

UNIVERSIDAD DE SONORA
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos
Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

**Estudio de Biopelículas de Compositos de Colágeno de Calamar Gigante
(*Dosidicus gigas*) y Quitosano**

TESIS

Que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

I.I.A. Joe Luis Arias Moscoso

Hermosillo, Sonora.

Noviembre de 2009

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DECLARACIÓN DEL AUTOR

Este trabajo se presenta como uno de los requisitos para la obtención de grado Maestro en Ciencias, especialidad Conservación y Procesamiento de Productos Marinos de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material descrito en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, deberá solicitar autorización a la Coordinación de Posgrado del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Joe Luis Arias Moscoso

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Este trabajo se aprobó en la fecha que se señala abajo

Dra. Josafat Marina Ezquerria Brauer

Fecha

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por la oportunidad de cursar la maestría en ciencias.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos por permitirme el uso de sus instalaciones y facilidades para la realización de mis estudios, y mi tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado mediante el proyecto 89879: “Caracterización Bioquímica, Fisicoquímica y Funcional del Colágeno Extraído de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)”, durante la realización de mis estudios.

A mi directora de tesis Dra. Josafat Marina Ezquerra Brauer, por su constante orientación, apoyo, confianza y sobre todo paciencia depositada en mí para concluir con esta tesis. Gracias por brindarme su amistad, su apoyo incondicional y sus oportunos e inoportunos regaños.

A mi comité de tesis, Dra. Maribel Plascencia, Dra. Reyna Luz Vidal, Dra. Herlinda Soto, por sus recomendaciones y sugerencias a mi trabajo. Y también el agradecimiento para la Dra. Ofelia Rouzand por su disposición y acertada asesoría durante la fase experimental.

DEDICATORIA

A mis padres Mauro y Livia por su indesmayable apoyo, preocupación y amor gracias por confiar en mí, gracias a ustedes estoy donde estoy, se los debo todo. Los amo y los extraño.

A todos mis compañeros de la maestría, especialmente a la gente brava de marinos, a mi brother Ramón gracias por hacerme sentir como en casa en tu casa. A Octavio, Edissa, Willy, Flor, Fredy por su amistad y convivencia, y como olvidar a mi chochera la Walter salud mi hermano.

A una persona muy especial compañera, amiga, novia, la mujer más necia del norte de Hermosillo. Te quiero mucho, gracias por tu apoyo, tu paciencia y todo tu amor. Sin ti esto no tendría el impacto que espero tenga.

A la familia de mi hermano por el soporte técnico en el desarrollo de esta maestría, gracias por brindarme dónde y cómo lamentablemente también porque, no lo sé y quien se cayó no fui yo.

A todas aquellas personas que influyeron de algún modo, me ayudaron, me apoyaron y hasta me estorbaron, muchas gracias.

CONTENIDO

	Página
DECLARACIÓN DE AUTOR.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	4
OBJETIVOS.....	5
ANTECEDENTES.....	6
Generalidades del Calamar.....	6
Distribución Geográfica.....	9
Hábitos Alimenticios.....	9
Composición Química del Calamar Gigante.....	10
Importancia de la Pesquería.....	11
Generalidades del Colágeno.....	12
Estructura Química del Colágeno.....	14
Fuentes de Colágeno.....	19

Colágeno en Organismos Terrestres.....	19
Colágeno en Organismos Acuáticos.....	20
Propiedades del Colágeno de Organismos Acuáticos...	21
Generalidades del Quitosano.....	22
Interacciones Quitosano-Proteína.....	28
Biopelículas.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Materia prima.....	34
Fase I.....	36
Obtención y Caracterización de Colágeno Soluble en Ácido.....	36
Caracterización de la Fracción Ácida del Colágeno de los	
Desechos de Calamar.....	38
Concentración de Proteína.....	38
Electroforesis en gel SDS-Poliacrilamida.....	38
Perfil de Aminoácidos.....	39
Calorimetría Diferencial de Barrido.....	40
Análisis de Quitosano.....	41
Fase II.....	42
Elaboración de Biopelículas.....	42
Caracterización de Biopelículas de Colágeno y Quitosano.....	44
Espesor.....	46

Propiedades Mecánicas de Esfuerzo-Deformación.....	46
Velocidad de Transmisión del Vapor de Agua.....	47
Solubilidad en Agua.....	48
Propiedades Térmicas.....	49
Microscopía Electrónica de Barrido	50
Diseño Experimental y Análisis de Datos.....	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
Fase I.....	53
Caracterización del Colágeno de Desechos de Calamar.....	53
Extracción de Colágeno.....	53
Perfil de Aminoácidos.....	54
Perfil Electroforético.....	58
Calorimetría Diferencial de Barrido	60
Caracterización de Quitosano Comercial.....	64
Peso Molecular.....	64
Calorimetría Diferencial de Barrido	64
Fase II.....	66
Elaboración de Biopelículas.....	66
Espesor.....	69
Propiedades Mecánicas de Esfuerzo-Deformación.....	71
Velocidad de Transmisión del Vapor de Agua.....	76

Solubilidad en Agua.....	78
Calorimetría Diferencial de Barrido	81
Microscopía Electrónica de Barrido.....	86
CONCLUSIONES.....	89
RECOMENDACIONES.....	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

INDICE DE TABLAS

No. Tabla	Título	Página
1	Propiedades y aplicaciones de películas de colágeno y quitosano de diferentes orígenes.....	33
2	Contenido de aminoácidos en el colágeno soluble en ácido extraído de los desechos de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	55
3	Contenido de proteína, colágeno soluble en ácido, prolina e hidroxiprolina de los desechos de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	57
4	Temperaturas y entalpías de los diferentes picos presentes en el colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar y el quitosano comercial.....	61
5	Peso molecular y viscosidad intrínseca del quitosano comercial.....	65
6	Espesores de las biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar gigante y quitosano comercial.....	70
7	Propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación de las biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar gigante y quitosano	

	comercial.....	72
8	Velocidad de transmisión del vapor de agua de las biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar gigante y quitosano comercial.....	77
9	Solubilidad al agua de las biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar gigante y quitosano comercial.....	79
10	Temperatura y calor específico de la transición vítrea de las biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar gigante y quitosano comercial.....	85
11	Películas y cubiertas de colágeno y quitosano, principales propiedades evaluadas y aplicaciones.....	91

INDICE DE FIGURAS

No. Figura	Título	Página
1	Calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	7
2	Representación de la secuencia de aminoácidos del colágeno.....	16
3	Representación esquemática de entrecruzamientos del colágeno entre moléculas de piridinolina y deoxipiridinolina...	23
4	Estructura del colágeno.....	24
5	Esquema elemental para la obtención de derivados de la quitina.....	25
6	Quitosano comercial de caparazón de cangrejo, 85% deacetilado de alto peso molecular.....	27
7	Interacciones propuestas entre el quitosano y la proteína...	29
8	Diagrama de flujo general para el desarrollo de las dos fases propuestas para la elaboración del trabajo experimental.....	35
9	Representación esquemática del método empleado para la extracción de colágeno.....	37
10	Representación esquemática del método empleado para la elaboración de biopelículas.....	45
11	Gel de electroforesis de SDS–Poliacrilamida del colágeno	

	extraído de los desechos del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	59
12	Termogramas obtenidos mediante calorimetría de barrido diferencial de: (A) la fracción ácida del colágeno soluble en ácido extraído del desecho de calamar gigante y (B) quitosano comercial	62
13	Biopelículas de colágeno soluble en ácido extraído de los desechos de calamar gigante y quitosano comercial en diferentes concentraciones.....	68
14	Termograma de biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de los desechos de calamar gigante y quitosano comercial.....	82
15	Imágenes de microscopía electrónica de barrido para las distintas concentraciones de biopelículas colágeno:quitosano.....	87

RESUMEN

El desecho de calamar es rico en colágeno y puede ser utilizado como materia prima para elaborar biopelículas con quitosano comercial, en este estudio se caracterizó el colágeno obtenido de la fracción soluble en ácido extraído de desecho de calamar gigante (*Dosidicus gigas*); asimismo se determinaron las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y térmicas de las biopelículas elaboradas a partir de la mezcla de colágeno:quitosano: 80:20, 50:50, 20:80, 0:100. El perfil de aminoácidos confirmó la presencia de hidroxiprolina iminoácido característico del colágeno. El patrón electroforético mostró tres fracciones (200, 116 y 97 kDa) confirmando la presencia del colágeno. Los termogramas obtenidos del colágeno mostraron un pico endotérmico (T_{max} 61.4°C), el quitosano utilizado fue de medio peso molecular (~570 kDa) y mostró dos manifestaciones, una endotérmica y una transición vítrea (81.9 y 165.05°C). Las biopelículas obtenidas fueron comparadas en sus propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación con películas de polipropileno y acetato de celulosa (celofán), llegándose a detectar diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las biopelículas obtenidas. A mayor concentración de colágeno, mayor fue la elongación, las biopelículas 50:50 mostraron valores de elongación similares ($p \geq 0.05$) a las de polipropileno, el menor valor ($p \leq 0.05$) de esfuerzo lo presentó la biopelícula 80:20, las biopelículas 20:80 mostraron valores de elongación similares al acetato de celulosa (celofán). La mayor velocidad de transmisión al vapor de agua ($p \leq 0.05$) la presentó la biopelícula 80:20. La propiedad que mide

la integridad física en agua de las biopelículas es la solubilidad en agua, las biopelículas presentaron mayor solubilidad a mayor concentración de colágeno ($p \leq 0.05$). Los termogramas obtenidos mostraron algunos comportamientos semejantes para cada biopelícula evaluada. La microscopía electrónica de barrido permitió revelar la miscibilidad de estos dos materiales, la biopelícula de quitosano es la que mostro una mayor uniformidad en el acomodo de su estructura, y el mayor desorden se observó en la de mayor concentración de colágeno, mostrando a su vez mayor opacidad. Con estos resultados se establece que es factible obtener una biopelícula a partir de la mezcla de colágeno soluble en ácido obtenido de desecho de calamar con quitosano comercial y que la adición de colágeno puede mejorar las propiedades plásticas de las biopelículas de quitosano, aunque se obtendrá una biopelícula con menor transparencia y con una mayor velocidad de transmisión del vapor de agua. Esta información sienta las bases para futuros estudios tendientes al aprovechamiento de este tipo de desechos.

INTRODUCCIÓN

Una de las pesquerías que llama más la atención en el sector pesquero de Golfo de California, en el Pacífico Mexicano es la del calamar gigante. Ello se explica por la creciente importancia en los volúmenes de captura total de esa pesquería en la última década, representando una fuente significativa de empleos e ingresos en la región, particularmente en Sonora. De acuerdo con las últimas estadísticas, la producción de calamar para el año 2007 fue de 11,882 toneladas (SAGARPA, 2007), sin embargo, esta creciente industria genera desechos que representan una enorme fuente de contaminación ambiental, los cuáles son arrojados en los mismos mares donde son capturados. Estos desechos constituyen una excelente materia prima para otros productos, tales como las enzimas y otros sub-productos con alto valor comercial cómo lo es el colágeno (Haard, 1992).

Como ya se mencionó, el aprovechamiento del calamar gigante no es integral, llegándose a desechar aproximadamente entre el 40 al 60% por organismo, y aunando al bajo precio en el mercado, es que desde hace algunos años, existe la preocupación por parte de los productores como del sector gubernamental de obtener el aprovechamiento integral de este recurso, siendo una de las alternativas para su aprovechamiento la obtención de colágeno a partir de estos desechos.

El colágeno se considera la proteína mayoritaria del tejido conectivo en vertebrados y en invertebrados. Como proteína estructural, es el componente

fundamental del sistema de sostén del organismo animal: huesos, cartílagos, tendones, tejido conjuntivo y piel (Fratzl, 2008). Debido a las propiedades que presenta el colágeno se utiliza como material tanto en la industria farmacéutica, médica y de alimentos (Song y col., 2006; Sivakumar y Chandrakasan, 1998; Shaoping y col., 2005; Shunji y col., 2007). Otra de las aplicaciones de este material es en la elaboración de biopelículas, partiendo sobre todo del colágeno sin tratamiento térmico (Wolf y col., 2009).

En estudios recientes donde se llevó a cabo la extracción y caracterización parcial del colágeno del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), la fracción soluble en ácido representa el 23% del tejido conectivo y presenta una resistencia térmica superior a la reportada para especies marinas, incluso al detectado para organismos terrestres (Valencia-Perez y col., 2008); además, se observó que la concentración de colágeno y las propiedades térmicas dependen de la región anatómica de donde se extrae ésta proteína, siendo los tentáculos los que presentan la mayor concentración de colágeno (Torres-Arreola y col., 2008). En estos estudios se reportó que del total de la proteína presente en este organismo, del 15-18% es colágeno.

Por otro lado, el quitosano es un polímero natural obtenido por la deacetilación de la quitina, la cual se encuentra en el caparazón de cangrejos, camarones y langostas y es considerado el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa. El quitosano posee propiedades funcionales muy importantes, tales como su baja o nula toxicidad, es biodegradable y

biocompatible; además, al obtenerse películas a partir de este material presenta propiedades mecánicas que lo hacen un material muy atractivo (Kasaai, 2009; Felse y Panda, 1999; Ke y col., 2007). Sin embargo las películas que se forman son muy frágiles (Plascencia-Jatomea, 2004), por lo que se busca mezclarlo con otros productos, para modificar sus propiedades físicas, en particular la elasticidad. En estudios de biocompatibilidad se reporta que hay una interacción entre los grupos funcionales cargados positivamente del quitosano con el colágeno, con un alto potencial de producir compositos con aplicaciones novedosas (Sionkowska y col., 2004a; Sionkowska y col., 2004b; Wang y col., 2008b; Lima y col., 2006; Horn y col., 2009). Recientemente se detectó que la fracción soluble en ácido del colágeno extraído del manto de calamar, presentó alta afinidad química, principalmente del tipo puentes de hidrógeno, con un quitosano comercial (Uriarte, 2007) formando aparentemente películas más elásticas que las que tenían como base solo quitosano; sin embargo, en este estudio no se evaluó las propiedades mecánicas ni fisicoquímicas, que permitieran confirmar que se habían mejorado las propiedades plásticas del quitosano al mezclarlo con el colágeno. En función de ello se planteó obtener y caracterizar mecánica y fisicoquímicamente películas de compositos de colágeno extraído del desecho de calamar gigante y quitosano comercial, entendiéndose por composito un material constituido por la mezcla de dos o más materiales distintos.

HIPÓTESIS

El colágeno soluble en ácido obtenido de desecho de calamar gigante, al ser utilizado en una mezcla compuesta de colágeno:quitosano, tendrá un efecto plastificante que permitirá modificar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las biopelículas de quitosano.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la adición de colágeno de calamar gigante como agente plastificante en la elaboración de biopelículas a partir de quitosano comercial.

Objetivos Particulares

- Extraer y caracterizar parcialmente la fracción soluble en ácido del colágeno presente en los desechos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*),
- Elaborar biopelículas a partir de una mezcla de colágeno obtenido de los desechos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y quitosano comercial en diferentes concentraciones por el método de casting.
- Evaluar las propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación, la velocidad de transmisión del vapor de agua, solubilidad en agua, así como las propiedades térmicas y el análisis de microscopia electrónica de barrido de las biopelículas obtenidas.

ANTECEDENTES

Generalidades del Calamar

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es una especie habitual del Pacífico, encontrándose desde las costas de los Estados Unidos hasta las costas de Chile, siendo las zonas de mayor aglomeración frente a las costas de Perú y México. Es una especie migratoria relacionada con procesos de alimentación y reproducción. Tiene un cuerpo en forma cilíndrica al que se le llama manto, el cual cumple la función de envolver y proteger los órganos internos, teniendo en un extremo las aletas, mientras que en el extremo opuesto se encuentra la cabeza, boca, tentáculos y brazos (**Figura 1**)(Kreuzer, 1986; Abugoch y col., 1999). Las diferencias que existen entre el calamar gigante y los demás moluscos es que la cabeza, los tentáculos y los brazos forman una sola estructura, y la boca se encuentra en medio de los tentáculos (Brusca, 1990).

Posee tres corazones, un cerebro muy evolucionado, dos ojos bien desarrollados y sus células nerviosas exhiben los axones de mayor longitud conocida en el reino animal (IIM-CSIC, 2009). Su cuerpo, con esqueleto interno cartilaginoso llamado comúnmente pluma, es esférico con dos aletas laterales muy amplias que utiliza de manera complementaria con el sifón (cavidad ventral que desemboca hacia la parte delantera en forma de embudo recubierto por el manto), cuando el agua penetra en la cavidad y, al ser expulsada a presión

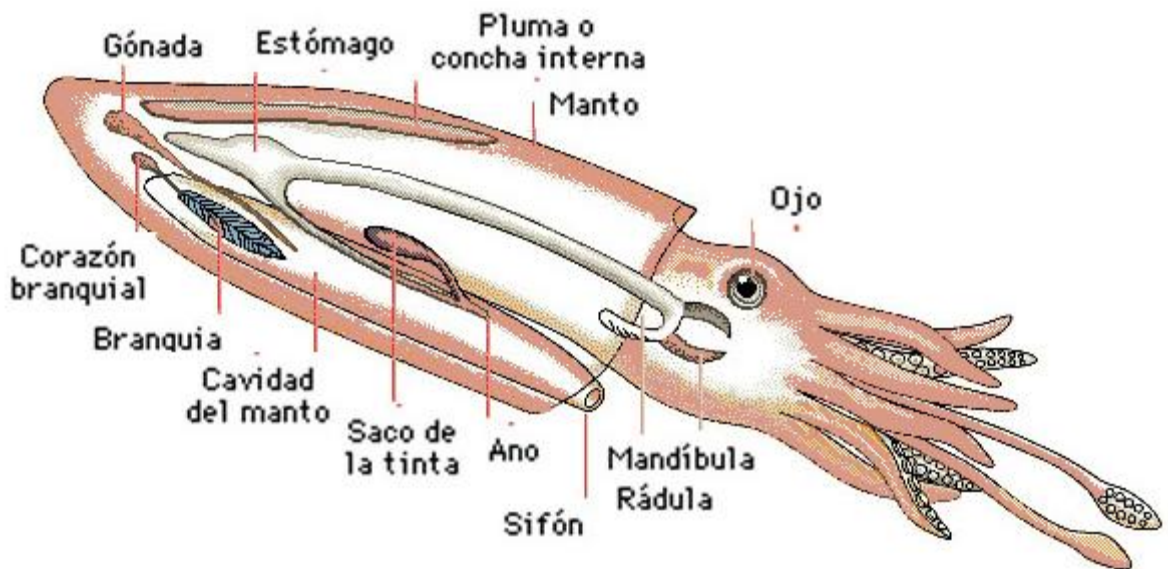
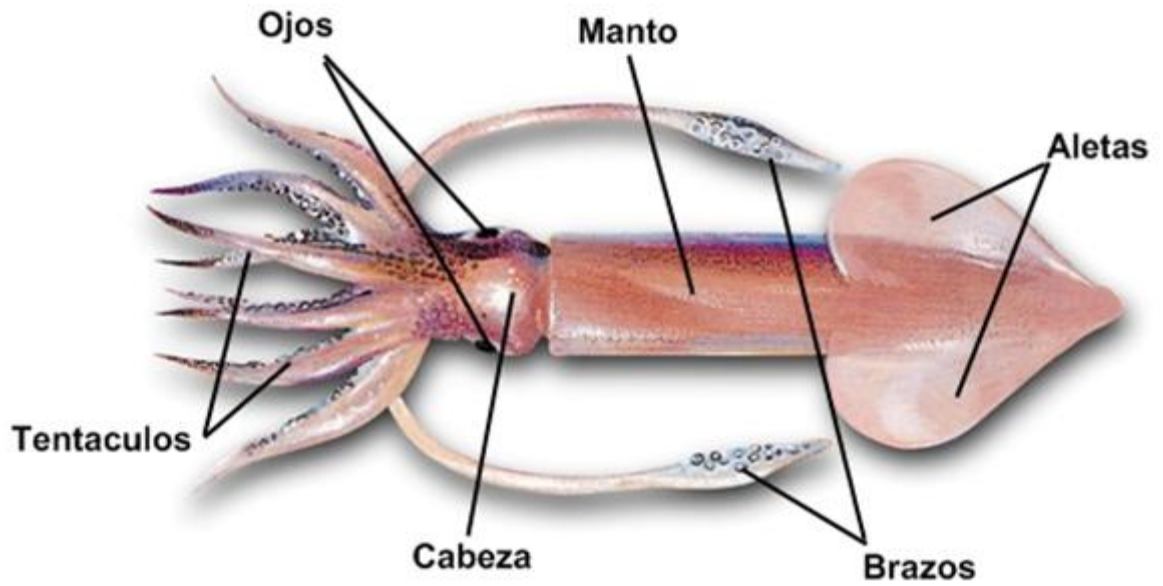


Figura 1. Calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

mediante el sifón, dota al animal de un sistema de locomoción por propulsión a chorro para desplazarse a grandes velocidades. La boca de esta especie presenta un

par de dientes que asemejan el pico de un perico y alrededor de ella se encuentran ocho tentáculos con ventosas y dos brazos contráctiles que utiliza para atrapar a sus presas (Enhardt y col., 1982). Su piel está conformada por cuatro capas, las dos primeras del lado externo contienen entre ellas las células pigmentosas de los cromatóforos, mientras que las capas tercera y cuarta, están compuestas por tejidos conectivos en forma de filamentos delgados (Maza-Ramírez, 2001; Bjarnason, 1989).

