compositos a partir de la mezcla del colágeno extraído y quitosano comercial, para evaluar sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas.

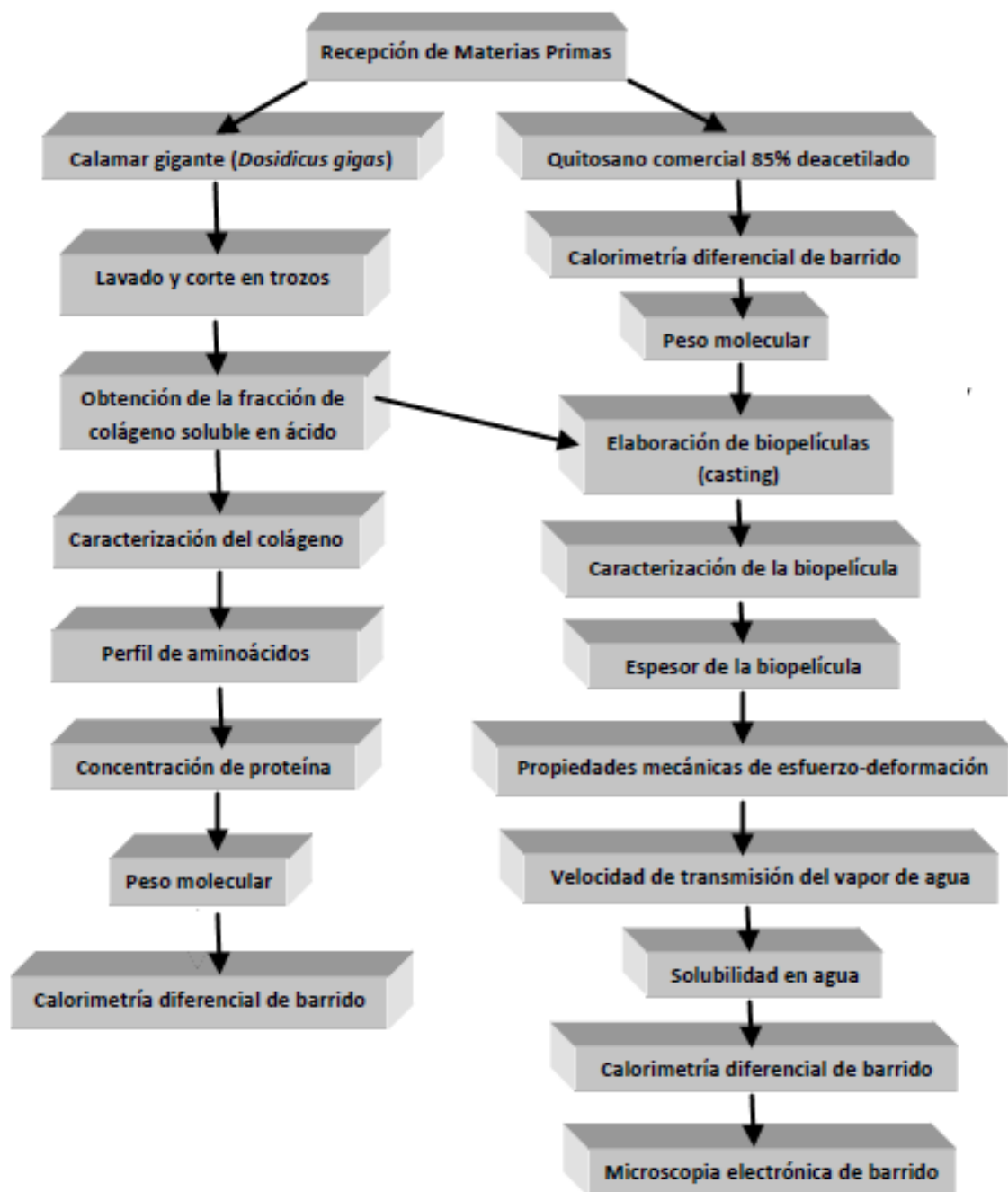


Figura 8. Diagrama de flujo general para el desarrollo de las dos fases propuestas para la elaboración del trabajo experimental.

