



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

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 en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

Efecto de los Métodos de Congelación y Descongelación Sobre las Proteínas Miofibrilares y Estructura del Músculo de Cazón (*Mustelus lunulatus*)

TESIS

Que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Jesús Aarón Salazar Leyva

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

CONTENIDO

	Página
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE TABLAS	xvii
RESUMEN	xviii
OBJETIVOS	xx
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	4
Situación Peñera en México	4
Generalidades de los Elasmobranquios	5
Cazones y Tiburones	5
Taxonomía	5
Caracteres Distintivos	6
Habitat y Biología	6
Pesca y Utilización	9
Generalidades de las Proteínas	12
Organización Estructural	13
Estructura primaria	13
Estructura secundaria	13
Estructura terciaria	13
Estructura cuaternaria	14
Interacciones Responsables de la Estabilidad de la Estructura	
Proteica	14
Interacciones de Van der Waals	15
Puente de hidrógeno	15
Interacciones electrostáticas	15
Interacciones hidrofóbicas	16
Enlace disulfuro	16
Desnaturalización Protéica	17
Proteínas Presentes en el Músculo de Pescado	18
Proteínas Sarcoplasmicas	19

Proteínas Miofibrilares	20
Miosina	21
Paramiosina	23
Actina	23
Tropomiosina	24
Troponinas	24
Proteínas del Estroma	25
Estructura del Músculo de Pescado	26
Congelación como Método de Preservación de Alimentos	30
Velocidad de Congelación y Calidad	31
Aspectos Generales de la Congelación de Pescado	32
Sistemas de Congelación	34
Congelación por convección de aire	34
Congelación por contacto de placas	35
Congelación criogénica	36
Cambios en la Calidad de Pescado Almacenado en Congelación	37
Desnaturalización Proteica de Músculo de Pescado Almacenado en Congelación	39
Redistribución del Agua y Concentración de Solutos	39
Hidrólisis y Oxidación de Lípidos	41
Formación de Formaldehído por la Enzima TMAOasa	43
Descongelación de Pescado	44
MATERIALES Y MÉTODOS	47
Obtención de la Muestra	47
Análisis Proximal	47
Preparación de la Muestra	48
Congelación	48
Congelación por Inmersión	48
Congelación por Convección de Aire	49
Descongelación	49
Goteo	49

Análisis de Textura	51
Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)	52
Análisis Electroforético	52
Estudio Histológico	54
Análisis Estadístico	56
RESULTADOS Y DISCUSION	59
Análisis Proximal del Músculo de Cazón	59
Proceso de Congelación	60
Métodos de Descongelación	64
Goteo	65
Textura	70
Calorimetría Diferencial de Barrido	74
Análisis Electroforético	84
Estudio Histológico	100
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	127
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	130



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Morfología externa del tiburón mamón (<i>Mustelus lunulatus</i>).	7
Figura 2.	Volumen de captura de tiburón y cazón en el estado de Sonora en el periodo 1998-2001.	11
Figura 3.	Modelo de la molécula de miosina.	22
Figura 4.	(a)Estructura de la fibra muscular. (b) Estructura del sarcomero.	28
Figura 5.	Estructura metamerica del músculo de pescado.	29
Figura 6.	Curva de congelación por inmersión con mezcla frigorífica (acetona + dióxido de carbono sólido) de músculo de cazón (<i>Mustelus lunulatus</i>).	61
Figura 7.	Curva de congelación por convección de aire de músculo de cazón (<i>Mustelus lunulatus</i>).	62
Figura 8.	Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes y reductoras de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de un mes de almacenamiento.	85

Figura 9.	Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de un mes de almacenamiento.	86
Figura 10.	Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes y reductoras de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de dos meses de almacenamiento.	93
Figura 11.	Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de dos mes de almacenamiento.	94
Figura 12.	Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes y reductoras de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de tres meses de almacenamiento.	97
Figura 13.	Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de tres meses de almacenamiento.	98

- Figura 14. Cortes histológicos de músculo de cazón sin congelar. 101
(a) y (b), ampliaciones de 40 y 100 x, respectivamente.
- Figura 15. Cortes histológicos de músculo de cazón 103
descongelado en horno de microondas después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (100x). (b): congelado rápido. (40x).
- Figura 16. Corte histológico de músculo de cazón descongelado 104
en agua a temperatura ambiente después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (40 x). (b): congelado rápido (10 x).
- Figura 17. Cortes histológicos de músculo de cazón 106
descongelado a baja temperatura después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (100x).
- Figura 18. Fibras musculares de músculo de cazón 108
descongelado en horno de microondas después de dos meses de almacenamiento. (a): congelado lento (100x). (b): congelado rápido (100x).
- Figura 19. Cortes histológicos de músculo de cazón 109
descongelado en agua a temperatura ambiente después de dos meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x).

- Figura 20. Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de dos meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x) (b): congelado rápido (100x). 110
- Figura 21. Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado en horno de microondas después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x). 112
- Figura 22. Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado en agua a temperatura ambiente después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x). 113
- Figura 23. Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x). 114
- Figura 24. Corte histológico del tejido conectivo del músculo de cazón. (a) y (b): músculo sin congelar. 40 y 100 x, respectivamente. 116
- Figura 25. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en horno de microondas después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x) 117

- Figura 26. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en agua a temperatura ambiente después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10 x). (b): congelado rápido (10x). 118
- Figura 27. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (40 x). (b): congelado rápido (40x). 119
- Figura 28. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en horno de microondas después de dos mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x). 121
- Figura 29. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en agua a temperatura ambiente después de dos mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x). 122
- Figura 30. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de dos mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x). 123

- Figura 31. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en horno de microondas después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (40x). 124
- Figura 32. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en agua a temperatura ambiente después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (40 x). (b): congelado rápido (40x). 125
- Figura 33. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (40x). 126

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Métodos de descongelación aplicados sobre el músculo de cazón (<i>Mustelus lunulatus</i>)	50
Tabla 2.	Protocolo de deshidratación del músculo de cazón (<i>Mustelus lunulatus</i>).	55
Tabla 3.	Protocolo de tinción de hematoxilina y eosina de Harris.	57
Tabla 4.	Protocolo de la tinción tricromica de Masson.	58
Tabla 5.	Tiempos de descongelación obtenidos en músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación.	66
Tabla 6.	Porcentaje de goteo en los filetes de cazón sometidos a los diferentes procesos de congelación y descongelación.	67
Tabla 7.	Textura en los filetes de cazón sometidos a los diferentes procesos de congelación y descongelación.	71
Tabla 8.	Parámetros térmicos de las proteínas del músculo de cazón sometido a los diferentes métodos de congelación y descongelación.	75

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar el posible efecto de diferentes métodos de congelación y descongelación sobre las proteínas miofibrilares del músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*), en el presente estudio se utilizaron dos diferentes procesos de congelación (inmersión y convección de aire) y posteriormente los filetes congelados se descongelaron mediante tres diferentes métodos de descongelación (agua a temperatura ambiente, horno de microondas y bajas temperaturas).

El porcentaje de goteo presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes métodos de congelación y descongelación. Los filetes congelados por inmersión y descongelados a baja temperatura presentaron el menor porcentaje de goteo durante todo el periodo de almacenamiento.

La resistencia al corte del músculo de cazón no mostró claras diferencias con respecto a los diferentes métodos de congelación y descongelación utilizados, pero se observó un aumento ($p < 0.05$) en la resistencia al corte conforme aumentó el tiempo de almacenamiento.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la entalpía de desnaturalización de la miosina, en los filetes que fueron congelados por convección de aire y descongelados "rápidamente" (agua y microondas).

Los perfiles densitométricos indicaron que después de un mes de almacenamiento la miosina presentó mayor estabilidad que la actina a los procesos de congelación y descongelación aplicados. Al finalizar el segundo mes de almacenamiento hubo un aumento en la proporción de actina y

miosina, y después del tercer mes de almacenamiento se observó una disminución de la actina y miosina en la mayoría de los tratamientos evaluados en este estudio.

Después de un mes de almacenamiento los filetes descongelados a baja temperatura presentaron un menor daño en la morfología de las fibras musculares y conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento la alteración de las fibras aumentó.

Después del tercer mes de almacenamiento se detectaron cambios en la estructura del tejido conectivo del músculo de cazón, y no se observó una influencia de los métodos de congelación y descongelación en dichos cambios.

Bajo las condiciones de este estudio se demostró que los métodos de descongelación influyen en algunos cambios ocurridos en el músculo de pescado, por lo que es importante tener en cuenta dichos métodos con la finalidad de obtener productos de óptima calidad.

↓ OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la influencia de diferentes métodos de congelación y descongelación sobre la estabilidad de las proteínas miofibrilares y estructura del músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*).

Objetivos Específicos

- 1.- Evaluar la desnaturalización térmica de las proteínas miofibrilares del músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*) sometido a diferentes métodos de congelación y descongelación.
- 2.- Evaluar el comportamiento electroforético de las proteínas miofibrilares extraídas del músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*) sometido a diferentes métodos de congelación y descongelación.
- 3.- Observar el efecto de los diferentes métodos de congelación y descongelación sobre la estructura general y tejido conectivo del músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*).

INTRODUCCION

La necesidad de tener alimentos frescos y de una calidad aceptable en el momento requerido, condujo al hombre a idear métodos que le auxiliaran a alargar la vida de anaquel de los productos alimenticios, surgiendo así de manera tradicional los métodos de conservación de alimentos. Los organismos de origen marino poseen gran importancia a nivel nutricional, lo que los ha convertido en una importante materia prima para la producción y manufactura de alimentos procesados.

Uno de los métodos de conservación más utilizados para preservar la calidad del pescado es la congelación. Con respecto a esto, existen datos que indican que la congelación comercial de pescado era practicada hace más de cien años atrás (Stevenson, 1899) y antes de eso, particularmente los habitantes de países con climas fríos aprendieron que el pescado podía ser preservado por congelación, creando congeladores naturales al aire libre (Heen y Karsti, 1965).

La congelación ha sido utilizada para preservar la calidad del pescado ya sea por medio de la aplicación de este proceso a bordo de las embarcaciones o en plantas procesadoras en tierra. Sin embargo, después de un almacenamiento prolongado aun a temperaturas por debajo de los -20°C los productos pueden sufrir cambios sensoriales indeseables (Sikorski *et al.*, 1976). Los parámetros de calidad que se ven más afectados durante el almacenamiento en congelación del pescado son el sabor, color y textura,

sobre todo cuando se utilizan técnicas de congelación indeseables o cuando la calidad inicial de la materia prima es pobre (Shenouda, 1980).

Las proteínas miofibrilares contribuyen de manera muy importante en los atributos de textura y en las propiedades funcionales del músculo de pescado. Se sabe que estos compuestos son de los más afectados durante el almacenamiento en congelación, ya que pueden sufrir una desnaturalización y/o agregación debida a factores como la parcial deshidratación proteica, la cual es ocasionada por la redistribución del agua durante la formación de cristales durante el proceso de congelación, con la consecuente concentración de solutos en el tejido; además, también se relaciona con dicha desnaturalización la formación de formaldehído en ciertas especies de pescado o a las interacciones de las proteínas con los lípidos o con sus productos de oxidación (Sikorski *et al.*, 1976; Matsumoto, 1979; Shenouda, 1980; Haard, 1992).

La calidad del pescado congelado depende principalmente de su calidad inicial como materia prima, del proceso de congelación, de las condiciones de almacenamiento y del proceso de descongelación utilizado (Nilsson y Eskstrand, 1995). El proceso de descongelación utilizado puede llegar a tener influencia en ciertos factores de calidad del pescado congelado; por ejemplo, Chevalier *et al.* (1999) observaron que utilizando un proceso de descongelación que utiliza altas presiones se logra disminuir el goteo de filetes de pescado (*Gadus marlangus*) conforme el tiempo de descongelación aumenta.

Por otro lado, los procesos de congelación y descongelación afectan las estructuras de las membranas de las células musculares (Rhaman, 1999). La desintegración de dichas estructuras puede ser medida por la actividad de una o más enzimas contenidas en los fluidos musculares, las cuales son retenidas en organelos intracelulares en el músculo fresco (Rehbein *et al.*, 1978). Nilsson y Ekstrand (1995) midieron la actividad de la enzima β -N-acetilglucosamidasa (NAG) en músculo de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) descongelada con diferentes medios de calentamiento (agua y aire) y observaron que el tiempo de descongelación utilizado influyó en la actividad de la NAG, la cual es una medida indirecta del daño que sufrieron las membranas celulares del músculo de trucha.

Sin embargo, no existen estudios que relacionen de manera directa el efecto de diferentes métodos de descongelación sobre las proteínas miofibrilares del músculo de pescado y además resulta de fundamental importancia el generar información relacionada con este tipo de procesos (congelación y descongelación) en especies de pescado de aguas tropicales como lo es el cazón (*Mustelus lunulatus*) ya que la gran mayoría de los estudios relacionados a este tema han sido realizados en especies de pescado de aguas frías.

Por lo mencionado anteriormente, el objetivo principal del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes procesos de congelación y descongelación sobre la estabilidad de las proteínas miofibrilares y observar el efecto de dichos procesos en la estructura del músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*).

REVISION BIBLIOGRAFICA

Situación Pesquera en México

México se caracteriza por poseer amplios litorales y una riqueza marina con gran potencial de explotación; en nuestras aguas existe una gran variedad de especies que pueden ser aprovechadas comercialmente.

En el año de 1995 México se colocó en el lugar 16 en producción pesquera a nivel mundial con 1.4 millones de toneladas (ton). Para el año 2000 el volumen de captura fue de 1,402,938 ton, para posteriormente presentar un incremento en el año 2001 con un volumen de captura de 1,520,938 ton (<http://www.inegi.gob.mx/estadistica/espanol>).

La región más importante en materia de pesca en nuestro país es la zona Noroccidental, la cual esta integrada territorialmente por las entidades de Baja California Norte y Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit (INE 2000).

Sonora es el estado más productivo del país, pues en 1999 se obtuvo un volumen de captura de 309, 000 ton, para después presentar un aumento en el 2001 con un volumen de captura de 488,953 ton. Entre las principales especies de valor comercial capturadas en el estado de Sonora están la sardina, camarón, tiburón-cazón, calamar, atún, bagre y tilapia (<http://www.inegi.gob.mx/estadistica/espanol>).

Generalidades de los Elasmobranquios

Los elasmobranquios son considerados peces primitivos ya que no presentan estructuras óseas y su esqueleto es cartilaginoso.

Estos organismos están constituidos por dos grandes grupos, el de los escuálidos o tiburones y el de los batoideos, que comprenden rayas y quimeras (Sevilla, 1983). Los elasmobranquios son un grupo de cerca de 1000 especies, principalmente marinos, la mayoría se caracterizan por poseer un lento crecimiento, madurez tardía, baja fecundidad y alta longevidad comparados con los peces óseos (Musick *et al.*, 2000).

Cazones y Tiburones

El grupo de los tiburones y cazones ha alcanzado en México altos niveles de explotación, ya que su comercialización es cada día más completa (Sevilla, 1983; INP, 2000). Según la NOM-029-PESC-2000 los cazones son tiburones que pertenecen a especies pequeñas y juveniles. Generalmente los datos estadísticos de los cazones y tiburones se analizan en conjunto, ya que se trata de especies pertenecientes al mismo suborden diferenciadas tan solo por el tamaño y en ocasiones la especie (Sevilla, 1983).

Taxonomía

Phylum Chordata.

Subphylum Vertebrata

Súper clase Gnathostomata

Grado Chondreichthiomorphi

Clase Chondreichythies

Subclase Elasmobranchii

Superorden Selachii (Euselachii)

Orden Carcharhiniformes

Familia Triakidae

Genero Mustelus

Especie lunulatus Jordan y Gilbert, 1883.

Caracteres Distintivos

Mustelus lunulatus (tiburón mamón grande o segadora) posee un cuerpo esbelto, cabeza corta, hocico moderadamente largo y dientes molariformes y asimétricos (Figura 1). Los machos de esta especie, maduran entre los 70 y 83 centímetros y alcanzan 1.1 metros de longitud, mientras que las hembras maduran aproximadamente a los 97 centímetros. La talla de estos organismos al nacer es entre 32 y 35 centímetros. Los organismos de esta especie poseen un dorso de color gris uniforme, vientre claro sin manchas blancas u oscuras (Campagno *et al.*, 1995).

Hábitat y Biología

Mustelus lunulatus es una especie abundante pero poco conocida de aguas templado-cálidas y tropicales, que habita sobre el fondo de las plataformas continentales del Pacífico oriental.

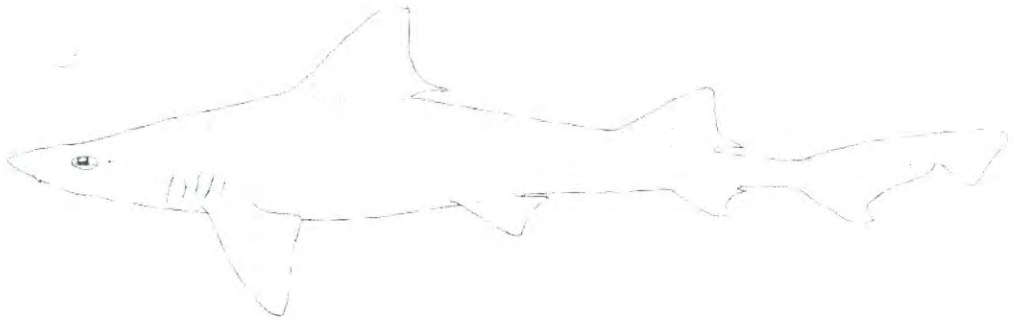


Figura 1. Morfología externa del tiburón mamon (*Mustelus lunulatus*)

Fuente: Perez y Ruiz, (1985).

La mayoría de los cazones, incluyendo al tiburón mamón, (*Mustelus lunulatus*) están ampliamente distribuidos en mares tropicales, templados y fríos, desde aguas someras hasta profundidades moderadas de 300 metros o más. Se alimentan de invertebrados del fondo como crustáceos, moluscos y poliquetos, así como también de pequeños peces óseos y huevos de peces (Campagno *et al.*, 1995).

La mayoría de las especies pequeñas de tiburones o cazones realizan migraciones masivas, principalmente en busca de alimento; las cuales están muy asociadas con la presencia de calamar, sardina, macarela y otras especies de abundancia estacional en el Golfo de California. En muestreos realizados en las costas de Sonora, se observó que existen por lo menos 24 especies de tiburones, y los que se capturan con mayor frecuencia son los pertenecientes al orden de los Carcharhiniformes (Compagno, 1984, 1988, 1990).

Al parecer, los tiburones penetran al Golfo de California en busca de zonas para el alumbramiento. Dichas áreas requieren de características muy particulares para el nacimiento de los neonatos; en dichas áreas, los organismos encuentran refugio a la depredación y un ambiente con condiciones bióticas y abióticas que les permiten crecer rápidamente para incorporarse a la población de juveniles y adultos (Castro 1993).

Los tiburones presentan características muy distintivas en su ciclo de vida. Entre las más mencionadas están su lento crecimiento, madurez tardía, prolongada gestación, alta longevidad, baja fecundidad y desconocida frecuencia reproductiva. Los tipos de reproducción de los tiburones que se

encuentran en el Golfo de California varían poco. La mayoría de estos son vivíparos (placentarios y no placentarios), pero también se pueden encontrar especies ovíparas (Walker, 1992).

Pesca y Utilización

La captura de tiburones en aguas mexicanas es una actividad tradicional; según Applegate *et al.* (1979) dicha actividad se remonta al tiempo de los Olmecas y Aztecas, quienes aparentemente fueron capaces de distinguir entre las diferentes especies. Esta pesquería es típicamente multiespecífica y de naturaleza artesanal (Castillo, 1992; Castillo *et al.*, 1998).

En 1944 se registró la primer cifra récord de captura de tiburones en el país con 4,833 ton, gracias a la enorme demanda internacional de fuentes de vitamina A. Posteriormente con la fabricación sintética de dicha vitamina a un menor costo, en 1949 se desplomó el mercado internacional de hígado de tiburón (INP, 2000).

A partir de los años sesenta se inició un nuevo incremento en las capturas como consecuencia de la demanda mundial de aletas y otros productos derivados de los tiburones. La participación en esta etapa de las cooperativas de producción pesquera (sector social) permitieron acelerar el desarrollo de la actividad, reflejándose en un decidido crecimiento y dando así lugar a la pesquería artesanal de tiburón más grande del mundo (INP, 2000).

En México la pesquería de tiburón y cazón está representada por tres unidades de pesquería: la ribereña artesanal que se lleva a cabo a lo largo de los dos litorales marinos con embarcaciones menores de menos de 10.5 m de eslora, la cual contribuye con aproximadamente el 40% de la producción nacional; la de mediana altura, que se lleva a cabo con embarcaciones de entre 10 y 27 m de eslora en aguas costeras de ambos litorales, pero principalmente en la zona costera de Tamaulipas y Veracruz, Sonda de Campeche y Quintana Roo, y en el Golfo de California y Golfo de Tehuantepec, en el litoral del Océano Pacífico; la otra unidad de pesquería es la pesca de altura, en donde operan embarcaciones de más de 27 m de eslora que capturan tiburón tanto en aguas costeras como en aguas oceánicas dentro de la Zona Económica Exclusiva del Océano Pacífico. Estas dos últimas unidades de pesquería contribuyen con aproximadamente el 60% de la producción nacional (NOM-029-PESC-2000).

En el 2001, el volumen de captura de tiburón y cazón en México fue de 25, 695 ton, el estado de Sonora ocupó el tercer lugar nacional de captura de estos organismos. En la figura 2 se puede observar que del año 1998 al año 2001 la tendencia en la captura de tiburón y cazón en el estado de Sonora aumentó por encima de las 2000 ton. (<http://www.inegi.gob.mx/estadistica/espanol>).

A pesar de que una buena parte de la pesquería de tiburón y cazón se lleva a cabo de una manera artesanal, la pesca de estos organismos representa una buena fuente de empleos y alimento para nuestro país.

