



TRABAJO FINAL DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA

“Preparación de Biopelículas de
Caseinato de Sodio-Gelatina de
Pescado”

Alumno: Rivero, Néstor Nahuel

Directora: Dra. Ávila, Adelaida

Departamento de Química

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencia de la Salud

Comodoro Rivadavia, Chubut

Año 2022

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

DEDICADO A MI FAMILIA

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la directora del Trabajo Final, la Dra. Adelaida Ávila, por su paciencia y aportes, por su comprensión y aliento a seguir adelante, además de su acompañamiento y guía durante la realización del Trabajo Final

A la Dra. Cecilia Crovetto por su colaboración en la realización de la electroforesis en gel de poliacrilamida.

A la Dra. Karina Bierbrauer por realizar los ensayos de determinación de propiedades mecánicas y espectroscopía infrarroja FTIR.

A Cecilia Tiedemann por su predisposición para ayudar a despejar dudas en la realización de ensayos del Trabajo Final.

A mis padres, Mario y Susana por su apoyo incondicional durante los años de carrera. Agradecer por incentivar me a nunca bajar los brazos y a seguir adelante.

A mi hermano, Leandro, por estar presente en los momentos difíciles que me tocaron transitar durante los últimos años de carrera.

A mi pareja, Natalia, por su incondicional apoyo y paciencia durante el proceso de realización del Trabajo Final. Por darme su apoyo incondicional y motivarme a seguir adelante.

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

INDICE

1. Resumen.....	11
2. Objetivos	13
3. Introducción	14
3.1. Generalidades de polímeros.....	14
3.2 Polímeros biodegradables.....	16
3.3 Envases biodegradables para alimentos.....	18
3.4 Polisacáridos y proteínas usadas en envases.....	21
3.5 Caseína	22
3.6 Gelatina de pescado.....	26
4. Materiales y métodos	28
4.1. Materiales	28
4.1.1. Leche descremada.....	28
4.1.2. Piel de merluza.....	28
4.1.3. Reactivos	28
4.1.4. Materiales de laboratorio	29
4.1.5. Equipos.....	29
4.2 Metodología empleada en la obtención de gelatina de pescado (GP).....	30
4.3. Caracterización de gelatina de pescado.....	31
4.3.1. Determinación del punto isoeléctrico de GP	31
4.3.2. Determinación de Peso Molecular aparente de GP.....	31
4.4. Metodología empleada para obtener Caseína /Caseinato de sodio.....	31
4.5. Caracterización del Caseinato de sodio (CAS).....	32
4.5.1. Determinación del punto isoeléctrico (pI) de la Caseína	32
4.5.2. Determinación de Peso Molecular aparente de Caseína.....	33

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

4.6. Preparación de films mediante casting.....	34
4.6.1. Caseinato de Sodio.....	34
4.6.2. Gelatina de Pescado.....	34
4.6.3. Mezclas Gelatina de Pescado/Caseinato (GP/CAS).....	35
4.7. Caracterización estructural y superficial de los films.....	36
4.7.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	36
4.7.2. Propiedades Mecánicas.....	36
4.7.3. Determinación de porcentaje de absorción de agua.....	37
4.7.4. Determinación de índice de hinchamiento a pH 4 y 7.....	37
4.7.5. Determinación de la permeabilidad al vapor de agua.....	37
4.8. Biodegradación en suelo.....	39
5. Resultados y Discusión.....	40
5.1 Obtención de gelatina de pescado.....	40
5.2 Determinación del punto isoeléctrico de gelatina de pescado.....	42
5.3 Determinación de Peso Molecular aparente de GP.....	43
5.4 Obtención de Caseína.....	45
5.5 Determinación del punto isoeléctrico de la Caseína.....	46
5.6 Determinación del Peso Molecular aparente de Caseína.....	47
5.7 Caracterización de los films.....	48
5.7.1. Aspecto de los films.....	48
5.7.2. Espectroscopía infrarroja FTIR.....	49
5.7.3. Porcentaje de absorción de agua.....	54
5.7.4. Índice de hinchamiento (IH) a pH 4 y 7.....	55
5.7.5. Propiedades mecánicas.....	57
5.7.6. Permeabilidad al vapor de agua.....	60

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

5.8 Biodegradación en suelo	61
6. Conclusión	63
7. Bibliografía	64

ABREVIATURAS

%A	Porcentaje de absorción de agua
%EB	Porcentaje de elongación
ASTM	American Society for Testing and Materials
CAS	Caseinato de sodio
GP	Gelatina de Pescado
GP/CAS	Gelatina de Pescado/Caseinato de sodio
GP85/CAS15	Gelatina de Pescado 85% / Caseinato de sodio 15%
GP90/CAS10	Gelatina de Pescado 90% / Caseinato de sodio 10%
GP95/CAS5	Gelatina de Pescado 95% / Caseinato de sodio 5 %
IH	Índice de hinchamiento
PI	Punto isoeléctrico
RG	Rendimiento Gravimétrico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.
TS	Tensión a la rotura
WVP	Permeabilidad al vapor de agua
WVTR	Velocidad de transmisión al vapor de agua

1. RESUMEN

La utilización de materiales provenientes de recursos renovables y desechos marinos presentan una potencial aplicación en películas poliméricas naturales y biodegradables para el envasado de alimentos.

En el presente trabajo se prepararon films biodegradables mediante el método de casting a partir de la mezcla en diferentes proporciones de caseinato de sodio (CAS) y gelatina de pescado (GP). Tanto los films puros como los films mezclas fueron caracterizados mediante diferentes ensayos.

La GP obtenida mediante un procedimiento alcalino a partir de la piel de merluza, residuo proveniente de la industria pesquera es transparente, con una leve coloración amarillenta. El rendimiento gravimétrico (RG) fue de 14%, el pI de 4,7, y un peso molecular entre 100-200 kDa. En el espectro infrarrojo se observaron las principales bandas características de esta proteína.

El film de GP presentó un porcentaje de absorción de agua de 91 %, un índice de hinchamiento a pH 4 entre 356-450 % y a pH 7 entre 510-512 % y una permeabilidad al vapor de agua $0,682 \times 10^{-13}$ g/Pa.s.m.

Por otro lado, el caseinato de sodio (CAS) obtenido a partir de leche descremada; presentó una coloración amarillenta, con un rendimiento alrededor de 4 %, un pI de 4,6, presentó un porcentaje de absorción de agua de 29 %, un índice de hinchamiento a pH 4 entre 23-35 %, a pH 7 entre 40-50 %, y una permeabilidad al vapor de agua de $1,63 \times 10^{-13}$ g/Pa.s.m

Los films mezclas presentaron en el espectro infrarrojo las bandas correspondientes a la sumatoria de los espectros de GP y CAS, además presentaron un aumento considerable en el porcentaje de absorción de agua que varió entre 183-211 %, un índice de hinchamiento intermedio entre la GP y CAS y una permeabilidad al vapor de agua con valores entre $1,27-1,58 \times 10^{-13}$ g/Pa.s.m

Las mezclas GP90/CAS10 y GP85/CAS15 presentaron una mejora notable en cuanto al porcentaje de elongación y la tensión de rotura.

Los films se degradaron rápidamente entre 1-7 días de ser colocados en suelo. Una muy rápida degradación dificulta su utilización.

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Los resultados presentados nos permiten concluir que es posible aprovechar la capacidad formadora de películas de caseinato de sodio, gelatina de pescado o sus mezclas para formular materiales aplicables al envasado y recubrimiento de alimentos.

2. OBJETIVOS:

2.1 Objetivo General:

- Desarrollar materiales novedosos basados en caseína y gelatina de pescado con potenciales aplicaciones en alimentos y caracterizarlos.
- Promover innovaciones tecnológicas aplicables a la explotación sustentable de los recursos naturales.

2.2 Objetivos específicos:

- Optimizar el proceso de extracción de gelatina de pescado a partir de la piel de merluza extraída del Golfo San Jorge.
- Preparar películas de gelatina de pescado, caseína y sus mezclas en diferentes proporciones y estudiar sus propiedades.
- Estudiar la biodegradación en suelo de dichas películas.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. GENERALIDADES DE POLIMEROS

Los polímeros son grandes moléculas que están formadas por la unión de muchas unidades repetitivas denominadas monómeros; generalmente, involucran uniones covalentes entre los átomos de carbono que constituyen la columna vertebral de la cadena polimérica (Mendizabal y López-Serrano, 2015).

Los polímeros se obtienen por un proceso llamado “polimerización” que se puede clasificar en:

- Polimerización por reacción en cadena donde ocurren una serie de reacciones, cada una de las cuales consume una partícula reactiva y produce otra similar, por lo que cada reacción individual depende de la anterior. Dichas partículas reactivas pueden ser radicales libres, cationes o aniones.
- Polimerización por etapas que consta de una serie de reacciones que son independientes entre sí; se forma un polímero porque el monómero tiene más de un grupo funcional (Morrison y Boyd, 1990).

Los polímeros presentan diferentes clasificaciones de acuerdo a su origen, mecanismo de obtención, forma, etc. Los polímeros enmarcados dentro de estas clasificaciones presentan diferentes características o propiedades que los hace importantes. En figura 1 se puede observar una clasificación de polímeros:

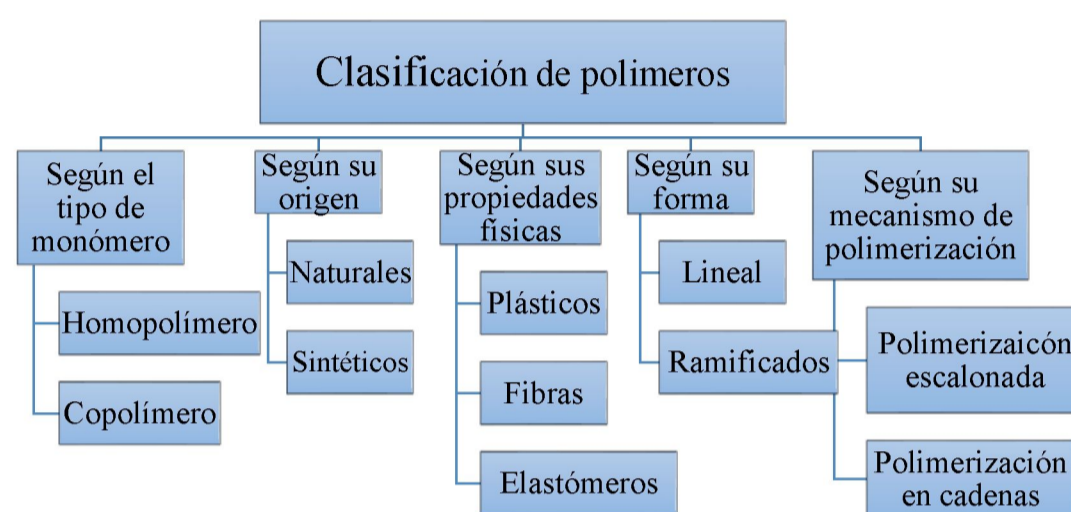


Figura. 1: Clasificación de polímeros según diferentes criterios.

Los primeros polímeros se obtuvieron a partir de la modificación de macromoléculas naturales como el caucho y la seda. Las macromoléculas sintéticas incluyen elastómeros, fibras y plásticos (Morrison y Boyd, 1990).

Los polímeros naturales poseen ventajas en cuanto a la bioactividad, a la capacidad de unión de ligandos a receptores de células, y mayor degradación proteolítica desencadenada por las células.

El desarrollo de los polímeros sintéticos es considerado uno de los grandes avances del siglo XX debido a las múltiples aplicaciones que ofrecen no sólo a nivel industrial sino también en la vida cotidiana. Los polímeros sintéticos se obtienen fundamentalmente del petróleo, y son materiales económicos, livianos, resistentes a la oxidación, versátiles, etc.

Con ellos se pueden formar materiales plásticos, fibras para la industria textil, elastómeros para empaques y calzados, etc.

La alta resistencia a la corrosión, al agua y a la descomposición bacteriana los convierte en residuos difíciles de eliminar, lo que deriva en un problema ambiental, por ejemplo, el polietileno y el polipropileno (presentes en bolsas de plásticos) pueden tardar hasta 500 años en descomponerse (Valero-Valdivieso *et al.*, 2013).

3.2 POLÍMEROS BIODEGRADABLES

Un polímero biodegradable es aquel que después de un proceso de degradación queda reducido totalmente a dióxido de carbono, agua, metano o biomasa por la acción de microorganismos y/o enzimas (Karlsson y Albertsson, 1998; Tharanathan, 2003).

Los polímeros biodegradables son materiales que tienen un grado de degradación por acción enzimática entre 60-90%. La biodegradación de estos polímeros debido a la exposición ambiental implica la acción de microorganismos y reducción del grado de polimerización, así como la degradación en fragmentos orgánicos más simples.

La cristalinidad y la hidrofiliidad son los factores más importantes que influyen en la degradación de un polímero. A menor grado de cristalinidad menor será el tiempo de degradación del polímero. Por otro lado, si el polímero es hidrofílico las enzimas pueden actuar fácilmente al ser solubles en agua (Rodríguez-Alba *et al.*, 2021).

Los polímeros biodegradables se clasifican en dos grupos principales: polímeros naturales y polímeros sintéticos, y se pueden describir 4 categorías distintas:

1. Polímeros naturales que son extraídos de la naturaleza como la celulosa, el almidón y las proteínas. Son todos aquellos cuyos monómeros son derivados de productos de origen natural, puesto que los polímeros naturales son producto de reacciones enzimáticas llevadas a cabo por seres vivos, estos son susceptibles a la degradación por sistemas biológicos o químicos.
2. Polímeros naturales modificados o semisintéticos como el acetato de celulosa
3. Polímeros sintéticos como poliestireno, polipropileno, polietileno, cloruro de polivinilo (PVC), etc.

4. Materiales compuestos que combinan partículas biodegradables con polímeros sintéticos y se usan para aumentar el grado de biodegradabilidad de éstos últimos.

En la tabla 1 se resumen las principales ventajas de los polímeros biodegradables con respecto a los plásticos convencionales (Zapata *et al.*, 2012). En ella se puede ver una comparativa del impacto medioambiental en la fase de producción y en el tratamiento de los residuos.

Tabla 1. Comparativa entre polímeros sintéticos y polímeros biodegradables.

Polímeros sintéticos	Polímeros biodegradables
Usan como materia prima recursos no renovables	Se producen a partir de recursos renovables
Se acumulan en el ambiente	Se degradan fácilmente por acción de microorganismos
Pueden generar sustancias tóxicas para el medio ambiente	Se biodegradan produciendo O ₂ y H ₂ O

El procesamiento pesquero tiene una importancia económica indiscutida, pero una gestión ambiental no integrada provoca problemas que exceden la capacidad de las poblaciones donde se asientan los puertos, debido a la generación de residuos de elevada carga orgánica que favorecen la proliferación de vectores sanitarios y por degradación enzimática y microbiológica pueden impactar en el aire, el suelo, y el cuerpo receptor acuático (superficial y subterráneo) (Ambrosio M., 2016).