Fase I:

Obtención y Caracterización del Colágeno Soluble en Ácido

El proceso para la obtención del colágeno se basa en la solubilidad que presentan las principales proteínas presentes en los tejidos. Para llevar a cabo dichoproceso de obtención se siguió la metodología reportada por Sivakumar y Chandrakasan (1998) y Uriarte (2007) (**Figura 9**).

La cabeza y tentáculos finamente picados fueron lavados con agua destilada. Con la finalidad de remover las proteínas miofibrilares, la muestra se homogenizó con 3 volúmenes de Urea 6 M en acetato de sodio (pH 6.8) usando un homogeneizador de tejido ("Wisetis" HG-15D, DAIHAN) por un tiempo de 3 min a 0°C, posteriormente se colocó en agitación magnética constante durante 24 h a 4°C. Al término de la agitación, las muestras fueron centrifugadas a 13416 G por 40 min a 4°C en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R (Eppendorf AG Int., Hamburgo Alemania). El precipitado obtenido fue tratado posteriormente con buffer neutro (Tris 0.05 M con NaCl 1 M, pH 7.2), dejándose en esta solución por 24 h a 4°C; en esta etapa del proceso se obtuvo el colágeno soluble en solución salina. Finalmente, el precipitado obtenido se trató con ácido acético 0.5 M para obtener la fracción soluble en ácido, la cual fue liofilizada y mantenida en refrigeración hasta su uso.