En general, en el Golfo de California el tamaño de estos moluscos varía desde los 25 cm hasta los 150 cm y con pesos superiores a los 65 kg (Nevarez-Martinez y col., 2006). La longitud media de su manto es de aproximadamente 64 cm, la cabeza es ancha en su porción posterior y en los brazos poseen de 100 a 200 ventosas diminutas las cuales contienen de 8 a 25 dientecillos (Enhardt, 1991; Hochberg y Gordon, 1980; Nevarez-Martinez y col., 2006; Markaida y Sosa-Nishizaki, 2001).

La especie presenta dimorfismo sexual ya que las hembras poseen un manto más ancho y abultado en la parte media, mientras que el macho presenta un manto cilíndrico y recto (Nesis, 1983; Markaida-Aburto, 2001). De acuerdo con Bjarnason (1989), este cefalópodo es un organismo de color marrón brillante que puede cambiar a un color pálido continuamente; es de aspecto impresionante por su gran tamaño con respecto a la mayoría de los otros calamares en el mundo.

Distribución Geográfica

Su ubicación geográfica, según la temperatura del medio, es bastante amplia, abarcando desde los 16° hasta los 30°C; además, su población sigue un patrón de comportamiento migratorio bastante complejo al parecer está relacionado con su biología reproductiva (Klett-Traulsen y Casas-Valdez, 1996). Posee un amplio espectro de movimiento dentro de la zona oceánica nerítica, presentando una distribución desde la superficie hasta profundidades mayores a los 500 m (De la Rosa, 1994).

En México, las zonas de mayor población, según registros de captura, se encuentran entre los 22° y 28° de latitud norte y los 109° y 114° longitud oeste, coordenadas que comprenden desde el Alto Golfo de California a Santa Rosalía (BCS) y Guaymas (Sonora) (Markaida-Aburto, 2001).

Hábitos Alimenticios

El calamar gigante es un consumidor voraz cuya dieta incluye una amplia variedad de especies dentro de las cuales se encuentran crustáceos, peces y calamares de menor tamaño, razón por la cual es un organismo de rápido crecimiento ya que llega a alcanzar una medida de 0.8 a 1 m de longitud en tan solo un año de vida (Enhardt, 1991). En general, su alimentación está relacionada con especies que habitan zonas de temperaturas bajas cercanas a los 16°C, incrementándose esta actividad durante la noche. Su dieta varía conforme crece, aunque es típicamente cazador de organismos nectónicos (Nesis, 1983). Esta dieta cubre una amplia diversidad de organismos y al parecer no tiene preferencias.

La lista de organismos encontrados en su estómago, incluye especies que dependen más del hábitat por donde se desplaza que a alguna preferencia notable por dicho organismo. Los calamares juveniles son depredadores más activos que los adultos debido a que estos requieren de mayor energía dado que nadan a mayor velocidad, entre 5-25 km/h; en cambio, los calamares adultos pueden acechar a su presa individualmente, mientras que los adultos de mayor tamaño son organismos mas oportunistas (Nesis, 1983).

Composición Química del Calamar Gigante

La composición química del músculo de especies marinas, como es el caso del calamar gigante, varía dependiendo de algunos factores como: sexo, talla, alimentación, temporada y localización de la captura entre otros. Existen muchas variaciones, en cuanto a composición química se refiere, de especie a especie así como también dentro de la misma especie; esta variación en la composición del músculo puede ocasionar cambios de sabor, color, textura y apariencia (Sikorski, 1990).

La composición química del músculo de varias especies de calamar (entre ellas *Dosidicus gigas*) indica que los compuestos nitrogenados no proteicos representan alrededor del 37% del total de compuestos nitrogenados incluida la proteína; esta fracción está compuesta principalmente de 300-1300 mg/100 g de óxido de trimetilamina (OTMA), así como de productos de su metabolismo, otras aminos como el cloruro de amonio, aminoácidos libres y sobre todo octopina en concentraciones de 450-1110 mg/100 g, arginina (hasta

600 mg/100 g), además de glicina, alanina, betaínas y nucleótidos, todos estos compuestos considerados como precursores de sabor. En cuanto a la composición lipídica del manto, se encuentra principalmente constituida por fosfolípidos y colesterol alrededor del 4%. La composición de ácidos grasos ha sido encontrada muy similar a la de los tejidos de peces magros o blancos como la lisa y el lenguado (Sikorski, 1986).

Importancia de la Pesquería

La importancia de su pesquería en la región noroeste del país, como todas las actividades de producción pesquera, radica en los beneficios que trae consigo esta actividad tanto en el aspecto nutricional como económico de la región. Su captura a nivel nacional inició a partir de 1974 con poca producción y consumo regional. No obstante, con el paso de los años, esta pesquería se ha convertido en un importante recurso para los estados de Baja California Sur, Sonora y Sinaloa (Nevarez-Martínez, 1999).

Los principales países productores en orden de importancia de captura son Perú, México y Chile, concentrando en estos casi la totalidad de la producción mundial de esta especie (Salinas, 2005), en la región noroeste de México y más en particular en el Golfo de California, la pesca de calamar gigante representa la mayoría de la producción nacional de la especie, siendo los estados de Baja California Sur, Sonora y Sinaloa los de mayor aportación. La actividad de esta pesquería se extiende a todo el año, concentrándose frente

a Baja California Sur en primavera y verano, y frente a Sonora en otoño e invierno (Salinas, 2005).

La industria pesquera regional ha venido comercializando el calamar gigante a mercados nacionales e internacionales, principalmente el mercado asiático, en donde se registra una fuerte demanda por productos a base de esta especie. Esta demanda se traduce en un alto interés por aprovechar comercialmente la totalidad de la misma. En México, las industrias que se dedican al procesamiento del calamar gigante solo emplean tres procesos principales, los cuales consisten en congelación, cocido y secado (Salinas, 2005).

Generalidades del Colágeno

El colágeno es el principal elemento fibroso del tejido conectivo y la proteína individual más abundante de cualquier organismo (Brinckmann, 2005). Este componente es muy importante debido a que contribuye de manera significativa a la dureza del músculo del animal. Además, las fibras del colágeno han sido utilizadas como ingredientes en una gran variedad de productos cárnicos debido a su habilidad para atrapar agua y grasa (Wolf y col., 2009). El colágeno es prácticamente insoluble en agua, pero a pH bajos su solubilidad incrementa. Por lo tanto, para fines prácticos, el colágeno insoluble es convertido a colágeno soluble por medio de procesamientos ácidos y/o alcalinos, obteniéndose derivados como la gelatina después de un tratamiento

térmico; sin embargo, con éstos tratamientos tan agresivos se pueden perder algunas de las propiedades funcionales de la molécula (Figueiro y col., 2004).

Por definición, la gelatina se considera al producto obtenido por la hidrólisis ácida parcial del colágeno sometido a un proceso térmico, proveniente de animales, ganado vacuno, porcino, aves y especies marinas. Dentro de las propiedades funcionales que se le atribuyen a la gelatina están: poder gelificante y aglutinante (Fennema, 2002), puede actuar como un plastificante (Krochta, 2002) y, aunque la gelatina es un ingrediente muy versátil como agente funcional en la industria de alimentos (Fennema, 2002), se ha detectado que la elaboración de biopelículas a partir de gelatina presenta propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua deficientes, además de presentar alta solubilidad al agua (Fakirov y col., 1997). Así, actualmente se está buscando utilizar el colágeno que presente cierta solubilidad, pero sin someterse a un tratamiento térmico, es decir, sin llegar al proceso de la gelificación (Wolf y col., 2009). En la actualidad, embutidos como el salchichón se recubren con materiales derivados del colágeno (gelatina) o con materiales derivados de mezclas de quitosano y gelatina (Chiou, 2006).

Estructura Química del Colágeno

El término colágeno deriva de la palabra griega "*kolla*" que es utilizada para pegamento y fue definido por primera vez en el diccionario Oxford de 1893

como “aquel constituyente del tejido conectivo el cual se convierte en gelatina cuando se hierve”.

Actualmente, se puede definir a los colágenos como proteínas que se arreglan en agregados supramoleculares en el espacio extracelular, las cuales se comprimen en cadenas polipeptídicas con un gran número de secuencias repetidas Gly-X-Y, donde Y es regularmente hidroxiprolina y X es regularmente prolina (Branden, 1999).

El colágeno está clasificado dentro de las proteínas fibrosas. Estas son aquellas que están constituidas por cadenas polipeptídicas ordenadas que forman fibras o láminas largas. Son físicamente resistentes, insolubles al agua y soluciones salinas diluidas, por lo que constituyen los elementos básicos estructurales del tejido conectivo de los animales superiores (Lehninger y col., 1995).

Las cadenas de colágeno tienen una composición y una secuencia de aminoácidos que no son habituales. El colágeno es extremadamente rico en glicina (35%) y prolina (12%), aminoácidos que son importantes para la formación de una triple hélice estable. La glicina es el único aminoácido que es suficientemente pequeño para ocupar el abarrotado interior de la triple hélice de colágeno, y en la mayoría de las regiones, la cadena constituye un residuo de cada tres. Todavía no se ha determinado la secuencia completa de aminoácidos de las cadenas de colágeno, pero las que aparecen con más frecuencia son Gly-X-Pro, Gly-Pro-X y Gly-X-Hyp (Branden, 1999). Además de

la glicina y la prolina, el colágeno también contiene alanina (11%), aminoácidos modificados (no codificables) como hidroxiprolina (9%) e hidroxilisina (3-9%) (**Figura 2**) (Alberts, 1990). El 50% de las prolinas (y algunos residuos de lisina) presentan hidroxilación en el retículo endoplásmico antes de que las procadenas se asocien formando las moléculas de triple fibra de procolágeno (Alberts, 1990). Carece casi siempre de triptófano y los aminoácidos que contienen azufre están presentes en bajos niveles (Fennema, 2002).

El colágeno contiene también unidades de carbohidratos como glucosa y galactosa unidos covalentemente a los residuos de hidroxilisina, el número de monómeros de carbohidratos depende del tejido donde se encuentre (Belitz, 1999).

Se sabe que parte del colágeno es soluble en disoluciones salinas neutras, otra parte es soluble en ácido y una tercera parte es insoluble (Fennema, 2002). Estudios realizados en colágeno del músculo de bovinos han demostrado que el contenido de piridinolina incrementa con la edad de los animales (Belitz, 1999). La piridinolina es una de las moléculas que interviene en los enlaces intramoleculares de las fibras del colágeno (Ando y col., 2006) y se ha reportado que tiene una estrecha relación con las propiedades físicas del mismo (Horgan y col., 1990).

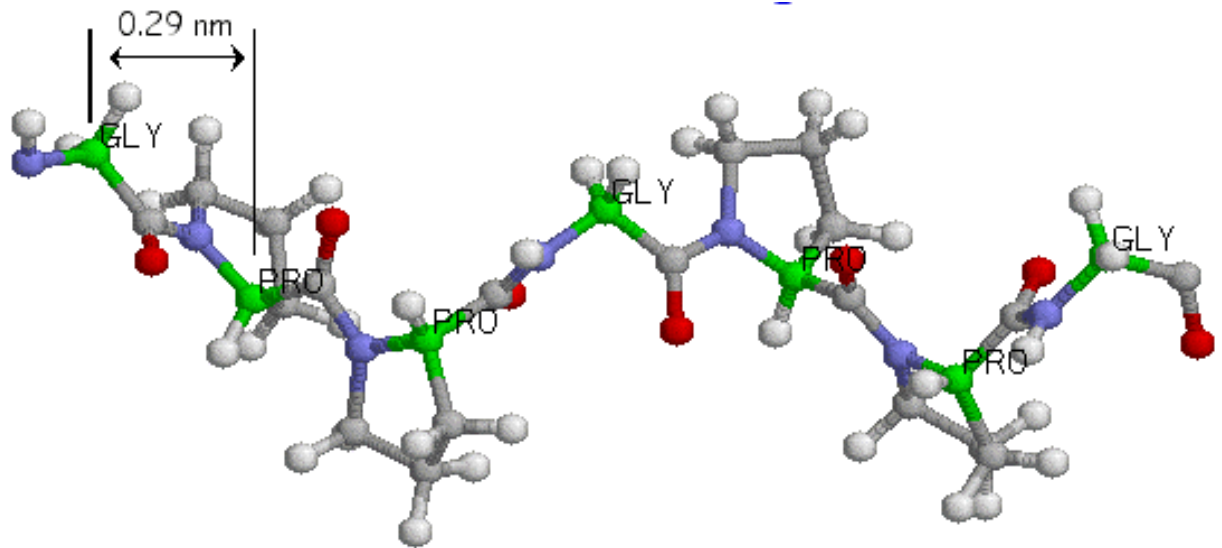


Figura 2. Representación de la secuencia de aminoácidos del colágeno

Se ha observado que cuando el colágeno posee alto contenido de piridinolina presenta menor solubilidad en agua (Ando y col., 2006; Bolboacaa y Jantschi, 2008; Amin y Ustunol, 2007). La cual varía dependiendo del origen; por ejemplo, en pescado, el colágeno de la piel y el músculo puede ser disuelto más del 80%, mientras que el colágeno del músculo porcino y bovino puede ser disuelto solamente entre 6-18% (Amin y Ustunol, 2007).

La estabilidad térmica de las fibras de colágeno está influenciada por el contenido de aminoácidos, ya que la triple hélice es estabilizada por el residuo que se encuentra en la posición X de la secuencia Gly-X-Y (Nomura y col., 2000). La pequeña cadena lateral de la glicina (un átomo de hidrógeno) se dispone hacia el interior, permitiendo que las tres cadenas polipeptídicas compacten la triple hélice, mientras que las cadenas laterales de los residuos de prolina e hidroxiprolina se disponen hacia el exterior de la triple hélice, interaccionando con el disolvente (Belitz, 1999). Además, se sabe que la hidroxiprolina desempeña un papel fundamental y especial como elemento que estabiliza esta triple hélice. Cuando hay defectos de la hidroxiprolina se traduce en la desorganización de la triple hélice y por lo tanto de todo el colágeno (Burjanadze, 1982). Debido a lo antes mencionado, los colágenos que contienen pequeñas concentraciones de ambos aminoácidos, prolina e hidroxiprolina, se desnaturalizan a temperaturas inferiores que los que lo contienen en grandes concentraciones. Los colágenos de los pescados contienen una menor cantidad de estos iminoácidos que los colágenos de los mamíferos, y su estabilidad térmica es menor (Fennema, 2002).

Se ha mostrado experimentalmente que la temperatura de desnaturalización del colágeno decae cuando la concentración de hidroxiprolina también decae, por lo que se cree que este iminoácido tiene una estrecha relación con la estabilidad térmica de la molécula (Burjanadze, 1982) .

Una característica de la fibra de colágeno es que se encoge cuando se calienta. La temperatura de encogimiento o retracción (T_s) depende de la especie. Para el colágeno del pescado, la T_s es de 45°C y para el de mamíferos de 60 a 65°C. Cuando el colágeno nativo es calentado a una temperatura mayor a la T_s , la triple hélice estándar se desnaturaliza, dependiendo del tipo de entrecruzamiento.

Este fenómeno de encogimiento ocasiona una desorganización de las fibras y el colapso de la arquitectura triple helicoidal de las subunidades polipeptídicas de la molécula de colágeno. Durante el calentamiento se pueden alterar las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, produciéndose la rotura de muchos enlaces no covalentes junto con algunos enlaces covalentes inter e intramoleculares y unos pocos enlaces peptídicos, lo cual hace que la molécula se despliegue. El resultado es la conversión de la estructura helicoidal del colágeno a una forma más amorfa, conocida como gelatina (Fennema, 2002). Debido a que las tres cadenas de la estructura helicoidal del colágeno no son idénticas, después de la degradación resultan tres tipos básicos de nuevas cadenas: las cadenas alfa, compuestas de una sola cadena peptídica, las cadenas beta, formadas por dos cadenas peptídicas conectadas, y las cadenas gamma, con tres cadenas peptídicas interconectadas, y dependiendo del gradiente de temperatura, la transición a una estructura más organizada puede o no ocurrir durante el enfriamiento (Belitz, 1999).

Fuentes de Colágeno

Colágeno en Organismos Terrestres. El colágeno generalmente constituye del 20 al 25% de la proteína total de los vertebrados superiores (Belitz, 1999) y alrededor de un tercio o más del cuerpo humano (Lehninger y col., 1995). Se dice que cuanto más pesado sea un animal, más colágeno posee. Por ejemplo, una vaca mantiene su forma debido al colágeno presente en su pellejo, tendones, huesos y otros tejidos conjuntivos (Lehninger y col., 1995).

Al menos cuatro tipos de colágeno (I, III, IV y V) se han identificado en músculos de mamíferos y aves (Haard, 1995); en animales de ganado y cerdos se ha encontrado que contienen primariamente colágeno tipo I de composición $[\alpha_1(I)_2\alpha_2(I)]$ y tipo III $[\alpha_1(III)]$ (Sikorski, 2001).

Por otro lado, el colágeno presente influye significativamente en la textura del músculo, ya que en animales jóvenes es más inestable debido a que los puentes de hidrógeno que los unen están en menor número. En cambio, en animales maduros, el colágeno posee un mayor número de puentes de hidrógeno (que se forman con el tiempo) y por lo tanto una mayor estabilidad. Esto explica las diferencias en las texturas de los músculos en animales de distinta edad (Fennema, 2002).

Colágeno en Organismos Acuáticos. El contenido de colágeno en los organismos marinos es menor que en los mamíferos, variando del 1 al 12% de la proteína y del 0.2 al 2.2% del peso del músculo (Haard, 1995; Sato y col., 1986). Se ha demostrado que juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura del músculo y está estrechamente relacionado con la capacidad

natatoria de los peces (Feinstein y Buck, 1984; Sato y col., 1986; Sato y col., 1989) quizá debido a que es el mayor contribuyente de la fuerza tensil del músculo (Espe y col., 2003).