Una solución a la generación de residuos pesqueros es la extracción de biopolímeros como la gelatina (polímero biodegradable) proveniente de la hidrólisis del colágeno el cual se encuentra en la piel de pescados (Aragón Lucero, 2018) y utilizarla en la elaboración de biofilms biodegradables para el recubrimiento de alimentos.

3.3 ENVASES BIODEGRADABLES PARA ALIMENTOS

La creciente demanda de productos procesados y listos para el consumo (ready-to-eat) plantea un reto para la seguridad alimentaria y ha conducido al desarrollo de tratamientos post procesado que permitan inhibir el crecimiento microbiano manteniendo la calidad y frescura de los alimentos. En este contexto toma importancia el desarrollo de películas y revestimientos de biopolímeros o polímeros biodegradables por razones ambientales y para dar salida a productos agrícolas y naturales (Begonya *et al.*, 2006).

El empaque de un alimento es fundamental para la conservación del mismo. Sin embargo, una vez que el alimento es consumido, el empaque se desecha y pasa a formar parte de las grandes cantidades de basura que se acumulan día a día.

La mayor parte de los materiales usados en la fabricación de empaques para alimentos son plásticos sintéticos, los cuales son productos derivados del petróleo. Debido a esto ha surgido una creciente preocupación por disponer de materiales de empaque que además de proteger a los productos que contienen, permitan reducir los problemas causados por la generación y acumulación de basura.

Un empaque biodegradable está definido por la ASTM (American Society for Testing and Materials) como aquel que es capaz de descomponerse en dióxido de carbono, metano, agua, compuestos inorgánicos o biomasa, siendo el mecanismo dominante la descomposición enzimática de los microorganismos y que los productos resultantes puedan ser obtenidos y medidos en un periodo determinado de tiempo (ASTM, 2011).

El envase de alimentos debe:

- Permitir una atmósfera modificada entre la superficie del alimento y la película.
- Evitar la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas y otros solutos entre el ambiente y el alimento o entre los diferentes componentes de un sistema alimentario.
- Actuar como matriz portadora de aditivos alimentarios, tales como compuestos antioxidantes, compuestos antimicrobianos o nutrientes específicos.

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

- Proteger el alimento del contacto con el ambiente para evitar posible deterioro físico debido a daños mecánicos y reducir la actividad química y microbiológica (García Roldán, 2017).

- *PROPIEDADES DE LOS ENVASES:*

El uso potencial de los envases biodegradables depende en gran medida de sus propiedades físicas como barrera al vapor de agua, gases, luz y aroma, propiedades ópticas como la transparencia y propiedades mecánicas como la tensión a la rotura y el porcentaje de elongación (Ramos *et al.*, 2012).

*Propiedades físicas

- **Propiedades de barrera:** son fundamentales en cuanto a la protección del alimento frente a factores ambientales y contacto con otros productos e ingredientes. Estas incluyen la permeabilidad al vapor de agua, a otros gases y aromas (Ramos *et al.*, 2012). La transferencia de moléculas a través de un film polimérico sucede principalmente por dos mecanismos: por un lado, mediante microporos e imperfecciones que suponen una vía de paso para las moléculas, y por otro lado la difusión pasiva, en el que las moléculas se disuelven en la superficie y debido al efecto gradiente atraviesan el film por difusión (Garde, 2014). De este modo, la permeabilidad se define como la tasa de transmisión de vapor (o gas) a través de una unidad de área de material plano de una unidad de espesor, inducida por una diferencia de presión unitaria entre los dos lados del material, bajo condiciones específicas de temperatura y humedad (Ramos *et al.*, 2012).

La permeabilidad depende de la composición y estructura química (tipo e intensidad de unión entre polímeros, grado de entrecruzamiento, cristalinidad, adición de plastificantes u otros aditivos) del film y de la interacción con el permeante.

La permeabilidad al vapor de agua es uno de los principales parámetros que definen las propiedades de barrera de un material, ya que la mayoría de las reacciones de deterioro de los alimentos depende de la cantidad de agua presente en el alimento

(Ramos et al., 2012). En este caso, la transferencia de moléculas de un lado a otro se produce por difusión pasiva por lo que es dependiente de las propiedades químicas del polímero. Los films elaborados con polímeros de carácter hidrófobo alcanzan mayor eficacia en cuanto a permeabilidad al vapor de agua, mientras que los de carácter hidrofílico no son tan efectivos.

Es importante que los materiales empleados en envases tengan baja permeabilidad a aromas ya que la pérdida de aromas procedentes del alimento o la absorción de aromas del exterior puede provocar pérdidas considerables en cuanto a la calidad sensorial del producto, lo que limita la aceptación de este por parte del consumidor (Ramos et al., 2012).

**Propiedades mecánicas*

Las propiedades mecánicas es otro de los factores que limitan el uso de materiales ya que son necesarias fuerzas mecánica y de extensibilidad suficientes como para garantizar que se mantenga la integridad de los productos. La determinación de las propiedades mecánicas de un material se realiza mediante un análisis mecánico dinámico que consiste en un ensayo de tracción el cual permite definir las siguientes propiedades:

- Tensión máxima a la rotura: es la máxima tensión que un material puede soportar antes de quebrarse, expresada en Newton.
- Elongación relativa: es el cambio de dimensiones que ha sufrido el material durante el ensayo en relación a sus dimensiones iniciales, expresado en porcentaje.
- Módulo de elasticidad o de Young: es el cociente entre la tensión y la elongación del material en la fase elástica de su deformación. Es un indicador de la rigidez del material, y es directamente proporcional a la fuerza necesaria para provocar una deformación del material (Ramos et al., 2012; Garde, 2014).

La biodegradación es un proceso natural en el que se produce la descomposición de sustancias orgánicas mediante la acción de microorganismos presentes en suelos y

aguas. Durante este proceso se produce la despolimerización del material orgánico, seguido de una reacción de mineralización, que acaba generando moléculas como dióxido de carbono, agua o metano, biomasa y residuo. De este modo, se evita la producción de compuestos que pueden generar residuos tóxicos para el medioambiente (García Roldán, 2017).

El grado de biodegradación del empaque va a depender de las condiciones ambientales como temperatura, humedad, presión parcial del oxígeno, composición microbiana y pH del suelo (Guerrero-Beltrán, 2017).

3.4 POLISACÁRIDOS Y PROTEÍNAS USADAS EN ENVASES

Los films para envases derivados de biopolímeros naturales como los polisacáridos y proteínas son completamente biodegradables, derivan de materiales renovables (bajo costo y gran disponibilidad) y no deterioran el medioambiente después de ser utilizados. Las películas de biopolímeros tienen propiedades de barrera que retardan la migración de grasas, evitan la pérdida de sabores y limitan el transporte de gases (Ávila *et al.*, 2010).

Los polisacáridos son macromoléculas conformadas por monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos y su hidrólisis produce un gran número de moléculas de uno o más azúcares simples (monosacáridos) o sus derivados (Merodos-Torres *et al.*, 2020).

Los polisacáridos y las proteínas son polímeros que forman redes moleculares cohesionadas debido a una elevada interacción entre sus moléculas, lo que les confiere buenas propiedades mecánicas y de barrera a los gases O₂ y CO₂, por lo cual retardan la respiración y el envejecimiento de muchas frutas y hortalizas. Estos compuestos le aportan a las películas y recubrimientos dureza, transparencia, viscosidad y adhesividad (Merodos-Torres *et al.*, 2020).

Los polisacáridos son utilizados en la industria de alimentos como gelificantes, espesantes, estabilizantes y formadores de películas comestibles, entre otras aplicaciones. Se obtienen principalmente de vegetales, algas y microorganismos.

La utilización de biopolímeros para la producción de materiales de empaque, se ve condicionada a las modificaciones químicas que puedan sufrir para el mejoramiento de sus propiedades mecánicas, debido a que no todos los biopolímeros pueden cumplir con las demandas requeridas en cuanto a propiedades de películas biodegradables (propiedades de barreras y propiedades mecánicas). Sin embargo, la aplicación de estos biopolímeros busca no solo competir con las propiedades convencionales presentes en los plásticos sintéticos, sino aprovechar la inherente biodegradabilidad de estos biopolímeros (Rutiaga Quiñones, 2002).

La adición de surfactantes mejora la resistencia al vapor de agua de las películas formuladas con polisacáridos; sin embargo, las aplicaciones se ven limitadas, debido a que se incrementa la opacidad de las películas resultantes (Chambi-Grosso, 2011). Por sus efectos sinérgicos, la adición de una proteína a la formulación puede mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de películas comestibles de polisacáridos (Aguilar-Méndez et al., 2012).

Las películas elaboradas con proteínas consisten en redes de macromoléculas continuas, relativamente ordenadas y de baja humedad, presentan gran permeabilidad al vapor de agua, son buenas formadoras de películas y se adhieren a las superficies hidrofílicas. Sin embargo, pueden aumentar su resistencia a la transmisión de vapor de agua mediante la combinación de proteínas con materiales hidrofóbicos. Las principales proteínas que pueden ser empleadas en la elaboración de películas compuestas comestibles son: caseína, colágeno, gelatina, proteína de soya y proteínas derivadas de los cereales (Aguilar, 2005; Acosta, 2011). Una desventaja de estas películas es su sensibilidad a los cambios de pH, por lo que deben delimitarse a las condiciones óptimas de su formación.

3.5 CASEINA

La caseína se define como un grupo de proteínas (α -caseína, β -caseína, μ -caseína y κ -caseína) que son dominantes en la composición de la leche. Estas proteínas se producen o se obtienen por medio de la precipitación ácida o enzimática. La caseína comercial se obtiene a partir de la leche desnatada por precipitación ácida o

coagulación mediante el cuajo. En este proceso de separación es necesario eliminar, en la medida de lo posible y mediante varios lavados en varias etapas con agua, la grasa, las seroproteínas, las sales y la lactosa de la leche ya que dichas sustancias reducen la calidad de la caseína. La transparencia, la biodegradabilidad y las buenas características técnicas (barrera al oxígeno y al dióxido de carbono) hacen de las películas de caseína los materiales más innovadores para la formación de películas biodegradables. Sin embargo, los materiales basados en caseína, tienen las desventajas de estar limitados por malas propiedades mecánicas y poca resistencia al agua.

Las caseínas tienen masas moleculares entre 20-25 kDa y punto isoeléctrico de 4,6 (Schlimme y Buchheim, 2002). El punto isoeléctrico (pI) es el pH en el cual no tiene carga eléctrica neta la caseína y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico, por lo que no existe repulsión electrostática entre las moléculas vecinas y tiende a precipitar (Serpa Guerra et al., 2014).

Las caseínas tienen bajos niveles de estructura secundaria y terciaria, lo que les confiere gran flexibilidad y una estructura fácilmente desnaturizable por agentes como el calor y ser susceptibles a la acción de las enzimas. Los residuos hidrofóbicos, polares y cargados no se distribuyen uniformemente en las moléculas, sino que se concentran en zonas hidrofóbicas o hidrofílicas, confiriendo a sus estructuras un fuerte carácter anfipático y una gran hidrofobicidad superficial, responsable de sus propiedades espumantes y emulgentes. (Bravo Vázquez, 2012).

La caseína existe en partículas coloidales llamadas “micelas de caseína” que son voluminosas y que contienen más agua que caseína (Fernández Gutiérrez et al., 2004) como se muestra a continuación en las figuras 2 y 3.

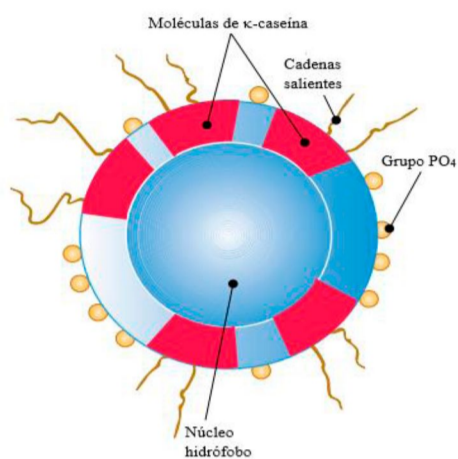


Fig. 2 Conformación de una submicela de caseína (Dairy processing handbook, 1995).

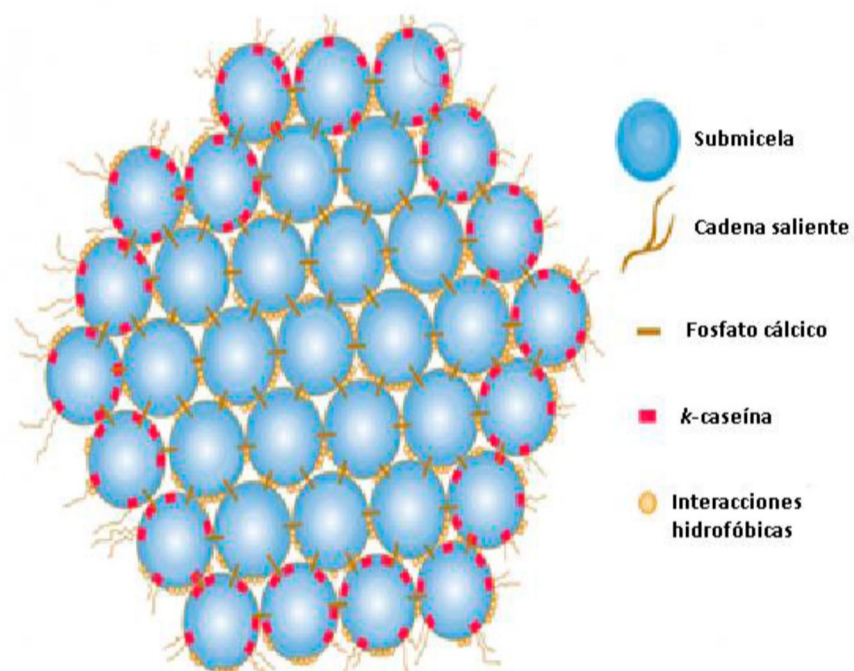


Fig. 3 Estructura de una micela de caseína (Dairy processing handbook, 1995).

Todas las caseínas son moléculas de gran tamaño que contienen fósforo y entre los aminoácidos más abundantes destacan el ácido glutámico y en menor grado leucina y prolina. Son proteínas conjugadas ya sea con grupos fosfatos (PO_4^{3-}) o

esterificados a los residuos de la serina, esos grupos fosfato son importantes en la estructura de las micelas de caseína. El balance de los grupos ionizables de diversas caseínas conduce a constatar un exceso notable de grupos ácidos sobre los básicos debido al ácido glutámico y aspártico que son dos aminoácidos diácidos. La k-caseína es la única que tiene una fracción glucídica que está formada por una o varias unidades de galactosamina, por lo que las proteínas son electronegativas, y por ello la gran facilidad para formar caseinatos (Fernández Gutiérrez et al., 2004).