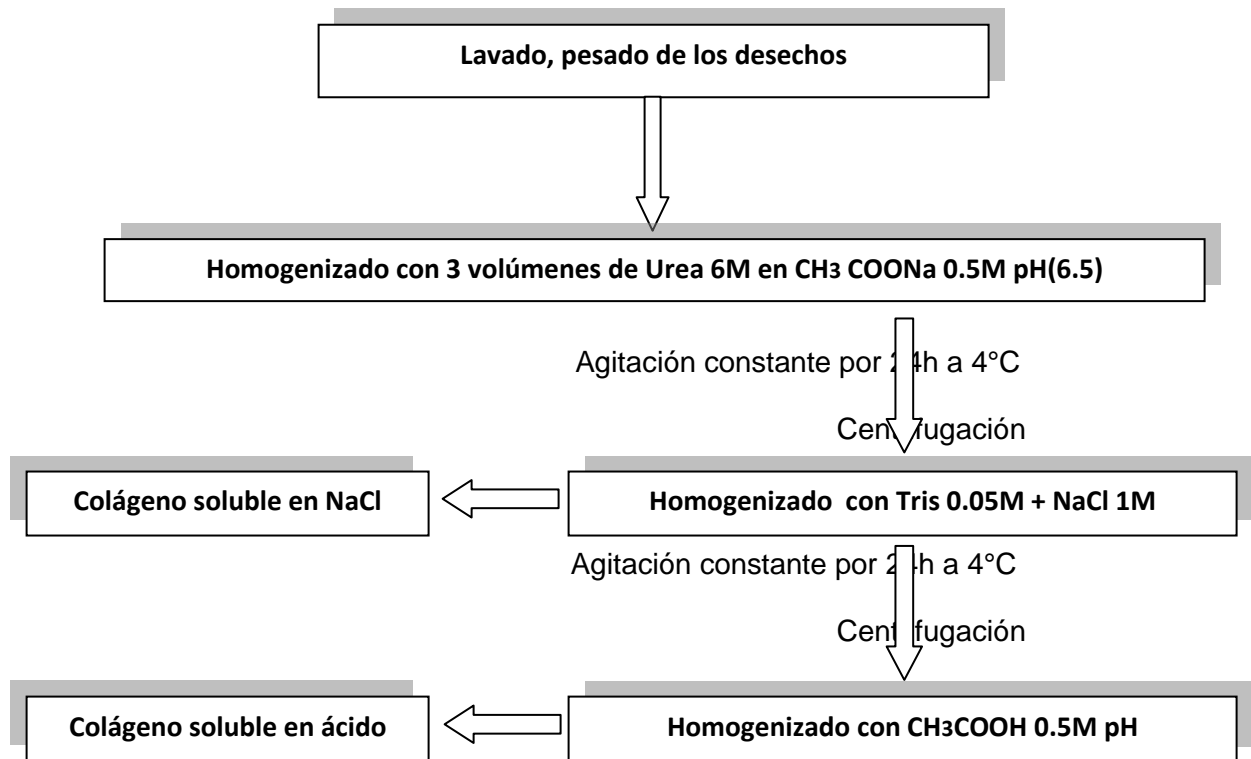


Figura 9. Representación esquemática del método empleado para la extracción de colágeno (Sivakumar y Chandrakasan, 1998; Uriarte, 2007).

Caracterización de la Fracción Ácida del Colágeno de los Desechos de Calamar

Concentración de Proteína

La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar (1mg/mL). A una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer lambda 2S).

Electroforesis en Gel de SDS – Poliacrilamida

Mediante esta técnica permitió establecer el peso molecular de la fracción obtenida y corroborar que se obtuvo colágeno. La corrida electroforética se realizó en geles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida al 7.5%, en condiciones desnaturalizantes de acuerdo a la metodología de Laemmli (1970), utilizando un voltaje de 120 volts. Después de corrida, los geles fueron teñidos con Azul de Comassie R-250 al 10% y desteñidos con ácido acético al 10%.

Los marcadores de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad) para estimar los pesos moleculares de los componentes de la muestra, fueron: miosina, 200 kDa; β -galactosidasa, 116.25 kDa; fosforilasa b, 97.4 kDa; seroalbúmina bovina, 66.2 kDa; ovoalbúmina, 45 kDa; anhidrasa carbónica, 31 kDa; inhibidor de tripsina de soya, 21.5 kDa; lisozima, 14.4 kDa y aprotinina, 6.5 kDa. Finalmente, para la interpretación de los geles se utilizó un analizador de imágenes Bio-Rad modelo 395.

Perfil de Aminoácidos

Además del peso molecular, otro indicador de que se trabajó con colágeno, es el contenido de prolina e hidroxiprolina, para lo cual es necesario llevar a cabo la determinación de los aminoácidos presentes en la muestra. Para este análisis se utilizó la metodología descrita por Vázquez-Ortiz (1995) y el método de derivatización en precolumna de Lindroth (1979). El método en general consistió en pesar 3 mg de la muestra liofilizada, la cual se colocó en tubos para llevar a cabo la hidrólisis, con HCl 6 N y ácido tioglicólico como

antioxidante. A los tubos se les aplicó vacío y se cerraron. Posteriormente, los tubos se calentaron en una placa de calentamiento por 6 h a 150°C. Al término de la hidrólisis se dejaron enfriar y se evaporó el reactivo en un rotavapor Buchi (Buchi, Flawil, Suiza), obteniéndose un concentrado, el cual se resuspendió en 2 mL de buffer de citrato de sodio 0.2 N pH 2.2 y se almacenó en viales a temperatura ambiente hasta su inyección en el cromatógrafo (Vázquez-Ortiz y col., 1995; Lindorth y K., 1979).