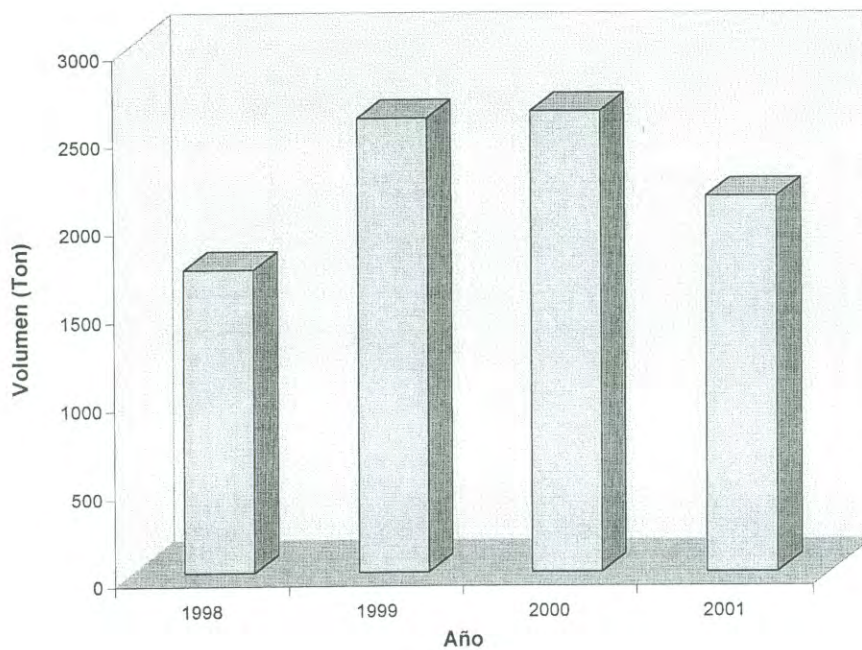


Figura 2. Volumen de captura de tiburón y cazón en el estado de Sonora en el periodo 1998-2001

Fuente: (<http://www.inegi.gob.mx/estadistica/espanol>)

En la NOM-029-PESC-2000 se menciona que la pesca de tiburón y cazón es una importante actividad del sector pesquero desde el punto de vista económico, alimentario y social, debido a que se lleva a cabo una buena generación de empleos en la fase de captura, manejo, proceso primario de la producción, distribución y comercialización de productos y subproductos pesqueros. Además, en esta pesquería más del 90% de la producción nacional se destina a consumo humano directo en distintas presentaciones, como fresco, congelado y seco-salado, proporcionando así productos de bajo costo a amplios sectores de la sociedad.

Generalidades de las Proteínas

Las proteínas son polímeros altamente complejos, constituidos por veinte diferentes aminoácidos. La gran importancia que tienen estas a nivel biológico está implícito en su nombre, que deriva del griego *proteois* que significa "ser primero" (Badui, 1993). Resulta de fundamental importancia el entender las propiedades físicas, químicas, nutricionales y funcionales de las proteínas, así como los cambios que experimentan sus propiedades durante el procesamiento de alimentos con la finalidad de mejorar la calidad de los productos terminados (Srinivasan, 1996).

Organización Estructural

→ **Estructura primaria.** La estructura primaria de una proteína se refiere a la ordenación o secuencia que tienen los aminoácidos en una cadena proteica; dichos aminoácidos están covalentemente unidos a través de enlaces amidas, también conocidos como enlaces peptídicos (Belitz-Grosch, 1999). Es sabido que la secuencia en la cual están unidos los aminoácidos determinan las propiedades estructurales, físicoquímicas y biológicas de las proteínas (Srinivasan, 1996).

→ **Estructura secundaria.** Este término se refiere al arreglo espacial de los residuos de aminoácidos en ciertos segmentos de una cadena polipeptídica (Srinivasan, 1996); En otras palabras, la estructura secundaria de las proteínas se refiere a la ordenación regular y periódica en el espacio a lo largo de su eje o dirección (Badui, 1993). En general, existen dos formas de estructura secundaria en las proteínas; una de ellas son las estructuras helicoidales, donde la forma más común es la hélice alfa y es la forma helicoidal más estable, debido a que posee un menor grado de energía libre; la otra forma de estructura secundaria es la conformación o hoja beta, la cual es más estable que la hélice alfa (Srinivasan, 1996; Belitz-Grosch, 1999).

→ **Estructura terciaria.** Este tipo de estructura se refiere al modo en que una cadena polipeptídica lineal con segmentos de estructura secundaria se curva o se dobla tridimensionalmente para formar una estructura estrechamente compacta y plegada. La formación de la estructura terciaria

envuelve la optimización de varias interacciones como lo son las hidrofóbicas, electrostáticas y de Van der Waals y los puentes de hidrógeno (Srinivasan, 1996).

→**Estructura cuaternaria.** A diferencia de las anteriores, esta estructura no necesariamente existe en todos los polipéptidos. La estructura cuaternaria se refiere al arreglo espacial de una proteína que contiene más de una cadena polipeptídica, donde la unión de dichas cadenas o fracciones se lleva a cabo por medio de interacciones no covalentes, como lo son puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Badui, 1993; Srinivasan, 1996).

Interacciones Responsables de la Estabilidad de la Estructura Proteica

Las fuerzas que contribuyen en la estabilidad y doblamiento de la estructura proteica pueden ser agrupadas en dos categorías: las interacciones intramoleculares que pertenecen a fuerzas intrínsecas de la misma molécula de proteína y por otro lado están las interacciones intramoleculares que son afectadas por el solvente que rodea a la molécula de proteína. Por ejemplo las interacciones de Van der Waals pertenecen al primer grupo mientras que el enlace de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas pertenecen al segundo grupo (Srinivasan, 1996). A continuación, se hace una descripción breve de las interacciones anteriormente mencionadas.

Interacciones de Van der Waals. Estos tipos de fuerzas se llevan a cabo por medio de interacciones del tipo dipolo inducido-dipolo y dipolo-dipolo inducido entre átomos neutros en la molécula de proteína. Las interacciones de Van der Waals se dan cuando dos átomos se aproximan uno con otro, y cada átomo induce un dipolo por medio de una polarización de la nube electrónica. La magnitud de este tipo de interacciones va a depender de la distancia existente entre los átomos involucrados (Mortimer, 1983; Srinivasan, 1996).

Puente de hidrógeno. El enlace o puente de hidrógeno envuelve la interacción de un átomo de hidrógeno que está unido por un enlace covalente a un átomo electronegativo con otro átomo electronegativo. Las proteínas contienen varios grupos que son capaces de formar puentes de hidrógeno; entre estos encontramos a los grupos N-H y C=O de los enlaces peptídicos y de las hélices alfa y hojas beta. Es sabido que los puentes de hidrógeno son importantes en el doblamiento que experimentan las moléculas de proteína, así como también tienen cierta contribución en la estabilidad de la estructura nativa (Badui, 1993; Srinivasan, 1996).

Interacciones electrostáticas. Se sabe que las moléculas de proteína contienen varios residuos de aminoácidos con grupos ionizables, y en la mayoría de los casos casi todos los grupos cargados en las proteínas están distribuidos en la superficie de la molécula. Las interacciones electrostáticas en las proteínas pueden ser de repulsión o de atracción y

esto va a depender directamente del pH que tenga el medio; por ejemplo, a pH neutros la proteína adquiere una carga neta positiva o una carga neta negativa. Esto ocasiona que se formen interacciones electrostáticas de repulsión entre los grupos que posean la misma carga e interacciones electrostáticas de atracción entre grupos cargados opuestamente, las cuales tienen cierta influencia en la estabilidad de la estructura proteica. Por otro lado los grupos cargados que están hacia el interior de la molécula de proteína usualmente forman puentes salinos con una alta energía de interacción (Srinivasan, 1996).

Interacciones hidrofóbicas. En una solución acuosa las interacciones hidrofóbicas entre grupos no polares son el resultado de una interacción termodinámicamente desfavorable entre el agua y grupos no polares; en este tipo de soluciones, los grupos no polares tienden a agregarse, por lo que el área de contacto directo con el agua es minimizada. Para el caso de las proteínas las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales no polares de los residuos de aminoácidos son de gran importancia en el doblamiento de la molécula de proteína hacia su estructura terciaria, ya que la mayoría de los grupos no polares están alejados del ambiente acuoso (Srinivasan, 1996; Belitz-Grosch, 1999).

Enlace disulfuro. Los enlaces disulfuro son los únicos enlaces covalentes encontrados naturalmente en las proteínas; pueden ser intramoleculares e intermoleculares. Este tipo de enlace se forma cuando

dos residuos de cisteína están muy próximos y con una orientación adecuada. Cuando se da este acercamiento entre los residuos de cisteína, se lleva cabo una oxidación de los grupos sulfidrilo por medio de oxígeno molecular y se da la formación del enlace disulfuro. Las mezclas de proteínas que contienen residuos de cistina y de cisteína son capaces de experimentar reacciones de intercambio de grupos disulfuro y sulfidrilos; estas reacciones de intercambio pueden ocurrir también con una proteína simple, si esta contiene un grupo sulfidrilo libre y un enlace disulfuro; esta reacción de intercambio, generalmente provoca un decremento en la estabilidad de la molécula de proteína (Srinivasan, 1996).

→ **Desnaturalización Proteica**

Es sabido que el estado nativo de una proteína es termodinámicamente el más estable, ya que posee una energía libre muy baja a condiciones fisiológicas. Sin embargo, si se lleva a cabo cualquier cambio en el ambiente circundante de la proteína tales como pH, fuerza iónica, temperatura, entre otros, va a provocar que la molécula asuma un cambio en su estructura en busca del equilibrio. Si los cambios en la estructura proteica son leves y no alteran la arquitectura molecular de la proteína, se dice que esta sufrió una "adaptabilidad conformacional". Pero si la molécula de proteína sufre cambios en su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria sin rompimiento en el esqueleto peptídico se dice que la proteína sufrió una "desnaturalización" (Srinivasan, 1996; Belitz-Grosch, 1999). En términos generales, el significado de la palabra desnaturalización

es alejarse de la forma natural; desde un punto de vista termodinámico, la desnaturalización se refiere al cambio de un estado ordenado de las moléculas a otro desordenado, lo que trae consigo un incremento en la entropía del sistema. Cuando se lleva a cabo la desnaturalización proteica, su estructura se desdobra o distiende, para exponer sus grupos hidrófobos internos al exterior y adquirir una conformación al azar (Badui, 1993).

En la mayoría de los casos la desnaturalización tiene una connotación negativa, ya que esta indica la pérdida de algunas propiedades. Por ejemplo, muchas proteínas biológicamente activas pierden su actividad después de la desnaturalización. En el caso de las proteínas de los alimentos, la desnaturalización causa generalmente insolubilización y pérdida de algunas propiedades funcionales. Sin embargo en algunos casos, la desnaturalización proteica es deseable, como por ejemplo la desnaturalización térmica es necesaria para que se lleve a cabo el proceso de gelificación en las proteínas presentes en los alimentos. Además también se sabe que ciertas proteínas al ser parcialmente desnaturalizadas son más digeribles y poseen mejores propiedades espumantes y gelificantes que las proteínas en estado nativo (Srinivasan, 1996).

Proteínas Presentes en el Músculo de Pescado

Todos los organismos marinos, como el pescado, crustáceos y moluscos son importantes fuentes de proteína para el ser humano (Shahidi,

1992). El músculo de pescado contiene diferentes tipos de proteínas y además presenta otros compuestos que contienen nitrógeno a los cuales se les llama nitrógeno no proteico (NNP). El contenido de NNP es más alto en los organismos marinos al compararlo con otros sistemas alimenticios. Dentro de los principales compuestos que forman parte del NNP en organismos marinos, están los aminoácidos libres, péptidos, aminos, compuestos guanidinos, urea, betainas nucleótidos y compuestos cuaternarios de amonio (Haard, 1995).

Las proteínas del músculo de pescado, al igual que las proteínas de otro tipo de músculos, pueden ser clasificadas en proteínas miofibrilares, sarcoplasmicas y del estroma (Shahidi, 1992). A continuación se hace mención de las principales características de estas proteínas contenidas en el músculo de pescado.

Proteínas Sarcoplasmicas

Las proteínas de la célula muscular que no están asociadas al aparato contractil constituyen el grupo de proteínas sarcoplasmicas. Estas proteínas tienen la propiedad de ser solubles en agua y en soluciones salinas diluidas. Las proteínas sarcoplasmicas del músculo de pescado se componen principalmente por mioglobina, cientos de enzimas y otras albuminas (Shahidi, 1992, Haard, 1995).

El contenido de proteínas sarcoplasmicas es generalmente más alto en especies de peces pelágicos al compararlas con peces demersales. Por otro lado el músculo oscuro de algunas especies de pescado contiene

menos proteínas sarcoplasmicas que el músculo blanco (Suzuki, 1987). Sin embargo la presencia de grandes cantidades de mioglobina, haemoglobina y citocromo C en el músculo oscuro puede revertir la tendencia anteriormente mencionada (Shahidi, 1992).

Por otro lado se sabe que las enzimas que forman parte de las proteínas sarcoplasmicas son responsables de la deterioración en la calidad post-mortem del pescado. Los principales grupos de enzimas que están envueltos en esta pérdida de calidad son las hidrolasas, oxidorreductasas y transferasas (Haard, 1995). La actividad de estas enzimas depende de varios factores, como lo son la especie de pescado, tipo de músculo, así como también los factores ambientales y la temporada de captura. El manejo y condición post-captura del pescado también determina la actividad de estas enzimas (Shahidi, 1992).

Proteínas Miofibrilares

Las proteínas miofibrilares forman parte del aparato contractil o miofibrilla en la célula muscular (Haard, 1995). Las proteínas miofibrilares que se encuentran en mayor proporción en el músculo de organismos marinos son la miosina, actina, tropomiosina y troponinas C, I y T (Suzuki, 1981). Este tipo de proteínas pueden ser extraídas del músculo de pescado con soluciones salinas concentradas, ejemplo: KCl 0.6 M (Shahidi, 1992).

La proporción de proteína miofibrilar en el músculo de pescado es más alta que en el músculo de animales terrestres, sin embargo las cantidades en cuanto a componentes individuales son muy similares (Haard,

1995). Es sabido que dichas proteínas experimentan cambios durante el proceso y resolución del rigor mortis, así como también durante un almacenamiento prolongado en congelación; dichos cambios tienen un efecto en la textura de los organismos marinos, por lo que es importante su estudio (Shahidi, 1992). A continuación se hace una descripción de las proteínas miofibrilares de importancia en el músculo de pescado.

Miosina. La miosina es la proteína miofibrilar más abundante en el músculo de pescado y se encuentra entre el 50 y 60% de la cantidad total de proteínas de este tipo. Su molécula consiste de dos subunidades llamadas cadenas pesadas, cada una con un peso molecular de 200 kDa y de otras cuatro pequeñas subunidades llamadas cadenas ligeras con un peso molecular entre 16 y 30 kDa (Haard, 1995). El peso molecular de la miosina nativa es de alrededor de 480 kDa (Hamoir, 1975). Sus cadenas pesadas se enrollan una con otra en la mayor parte de su longitud en una conformación de hélice alfa. Su extremo NH₂ terminal posee una estructura globular, a la cual se le llama cabeza (Figura 3); las cadenas ligeras se unen a las pesadas a nivel de la cabeza (Brandon y Tooze, 1999).

La molécula de miosina posee actividad ATPasa, la cual esta localizada en la región globular de la molécula y dicha actividad es importante para que se lleve a cabo la interacción entre la miosina y la actina durante el proceso de contracción muscular (Brandon y Tooze, 1999).

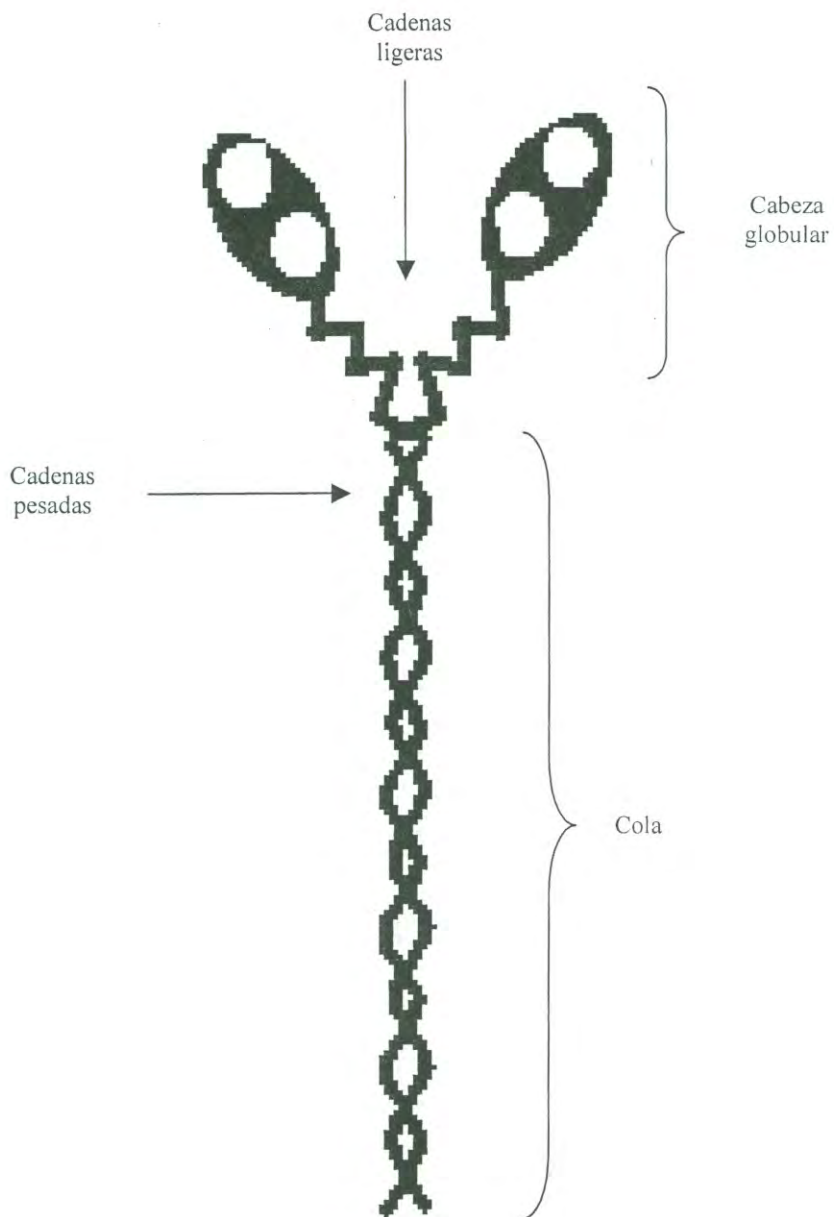


Figura 3. Modelo de la molécula de miosina

Fuente: Suzuki (1987)

La composición de aminoácidos y pesos moleculares de las miosinas encontradas en diferentes músculos de pescado son muy similares (Skaara y Regenstein, 1990). Por otro lado, se ha observado que el alto contenido de grupos tiol en la miosina (30 a 40) juega un papel muy importante en el procesamiento de la carne (Hofmann y Hamm, 1978) y dicho contenido de grupos tiol es similar en muchas especies de pescado (Skaara y Regenstein, 1990).

Paramiosina. Esta proteína es encontrada en el músculo de organismos marinos invertebrados; su peso molecular aproximado es de 200 kDa (Offer, 1987). Las moléculas de paramiosina forman un núcleo en los filamentos gruesos del músculo, el cual es cubierto por una capa de miosina; es sabido que la paramiosina mantiene la tensión de los tejidos musculares (Shahidi, 1992). Se ha encontrado que en ciertos organismos marinos como el abulon, la paramiosina esta presente en un 65% del total de proteínas miofibrilares (Pyeun *et al.*, 1973).

Actina. La actina es la segunda proteína miofibrilar más abundante en el músculo de pescado, constituye aproximadamente el 20% del total de este tipo de proteínas (Shahidi, 1992).

La estructura de la actina (G-actina) es globular y esta constituida por una cadena polipeptídica simple que contiene un nucleotido (ATP o ADP) y un catión divalente, calcio o magnesio (Hamoir, 1975). La G-actina polimeriza a concentraciones salinas fisiológicas, para formar filamentos,

llamados F-actina; algunos estudios han encontrado que las actinas provenientes de calamar, carpa y tilapia tienen un peso molecular similar a la actina proveniente del músculo de conejo (Seki *et al.*, 1973; Tsuchiya *et al.*, 1977).

Tropomiosina. Esta proteína está formada por dos subunidades de aproximadamente 33 kDa, y es una proteína reguladora (Haard, 1995). La proporción de estas dos subunidades (a y b) varía con el tipo de fibra muscular.

La composición de aminoácidos de la tropomiosina purificada del músculo de bacalao es muy similar a la tropomiosina proveniente de mamíferos, con la excepción de la alta cantidad de residuos de ácido aspártico que poseen la tropomiosina proveniente de mamíferos (Saad *et al.*, 1959).

Troponinas. Esta es una proteína reguladora, con un peso molecular de 80 kDa; la troponina se encarga de conferir al complejo actinmiosina ATPasa su sensibilidad al calcio. Esta proteína consta de tres subunidades, las cuales poseen diferentes propiedades (Brandon y Tooze, 1999). La troponina **C** actúa en la unión del calcio, mientras que la troponina **I** actúa en la relajación del complejo actinmiosina en la presencia de ATP y la troponina **T** es la encargada de unir a la molécula completa de troponina con la tropomiosina (Haard, 1995).

Proteínas del Estroma

El residuo insoluble que queda después de remover las proteínas sarcoplasmicas y miofibrilares del músculo es conocido como estroma; los principales tipos de proteína encontrados en esta fracción son el colágeno y la elastina, las cuales son proteínas pertenecientes al tejido conectivo. Las proteínas del estroma son solubles en soluciones diluidas de HCl y NaOH y contribuyen en un 10% de la proteína total del músculo de pescado (Shahidi, 1992). Dentro de las proteínas del estroma, el colágeno es la proteína que esta en mayor proporción. En general la molécula de colágeno está compuesta por tres cadenas polipeptídicas designadas cadenas o hélices alfa; dichas cadenas tienen secuencias repetidas en la forma Glicina-X-Y a lo largo de su longitud, donde X - Y son residuos de aminoácidos cualesquiera (Hamoir, 1975). Esta proteína presenta ciertas características diferentes al compararse con el colágeno de mamíferos, las cuales se describen a continuación.