El caseinato de sodio es un polímero soluble en agua, comercialmente disponible, obtenido por el agregado de NaOH a la solución acuosa de caseína (Audic y Chaufer, 2005). El caseinato es un material renovable y biodegradable, pero además forma films que presentan transparencia, propiedades de barrera a los gases (Chick y Ustunol, 1998), elevada calidad nutricional y excelentes propiedades sensoriales (Pereda et al., 2014).

Sin embargo, estos materiales tienen dos desventajas: flexibilidad limitada y alta sensibilidad al vapor de agua (Arrieta et al., 2011).

Las películas obtenidas a partir de caseinato resultan materiales de elevado módulo, pero muy frágiles. Esto ocurre por las fuertes interacciones entre las cadenas moleculares (puentes hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y posibles puentes disulfuro en el caso de las proteínas) (Pereda *et al.*, 2014). Esta fragilidad hace a estas películas inviables para ser utilizadas en envases, ya que se agrietan y resquebrajan durante su manipulación. La técnica habitual para mejorar la flexibilidad y extensibilidad de las películas es agregar un plastificante. Los plastificantes son líquidos hidrofílicos de bajo peso molecular que reducen la interacción entre las cadenas, aumentan el espacio intermolecular (Becerra López – Paz Rueda, 2009), y comparten puentes de hidrógeno con la red polimérica (Mangavel et al., 2003). El resultado es un aumento del volumen libre y de la movilidad de las cadenas de polímero, lo que por otro lado reduce la temperatura de transición vítrea del material y lleva a obtener películas más flexibles, aunque con menor resistencia mecánica (Pereda M. et al., 2014).

3.6 GELATINA DE PESCADO

La gelatina deriva de la degradación hidrolítica del colágeno, la fibra más abundante del tejido conectivo. Estas fibras son flexibles y tienen una notable resistencia a la fuerza tensional. La estructura básica del colágeno es una proteína fibrosa de peso molecular algo menor a 300 kDa, que mide unos 300 nm de longitud por unos 1,5 nm de espesor. Cada molécula de tropocolágeno está compuesta de tres cadenas polipeptídicas entrelazadas (figura 5). Cada uno de estos polipéptidos se denominan cadena alfa y poseen un peso molecular de 90 kDa aproximadamente. Estas cadenas se entrelazan para formar una triple hélice dextrógira (Olivares, 2007).

En esta triple hélice el 30 % de los residuos de aminoácidos constituyentes son de glicina y el 25 % son de hidroxiprolina y de hidroxilisina que se ubican en el exterior de esa triple hélice.

La unidad básica estructural del colágeno es el “tropocolágeno”, constituido por tres cadenas polipeptídicas del mismo tamaño y de composición idéntica o no, según el tipo de colágeno (figura 4).

El tropocolágeno se estabiliza por puentes de hidrógeno entre las tres cadenas que lo forman y enlaces covalentes entre residuos de lisina, mientras que, la fibra de colágeno se estabiliza por enlaces cruzados covalentes entre las unidades de tropocolágeno que involucran residuos de lisina, hidroxiprolina e histidina.

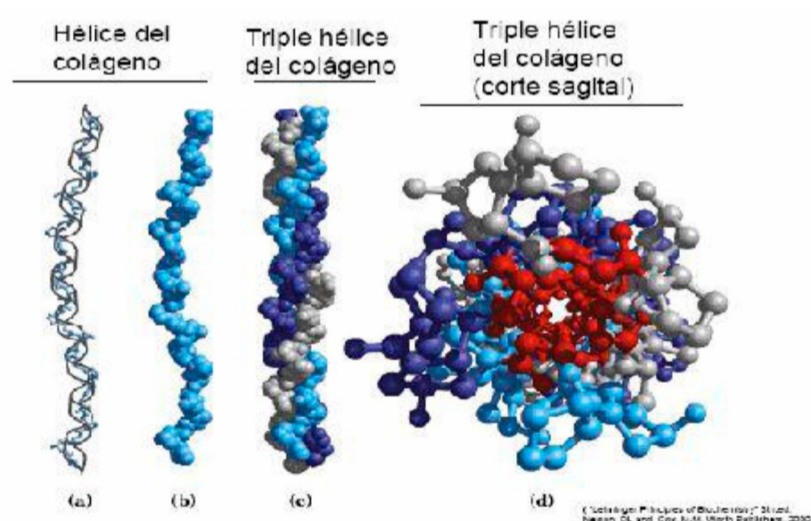


Fig. 4 Estructura triple hélice de colágeno. (David y Michael, 2002)

Cuando los tejidos que contienen colágeno (por ejemplo, piel de merluza) se someten a procesos degradativos que involucran hidrólisis alcalina o ácida seguido de una extracción acuosa en caliente, la estructura fibrosa del colágeno se rompe irreversiblemente y se obtiene gelatina (Olivares, 2007).

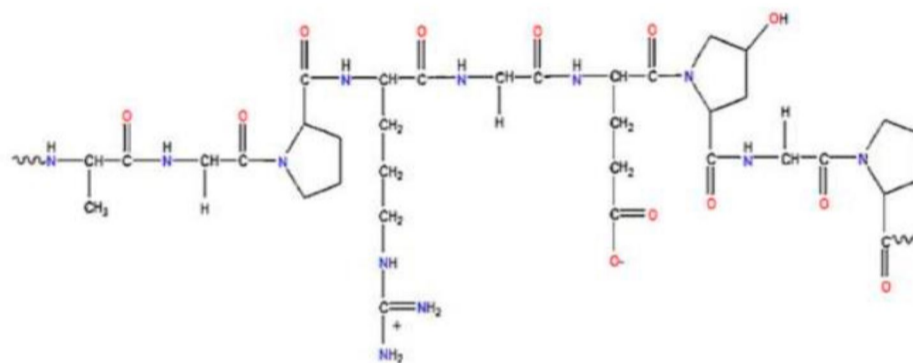


Fig. 5 Estructura representativa de gelatina (Chaplin, 2012).

En la gelatina existen tres tipos predominantes de cadenas que se pueden encontrar después de la degradación:

- Cadena alfa: compuesta por una sola cadena peptídica
- Cadena beta: formada por dos cadenas peptídicas conectadas
- Cadena gamma: que resulta del vínculo entre tres cadenas

Debido a la presencia de las mismas y sus fragmentos intermedios, una muestra de gelatina tiene una amplia distribución de pesos moleculares. En menor cantidad se detectan fracciones de pesos moleculares pequeñas y muy altas (Normand et al., 2000)

El proceso alcalino a través de la remoción de grupos amida provee una gelatina con una alta densidad de grupos carboxilos que la hacen negativamente cargada a pH neutro, es decir, el punto isoeléctrico es relativamente bajo. Por el contrario, la naturaleza eléctrica del colágeno del cual se obtiene la gelatina no es sustancialmente modificada mediante el proceso de extracción ácido y como resultado se obtiene una gelatina con un punto isoeléctrico relativamente alto (Ward y Courts, 1977). La gelatina posee propiedades características, por ejemplo, forma una solución de elevada viscosidad en agua y produce un gel cuando esta solución

se enfría. Asimismo, estas macromoléculas en solución se comportan como polianfolitos debido a la composición de aminoácidos básicos y ácidos (Dobrynin et al., 2004). En general, la conformación de las cadenas de gelatina depende del medio fisicoquímico en el que se encuentran disueltas, teniendo en cuenta que estas moléculas tienden a estabilizarse mediante diferentes tipos de fuerzas inter e intramoleculares, en las que intervienen principalmente los enlaces del tipo puente hidrógeno (Herning et al., 1991; Djabourov et al., 1993 Bohidar y Jena, 1994; Bohidar, 1998; Tromp et al., 2002).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Leche descremada

Se utilizó leche descremada por tener menor porcentaje de grasa, y se sometió a precipitación ácida para la obtención de caseína.

4.1.2. Piel de merluza

Se lavaron con abundante agua fría, se les retiraron las escamas y los restos de carne. Se conservaron en el freezer hasta su utilización.

4.1.3. Reactivos

Tabla. 2: Reactivos utilizados en los ensayos.

Reactivos	Fórmula química	Calidad	Laboratorio
Ácido acético glaciar	C ₂ H ₄ O ₂	Pro-análisis	Biopack
Ácido clorhídrico	HCl	Pro-análisis	Cicarelli
Ftalato ácido de potasio	KC ₈ H ₅ O ₄	-	BDH Laboratory
Buffer pH 4, 7 y	-	-	Biopack

10			
Cloruro de calcio	CaCl ₂	-	Cicarelli
Etanol	C ₂ H ₅ OH	-	Sanicol
Éter sulfúrico	C ₄ H ₁₀ O	Pro-análisis	Cicarelli
Fosfato diácido de potasio	KH ₂ PO ₄	Pro-análisis	J.T Baker
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	-	-
Hidróxido de sodio	NaOH	Pro-análisis	Anedra
Leche descremada	-	-	Ilolay

4.1.4. Materiales de laboratorio

Tabla. 3: Materiales de laboratorio utilizado en los ensayos.

Materiales de laboratorio	
Pipetas graduadas y aforadas	Varillas de vidrio
Erlenmeyer	Espátulas
Vasos de precipitados	Cajas de Petri
Cápsulas de permeación	Embudo cónico
Tubos de centrifuga	Probetas
Pie universal	Termómetro
Buretas	Matraz aforado
Bandejas de polipropileno de 15 cm x 10 cm x 5 cm	Mallas mosquiteras de plástico

4.1.5. Equipos

Tabla. 4: Equipos de laboratorio utilizado en los ensayos.

Equipos de laboratorio	
Agitador magnético ZELLECS MS-5	Peachímetro Oakton pHtestr 2
Centrífuga ROLCO Modelo 2036	Balanza analítica RADWAG AS

	220.R2
Especímetro Schwyz	Espectrofotómetro IR Varian 1000 FT-IR Scimitar Series
Texturómetro TA-XT2i	Estufa de secado DALVO INSTRUMENTOS
Equipo para electroforesis Mini- PROTEAN IV de BioRad	

4.2 METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA OBTENCIÓN DE GELATINA DE PESCADO (GP)

Para la obtención de GP se utilizó la metodología descrita por Miano et al., 2014. Para ello se realizó la hidrólisis alcalina de la piel de merluza la cual previamente fue limpiada para eliminar las escamas y restos de carne.

La piel de pescado fue cortada en cuadrados de 1 cm de lado aproximadamente y se le realizó un pretratamiento con NaOH 0,1 M a 10 °C por 48 horas, con una relación masa de piel (g): volumen de solución (mL) 1:3 (p/v). Luego fue lavada con agua y neutralizada con HCl 0,05 M.

En la etapa de extracción la piel fue colocada en un vaso de precipitados con agua en relación 1:4 (p/v) y se mantuvo a 60 °C por 4 horas. Se filtró la suspensión para obtener la parte líquida (gelatina en solución). Esta solución fue congelada por 24 horas. Posteriormente se llevó a temperatura ambiente y se separó el agua excedente. Finalmente, los geles de gelatina se colocaron en cajas de Petri y fueron llevados a estufa para su secado. Luego la gelatina obtenida fue molida con un molinillo y el polvo se guardó hasta su utilización.

El rendimiento gravimétrico porcentual (RG %) de la GP extraída se determinó en base a la masa de piel húmeda utilizada. El resultado fue expresado en porcentaje de acuerdo a la ecuación 1 (Binsi et al., 2009):

$$RG (\%) = \frac{\text{Masa de gelatina obtenida (g)}}{\text{Masa de piel húmeda (g)}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

4.3. CARACTERIZACIÓN DE GELATINA DE PESCADO

4.3.1. Determinación del punto isoeléctrico de GP

Se prepararon 50 mL de una solución acuosa de GP 0,5 % p/v y se añadió dos gotas de NaOH 0,5 M, se midió el pH inicial de la solución.

Se completó una bureta de 25 mL con ácido acético 0,5 M y se procedió a la titulación de la solución registrando el pH, hasta la aparición de turbidez (punto final). Se graficó el pH en función del volumen de solución de ácido acético, se calculó mínimo o máximo de la derivada primera que corresponde al punto isoeléctrico de la gelatina.

4.3.2. Determinación de Peso Molecular aparente de GP

El Peso Molecular de la GP se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Para ello, se preparó una solución acuosa de GP 0,15 % p/v, de la cual se extrajeron 20 μ L. En la técnica se utilizaron dos tipos de geles, el primero llamado de siembra que es un gel de baja concentración preparado con buffer pH 6,8 permitiendo que la muestra se concentre y llegue al segundo gel llamado separador preparado con buffer pH 8,8. La muestra fue mezclada con 10 μ L de buffer de siembra y calentada a 95 °C por 5 minutos. La corrida comenzó a 60 V y se aumentó a 100 V durante una hora y media a temperatura ambiente durante 90 minutos aproximadamente. Las bandas de proteínas fueron teñidas con una solución de azul de coomassie R-250 al 0,2 % p/v y destañadas con solución metanol:agua:ácido acético (5:4:1 v/v/v). La masa molar aparente de las bandas que constituye la GP se calculó mediante un marcador de PM (formado por una mezcla de proteínas de PM conocido).

4.4. METODOLOGÍA EMPLEADA PARA OBTENER CASEÍNA /CASEINATO DE SODIO

La caseína se obtuvo de la precipitación ácida de la leche. Se calentó a 40 °C leche descremada y se agregó gota a gota ácido acético (HAc) 10 % v/v hasta la

formación de precipitado, se detuvo la agitación, se dejó decantar y se filtró para separar el suero (líquido) del sólido. El precipitado obtenido es caseína.

La caseína obtenida se lava con 25 mL de etanol, luego con una mezcla 1:1 de etanol:éter sulfúrico para retirar la materia grasa presente. Finalmente se filtró y se llevó a estufa hasta peso constante. Una vez seca y fría fue triturada para obtener un polvo fino.

La solución de caseinato de sodio se obtuvo solubilizando 1,2 g de caseína en 40 mL de agua (solución 3 % p/v), se dejó reposar en frío durante 3 días. Por último, se agregó 1 mL de NaOH 0,1 M y se agitó hasta total disolución.

4.5. CARACTERIZACIÓN DEL CASEINATO DE SODIO

4.5.1. Determinación del punto isoeléctrico (pI) de la Caseína

- Preparación de la solución de caseína:
 - Colocar aproximadamente 250 mg de caseína en un vaso de 50 mL.
 - Agregar 20 mL de agua y 5 mL de NaOH 1 M; agitar hasta lograr una disolución total de la caseína.
 - Una vez disuelta la caseína, verter en un matraz aforado de 50 mL, adicionar 5 mL de ácido acético 1 M y enrasar con agua destilada.
- Determinación del pI:
 - En diez vasos de 25 mL limpios y secos adicionar los volúmenes de reactivos según la tabla 5:

Tabla 5: Volúmenes (mL) de reactivos agregados a cada vaso.