Los organismos acuáticos son heterogéneos en composición, el tipo de colágeno presente en estos y sus características varían de especie a especie. Sin embargo, se ha demostrado que el colágeno tipo I y V frecuentemente forman parte del tejido conectivo de los organismos marinos. Además, no se ha encontrado en cantidades detectables el tipo III, que en mamíferos es el mayor componente del perimisiso (células que rodean las células endoteliales de los capilares y vénulas pequeñas) (Yoshimura y col., 2000; Sato y col., 1989).

Estos factores sugieren que las especies moleculares del colágeno y su distribución en los organismos acuáticos son diferentes al de los músculos de aves y mamíferos.

Propiedades del Colágeno de Organismos Acuáticos. En sí, los atributos de los músculos de animales terrestres y acuáticos difieren en gran medida de acuerdo a su composición química.

En análisis realizados al colágeno proveniente de pescados comúnmente utilizados para la producción de gelatina, se ha encontrado que la distribución de aminoácidos es similar al proveniente de los mamíferos, pero con menores cantidades de prolina e hidroxiprolina y altos valores de serina, treonina, y en algunos casos metionina (Borgstrom, 1962).

Así mismo en un análisis donde se compararon las propiedades del colágeno tipo I del gran tiburón azul (*Prionace glauca*) y las del colágeno de cerdo, se encontró que el colágeno proveniente del tiburón presenta una menor temperatura de desnaturalización lo cual se relaciona con el menor contenido de iminoácidos (Nomura y col., 2000).

Se ha reportado que aproximadamente el 70% del colágeno del manto de calamar no se solubiliza después de 30 min de calentamiento en agua hirviendo, detectando incluso las fibras del colágeno bajo observación al microscopio electrónico, aún después de la cocción. Esto demuestra, de acuerdo a estos autores, que en el músculo del calamar existe un colágeno estable al calor (Ando, 1997; Ando, 1996).

El músculo del calamar, después de la cocción, es diferente al del pescado, ya que es relativamente duro y no se torna frágil durante el calentamiento (Ando y col., 2001). La estabilidad térmica del colágeno presente en el manto de calamar se atribuye a la presencia de una molécula que forma parte de las fibras del colágeno, llamada piridinolina (**Figura 3 y 4**) (Belitz, 1999; Ando y col., 2001). Una considerable cantidad de colágeno (45 al 70%) del manto de varias especies de calamares (*Loligo forbesii*, *Loligo pealei*, *Sepia pharaonis* y *Sepia officinalis*), no se solubiliza aún después de 30 minutos de cocción, manteniendo sus estructuras intactas, detectando que la piridinolina es la molécula predominante en el colágeno que permanece insoluble (Ando y col., 2001). Esto hace suponer que la piridinolina tiene influencia en la estabilidad

térmica del colágeno del manto de los calamares estudiados y que esto a su vez influye en la textura de los organismos (Ando y col., 2001).

Generalidades del Quitosano

El quitosano fue descubierto por (Rouget, 1859), quien encontró que al tratar quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta “quitina modificada”, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Más tarde fue estudiada por (Hoppe-Seyler, 1894), quién la denominó “quitosano”. En la **Figura 5**, se muestra el esquema para la obtención de quitosano.

La quitina es la base de la obtención del quitosano, la cual es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa y se obtiene principalmente

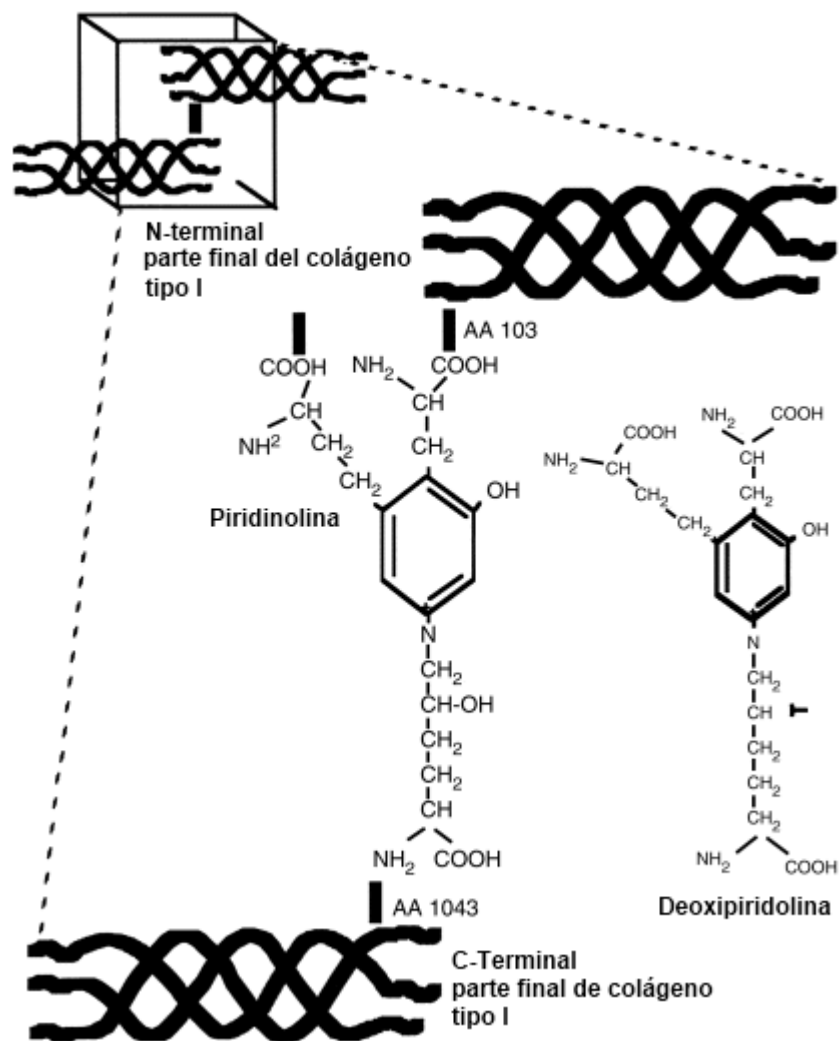


Figura 3. Representación esquemática de entrecruzamientos del colágeno entre moléculas de piridinolina y deoxipiridinolina (Ureña y Marie-Christine, 1999).

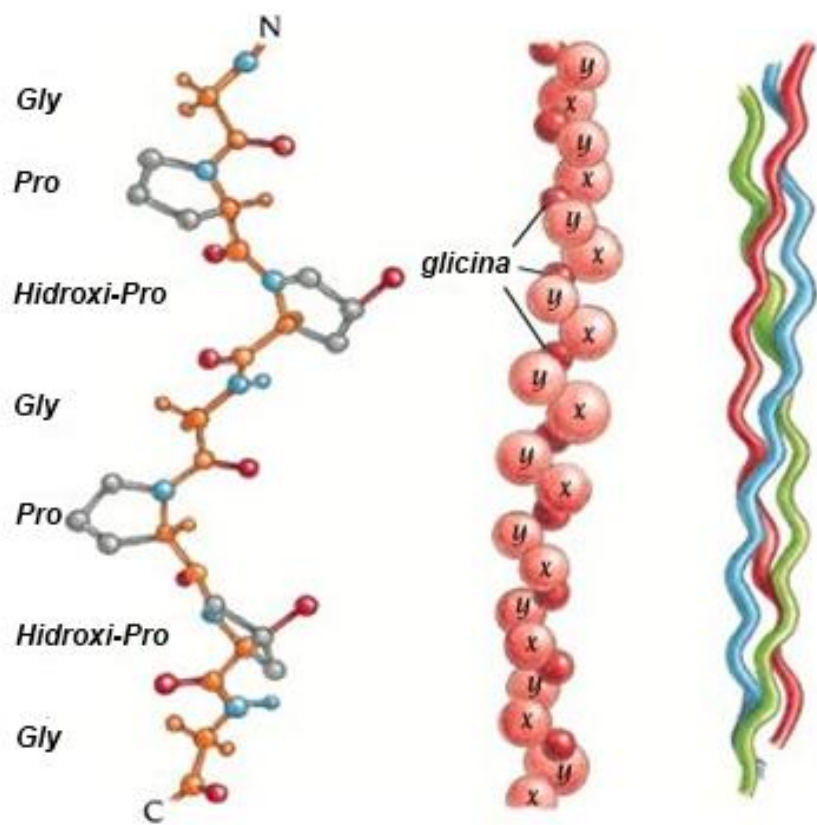


Figura 4. Estructura del colágeno (Lehninger y col., 1995).

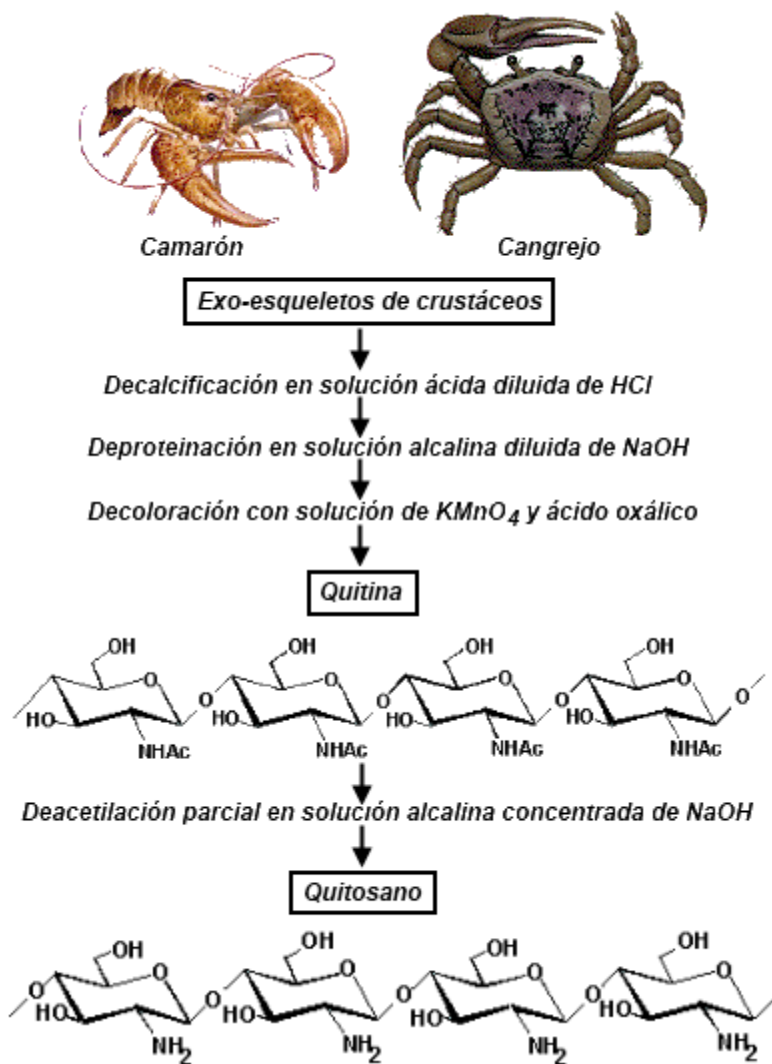


Figura 5. Esquema elemental para la obtención de derivados de la quitina (Velásquez, 2003).

de los desechos del procesamiento de cangrejos y camarones (Synowiecki y Shahidi, 1991).

El quitosano es un polímero catiónico que presenta grupos aminos libres de estructura lineal con una alta densidad de cargas positivas.

Es utilizado como antimicrobiano y en tratamiento de efluentes Industriales (**Figura 6**) (Plascencia-Jatomea, 2004; Yang y col., 2009). La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles que se estudian desde hace ya algún tiempo, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como la reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, de las cuales se obtienen materiales con propiedades adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología, biomedicina, agricultura, etc. (Hirano y col., 1997).

Dependiendo del pH del medio es la capacidad del quitosano para interactuar con otras moléculas. Por ejemplo, a pH 3.1, el quitosano retiene más gelatina (58.3%) que a pH de 4.1 (31%), esto atribuido al carácter básico de sus grupos NH₂ (Medina-Maureira, 2005).

Otro factor que determina la interacción entre el quitosano y otras moléculas, principalmente proteínas, es el peso molecular de las mismas. A menor peso molecular se traduce en una mayor facilidad de contacto entre el quitosano y la proteína (Medina-Maureira, 2005).



Figura 6. Quitosano comercial de caparaz3n de cangrejo, 85% deacetilado de alto peso molecular (Sigma Chemicals Co, St. Louis, Mo).

Interacciones Quitosano:Prote3na

Las interacciones químicas entre el quitosano y las proteínas se dan por la presencia de grupos nucleofílicos como OH, NH₂ en el quitosano y los grupos COOH, NH₂ en la proteína (colágeno) así como los enlaces heteroátomos-hidrógenos polarizados. Entre las interacciones más importantes están las del tipo de enlace puentes de hidrógeno así también enlaces iónicos interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals; siendo las primeras las más representativas (Lima y col., 2006; Sionkowska y col., 2004b), por ejemplo:

- Entre dos grupos hidroxilo (HO-HO)
- Entre el hidrógeno del grupo amina de la proteína y los oxígenos de los grupos hidroxilo del quitosano y viceversa (HO-HN)
- Entre el hidrógeno sobre el nitrógeno de la amina del quitosano y el grupo carbonilo de la proteína (C=O-HN).

En la **Figura 7** se muestra la posible interacción entre el quitosano y una proteína (sección del aminoácido prolina). Una de las propiedades que caracteriza al quitosano es su grado de saturación, el cual está directamente relacionado con el proceso de hidrólisis de los grupos acetamido de la quitina (CH₃CONH-) hasta grupos aminos (NH₂), la cual lleva a la obtención del quitosano. De acuerdo a esto se puede esperar un comportamiento distinto en lo que se refiere a los posibles enlaces que ocurre con la proteína. A mayor masa molar existe mayor cantidad de grupos aminos o acetilos disponibles para enlazarse con la proteína (Medina-Maureira, 2005).

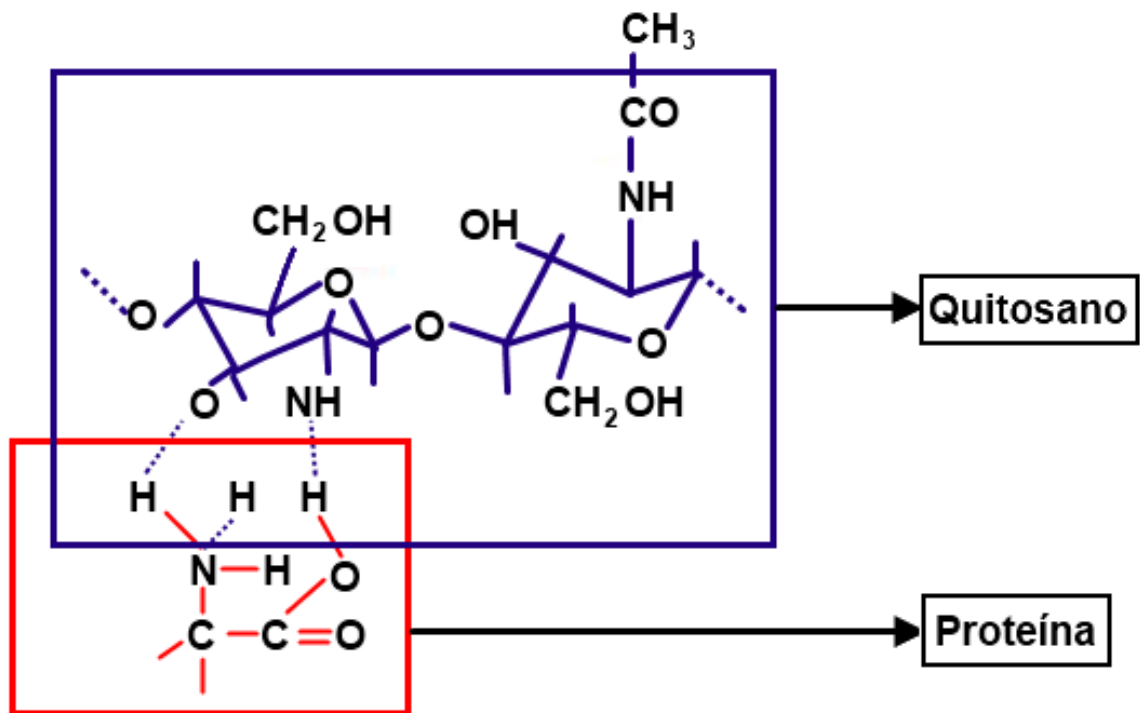
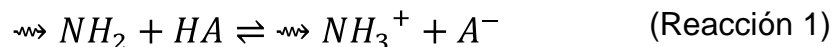


Figura 7. Interacciones propuestas entre el quitosano y un proteína (Medina-Maureira, 2005).

En el quitosano, hay un número menor de interacciones del tipo de enlaces puente de hidrógeno posible en los que intervienen los grupos carbonilo (C=O-OH y C=O-NH) (González-González y col., 2002), el grupo acetilo puede presentar un impedimento estérico para la formación de enlaces de puentes de hidrógeno, en los que intervenga el grupo hidroxilo vecino o el hidrógeno amínico y resultar en una desventaja relacionada con la adsorción de la proteína.

La presencia de grupos amino a lo largo de la cadena tanto del colágeno como del quitosano, dependiendo de su tratamiento y su peso molecular, permite su disolución en ácidos diluidos, por medio de la protonación de esos grupos.

En medios ácidos diluidos se lleva cabo la siguiente reacción de equilibrio:



Al adquirir cargas positivas, las aminas presentes en las moléculas tanto del quitosano como del colágeno aumentan su capacidad hidrofílica.

De diversas investigaciones donde se ha llevado cabo la mezcla de colágeno con quitosano, se ha detectado lo siguiente:

- Al aumentar la concentración de quitosano, las fibras de la mezcla se hacen más delgadas (Sionkowska, 2006).
- El quitosano (16% deacetilado) aumenta la estabilidad térmica de las películas de colágeno. Esto se atribuye a que aumenta la organización microscópica de

la estructura de las moléculas, ocasionando a su vez un aumento en la estabilidad térmica (Lima y col., 2006; Horn y col., 2009).

- Al mezclar el colágeno con el quitosano, se puede presentar un incremento en las interacciones hidrofílicas, induciendo una menor asociación proteína-proteína, por lo que la viscosidad de la mezcla aumenta y se potencializa un comportamiento tipo fluido viscoelástico (Sionkowska y col., 2004b; Horn y col., 2009).
- A mayor concentración de quitosano la fuerza de elongación disminuye (Suyatma y col., 2004).

Biopelículas

En los últimos 50 años los avances en la producción de películas han sido impresionantes, se han elaborado películas de polímeros sintéticos diseñados para proteger los alimentos y productos farmacéuticos, entre otros, realizando además funciones como acolchado. Con el aumento de la población y la explotación de los recursos no renovables y el medio ambiente, se plantea el uso de recursos renovables para producir biopelículas comestibles y biodegradables que pueden mejorar la calidad de los productos y/o reducir los problemas con la eliminación de residuos (Aristippos, 2002).

Una serie de estudios han considerado adecuados a los materiales de diferentes orígenes renovables que tengan las propiedades y aplicaciones potenciales para elaborar biopelículas, recubrimientos comestibles y biodegradables (**Tabla 1**) (Daniels, 1973; Gilbert y Pegaz, 1969; Kester y Fennema, 1986; Krochta, 1992). Entre los

materiales utilizados se tienen a las proteínas, polisacáridos, lípidos y resinas naturales como la colofonia (Hernandez, 1994; Baldwin y col., 1997; Callegarin y col., 1997; Shellhammer y Krochta, 1997).

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

Tabla 1. Propiedades y aplicaciones de películas de colágeno y quitosano de diferentes orígenes.