El contenido de colágeno en organismos marinos es menor al compararlo con el contenido de colágeno en mamíferos. En el músculo de organismos marinos el contenido de colágeno puede ser del 1 al 12%, mientras que en el caso del músculo de mamíferos el colágeno constituye entre el 20 y 25% de la proteína total (Sato *et al.*, 1986; Sikorski *et al.*, 1990)

Otra diferencia importante entre el colágeno del músculo de organismos marinos y del colágeno proveniente del músculo de mamíferos es el contenido de hidroxiprolina en su estructura. Es sabido que este iminoácido juega un papel importante en la estabilización de la molécula de

colágeno (Haard, 1995). Con respecto a esto, Sato *et al.* (1989) observaron que el contenido de hidroxiprolina en 22 especies de pescado estuvo en el rango de 4.7 al 10%, mientras que el contenido de colágeno en músculo de bovino es 10.9% (McClain *et al.*, 1971); estos resultados indicaron que en organismos marinos el contenido de hidroxiprolina es menor que en el caso del músculo de bovino, por lo que el colágeno contenido en el músculo de organismos marinos presenta una menor estabilidad que el colágeno del músculo de mamíferos. Con respecto a lo anterior, se ha observado que el colágeno del músculo de pescado es normalmente desnaturalizado a temperaturas relativamente bajas (Sikorski *et al.*, 1984).

Estructura del Músculo de Pescado

Se sabe que las fibras musculares del músculo de pescado son similares a las fibras del músculo estriado de animales terrestres (Howgate, 1979). Se ha establecido que las fibras musculares del músculo esquelético son enormes células individuales formadas durante el desarrollo embrionario, resultantes de la fusión de células individuales. El núcleo de las células integrantes permanece en esta gran célula y se dispone justo debajo de la membrana plasmática (Alberts *et al.*, 1983).

La mayor parte del citoplasma, una o dos terceras partes de su masa esta formado por miofibrillas, las cuales son los elementos contráctiles de la fibra muscular. Las miofibrillas son estructuras cilíndricas que

frecuentemente son tan largas como la célula muscular (Figura 4a). A su vez, cada miofibrilla esta formada por una cadena de minúsculas unidades contráctiles, llamadas sarcomeros, los cuales confieren a la miofibrilla su apariencia estriada. A gran aumento, en cada sarcomero puede verse una serie de bandas claras y oscuras (bandas A y bandas I). Cada sarcómero esta separado del siguiente por una línea situada en el centro de cada banda clara, denominada línea 'o disco Z y además contienen un ensamblaje de filamentos parcialmente superpuestos y paralelos; los filamentos delgados están formados por actina, con proteínas asociadas que están unidas a los discos Z en uno de los extremos del sarcómero. Dichos filamentos (Figura 4b).se superponen con los filamentos gruesos que se forman principalmente por miosina (Howgate, 1979; Alberts *et al.*, 1983)

En el caso del pescado, se puede decir que la carne o músculo esta constituido por bloques de músculo adyacente llamados miotomos, los cuales están separados por hojas de tejido que contienen colágeno, llamados mioseptos (Dunjasky, 1979; Suzuki, 1987). Este tipo de músculo presenta una estructura metamérica, la cual no se presenta en los tejidos musculares de mamíferos (Figura 5). La forma de los miotomos es característica para cada especie de pescado y también depende de la localización del miotomo en el músculo. Las células musculares o fibras musculares, las cuales son el elemento básico de la musculatura, se extienden entre dos mioseptos, en una forma más o menos paralela al esqueleto, con sus partes finales insertadas en los mioseptos (Dunajsky, 1979; Howgate, 1979).

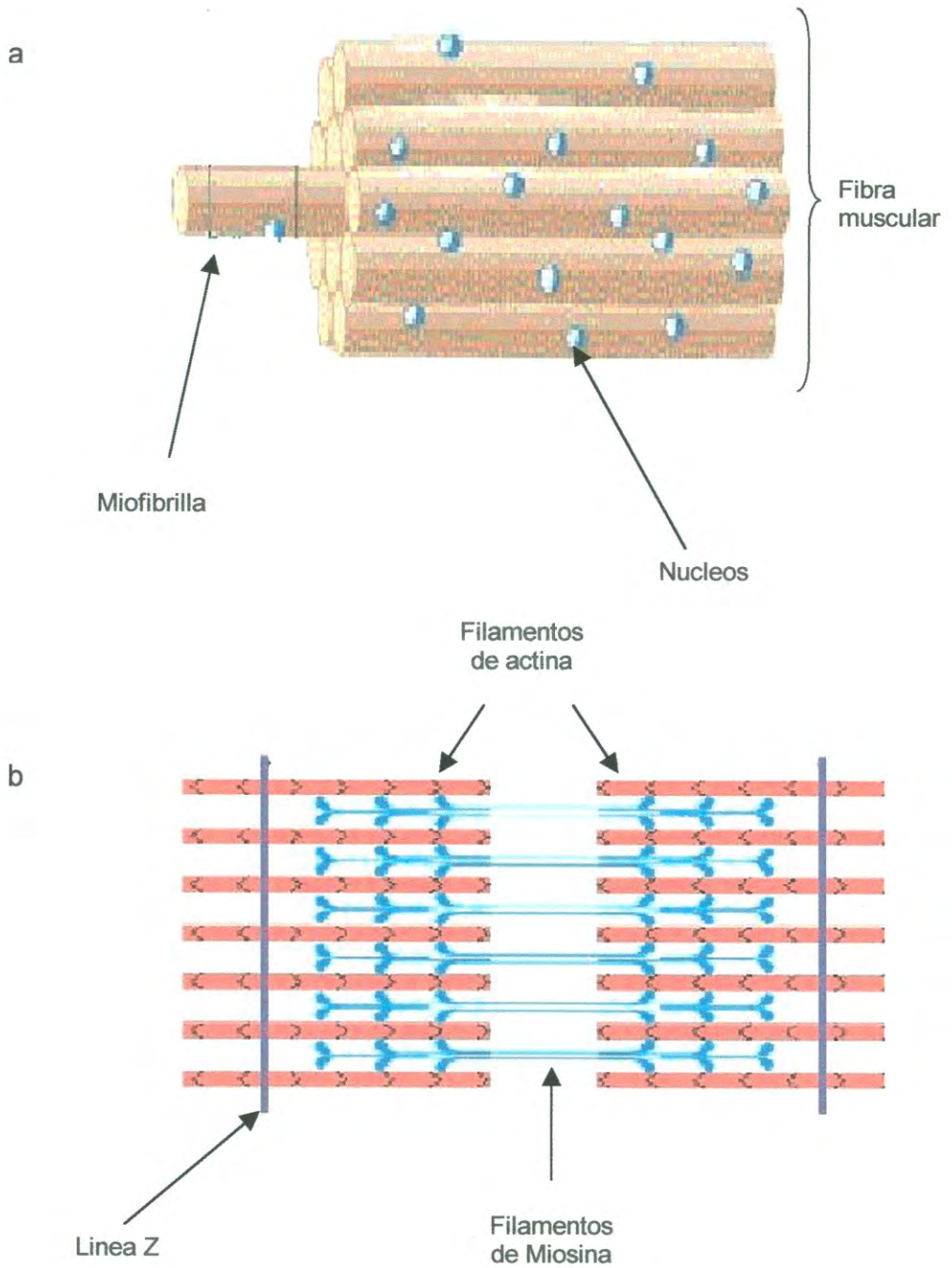


Figura 4. (a) Estructura de la Fibra Muscular. (b). Estructura del sarcomero
Fuente: Alberts *et al.* (1983).

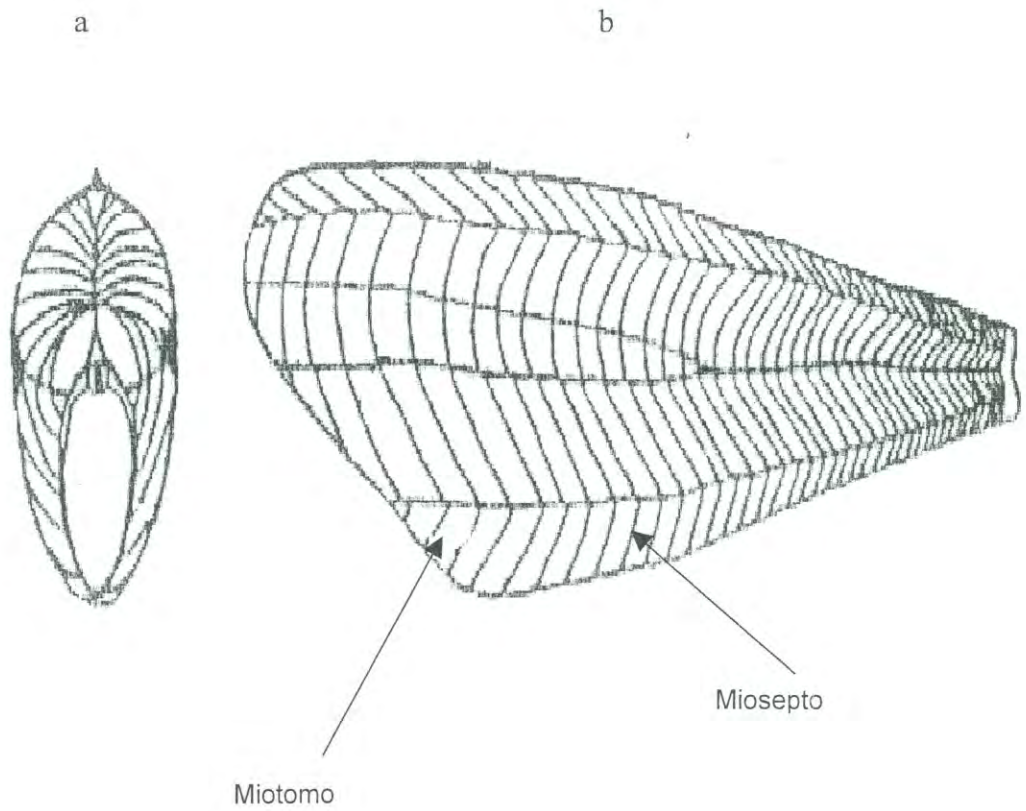


Figura 5. Estructura metamérica del músculo de pescado. a) corte dorsoventral.
b) corte lateral
Fuente: Dunajsky, (1979).

Congelación como Método de Preservación de Alimentos

El fin de toda técnica de preservación de los productos alimenticios, es prolongar el tiempo de conservación de los mismos, ya sea destruyendo los microorganismos o inhibiendo su actividad y multiplicación (Gomez-Pastrana, 2002).

[La congelación es una técnica de preservación de alimentos que provee una larga vida de anaquel a los mismos, y ha sido utilizada en una amplia variedad de productos alimenticios (Rahman, 1999). Esta técnica de preservación no detiene por completo las reacciones físicas y químicas que gobiernan el deterioro de los alimentos, pero disminuye la velocidad de dichas reacciones (George, 1993).]

Durante el proceso de congelación el agua disponible o congelable del alimento sufre un cambio de estado de líquido a sólido, convirtiendo la mayoría del agua en hielo; este cambio de estado se lleva a cabo debido a la remoción de calor latente del alimento (Rahman, 1999).

La disminución de temperatura alcanzada durante la congelación provoca que las velocidades de las reacciones de deterioro disminuyan y a su vez conforme la mayoría del agua se convierte en hielo, se lleva a cabo una disminución en la actividad de agua del alimento. Esto provoca una disminución en el crecimiento microbiano. Con relación a lo anterior, se puede decir que la congelación preserva a los alimentos a través de la combinación de reducción de temperatura y disminución en la actividad de agua (Garthwaite, 1997; Rahman, 1999).]

Velocidad de Congelación y Calidad

↳ Un factor importante en la calidad de los alimentos congelados es la velocidad de congelación. Generalmente cuando es rápida, se obtiene un alimento de mejor calidad que cuando es lenta. Esto se atribuye principalmente a las diferencias en el número y tamaño de los cristales formados durante el proceso de congelación. Es sabido que durante la congelación lenta, se producen cristales de hielo de mayor tamaño y en menor número al compararlos con un proceso de congelación rápida, lo que causa que dichos cristales ocasionen una mayor ruptura de las paredes celulares y pérdida de fluidos del alimento. En contraste con lo anterior, la congelación rápida produce un gran número de cristales de hielo de menor tamaño, por lo que la posibilidad de rompimiento de las paredes celulares se disminuye (Garthwaite, 1997). ↵

En el caso de la congelación de tejidos animales, la concentración de solutos dentro de las células es mayor que en la región extracelular, y conforme se da el cambio de estado del agua a hielo dicha concentración aumenta, por lo que en algún momento se lleva a cabo una diferencia en la presión osmótica entre la región intracelular y la extracelular, lo que causa entonces la difusión del agua del interior de la célula hacia la región extracelular para igualar o balancear la diferencia en la concentración de solutos. Esta deshidratación o pérdida de agua de la célula es a su vez acompañada por el encogimiento de la misma, el cual por lo regular no es grave. Sin embargo la velocidad de congelación afecta este proceso, ya que ↳ la congelación rápida provoca una menor deshidratación celular ↳ debido a

que durante este proceso el agua tiene menos tiempo para difundirse o salir de la célula. Por lo tanto el rompimiento de las paredes celulares también disminuye en comparación con el proceso de congelación lenta (Rahman, 1999).

Aspectos Generales de la Congelación de Pescado

- Según la especie, el pescado contiene de 60 a 80% de agua, y durante el proceso de congelación la mayoría del agua es convertida en hielo. En el agua contenida en el músculo de pescado existe de manera natural la presencia de sustancias coloidales como sales y otros compuestos, las cuales sufren un efecto de concentración conforme el agua se convierte en hielo durante el proceso de congelación. Este efecto de concentración de solutos provoca una depresión o disminución del punto de congelación del agua contenida en el músculo; de manera general, se → maneja que el punto de congelación del agua en el músculo de pescado es de -1 a -2°C (Keizer, 1995; Garthwaite, 1997).
- La mayoría del agua contenida en el músculo de pescado es congelada entre -1 y -5°C ; este rango de temperatura es conocido como la “zona de congelación” o “zona crítica” (Heen y Karsti, 1965; Dyer, 1971). Sin embargo, aun a temperaturas de -30°C solo del 90 al 95% del agua es realmente congelada, donde la porción de agua sin congelar es llamada agua ligada, la cual se encuentra unida químicamente a sitios específicos tales como grupos amino y carboxilos de proteínas y nunca esta disponible para ser congelada (Jhonston *et al.*, 1994; Garthwaite, 1997).

Como ya se menciona anteriormente, es sabido que la velocidad de congelación tiene cierto efecto en la calidad de los alimentos congelados, debido a la diferencia en el número y tamaño de los cristales formados durante el proceso de congelación. Sin embargo, varios autores mencionan que en el caso del pescado las paredes celulares pueden ser consideradas lo suficientemente elásticas para soportar el daño causado por la formación de cristales grandes durante un proceso de congelación lenta.

Los cambios en cuanto a pérdida de fluidos y de textura en el músculo de pescado, pueden ser atribuidos principalmente a la desnaturalización proteica causada por la formación del hielo durante el proceso de congelación y no solamente a la dimensión o tamaño de dichos cristales. La velocidad de desnaturalización proteica durante el proceso de congelación está íntimamente ligada con la disminución en temperatura y con la concentración de enzimas y otros compuestos tales como sales.

Al aumentar la concentración de enzimas incrementa la velocidad de desnaturalización, mientras que dicha velocidad es reducida conforme la temperatura disminuye; es entonces debajo del punto de congelación del agua donde los factores concentración y temperatura están muy relacionados, ya que conforme la mayor parte del agua se convierte en hielo a la vez aumenta la concentración de enzimas en solución, por lo que se dice que el efecto combinado de los factores concentración-temperatura tiene su velocidad máxima de desnaturalización entre -1 y 2 °C. Por lo tanto, con la finalidad de reducir el efecto de desnaturalización proteica en el músculo de pescado se debe de emplear el menor tiempo posible en este

rango de temperatura durante el proceso de congelación (Jhonston, 1994; Keizer, 1995; Garthwaite, 1997).

Sistemas de Congelación

No existe un sistema de congelación el cual sea capaz de cubrir todas las necesidades de calidad de los alimentos congelados, ya que existen una gran variedad de productos alimenticios así como también los diferentes sistemas de congelación poseen diversas características de proceso (Hung y Kim, 1996). El criterio utilizado para seleccionar un sistema de congelación en específico, está relacionado con el tipo de producto a congelar, aspectos económicos y de operación del equipo y con la calidad que se desea que tenga el producto terminado (Ashrae, 1994). En lo concerniente a la congelación de organismos marinos los sistemas de congelación más utilizados son la congelación por convección de aire, por contacto de placas y la congelación criogénica (Keizer, 1995; Garthwaite, 1997). A continuación se hace una descripción de dichos sistemas.

→ **Congelación por convección de aire.** En este tipo de sistemas, la temperatura del alimento es reducida con aire frío que pasa a través del alimento. Este sistema de congelación puede dividirse en congelación por túnel, bandas y por lecho fluidizado, esto dependiendo de cómo interactúa el aire frío con el alimento (Hung, y Kim, 1996).

El tipo de congelador por convección de aire más simple es el de túnel, en el cual el aire es producido por ventiladores y posteriormente dicho

aire es enfriado y pasa sobre el producto que esta situado generalmente en cajas o estantes estacionarios. La velocidad del aire utilizada en este sistema debe ser alrededor de los 5 m/seg, con la finalidad de obtener una transferencia de calor adecuada (Keizer, 1995; Garthwaite, 1997).

El otro tipo de congelación por convección de aire es el de banda, el cual esta equipado con una o más bandas, hechas generalmente de acero inoxidable, en las cuales el pescado es transportado a través del congelador. Los congeladores de banda, generalmente son utilizados para congelar productos individualmente (IQF por sus siglas en ingles) tales como lo son cierto tipo de crustáceos, filetes de pescado y productos de valor agregado como porciones de pescado empanizado (Keizer, 1995; Garthwaite, 1997).

Los congeladores de lecho fluidizado son el otro tipo de congelación por convección, donde el aire tiene la función adicional de fluidizar el producto, lo que significa que el aire frío es impulsado por debajo del producto, haciendo que este se levante y flote; este efecto se logra en alimentos que tengan aproximadamente la misma dimensión y forma. Este tipo de sistemas es muy utilizado para congelar productos individualmente (IQF) en crustáceos como lo es el camarón (Keizer, 1995; Garthwaite, 1997; Rahman, 1999).

→ **Congelación por contacto de placas.** En este tipo de congelación se utilizan placas metálicas fabricadas generalmente de aluminio, las cuales entran en contacto directo con el producto o con su empaque; las placas pueden estar dispuestas de manera vertical u horizontal y estas son

enfriadas con un refrigerante, el cual es generalmente bombeado a través de las placas. La transferencia de calor se da tanto en la parte superior como la inferior de las placas y la congelación es alcanzada debido al contacto directo entre las placas y el alimento. Por lo general se aplica presión hacia las placas, para mejorar así el contacto entre las mismas y de esta manera se incrementa el coeficiente de transferencia de calor entre la placa y el producto. Este tipo de sistema es utilizado para congelar bloques de pescado y no es tan versátil como los congeladores por convección de aire (Keizer, 1995; Garthwaite, 1997).

➤ **Congelación criogénica.** En la congelación criogénica el producto tiene contacto directo con el refrigerante, el cual es usualmente nitrógeno líquido o dióxido de carbono líquido o sólido. En este sistema el producto puede ser puesto en contacto con el medio criogénico ya sea por la aspersión del mismo sobre el producto o por la inmersión del producto en el líquido criogénico. Generalmente en el caso del pescado este es transportado en una banda a contracorriente del flujo del gas criogénico, y la extracción de calor del producto es debida a la evaporación del líquido criogénico. Este tipo de congelación es generalmente utilizada en el caso de productos de valor agregado, como lo son el camarón y las langostas (Keizer, 1995; Garthwaite, 1997; Rahman, 1999).

Cambios en la Calidad de Pescado Almacenado en Congelación

Durante el almacenamiento en congelación del pescado es posible disminuir algunas deterioraciones en su calidad, sobre todo las que están relacionadas con los microorganismos y con algunos procesos bioquímicos. Sin embargo se ha demostrado que ciertas características organolépticas del músculo de pescado se ven afectadas durante un almacenamiento en congelación (Haard, 1990).

Con respecto a lo anterior, el deterioro del sabor, que se manifiesta generalmente como pérdidas y sabores "rancios" o "amargos" se cree que están relacionados con la formación de compuestos de bajo peso molecular generados de la oxidación de lípidos o de la degradación de ciertas proteínas en el músculo de pescado almacenado en congelación. Por otro lado los cambios indeseables en color y apariencia tales como la pérdida de intensidad del color o apariencia opaca del tejido, desarrollo de "quemaduras" por congelación y deshidratación de la superficie del músculo de pescado generalmente son debidos a cambios irreversibles que ocurren en ciertas proteínas que actúan como pigmentos, como por ejemplo la mioglobina y la oximioglobina que cambian hacia metamioglobina en la carne de atún congelado (Shenouda, 1980).

Otro parámetro de calidad que se puede ver afectado durante el almacenamiento en congelación del músculo de pescado es la textura (Dunajsky, 1979; Matsumoto, 1979; Shenouda, 1980; Love, 1988). Este parámetro es considerado como uno de los más importantes en la calidad de

los organismos marinos congelados, ya que en muchas especies de pescado, al no poseer un sabor fuerte o característico, es la textura el factor que influye en la aceptabilidad del consumidor (Hyldig y Nielsen, 2001).