Para la determinación de los aminoácidos primarios se tomaron 250 μ L del extracto hidrolizado, mezclándose con 250 μ L de o-ftalaldehído (OPA). Previo a la inyección de la muestra se tomó control del tiempo con un cronómetro por 2 min, para después filtrar y recibir el filtrado en un vial oscuro, del cual posteriormente se inyectó 20 μ L en el cromatógrafo. Para la determinación de los aminoácidos secundarios (prolina e hidroxiprolina) se tomaron 125 μ L del extracto hidrolizado, se les adicionó 0.5 ml de buffer de boratos 0.4 M pH 10.4. De esta dilución, se tomaron 250 μ L y se mezclaron en un jeringa con filtro con 250 μ L con la solución derivatizante (NBD-Cl 2 mg/mL en MeOH); una vez filtrada, la mezcla se calentó a 60°C durante 5 min en un vial oscuro con tapa. La reacción de derivatización se detuvo con la adición de 50 μ L de HCl 1 M y se enfrió a 0°C. Para el análisis, se tomaron 20 μ L de extracto final y se inyectaron en el cromatógrafo.

El área producida por la fluorescencia de los aminoácidos se registró con la ayuda del programa Chem Station (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA).

Los aminoácidos fueron identificados y cuantificados de acuerdo al tiempo de retención y las áreas comparadas con un estándar externo de aminoácidos.

Calorimetría Diferencial de Barrido

El comportamiento térmico de la molécula obtenida fue determinado mediante la determinación de la temperatura de transición y la energía de desnaturalización o descomposición, medida como entalpía (ΔH) utilizando un calorímetro diferencial de barrido (Perkin Elmer Diamond DSC (Waltham, MA, USA). De la fracción ácida del colágeno liofilizado, se pesaron 20 mg de muestra. Las microcápsulas de acero inoxidable que contenían la muestra fueron selladas herméticamente con una engargoladora (Perkin Elmer). Las condiciones de la medición fueron: velocidad de barrido de 10°C/min en un rango de temperatura de 30 a 200°C, usando aire como referencia. La energía total de desnaturalización de la proteína, el cambio de la entalpía, se midió por la integración del pico bajo el área, obteniéndose los termograma, entalpías (J/g) y temperaturas máximas (°C) de transición para todas las muestras (Brown, 1998).

Análisis al Quitosano Comercial

Con la finalidad de verificar el peso molecular del quitosano comercial, así como sus propiedades térmicas, se llevo a cabo la determinación de las mismas.

El peso molecular del quitosano se determinó mediante la viscosidad intrínseca (η), la cual se obtuvo a partir de la medición de la viscosidad relativa (η_{rel}).

Para la muestra de quitosano se preparó 4 diluciones en ácido acético 0.3M con 0.2M de acetato de sodio. Posteriormente se determinó el tiempo de paso por un viscosímetro capilar Ubbelohde a 25°C en un baño de agua (González-Aguilar y col., 2005). El valor de la viscosidad relativa se calculó con la ecuación 1.

$$(\eta_{rel}) = t_x / t_s \quad (\text{Ecuación 1})$$

En donde t_x corresponde al tiempo de paso de la solución de quitosano y t_s es el tiempo de paso del solvente.

El valor de la viscosidad intrínseca se determinó utilizando los valores de la viscosidad relativa, mediante la extrapolación gráfica conjunta de las curvas obtenidas de las ecuaciones de Huggins, Kramer y punto crítico, a una concentración teórica de polímero igual a 0. A continuación se calculó el peso molecular a partir de los valores de viscosidad intrínseca, empleando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$(\eta) = KMw^a \quad (\text{Ecuación 2})$$

En donde K y a son las constantes, con valores de 3.04×10^{-5} y 1.26, respectivamente y Mw es el peso molecular (Rinaudo y col., 1993).

Para las propiedades térmicas del quitosano comercial se utilizó el calorímetro de barrido diferencial, siguiendo el procedimiento antes señalado en el apartado de caracterización del colágeno.

Fase II:
Elaboración de Biopelículas

Extraída y caracterizada la fracción soluble en ácido del colágeno presente en los desechos del calamar gigante, y confirmado el peso molecular y propiedades térmicas del quitosano comercial, se procedió a obtener las biopelículas aplicando el método de casting (Plascencia-Jatomea, 2004).