Vaso	Acetato de Sodio 0,1 M (mL)	Ác. Acético 0,1 M (mL)	Ác. Acético 0,01 M (mL)	pH
1	0,5	9,5	-	3,4
2	1	9	-	3,7
3	1,5	8,5	-	3,9
4	2	8	-	3,9
5	3	7	-	4,2

6	4	6	-	4,4
7	6	4	-	4,7
8	8	2	-	5,1
9	6	-	4	5,5
10	8	-	2	6,5

- Medir el pH de todos los vasos
- Añadir 1 mL de disolución de caseína a cada vaso
- Agitar suavemente cada vaso y esperar aproximadamente 3 minutos
- Medir la absorbancia de cada muestra a 640 nm
- Representar la absorbancia frente al pH en un gráfico cartesiano, y determinar el pI aproximado de la caseína

4.5.2. Determinación de Peso Molecular aparente de Caseína

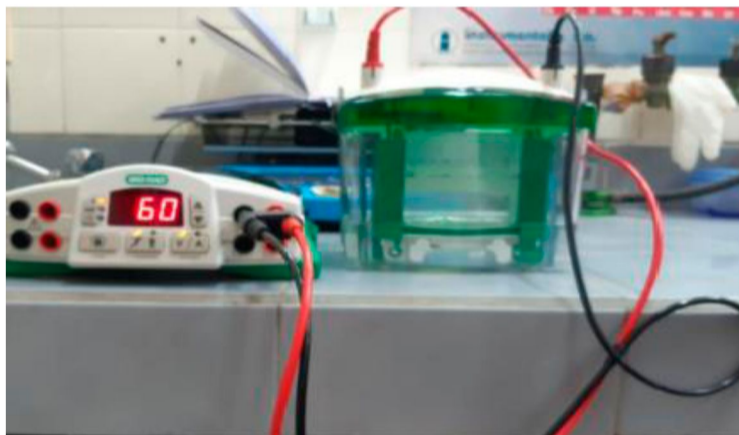


Foto 1: Equipo de electroforesis utilizado en el ensayo.

El Peso Molecular aparente de la caseína se obtuvo mediante electroforesis (Foto 1) en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio. Se procede igual que para la determinación del Peso Molecular aparente de GP.

4.6. PREPARACIÓN DE FILMS MEDIANTE CASTING

4.6.1. Caseinato de Sodio

Se prepararon 40 mL de una mezcla acuosa de caseína 3 % p/v, se agitó durante 60 minutos, luego se agregó 1 mL de NaOH 0,1 M y se dejó reposar en frío durante tres días para favorecer su disolución. Posteriormente la solución fue agitada durante 60 minutos, se agregaron 0,35 mL de glicerol y se continuó la agitación hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla fue centrifugada y volcada en caja de Petri, para finalmente ser llevada a estufa por aproximadamente 24 hs a 40 °C, hasta peso constante.

4.6.2. Gelatina de Pescado

Se prepararon 40 mL de una solución acuosa solubilizando 1,2 g de GP en 40 mL de agua a 40°C (3% p/v). Se le adicionó 0,35 mL de glicerol a la solución filtrada y se agitó durante 48 hs. La mezcla fue centrifugada y volcada en caja de Petri, para finalmente ser llevada a estufa por aproximadamente 24 hs a 40°C, hasta peso constante. Se obtiene film tal como se muestra en la Foto 2:



Foto 2: Film de GP.

4.6.3. Mezclas Gelatina de Pescado/Caseinato (GP/CAS)

Se mide con probeta los volúmenes correspondientes a cada solución para lograr las distintas proporciones: 95/5, 90/10 y 85/15 GP/CAS, según se muestra en la tabla 6, se agregó 0,35 mL de glicerol a cada mezcla. Las mezclas fueron agitadas durante 48 hs, centrifugadas y colocadas en cajas de Petri para luego ser llevadas a la estufa a 40°C hasta peso constante. Los films obtenidos se pueden ver en la Foto 3.

Tabla 6: Volúmenes de CAS y GP agregado a cada mezcla

Mezcla	Volumen de caseinato (mL)	Volumen de GP (mL)
GP95/CAS5	2	38
GP90/CAS10	4	36
GP85/CAS15	6	34

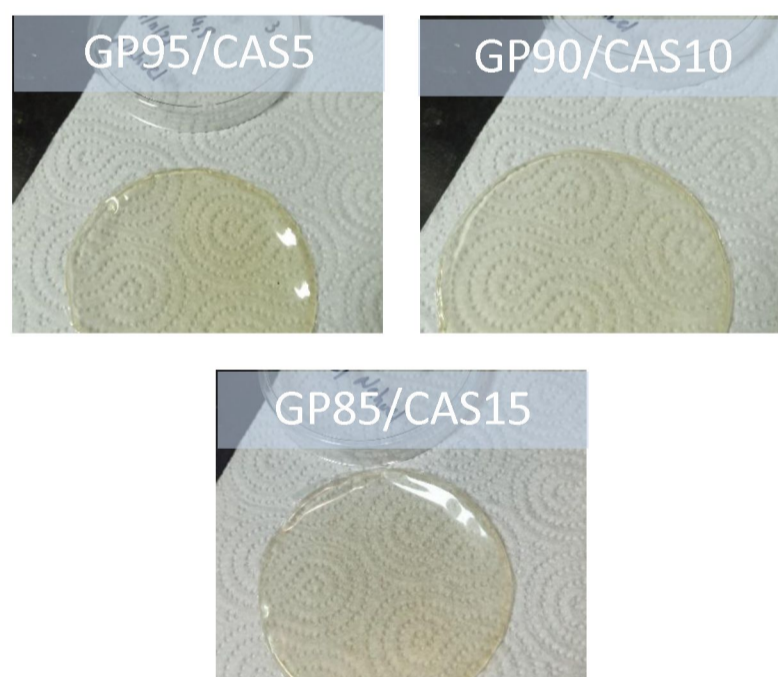


Foto 3: Films GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15.

4.7. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y SUPERFICIAL DE LOS FILMS

4.7.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía FTIR es una de las herramientas más utilizada para la caracterización de polímeros. Esta se basa en las vibraciones de los átomos y sus grupos funcionales en las moléculas a causa de su interacción con la radiación emitida en la región infrarroja del espectro electromagnético. El espectro infrarrojo se obtiene haciendo pasar a través de la muestra una radiación de la longitud de onda adecuada y determinando que fracción de la energía incidente es absorbida a causa de los diferentes movimientos de enlaces. Dado que los niveles de energía vibracionales son diferentes para cada molécula, el espectro IR se puede considerar como la huella digital de cada molécula (López-Serrano y Mandiázabal, 2015).

En este trabajo se utilizó la espectroscopía FTIR para caracterizar los grupos funcionales y poder observar los posibles cambios causados por las interacciones entre los distintos componentes de las mezclas. Para ello se utilizó un equipo FTIR-8501 SHIMADZU (Ceprocor, Córdoba). Todas las corridas se realizaron entre 400 y 4000 cm^{-1} . Se realizaron los espectros a los films GP95/CAS5, GP90/CAS10, GP85/CAS15, CAS y GP.

4.7.2. Propiedades Mecánicas

Los films deben poseer una resistencia mecánica y una extensibilidad adecuadas para mantener la integridad y soportar las tensiones externas que prevalecen durante el procesamiento, manipulación y almacenamiento. Estas propiedades mecánicas (tensión y elongación) dependen del tipo de material utilizado para su formación, adición de agentes estructurantes y aditivos; y pueden variar con el espesor del film y la velocidad de prueba utilizada (Ramos et. al., 2012).

Las propiedades mecánicas fueron evaluadas utilizando un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK). Se utilizaron secciones de films rectangulares que fueron acondicionadas a 20°C y 50% de humedad relativa. La

separación inicial fue de 50 mm, a una velocidad de estiramiento de 30 mm/min. A cada film se le realizó el ensayo por triplicado para determinar la fuerza de rotura y elongación máxima.

4.7.3. Determinación de porcentaje de absorción de agua

Se recortó un trozo de film de aproximadamente 2 cm de lado, se registró su peso seco y luego se colocó en una caja de Petri cubierto con agua por 24 hs a temperatura ambiente, posteriormente se secó con papel absorbente y se registró el peso en balanza analítica. Se calculó el porcentaje de agua absorbida por el film de acuerdo a la ecuación 2:

$$\text{Absorción de agua (\%)} = \frac{W_h - W_s}{W_h} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Donde W_h corresponde al peso del film hidratado, y W_s al peso del film seco.

4.7.4. Determinación de índice de hinchamiento a pH 4 y 7

Se recortó un trozo de film de aproximadamente 2 cm de lado, se registró su peso seco en balanza analítica, se lo sumergió en un vaso de precipitado que contenía buffer a pH 4; cada 5 minutos se secó y se registró el nuevo peso. La operación se repitió hasta que el film se deformó. Lo mismo se realizó con buffer pH 7.

El índice de hinchamiento fue calculado de acuerdo a la ecuación 3:

$$IH = \frac{W_h - W_s}{W_h} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde IH es el índice de hinchamiento, W_h es el peso del film hinchado y W_s es el peso del film seco.

4.7.5. Determinación de la permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó según una modificación del método desecante, descrito en la norma ASTM E96M-10.

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Para realizar esta prueba se armó un equipo de permeación, el cual cuenta con un higrómetro, una cápsula de permeación (Foto 4), una solución saturada de NaCl y una cuba donde se colocaron todos los elementos mencionados. Los films se colocaron en la cámara de humedad controlada por 48 horas previo al ensayo.



Foto 4. Cámara de permeación



Foto 5. Cápsulas de permeación

Una vez transcurrido este tiempo, se colocó en la cápsula de permeación 2/3 de la capacidad de la misma de CaCl_2 (Foto 5) que ha sido previamente secado en estufa a 200°C por dos horas. Se tomaron 5 medidas del espesor de cada film con un especímetro; luego se engrasan los bordes de la cápsula con silicona para lograr un cierre hermético y se coloca el film en la cápsula con la cara superior hacia abajo, cuidando que quede un espacio de medio centímetro entre el film y el CaCl_2 . Se procede al cierre de la cápsula. Se registra el peso inicial con balanza analítica, además de la temperatura y el porcentaje de humedad relativo inicial (% HRi) de la cuba de permeabilidad. Se evalúa el incremento de masa con balanza analítica cada hora, durante 7 horas.

Posteriormente se grafica la variación de la masa de la cápsula en función del tiempo y se determina la velocidad de transmisión al vapor de agua (WVTR) a partir de la ecuación 4:

$$WVTR = \frac{f}{A} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

f = flujo (pendiente del gráfico de variación de masa en función del tiempo) (g/h).

A = área de superficie de la película expuesta al vapor de agua o permeante (m²).

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se calcula a partir de la ecuación 5:

$$WVP = \frac{WVTR \times e}{[S \times (RH1 - RH2)]} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde:

e = Espesor de la película (cm)

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

RH1-RH2 = Gradiente de humedad relativo utilizado en el ensayo.

4.8. BIODEGRADACIÓN EN SUELO

Se consideró necesario analizar la degradación en suelo de los films GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15, con el objetivo de comprobar si el material, pese a las mezclas, conservaba su biodegradabilidad intrínseca. Se estudió la degradación a films de caseinato (CAS), y gelatina (GP) a los fines comparativos.

El ensayo se realizó en bandejas de poliestireno de 15 cm x 10 cm x 5 cm conteniendo tierra de jardín húmedo (Foto 6). Las muestras de los distintos films se cortaron en trozos de 2-3 cm y se colocaron en el interior de bolsitas (5 cm x 4 cm) diseñadas con malla plástica. Los agujeros en la malla permitieron el acceso de los microorganismos y la humedad y las muestras degradadas pudieron ser fácilmente extraídas de las mismas. Las bolsitas con el film se enterraron a una profundidad de 2 cm de la superficie, de manera de asegurar la degradación aeróbica. El suelo de jardín se mantuvo en condiciones de humedad mediante la aspersión periódica de agua a temperatura ambiente.

Se calculó el porcentaje de pérdida de peso de las muestras (Wp) como indica la ecuación 6:

$$Wp = \frac{Wi - Wf}{Wi} \times 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde Wi es el peso de los films al inicio de la prueba de biodegradación y Wf el peso de los films al final del experimento. Diariamente se desenterraron las muestras y se dejaron secar al aire. Una vez seco, se cepillaron cuidadosamente con un pincel suave con el objetivo de eliminar cualquier resto de suelo y se registró el peso. Esta operación se repitió hasta que el deterioro del film no permitió pesarlo.



Foto 6: Bandeja donde se enterraron los films

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 OBTENCIÓN DE GELATINA DE PESCADO

Se obtuvo una gelatina transparente, con una leve coloración amarillenta (Foto 7), lo que favorecería su incorporación a los sistemas alimentarios sin atribuirle ninguna coloración adicional al producto (Jamilah y Harvinder, 2002).



Foto 7. A la izquierda GP molida, a la derecha GP seca antes de triturar

El color de la gelatina comercial varia de amarillo pálido a ámbar oscuro y es considerado un atributo comercial importante. La turbidez y el color oscuro son comúnmente causados por sustancias contaminantes que no se eliminan durante el procedimiento de extracción. El color final de la gelatina depende de varios factores como la especie de pez y las condiciones de extracción (Alfaro et al., 2015).

En la tabla 7 se puede observar el rendimiento porcentual obtenido de la extracción de gelatina a partir de piel de merluza.

Tabla 7: RG obtenido para GP.

Ensayo	Peso de piel (g)	GP (g)	Rendimiento (%)
1	100	13,9671	13,97
2	100	14,0128	14,01
3	100	14,1035	14,10

Los rendimientos de gelatina obtenidos en este trabajo son similares a los reportados en peces de agua fría como bacalao con rendimientos del 11% (Gudmundsson y Hafsteinsson, 1997) y tollo con rendimientos del 16,7% (Miano et al., 2014).

Las variaciones en los rendimientos de gelatina dependen de la especie de pez, la edad, el contenido de colágeno y la cantidad de componentes solubles presentes en la piel, que a su vez varían con el método de extracción empleado (Muyonga et al., 2004). Además, existen pérdidas del colágeno como consecuencia de los sucesivos

lavados de la piel y por hidrólisis incompleta del colágeno durante la extracción dado por el alto grado de entrecruzamiento de los enlaces covalentes, que hacen decrecer la solubilidad del colágeno.

5.2 DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO DE GELATINA DE PESCADO

Dependiendo del método de pretratamiento de la piel de pescado se obtienen dos tipos de gelatina con características diferentes. La gelatina tipo A es producida por un pretratamiento ácido con un pI de 6-9 y la gelatina tipo B con un pretratamiento alcalino presenta un pI de 5 aproximadamente (Karim y Bhat, 2009).