Los cambios en la textura del pescado almacenado en congelación generalmente se ven reflejados en un endurecimiento del músculo y pérdida de succulencia y jugosidad de la carne y además de verse afectada su propiedad en la retención de agua. Dichos cambios son atribuidos a la desnaturalización y agregación que se lleva a cabo principalmente en la fracción miofibrilar de las proteínas del músculo de pescado almacenado en congelación (Dyer, 1951; Matsumoto, 1979; Shenouda, 1980; Haard, 1990). Montero y Borderias (1992) observaron que en músculo de merluza, además de las proteínas miofibrilares el colágeno también participa en la formación de agregados y en el endurecimiento posterior de los filetes almacenados en congelación. Por otro lado, Howgate (1977) indica que además de la influencia que tiene la agregación de las proteínas miofibrilares en el endurecimiento del músculo de pescado, este puede ser causado también por la degradación del retículo sarcoplasmico, ya que dicho retículo al ser degradado actúa como una especie de cemento que mantiene juntas a las miofibrillas y provoca el fenómeno de endurecimiento.

Desnaturalización Proteica en Músculo de Pescado

Almacenado en Congelación

Muchos de los cambios indeseables que se llevan a cabo en el pescado congelado son atribuidos principalmente a la desnaturalización de las proteínas del músculo. Con respecto a esto, existen varios mecanismos propuestos en dicha desnaturalización (Sikorski *et al.*, 1976; Matsumoto, 1979; Shenouda, 1980). Los factores que la causan se discutirán a continuación.

Redistribución del Agua y Concentración de Solutos

De acuerdo a Lewin (1974) las reacciones de conformación y desconformación en los biopolímeros están reguladas en gran parte por el grado de ordenamiento de las moléculas de agua en el ambiente circundante de dichos biopolímeros. Además, la estabilidad de la estructura tridimensional de las proteínas es altamente dependiente de los enlaces de hidrógeno, muchos de los cuales están relacionados con moléculas de agua. En el caso de la congelación, durante la formación de cristales, se lleva a cabo una redistribución del agua, que ocasiona una deshidratación de las moléculas de proteína, ya que el agua de hidratación de las proteínas migra y empieza a formar parte de los cristales de hielo. Esto resulta en un rompimiento de los enlaces de hidrógeno así como también se lleva a cabo la exposición de ciertas regiones de la molécula de proteína; consecuentemente al estar estas regiones vulnerables o desprotegidas se

pueden llevar a cabo interacciones entre la misma molécula de proteína o entre moléculas vecinas, lo que da lugar a interacciones proteína-proteína y consecuentemente la agregación de dichas moléculas (Matsumoto, 1979; Shenouda, 1980).

Teóricamente el efecto de la concentración de solutos (principalmente sales) sobre la desnaturalización proteica se basa en el efecto que tienen estas sales en algunas uniones que ayudan a estabilizar la estructura proteica, como lo son las fuerzas de Van der Waals y las fuerzas hidrofóbicas. Al incrementar la concentración de sales durante el proceso de congelación, dichas sales pueden llegar a competir con los enlaces electrostáticos existentes en la estructura proteica así como también se puede dar el rompimiento de algunos de ellos, lo que además afecta a algunas fuerzas de estabilización (fuerzas de Van der Waals e hidrofóbicas) lo que provoca entonces cambios conformacionales en la estructura proteica (Shenouda, 1980). Matsumoto (1979) indica que la concentración de solutos durante el proceso de congelación induce además cambios en el pH y la fuerza iónica, lo cual provoca la disociación y/o desnaturalización de la estructura proteica. Con relación a esto en estudios más recientes, Badii y Howell (2002) concluyeron que la desnaturalización de las proteínas del músculo de bacalao almacenado en congelación fue causada principalmente por la formación de cristales y la resultante concentración de solutos.

Hidrólisis y Oxidación de Lípidos

Durante el almacenamiento en congelación de músculo de pescado picado o entero, la presión ejercida por los cristales de hielo formados en la estructura celular, puede causar el rompimiento de membranas y la deformación de otros organelos, manifestado por la desorientación o liberación de algunos lípidos y proteínas de sus compartimentos naturales, para así crear la posibilidad de formación de complejos entre los lípidos y las proteínas diferentes a los encontrados de manera natural en la membrana celular; dichas interacciones pueden llegar a formar complejos insolubles de lípido-proteína, lo que afecta la estructura proteica nativa (Shenouda y Pigott, 1977; Shenouda, 1980).

Por otro lado, se ha observado que la formación de ácidos grasos libres puede llegar a provocar un endurecimiento en el músculo de pescado, debido a que podrían llegar a interactuar con las proteínas del músculo por medio de interacciones hidrofóbicas; se cree que los ácidos grasos libres atacan principalmente a las proteínas miofibrilares, mientras que su unión con las proteínas sarcoplasmicas se da en un menor grado (Shenouda, 1980). Sikorski *et al.* (1976) proponen que los ácidos grasos libres se unen hidrofólicamente o hidrofílicamente, para apropiarse de ciertos sitios en la superficie de la estructura proteica. Consecuentemente la presencia de estos provoca que se dé la formación de regiones hidrofóbicas en lugar de regiones polares cargadas alrededor de la superficie de la proteína, lo que ocasiona un decremento en la solubilidad de las proteínas en soluciones amortiguadoras acuosas. Se ha demostrado que la formación de estos

ácidos grasos libres, se realiza principalmente por medio de la fosfolipasa A₂. Por ejemplo Ohshima *et al.* (1984) observaron que al adicionar fosfolipasa A₂ a músculo de bacalao almacenado a -16°C se promovió la pérdida de solubilidad de las proteínas miofibrilares. Por otro lado Chawla *et al.* (1988) reportaron que la actividad microsomal de la fosfolipasa se incrementó con el tiempo de almacenamiento de músculo de bacalao a -30°C.

La oxidación de lípidos en pescado congelado generalmente provoca una disminución en la vida de anaquel de muchas especies, especialmente de las que contienen un alto contenido de grasa debido a reacciones de rancidez; junto con el problema de rancidez, los lípidos oxidados pueden llegar a interactuar con las proteínas, para causar cambios indeseables en las propiedades funcionales de las mismas y provocar así el endurecimiento del músculo.

Se sabe que los lípidos contenidos en el músculo de pescado son susceptibles a la rancidez oxidativa durante el almacenamiento en congelación, debido a que estos contienen una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados con cuatro, cinco y hasta seis dobles enlaces (Shenouda, 1980). En estudios recientes, Srinivasan *et al.* (1997) observaron un incremento en las sustancias reactivas con el ácido tiobarbiturico (TBARS por sus siglas en inglés) en el músculo de langostinos (*Machrobrachium rosenbergii*) almacenado en congelación. Sin embargo estos autores no observaron una relación positiva entre la oxidación de lípidos y el endurecimiento del músculo de langostino. Por otro lado, Lou *et al.* (2001) encontraron que en filetes de pez paleta (*Polyodon spathula*) la oxidación de

lípidos se mantuvo estable hasta el séptimo mes de almacenamiento de los filetes en congelación.

Varma (1967) propone que existen dos mecanismos de reacción entre los lípidos oxidados y las proteínas. Uno de ellos está relacionado con la formación de radicales libres inestables que son intermediarios de la peroxidación de lípidos; y que pueden llegar a causar polímeros insolubles en agua, los cuales son formados a través de enlaces cruzados entre las proteínas. El otro mecanismo está relacionado con la formación de productos de la oxidación de lípidos, como el malonaldehído, propanal y hexanal, los cuales pueden reaccionar covalentemente con las cadenas laterales de las proteínas, principalmente histidina, metionina, cisteína y lisina.

Formación de Formaldehído por la Enzima TMAOasa

El óxido de trimetilamina (TMAO) es un compuesto que se presenta de manera natural en muchos organismos marinos. El papel a nivel fisiológico del TMAO es mantener el balance de nitrógeno a través de su excreción (Shenouda, 1980).

Cuando el TMAO es degradado enzimáticamente, da lugar a la formación de dimetilamina (DMA) y formaldehído (FO); dichos compuestos de degradación han sido identificados en más de 30 especies de pescado (Sikorski y Kostuch, 1982). Los peces pertenecientes al orden de los gadiformes tienen la particularidad de producir grandes cantidades de DMA y FO que otros grupos de pescado, debido a que la sangre y el hígado de los

gadoides posee una alta actividad de la enzima TMAOasa. Esto provoca que en este tipo de especies de pescado sé de un acelerado endurecimiento de su músculo, además de que generalmente presente una relación positiva entre el endurecimiento del músculo y la formación de DMA y FO durante el almacenamiento en congelación (Rehbeein, 1988). Por otro lado, Careche *et al.* (1998) observaron que el nivel de formaldehído libre en el músculo de bacalao es dependiente de la temperatura de almacenamiento, encontrándose un mayor nivel de formaldehído en el músculo almacenado a -30°C que en el almacenado a -20°C .

Se sabe que el formaldehído (FO) es un compuesto muy reactivo, capaz de interactuar con muchos grupos funcionales de las proteínas (Sikorski *et al.*, 1976). A nivel molecular, el mecanismo por el cual el FO afecta a las proteínas esta relacionado con la capacidad que posee el FO para unirse covalentemente a varios grupos funcionales en las proteínas, lo que causa una desconformación de la estructura acompañada por la formación de enlaces cruzados entre las cadenas laterales de proteína vía puentes metileno (Shenouda, 1980).

Descongelación de Pescado

└ La descongelación es un proceso en el que se lleva a cabo una transferencia de calor hacia el producto alimenticio congelado para cambiar de estado el hielo formado en el alimento durante el proceso de congelación

(Seafood ITO, 2000). De acuerdo a Fennema (1968) el proceso de descongelación es un parámetro que influye en la calidad de los alimentos congelados.」

En el caso del pescado, es recomendable que el sistema de descongelación utilizado evite un sobrecalentamiento localizado en el músculo, un goteo excesivo y el crecimiento de microorganismos (Garthwaite, 1997).

→ El proceso de descongelación se considera que ha llegado a su fin cuando el músculo de pescado no contiene agua en estado sólido, lo cual ocurre generalmente cuando al centro del producto se alcanza -1°C (Seafood ITO, 2000).」

└ Los métodos de descongelación se pueden clasificar en dos grupos, esto de acuerdo a la manera de aplicación del calor hacia el alimento. En el primer grupo, el calor es aplicado en la superficie del alimento con la subsecuente transferencia de calor hacia todo el producto y en el segundo grupo el calor puede ser aplicado directamente hacia el interior del producto.」
Dentro del primer grupo se encuentran los métodos que usan como medio de calentamiento aire o agua y en el segundo grupo están los que usan corriente eléctrica o intercambio de campos eléctricos, donde los más utilizados son el calentamiento dieléctrico, el calentamiento por resistencias eléctricas y el calentamiento con microondas; en el caso de la descongelación de pescado, los métodos pertenecientes al segundo grupo son los menos utilizados (Keizer, 1995).」

Cuando se usa aire o agua como medio de calentamiento es recomendable que la temperatura del medio no sobrepase los 20°C y la superficie del pescado debe de ser mantenida a menores temperaturas (Keizer, 1995; Garthwaite, 1997).

Rahman (1999) menciona que las variaciones en los métodos de descongelación tienen un limitada pero no insignificante influencia en la calidad final del producto. Sin embargo puntualiza que en productos cárnicos (ejemplo: pescado, pollo y res) donde la textura es un parámetro de calidad importante, la velocidad de descongelación puede jugar un papel importante en la calidad final del producto, y se recomienda la descongelación lenta debido a que esta permite que en el tejido descongelado, el agua tenga un mayor tiempo para volver a su posición original. ←

MATERIALES Y METODOS

Obtención de la Muestra

Se obtuvieron organismos de cazón (*Mustelus lunulatus*), capturados en Guaymas Sonora, en el mes de enero del 2003. Inmediatamente después de la captura estos se enhielaron en capas alternadas (hielo-producto) y fueron trasladados al laboratorio de Procesamiento de Productos Marinos del DIPA (Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos) donde fueron eviscerados y fileteados manualmente. El tiempo transcurrido desde la captura al traslado al laboratorio no fue mayor a 8 horas.

Análisis Proximal

Para el análisis proximal se emplearon tres organismos, realizándose los análisis correspondientes por triplicado. El contenido de humedad y cenizas se determinó de acuerdo a la metodología establecida por la AOAC (1990). La determinación de proteína se llevó a cabo en un equipo Micro-Kjeldhal (Rapid Distillation Unit, LABCONCO), empleándose como factor de conversión 6.25. El contenido de lípidos se determinó de acuerdo a lo establecido por Woyewoda *et al.* (1986).

→ Preparación de la Muestra

Se utilizaron 10 organismos para la realización de este estudio con un peso y talla promedio de 856 ± 0.23 g y 60.9 ± 0.1 cm respectivamente, de los cuales se obtuvieron 20 filetes. Cada filete se dividió en tres secciones de aproximadamente 9 cm de largo y 2.5 cm de ancho. Se tomó al azar una sección de filete de 3 organismos para realizar los análisis correspondientes al día cero; las secciones restantes de los filetes se colocaron en bolsas plásticas y se sometieron a su respectivo proceso de congelación. Posteriormente se tomó muestra, una sección de filete de 3 organismos y se aplicaron tres diferentes métodos de descongelación. El muestreo se llevó a cabo durante un periodo de almacenamiento de tres meses.

Congelación

– **Congelación por Inmersión**

Para llevar a cabo este proceso, se utilizó una mezcla frigorífica compuesta por acetona y dióxido de carbono sólido. La temperatura de dicha mezcla durante el proceso de congelación fue de -40°C . El proceso de congelación llegó a su fin cuando el centro del filete alcanzó -20°C ; dicha temperatura se midió utilizando un termopar (Corning Inc, Big Flags, NY). Una vez congelado el producto se almacenó a $-15 \pm 2^{\circ}\text{C}$ empacado en bolsas selladas de polietileno de baja densidad (calibre 300) ya que dicho tipo de empaque es impermeable al oxígeno y vapor de agua (Soto, 2002).

— Congelación por Convección de aire

Este proceso se llevó a cabo en un cuarto de congelación convencional. La temperatura en el interior del cuarto de congelación fue de $-15 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los filetes de pescado fueron empacados en bolsas de polietileno comerciales (Ziplock, Richmond, VA). El seguimiento del proceso de congelación se llevó a cabo midiendo la temperatura en el centro del filete utilizando un termopar (Corning Inc, Big Flags, NY).

Descongelación

Se utilizaron tres diferentes métodos de descongelación sobre los filetes de cazón. En la Tabla 1 se muestran detalladamente los métodos de descongelación utilizados en este estudio.

Goteo

El porcentaje de goteo se determinó de acuerdo a lo establecido por Santos y Regenstein (1990). Esta prueba se realizó con la finalidad de obtener información relacionada con la pérdida de agua del músculo de cazón descongelado. Las secciones de los filetes de pescado congeladas se pesaron y fueron sometidas a los diferentes métodos de descongelación, utilizándose tres organismos diferentes por cada tratamiento de descongelación; esta determinación se realizó por triplicado.

→ **Tabla 1.** Métodos de descongelación aplicados sobre el músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*)

MÉTODO DE DESCONGELADO	CONDICIONES
Recipiente con agua corriente	Se colocaron tres secciones de filete en su empaque en recipiente con agua corriente a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$).
Baja temperatura	Se colocaron tres secciones de filete en cuarto refrigerado con una temperatura de $10 \pm 2^\circ \text{C}$.
Horno de Microondas	Se colocaron tres secciones de filete en horno de microondas, (MS-74NE), 2450 MHz de potencia, programado en descongelación automática por peso

El proceso de descongelación se consideró terminado cuando el centro del filete alcanzo una temperatura de -1 a 1°C medida con un termopar (Corning, Inc, Big Flags, N.Y.)

La muestra descongelada se pesó y el porcentaje de goteo se expresó como:

$$\% \text{ Goteo} = \frac{\text{Peso inicial muestra congelada} - \text{peso final}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

→ Análisis de Textura

Se midió la fuerza requerida para cortar el tejido del músculo de cazón sometido a los diferentes métodos de congelación y descongelación. Cada sección de filete se cortó en piezas de aproximadamente 20 x 20 x 10 mm³ (largo y ancho), con el fin de uniformizar el tamaño de muestra. La medición de la fuerza al corte se registró en un textuómetro Instron, (modelo 4465, Canton, Massachusets) con una celda Warner-Bratzler, con capacidad de carga de 500 kg. La velocidad de corte empleada fué de 20 mm/min (Lou *et al.*, 2000). Se utilizaron tres organismos para la determinación de la resistencia al corte y el valor promedio de cuatro repeticiones se reportó como los Newtons (N) requeridos para cortar el músculo de cazón.

Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

La desnaturalización térmica de las proteínas del músculo de cazón sometido a los diferentes métodos de congelación y descongelación se midió en un calorímetro diferencial de barrido (Perkin-Elmer DSC-7, Lancaster, PA). El equipo se calibró utilizando Indio como estándar. Se pesaron de 50 a 65 mg de músculo de cazón y la muestra se colocó en crisoles de acero inoxidable sellados herméticamente. Se utilizó un barrido de temperatura de 26°C a 125°C, con una velocidad de calentamiento de 10°C por minuto (Srinivasan *et al.*, 1997). El cambio en la entalpía total (ΔH , J/g) asociado con la desnaturalización térmica de las proteínas se estimó midiendo el área bajo la curva de la endoterma de transición y se registró la temperatura máxima del pico de la endoterma. Se utilizaron tres organismos, y el análisis se realizó por triplicado.

Análisis Electroforético

Con la finalidad de obtener el perfil electroforético de las proteínas del músculo de cazón sometido a los procesos de congelación y descongelación se utilizó un sistema de extracción de proteínas con urea 8M, fenilmetil-sulfonil fluoruro 0.1mM, ácido etilendiamino tetracético (EDTA), azida de sodio 0.01% y KCl 0.6M. Para la extracción de las proteínas se mezclaron 3 g de muestra con 30 mL de solución de urea, y fue homogeneizada por dos

minutos en un homogeneizador de tejido Biospec modelo 133 (Biospec Co, Bartlesville, OK), registrándose el volumen del extracto.

Una vez que se obtuvo el extracto de urea, este se mezcló con una solución amortiguadora en condiciones desnaturizantes [presencia de mercaptoetanol (ME)] y en condiciones desnaturizantes y reductoras [ausencia de mercaptoetanol (ME)], en una proporción 1:3 (muestra:solución amortiguadora). La mezcla, se calentó durante cuatro minutos en agua a ebullición y se almaceno en congelación para su posterior análisis. La composición de la solución amortiguadora de la muestra fue la siguiente:

Para condiciones desnaturizantes: 25% de Tris-HCl, pH 6.8, 40% de SDS al 10%, 20% de glicerol, 15% de agua desionizada y 0.03% de azul de bromofenol.

Para condiciones desnaturizantes y reductoras: 25% de Tris-HCl, pH 6.8, 40% de SDS al 10%, 20% de glicerol, 10% de mercaptoetanol, 5% de agua desionizada y 0.03% de azul de bromofenol.

Los análisis electroforéticos se realizaron de acuerdo al método de Laemmli (1970), utilizando un equipo MINIPROTEAN III (Biorad Laboratories Chemical, Hercules, CA). Los geles superior y concentrador se prepararon al 4 y 10 % de acrilamida respectivamente. Se aplicaron 100 µg de proteína presentes en el extracto con urea. La corrida de electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente a un voltaje de 120 volts. Las bandas fueron teñidas con azul de comassie al 0.1 %.

Con la finalidad de obtener el número de bandas promedio y la proporción de estas en cada extracto, los geles fueron analizados en un

densitómetro de imágenes modelo GS-710 (Bio-Rad Laboratories., Hercules, CA). Posteriormente se llevo a cabo un análisis de imagen con el programa Multi-Analyst /PC).

Estudio Histológico

El tejido del músculo de cazón sin congelar y el sometido a los diferentes métodos de descongelación se observó a través de microscopia óptica con la finalidad de observar los cambios en la estructura muscular del cazón bajo los diferentes tratamientos.

El músculo de cazón se fijó en solución fijadora de Bouin para posteriormente ser deshidratado en un procesador de tejidos (TISSUE-TEK II, Mishawaka, IN). El proceso de deshidratación utilizado se realizo de acuerdo a lo propuesto por Prophet y Mills, (1992). El protocolo de deshidratación se muestra en la Tabla 2. Posteriormente, los tejidos provenientes de la deshidratación se colocaron en un incluser de parafina (HistoEmbedder, Leica Nussloch, Germany) para obtener bloques con el tejido en parafina. A partir de dichos bloques se prepararon secciones (5 micras de grosor) con un microtomo (AO, Scientific Instruments, Bufalo, NY), para después teñir dichas secciones.

En este estudio se utilizaron dos tipos de tinciones diferenciales, una de ellas fue la de Hematoxilina y Eosina, (Prophet y Mills, 1992), la cual permite elucidar la estructura general del músculo de cazón.

Tabla 2. Protocolo de deshidratación para el músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*)

REACTIVO	TIEMPO (horas)
Etanol 70%	2
Etanol + butanol 70%	3
Etanol + butanol 83%	3
Etanol + butanol 95%	1.5
Etanol + butanol 95%	1.5
Etanol + butanol 100%	2
Etanol 100%	2
Alcohol xileno	1
Xileno	1
Xileno	1
Parafina	1
Parafina	1

La otra tinción utilizada fue la tricrómica de Masson (1929) para diferenciar los componentes del tejido conectivo del músculo de cazón; por medio de esta técnica de tinción, el tejido conectivo se torna a un color azul. Los protocolos utilizados para cada tinción se muestran en las Tablas 3 y 4. Para realizar las observaciones se utilizó un microscopio compuesto (ICS, Estándar 25, Jena, Germany) conectado a un sistema fotográfico.

Análisis Estadístico

En este estudio se utilizó un diseño factorial con tres factores o efectos principales: proceso de congelación, con dos niveles (congelación por inmersión y congelación por convección de aire), método de descongelación, con tres niveles (descongelación en microondas, agua y baja temperatura) y tiempo de almacenamiento, con cuatro niveles (tiempo cero, mes 1, mes 2 y mes 3).

Se realizó un análisis de varianza y cuando no existió una interacción entre los tres factores o efectos principales, se realizó una comparación de medias por Tukey-Kramer. Se utilizó un nivel de significancia del 5% para las variables respuesta evaluadas en los análisis de calorimetría, textura y goteo. Se utilizó el programa estadístico JMP versión 4.0.4. (Cary, NC).