Materiales	Propiedades	Aplicaciones	Referencias
Quitosano + PEO (óxido de polietileno)	Mecánicas: TS=47.0 mPa, %E=4.2 Solubilidad en agua: 46.4%	NR	(Zivanovic y col., 2007)
Colágeno + quitosano	NR	Material para reemplazo de tejido en córnea	(Chen y col., 2005)
Quitosano + Colágeno	Interacciones puentes de hidrogeno	NR	(Sionkowska y col., 2004b)
Quitosano + glicerol + cera	PM: 220kDa bajo, 350kDa medio, 560kDa alto	Cubiertas comestibles para frutas	(González-Aguilar y col., 2005)
Quitosano + HPMC (hidroxipropil metil celulosa)	Mecánicas: TS=7 mPa, %E=60.5 VTVA = 9.7 g/m ² /dia	NR	(Sebti y col., 2007)
Quitosano + colágeno	Aumento de la resistencia térmica de los componentes	NR	(Horn y col., 2009)
Pectina + gelatina	Mecánicas: TS=43.5 mPa, %E=3 VTVA = 147 g/m ² /dia	NR	(Liu y col., 2007)
Colágeno	NR	Formación de la matriz extracelular	(Song y col., 2006)
Colágeno + quitosano	Mecánicas: TS=0.61 mPa, %E=3.2 Térmicas: Tmax 115°C	Elaboración de matriz artificial de para huesos	(Wang y col., 2008b)
Colágeno + PLA (ácido poliláctico)	Mecánicas: TS=0.49 mPa, %E=17	Acelerador en la formación de tejido	(Jeong y col., 2007)
Proteína de Trigo + colágeno	Mecánicas: TS=7 mPa, %E=48	NR	(Simelane y Ustunol, 2005)
Colágeno + glicerol	Mecánicas: TS=46.6 mPa, %E=110	NR	(Zhang y col., 2007)
Proteína de trigo comparado con Colágeno	Mecánicas: TS=6.5 mPa, %E=6.8	NR	(Amin y Ustunol, 2007)
Quitosano + PLA (ácido poliláctico)	Mecánicas: TS=64.4 mPa, %E=4.2 VTVA =12.5 g/m ² /dia	NR	(Suyatma y col., 2004)

TS = esfuerzo a la tensión

%E = porcentaje de elongación

VTVA = velocidad de transmisión del vapor de agua

PM = peso molecular

NR = no reportado

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.

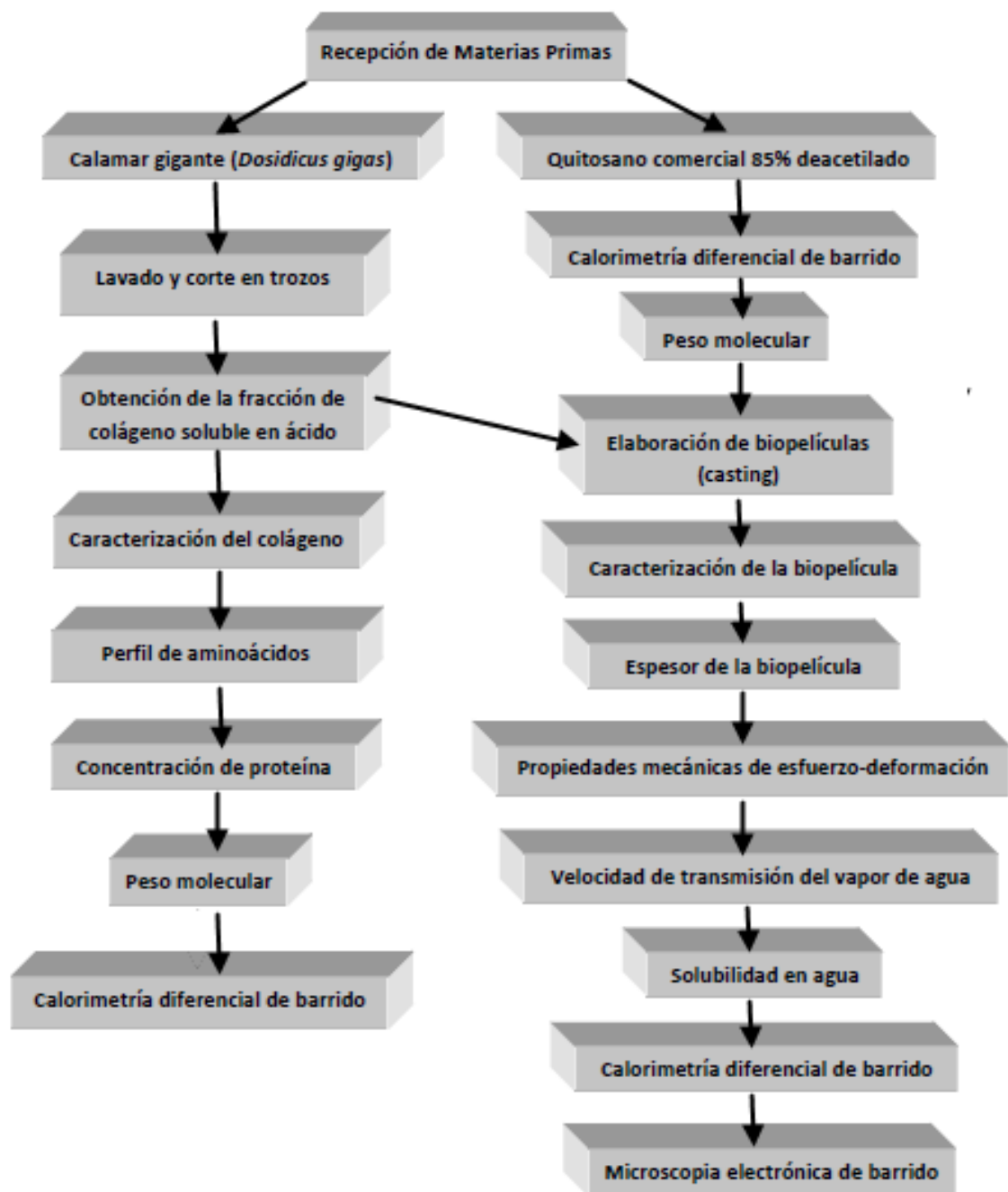


Figura 8. Diagrama de flujo general para el desarrollo de las dos fases propuestas para la elaboración del trabajo experimental.

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.

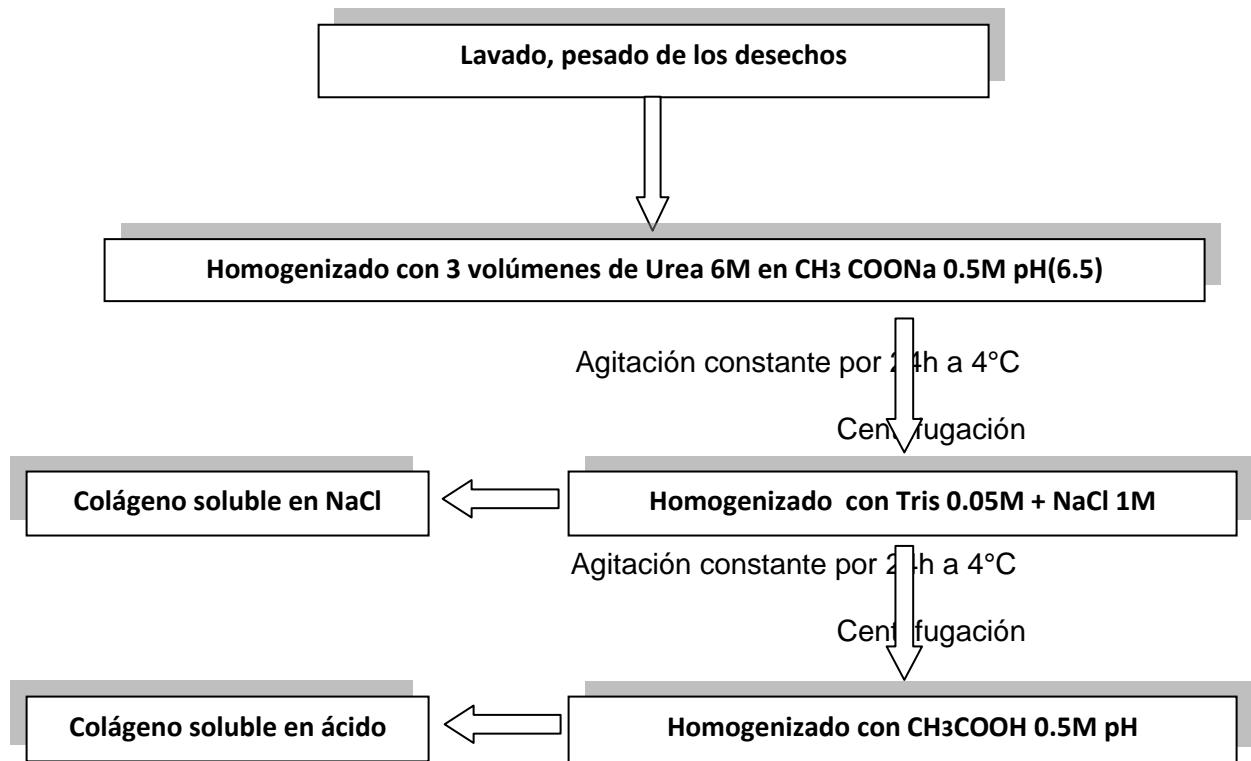


Figura 9. Representación esquemática del método empleado para la extracción de colágeno (Sivakumar y Chandrakasan, 1998; Uriarte, 2007).

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

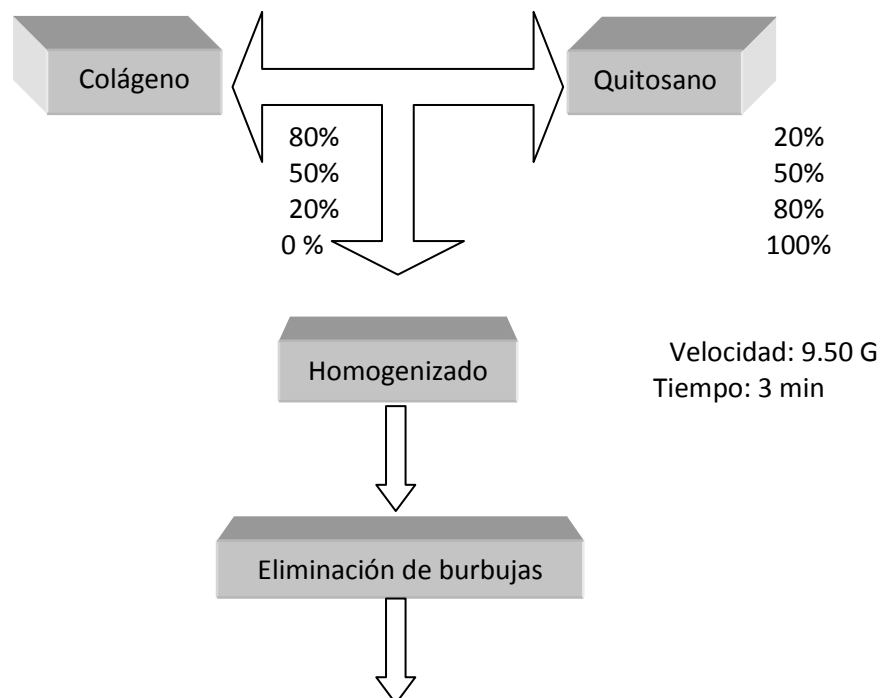
Biopelícula 4. 20% quitosano : 80% colágeno.

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



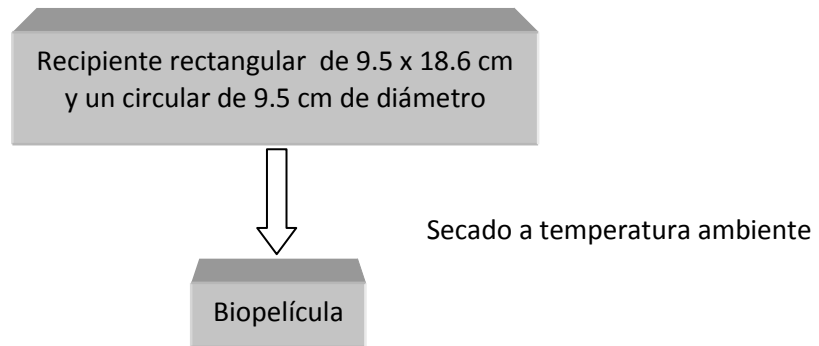


Figura 10. Representación esquemática del método empleado para la elaboración de biopelículas.

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%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I:

Caracterización del Colágeno

Extracción de Colágeno

Se logró extraer 9.3 ± 0.01 g de proteína por cada 100 g de desecho. Durante el proceso de la extracción se separaron las proteínas estromales de las miofibrilares y sarcoplasmáticas, obteniéndose la fracción soluble en ácido del colágeno.

La cantidad de proteína extraída es superior a la obtenida para otras especies de calamar como *Loligo patagonica* (3%), similar a *Illex argentinus* (11%), *Illex condenti* (10.6%), aunque menor a *Tadoropsis eblanae* (13-18%) (Sikorski, 1986; Nevarez-Martinez y col., 2000; Morales y col., 2000; Kolodziejska y col., 1999).

La concentración de colágeno soluble en ácido presente en el contenido total de proteínas fue de $74.1 \pm 2.9\%$. Valores menores del colágeno soluble en ácido se detectaron en el manto del calamar gigante (70%) (Uriarte, 2007), sin embargo valores más altos de éste colágeno soluble en ácido se han detectado en otras especies de calamar, como el calamar volador (*I. coindetii*) y al calamar pota (*T. eblanae*), donde se reportan valores entre 77 – 87% (Morales y col., 2000).

Se sabe que a mayor grado de entrecruzamiento en el colágeno menor será su solubilidad en ácido (Friess, 1998). Por lo tanto, es posible que exista

un menor grado de entrecruzamiento en el colágeno presente en la cabeza y tentáculos del *D.gigas* comparado con el manto, y mayor comparado con otras especies de calamar.

Perfil de Aminoácidos

La detección realizada por fluorescencia presentó los valores de los aminoácidos primarios que se muestran en **Tabla 2**, en donde puede apreciarse que los valores de glicina obtenidos son de 2.8 ± 0.1 mg/g proteína. Un aminoácido que se esperaba en bajas concentraciones era la metionina, sin embargo el análisis arrojó valores muy elevados (50.1 ± 2.9 mg/g proteína).

Los valores de glicina son menores a lo reportado por otros autores, ya que se espera que una muestra de colágeno presente una alta concentración de este aminoácido (entre 27 y 34.5 mg/g de proteína); esto puede atribuirse a la región anatómica de donde se extrajo el colágeno, ya que en los tentáculos se encuentran los aminoácidos como la alanina, lisina que son la principal fuente de energía metabólica para el calamar gigante.

Por otro lado el contenido de metionina es elevado en comparación con otros valores reportados (0.6 a 1.3 mg/g proteína) (Song y col., 2006; Giménez y col., 2009; Kim y Park, 2004). Esto puede atribuirse a que durante el proceso de extracción del colágeno, no se alcanzó a remover completamente otro tipo

Tabla 2. Contenido de aminoácidos en el colágeno soluble en ácido extraído de los desechos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Aminoácidos	Concentración mg/g
Ácido aspártico	0.7 ± 0.1
Ácido glutámico	1.5 ± 0.2
Glicina	2.8 ± 0.1
Treonina	1.3 ± 0.2
Alanina	0.5 ± 0.1
Tirosina	1.7 ± 0.1
Metionina	50.1 ± 2.9
Valina	1.5 ± 0.01
Lisina	1.0 ± 0.2
Cantidad Total de AA	61.087

Los aminoácidos fueron cuantificados por HPLC, según modificaciones al método (Vázquez-Ortiz y col., 1995).

Los análisis se realizaron por triplicado, indicando el valor promedio ± el error estándar.

de proteínas como las miofibrilares, tal como se aprecia en el análisis electroforético, que se discute más adelante.

El contenido de los aminoácidos secundarios presentes en el colágeno soluble en ácido obtenido de la cabeza de *Dosidicus gigas* se muestran en la **Tabla 3**. Los resultados

indican un contenido de hidroxiprolina es de 4.6% y de prolina de 8.3%. La concentración tanto de hidroxiprolina como de prolina fueron menores al detectado en el colágeno soluble en ácido presente en manto de calamar gigante (6.5% y 10.9% respectivamente) (Uriarte, 2007).

La presencia de prolina e hidroxiprolina se relaciona con la presencia de colágeno, debido a que estos aminoácidos no se encuentran en forma habitual en otras proteínas (Vázquez-Ortiz y col., 2004), por lo que la detección de los mismos confirma que se trabajó con esta proteína. Además, se ha establecido que la concentración de estos aminoácidos está relacionado con la estabilidad térmica del colágeno (Sikorski y col., 1984), considerando a la hidroxiprolina la responsable de dicha estabilización debido a su habilidad de formar puentes de hidrógeno (Guo y col., 2003; Khew y Tong, 2008). De ahí que el colágeno soluble en ácido extraído de la cabeza y tentáculos del calamar gigante presente propiedades térmicas menores a las detectadas en el manto, cómo se menciona en el apartado de calorimetría, que se describen más adelante.

Tabla 3. Contenido de proteína, colágeno soluble en ácido, prolina e hidroxiprolina de los desechos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Colágeno	Extracto (100g de desechos)
Total (% del contenido de proteína)	9.3 ± 0.01
Colágeno soluble en ácido (% del colágeno total)	74.1 ± 2.9
Hidroxiprolina (% del colágeno soluble en ácido)	4.8 ± 0.1
Prolina (% del colágeno soluble en ácido)	8.3 ± 0.2

Los valores son promedio de 3 repeticiones.

El porcentaje de colágeno fue determinado multiplicando el valor de hidroxiprolina por el factor 21.56.

Perfil Electroforético

El perfil electroforético de la fracción ácida del colágeno se muestra en la **Figura 11**, en donde se aprecia la presencia de 3 fracciones o bandas en el carril **D**, dos de ellas cercanas con pesos moleculares de 116 y 97 kDa, y una tercera alrededor de los 200 kDa. Este patrón es semejante a lo reportado por otros autores para el colágeno de origen marino, incluyendo al calamar gigante (Uriarte, 2007; Torres-Arreola y col., 2008; Bower y col., 2006; Kim y Park, 2004; Valencia-Perez y col., 2008).

Los valores obtenidos en 116 y 97 kDa son dos bandas relacionadas con las cadenas 2α , la cadena $\alpha1$ superior y $\alpha2\alpha$; este comportamiento es reportado por otros autores para la misma especie (Uriarte, 2007; Torres-Arreola y col., 2008; Valencia-Perez y col., 2008). La presencia de las dos cadenas α y la tercera cadena β está relacionada con el colágeno Tipo I y el Tipo V, detectados principalmente en organismos marinos (Fullerton y col., 2006). Este tipo de colágeno se caracteriza por presentar una estructura heterotrimétrica, por lo que para poder confirmar que efectivamente se trata de un colágeno Tipo I o bien Tipo V se requeriría llevar a cabo estudios del tipo de cristalografía de rayos x y dicroísmo circular que nos permitirán conocer más al detalle los enlaces y estructuras presentes en esta muestra.