Para poder preparar las soluciones tanto de quitosano, como de colágeno, primeramente se determinó el medio en el cual ambos presentaban su máxima solubilidad, siendo solubles ambos en medio ácido. Por lo tanto, se preparó una solución de quitosano comercial al 2% (p/v) en ácido acético 0.5 M. Para el colágeno obtenido de los desechos de calamar gigante, se utilizaron las muestras liofilizadas y también se preparó una solución al 2% (p/v) en ácido acético 0.5 M. Para la obtención de la biopelícula se mezclaron las soluciones anteriormente preparadas.

Partiendo de la hipótesis de que el colágeno tendrá un efecto plastificante en una biopelícula de quitosano, se evaluaron tres biopelículas siendo la biopelícula 1 el control sin colágeno:

Biopelícula 1. 100% quitosano.

Biopelícula 2. 80% quitosano : 20% colágeno

Biopelícula 3. 50% quitosano : 50% colágeno

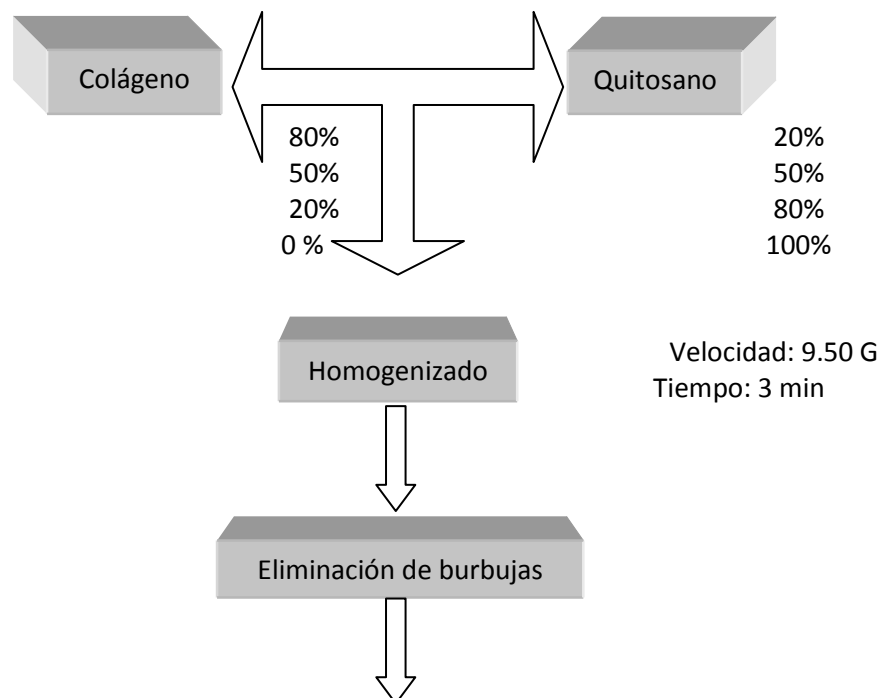
Biopelícula 4. 20% quitosano : 80% colágeno.

El procedimiento que se siguió para obtener la mezcla y asegurar que se contaba con la concentración deseada en cada mezcla, consistió en pesar el volumen necesario de cada solución para obtener la concentración requerida, posteriormente estos volúmenes se mezclaron utilizando un homogeneizador ("Wisetis" HG-15D, DAIHAN). Cada mezcla se colocó en un molde de forma rectangular con medidas de 9.5 cm por 18.6 cm y en molde circular con diámetro de 9.5 cm en una superficie plana nivelada, en la cual se dejó reposar hasta que se evapora el ácido acético (Plascencia-Jatomea, 2004). Antes de verter la mezcla en los recipientes, se midió el volumen del recipiente y posterior a ello se midió el volumen de la mezcla para establecer el espesor que dicho volumen proporciona a la biopelícula al secarse. Una vez encontrado el volumen a utilizar por cada mezcla; este se determinó mediante comparación de medias, para que no hubiese diferencia significativa entre los volúmenes empleados por mezcla, ni en el espesor obtenido. Con esto se aseguraba que los valores obtenidos de las evaluaciones realizadas a las biopelículas, fuese únicamente por efecto de la concentración de colágeno.