Tabla 3. Protocolo de tinción de Hematoxilina y Eosina de Harris

REACTIVO	TIEMPO O ZAMBULLIDAS
Xileno 1	5 minutos
Xileno 2	5 minutos
Etanol 100%	32 zambullidas
Etanol 95 %	32 zambullidas
Etanol 70%	32 zambullidas
Etanol 50 %	32 zambullidas
Agua destilada	32 zambullidas
Hematoxilina de Harris	15 minutos
Agua corriente	5 minutos
Alcohol ácido 1%	1 a 2 zambullidas
Lavar en agua corriente	
Agua amoniacal	3 minutos
Agua corriente	10 minutos
Etanol 80%	2 minutos
Solución eosina	2 minutos
Agua destilada	32 zambullidas
Etanol 50 %	32 zambullidas
Etanol 70%	32 zambullidas
Etanol 95 %	32 zambullidas
Etanol 100%	32 zambullidas
Xileno 2	5 minutos
Xileno 1	5 minutos

Tabla 4. Protocolo de la tinción tricrómica de masson

Reactivo	Tiempo o zambullidas
Xileno 1	5 minutos
Xileno 2	5 minutos
Etanol 100%	32 zambullidas
Etanol 95 %	32 zambullidas
Etanol 70%	32 zambullidas
Etanol 50 %	32 zambullidas
Agua destilada	32 zambullidas
Hematoxilina de Weigert	10 minutos
Lavar agua corriente	10 minutos
Enjuagar agua destilada	30 segundos
Escarlata de Biebrich	7 a 10 minutos
Enjuagar agua destilada	30 segundos
Solución de ácidos	10 a 15 minutos
Azul de anilina	5 a 10 minutos
Acido acético 1%	3 a 5 minutos
Agua destilada	32 zambullidas
Etanol 50 %	32 zambullidas
Etanol 70%	32 zambullidas
Etanol 95 %	32 zambullidas
Etanol 100%	32 zambullidas
Xileno 2	5 minutos
Xileno 1	5 minutos

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Análisis Proximal del Músculo de Cazón

La composición química proximal del músculo de cazón, (*Mustelus lunulatus*) obtenida en este estudio fue la esperada al compararla con lo reportado por otros autores. El contenido de proteína fue de $22.9\% \pm 0.33$, ← humedad $75.2\% \pm 0.6$, cenizas $1.1\% \pm 0.1$ y lípidos $0.7\% \pm 0.2$. Burgos (1987) reportó la composición promedio del músculo de cazón con un 66.5% de humedad, 21.3% de proteína y 0.2% de lípidos. Por otro lado Meza (2000) reportó la composición proximal de cazón con un 16% de proteína, 80.7% de humedad, 0.9% de lípidos y 1.6% de cenizas.

Con respecto a lo anterior, es sabido que la composición química del músculo de pescado depende de factores tales como la especie, tamaño, madurez, sexo y actividad del espécimen. En muchas ocasiones se pueden llegar a encontrar grandes diferencias en la composición proximal, inclusive entre organismos de una misma especie. Dichas diferencias por lo general son atribuidas al estado de desarrollo sexual del organismo, así como también a las condiciones de alimentación (Dunajski, 1979). También es sabido que el músculo de pescado contiene diferentes tipos y tamaños de células, por lo que también se pueden llegar a encontrar diferencias en un mismo organismo de acuerdo a la localización anatómica en el músculo. Por ejemplo, se ha observado que la proporción de músculo blanco y de músculo

oscuro difiere continuamente a lo largo del cuerpo y es bien sabido que el músculo oscuro el cual contiene células más angostas contiene menos proteína y muchos más lípidos que el músculo blanco. Además la distribución de acuerdo al tamaño de las células del músculo influye en el radio de materia extracelular e intracelular, lo que en consecuencia ocasiona que cambie la concentración de la mayoría de los componentes en las diferentes partes de la musculatura (Love, 1988; Dunajski, 1979).

Proceso de Congelación

En los filetes de cazón congelados por inmersión con la mezcla frigorífica de acetona + dióxido de carbono sólido (-40 ± 2 ° C) se observó que sus centros alcanzaron los -22 ° C en un lapso no mayor a los cinco minutos (Figura 6). Para el caso de los filetes de cazón congelados por convección de aire (15 ± 2 ° C) los centros de los filetes de cazón alcanzaron -14.7 ° C en 5.8 horas (Figura 7).

Resulta difícil exponer una definición exacta de lo que es un proceso de congelación rápida con el objetivo de diferenciarlo con un proceso de congelación lenta; una alternativa para esto es comparar la velocidad del movimiento del frente de hielo a través del alimento (mm/h). Sin embargo la velocidad con que se mueva el frente de hielo va a depender de varios factores, como lo son la forma y propiedades térmicas del músculo de pescado y del tipo

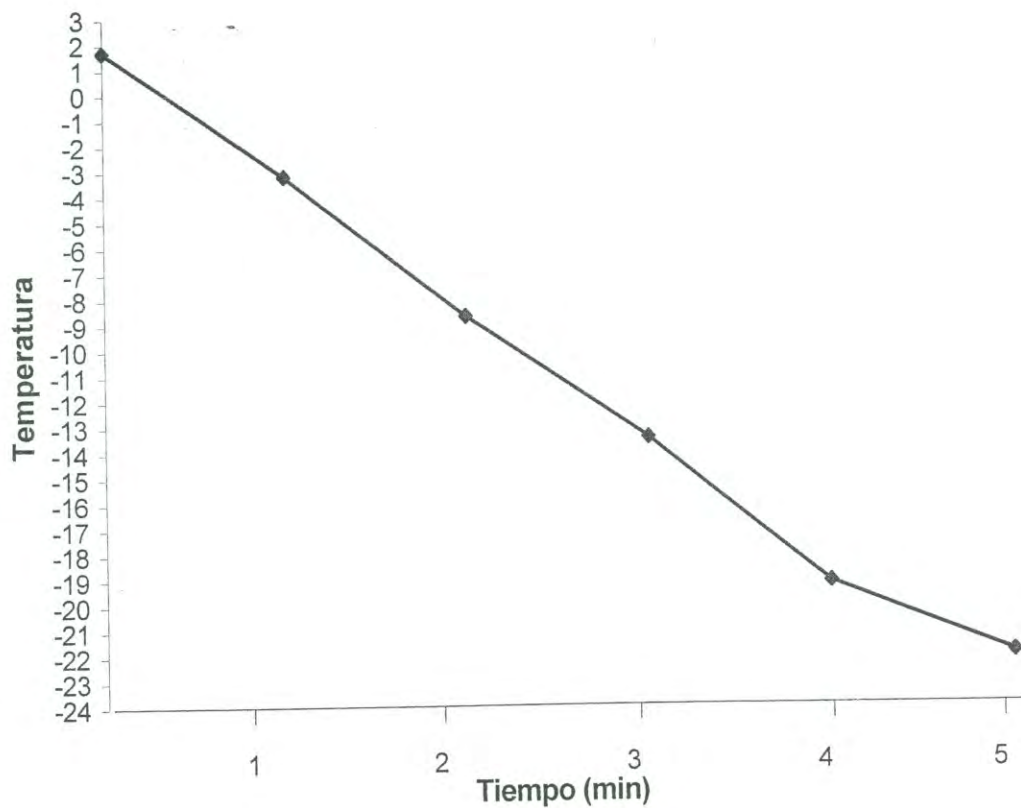


Figura 6. Curva de congelación por inmersión con mezcla frigorífica (acetona + dióxido de carbono sólido) de músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*).

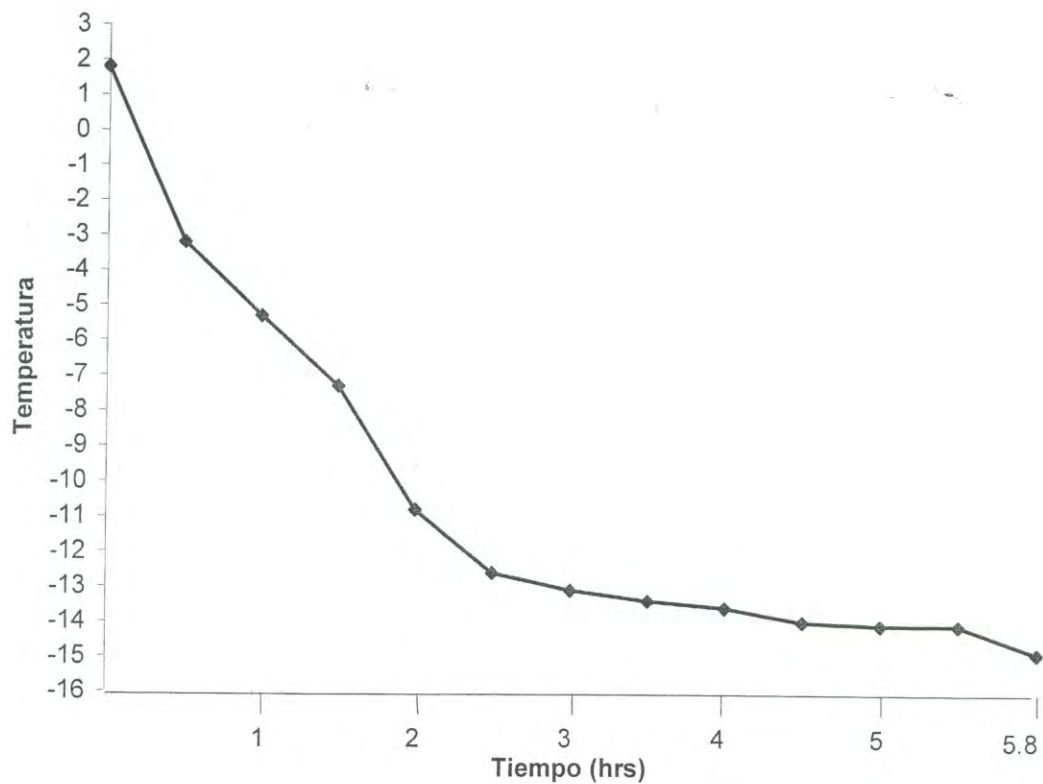


Figura 7. Curva de congelación por convección de aire del músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*).

de congelador utilizado (Garthwaite, 1997). Jhonston *et al.* (1994) mencionan que las velocidades de congelación son solo velocidades promedio, las cuales no representan lo que sucede realmente en la práctica.

Con respecto a lo anterior, existe una definición surgida en el Reino Unido, la cual menciona que un proceso de congelación rápida es aquel en que la temperatura del centro del pescado se disminuye al rango de 0 a -5°C en 2 horas o menos. Este rango de temperatura fue propuesto ya que se sabe que justo debajo de los 0°C es la zona crítica para el deterioro mediante la desnaturalización proteica. Después de librar esa zona crítica de temperatura de desnaturalización proteica, se recomienda bajar la temperatura del centro del filete a -20°C, lo cual equivale a que la temperatura promedio del músculo de pescado alcanza los -30°C. El tiempo tomado para bajar la temperatura a -20°C en el centro térmico del pescado es lo que se llama normalmente tiempo de congelación (Garthwaite, 1997; Jhonston *et al.*, 1994).

Si se toma en cuenta la definición de congelación rápida mencionada anteriormente, en el presente estudio tanto la congelación por inmersión y la congelación por medio de convección de aire se pueden considerar como procesos de congelación rápida, ya que en ambos casos el rango de temperatura de 0 a -5 °C fue alcanzado en un tiempo menor a las dos horas (Figuras 6 y 7).

Sin embargo la diferencia en cuanto al tiempo requerido por cada proceso para pasar a través de la zona crítica de desnaturalización proteica (0 a

-2°C) es muy amplia, ya que para el caso de la congelación por inmersión se alcanzaron los -5°C en menos de un minuto mientras que en la congelación por convección de aire esta disminución se llevó a cabo en un tiempo aproximado de 45 minutos. Aunado a esto, la diferencia en cuanto al número y tamaño de cristales de hielo formados en cada proceso debió tener diferencias marcadas, por lo que probablemente, el proceso de congelación por convección de aire pudo acarrear más efectos adversos que el método de congelación por inmersión. Para cuestiones prácticas, en el presente estudio el proceso de congelación por inmersión se denomina como “congelación rápida”, mientras que el proceso de congelación por convección de aire se denomina como “congelación lenta”.

Métodos de Descongelación

De los tres diferentes métodos de descongelación aplicados sobre el músculo de cazón congelado, se observó que entre los diferentes métodos el de bajas temperaturas presentó el mayor tiempo de descongelación con respecto a los otros dos métodos, considerándose este una “descongelación lenta”. En cuanto a los métodos de descongelación en horno de microondas y en agua a temperatura ambiente se consideraron como métodos de “descongelación rápida”, debido a que ambos presentaron tiempos de

descongelación bajos. Se observó que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el tiempo de descongelación con respecto al proceso de congelación utilizado, pero si existieron estas diferencias dependiendo del método de descongelación aplicado. (Tabla 5).

Goteo

De los tres efectos principales evaluados en este estudio, el tipo de descongelación y el periodo de almacenamiento tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) en los cambios observados en el porcentaje de goteo. El proceso de congelación utilizado no ejerció un efecto significativo ($p > 0.05$) sobre esta variable. No se observó una interacción triple de los efectos principales sobre el porcentaje de goteo

Se observó que al congelar los filetes rápidamente y descongelarlos a baja temperatura se obtuvieron los valores de porcentaje de goteo más bajos, ($p < 0.05$) con respecto al resto de los tratamientos durante los tres meses de almacenamiento en congelación. Por otro lado, se observó que al descongelar los filetes de pescado en agua se obtuvieron los valores de porcentaje de goteo más altos ($p < 0.05$) durante los tres meses de almacenamiento, tanto en los filetes congelados rápidamente (primer y tercer mes) y lentamente (segundo mes) (Tabla 6).

→ **Tabla 5.** Tiempo de descongelación obtenido en músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación

Método de descongelación	Tipo de congelación	Tiempo de descongelación (segundos)*
Horno de microondas	Congelación rápida	25.6 ± 5.1^a
Horno de microondas	Congelación lenta	25 ± 5.2^a
Agua corriente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$)	Congelación rápida	208.9 ± 1.9^b
Agua corriente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$)	Congelación lenta	202.1 ± 2.1^b
Baja temperatura ($10 \pm 2^\circ\text{C}$)	Congelación rápida	6996.2 ± 2.3^c
Baja temperatura ($10 \pm 2^\circ\text{C}$)	Congelación lenta	7040 ± 2.4^c

Cada determinación se llevó a cabo por triplicado ($n = 3$)

Cada valor es promedio de los valores obtenidos después de tres meses de almacenamiento

*Valores con letras iguales no hay diferencias significativas ($p < 0.05$)

Los valores bajos de porcentaje de goteo obtenidos en los filetes congelados rápidamente y descongelados a baja temperatura se pueden explicar basándose en que el proceso de congelación por inmersión pudo ocasionar que en el músculo de pescado no se produjera un marcado daño en su estructura, y de esta manera se evito una pérdida de fluidos excesiva en el músculo de pescado. Aunado a esto, el método de descongelación utilizado también influyó en los bajos valores de porcentaje de goteo observados en estos filetes, ya que la descongelación a baja temperatura presentó un tiempo de descongelación muy alto (Tabla 5). Además, en los filetes que fueron congelados lentamente y descongelados a baja temperatura también se observaron bajos porcentajes de goteo con respecto a los demás tratamientos durante los tres meses de almacenamiento (Tabla 6). Con relación a lo anterior, el tiempo largo de descongelación al descongelar a baja temperatura, posiblemente provoco que el cambio de estado de las moléculas de agua contenidas en el músculo de sólido a líquido fuera lento, permitiendo así que la mayoría de las moléculas de agua en estado líquido retomaran a su posición original en el músculo, lo que evitó una excesiva perdida de fluidos en el músculo descongelado.

En lo que respecta a los valores altos de porcentaje de goteo obtenidos en los filetes descongelados en agua probablemente este método de descongelación tuvo gran influencia en los resultados, ya que se observaron valores altos de porcentaje de goteo ($p < 0.05$) tanto en los filetes que fueron

congelados rápidamente (primer y tercer mes) y lentamente (segundo mes) (Tabla 6). Estos valores podrían estar relacionados con el bajo tiempo de descongelación observado al descongelar los filetes en agua (Tabla 5), ya que dicha descongelación pudo haber provocado un cambio rápido de estado de sólido a líquido de las moléculas de agua contenidas en el músculo, ocasionando que la mayoría de las moléculas de agua en estado líquido no tuvieran el tiempo suficiente para retomar su posición original en el músculo de pescado.

En el caso de los filetes descongelados en horno de microondas, que presentaron el tiempo de descongelación más bajo (Tabla 5) también se observaron altos valores de porcentaje de goteo al compararse con la descongelación a bajas temperaturas ($p > 0.05$), aunque en menor grado que los filetes descongelados en agua (Tabla 6); por lo que probablemente además de la influencia del tiempo de descongelación, quizás también influyó el mecanismo utilizado para inducir el cambio de estado de sólido a líquido de las moléculas de agua.

Se observó que conforme aumento el tiempo de almacenamiento hasta el tercer mes, los valores de porcentaje de goteo tendieron hacia el aumento en el caso de todos los tratamientos aplicados (Tabla 6). Santos y Regenstein (1990) observaron un comportamiento similar de aumento en el porcentaje de goteo conforme transcurría el tiempo de almacenamiento en filetes de merluza almacenados a -7°C .

Textura

En el primer mes de almacenamiento cada uno de los factores evaluados ejercieron un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la textura, medida como resistencia al corte. Después del primer mes, solamente el tiempo de almacenamiento ejerció un efecto significativo sobre esta variable respuesta. No se observó una interacción significativa de los tres factores.

Al inicio de la fase experimental, la textura del músculo de cazón sin congelar fue medida, y presentó una fuerza al corte de 0.07 N/mm^2 . Después del primer mes de almacenamiento en congelación la resistencia al corte de los filetes de cazón descongelados por los tres diferentes métodos tendió a aumentar con respecto a la presentada en el músculo sin congelar. Sin embargo, para el caso de los filetes congelados rápidamente y descongelados en horno de microondas (1MR) y de los filetes congelados lentamente y descongelados a baja temperatura (1RL) el aumento en la resistencia al corte no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) al compararse con el músculo sin congelar (Tabla 7).

Después del segundo y tercer mes de almacenamiento, todos los tratamientos aplicados presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la resistencia al corte con respecto al músculo sin congelar, con la tendencia en todos los casos al aumento en la resistencia al corte.

→ **Tabla 7.** Textura en los filetes de cazón sometidos a los diferentes procesos de congelación y descongelación.

Muestra	Textura (Newtons)*
F	0.07 ± 0.003 ^a
Primer mes	
MR	0.101 ± 0.005 ^a
ML	0.141 ± 0.004 ^b
AR	0.153 ± 0.003 ^b
AL	0.164 ± 0.004 ^b
RR	0.130 ± 0.006 ^b
RL	0.110 ± 0.001 ^a
Segundo mes	
MR	0.130 ± 0.003 ^b
ML	0.168 ± 0.001 ^b
AR	0.166 ± 0.005 ^b
AL	0.169 ± 0.007 ^b
RR	0.132 ± 0.002 ^b
RL	0.133 ± 0.002 ^b
Tercer mes	
MR	0.163 ± 0.002 ^b
ML	0.174 ± 0.002 ^b
AR	0.156 ± 0.005 ^b
AL	0.154 ± 0.002 ^b
RR	0.139 ± 0.009 ^b
RL	0.149 ± 0.003 ^b

Cada valor es la media de cuatro determinaciones ± desviación estándar (n = 3)

*Valores con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos

F: Músculo sin congelar

MR: Congelación rápida y descongelación en horno de microondas

ML: Congelación lenta y descongelación en horno de microondas

AR: Congelación rápida y descongelación en agua

AL: Congelación lenta y descongelación en agua

RR: Congelación rápida y descongelación a baja temperatura

RL: Congelación lenta y descongelación a baja temperatura

Sin embargo, después de este tiempo de almacenamiento no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la resistencia al corte entre los métodos de congelación y descongelación aplicados (Tabla 7).

En el presente estudio se observó que conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento el músculo de cazón tendió al endurecimiento, independientemente del método de congelación y/o descongelación aplicado (Tabla 7). Es sabido que las especies de pescado bajas en grasa y almacenadas a temperaturas de congelación, son susceptibles al endurecimiento durante su almacenamiento (Srinivasan *et al.*, 1997). Con base en los análisis proximales obtenidos del presente estudio, el cazón es una especie baja en grasa (0.7% lípidos).

Con respecto a lo anterior Dyer (1951) sugiere que entre otros factores, el elevado contenido de lípidos en el músculo de pescado puede de alguna manera ejercer un efecto de protección sobre las proteínas del músculo, lo que evita así su desnaturalización y posterior endurecimiento del músculo de pescado almacenado bajo congelación. Dicho efecto protector sobre las proteínas es atribuido a las fracciones lipídicas neutras, como lo son los triglicéridos; se ha propuesto que la presencia de estos compuestos disminuye el efecto perjudicial de los ácidos grasos libres sobre las proteínas. Esto es debido a que los lípidos neutros disuelven a los ácidos grasos libres, lo que disminuye así su efecto hidrofóbico sobre las proteínas. También es posible que

por el efecto de dilución, los lípidos neutros compitan con los ácidos grasos libres por los sitios de unión de la estructura proteica (Shenouda, 1980).

Haard (1990) atribuye que el efecto protector de los lípidos en las especies con alto contenido de grasa puede ser debido a la presencia de un "pool" subcelular lipofílico, el cual está separado del ambiente acuoso donde interaccionan las proteínas del músculo. Este "pool" lipofílico es una especie de confinador de los productos de hidrólisis y oxidación de lípidos, y de los cuales se sabe que pueden llegar a provocar el endurecimiento del músculo de pescado.