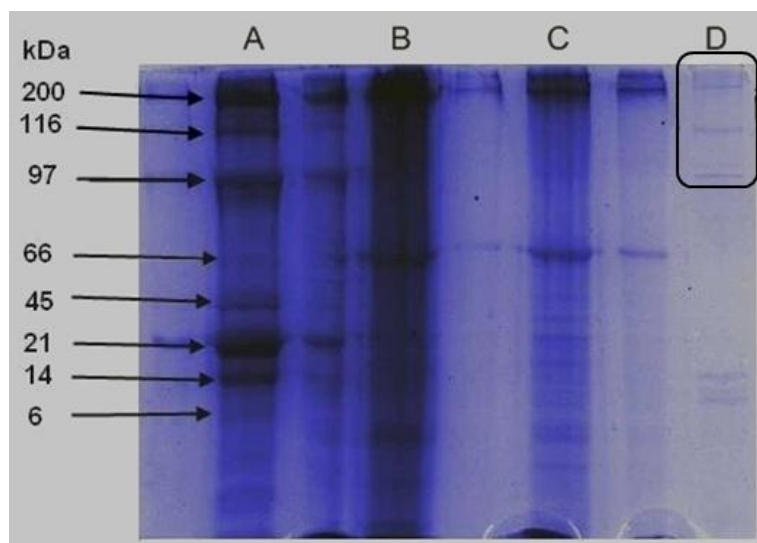


Figura 11. Gel de electroforesis de SDS – poliacrilamida del colágeno extraído de los desechos del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Carril A: Marcador de amplio rango. B: Colágeno soluble en Urea. C: Colágeno soluble en tris y NaCl. D: Colágeno soluble en Ácido.

Calorimetría Diferencial de Barrido

Los resultados obtenidos del análisis calorimétrico se muestran en la **Tabla 4**.

Del termograma obtenido de la fracción de colágeno soluble en ácido (**Figura**

12A) se observa un solo pico endotérmico en el rango de 55-81°C. Lo que indica que se tiene una sola molécula en términos de transición térmica, presentándose su temperatura máxima a 61.4°C.

El análisis térmico ha sido utilizado por otros autores para dilucidar la estructura del colágeno nativo, los enlaces que lo asocian a otras macromoléculas y se ha establecido que un proceso endotérmico está asociado a la desnaturalización de la proteína (Linsenmayer y col., 1984). El pico observado en el presente estudio se relaciona con la transición de la triple hélice del colágeno en una sola espiral de forma aleatoria, la cual se presenta cerca de los entrecruzamientos. El fenómeno antes mencionado podría explicarse en función de los enlaces que estabilizan la triple hélice, que pueden ser puentes de hidrógeno, entre los grupos OH y NH₂ de las cadenas vecinas entre los aminoácidos como la lisina, tirosina, treonina, prolina, hidroxiprolina, y enlaces hidrofóbicos donde intervienen los grupos de alanina y metionina, fuerzas de Van der Waals e interacciones de cargas opuestas entre residuos de las cadenas laterales donde participa el ácido aspártico (Lima y col., 2006; Rochdi y col., 1999), los cuáles contribuyen de diferente manera en la estructura y estabilidad de la molécula. La distribución no aleatoria de iones y

Tabla 4. Temperaturas y entalpías de los diferentes picos presentes en el colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar gigante y el quitosano comercial.

Pico 1				
Muestras	Tmax °C	ΔH (kJ.mol⁻¹)	Tg °C	ΔCp (kJ.mol⁻¹)
Colágeno	↑61.4 ± 3.5	60.3 ± 4.2	ND	ND
Quitosano	↑81.06 ± 0.6	0.67 ± 0.06	165.05 ± 1.1	0.54 ± 0.1

N = 3 veces

(↑) Simboliza picos endotérmicos

ND = no se detectó

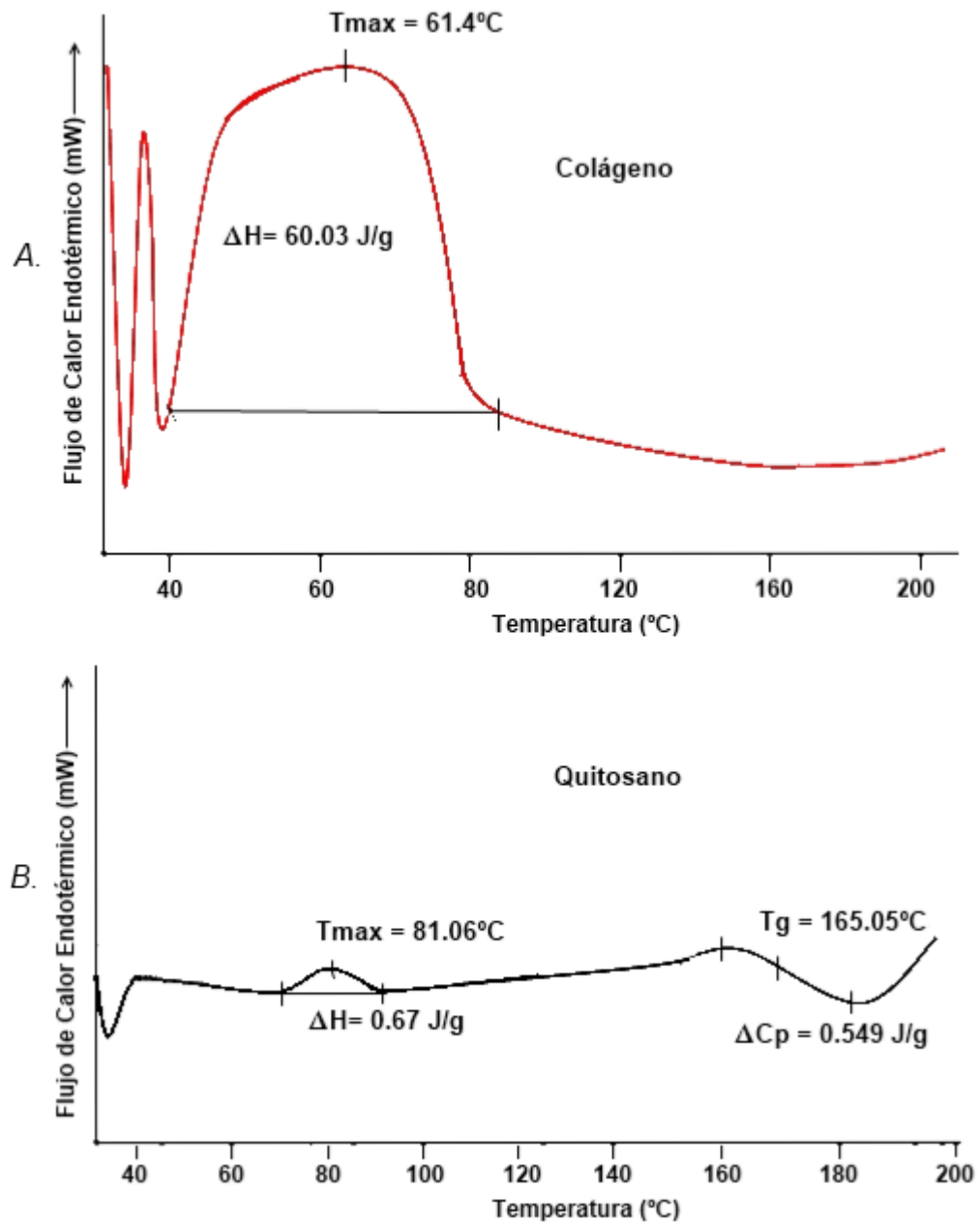


Figura 12. Termogramas obtenidos mediante calorimetría de barrido diferencial de: (A) la fracción ácida del colágeno soluble en ácido extraído del desecho de calamar gigante y (B) quitosano comercial.

las cadenas hidrófobas laterales en forma repetitiva, da como resultado cargas positivas y/o negativas, que permiten la unión de las hélices, mientras que los enlaces hidrofóbicos contribuyen a la estabilización de la estructura a través de las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Durante el proceso de transición térmica, ésta se inicia con la ruptura de los puntos más débiles de la hélice, entre las agrupaciones menos estables, una pequeña región presente en la molécula la cual contiene los enlaces de baja energía es el lugar más favorable para iniciar la desnaturalización (Chahine, 2000; Lima y col., 2006).

La temperatura de transición térmica detectada en este estudio, es menor a la reportada previamente en el colágeno de calamar gigante, con picos endotérmicos entre 115-123°C (Valencia-Perez y col., 2008; Hernandez-Izquierdo y Krochta, 2008; Torres-Arreola y col., 2008; Wang y col., 2008b; Lima y col., 2006; Uriarte, 2007). Como ya se mencionó, hay una relación favorable entre la estabilidad térmica de una proteína con el contenido de los iminoácidos (hidroxiprolina y prolina). En un estudio anterior se detectó que el colágeno soluble en ácido del manto de calamar gigante presentaba 174 residuos/1000 residuos de éstos dos iminoácidos con una estabilidad térmica de 119°C (Uriarte, 2007). En el presente trabajo, el contenido total de estos dos iminoácidos fue de 129.7 residuos/1000 residuos con una estabilidad térmica de 61.4°C. Sin embargo, son valores más altos a los reportados para el colágeno extraído de otras especies marinas, incluso para otras especies de calamar (Paredi y col., 1996). Esto último se atribuye a la presencia de la

molécula entrecruzadora, piridinolina, la cual se espera se encuentre en mayor proporción en el calamar gigante (Torres-Arreola y col., 2008), estableciéndose que a mayor contenido de piridinolina mayor es la estabilidad térmica del colágeno (Ando y col., 2001).

Caracterización del Quitosano Comercial

Peso Molecular

El peso molecular del quitosano comercial en función de la viscosidad se muestra en la **Tabla 5**. La determinación de este peso molecular se realizó por viscosimetría (Parada y col., 2004), utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada. Se ha definido que un quitosano de peso molecular medio se encuentra entre los 400 y 600 kDa, valores superiores se consideraría un molécula de alto peso molecular (Freier y col., 2005; González-Aguilar y col., 2005) por lo que se establece que el peso molecular del quitosano con el que se trabajó es de medio peso molecular.

Calorimetría Diferencial de Barrido

El termograma obtenido para el quitosano comercial se muestra en la **Figura 12B**. Donde se observan dos transiciones, una endotérmica (70–99°C) y una transición vítrea (160–180 °C). El primer pico se relaciona con un proceso de evaporación de agua, ya que se presenta en un intervalo de temperaturas semejante a lo reportado por Suyatma y col. (2005). La segunda transición está

Tabla 5. Peso molecular y viscosidad intrínseca del quitosano comercial.

Muestra	[η] (dl/g)	PM (kDa)
Quitosano Sigma Chemicals	10.3 ± 0.294	~570.3

[η]: viscosidad intrínseca, **PM**: peso molecular.

n= 3

relacionada con el desarreglo de la molécula de quitosano, asociada con la relajación del mismo como consecuencia de la ruptura de los enlaces glucosídicos de la molécula. Esta transición es una transición vítrea (T_g) de este material (Mucha y Pawlak, 2005; Suyatma y col., 2004), Se entiende como (T_g) al punto intermedio de temperatura entre el estado fundido y el estado rígido del material (Maglic y col., 1984).

Los resultados aquí observados, están relacionados con la ruptura de enlaces del tipo puente de hidrógeno presentes en el quitosano, siendo el aumento de esta resistencia térmica atribuido a la cantidad de enlaces presentes en la composición del quitosano principalmente la interacción de los grupos amida con $-OH$ y los $-NH_2$ (Sionkowska y col., 2004b).

Fase II:

Elaboración de Biopelículas

En este apartado se discutirán los resultados de las biopelículas obtenidas de la mezcla de colágeno:quitosano. Se esperaba que el colágeno soluble en ácido fuese menos higroscópico (Bower y col., 2006; Chajra y col., 2008) sin embargo, la obtención de biopelículas partiendo de la fracción de colágeno soluble en ácido extraído del calamar gigante no fue posible que adquiriesen la forma del recipiente empleado (cajas petri y/o molde rectangular). Por otro lado, se buscaba que las propiedades del quitosano se viesen modificadas al mezclarse con el colágeno (Bower y col., 2006; Chajra y col.,

2008), tal como pudo apreciarse en el presente trabajo, ya que se observó que en los compositos evaluados, a medida que aumentaba la concentración de quitosano, la consistencia y el grado de brillantez de las películas fueron modificándose (**Figura 13**). Con lo cual se estaría cumpliendo el objetivo central del estudio, que el colágeno puede servir como un agente plastificante en la obtención de biopelículas de quitosano por el método de casting.

La biopelícula obtenida de la mezcla 80% de colágeno y 20% de quitosano (**Figura 13a.**) presentó una consistencia extremadamente flexible, por lo que al formarse las biopelículas, tenían dobleces, corrugaciones, además de ser muy opaca. La biopelícula que se obtuvo de la mezcla 50% colágeno y 50% quitosano, adquirió perfectamente la forma del molde empleado; sin embargo, aún es opaca y con flexibilidad (**Figura 13b.**). Al trabajar con la mezcla 20% colágeno y 80% quitosano, la biopelícula también adquirió perfectamente la forma del molde usado, aún es flexible y presenta brillo (**Figura 13c.**). Finalmente, la biopelícula de 100% de quitosano, tal como se esperaba, se formó perfectamente en el molde, presentó brillantez, una rigidez excesiva, poca flexibilidad y alta fragilidad (**Figura 13d.**).

En trabajos donde se obtuvieron películas de quitosano y agentes plastificantes (Cota, 2007; Martínez, 2009), así como de películas de quitosano y colágeno (Uriarte, 2007; Cota, 2007; Martínez, 2009), se observó un comportamiento similar al antes mencionado.

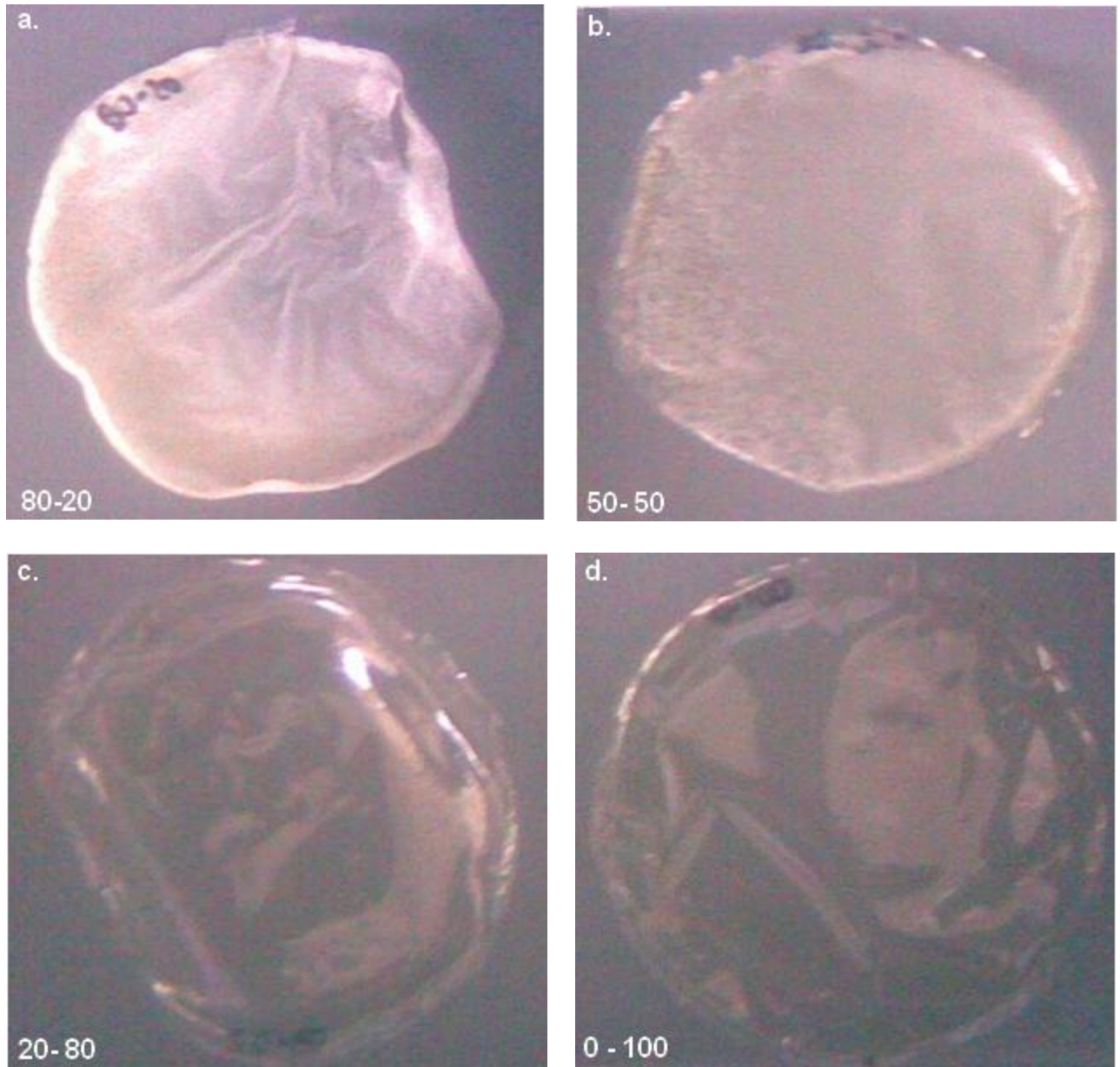


Figura 13. Biopelículas de colágeno soluble en ácido extraído de los desechos de calamar gigante y quitosano comercial en diferentes concentraciones.

Este comportamiento se atribuye al hecho de que, si el quitosano se mezcla con otros compuestos, como plastificantes o agentes antimicrobianos, con un volumen molecular mayor al del anión, en este caso el colágeno se obtienen películas más suaves (Begin y Van Calsteren, 1999). El comportamiento observado en la mezcla de quitosano y colágeno puede atribuirse a las interacciones moleculares que se dan entre la molécula de quitosano con la proteína. Se ha reportado que debido a los grupos nucleofílicos como OH, NH₂ y a enlaces heteroátomos-hidrógenos polarizados (**Figura 7**), se dan interacciones electrostáticas entre el solvente, el colágeno y el quitosano, además de puentes de hidrógeno (Uriarte, 2007). Por lo tanto, al aumentar la concentración de colágeno se pueden llevar a cabo modificaciones conformacionales de las biomoléculas en la matriz de la película formada. Este tipo de interacción y otras del tipo hidrofóbico pueden también presentarse entre estas dos moléculas, lo cual puede explicarse por los resultados obtenidos en el estudio calorimétrico.

Espesor

La adición de agentes plastificantes puede llegar a modificar el espesor de las biopelículas de quitosano (Plascencia-Jatomea, 2004) y así afectar principalmente sus propiedades de barrera, por lo que se tuvo especial cuidado en mantener un espesor uniforme (**Tabla 6**) de esta manera, la diferencia detectada en las propiedades mecánicas y de velocidad de transmisión al vapor

Tabla 6. Espesores de las biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar gigante y quitosano comercial.

Películas	Espesores (mm)
80% colágeno – 20% quitosano	0.072 ^a
50% colágeno – 50% quitosano	0.072 ^a
20% colágeno – 80% quitosano	0.073 ^a
0% colágeno –100% quitosano	0.074 ^a

n = 40

Las biopelículas fueron elaboradas hasta obtener una variación menor o igual al 10%.

Los volúmenes de las mezclas fueron: 70 mL (80C-20Q); 67 mL (50C-50Q); 65 mL (20C-80Q y 0C-100 Q).

El coeficiente de variación para todas las películas fue menor al 6.6%.

Letras diferentes entre renglones indican diferencia significativa $p < 0.05$.

de agua evaluadas sean producto de las interacciones moleculares y propias de cada material, no por efecto de una diferencia entre los espesores.

El espesor de las biopelículas es una medida de la densidad de las mismas y que se relaciona con el volumen molecular del anión correspondiente al solvente en el cual se disolvió el quitosano y el colágeno (Begin y Van Calsteren, 1999). Se encontró que al aumentar la concentración de colágeno se obtienen biopelículas con un espesor ligeramente menor, esto atribuido a las interacciones químicas que se dan entre ambos compuestos. Se ha reportado que durante el proceso de evaporación y formación de la biopelícula, las soluciones formadoras se gelifican antes de que las moléculas tanto del polímero como del anión y del plastificante se puedan alinear y compactar, contribuyendo así a obtener biopelículas con diferente espesor.