Todas las biopelículas tuvieron un espesor similar para poder llevar a cabo las comparaciones, y que el espesor no fuese un factor que afectara los resultados. El diagrama de flujo para la elaboración de la biopelícula se muestra en la **Figura 10**.

Caracterización de las Películas de Colágeno y Quitosano

Las cualidades de los materiales son consecuencia directa de su composición y de su estructura molecular (Jenkins, 1991). Las propiedades mecánicas más comunes que se le determinan a un material para su caracterización, identificación y control son: resistencia a la tensión y elongación, así como la propiedad de barrera que es la velocidad de transmisión al vapor de agua, velocidad de transmisión al oxígeno, CO₂ entre otras. Dentro de éstas, las dos primeras son importantes para determinar la resistencia del material, la capacidad de estiramiento antes de romperse y la fuerza necesaria para romper el material (Ramírez, 2001). Y la tercera es un requerimiento importante en la selección del sistema de envasado para alimentos, ya que esta propiedad permitirá el paso de



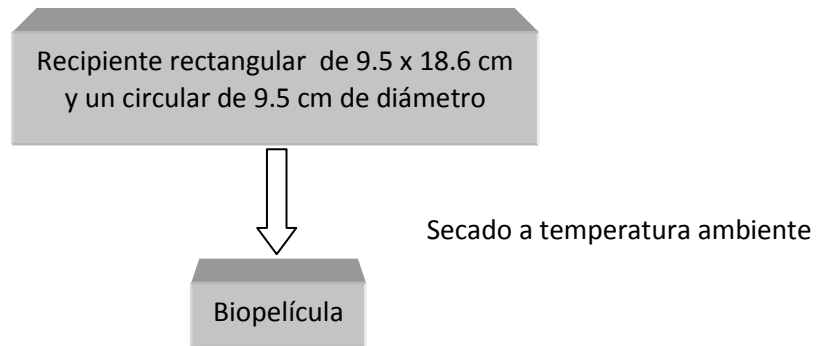


Figura 10. Representación esquemática del método empleado para la elaboración de biopelículas.

gases o vapores a través de su estructura molecular, ya sea hacia adentro o hacia afuera del envase (Marsh y col., 2007).

Espesor: Antes de proceder con la determinación a todas las películas se les midió el espesor utilizando un micrómetro marca Mitutoyo modelo IP65 Coolant Proof, con rango de 0-1 pulgadas; se cuidó que la variación de espesor en todas las películas no fuera mayor al 10%, se midió en diez partes de la película en los extremos y en el centro, sacando un promedio tomándose ese promedio como el espesor final.

Propiedades Mecánicas de Esfuerzo–Deformación: Al mezclar el quitosano con el colágeno obtenido del calamar gigante, se esperaba que se aumentara el porcentaje de elongación, lo cual indicaría que obtuvo una película más plástica.

El porcentaje de elongación y el esfuerzo se monitorearon de acuerdo a la Norma ASTM–D882-91 “Propiedades de Tensión en Laminas Plásticas Delgadas”.

Para llevar a cabo estas pruebas, las biopelículas recién formadas se cortaron en tiras de 0.5 cm de ancho por 8 cm de largo y se almacenaron en bolsas selladas por 48 horas antes de la prueba con la finalidad de evitar la posible ganancia de humedad. Las pruebas se llevaron a cabo en un analizador de textura Instron (United Modelo SSTM-5KN), a una velocidad transversal de 10 mm/s para tensión y elongación al punto de fracción (Cota, 2007).

Además de establecer las propiedades mecánicas de las biopelículas obtenidas, se determinaron las propiedades de una película comercial a base de acetato de celulosa (celofán) y otra de polipropileno; estos materiales son comúnmente utilizados en la elaboración de películas plásticas comerciales, de allí la importancia de comparar las biopelículas con estos materiales.