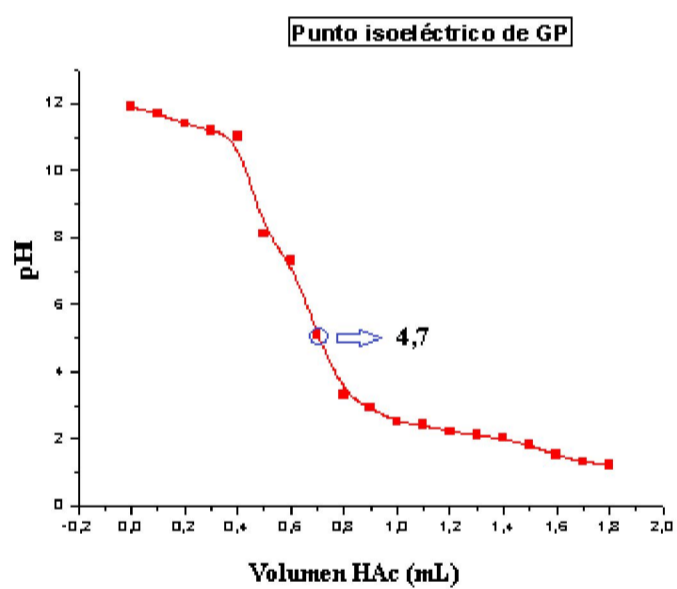


Fig 6: Curva de titulación para GP

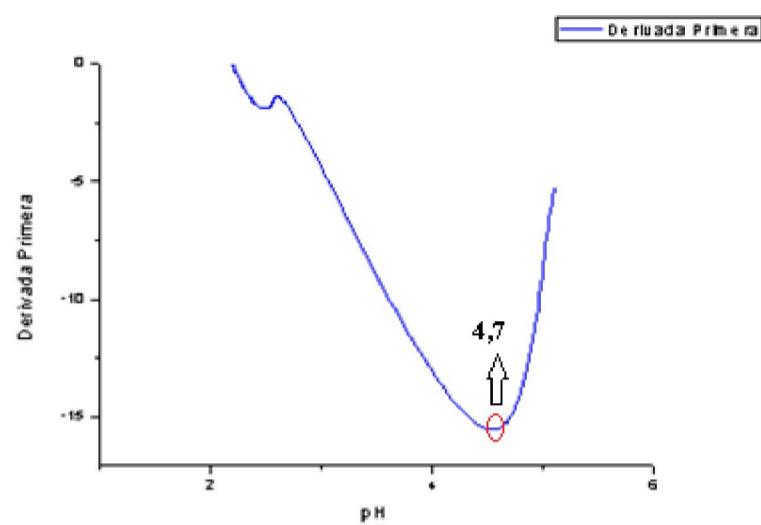


Fig. 7: Derivada primera para GP.

En este trabajo se utilizó el método alcalino para la extracción de la gelatina de la piel de merluza y se obtuvo un punto isoeléctrico de 4,7, que corresponde al punto donde la derivada primera se hace mínima.

5.3 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR APARENTE DE GP

En la electroforesis se observan 6 bandas entre 100-200 kDa que se muestran a continuación en la foto 8:

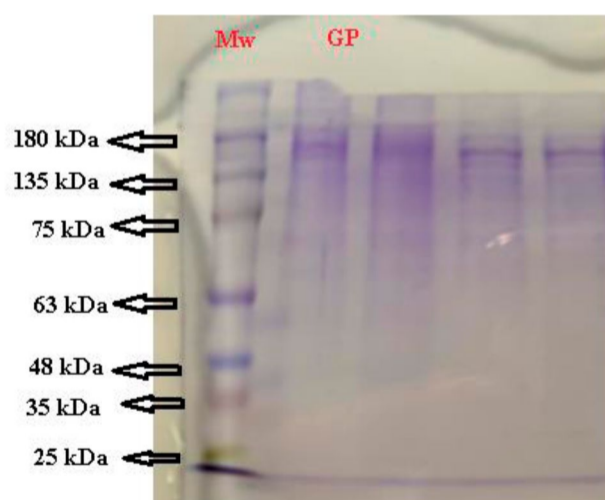


Foto 8: Electroforesis en gel de poliacrilamida de GP.

En la tabla 8 figuran los pesos aparentes:

Tabla 8: Marcador de peso molecular (Mw) y Pesos moleculares aparentes de GP.

Calle 1 – Mw (kDa)	Calle 2 y 3 - GP (kDa)
180	150
135	105
75	66
63	54
48	35
35	29
25	-

Pesos moleculares aparentes similares se describen en el trabajo de Gómez-Guillen *et al.* (2002) donde se señala que los pesos moleculares de la gelatina varían entre 30-300 kDa dependiendo de la especie y proceso de extracción. También señalan que las especies provenientes de aguas cálidas presentan mayores contenidos de componentes de alto peso molecular que los de agua fría (como la merluza utilizada en este trabajo) lo que explica los bajos pesos moleculares obtenidos en la electroforesis.

Por otro lado, las gelatinas con componentes de bajo peso molecular presentan propiedades funcionales reducidas como bajo punto de fusión, baja viscosidad y baja gelificación, demostrando que los componentes influyen en las propiedades de la gelatina (Muyonga *et al.*, 2004).

Además, las bandas observadas de menores pesos moleculares están relacionadas con una mayor degradación del colágeno que se relaciona con el método de extracción utilizado y a la concentración utilizada (Santiz Gomez, 2012).

5.4 OBTENCIÓN DE CASEINA

La caseína obtenida por precipitación ácida a partir de leche descremada presentó una coloración amarillenta como se observa en la foto 9.

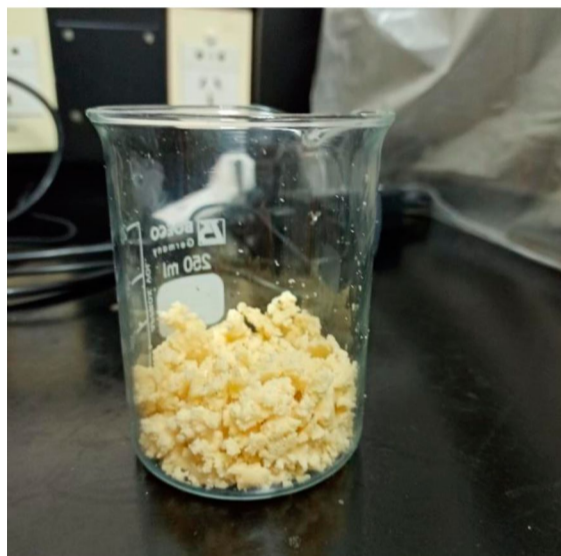


Foto 9. Caseína en polvo.

Tabla 9: RG obtenido para CAS.

Ensayo	Volumen de Leche (mL)	Caseína (g)	Rendimiento (%)
1	1000	38,1	3,8
2	1000	40,0	4,0

Esta caseína obtenida presentó un rendimiento gravimétrico de entre 3,8-4,0 %, similar a lo reportado por Zambrano y Quiroz (2011) quienes obtuvieron un rendimiento de entre 2,4-3,1%, y por debajo de lo reportado por Ruiz y Bastidas (2015) con un rendimiento de 5,25% con un litro de leche descremada.

5.5 DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELECTRICO DE LA CASEINA

Según Bravo-Vázquez, (2012) en la leche se pueden identificar 2 clases de proteínas: las proteínas de suero y las caseínas. Estas proteínas se separan mediante acidificación de la leche a pH 4,6, el punto isoelectrico de las caseínas, que produce su precipitación.

En el caso de la caseína el punto isoelectrico se determinó mediante espectrofotometría UV-vis donde el punto de máxima absorbancia es el punto isoelectrico.

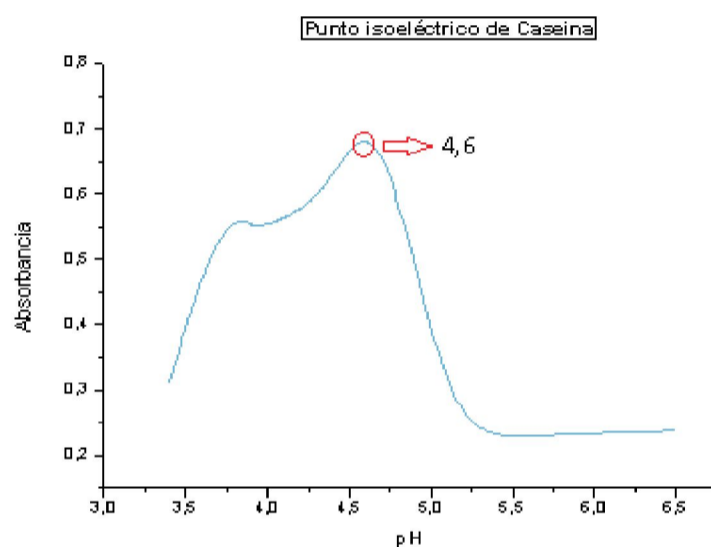


Fig. 8: pI obtenido para CAS.

Al agregar el ácido se remueve el sodio y el fosfato de sodio, y precipita CAS aumentando la carga negativa debido a un proceso de disociación de los iones sodio. Por consiguiente, tendrá moléculas en suspensión (se observa turbidez) por lo que absorberá una mayor cantidad de luz en el espectrofotómetro (Zimmermann-Stein y Ruiz-Espinoza, 2010).

Para determinar la longitud de onda de trabajo se utiliza una concentración conocida de Albúmina como patrón y reactivo de Biuret. Con esto se mide la absorbancia máxima que es proporcional a la concentración de Albúmina.

En este trabajo se obtuvo un punto isoeléctrico de 4,6 acorde a lo descrito por Bravo-Vázquez (2012).

5.6 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR APARENTE DE CASEINA

En la electroforesis se observan 3 bandas entre 29-35 kDa que se muestran a continuación en la foto 10

:

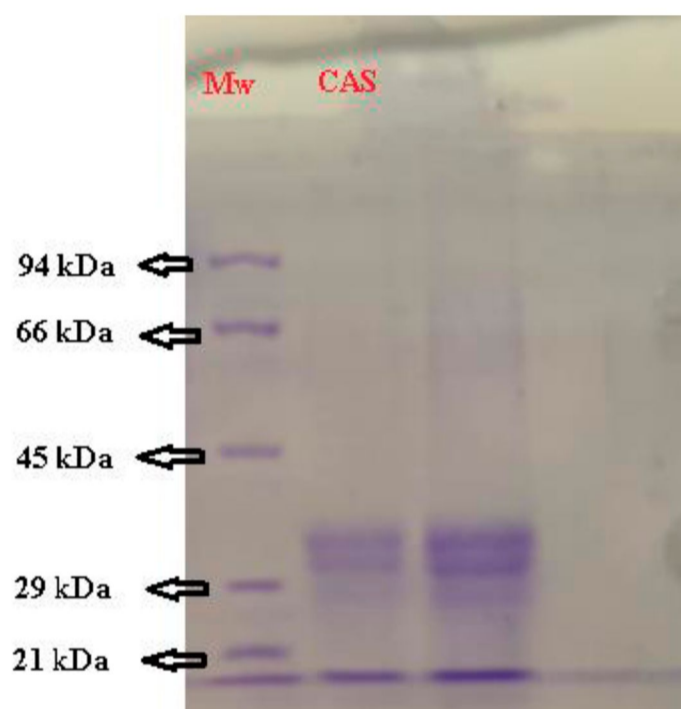


Foto 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida de CAS.

En la tabla... se muestra el los pesos moleculares aparentes para CAS:

Tabla. 10: Marcador de peso molecular (Mw) y peso molecular aparente de CAS.

Calle 6 – Mw (kDa)	Calle 7 y8 - CAS
94	-
66	-
45	35

29	31
21	29

5.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS FILMS

5.7.1. Aspecto de los films

Se obtuvo una GP transparente (Foto 11), con una leve coloración amarillenta, con espesor de 125 micras. En cuanto a la CAS, se obtuvo un producto amarillento opaco, con un espesor menor, comparado con el resto de los films, de 110 micras. El films de CAS debido a su espesor resultó ser difícil de manipular sin que el mismo se rompa.

Para los films mezclas GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15, se obtuvieron productos de color amarillento, con espesores entre 126-130 micras. (Foto 12, Foto 13 y Foto 14).



Foto 11: GP

Foto 12: GP95/CAS5

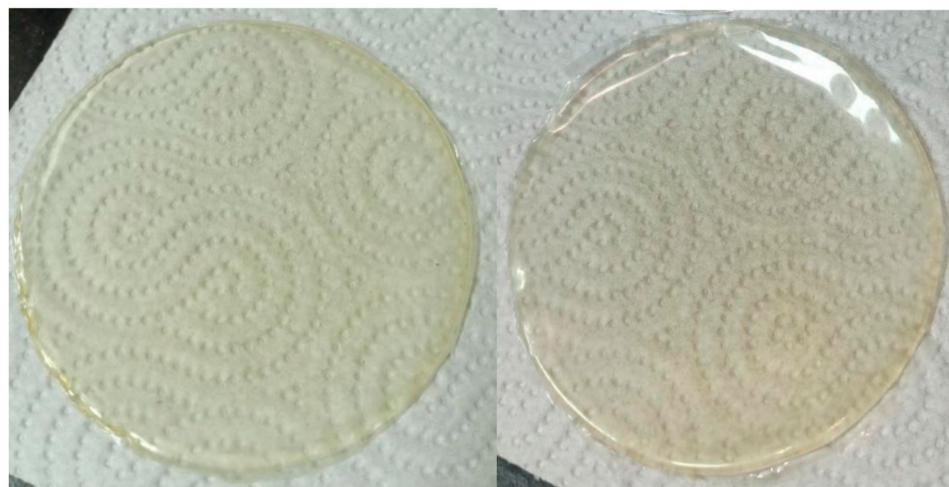


Foto 13: GP90/CAS10

Foto 14: GP85/CAS15

5.7.2. Espectroscopía infrarroja FTIR

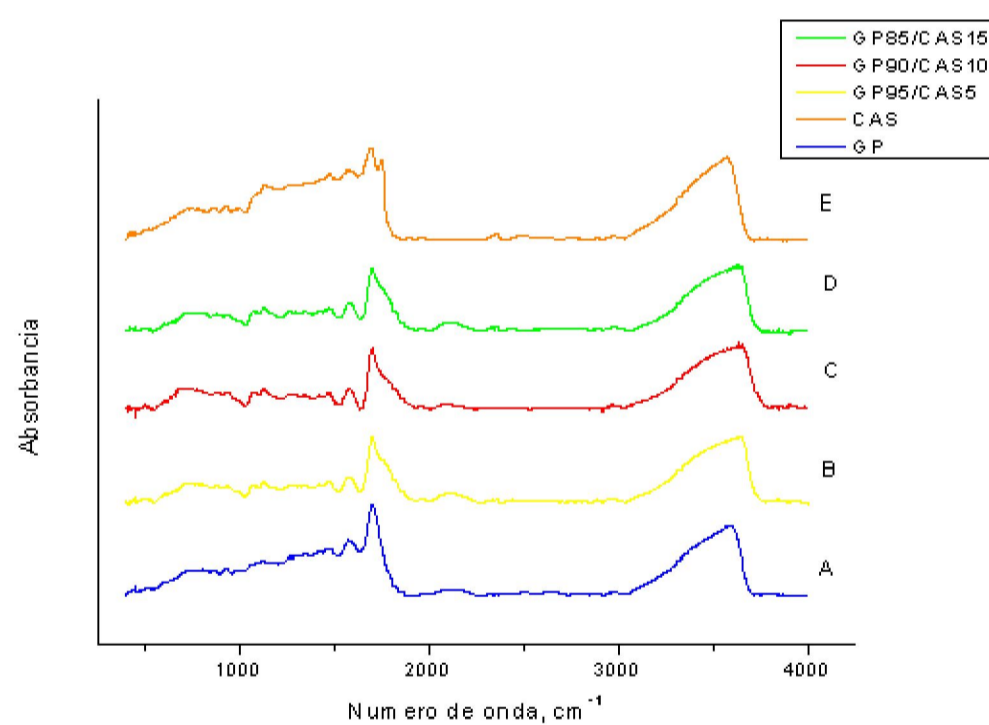


Fig. 9. Espectro FTIR de films de GP, GP95/CAS5, GP90/CAS10, GP85/CAS15 y CAS.