Propiedades Mecánicas de Esfuerzo-Deformación

El quitosano presenta una alta barrera al oxígeno y baja velocidad de transmisión al vapor de agua; sin embargo, la biopelícula que se forma es muy poco elástica y frágil, por lo que se busca mezclarlo con algunos agentes plastificantes con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas, principalmente el porcentaje de elongación (Butler y col., 1996).

Los valores obtenidos de esfuerzo y porcentaje de elongación de las biopelículas elaboradas se muestran en la **Tabla 7**. Se observa que a medida que disminuye la concentración de colágeno, el esfuerzo necesario para la

Tabla 7. Propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación de las biopelículas de colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar gigante y quitosano comercial.

Películas	Esfuerzo (mPa)	Elongación (%)
80% colágeno – 20% quitosano	1.5 ^f ± 0.1	29.1 ^b ± 0.9
50% colágeno – 50% quitosano	4.1 ^e ± 1.2	39.8 ^a ± 3.2
20% colágeno – 80% quitosano	35.5 ^d ± 4.4	12.3 ^c ± 1.1
0% colágeno –100% quitosano	50.1 ^c ± 3.6	5.2 ^d ± 0.3

n= 5

Las medias y desviaciones estándar fueron obtenidas de las evaluaciones realizadas a las 4 biopelículas elaboradas

La determinación se realizó por duplicado

Letras diferentes entre renglones indican diferencia significativa con $p < 0.05$

ruptura de la biopelícula es mayor y el porcentaje de elongación va disminuyendo. El modulo elástico es definido como la fuerza intrínseca e indica la rigidez de la biopelícula (Srinivasa y col., 2007), es decir, determina el punto en el que la biopelícula se rompe al someterse esta a un estiramiento. Este punto de ruptura cuando la biopelícula está estirada dependerá principalmente de la fuerzas de las interacciones que se dé entre las cadenas de los biopolímeros mezclados como se menciona en otros apartados las principales interacciones de estos dos materiales son mediante puentes de hidrógeno, fuerzas iónicas e interacciones electrostáticas (Suyatma y col., 2004). En este parámetro se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes biopelículas evaluadas.

Una característica importante de las biopelículas es su funcionalidad, la cual está relacionada con sus características mecánicas, como la fuerza de la estructura, que se determina mediante el esfuerzo aplicado al material y la deformación resultante (Rayas y col., 2003). Se observó que la adición del colágeno aumenta el porcentaje de elongación de la biopelícula de quitosano de $5.2 \pm 0.3\%$ hasta $39.8 \pm 3.2\%$. Incluso se detectó, que la biopelícula elaborada con la mezcla 50% colágeno:50% quitosano, presentó un porcentaje similar al de un plástico comercial (polipropileno 38.4%). Este comportamiento se atribuye a la propiedad hidrofílica de la molécula de colágeno, lo cual le confiere a la biopelícula un cierto grado de hidratación dando como resultado un aumento en el porcentaje de elongación (Simelane y Ustunol, 2005).

Al comparar la biopelícula 20% colágeno:80% quitosano, esta posee propiedades similares, en cuanto a elongación al acetato de celulosa (celofán 9.2%) ya que no se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$), lo cual indica que ésta biopelícula posee una flexibilidad similar al material comercial relacionado directamente con el tipo de composición química del quitosano al ser muy semejante al acetato de celulosa solo cambiando en el grupo funcional amino que lo diferencia de este.

En lo que se refiere al esfuerzo o fuerza tensil, esta fue menor en las biopelículas con mayor contenido de colágeno, siendo los materiales comerciales (celofán 69.6 mPa y polipropileno 110 mPa) los que presentaron mayores valores ($p < 0.05$). Esto indica que éstos últimos materiales requieren de mayor fuerza para lograr su ruptura. El comportamiento de las biopelículas que contienen colágeno, en cuanto a la fuerza tensil, es similar al de una biopelícula con plastificante, ya que se ha reportado que a medida que decrece la concentración de plastificante se espera una disminución del porcentaje de elongación y un incremento del esfuerzo a la ruptura (Suyatma y col., 2005). Así las biopelículas 100% quitosano fueron más rígidas y presentaban un valor más alto en esfuerzo, lo cual también ha sido reportado por otros autores (Belalia y col., 2008; Sebti y col., 2007).

El comportamiento anterior se atribuye al elevado peso molecular de los materiales empleados, induciendo que la interacción entre los principales grupos hidrofílicos del quitosano como son los amino primarios, los grupos

hidroxilos y las unidades de glucosamina presentes, con los grupos hidroxilo, carboxilo y aminos del colágeno, no se dieran en forma mayoritaria, lo que provocó valores altos de elongación y bajos de esfuerzo (Wang y col., 2005; Suyatma y col., 2005). Mientras que la ausencia del colágeno indujo a que los grupos hidrofílicos del quitosano como los amino primarios, los grupos hidroxilos y las unidades de glucosamina, se alinearan y compactaran, por lo que exhibió un porcentaje de elongación menor y un mayor esfuerzo (Miranda y col., 2003). Valores similares en cuanto a esfuerzo (51.8 mPa) y elongación (4.7%) en películas elaboradas con quitosano comercial sin plastificantes, fueron reportados para quitosano 85% y 95% deacetilado por (Zivanovic y col., 2007; Belalia y col., 2008).

Los parámetros medidos para determinar las propiedades mecánicas de las biopelículas elaboradas fueron fuerza tensil, el porcentaje de elongación, siendo estas características las más comúnmente evaluadas. La fuerza de tensión o el esfuerzo indica la tensión máxima que puede soportar una película antes de romperse, dando una medida de integridad y durabilidad de las películas para potenciales aplicaciones, mientras que el porcentaje de elongación o la deformación es una medida que presenta las propiedades de estiramiento de los materiales (Miranda y col., 2003; Rayas y col., 2003; Srinivasa y col., 2007).

Velocidad de Transmisión del Vapor de Agua

Los resultados del análisis de la velocidad de transmisión del vapor de agua se muestran en la **Tabla 8**, los cuáles indican que existen diferencias significativas entre las biopelículas. Las biopelículas con mayor concentración de colágeno (80 y 50%) presentaron mayor velocidad que las de baja concentración (20% y 100%) quitosano.

La velocidad de transmisión del vapor de agua es una medida de la permeabilidad de las biopelículas, esta indica la cantidad de vapor de agua que atraviesa una membrana de un espesor determinado, por unidad de área y en un determinado tiempo con una gradiente de presión. Uno de los inconvenientes de los biopolímeros en los que son basados las biopelículas es su sensibilidad al agua dependiendo directamente la capacidad de absorción del polímero (Sebti y col., 2007).

La velocidad detectada en las biopelículas conteniendo 80 y 50% de colágeno es semejante ($170 \text{ gr/m}^2 \text{ día}$) a lo que reportó Belalia y col (2008) para biopelículas de quitosano y las de 20% y 0% de colágeno fueron similares a los detectados en películas elaboradas para gelatina de pescado ($98 \text{ gr/m}^2 \text{ día}$) (Belalia y col., 2008; Liu y col., 2007).

Esto puede atribuirse a que al aumentar la concentración de colágeno se aumentaba la concentración del iminoácido hidroxiprolina (Giménez y col., 2009), produciendo un efecto de relajación en la cadenas del quitosano

Tabla 8. Velocidad de transmisión del vapor de agua de las biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar gigante y quitosano comercial.

Películas	Velocidad del vapor de agua (gr/m² día)
80%colágeno – 20% quitosano	190 ^b
50% colágeno – 50% quitosano	170 ^b
20% colágeno – 80% quitosano	100 ^a
0% colágeno – 100% quitosano	114 ^a

n= 3

Todas las biopelículas presentaron un coeficiente de variación menor o igual al 3.98%

Letras diferentes entre renglones indican diferencia significativa $p < 0.05$.

aumentando los enlaces puentes de hidrógeno e incrementando el espacio intermolecular aumentando la sorción de moléculas polares. Aumentando la percolación de moléculas de agua, permitiendo así su paso a través de la biopelícula, además las moléculas de agua también forman puentes de

hidrógeno con la proteína y también con el quitosano (Miranda y col., 2003; Zivanovic y col., 2007).

Al comparar las biopelículas con materiales plásticos como polipropileno con una velocidad de 6.6 gr/m² día (Wilmer, 1991), el cual es ampliamente utilizado en la industria de películas, no se obtuvieron semejanzas con ninguna concentración de biopelícula, lo cual indica que el material obtenido en el presente estudio puede tener una aplicación distinta a la de un material plástico; sin embargo, los valores reportados para el acetato de celulosa (celofán 155 gr/m² día) (Paine y Paine, 1992) son semejantes a las biopelículas obtenidas entre las concentraciones de 100% y 50% – 50%.

Solubilidad en Agua

La solubilidad de las biopelículas en agua se muestra en la **Tabla 9**, donde se aprecia que a medida que aumenta la concentración del quitosano decrece significativamente la solubilidad de las biopelículas en agua.

La solubilidad al agua es una propiedad química relacionada con la habilidad de disolverse en un solvente, expresa el porcentaje inicial de materia seca determinándolo desde el peso seco residual después de la inmersión

Tabla 9. Solubilidad al agua de las biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de desechos de calamar gigante y quitosano comercial.

Películas	% de solubilidad
80%colágeno – 20% quitosano	44.23 ^a ± 1.9
50% colágeno – 50% quitosano	40.48 ^a ± 2.4
20% colágeno – 80% quitosano	29.92 ^b ± 1.4
0% colágeno – 100% quitosano	0

n=3

Las medias y desviaciones estándar fueron obtenidas de las evaluaciones realizadas a las 4 biopelículas elaboradas

Letras diferentes entre renglones indican diferencia significativa $p < 0.05$.

comparada con el peso seco inicial. Los valores detectados en las biopelículas con alta concentración de colágeno son similares a los reportados para películas de quitosano con óxido de polietileno (46.6%) (Zivanovic y col., 2007), pero menores a los de colágeno de pescado (90%) (Giménez y col., 2009). El mayor porcentaje de solubilidad detectado en las biopelículas con mayor contenido de colágeno se puede atribuir a que al aumentar el contenido de éste, se aumenta la concentración de aminoácidos como la serina, treonina, tirosina, ácido aspártico, asparagina, glutamina, histidina, lisina, lo cuales poseen una mayor afinidad por el agua de acuerdo a lo reportado para la molécula del colágeno (Bolboacea y Jantschi, 2008).

Por otro lado, se tiene que las biopelículas con concentraciones más altas de quitosano presentaron la menor solubilidad (0%-29.92%), confirmando el carácter poco hidrofílico del quitosano. Al disminuir el contenido de colágeno, probablemente se mantuvo el número de enlaces covalentes de la molécula del quitosano y por lo tanto un decremento de la solubilidad de las películas. Algunos autores han reportado que el quitosano presenta un 100% de solubilidad en el agua mediante un proceso de quaternización, provocando una protonación de los grupos amino presentes en la molécula y aumentando así la solubilidad de la molécula (Belalia y col., 2008).

En cuanto a la solubilidad de los materiales que recubren algunos alimentos, como por ejemplo en las frutas, se busca que éstos presenten una solubilidad entre 30-50%, con la finalidad de mantener una humedad relativa

adecuada durante el almacenamiento de las mismas (Viña y Martino, 2007). Basándose en este parámetro, se podría suponer que la adición del colágeno favorece la utilización de las biopelículas de quitosano en el recubrimiento de algunos vegetales.

Calorimetría Diferencial de Barrido

El análisis calorimétrico de las biopelículas elaboradas permitió conocer el comportamiento termodinámico de los materiales, mostrando su interacción para así establecer su estabilidad térmica.

En la **Figura 14** se muestran los termogramas obtenidos para las biopelículas elaboradas de la mezcla de colágeno soluble en ácido extraído del calamar y quitosano comercial. En la (**Figura 14A.**) se observan las transiciones que se presentan en las temperaturas de 60 a 100°C y en la (**Figura 14B.**) se presentan las transiciones vítreas. Se representa al colágeno con la letra (C) y el quitosano con (Q); dependiendo de la concentración de colágeno utilizado en la biopelícula el comportamiento observado fue diferente.

En las biopelículas a base de (100%Q) se detectaron dos picos, el primero detectado en el rango de temperatura de (70-80°C) se atribuye a la evaporación del agua (Neto y col., 2005; Mucha y Pawlak, 2005), el valor de la entalpia obtenido confirma esta manifestación ya que se sabe que la energía requerida para la evaporación del agua es de orden de 1.4 J/g (Burns y Hill., 1996), el segundo pico

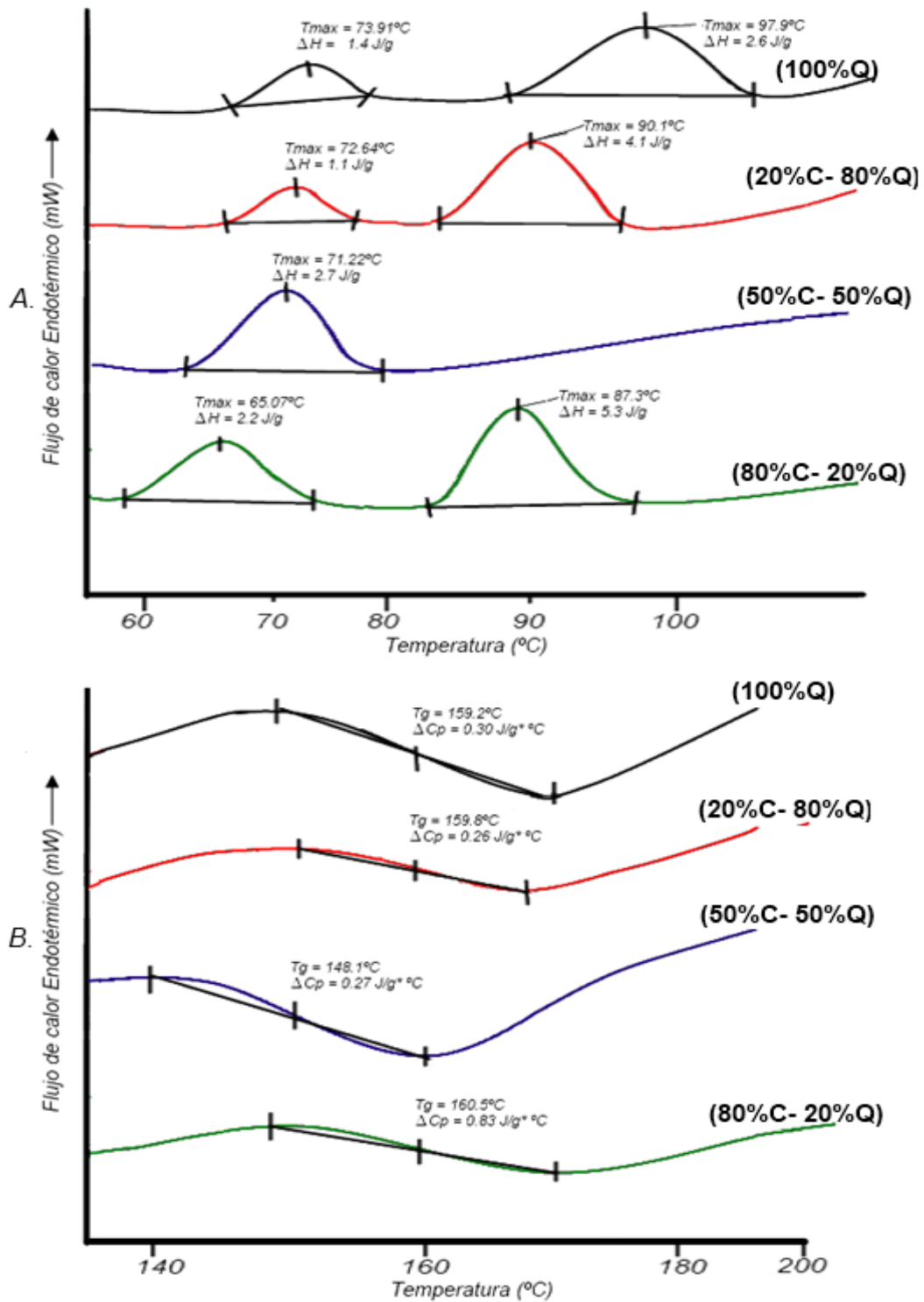


Figura 14. Termograma de biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de los desechos de calamar gigante y quitosano comercial

(95-105°C) se relaciona con la ruptura de los enlaces de puentes de hidrógeno de la molécula de quitosano (Kasaai, 2009; Kittur y col., 2002).

Para esta misma biopelícula (100%Q), en la **Figura 14B** se observa que la transición vítrea se presenta en el rango de (140-170°C). Esta transición vítrea se refiere a la relajación del quitosano, la cual se relaciona a la pérdida de los enlaces glucosídicos (Suyatma y col., 2004; Mucha y Pawlak, 2005; Suyatma y col., 2005).

En las biopelículas a las que se le adicionó colágeno, se observaron dos picos endotérmicos en las mezclas de (80%C – 20%Q) y (20%C – 80%Q). El primer pico (60-80°C) atribuido a la evaporación del agua, el segundo pico (85-95°C) está relacionado con la desnaturalización de la molécula de colágeno, con la transición de la triple hélice del colágeno en una sola espiral de forma aleatoria, lo cual se presenta cerca de los entrecruzamientos. El fenómeno antes mencionado podría explicarse en función de los enlaces que estabilizan la triple hélice, ya que son de varios tipos entre los que se tienen puentes de hidrógeno, hidrofóbicos, fuerzas de Van der Waals e interacciones de cargas opuestas entre residuos de las cadenas laterales (Lima y col., 2006; Rochdi y col., 1999).

Para estas biopelículas (80%C – 20%Q) y (20%C – 80%Q), en la **Figura 14B** se observa que la transición vítrea (T_g) del quitosano se presenta en el rango (140-170°C).

En la biopelícula (50%C–50%Q) solo se observó un pico endotérmico en el rango de (60-80°C), relacionado con la evaporación de la molécula de agua;

se puede interpretar que la interacción del colágeno y el quitosano en esta proporción de la mezcla, no permiten la manifestación endotérmica del colágeno. Como no se dispone de resultados parecidos en otras investigaciones es necesario realizar más estudios para dilucidar este comportamiento.

Para esta biopelícula (50%C–50%Q) en la **Figura 14B** se observa que la transición vítrea (T_g) del quitosano se presenta en el rango (130-180°C), el valor de T_g es menor que las de las otras biopelículas. Este comportamiento está asociado con la proporción de los materiales, al estar en iguales concentraciones hubo formación de enlaces iónicos en la molécula de colágeno, provocando cambios estructurales en la triple hélice de esta molécula, modificando sus propiedades térmicas (Horn y col., 2009), afectando la manifestación de la transición vítrea (T_g) del quitosano, un comportamiento similar fue detectado por Uriarte (2007).

Como se aprecia en la **Tabla 10**, los valores de calor específico de la transición vítrea (ΔC_p) fueron estadísticamente mayores ($p < 0.05$) en la biopelícula elaborada con la mayor concentración de colágeno (80%C–20%Q).