Por otro lado, Hale y Waters (1981) proponen que el endurecimiento del músculo de pescado almacenado en congelación puede ser atribuido al encogimiento de las fibras musculares, así como también el aumento en el goteo del músculo. Otras teorías acerca del endurecimiento del músculo de pescado, durante el almacenamiento en congelación, están relacionadas con los cambios estructurales que sufren las proteínas del músculo de pescado durante el almacenamiento (Dunajsky, 1979; Love, 1988). Montero y Borderias (1992) observaron que tanto las proteínas miofibrilares y del estroma (colágeno) formaban agregados y provocaron el endurecimiento del músculo de pescado almacenado en congelación. Badii y Howell (2002) encontraron que la dureza de filetes de bacalao almacenado en congelación se incrementaba mientras que la solubilidad de las proteínas miofibrilares disminuía, lo que indica que la

posible desnaturalización de dichas proteínas estaba relacionada con el aumento en la dureza del músculo de pescado.

Calorimetría Diferencial de Barrido

Con respecto al cambio de entalpía (ΔH) y temperatura máxima de transición (T_{max}) de las proteínas contenidas en el músculo de cazón, no se observó una interacción combinada ($p > 0.05$) de los tres factores principales sobre estas variables. Sin embargo, se observó un efecto significativo del proceso de congelación y descongelación sobre el cambio de entalpía de desnaturalización correspondiente a la miosina.

En este estudio se observaron tres transiciones endotérmicas, las cuales corresponden, la primera a la miosina, la segunda a las proteínas sarcoplasmicas y/o del estroma y la última transición a la actina. En el músculo de cazón sin congelar la T_{max} de la miosina fue de 49°C , para las proteínas sarcoplasmicas y/o del estroma fue de 65.93°C y para la actina, se registró una temperatura de 75.4°C (Tabla 8). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en otros estudios. Por ejemplo, Beas *et al.* (1990) encontraron en músculo de merluza (*Merluccius hubbsi*) dos transiciones endotérmicas, la

Tabla 8. Parámetros térmicos de las proteínas del músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*) sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación.

Muestra	Miosina		Sarcoplasmicas y/o estroma		Actina	
	Tmax (°C)	ΔH (J/g)	Tmax (°C)	ΔH (J/g)	Tmax (°C)	ΔH (J/g)
F	49 ± 0.250 ^a	1.266 ± 0.210 ^a	65.93 ± 0.207 ^a	0.039 ± 0.008 ^a	75.46 ± 0.778 ^a	0.410 ± 0.017 ^a
1er. Mes						
MR	48 ± 0.859 ^a	1.316 ± 0.213 ^a	66.3 ± 0.251 ^a	0.040 ± 0.023 ^a	76 ± 0.225 ^a	0.316 ± 0.085 ^a
ML	49 ± 0.339 ^a	1.71 ± 0.230 ^b	66 ± 1.243 ^a	0.040 ± 0.027 ^a	76 ± 0.381 ^a	0.300 ± 0.069 ^a
AR	49 ± 0.228 ^a	1.56 ± 0.174 ^a	66 ± 0.555 ^a	0.029 ± 0.010 ^a	76 ± 0.480 ^a	0.283 ± 0.057 ^a
AL	48 ± 0.430 ^a	1.34 ± 0.202 ^a	67 ± 0.011 ^a	0.049 ± 0.030 ^a	76 ± 0.574 ^a	0.300 ± 0.034 ^a
RR	49 ± 0.796 ^a	1.34 ± 0.023 ^a	66 ± 0.383 ^a	0.039 ± 0.023 ^a	76 ± 1.577 ^a	0.303 ± 0.047 ^a
RL	49.1 ± 0.368 ^a	1.43 ± 0.095 ^a	67.1 ± 0.725 ^a	0.038 ± 0.004 ^a	76 ± 0.352 ^a	0.340 ± 0.017 ^a
2do. Mes						
MR	48 ± 0.328 ^a	1.103 ± 0.127 ^a	66.2 ± 0.005 ^a	0.026 ± 0.011 ^a	76 ± 0.540 ^a	0.336 ± 0.057 ^a
ML	49 ± 0.271 ^a	0.93 ± 0.076 ^{a,c}	65.5 ± 0.560 ^a	0.023 ± 0.005 ^a	76 ± 1.088 ^a	0.356 ± 0.098 ^a
AR	48 ± 0.557 ^a	1.22 ± 0.115 ^a	65.3 ± 1.758 ^a	0.063 ± 0.046 ^a	75.1 ± 0.682 ^a	0.326 ± 0.035 ^a
AL	49 ± 0.630 ^a	1.46 ± 0.080 ^{a,d}	67.1 ± 0.280 ^a	0.030 ± 0.010 ^a	77 ± 0.290 ^a	0.373 ± 0.005 ^a
RR	48.3 ± 0.763 ^a	1.01 ± 0.233 ^a	66 ± 0.805 ^a	0.040 ± 0.026 ^a	76 ± 0.535 ^a	0.313 ± 0.057 ^a
RL	48.3 ± 0.499 ^a	1.16 ± 0.046 ^a	66.4 ± 0.962 ^a	0.036 ± 0.015 ^a	75.2 ± 0.500 ^a	0.313 ± 0.057 ^a
3er. Mes						
MR	48 ± 0.283 ^a	1.09 ± 0.141 ^a	67 ± 0.577 ^a	0.040 ± 0.010 ^a	76 ± 0.321 ^a	0.296 ± 0.041 ^a
ML	48 ± 0.727 ^a	1.31 ± 0.191 ^{a,e}	67 ± 0.571 ^a	0.043 ± 0.005 ^a	76 ± 0.309 ^a	0.306 ± 0.066 ^a
AR	47 ± 0.534 ^a	0.97 ± 0.127 ^a	66 ± 0.225 ^a	0.046 ± 0.020 ^a	76 ± 0.750 ^a	0.323 ± 0.057 ^a
AL	48 ± 0.840 ^a	0.70 ± 0.017 ^f	66 ± 0.225 ^a	0.030 ± 0.001 ^a	76 ± 0.317 ^a	0.333 ± 0.076 ^a
RR	47 ± 0.460 ^a	1.13 ± 0.091 ^a	65.4 ± 0.003 ^a	0.070 ± 0.002 ^a	75.1 ± 0.090 ^a	0.296 ± 0.011 ^a
RL	48 ± 0.392 ^a	0.85 ± 0.115 ^a	66.4 ± 0.375 ^a	0.036 ± 0.023 ^a	76 ± 0.577 ^a	0.350 ± 0.002 ^a

Cada valor es la media de tres determinaciones ± desviación estándar (n = 3).

F: Músculo sin congelar; MR: Congelación rápida y descongelación en horno de microondas; ML: Congelación lenta y descongelación en horno de microondas; AR: Congelación rápida y descongelación en agua; AL: Congelación lenta y descongelación en agua; RR: Congelación rápida y descongelación a baja temperatura; RL: Congelación lenta y descongelación a baja temperatura.

primera con una T_{max} de 46.5 °C y la segunda de 75.3 °C, las cuales correspondían a la miosina y actina respectivamente.

Poulter *et al.* (1985) encontraron también estas dos transiciones endotérmicas en músculo fresco de bacalao entre los 41°C y los 74 °C correspondientes a la miosina y actina respectivamente. Aunado a esto, Stabursvik y Martens, (1980) observaron alrededor de los 67 °C un pico de transición que presumiblemente correspondía a la transición de las proteínas sarcoplasmicas y/o del estroma. Es importante mencionar que al comparar la T_{max} de la miosina del músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*) el cual es una especie de pescado que habita en aguas tropicales (25-30°C) con respecto a la T_{max} del bacalao (*Gadus morhua*) que es una especie de pescado que habita en aguas frías (0-6°C) (Hastings *et al.*, 1985) se observó que el pico de la T_{max} de la miosina del músculo de cazón es mayor por 9°C que la T_{max} encontrada en la miosina del músculo de bacalao, lo que concuerda con lo observado por otros autores (Poulter *et al.*, 1985; Hastings *et al.*, 1985) con respecto a que la miosina de especies de pescado de aguas tropicales presenta una mayor estabilidad térmica que aquellos que habitan en aguas frías.

Después de un mes de almacenamiento en congelación del músculo de cazón y posterior descongelación por medio de los tres diferentes métodos aplicados en este estudio, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las T_{max} de transición de la miosina del músculo de cazón. Este mismo

comportamiento se presentó después del segundo y tercer mes de almacenamiento en congelación (Tabla 8).

En el músculo de cazón sin congelar se obtuvo un cambio de entalpía de desnaturalización (ΔH) de la miosina de 1.26 J/g. Después de un mes de almacenamiento en congelación y posterior descongelación el ΔH de la miosina del músculo de cazón presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) en los filetes congelados lentamente y descongelados en horno de microondas (1ML) al compararse con el músculo sin congelar y entre el resto de los tratamientos aplicados. En este caso se observó que el ΔH aumentó con respecto al músculo sin congelar y entre los diferentes tratamientos de congelación y descongelación (Tabla 8)

Una vez terminado el segundo mes de almacenamiento, el ΔH de desnaturalización de la miosina no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) al compararse con el músculo sin congelar, sin embargo entre los tratamientos de congelación y descongelación aplicados si existieron diferencias significativas ($p < 0.05$), siendo los filetes congelados lentamente y descongelados en microondas (2ML) los que presentaron el ΔH de desnaturalización más bajo, mientras que los filetes congelados lentamente y descongelados en agua (2AL) presentaron la mayor entalpía de desnaturalización (Tabla 8).

Después del tercer mes de almacenamiento, se observaron diferencias significativas en el ΔH de desnaturalización de la miosina de los filetes

congelados lentamente y descongelados en agua (3AL) con respecto al músculo sin congelar, con un ΔH de desnaturalización de 0.70 J/g. Este mismo tratamiento, también fue el que presentó el menor ΔH entre los tratamientos aplicados después del tercer mes de almacenamiento (Tabla 8). El otro tratamiento que presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos aplicados pero no presentó dichas diferencias con respecto al músculo sin congelar, fue el de los filetes congelados lentamente y descongelados en microondas (3ML). Este valor de entalpía fue el más alto entre los tratamientos de congelación y descongelación aplicados después de tres meses de almacenamiento (Tabla 8).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que la miosina presente en el músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*) se vio afectada en su estabilidad térmica (bajos valores de ΔH de desnaturalización) cuando el músculo de cazón fue sometido a procesos de congelación lenta combinados con métodos de descongelación rápida (descongelación en microondas y descongelación en agua); esto fue debido a que al someter los filetes de pescado a este tipo de procesos, se llevó a cabo una desestabilización en la estructura de la miosina y esto provocó algún tipo de cambio conformacional en la misma y por ende la disminución en la entalpía de desnaturalización.

Con relación a lo anteriormente mencionado, es sabido que la desnaturalización de las proteínas en el músculo de organismos marinos almacenados en congelación, puede ser causada por la formación de cristales

llevada a cabo durante el proceso de congelación, y esta a su vez ocasiona la pérdida de agua en el músculo, incremento en la concentración de solutos y la subsecuente interacción proteína-proteína (Schubring, 1999). Se sabe que dichos eventos pueden aumentar si la congelación aplicada es lenta, debido a que los cristales de agua formados son de mayor tamaño al compararlos con los formados durante la congelación rápida. De esta forma, se puede pensar que el proceso de congelación lenta aplicado en este estudio causó por sí mismo un daño en las muestras donde se observó la disminución en la entalpía de desnaturalización de la miosina (2ML y 3AL). Sin embargo el método de descongelación utilizado también tuvo influencia en estos resultados, ya que la disminución en los valores de entalpía se observó en el caso de los filetes descongelados en horno de microondas y en los filetes descongelados en agua, por lo que se podría pensar que el descongelar "rápidamente" ocasiona un diferente tipo de desestabilización de la molécula de miosina con respecto a la descongelación "lenta" (baja temperatura), provocando la disminución en la entalpía de desnaturalización. Esta diferencia se explica basándose en que en el caso de la descongelación en agua y en microondas, las moléculas de agua cambian del estado sólido al líquido en forma más rápida y esto provoca una menor disposición de las moléculas de agua en su posición original en el músculo de pescado, lo que a su vez probablemente ocasiona una mayor interacción de la miosina con otras proteínas debido a que los residuos de sus aminoácidos hidrofóbicos, ante la poca disposición de las moléculas de agua

podieron llegar a orientarse hacia el exterior de la molécula ocasionando entonces la mencionada interacción proteína-proteína y la disminución en la entalpía de desnaturalización de la miosina. En cambio en los filetes descongelados a baja temperatura la desestabilización de la miosina quizá no se lleva a cabo debido a que el cambio de las moléculas de agua de sólido a líquido es lento por lo que la mayoría del agua regresa a su posición original en el músculo.

Sin embargo como ya se mencionó anteriormente, se observó que en el caso de las muestras 1ML, 2AL y 3ML (congelación lenta y descongelación rápida) se llevo a cabo un aumento significativo ($p < 0.05$) en el ΔH de desnaturalización de la miosina, lo que puede llegar a indicar que posiblemente, también se efectuó la mencionada desestabilización de la molécula de miosina, ocasionada por los procesos de congelación y descongelación aplicados.

El aumento del ΔH de desnaturalización puede explicarse basándose en el tipo de evento e interacción llevadas a cabo en la proteína durante la desnaturalización térmica inducida. Myers (1990) menciona que en el caso de las proteínas, conforme se da un aumento en la temperatura, las interacciones que están bajo control entropico, tales como las interacciones hidrofóbicas y las interacciones estéricas se vuelven más fuertes, mientras que las interacciones que están bajo control entalpico como las interacciones electrostáticas y de Van der Waals y los enlaces de hidrógeno se vuelven débiles, para posteriormente,

conforme se alcanza la temperatura de desnaturalización, las interacciones bajo control entropico empiezan a debilitarse.

Con relación a lo anteriormente mencionado, se ha establecido que en el caso de las proteínas, la desnaturalización térmica inducida puede ser detectada por medio de calorimetría diferencial de barrido como un pico endotérmico, debido a que se lleva a cabo el rompimiento de enlaces de hidrógeno intramoleculares en la molécula de proteína, y el valor de la entalpía de desnaturalización puede llegar a proporcionar una estimación de la energía térmica requerida para desnaturalizar a la proteína. No obstante, el valor de la entalpía es realmente un valor neto que proviene de la combinación de procesos o eventos endotérmicos y exotérmicos, que se llevan a cabo simultáneamente durante la desnaturalización térmica inducida de las proteínas (Schubring, 1999). De esta manera, se puede pensar que en las muestras donde se observo un aumento en la entalpía de desnaturalización, probablemente las interacciones que controlan la entropía estuvieron más fuertes o tuvieron mayor presencia que las interacciones que controlan la entalpía, lo que provoco que en estas muestras, se requiriera de una mayor energía térmica para desnaturalizar a la proteína.

Varios autores han observado la inestabilidad de la miosina contenida en músculo de organismos marinos a los procesos de congelación. Por ejemplo en estudios realizados por Poulter *et al.* (1985) se observo que la T_{max} de desnaturalización de la miosina de tilapia congelada disminuyó muy poco en

relación con el músculo de tilapia sin congelar, pero al comparar la entalpía de desnaturalización del músculo sin congelar con el congelado se observó un decremento en la entalpía de desnaturalización de la miosina de alrededor del 30%. Por otro lado, Hastings *et al.* (1985) indican que en músculo de bacalao (*Gadus morhua*) después de 2 semanas de almacenamiento a -10°C la miosina experimento cierto grado de desnaturalización.

En lo que respecta a la segunda transición, observada en el músculo de cazón sin congelar correspondiente a las proteínas sarcoplasmicas y/o del estroma ($T_{\text{max}} = 66^{\circ}\text{C}$) no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la T_{max} entre los tratamientos aplicados ni con respecto al músculo sin congelar en ninguno de los tiempos de almacenamiento. Para la entalpía de desnaturalización de las proteínas sarcoplasmicas y del estroma, tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, ni con respecto al músculo sin congelar en ninguno de los tiempos de almacenamiento. (Tabla 8). Estos resultados indican que este tipo de proteínas son estables a los procesos tanto de congelación y de descongelación aplicados en este estudio.

La tercera transición observada en el músculo de cazón fue la correspondiente a la actina ($T_{\text{max}} = 75.46^{\circ}\text{C}$) y para esta proteína no se observaron diferencias significativas en la T_{max} entre ninguno de los tratamientos aplicados ni de estos con respecto a la T_{max} del músculo sin congelar en ninguno de los tiempos de almacenamiento. La entalpía de

desnaturalización de la actina tampoco presentó diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ni con respecto al músculo sin congelar en ninguno de los tiempos de almacenamiento (Tabla 8). Esto indica, que la actina contenida en el músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*) es relativamente estable a los procesos de congelación y descongelación aplicados en este estudio.

Con relación a lo anterior, se ha observado en otros estudios, que la actina contenida en el músculo de organismos marinos presenta una mayor estabilidad en su conformación con relación a la miosina. Por ejemplo Poulter *et al.* (1985) encontraron que tanto en bacalao y tilapia almacenada en congelación la actina del músculo de estas dos especies de pescado no presento cambios significativos ni en el ΔH de desnaturalización ni en la T_{max} de transición; Hastings *et al.* (1985) observaron que la actina de músculo de bacalao (*Gadus morhua*) no presento cambios en sus parámetros térmicos después de 10 semanas de almacenamiento a -10°C . Por otro lado Lou *et al.* (2000) tampoco observaron cambios significativos en la entalpía de desnaturalización y T_{max} de la actina del músculo de pez paleta (*Polydon spathula*) almacenado durante nueve meses en congelación.

Análisis Electroforético

Las proteínas del músculo de cazón congelado y posteriormente descongelado por tres diferentes métodos de descongelación fueron analizadas para obtener el perfil electroforético bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras y bajo condiciones desnaturalizantes. Los resultados de este análisis se muestran como perfiles densitométricos, en los cuales se puede observar que en el rango de peso molecular de 200 kDa se ubica la cadena pesada de la miosina, mientras que a pesos moleculares de 45 kDa se encuentra la actina, y los picos observados por debajo de los 45 kDa corresponden a la tropomiosina, troponinas y a las cadenas ligeras de la miosina.

Se observó que en el músculo de cazón sin congelar, la proporción de la cadena pesada de la miosina presente fue del 15.05% con respecto al resto de las bandas de proteína presentes en los geles. Después de un mes de almacenamiento y posterior descongelación de los filetes, se observó que en general la proporción de miosina tendió a aumentar con respecto al músculo sin congelar, aunque también se observó que en algunos casos la proporción de miosina disminuyó. Los tratamientos que presentaron la disminución más marcada en la proporción de miosina con respecto al músculo sin congelar, fueron los filetes congelados lentamente y descongelados en horno de microondas (1ML) y los congelados lentamente y descongelados a bajas temperaturas (1RL) en ausencia y presencia de ME respectivamente (Figuras 8 y 9).

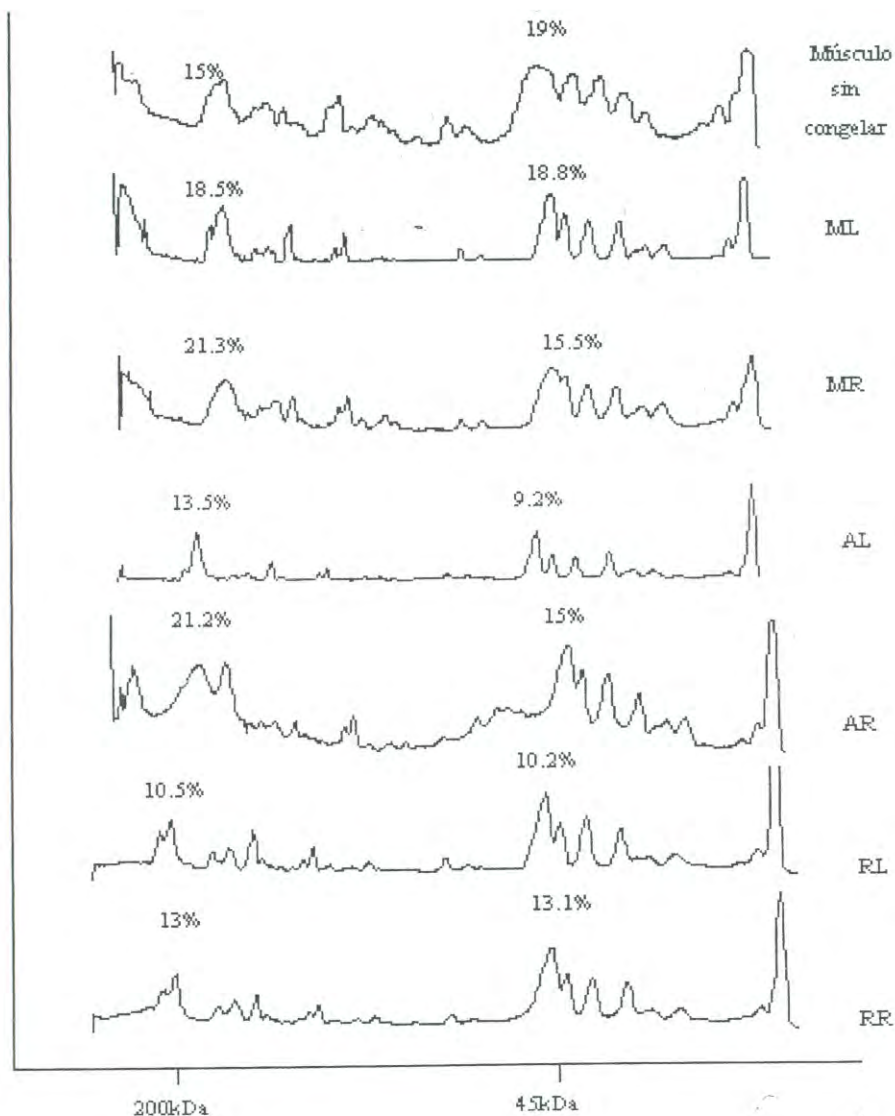


Figura 8. Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes y reductoras de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de un mes de almacenamiento. ML y MR: Descongelación en microondas y congelación lenta y rápida; AL y AR: Descongelación en agua y congelación lenta y rápida. RL y RR: Descongelación a baja temperatura y congelación lenta y rápida