Velocidad de Transmisión del Vapor de Agua: Otro parámetro muy importante para determinar el potencial de utilización de un material dentro de la elaboración de películas es la permeabilidad, siendo la propiedad que tienen las películas plásticas de permitir el paso de gases o vapores a través de su estructura molecular, es una propiedad del material, y la difusión o paso de gases o vapores siempre ira del lugar de mayor concentración al de menor concentración (Han, 2005). La protección al alimento del intercambio de gases y vapores depende de la integridad del envase y de la permeabilidad del material.

Los principales factores que influyen en la permeabilidad a gases y vapores son la naturaleza del polímero y del permeante, la temperatura y el espesor del material de envase (Graciano-Verdugo, 2006; Marsh y col., 2007). Para evaluar la permeabilidad se utiliza la evaluación de la velocidad de transmisión del vapor de agua la cual se define como la constante de velocidad en la que el vapor de agua penetra a través de una película de la muestra en condiciones específicas de temperatura y humedad relativa (Robertson, 2006).

Es importante para aquellos alimentos que tienden a ganar o perder humedad. Los alimentos susceptibles a la humedad necesitan ser envasados en materiales con una alta barrera a este factor. La penetración de humedad ocasiona pérdida de textura, ablandamiento o humedecimiento de productos. Además, favorece el desarrollo de hongos y levaduras, así como una apariencia indeseable del producto para el consumidor (Graciano-Verdugo, 2006).

La velocidad de transmisión del vapor de agua, se llevó a cabo por el método de las cápsulas según la Norma ASTM 96-80. Se utilizó un material higroscópico dentro de la capsula de aluminio y posteriormente se recubrió con las películas, se almacenó en cámara a humedad relativa de 55% y luego se midió la ganancia de peso de la muestra durante más de 10 días (hasta conseguir el equilibrio) tomando medidas cada día para al final de este tiempo elaborar una gráfica peso ganado vs tiempo.

Solubilidad en Agua: La solubilidad de las películas es una propiedad importante que se relaciona con la utilidad de las películas elaboradas. En algunos casos, la

facilidad del disolverse en agua es deseable y en otros casos lo que se quiere es que las películas o el recubrimiento presente una resistencia a la solubilidad para garantizar la integridad de los alimentos. Dependiendo del tipo de proteína que se emplea para la elaboración de películas se tendrán películas con diferentes capacidades de solubilidad en agua (Krochta, 2002).

Para esta determinación se pesaron muestras cercanas a 0.0001 g, estas fueron secadas en una estufa de secado a 100°C por 24 horas para obtener el peso inicial de la materia. Las muestras secas fueron puestas en 50 ml de agua deionizada, la cual contenía 0.02% p/v azida de sodio (como prevención del crecimiento microbial), a continuación fueron agitadas por 24 horas, las biopelículas fueron inspeccionadas visualmente hasta obtener total solubilidad según sea el caso. Después de 24 horas las películas que no se pudieron disolver fueron extraídas del agua y se pusieron a secar a 100°C por 24 horas, para determinar el peso de la materia seca que no se disolvió en agua (Gontard y col., 1992). Los resultados se reportan utilizando la relación que se muestra en la ecuación 3.

$$\frac{\text{Peso inicial de la materia seca} - \text{Peso de la materia seca que no se disuelve}}{\text{Peso inicial de la materia seca}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Propiedades Térmicas: Las propiedades térmicas permiten el conocimiento del comportamiento de los materiales al ser sometidos a un calentamiento. La resistencia térmica de éstos determinará la estabilidad de la molécula y el método al que pueden ser sometidos para la obtención de películas, ya que

procesos como la extrusión necesitan de materiales termoplásticos para poder producir películas de calidad (Krochta, 2002).