Al requerirse mayor energía para que se lleve a cabo la relajación del quitosano, indica que solamente esta concentración de colágeno tuvo la capacidad de disminuir la ruptura de los enlaces puentes de hidrógeno (Kasaai, 2009; Kittur y col., 2002) y la pérdida de los enlaces glucosídicos, relacionados

Tabla 10. Temperatura y calor específico de la transición vítrea de las biopelículas obtenidas de colágeno soluble en ácido extraído de calamar gigante y quitosano comercial

Películas	Tg °C	ΔC_p (Kj.mol ⁻¹)
80%colágeno – 20% quitosano	160.5 ^a ± 0.8	0.83 ^b ± 0.1
50% colágeno – 50% quitosano	148.1 ^b ± 1.1	0.27 ^a ± 0.1
20% colágeno – 80% quitosano	159.8 ^a ± 0.8	0.26 ^a ± 0.1
0% colágeno – 100% quitosano	159.2 ^a ± 0.9	0.30 ^a ± 0.03

n= 3 veces

Las medias y desviaciones estándar fueron obtenidas de las evaluaciones realizadas a las 4 biopelículas elaboradas

Letras diferentes entre renglones indican diferencia significativa $p < 0.05$

con la transición vítrea del quitosano (Mucha y Pawlak, 2005; Suyatma y col., 2005). En este estudio, la corrida calorimetría se realizó en el rango de 30 a 200°C lo cual permitió observar solamente la manifestación de la transición vítrea del quitosano y no todo el comportamiento térmico de este material. Por

ello se recomienda para estudios posteriores trabajar a temperaturas superiores a los 250°C.

Microscopía Electrónica de Barrido

El Microscopio electrónico de barrido (o SEM, de *Scanning Electron Microscopy*), usa electrones para formar una imagen. Tiene una gran profundidad de área, la cual permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra. También produce imágenes de alta resolución, significa que características espacialmente cercanas en la muestra pueden ser examinadas a una alta magnificación. Los resultados para las distintas concentraciones de películas se pueden observar en la **Figura 15**.

En la imagen del SEM para la concentración de 80-20 colágeno:quitosano muestra claramente una dispersión homogénea de las fibras de colágeno, y a medida que la concentración de quitosano va aumentando se tiene un cambio de esta homogeneidad, mostrando el cambio del aspecto fibroso del colágeno a uno más liso (Wang y col., 2005); estos espacios son producto del reacomodo de la fibras de colágeno (Shaoping y col., 2005) , estos espacios se van perdiendo conforme se van ordenando las

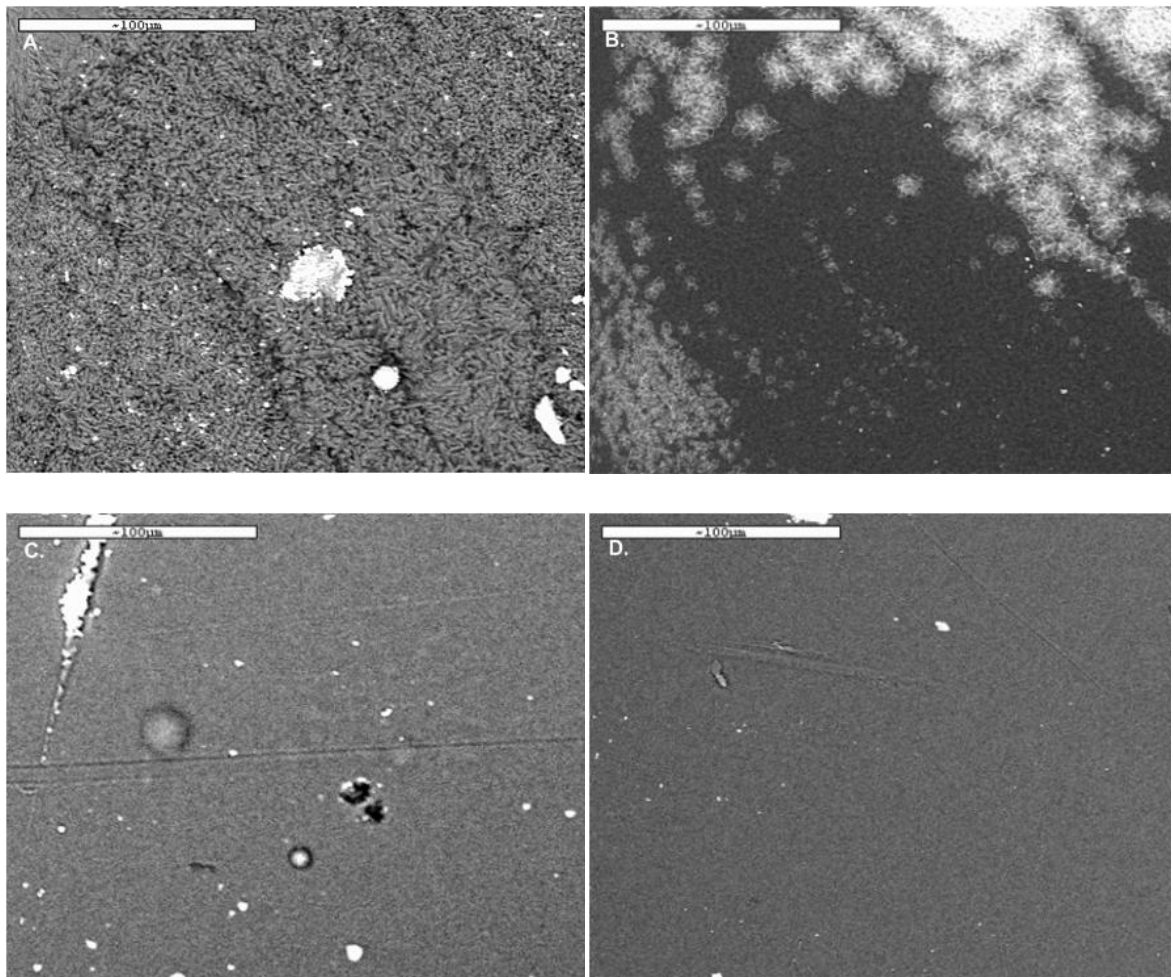


Figura 15. Imágenes de microscopía electrónica de barrido para las distintas concentraciones de biopelículas colágeno:quitosano. Donde: A= concentración 80-20. B=concentración 50-50. C=concentración 20-80. D=concentración 0-100.

moléculas de quitosano. Los puntos de color blanco son polvo o suciedad que se encuentran en el ambiente. El acomodo de las fibras de colágeno en las películas con mayor contenido de este material, son el agente causal de la opacidad detectada en las biopelícula. Se ha reportado que la inclusión de proteínas en la elaboración de películas produce películas ásperas, densas y con poca brillantez (Liu y col., 2007). A medida que la concentración de quitosano aumenta, se disminuye el ordenamiento de las fibras de colágeno, mostrando una superficie más lisa con menor opacidad y más brillante, debido a la reducción del ordenamiento natural de las fibras de colágeno (Horn y col., 2009), por lo tanto las biopelículas con menor contenido de colágeno, fueron las que menor velocidad de transmisión al vapor de agua presentaron.

Finalmente se observa que las biopelículas elaboradas solo de quitosano presentan una mayor uniformidad en su acomodo, presentando una superficie lisa, gran brillantez y también mayor rigidez, observaciones similares han sido reportadas para películas de quitosano por otros autores (Nordqvist y col., 2007; Wang y col., 2005).

CONCLUSIONES

El colágeno soluble en ácido proveniente de los tentáculos y cabeza del calamar gigante, logró extraerse con 0.5 M de ácido acético con un rendimiento del 9 %. El colágeno soluble en ácido obtenido mostró una temperatura de transición menor a la reportada previamente, debido a la baja concentración de hidroxiprolina y prolina.

El colágeno soluble en ácido obtenido de la cabeza y tentáculos del calamar gigante actúa como plastificante en las biopelículas obtenidas de compositos de quitosano.

Las películas elaboradas con una mayor concentración de colágeno, presentaron mayor opacidad, mayor capacidad de elongación, velocidad de transmisión de vapor de agua y solubilidad. En la biopelícula con 80% de colágeno presento mayor energía potencial indicando una modificación en la temperatura de transición vítrea (Tg) del quitosano.

En función de las propiedades detectadas en cada una de las películas elaboradas, las cuáles se resumen en la **tabla 11**, la posible aplicación podría ser en el campo de la medicina, en el caso de las películas obtenidas de las mezclas 80% colágeno:20% quitosano y 50% colágeno:50% quitosano, por su baja propiedad de esfuerzo y alta solubilidad. Las biopelículas obtenidas a partir de la mezcla 20% colágeno:80% quitosano y 100% quitosano, se podrían

aplicar como recubrimiento de frutas y productos hortícolas, tales como el aguacate, ya que presentan una permeabilidad al vapor de agua que podría favorecer la humedad relativa que requieren este tipo de productos durante su almacenamiento, además de presentar propiedades térmicas, esfuerzo y elongación, adecuadas para recubrir un fruto. Sin embargo aún faltaría realizar más análisis, como estabilidad de la película, permeabilidad a diferentes temperaturas, capacidad antimicrobiana, entre otras.

Tabla 11. Películas y cubiertas de colágeno y quitosano, principales propiedades evaluadas y aplicaciones.

Material	Velocidad de transmisión g/m ² día	Solubilidad en agua %	Tmax (°C)	Esfuerzo (mPa)	Elongación %	Aplicación
Quitosano + cera de abeja (Miranda y col., 2003)	167.04	NR	NR	49.2	9.3	Recubrimiento de aguacate
Quitosano + glicerol (Miranda y col., 2004)	6.48	NR	NR	50.9	9.1	Recubrimiento de aguacate
Lignina + etileno (Bono y Lambert, 1994)	NR	NR	NR	25.5	5.8	Elaboración de bolsas
Colágeno + quitosano (Wang y col., 2008a)	NR	NR	115	0.65	3.2	Matriz artificial formación de huesos
Quitosano + celulosa (Garcia y col., 2004)	73.2	NR	NR	12	7.24	Elaboración de películas
Colágeno + PLGA (Jeong y col., 2007)	NR	NR	NR	0.49	17	Formación de tejidos
Almidón (Flores y col., 2007)	544	22- 31	NR	2.35	29	Recubrimiento de frutas
Almidón + quitosano (Xu y col., 2005)	47.83	NR	NR	33 - 40	33 - 61	Recubrimiento de frutas
Almidón oxidado (plátano) (Zamudio-Flores y col., 2007)	NR	30-50	131- 151	NR	NR	Recubrimiento de frutas
80% Colágeno + 20% quitosano	190	44	170	1.5	29.1	Formación de huesos
50% Colágeno + 50% quitosano	170	40	157	4.1	39.8	Formación de huesos
20% Colágeno + 80% quitosano	100	29	169	35.5	12.3	Recubrimiento de frutas
0% Colágeno + 100% quitosano	114	NS	170	50.1	5.2	Recubrimiento de frutas

NR = no reportado

RECOMENDACIONES

Ya que en este estudio se trabajó con quitosano de medio peso molecular y con colágeno extraído de la cabeza y tentáculos, se recomienda realizar estudios sobre el comportamiento de las biopelículas elaboradas con quitosano de distinto peso molecular así como también con colágeno extraído de una sola región anatómica.

Es necesario continuar con la investigación de las características de las películas para obtener un proceso mejorado de diseño y apariencia.

Se sugiere realizar técnicas de análisis más detalladas que complementen este estudio, como son la permeabilidad al oxígeno, espectrofotometría de infrarrojo, resonancia magnética nuclear, con la finalidad de obtener información sobre las propiedades y el comportamiento de estos dos materiales en una mezcla.

Llevar a cabo evaluaciones de estabilidad de las mezclas evaluadas, a diferentes temperaturas y porcentajes de humedad, y así determinar si las películas pueden ser adecuadas para recubrir alimentos como los hortofrutícolas.

Así también se recomienda evaluar algunas propiedades funcionales de las biopelículas como su posible actividad antioxidante, y/o fungistática.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abugoch, L., A. Guarda, L. M. Perez, y M. P. Paredes. 1999. Determination of proximal chemical composition of squid (*Dosidicus gigas*) and development of a gel product. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion* 49 (2):156-161.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, y K.;Walter, P. 1990. *Molecular biology of the Cell*. Edited by G. Pubs. Vol. 1219 pp. New York, USA.
- Amin, S., y Z. Ustunol. 2007. Solubility and mechanical properties of heat-cured whey protein-based edible films compared with that of collagen and natural casings. *International Journal of Dairy Technology* 60 (2):149-153.
- Ando, M. 1996. Textural change of frozen-thawed several squid mantles by heating. *Memoirs of Narabunka Womens' Junior College* 27:121-127.
- Ando, M., M. Ando, M. Makino, Y. Tsukamasa, Y. Makinodan, y M. Miyosh. 2001. Interdependence between heat solubility and pyridinoline contents of squid mantle collagen. *Journal of Food Science* 66 (2):265-269.
- Ando, M., Y. Nakagishi, K. Yoshida, M. Nakao, T. Nakagawa, Y. Makinodan, Y. Tsukamasa, y K. I. Kawasaki. 2006. Pyridinoline concentrations in muscular and skin collagen of fish and relationship between collagen solubility and pyridinoline concentration in fish muscular collagen. *Fisheries Science* 72 (5):1104-1108.
- Ando, M. O. 1997. Correspondence of collagen on the heatinduced softening of frozen-thawed cuttlefish *Sepia officinalis* mantle. *J. Home Econ. Jap* 48:315-321.
- Aristippos, G. 2002. *Protein based films and coatings* Edited by C. P. LLC. United States of America.
- Baldwin, E. A., M. O. Nisperos, R. D. Hagenmaier, y R. A. Baker. 1997. Use of Lipids in Coatings for Food Products. *Food Technology*, 51(6):56-62, 64. 51 (6):8.
- Begin, A., y M. R. Van Calsteren. 1999. Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 26 (1):63-67.
- Belalia, R., S. Grelier, M. Benaissa, y V. Coma. 2008. New bioactive biomaterials based on quaternized chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (5):1582-1588.
- Belitz, H. D. G., W. . 1999. *Food Chemistry*. 2nd ed. Berlin, Germany Springer-Verlag.
- Bjarnason, A. B. 1989. Squid Fishing. *INFOFISH Intl.* 2(89)::38-40.
- Bolboacaa, S. D., y L. Jantschi. 2008. A structural informatics study on collagen. *Chemical Biology & Drug Design* 71 (2):173-179.
- Bono, P., y C. Lambert. 1994. Degradable plastics film including as active vegetable filler. In www.freepatentsonline.com. France, 5.
- Borgstrom, G. 1962. *Shellfish Protein - Nutritive Aspects In Fish as Foo*. Edited by G. Borgstrom. New York; Academic Press.
- Bower, C. K., R. J. Avena-Bustillos, C. W. Olsen, T. H. McHugh, y P. J. Bechtel. 2006. Characterization of fish-skin gelatin gels and films containing the antimicrobial enzyme lysozyme. *Journal of Food Science* 71 (5):M141-M145.
- Branden, C. y. T., J. . 1999. *Introduction to protein structure*. Edited by G. Publishing. 2nd ed. New -York . USA, .
- Brinckmann, J. 2005. Collagens at a glance. *Collagen* 247:1-6.
- Brown, M. E. 1998. *Handbook of thermal analysis and calorimetry*. Edited by P. K. Gallagher. Vol. 1 PRINCIPLES AND PRACTICE: ELSEVIER.
- Brusca, C. R. y. B., G. . 1990. *Invertebrates*. Edited by F. e. S. Associates. Massachusetts. U.S.A.: Publishers Sunderland,.

- Burjanadze, T. V. 1982. Stabilization of Collagen Structure - Dependence of Collagen Denaturation Enthalpy on the Imino Acid Content. *Biopolymers* 21 (8):1587-1595.
- Burns, R. A., y J. W. Hill. 1996. Enlaces químicos In *Fundamentos de química*. México
- Butler, B. L., P. J. Vergano, R. F. Testin, J. M. Bunn, y J. L. Wiles. 1996. Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science* 61 (5):953-&.
- Callegarin, F., J.-A. Quezada Gallo, F. Debeaufort, y A. Voilley. 1997. Lipids and Biopackaging. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74:9.
- Cota, O. A. 2007. Obtención y Estudio de Quitosano y Biopelículas Funcionales de Compositos de Quitosano, Universidad de Sonora, Hermosillo
- Chahine, C. 2000. Changes in hydrothermal stability of leather and parchment with deterioration: a DSC study. *Thermochimica Acta* 365 (1-2):101-110.
- Chajra, H., C. F. Rousseau, D. Cortial, M. C. Ronziere, D. Herbage, F. Mallein-Gerin, y A. M. Freyria. 2008. Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. *Bio-Medical Materials and Engineering* 18:S33-S45.
- Chen, J. S., Q. H. Li, J. T. Xu, Y. X. Huang, Y. Ding, H. W. Deng, S. B. Zhao, y R. Chen. 2005. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *artificial organs* 29 (2):104-113.
- Chiou, B.-S. A.-B., Roberto J.; Olsen, Carl W.; Olson, Don A.; Narayan, Rajnesh; Bechtel, Peter J.; Imam, Syed H.; Glenn, Gregory M.; Orts, William J., y McHugh, Tara H. . 2006. Barrier and mechanical properties of fish gelatin films. *Bioproduct Chemistry and Engineering* 232nd 10-14.
- Daniels, R. 1973. *Edible Coatings and Soluble Packaging*. Park Ridge, NJ: Noyes Data Corp.
- De la Rosa, M., Silva, J. T., García-Tirado, V. M. y García-Peña, S. 1994. El Calamar: una Pesquería en Desarrollo. *Atlas Pesquero de México Pesquerías Relevantes*.
- Enhardt, N. M. 1991. Potential Impact of a Seasonal Migratory Jumbo Squid (*Dosidicus gigas*) Stock on a Gulf of California Sardine (*Sardinops Sagax caerulea*) Population. *Marine Science* 49:325-332.
- Enhardt, N. M., S. J. Pierre, D. G. González, y R. Ulloa. 1982. Descripción de la Pesquería de Calamar Gigante durante 1980 en el Golfo de California, Flota y Poder de Pesca. *Ciencia Pesquera* 3::41-60.
- Espe, M., T. Hagenes, y K. E. Gulbrandsen. 2003. Age of farmed Atlantic salmon at seawater transfer affects muscle collagen content and solubility at harvest. *Journal of Food Science* 68 (5):1814-1817.
- Fakirov, S., Z. Sarac, T. Anbar, B. Boz, I. Bahar, M. Evstatiev, A. A. Apostolov, J. E. Mark, y A. Kloczkowski. 1997. Mechanical properties and transition temperatures of crosslinked-oriented gelatin .2. Effect of orientation and water content on transition temperatures. *Colloid and Polymer Science* 275 (4):307-314.
- Feinstein, G. R., y E. M. Buck. 1984. Relationship of Texture to Ph and Collagen Content of Yellowtail Flounder and Cusk. *Journal of Food Science* 49 (1):298-299.
- Felse, P. A., y T. Panda. 1999. Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering* 20 (6):505-512.
- Fennema, O. 2002. *Química de los Alimentos*. 2da ed. España: Acibia

- Figueiro, S. D., M. C. Goes, R. A. Moreira, y A. S. B. Sombra. 2004. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan-collagen films. *Carbohydrate Polymers* 56 (3):313-320.
- Flores, S., L. Fama, A. M. Rojas, S. Goyanes, y L. Gerschenson. 2007. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International* 40 (2):257-265.
- Fratzl, P. 2008. *collagen structure and mechanics*. New York: Springer Science+Business Media, LLC.
- Freier, T., H. S. Koh, K. Kazazian, y M. S. Shoichet. 2005. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials* 26 (29):5872-5878.
- Friess, W. 1998. Collagen - biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45 (2):113-136.
- Fullerton, G. D., E. Nes, M. Amurao, A. Rahal, L. Krasnosselskaia, y I. Cameron. 2006. An NMR method to characterize multiple water compartments on mammalian collagen. *Cell Biology International* 30 (1):66-73.
- Garcia, M. A., A. Pinotti, M. N. Martino, y N. E. Zaritzky. 2004. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers* 56 (3):339-345.
- Gilbert, S., y D. Pegaz. 1969. Find New Way to Measure Gas Permeability. *Packaging Eng*:66-69.
- Giménez, B., J. Gomez-Estaca, A. Aleman, M. C. Gomez-Guillen, y M. P. Montero. 2009. Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids* 23 (3):585-592.
- Glover, T., y K. Michell. 2008. *An introduction to Biostatistics*. 2nd ed. Illinois: Waveland Press Inc.
- Gontard, N., S. Guilbert, y J. L. Cuq. 1992. Edible Wheat Gluten Films - Influence of the Main Process Variables on Film Properties Using Response-Surface Methodology. *Journal of Food Science* 57 (1):190-&.
- González-Aguilar, G. A., I. Monroy-García, F. Goycolea-Valencia, M. Díaz-Cinco, y J. F. Ayala-Zavala. 2005. Cubiertas comestibles de quitosano. Una alternativa para prevenir el deterioro microbiano y conservar la calidad de papaya fresca cortada. *Nuevas Tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Memoria de congreso*:121-133
- González-González, V., C. Guerrero Salazar, y U. Ortiz Méndez. 2002. Estructura química y compatibilidad de poliamidas con quitina y quitosano. *Ciencia UANL* V, número 001:39-47.
- Graciano-Verdugo, A., Peralta, E., Soto-Valdez, H. 2006. Permeabilidad y vida útil de los alimentos. *AlimenPack*:1 - 5.
- Guo, L., R. H. Colby, C. P. Lusignan, y A. M. Howe. 2003. Physical gelation of gelatin studied with rheo-optics. *Macromolecules* 36 (26):10009-10020.
- Haard, N. 1995. Composition and Nutritive Value of Fish Proteins and Others Nitrogen Compounds In *Fish and Fishery Products Composition ,Nutritive Properties and Stability* . edited by A. Ruiter: CAB International.
- Haard, N. F. 1992. Control of Chemical-Composition and Food Quality Attributes of Cultured Fish. *Food Research International* 25 (4):289-307.
- Han, J. H. 2005. *Innovations in Food Packaging* San Diego, California
- Hernandez-Izquierdo, V. M., y J. M. Krochta. 2008. Thermoplastic processing of proteins for film formation - A review. *Journal of Food Science* 73 (2):R30-R39.