En la figura 9 se pueden observar los espectros FTIR de los films GP (A), GP95/CAS5 (B), GP90/CAS10 (C), GP85/CAS15 (D) y CAS (E).

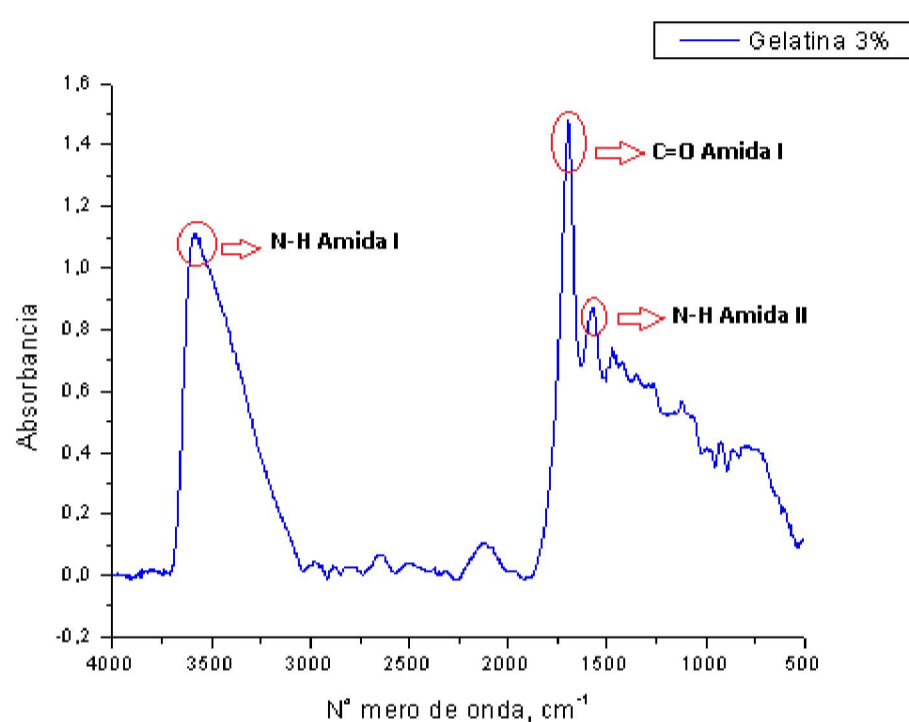


Fig. 10. Espectro FTIR de GP.

Tabla. 11: Absorbancias de grupos funcionales para GP

Grupo funcional	GP (cm ⁻¹)	Asignación
N-H	3500	Vibración de estiramiento N-H (Amida I)
C=O	1600	Vibración de estiramiento C=O (Amida I)
N-H	1500	Vibración de deformación N-H (Amida II)

En el espectro del film GP es posible observar una banda en 3500 cm⁻¹ correspondiente a la amida I, asociada con las vibraciones de estiramiento asimétrico del enlace N-H. La banda amida I representa las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo en los péptidos con algunos estiramientos mínimos de los enlaces C-N y movimientos de flexión del grupo N-H, encontrándose a 1600 cm⁻¹. La banda correspondiente a la amida II se observa a 1500 cm⁻¹ que corresponde a las vibraciones de deformación del grupo N-H y estiramiento del

grupo C-N. Los resultados se condicen con lo reportado por Fernández Cervantes (2018).

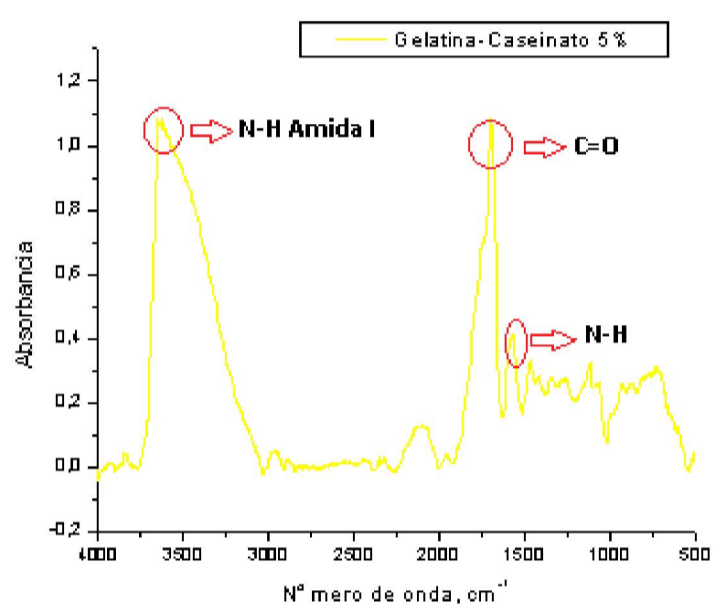


Fig. 11. Espectro FTIR de GP95/CAS5.

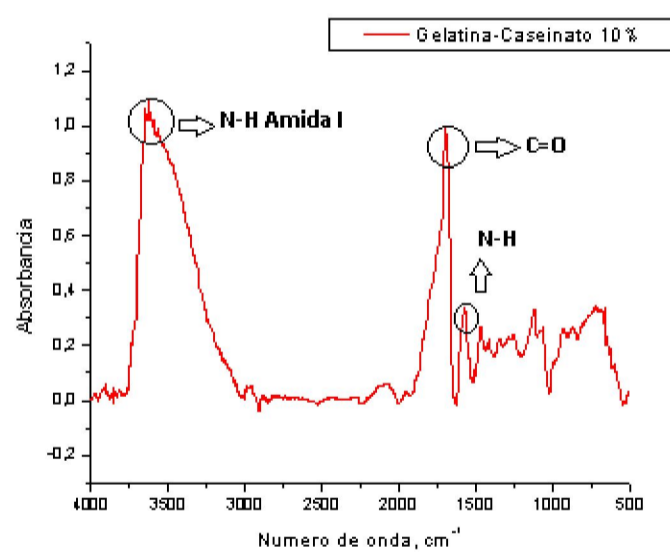


Fig. 12. Espectro FTIR de GP90/CAS10.

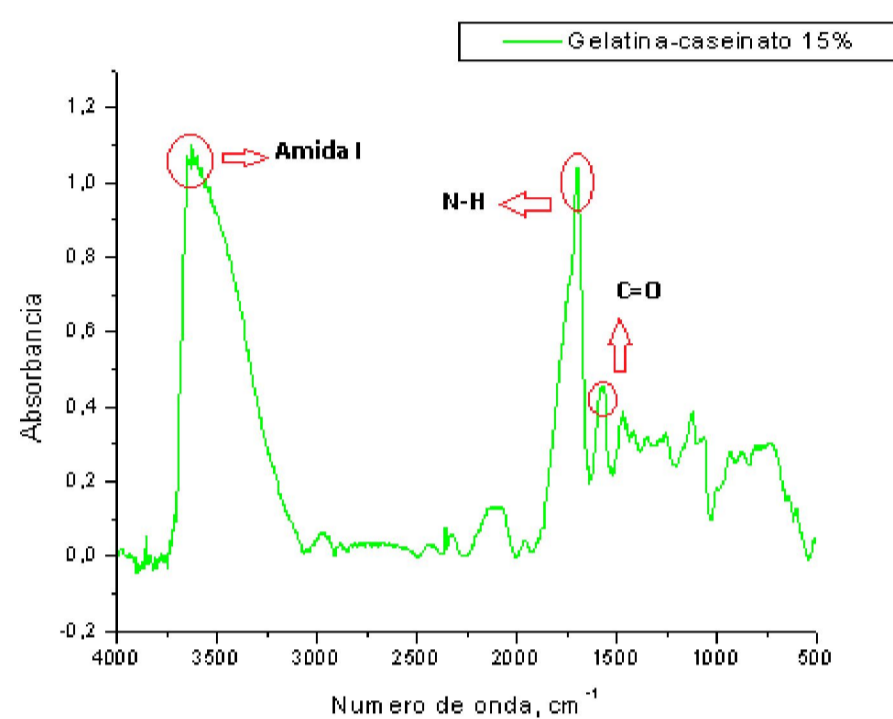


Fig. 13. Espectro FTIR de GP85/CAS15.

Tabla. 12: Absorbancia de grupos funcionales para GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15.

Grupo funcional	GP (cm ⁻¹)	Asignación
N-H	3500	Vibración de estiramiento N-H (Amida I)
C=O	1600	Vibración de estiramiento C=O (Amida I)
N-H	1500	Vibración de deformación N-H (Amida II)

En los films mezcla se pueden observar bandas que corresponden a la sumatoria de los espectros de GP y CAS. Debido a la baja concentración de CAS en las mezclas, los espectros de las mezclas se parecen más al espectro de GP.

Analizando la figura 9 se puede observar que, la banda correspondiente a la Amida I a 3500 cm⁻¹ se mantiene en todos los films mezclas. Las bandas a 1500 cm⁻¹ y 1600 cm⁻¹ se mantienen, pero desaparece la banda a 1700 cm⁻¹ de la CAS que corresponde a las vibraciones de tensión del grupo carboxilo C=O.

Además, la banda a 1600 cm⁻¹ de la amida I de la GP, correspondiente a las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo en los péptidos con algunos

estiramientos mínimos de los enlaces C-N y movimientos de flexión del grupo N-H; en los espectros de las mezclas se observa más ancha.

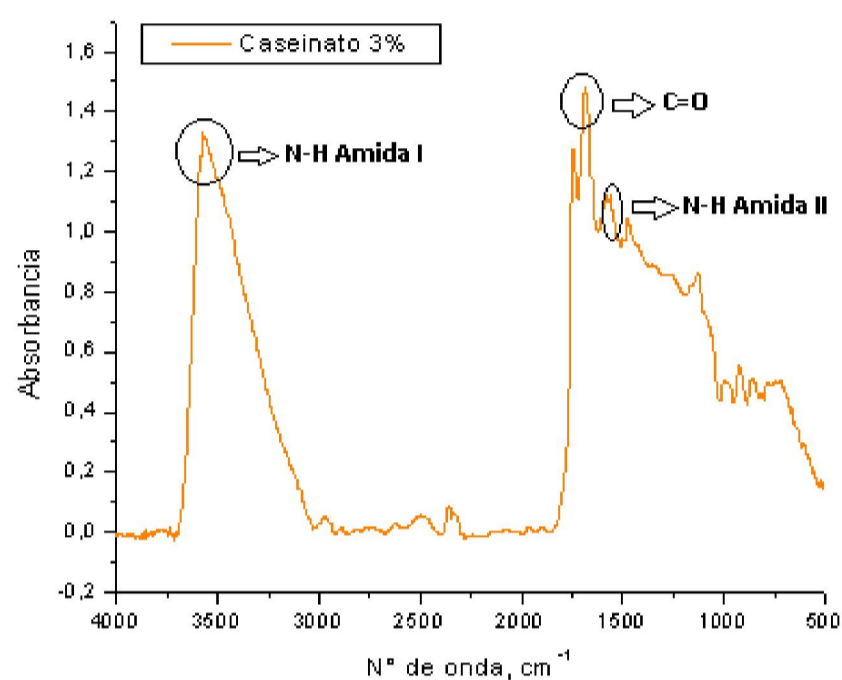


Fig. 14. Espectro FTIR de CAS.

Tabla. 13: Absorbancia de grupos funcionales para CAS.

Grupo funcional	GP (cm ⁻¹)	Asignación
N-H	3500	Vibración de tensión N-H (Amida I)
C=O	1700	Vibraciones de tensión C=O
C=O	1600	Vibración de tensión C=O (Amida I)
N-H	1500	Vibración de flexión N-H (Amida II)

En el espectro FTIR del film CAS se muestra a 3500 cm⁻¹ la banda correspondiente a la amida I que corresponde a las vibraciones de tensión N-H. La banda en 1700 cm⁻¹ corresponde a las vibraciones de tensión del grupo carbonilo del carboxilo C=O. Las vibraciones de tensión del grupo carboxilo C=O correspondiente a la amida I se pueden observar alrededor de 1600 cm⁻¹. Por último, alrededor de 1500 cm⁻¹ se observan las vibraciones de flexión del grupo N-H correspondiente a la amida II. Esto se corresponde a lo reportaron por autores como Bastidas (2015).

5.7.3 Porcentaje de absorción de agua

Tabla 14: % A obtenidos para GP, CAS y films mezclas.

Film	W_s (g)	W_h (g)	%A
GP	0,2271	0,4335	91
CAS	0,1606	0,2067	29
GP95/CAS5	0,5468	1,7026	211
GP90/CAS10	0,1497	0,4480	199
GP85/CAS15	0,1806	0,5109	183

En la tabla 14 se muestra los valores de porcentaje de absorción de agua (% A) de los films GP, CAS, GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15.

Se observa que el film CAS posee el menor porcentaje de absorción de agua (29%), esto puede explicarse por el carácter hidrofóbico del caseinato. El porcentaje de absorción de agua del film GP es de 91 % que se condice con lo obtenido por Denavi *et al.* (2009) para films elaborados a partir de gelatina de bacalao con un porcentaje de absorción de agua de 87,66 %.

Por su parte los films mezclas presentaron valores mayores que los films puros; esto indicaría que se produce una interferencia física en el entrelazamiento de las cadenas polipeptídicas de gelatina dentro de la matriz de la película. Dicha interferencia, podría haber provocado una variación de la capacidad de la gelatina para interactuar con las moléculas de agua, resultando en un aumento del porcentaje de absorción de agua de las películas compuestas. Podrían resultar de interacciones entre ambos biopolímeros provocadas por fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, etc (Hosseini *et al.*, 2013).

Se puede observar que a medida que aumenta el porcentaje de CAS en la composición de los films presentan menores porcentajes de absorción de agua.

5.7.4. Índice de hinchamiento (IH) a pH 4 y 7

El IH de es de gran importancia, dado la potencial aplicación del gel en medios acuosos o fluidos fisiológicos, lo que provocaría la absorción de agua con la consecuente alteración de sus propiedades físicas.