Las propiedades térmicas de las biopelículas obtenidas fueron evaluadas en función de la temperatura de transición y energía de desnaturalización (ΔH) mediante el uso de la calorimetría diferencial de barrido. Para esto se utilizó un calorímetro de barrido diferencial marca Perkin Elmer Diamond DSC (Waltham, MA, USA). Se cortaron las biopelículas en tiras muy delgadas y se colocaron en las micro cápsulas de acero inoxidable, pesando alrededor de 20 mg por cada muestra; las capsulas fueron selladas herméticamente con una engargoladora marca Perkin Elmer. Las condiciones de la medición fueron: velocidad de barrido de 10°C/min en un rango de temperatura de 30 a 200°C, usando aire como referencia. La energía total de desnaturalización de la biopelícula, el cambio de la entalpía, se midió por la integración del pico bajo el área, obteniéndose los termogramas, entalpías (J/g) y temperaturas máximas (°C) de transición para cada biopelícula. Esta determinación se repitió al menos tres veces para cada una de las películas obtenidas.

Microscopia Electrónica de Barrido: Esta técnica permite una observación de las posibles interacciones de los materiales mostrando una imagen clara del comportamiento de los materiales a diferentes concentraciones.

Para el análisis de las superficies de las biopelículas se utilizó un microscopio electrónico de barrido marca JEOL Modelo 5410LV equipado con un EDS marca Oxford. Se utilizó una pequeña cantidad de muestra, se fijó en

un porta muestras de bronce con una tira de papel de carbón autoadhesiva de 13 mm y se sometió a observación directa en el microscopio con un voltaje de aceleración de 5 kilovoltios (KV). Para las diferentes biopelículas se realizó el mismo procedimiento.

Diseño Experimental y Análisis de Datos

Este trabajo se dividió en dos fases: (I) La obtención de la fracción ácida del colágeno presente en los desechos de calamar gigante; (II) La elaboración de biopelículas de colágeno – quitosano.

En la fase (I) de la obtención del colágeno se aplicó un proceso de extracción reportado por otros autores, se partió de la cabeza y tentáculos de calamar de una captura única, evitando así el efecto de temporada y zona de pesca. Para obtener el colágeno se partió de lotes de 100g de muestra molida. El proceso se repitió hasta obtener la suficiente cantidad de muestra liofilizada y llevar a cabo las evaluaciones de caracterización del colágeno extraído y elaboración de biopelículas.

Las variables respuesta de la primera fase fueron: concentración de proteína, movilidad de las fracciones proteicas en el análisis electroforético, concentración de aminoácidos e iminoácidos (prolina e hidroxiprolina), y la temperatura de transición y entalpía.

Cada una de las determinación analíticas se repitieron hasta obtener una variación entre replicas menor al 5%, para la evaluación de los datos se aplicó un análisis descriptivo (Glover y Michell, 2008).

En la fase (II) se elaboraron tres diferentes mezclas de colágeno - quitosano y se obtuvieron las biopelículas por casting; para lo cual se utilizó un diseño completamente al azar en el que se utilizó como control una biopelícula de quitosano.

Todos los experimentos se repitieron dos veces. En cada réplica, 5 biopelículas de cada una de las mezclas elaboradas fueron preparadas para medir las propiedades mecánicas y velocidad de transmisión de vapor de agua, 3 biopelículas fueron usadas para evaluar la solubilidad al agua y propiedades térmicas, y 2 biopelículas para llevar a cabo las observaciones realizadas a través del microscopio electrónico de barrido.

Las variables respuesta para esta segunda fase fueron: el espesor, las propiedades de esfuerzo-deformación, la velocidad de transmisión de vapor de agua, la solubilidad en agua y la temperatura de transición, entalpías y la temperatura de transición vítrea.

El procedimiento de modelos generales lineales se aplicó para evaluar las diferencias entre las películas, usando el paquete estadístico JMP 5.0.1.

El análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía se aplicó a todos los tratamientos. La prueba de Tukey se utilizó para la comparación múltiple de medias, se trabajó con un nivel de significancia de 95%.