- Hernandez, E. 1994. Edible Coatings from Lipids and Resins. In *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, edited by J.M. Krochta, E.A. Baldwin y M. Nisperos-Carriedo. Lancaster, PA. USA: Technomic Publishing Co., Inc., 279-303.
- Hirano, S., K. Yamamoto, y H. Inui. 1997. Calcium chloride as a biomimetic intermediate for the mineralization of carbonate ions of water as calcium carbonate in gelatinous matrices of chitosan and chitin. *Energy Conversion and Management* 38:S517-S521.
- Hochberg, F. G., y F. Gordon. 1980. Cephalopoda: The Squids and Octopuses. In *"Intertidal Invertebrates of California"*. Stanford California: Stanford University press.
- Hoppe-Seyler. 1894. Ueber Chitosan und Zellulose. *Ber. Deut. Chem. Gesell.* 27 (1894):3329-3331.
- Horgan, D. J., N. L. King, L. B. Kurth, y R. Kuypers. 1990. Collagen Cross-Links and Their Relationship to the Thermal-Properties of Calf Tendons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 281 (1):21-26.
- Horn, M. M., V. C. A. Martins, y A. M. D. Plepis. 2009. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydrate Polymers* 77 (2):239-243.
- IIM-CSIC, I. d. I. M. d. V.-C. S. d. I. C. 2009. Fisiología, Nutrición y Cultivo de Moluscos. España, <http://nautilus.iim.csic.es/FaroDeVigo/MaryPesca/>.
- Jenkins, W., Harrington J. 1991. *Packaging food with plastics*. Edited by Technomic. Estados Unidos de América.
- Jeong, S. I., S. Y. Kim, S. K. Cho, M. S. Chong, K. S. Kim, H. Kim, S. B. Lee, y Y. M. Lee. 2007. Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors. *Biomaterials* 28 (6):1115-1122.
- Kasaai, M. R. 2009. Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (5):1667-1676.
- Ke, G. Z., W. L. Xu, W. Liu, y W. D. Yu. 2007. Structure and properties of chitosan and sodium alginate complex membrane. *Proceedings of the 2007 International Conference on Advanced Fibers and Polymer Materials Vols 1 and 2*:746-749-1025.
- Kester, J. J., y O. R. Fennema. 1986. Edible Films and Coatings: A Review. *Food Technology* 40 (12):47-59.
- Khew, S. T., y Y. W. Tong. 2008. Template-assembled triple-helical peptide molecules: Mimicry of collagen by molecular architecture and integrin-specific cell adhesion. *Biochemistry* 47 (2):585-596.
- Kim, J. S., y J. W. Park. 2004. Characterization of acid-soluble collagen from Pacific whiting surimi processing byproducts. *Journal of Food Science* 69 (8):C637-C642.
- Kittur, F. S., K. V. H. Prashanth, K. U. Sankar, y R. N. Tharanathan. 2002. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers* 49 (2):185-193.
- Klett-Traulsen, A., y G. Casas-Valdez. 1996. Estudio del Potencial Pesquero y Acuicola de Baja California Sur. *Pesquería del Calamar Gigante*, 128-165.
- Kolodziejska, I., Z. E. Sikorski, y C. Niecikowska. 1999. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skins. *Food Chemistry* 66 (2):153-157.
- Kreuzer, R. 1986. Squid Seafood Extraordinaire in "Infotish marketing digest". No. 6.

- Krochta, J. M. 1992. *Control of Mass Transfer in Foods with Edible Coatings and Films in Advances in Food Engineering*. Edited by R. P. S. a. M. A. Wirakartakusumah. Boca Raton, FL.
- Krochta, J. M., y C. De Mulder-Johnston. 1996. Biodegradable Polymers from Agricultural Products in Agricultural Materials as Renewable Resources. *American Chemical Society*:120-140.
- Krochta, M. 2002. *Proteins as Raw Materials for Films and Coatings: Definitions, Current Status, and Opportunities*. Edited by P. D. Aristippos Gennadios. Boca Raton London New York Washington, D.C.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, y M. M. Cox. 1995. *Principios de Bioquímica*. 2da ed. Barcelona, España: Omega
- Lima, C. G. A., R. S. de Oliveira, S. D. Figueiro, C. F. Wehmann, J. C. Goes, y A. S. B. Sombra. 2006. DC conductivity and dielectric permittivity of collagen-chitosan films. *Materials Chemistry and Physics* 99 (2-3):284-288.
- Lindorth, P., y M. K. 1979. *High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde*. Vol. 51.
- Linsenmayer, T. F., E. Gibney, J. M. Fitch, J. Gross, y R. Mayne. 1984. Thermal-Stability of the Helical Structure of Type-Iv Collagen within Basement-Membranes Insitu - Determination with a Conformation-Dependent Monoclonal-Antibody. *Journal of Cell Biology* 99 (4):1405-1409.
- Liu, L., C. K. Liu, M. L. Fishman, y K. B. Hicks. 2007. Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (6):2349-2355.
- Maglic, K. D., A. Cezairliyau, y V. E. Peletsky. 1984. Compendium of Thermophysical Property Measurement Methods. 1.
- Markaida-Aburto, U. 2001. Biología del Calamar Gigante Cephalopoda: ommastrephidae en el Golfo de California., 385.
- Markaida, U., y O. Sosa-Nishizaki. 2001. Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995-1997. *Fisheries Research* 54 (1):63-82.
- Marsh, K., B. Bugusu, y T. Tarver. 2007. Food packaging and its environmental impact. *Food Technology* 61 (4):46-50.
- Martinez, A. P. C. 2009. Propiedades Estructurales y Fungistáticas de Biopelículas de Quitosano Obtenido de Ensilados de Desechos de Camarón Universidad de Sonora
- Maza-Ramírez, S. 2001. Tecnología de Procesamiento de Pota “*Dosidicus gigas*”.
- Medina-Maureira, L. 2005. Estudio de la Acción de Quitosano como Absorvedor de Proteínas Hidrosolubles: Optimización de Parámetros, Facultad de Ciencias Universidad Católica de Temuco, Concepción, Chile
- Miranda, S. P., G. Cárdenas, D. López, y V. Lara-Sagahon. 2003. Comportamiento de películas de quitosano compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate *Journal of the Mexican Chemical Society* 47.
- Miranda, S. P., O. Garnica, V. Lara-Sagahon, y G. Cardenas. 2004. Water vapor permeability and mechanical properties of chitosan composite films. *Journal of the Chilean Chemical Society* 49 (2):173-178.

- Morales, J., P. Montero, y A. Moral. 2000. Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (6):2142-2148.
- Mucha, M., y A. Pawlak. 2005. Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta* 427 (1-2):69-76.
- Nesis, K. N. 1983. *Dosidicus Gigas*. Cephalopod Life Cycles, 215-231.
- Neto, C. G. T., J. A. Giacometti, A. E. Job, F. C. Ferreira, J. L. C. Fonseca, y M. R. Pereira. 2005. Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers* 62 (2):97-103.
- Nevarez-Martinez, M. O., A. Hernandez-Herrera, E. Morales-Bojorquez, A. Balmori-Ramirez, M. A. Cisneros-Mata, y R. Morales-Azpeitia. 2000. Biomass and distribution of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*; d'Orbigny, 1835) in the Gulf of California, Mexico. *Fisheries Research* 49 (2):129-140.
- Nevarez-Martinez, M. O., F. J. Mendez-Tenorio, C. Cervantes-Valle, J. Lopez-Martinez, y M. L. Anguiano-Carrasco. 2006. Growth, mortality, recruitment, and yield of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) off Guaymas, Mexico. *Fisheries Research* 79 (1-2):38-47.
- Nevarez-Martínez, N. y. M.-B., E. 1999. El Escape Proporcional y el Uso del Punto de Referencia Biológico para la Explotación del Calamar gigante, *Dosidicus gigas*, del Golfo de California, México. *Oceanides* 12 ((2):):97-104.
- Nomura, Y., S. Toki, Y. Ishii, y K. Shirai. 2000. The physicochemical property of shark type I collagen gel and membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (6):2028-2032.
- Nordqvist, D., J. Idermark, y M. S. Hedenqvist. 2007. Enhancement of the wet properties of transparent chitosan-acetic-acid-salt films using microfibrillated cellulose. *Biomacromolecules* 8 (8):2398-2403.
- Paine, F. A., y H. Y. Paine. 1992. Handbook of food packaging, edited by B. a. professional, 69.
- Parada, L. G., G. D. Crespín, R. Miranda, y I. Katime. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Marzo 2004
- Paredi, M. E., N. A. D. deMattio, y M. Crupkin. 1996. Biochemical properties of actomyosin and expressible moisture of frozen stored striated adductor muscles of *Aulacomya ater ater* (Molina): Effects of polyphosphates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (10):3108-3112.
- Plascencia-Jatomea, M. 2004. Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.
- Ramírez, R. 2001. Polietileno. *Centro de Investigación de Química Aplicada*, 60 - 80.
- Rayas, J. A., R. Rodriguez-Vera, y A. Martínez. 2003. Medicion de modulo de Young en el hule latex usando ESPI. *Revista Mexicana de Física*, Diciembre.
- Rinaudo, M., M. Milas, y P. Ledung. 1993. Characterization of Chitosan - Influence of Ionic-Strength and Degree of Acetylation on Chain Expansion. *International Journal of Biological Macromolecules* 15 (5):281-285.
- Robertson, G. L. 2006. *Food Packaging Principles and Practice*. Edited by s. edition. Boca Raton, FL CRC.
- Rochdi, A., L. Foucat, y J. P. Renou. 1999. Effect of thermal denaturation on water-collagen interactions: NMR relaxation and differential scanning calorimetry analysis. *Biopolymers* 50 (7):690-696.

- Rouget. 1859. Des substances amylacées dans le tissu des animeaux, spécialement les articulés (chitine). *Comp. Rend* 48 (1859):792-795.
- SAGARPA. 2007. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2007, edited by S. d. Pesca. México.
- Salinas, Z., Sanchez, H., Aragon, N., Sanchez, V. C., Soria, M., Escoto, G., Moctezuma, C., Camarillo, C., Mejía, R., Bazzino, F. 2005. Programa maestro de la pesquería de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Programa Maestro de Comité Sistema Producto de la Pesquería de Calamar Gigante en el Estado de Sonora*.
- Sato, K., R. Yoshinaka, Y. Itoh, y M. Sato. 1989. Molecular-Species of Collagen in the Intramuscular Connective-Tissue of Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 92 (1):87-91.
- Sato, K., R. Yoshinaka, M. Sato, y S. Ikeda. 1986. A Simplified Method for Determining Collagen in Fish Muscle. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52 (5):889-893.
- Sebti, I., E. Chollet, P. Degraeve, C. Noel, y E. Peyrol. 2007. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (3):693-699.
- Shaoping, Z., T. Wee Eong, Z. Xiao, R. Beuerman, y S. a. L. Y. L. Y. Ramakrishna. 2005. Formation of Collagen–Glycosaminoglycan Blended Nanofibrous Scaffolds and Their Biological Properties. *Biomacromolecules* 6 (6):2998-3004.
- Shellhammer, T. H., y J. M. Krochta. 1997. Edible Coating and Film Barriers. In *Lipids—Industrial Applications and Technology*, edited by F. D. Gunstone y F. B. Padley. New York: Marcel Dekker, 453-479.
- Shunji, Y., S. Takeshi, M. Kazuo, N. Nagai, y M. Munekata. 2007. Novel elastic material from collagen for tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 18 (7):1369-1375.
- Sikorski, Z. 2001. Chemical and Functional Properties of Food Proteins. *Technomic Publishing*, 490 pp.
- Sikorski, Z. E. 1990. *Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation*. Florida, USA.
- Sikorski, Z. E., D. N. Scott, y D. H. Buisson. 1984. The Role of Collagen in the Quality and Processing of Fish. *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 20 (4):301-343.
- Sikorski, Z. E. y K., I. 1986. The Composition and Properties of Squid Meat. *Food Chemistry* 20: :213-224.
- Simelane, S., y Z. Ustunol. 2005. Mechanical properties of heat-cured whey protein-based edible films compared-with collagen casings under sausage manufacturing conditions. *Journal of Food Science* 70 (2):E131-E134.
- Sionkowska, A. 2006. Effects of solar radiation on collagen and chitosan films *Journal of photochemistry and photobiology. B: Biology* 82, no1: 9-15
- Sionkowska, A., M. Wisniewski, J. Skopinska, C. J. Kennedy, y T. J. Wess. 2004a. The photochemical stability of collagen-chitosan blends. *Photochemistry and Photobiology* 162(2-3):545-554.
- Sionkowska, A., M. Wisniewskia, J. Skopinska, C. J. Kennedy, y T. J. Wess. 2004b. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomaterials*.
- Sivakumar, P., y G. Chandrakasan. 1998. Occurrence of a novel collagen with three distinct chains in the cranial cartilage of the squid *Sepia officinalis*: comparison with shark cartilage collagen. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1381 (2):161-169.

- Song, E., S. Y. Kim, T. Chun, H. J. Byun, y Y. M. Lee. 2006. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials* 27 (15):2951-2961.
- Srinivasa, P. C., R. Ravi, y R. N. Tharanathan. 2007. Effect of storage conditions on the tensile properties of eco-friendly chitosan films by response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 80 (1):184-189.
- Suyatma, N. E., A. Copinet, L. Tighzert, y V. Coma. 2004. Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. *Journal of Polymers and the Environment* 12 (1):1-6.
- Suyatma, N. E., L. Tighzert, y A. Copinet. 2005. Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (10):3950-3957.
- Synowiecki, J., y F. Shahidi. 1991. Lipid and Pigment Extraction from Mechanically Separated Seal Meat. *Journal of Food Science* 56 (5):1295-1297.
- Torres-Arreola, W., R. Pacheco-Aguilar, R. R. Sotelo-Mundo, O. Rouzaud-Sandez, y J. M. Ezquerra-Brauer. 2008. Partial Characterization of Collagen from Mantle, Fin, and Arms of Jumbo Squid (*Dosidicus Gigas*). *Ciencia Y Tecnologia Alimentaria* 6 (2):101-108.
- Ureña, P., y V. Marie-Christine. 1999. Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney International* 55, (2141-2156);).
- Uriarte, M. M. H. 2007. Aislamiento Parcial y Caracterización del colágeno del Manto de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*) y su Potencial Aplicación como Plastificante en la Elaboración de Biopelículas con Quitosano, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.
- Valencia-Perez, A., M. H. Garcia-Morales, J. L. Cardenas-Lopez, J. R. Herrera-Urbina, O. Rouzaud-Sandez, y J. M. Ezquerra-Brauer. 2008. Effect of thermal process on connective tissue from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle. *Food Chemistry* 107 (4):1371-1378.
- Vázquez-Ortiz, F. A., G. Caire, I. Higuera-Ciapara, y G. Hernandez. 1995. High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Free Amino-Acids in Shrimp. *Journal of Liquid Chromatography* 18 (10):2059-2068.
- Vázquez-Ortiz, F. A., O. E. Moron-Fuenmayor, y N. F. Gonzalez-Mendez. 2004. Hydroxyproline measurement by HPLC: Improved method of total collagen determination in meat samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 27 (17):2771-2780.
- Velásquez, C. L. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 91.
- Viña, S. Z., A. Mugridge, M. A. García, R. M. Ferreyra, M. N., y A. R. C. Martino, N. E. Zaritzky. 2007. Effects of polyvinylchloride films and edible starch coatings on quality aspects of refrigerated Brussels sprouts. *Food Chemistry* 103:701-709.
- Wang, L. Z., B. Yang, X. Q. Du, Y. F. Yang, y J. L. Liu. 2008a. Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9 (4):604-607.
- Wang, S. F., L. Shen, W. D. Zhang, y Y. J. Tong. 2005. Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites. *Biomacromolecules* 6 (6):3067-3072.
- Wang, Y., L. H. Zhang, M. Hu, H. C. Liu, W. S. Wen, H. X. Xiao, y Y. Niu. 2008b. Synthesis and characterization of collagen-chitosan-hydroxyapatite artificial bone matrix. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 86A (1):244-252.

- Wilmer, A., y Harrington, J. . 1991. Packaging food with plastics, edited by J. o. p. f. a. sheeting. Lancaster, Pensilvania, 20 - 30.
- Wolf, K. L., P. J. A. Sobral, y V. R. N. Telis. 2009. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. *Food Hydrocolloids* 23 (7):1886-1894.
- Xu, Y. X., K. M. Kim, M. A. Hanna, y D. Nag. 2005. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products* 21 (2):185-192.
- Yang, H., B. Yuan, Y. B. Lu, y R. S. Cheng. 2009. Preparation of magnetic chitosan microspheres and its applications in wastewater treatment. *Science in China Series B-Chemistry* 52 (3):249-256.
- Yoshimura, K., M. Terashima, D. Hozan, y K. Shirai. 2000. Preparation and dynamic viscoelasticity characterization of alkali-solubilized collagen from shark skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (3):685-690.
- Zamudio-Flores, P. B., L. A. Bello-Perez, A. Vargas-Torres, J. P. Hernandez-Uribe, y C. A. Romero-Bastida. 2007. Partial characterization of films prepared with oxidized banana starch. *Agrociencia* 41 (8):837-844.
- Zhang, S., Y. Wang, J. L. Herring, y J. H. Oh. 2007. Characterization of edible film fabricated with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatin extract using selected pretreatment methods. *Journal of Food Science* 72 (9):C498-C503.
- Zivanovic, S., J. J. Li, P. M. Davidson, y K. Kit. 2007. Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. *Biomacromolecules* 8 (5):1505-1510.