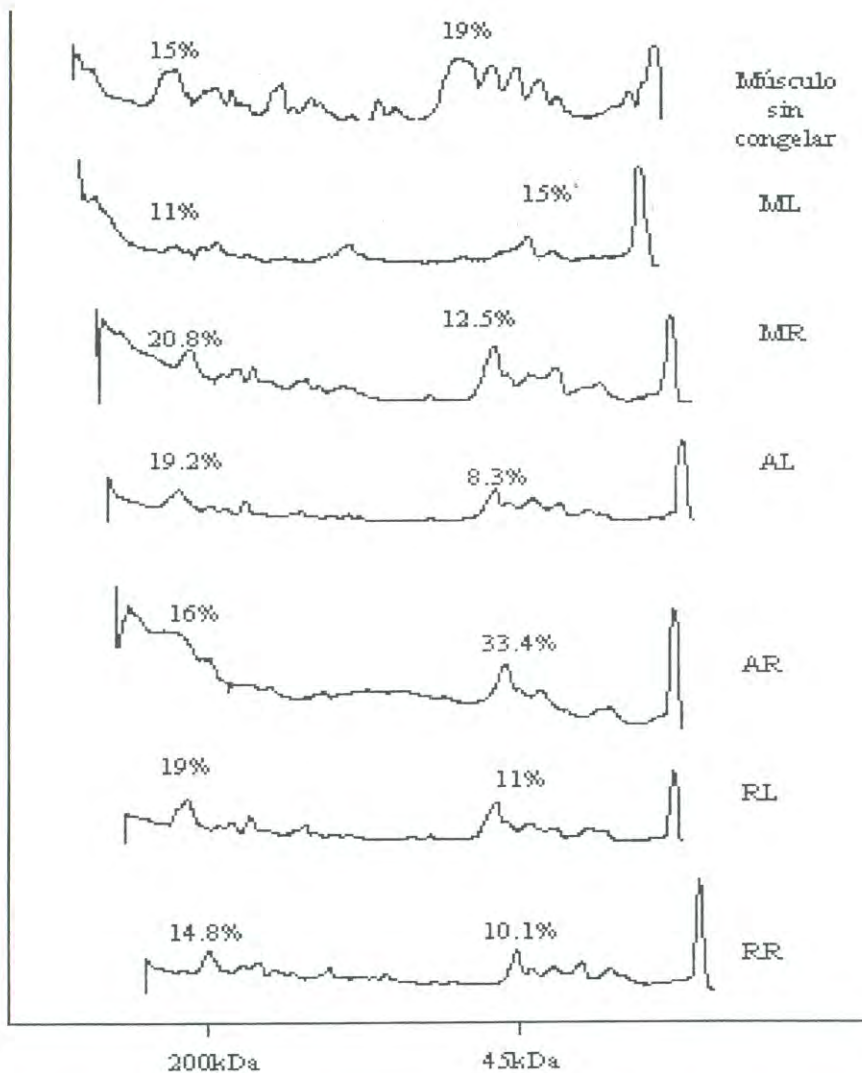


Figura 9. Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de 1 mes de almacenamiento. ML y MR: Descongelación en microondas y congelación lenta y rápida; AL y AR: Descongelación en agua y congelación lenta y rápida. RL y RR: Descongelación a baja temperatura y congelación lenta y rápida

Para el caso de 1ML, tal disminución en la proporción de miosina probablemente fue debida a que la miosina estuvo asociada por medio de enlaces del tipo disulfuro con otras proteínas, ya que en el densitograma de 1ML tratado con ME se observó la presencia de un mayor número de picos con pesos moleculares menores a la miosina (Figura 8). En este caso tampoco hay que descartar la posible interacción de la miosina con otras proteínas de muy alto peso molecular, ya que con el método de extracción utilizado es posible lograr la extracción de dichos agregados pero cabe la posibilidad de que estos no hayan logrado entrar al gel de poliacrilamida debido a su alto peso molecular. En lo concerniente a 1RL se puede suponer que la disminución en la proporción de miosina se debió a que dicha proteína pudo estar asociada con otras proteínas por medio de enlaces del tipo no disulfuro.

Con relación a lo anterior, Ragnarsson y Regenstein (1989) proponen que en bacalao (*Gadus morhua*) y whiting (*Merlangius merlangus*) almacenados en congelación se forma un agregado proteico de aproximadamente 280 kDa por medio de puentes metileno. Por otro lado, Lim y Haard (1984) estimaron el peso molecular de los agregados proteicos formados durante el almacenamiento en congelación de halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*), y obtuvieron pesos moleculares aparentes de 500 y hasta más de 1000 kDa. Borderias y Montero (1985), observaron agregados con un peso molecular de 300 kDa en merluza almacenada en congelación.

Por otro lado, en estudios realizados por Niwa *et al.* (1984) observaron que en actomiosina de pescado, las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la insolubilización de las proteínas debido al proceso de congelación. En estudios más recientes Careche *et al.* (1998); y Tejada *et al.* (1996) concluyeron que en músculo molido de bacalao almacenado en congelación se lleva a cabo la formación de agregados de alto peso molecular. A partir de sus resultados concluyeron que dichos agregados podrían estar unidos por medio de enlaces covalentes de tipo no disulfuro. Como ya se mencionó anteriormente, en este estudio los filetes que fueron congelados lentamente y descongelados en microondas (1ML) y a baja temperatura (1RL) fueron los que presentaron las disminuciones más marcadas en la proporción de miosina con respecto al músculo sin congelar. Con base en estos resultados se concluye que tanto el proceso de congelación así como también el de descongelación utilizados tienen una influencia en las disminuciones en la proporción de miosina después de un mes de almacenamiento. Con relación a esto es bien sabido que el congelar rápida o lentamente ocasiona efectos muy diferentes en el músculo de pescado, ya que el crecimiento de los cristales de hielo durante un proceso de congelación lenta es muy pronunciado y por ello causa un daño mayor en el músculo, así como mayor expulsión de agua aumentando con esto las posibilidades de que se lleven a cabo interacciones proteína-proteína en el músculo. Por otro lado, durante el proceso de congelación rápida los cristales de hielo crecen en menor tamaño, lo que evita

el daño antes mencionado; de esta manera en este estudio, el proceso de congelación por si mismo ocasiono que se llevara a cabo una mayor perdida en la proporción de miosina en los tratamientos antes mencionados (1ML y 1RL). Sin embargo, el comportamiento en cuanto al tipo de enlace (disulfuro o no disulfuro) fue diferente y dependió del método de descongelación aplicado, así el mecanismo de descongelación pudo influir en esta diferencia en el tipo de enlaces formados entre las proteínas.

Con respecto a lo anterior, se sabe que los alimentos son capaces de absorber la energía de los microondas, para liberar después dicha energía en forma de calor. En el caso de la mayoría de los alimentos, el agua es el componente que participa en el mecanismo de calentamiento, ya que en un horno de microondas se crea un campo electromagnético que provoca que las moléculas de agua que poseen tanto cargas negativas y positivas en su estructura (molécula dipolar) se comporten como magnetos por lo que así, se da un movimiento vibracional de estas moléculas y la energía de los microondas es absorbida, y durante este proceso, se pueden llegar a afectar las interacciones del agua con sus moléculas vecinas (Hill, 2000).

Aplicando el mecanismo anteriormente explicado a los procesos de descongelación utilizados en el presente estudio, probablemente el mencionado movimiento vibracional de las moléculas de agua pudo haber afectado la interacción de esta con las moléculas de proteína del músculo de pescado, y así provocar algún tipo de cambio conformacional o desdoblamiento de la

proteína. De esta manera, ciertos grupos reactivos, como los grupos tioles que pudieron estar cubiertos o impedidos por la misma molécula, ahora estuvieron expuestos hacia el exterior, dándose entonces su participación en la formación de enlaces disulfuro.

En contraste con lo expuesto anteriormente, los filetes que fueron descongelados a bajas temperaturas (1RL) tanto el mecanismo y tiempo de descongelación fueron diferentes, pues en este caso el cambio de estado de las moléculas de agua de sólido a líquido es mucho más lento, lo que permitió que la mayoría del agua líquida retornara a su posición original, y como consecuencia el cambio conformacional de la proteína se halla llevado a cabo de una manera diferente o se hayan expuesto otro tipo de grupos diferentes a los tioles hacia el exterior de la molécula.

Con relación a lo anterior, es sabido que la estabilidad de una proteína contenida en un alimento sobre el cual se aplica cualquier operación unitaria va a depender principalmente de la estructura misma de la proteína (proporción y tipo de aminoácidos, grupos R, entre otros) y de las condiciones del sistema, como pH, fuerza iónica, y actividad acuosa). A su vez también influye el tipo de proceso utilizado, por lo que se puede decir que la acción conjunta de todos estos factores es lo que determina la velocidad y quizá el tipo de desnaturalización en dicha proteína (Badui, 1993).

En lo referente a la actina, se observó en una proporción del 19.44 % en el músculo sin congelar con respecto al resto de las bandas de proteína

presentes en los geles. Después de un mes de almacenamiento y posterior descongelación por los tres diferentes métodos se observó que en la mayoría de los tratamientos la proporción de actina disminuyó con respecto al músculo sin congelar (Figura 8 y 9). En el caso de los filetes que fueron congelados rápida y lentamente y descongelados en horno de microondas (1MR y 1ML respectivamente) se observó la posibilidad de que la actina pudo haber participado en la formación de algún agregado con otras proteínas por medio de enlaces del tipo disulfuro. Las disminuciones más marcadas en la proporción de actina después de un mes de almacenamiento fueron en el caso de los filetes congelados lentamente y descongelados en agua (1AL) y en los filetes que fueron congelados lentamente y descongelados a baja temperatura (1RL) (Figura 8 y 9).

Basándose en lo anterior, se observó que después de un mes de almacenamiento en congelación, la actina fue más susceptible que la miosina a los procesos tanto de congelación como de descongelación utilizados, ya que su proporción disminuyó en forma más marcada al compararse con la miosina en la mayoría de los tratamientos, lo que podría indicar que la actina es la proteína que puede llegar a estar más involucrada en la formación de agregados con otras proteínas. Estos resultados son inesperados, ya que varios autores han observado que la actina es más estable que la miosina durante el almacenamiento de pescado en congelación. Con relación a lo anterior, en investigaciones realizadas por Tejada *et al.* (1996); Careche *et al.* (1998)

observaron por medio de análisis electroforéticos que en músculo molido de bacalao (*Gadus morhua*) la actina fue más estable durante el almacenamiento en congelación; LeBlanc y LeBlanc (1989) también observaron la mencionada estabilidad de la actina sobre la miosina durante el almacenamiento en congelación de filetes de bacalao (*Gadus morhua*). Con relación a esto, Owusu-Ansah y Hultin (1992) encontraron que la actina del músculo de merluza roja (*Urophycis chuss*) disminuyó en su proporción en un 57% después de 12 semanas de almacenamiento en congelación, mientras que la miosina ya no fue detectada en los electroforegramas después de ese tiempo de almacenamiento. Las diferencias encontradas en cuanto a la estabilidad de la actina y la miosina del músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*) con respecto a las investigaciones anteriormente citadas se pueden deber a varios factores, como lo son las diferencias entre especies, hábitat, y estado fisiológico del organismo.

Después del segundo mes de almacenamiento, la proporción de miosina y actina aumentó en la mayoría de los tratamientos de congelación y descongelación aplicados sobre el músculo de cazón con respecto a los valores observados después del primer mes de almacenamiento y en el músculo sin congelar (Figuras 10 y 11). Este comportamiento definitivamente es variable entre especies de pescado, ya que Owusu-Ansah y Hultin (1992) encontraron en músculo de merluza roja (*Urophycis chuss*) después de dos meses de almacenamiento en congelación la proporción de actina (área del pico) disminuyó en un 35%, mientras que la banda de la miosina ya no fue detectada

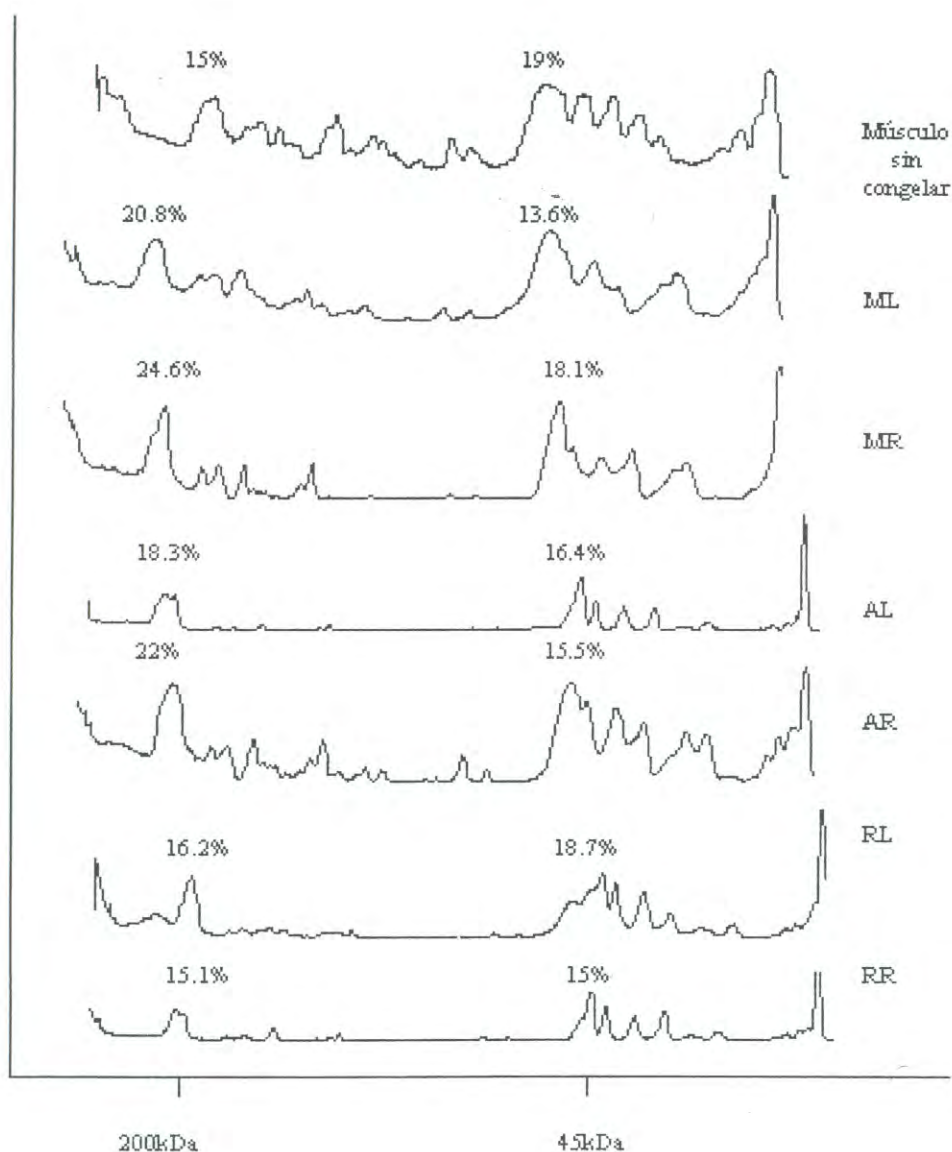


Figura 10. Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes y reductoras de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de dos meses de almacenamiento. ML y MR: Descongelación en microondas y congelación lenta y rápida; AL y AR: Descongelación en agua y congelación lenta y rápida. RL y RR: Descongelación a baja temperatura y congelación lenta y rápida

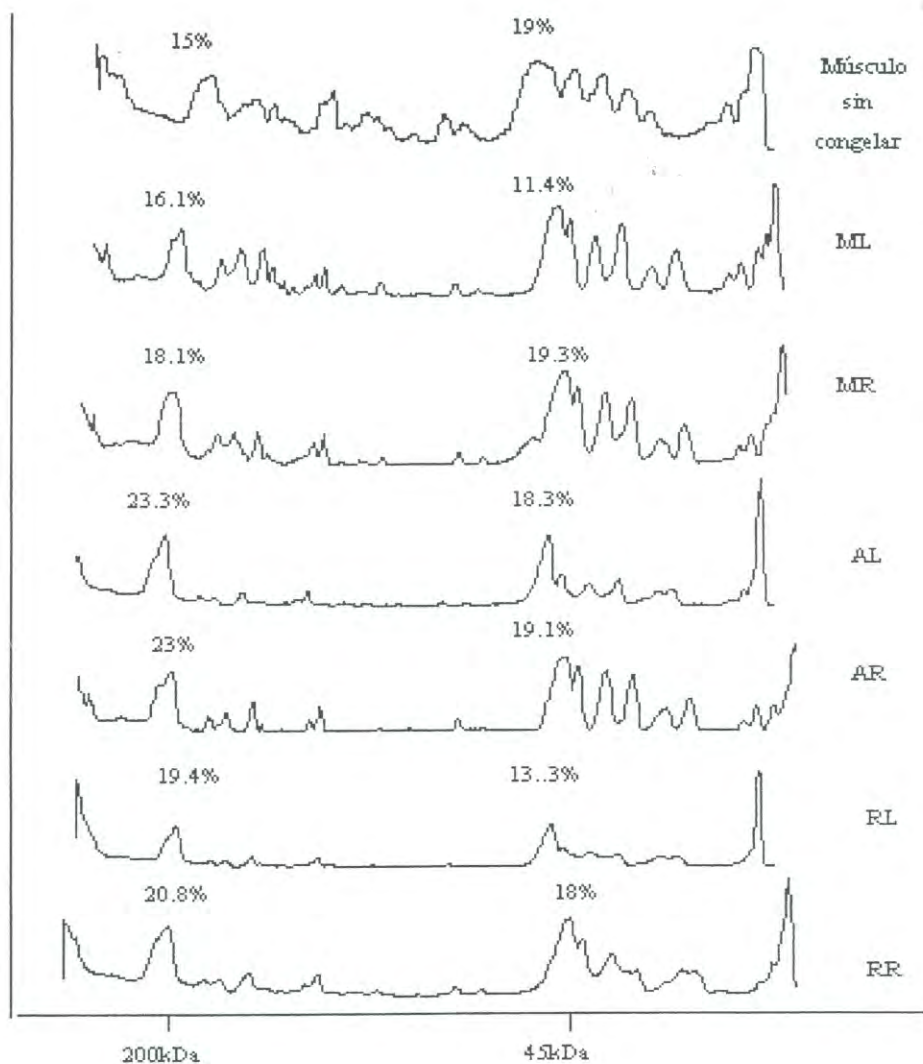


Figura 11. Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de dos meses de almacenamiento. ML y MR: Descongelación en microondas y congelación lenta y rápida; AL y AR: Descongelación en agua y congelación lenta y rápida. RL y RR: Descongelación a baja temperatura y congelación lenta y rápida.

en los electroforegramas. Sin embargo, en estudios más recientes se observaron comportamientos similares a los encontrados en el presente estudio en cuanto a la tendencia de aumento en la proporción de actina y miosina; por ejemplo Tejada *et al.* (1996) observaron que en un extracto de actomiosina natural obtenido con NaCl 0.6M de músculo molido de bacalao (*Gadus morhua*) la proporción de la cadena pesada de la miosina (cuantificada como densidad óptica integrada (IOD) por microgramo de proteína extraída) después de 5 semanas de almacenamiento a - 20°C aumento de manera marcada con respecto al músculo fresco, y después de 8 semanas de almacenamiento la proporción de miosina permaneció sin cambios aparentes, para después de 14 semanas de almacenamiento declinar en su proporción; en este mismo estudio de Tejada *et al.* (1996) el comportamiento en el IOD de la actina fue similar, observándose un aumento gradual de la misma en las semanas 5, 8 y 14 con respecto al músculo fresco, para después disminuir conforme aumento el tiempo de almacenamiento. Con relación a lo anterior Careche *et al.*(1999) encontraron resultados muy similares en un extracto de actomiosina de músculo de bacalao (*Gadus morhua*) almacenado a -20 y a -30°C. Se observó que el IOD de la miosina y de la actina después de 5 y 8 semanas de almacenamiento aumento significativamente con respecto al músculo fresco, para después de la semana 14 disminuir en su IOD a ambas temperaturas de almacenamiento. En los dos estudios mencionados anteriormente no se ofrece una explicación del porque se da este comportamiento de aumento en la actina y la miosina

después de cierto tiempo de almacenamiento con respecto al músculo sin congelar.

Una vez terminado el tercer mes de almacenamiento en congelación, en general se observó que tanto la proporción de actina y de miosina en el músculo de cazón tiende a disminuir y en algunos casos permanece constante con respecto al segundo mes de almacenamiento (Figuras 12 y 13). En el caso de la miosina se observó que los filetes que fueron congelados lentamente y descongelados con horno de microondas (3ML) y los filetes que fueron congelados lentamente y descongelados en agua (3AL) son los que presentaron las disminuciones más marcadas en la proporción de miosina (Figuras 12 y 13); para el caso de los filetes descongelados en microondas (3ML) se observó nuevamente, al igual que en el primer y segundo mes de almacenamiento la intervención de enlaces del tipo disulfuro en la posible formación de agregados con otras proteínas.

Con base a estos resultados, después de tres meses de almacenamiento, el proceso de congelación lenta combinado con una descongelación "rápida" (descongelación en agua y microondas) son los que causaron una mayor pérdida de miosina en el músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*).