En la figura 10 se muestran los valores de los IH en función del tiempo a pH 4 y en la figura 11 a pH 7 de los films puros GP y CAS y de las mezclas GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15.

A pH 4 el mayor IH es para el film GP y el menor para el de CAS. Esto se podría explicar porque la gelatina a este pH se encuentra cargada positivamente lo que favorecería la difusión de las moléculas de agua y la solvatación de las moléculas hidrofílicas.

Para los films CAS tanto a pH 4 como a pH 7 se obtuvieron los menores valores de IH comparados con los demás films, resultado del carácter hidrofóbico de los mismos que no favorecería la difusión de moléculas de agua. A pH 7 se obtuvieron los mayores valores, esto podría explicarse por el grado de ionización de los grupos carboxilos y amino a los respectivos pH que favorece el hinchamiento.

Para los films mezclas se obtuvieron valores mayores de IH a pH 7 que a pH 4. A pH 4 los grupos amino de CAS estarían protonados y adquirirían carga positiva, GP también tendría carga positiva neta ya que su punto isoeléctrico es aproximadamente 5, causando una repulsión entre las macrocadenas de carga positiva. A pH 7 CAS se encuentra desprotonada, GP adquiere carga negativa neta, lo que favorece la interacción de enlace de hidrógeno entre los grupos -COO- de GP y los grupos amino de CAS provocando mayor atracción entre los polímeros, lo que explica el comportamiento de los films mezclas (Yin *et al.*, 2005; Ávila *et al.*, 2010).

El IH se encuentra relacionado con el espesor de las películas, ya que cuanto más delgado sea el film, hay menos cantidad de moléculas hidrofílicas disponibles para absorber una unidad de masa de moléculas de agua, de manera que el hinchamiento de estas ocurre más rápido que en películas de mayor espesor en donde hay un mayor número de moléculas hidrofílicas disponibles para absorber la misma unidad

de masa de moléculas de agua. Por lo tanto, el hinchamiento aumenta conforme aumenta el camino o la distancia que debe recorrer una molécula para avanzar una distancia determinada en el film (Bosquez *et al.*, 2003). Este efecto se pudo observar en los films CAS que resultaron ser muy delgados (espesor de 110 micras) y se desintegraron más rápidamente en los buffers utilizados.

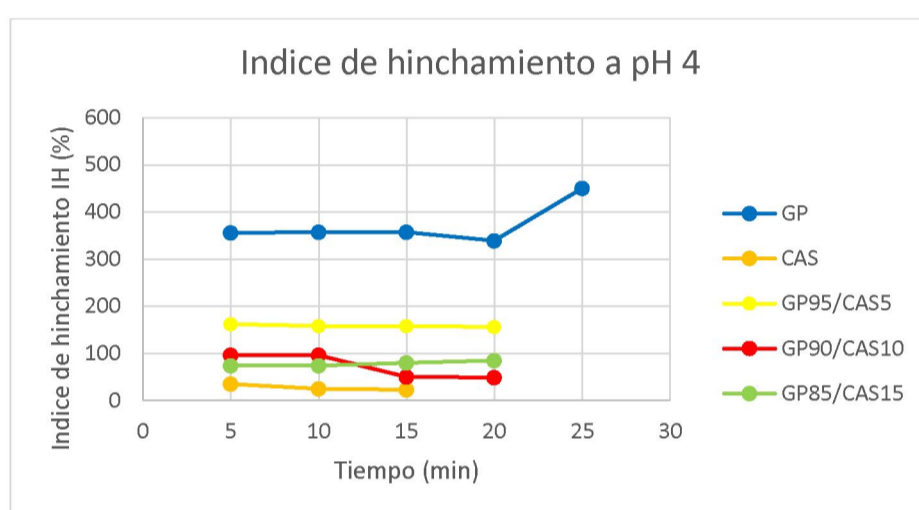


Fig. 15: IH a pH 4 para GP, CAS, GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15.

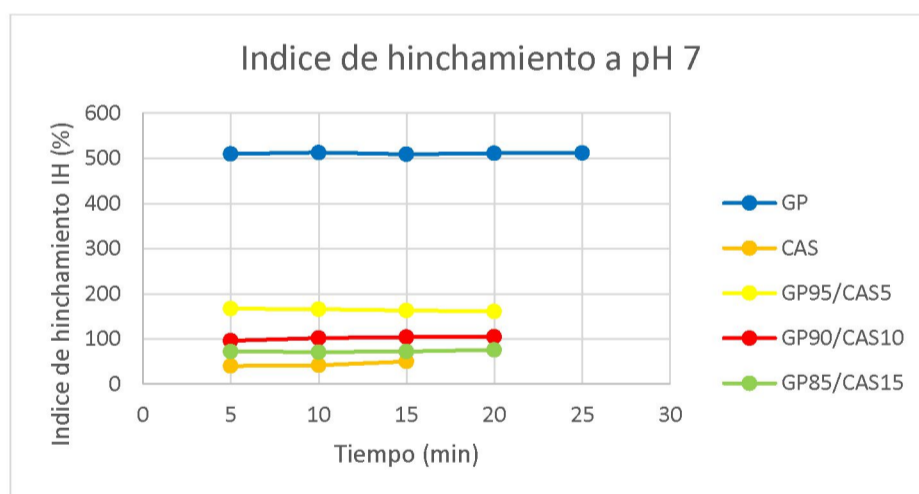


Fig. 16: IH a pH 7 para GP, CAS, GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15.

5.7.5. Propiedades mecánicas

La determinación de las propiedades mecánicas en films es uno de los factores que limitan el uso de estos materiales en envases alimentarios, ya que son necesarias una fuerza mecánica y extensibilidad suficientes para garantizar que se mantenga la integridad de los alimentos. Las propiedades mecánicas de los films y recubrimientos dependen principalmente del polímero empleado para su formación, de la adición de agentes estructurantes y aditivos. Los agentes estructurantes son agentes plastificantes, como sorbitol o glicerol, que facilitan la elaboración y formación de los films al reducir su rigidez y fragilidad. Son compuestos de bajo peso molecular que producen un descenso en la temperatura de transición vítrea de los polímeros, reduciendo el radio de zonas cristalinas respecto al de zonas amorfas. De este modo, la adición de estos compuestos produce una mejora en la flexibilidad, manejo, dureza y resistencia al rasgado de los films (García Roldán, 2017).

En la figura 12 se muestra el gráfico esfuerzo vs deformación para los films GP, GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/15 que son el resultado del promedio obtenido para cada muestra. En dicho gráfico se puede observar que el film mezcla GP90/CAS10 resiste una mayor fuerza comparado con el resto de los films lo cual se traduce en una mayor tensión de rotura (TS).

En el film mezcla GP85/CAS15 se observa como disminuye la fuerza necesaria para producir la deformación del film lo cual se traduce en un menor valor de TS comparado con el film GP90/CAS10 pero también se observa un aumento en el % EB también comparado con la mezcla GP90/CAS10.

Los menores valores obtenidos de fuerza vs distancia se dieron para los films GP95/CAS5 y GP. Esto demuestra que a medida que aumenta la concentración de CAS en los films aumenta TS y % EB respecto a los films de GP.

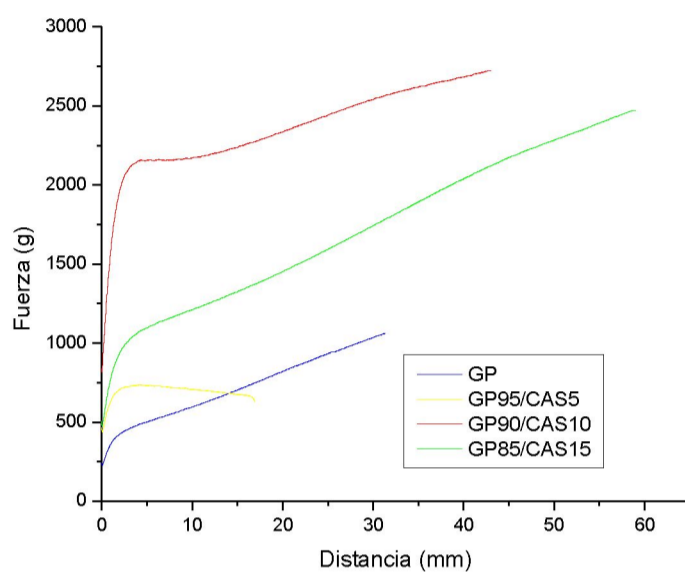


Fig. 17: Gráfico de fuerza vs distancia obtenidos para GP y films mezclas.

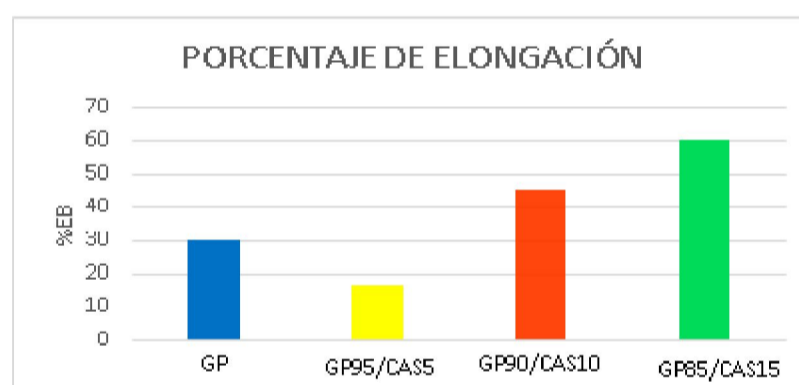


Fig.18: % EB para GP y films mezclas.

La figura 18 muestra el porcentaje máximo de elongación de los films GP, GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15. Se puede observar que a medida que aumenta la concentración de caseinato aumenta el porcentaje de elongación máximo de los films. En el caso del film GP95/CAS5 se observó una disminución del porcentaje de elongación del film en relación al del film de GP. Este comportamiento podría deberse a la presencia del caseinato en baja concentración

que no modificaría considerablemente la estructura del film, pero si su elongación máxima. Según Chambi y Grosso 2006 las interacciones interproteicas de alta energía reducen la elongación de los films. Además, los entrecruzamientos que se dan entre las cadenas pueden actuar como nodos rígidos que restringen el movimiento de los segmentos de las cadenas, lo que se traduce en una disminución de la elongación.

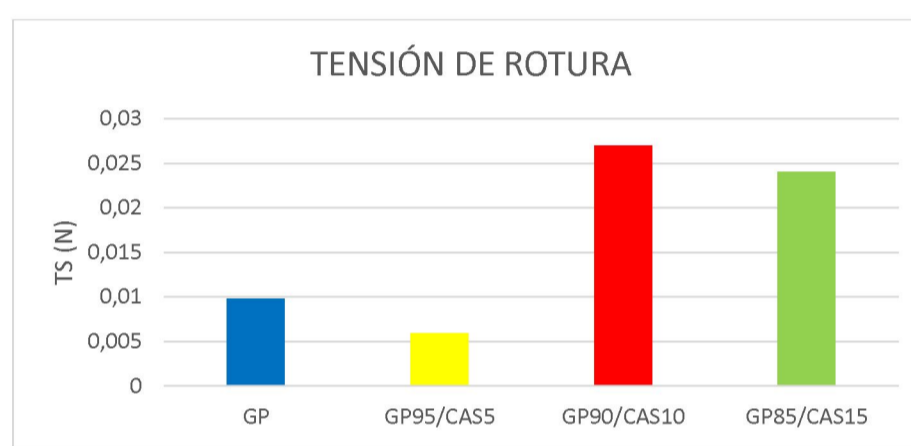


Fig.19: TS obtenidos para GP y films mezclas.

En la figura 19 se muestra el valor de la tensión a la rotura (TS) de los films GP, GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15. En el caso de las mezclas GP90/CAS10 y GP85/CAS15 se observa un aumento en la TS respecto a GP. Para la mezcla GP85/CAS15 se observa un menor aumento respecto a GP90/CAS10, comportamiento no registrado en bibliografía.

Nuevamente para el film GP95/CAS5 se observa un comportamiento anómalo no registrado en bibliografía. Esto podría explicarse en base a que esta mezcla GP95/CAS5 presentó el mayor valor de absorción de agua, de permeabilidad al vapor de agua y índice de hinchamiento de las 3 mezclas preparadas; lo cual indicaría que en esta proporción el film se vería debilitado en su capacidad para soportar grandes tensiones sin romperse y por eso soporta menor tensión a la rotura y se vuelve más rígido lo cual se observa en el menor porcentaje de elongación que tiene esta mezcla GP95/CAS5.

El film GP90/CAS10 es el que soporta el valor más grande de TS. Esto podría deberse a que en esta proporción las interacciones entre los polímeros los hace más resistentes y con mayor movilidad de las cadenas mejorando la flexibilidad del film lo que se traduce en un mayor % EB.

5.7.6. Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) es una medida de la humedad que puede pasar a través de un material, y generalmente depende tanto de la difusividad como de la solubilidad de las moléculas en la matriz del film (Bhat y Karim, 2014). En la tabla 15 se muestran los valores de Velocidad de Transmisión al Vapor de Agua (WVTR) y Permeabilidad al Vapor de Agua (WVP) para los films GP, CAS, GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15:

Tabla 15: WVP obtenidos para GP, CAS, GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15.

Film	WVTR ($\times 10^{+4}$ g/s.m ²)	Espesor (micras)	WVP ($\times 10^{-13}$ g/Pa.s.m)
GP	0,744	125	0,682
CAS	2,02	110	1,63
GP95/CAS5	1,70	127	1,58
GP90/CAS10	1,37	126	1,27
GP85/CAS15	1,56	130	1,49

Los menores valores de WVP se obtuvieron para los films de GP ($0,682 \times 10^{-13}$ g/Pa.s.m) lo que nos indica que presentaron mejores propiedades barrera al vapor de agua en comparación con los films de CAS que fue el de mayor valor ($1,63 \times 10^{-13}$ g/Pa.s.m), en cuanto a los films mezclas se obtuvieron valores que fueron intermedios entre GP y CAS. El bajo valor de WVP del film de GP estaría

relacionado con un menor carácter hidrofílico debido a la cantidad reducida de prolina e hidroxiprolina que las GP poseen (Hosseini et al., 2013).

La alta permeabilidad al vapor de agua de los films CAS puede deberse al espesor de los films. Bertuzzi *et. al.* (2002) consideran que a medida que el espesor del film aumenta, se incrementa la resistencia a la transferencia de masa a través de él y en consecuencia, la presión parcial de vapor de agua de equilibrio en la superficie inferior del film se incrementa. También el efecto del espesor se puede atribuir a cambios en la estructura del film ocasionados por el hinchamiento que provoca el agua en el polímero. En el caso del film de CAS, al tener un espesor de 110 micras, disminuye la resistencia a la transferencia de masa aumentando la permeabilidad al vapor de agua.

En el caso de los films mezclas, el agregado de CAS aumenta la permeabilidad al vapor de agua comparado con los films de GP, por lo que no mejorarían las propiedades de barrera respecto a los films de GP. Para la mezcla GP85/CAS15 que posee un espesor mayor, se observa un comportamiento anómalo no registrado en bibliografía.

5.8 BIODEGRADACIÓN EN SUELO

El proceso de degradación en suelo de los films GP, CAS, GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15 ocurrió entre 2-7 días de colocados los films en tierra. Este comportamiento podría deberse a la gran susceptibilidad de los materiales basados en proteínas a la acción de enzimas (proteasas) que son producidas por una amplia variedad de microorganismos (Martucci y Ruseckaite, 2009).

En el caso del CAS es una proteína totalmente amorfa y prácticamente no posee estructura secundaria, lo que contribuiría a que su biodegradación completa ocurra al término de 3 días debido a que la humedad absorbida por el film de CAS favorecería la proliferación microbiana en la tierra debido a la mayor disponibilidad de agua en el material, a partir de lo cual comienza su biodegradación (Pereda et al., 2014).

Los films de GP sufrieron una rápida degradación (7 días), lo cual pudo deberse a que GP posee grupos aminoácidos hidrofílicos por lo que los films absorben humedad del medio, lo cual favorece la proliferación microbiana en la tierra lo cual deriva en una rápida degradación.

En el caso de los films mezclas se observa que el agregado de CAS a bajas proporciones no varía significativamente el tiempo de biodegradación respecto al films de GP.

Tabla. 16: Tiempo de biodegradación de films de GP, CAS, GP95/CAS5, GP90/CAS10 y GP85/CAS15.

Film	Tiempo de biodegradación (días)
GP	7
CAS	3
GP95/CAS5	7
GP90/CAS10	7
GP85/CAS15	6

6. Conclusión

En este trabajo se describen los resultados de la preparación de biofilms basados en GP y CAS para su posible utilización en el envasado de alimentos.

Se pudo obtener GP tipo B (a partir del pretratamiento alcalino) con rendimientos gravimétricos entre 13,97-14,10%, valores similares a los de bibliografía, poniendo de manifiesto el potencial aprovechamiento de la piel de merluza.

Los films mezclas con el agregado de CAS en bajas proporciones presentaron mayor % A, TS y % EB en comparación con los films de GP. Estos films mezclas también resultaron con valores de IH intermedios entre los obtenidos por los films puros GP y CAS.

Presentaron una alta biodegradabilidad, lo que es muy favorable en cuanto al cuidado del medio ambiente, pero a la vez dificulta su estabilidad a largo plazo.

Se requerirá continuar con el estudio de las proporciones de GP/CAS que permitan aumentar los tiempos de biodegradación.

Los resultados obtenidos sugieren que los films podrían ser adecuados para el envasado de alimentos.

En base a los resultados obtenidos es posible proponer que el film GP90/CAS10 presenta las mejores propiedades para ser usado en el envasado de alimentos.

7. Bibliografía

- Acosta Domiguez, L. (2011). *Películas comestibles nanoestructuradas de almidón de camote (Ipomea batata)*. [Tesis de maestría, Universidad Veracruzana].
- Aguilar Méndez, M. (2005). *Propiedades físicas y mecánicas de películas biodegradables y su empleo en el recubrimiento de frutos de aguacate*. [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional].
- Aguilar-Méndez, M., San Martín-Martínez, E., Espinoza-Herrera, N., Sánchez-Flores, M., Cruz-Orea, A., Ramírez-Ortiz, M. 2012. Caracterización y aplicación de películas a base de gelatina-carboximetilcelulosa para la preservación de frutos de guayaba. *Superficies y Vacío*, **25**: 1-7. Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales.
- Alfaro, A., Balbinot, E., Weber, C., Tonial, I., Machado-Lunkes, A. 2015. Fish Gelatin: Characteristics, Functional Properties, Applications and Future Potentials. *Food Engineering Reviews*, **6**(4).
- Ambrosio, M. 2016. Procesamiento pesquero, disposición de residuos, e impacto ambiental.
- Aragón Lucero, I. (2018). *Obtención y caracterización de un bioplástico a partir de residuos de la industria pesquera de dos especies: Marlin (Makaira nigricans) y Tiburón (Carcharhinus falciformis)*. [Tesis de Grado, Ciudad de México].
- Arrieta, M., Peltzer, M., Garrigós, S., Jiménez Migallón, A. 2011. Biopelículas activas obtenidas a partir de proteínas lácteas. *Seguridad y Medio Ambiente*, **121**.
- ASTM 2011. ASTM D5511-11. Standard test method for determining anaerobic biodegradation of plastic materials under high solids anaerobic digestion conditions.
- ASTM International. 2010. ASTM E96M-10. Standard test Methods for Water Vapor Transmission of Materias.

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

- Audic, J., Chaufer, B. 2005. Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal*, **41**: 1934-1942.
- Ávila, A., Costamagna, V., Barrientos, E., Pucci, G., Sánchez, E., Strumia, M. 2010. Películas de Quitosano con Sorbato de Potasio unido física y covalentemente. Estudio de Aplicación. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **11**: 73-87.
- Bastidas, A. (2015). *Obtención de hidrogeles basados en caseína y genipina*. [Trabajo Especial de Grado de Licenciada en Química, Universidad de Los Andes].
- Becerra López, S., Paz Rueda, J. 2009. Uso de caseína como film comestible. *Seminario de Procesos de Producción y Materiales Industriales II*: 11-15.
- Begonya, M., Aymerich, T., Garriga, M., Monfort, J. 2006. Envasado activo biodegradable para el control de *Listeria monocytogenes* en jamón cocido. *Centro de Tecnología de la Carne. Microbiología y Biotecnología Alimentarias*, **145**.
- Bertuzzi, M., Armada, M., Gottifredi, J., Aparicio, A., Jiménez, P. 2002. Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos. *Congreso Regional de Ciencia y Tecnología: Ciencias de la Ingeniería, Agronomía y Tecnología*.
- Bhat, R., Karim, A. 2014. Towards producing novel fish gelatin films by combination treatments of ultraviolet radiation and sugars (ribose and lactose) as cross-linking agents. *J Food Sci Technol*, **51**: 1326-1333.
- Binsi, P., Shamasundar, B., Dileep, A., Badii, N., Howell, N. 2009. Rheological and functional properties of gelatina from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthus hamrur*) fish: Influence of gelatin on the gel-forming ability of fish mince. *Food Hydrocolloids*, **23**: 132-145.
- Bohidar, H. 1998. Hydrodynamic properties of gelatin in dilute solutions. *Int. J. Biol. Macrom.*, **23**: 1-6.

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

- Bohidar, H., Jena, S. 1994. Study of sol-state properties of aqueous gelatin solutions. *J. of Chem. Phys*, **100**: 6888-6895.
- Bosquez Molina, E., Guerrero-Legarreta, I., Venon-Carter, E. 2003. Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum-candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Research International*, **36**: 885-893.
- Bravo Vázquez, I. (2012). *Estudio de la fracción proteica de leche y fórmulas infantiles sometidas a altas presiones*. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid].
- Chambi, H., Grosso, C. 2011. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-polysaccharide based films. *European Food Research and Technology*, **232**: 63-69.
- Chambi, H., Grosso, C. 2006. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, **39**: 458-466.
- Chaplin, M. 2012. Water Structure and Science: Gelatin, Web-site: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hygel.html>.
- Chick, J., Ustunol, Z. 1998. Mechanical and barrier Properties of Lactic Acid and Rennet Precipitated Casein-Based Edible Films. *Journal of food science*, **63**: 1024-1027.
- David, L. N., y Michael, M. C. (2002). *Lehninger Principios de Bioquímica (3era ed.)*, Omega.
- Denavi, G., Pérez-Mateos, M., Añón, M., Montero, P., Mauri, A., Gómez-Guillén, M. 2009. Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, **23**: 2094-2101.
- Djabourov, M., Lechaire, J., Galli, F. 1993. Structure and rheology of gelatin and collagen gels. *Biorheology*, **30**: 191-295.
- Dobrynin, A., Colby, R., Rubinstein, M. 2004. Polyampholytes. *Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)*.
- Fernández Cervantes, I. (2018). *Obtención y caracterización de andamios tegumentarios a partir de polímeros naturales de cassiopea xamachana*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán].

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

- Fernández-Gutiérrez, J., Martín-Martínez, E., Martínez-Bustos, F., Cruz-Orea, A. 2004. Physicochemical Properties of Casein-Starch Interaction, **56**: 190-198.
- García Roldán, A. (2017). *Comparación de las propiedades físicas de películas comestibles basadas en proteína aislada de suero lácteo o gelatina de pescado con extractos de hinojo marino incorporados*. [Tesis de grado, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos].
- Garde, I. (2014). *Efecto de la adición, tipo y concentración de nanoarcilla sobre las propiedades mecánicas y de barrera de películas biodegradables basadas en quitosano*. [Tesis de Maestría, Universidad Pública de Navarra].
- Gómez-Guillén, M., Turnay, J., Fernández-Díaz, M., Ulmo, N., Lizarbe, M., Montero P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, **16**: 25-34.
- Gösta Bylund, M. (1995). *Dairy processing handbook*, Tetra Pak Processing Systems AB.
- Gudmundsson, M., Hafsteinsson, H. 1997. Gelatin from cod skins as effected by chemical treatments. *Journal of food science*, **62**.
- Guerrero-Beltrán, J. 2017. Polímeros utilizados para la elaboración de películas biodegradables. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, **6**: 173-181.
- Hering, T., Djabourov, M., Leblond, J., Takerkart, G. 1991. Conformation of gelatin chains in aqueous solutions. A quasi-elastic light scattering study. *Polymer*, **32**: 3211-3217.
- Hosseini, S., Rezaei, M., Zandi, M., Ghavi, F. 2013. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, **136**: 1490-1495.
- Jamilah, B., Harvinder, K. 2002. Propierties of gelatins from skins of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food chemistry*, **77**: 81-84.
- Karim, A., Bhat, R. 2009. Fish gelatin: propierties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, **23**: 563-576.

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

- Karlsson, S., Albertsson, C. 1998. Biodegradable Polymers and Environmental Interaction. *Department of Polymer Technology, The Royal Institute of Technology*.
- López-Serrano, F., Mandizabal, E. 2015. Introducción a la ciencia de los polímeros. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, 2-9.
- Mangavel, C., Barbot, J., Guéguen, J., Popineau, Y. 2003. Molecular Determinants of the Influence of Hydrophilic Plasticizers on the Mechanical Properties of Cast Wheat Gluten Films.
- Martucci, J., Ruseckaite, R. 2009. Tensile Properties, Barrier Properties, and Biodegradation in Soil of Compression-Molded Gelatin-Dialdehyde Starch Films. *Published online in Wiley InterScience*.
- Mendizabal, E. y López-Serrano, F. (2015). *Introducción a la ciencia de los polímeros* (p. 2). Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara.
- Meredos-Torres, Y., Bernabé-Galloway, P., Ramírez-Arrebato, M. 2020. Polysaccharide-based films a biodegradable coating in fruits postharvest. *Cultivos Tropicales*, **41**. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba.
- Miano, A., Rojas, C., Barraza, G. 2014. Influencia de la temperatura y tiempo de extracción en la fuerza de gel y rendimiento de gelatina obtenida a partir de piel de tollo (*Mustelus mento*). *Scientia Agropecuaria*, **5**: 140-147.
- Morrison, R. T., Boyd, R. N. (1990). *Química Orgánica (5ta ed.)*, Addison Wesley Iberoamericana S.A.
- Muyonga, J., Cole, C., Duodu, K. 2004. Characterization of acid soluble collagen from skins of Young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, **85**: 81-89.
- Normand, V., Muller, S., Ravey, J., Parker, A. 2000. Gelation Kinetics of Gelatin: A Master Curve and Network Modelin.
- Olivares, M. (2007). *Caracterización Reológica y Reométrica de Soluciones Macromoleculares Eléctricamente Cargadas: Aplicación a Gelatinas Comerciales*. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral].

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

- Pereda, M., Moreira, M., Roura, S., Marcovich, N., Aranguren, M. 2014. Bio-Películas para el envasado de alimentos: Proteínas y Carbohidratos. *Ciencia e Investigación*, **64**.
- Ramos, O., Fernández, J., Silva, S., Pintado, M., Malcata X. 2012. Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**: 533-552.
- Rodríguez-Alba, E., Bernal Dubón, A., Gaitán López, H., Kim Godoy, C., Salguero Mérida, J., Toledo Hernández, E., Vásquez Maldonado, C., Martínez Richa, A. 2021. La ciencia de los Polímeros Biodegradables. *XXVI Verano de la Ciencia*, **10**: 2-6.
- Ruiz, C., Bastidas, B. (2015). *Desarrollo del proceso y Obtención del Caseinato de Sodio para uso industrial*. [Tesis de Grado, Universidad de Guayaquil].
- Rutiaga Quiñones, O. (2002). *Elaboración de películas plásticas flexibles a partir de polímeros naturales como una alternativa de empaque y la evaluación de sus propiedades*. [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo Leon].
- Santiz Gómez, M. (2012). *Optimización del proceso de extracción de Gelatina a partir de piel de Raya Arenera (*Dasyatis brevis*)*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo], Ciudad de México.
- Schlimme, E., Buchheim, W. 2002. Proteínas lácteas: caseínas, proteínas de suero y proteínas minoritarias. *La leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas*. Acribia, Zaragoza, Spain, pp. 33-75.
- Serpa Guerra, A., Llano, G., Álvarez López, C. 2014. Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (*Manihot esculenta Crank*) variedades verónica y tai, jatropha (*Jatropha curcas L.*) y gmelina (*Gmelina arborea*). *Prospect*, **12**.
- Tharanathan, R. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, **14**: 71-78.
- Tromp, R., Grotemhuis, E., Olieman, C. 2002. Self-aggregation of gelatine above the gelling temperature analyzed. *Food Hydrocolloids*, **16**: 235-239.

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

- Valero-Valdivieso, M., Ortegón, Y., Uscategui, Y. 2013. Biopolímeros: Avances y Perspectivas. *Dyna, año 80*, **181**: 171-180.
- Ward, A., Courts, A. 1977. Science and technology of gelatin. *National Agricultural Library*.
- Yin, Y., Li, Z., Sun, Y., y Yao, K. 2005. A preliminary study on chitosan/gelatin polyelectrolyte complex formation. *Journal of materials science*, **40**(17): 4649-4652.
- Zambrano, M., Quiroz, E. (2011). *Proceso de Obtención de la Caseína a partir de leche de ganado vacuno y la Optimización de sus parámetros*. [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Trujillo]
- Zapata, D., Pujol, R., Coda, F. 2012. Polímeros biodegradables: una alternativa de futuro a la sostenibilidad de medio ambiente. *Técnica industrial*, **297**: 76-80.
- Zimmermann-Stein, K., Ruiz-Espinoza, H. 2010. Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas: Efecto de modificaciones inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, **4**(2): 24-37.