La disminución en la proporción de actina después de tres meses de almacenamiento fue más marcada con respecto a la miosina, y se observó que al igual que después del primer mes de almacenamiento, una mayor estabilidad

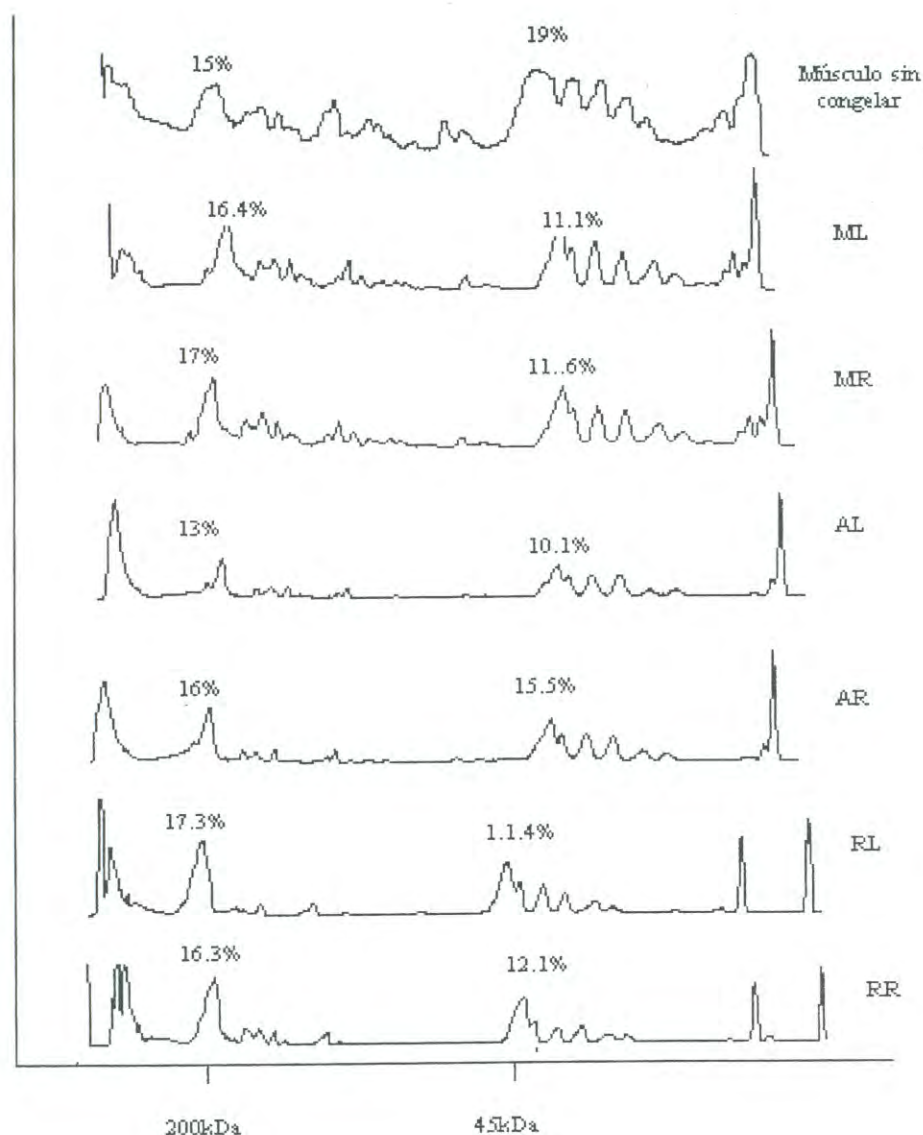


Figura 12. Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes y reductoras de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de tres meses de almacenamiento. ML y MR: Descongelación en microondas y congelación lenta y rápida; AL y AR: Descongelación en agua y congelación lenta y rápida. RL y RR: Descongelación a baja temperatura y congelación lenta y rápida.

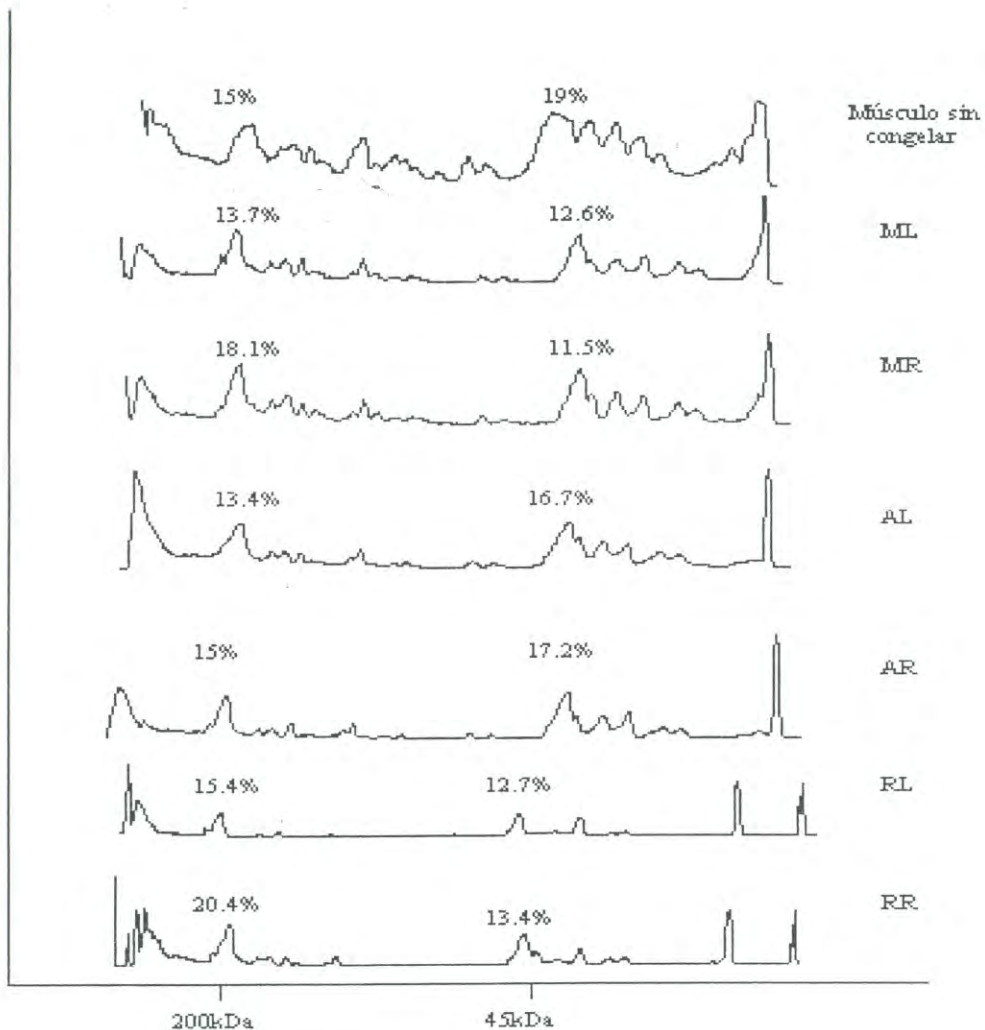


Figura 13. Perfil densitométrico en condiciones desnaturalizantes de proteínas de músculo de cazón sometido a los diferentes procesos de congelación y descongelación después de tres meses de almacenamiento. ML y MR: Descongelación en microondas y congelación lenta y rápida; AL y AR: Descongelación en agua y congelación lenta y rápida. RR y RL: Descongelación a baja temperatura y congelación rápida y lenta.

de la miosina con respecto a la actina durante el almacenamiento en congelación. Además después del tercer mes de almacenamiento, la pérdida de actina no presentó muchas diferencias en cuanto a los métodos de congelación y descongelación utilizados en el presente estudio. (Figuras 12 y 13). La disminución en la proporción de estas proteínas en esta investigación después del tercer mes de almacenamiento concuerda con lo encontrado por Tejada *et al.*(1996) y Careche *et al.*(1999) en músculo molido de bacalao (*Gadus morhua*), ya que ellos empezaron a detectar disminuciones en el IOD de la actina y la miosina hasta después de 14 semanas de almacenamiento en congelación (3 meses y medio aproximadamente). La disminución observada en la proporción de miosina después del tercer mes de almacenamiento probablemente esta relacionada con la formación de agregados de alto peso molecular, los cuales no lograron entrar a los geles, esto debido a que no se observo un incremento en las bandas de pesos moleculares menores al de la miosina que pudieran indicar que la disminución de esta proteína haya sido debida a una proteolisis. Probablemente en este caso, en la formación de agregados proteicos estuvieron envueltos enlaces covalentes. Lim y Haard (1984)., Owusu-Ansah y Hultin (1986) concluyeron que en las fracciones de alto peso molecular que no lograron penetrar en los geles de poliacrilamida pudieron estar presentes enlaces covalentes. Careche *et al.* (1998) atribuyeron que la pérdida de miosina después de un tiempo de almacenamiento prolongado puede estar relacionada con la formación de agregados de alto peso molecular

que probablemente están unidos a través de enlaces covalentes del tipo no disulfuro.

Estudio Histológico

El músculo de cazón (*Mustelus lunulatus*) sometido a los diferentes métodos de descongelación fue analizado a través de microscopía óptica por medio de dos tipos de tinciones diferenciales; la tinción con hematoxilina y eosina fue utilizada con la finalidad de elucidar la estructura general del músculo de cazón y la tinción tricromica de Masson se utilizo para diferenciar el tejido conectivo, el cual esta compuesto principalmente por colágeno.

En lo que respecta a la estructura general del tejido muscular de cazón en las figuras 14a y 14b se pueden observar las fibras del músculo de cazón sin congelar, en las que se aprecia un denso empaquetamiento en su estructura sin aparentes daños. Además se logra observar una banda clara (banda A) y una banda oscura (banda I), las cuales se sabe que forman parte del sarcomero, el cual es una unidad contractil que confiere a las miofibrillas su apariencia estriada (Howgate, 1979; Alberts *et al.*, 1983).

Después de un mes de almacenamiento, las muestras congeladas se descongelaron bajo los tres diferentes métodos.

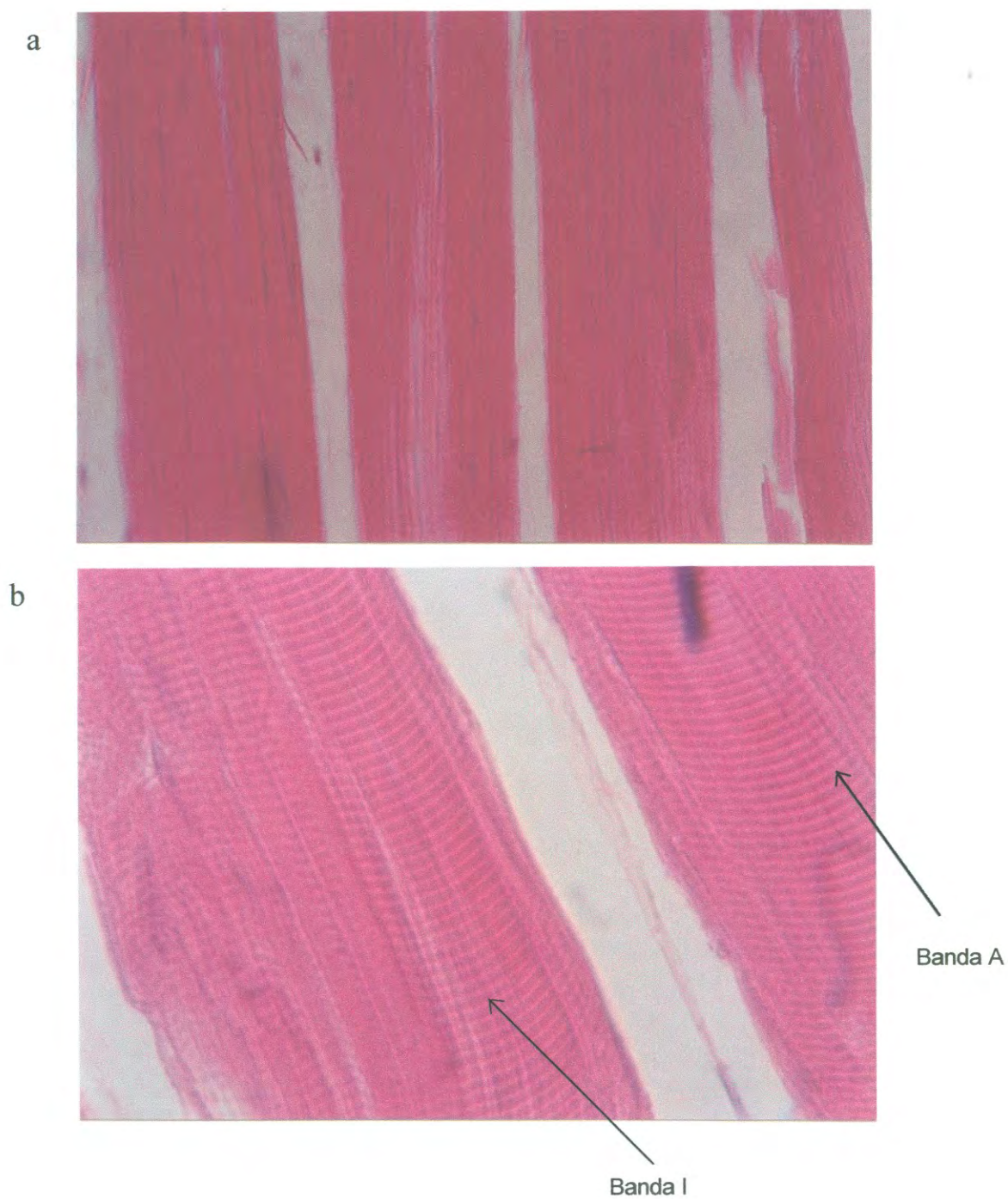


Figura 14. Cortes histológicos de músculo de cazón sin congelar. (a) y (b), ampliaciones de 40 y 100 x, respectivamente.

En lo que respecta al método de descongelación por microondas se observaron daños severos en las muestras que fueron congeladas lentamente (Figura 15a); la alteración de las fibras musculares con respecto al músculo sin congelar es notoria, ya que se observó un encogimiento pronunciado en las fibras musculares, marcado por la presencia de huecos en las mismas, causados posiblemente por la formación de cristales de hielo de mayor tamaño durante la congelación lenta. En lo que respecta a los filetes de pescado descongelados en horno de microondas pero congelados rápidamente (Figura 15b), también se observó un patrón similar al anterior en el daño de las fibras musculares, aunque en un menor grado al compararlas con las muestras que fueron congeladas lentamente. Esto se puede explicar dado que durante la congelación rápida (inmersión) los cristales de hielo formados fueron de menor tamaño que los formados durante la congelación lenta (convección de aire), con las consecuentes diferencias antes mencionadas.

En los filetes descongelados en agua y congelados lentamente, se observó también alteración severa de las fibras musculares al compararlas con el músculo sin congelar (Figura 16a). Las fibras musculares de los filetes sometidos a este proceso de descongelación sufrieron un efecto de “resquebrajamiento” o rompimiento en su estructura, efecto que no fue observado en los filetes descongelados en horno de microondas. Por otro lado, los filetes descongelados en agua pero congelados rápidamente, presentaron también cierto grado de rompimiento en las fibras musculares (Figura 16b).

a



b

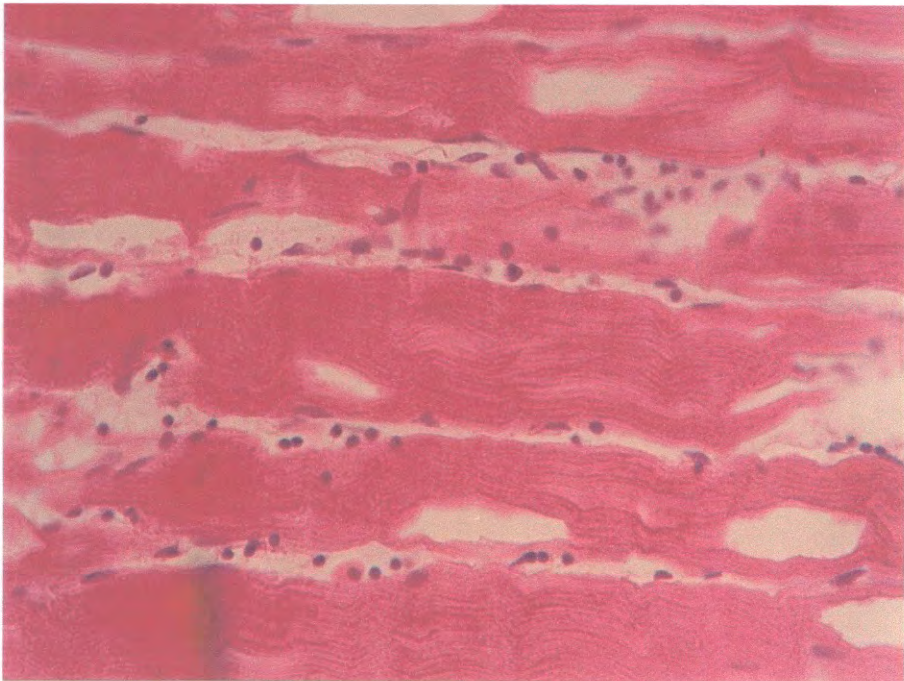


Figura 15. Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado en horno de microondas después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (100x). (b): congelado rápido. (40x).

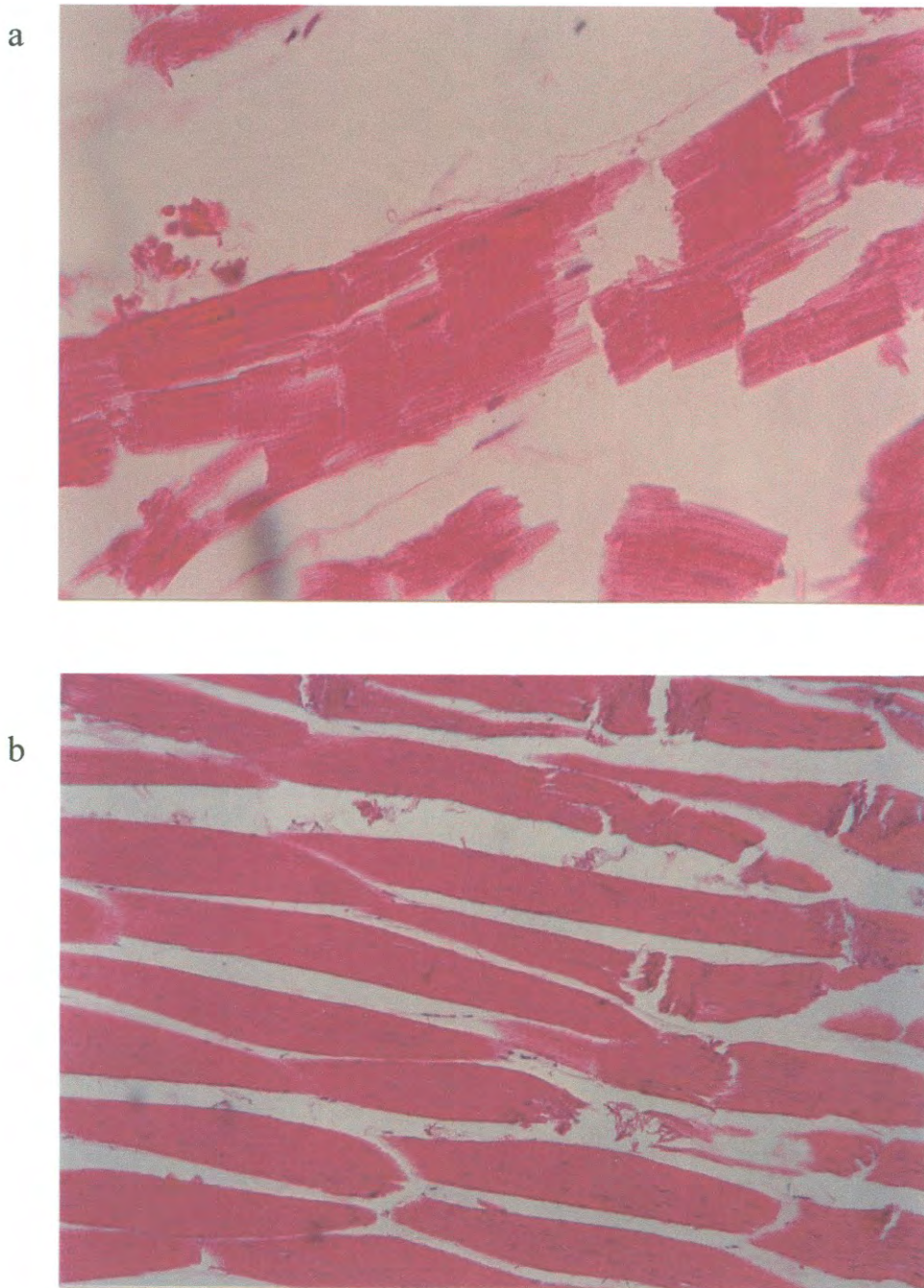


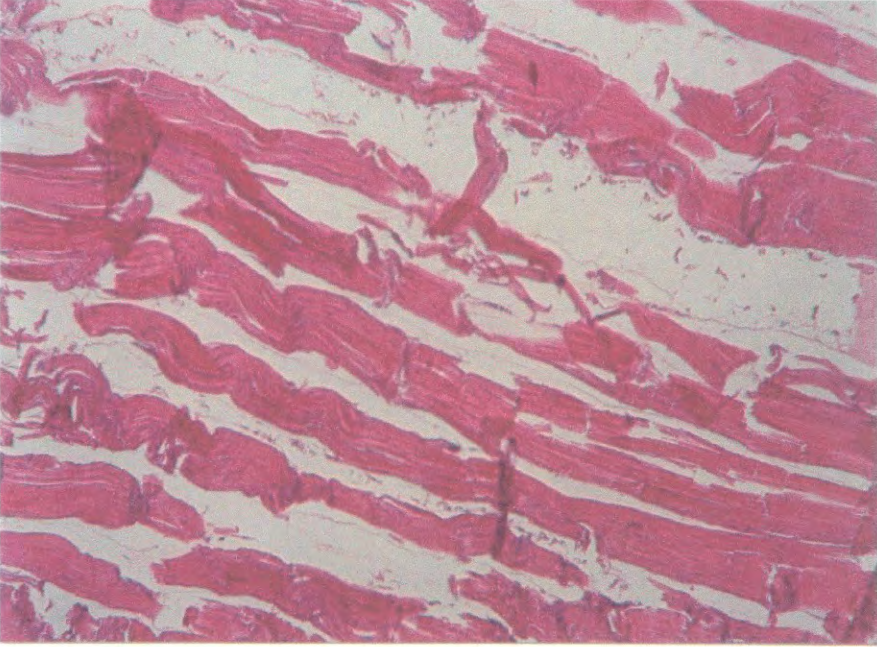
Figura 16. Corte histológico de músculo de cazón descongelado en agua a temperatura ambiente después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (40 x). (b): congelado rápido (10 x).

Por lo tanto, en función del método de descongelación se observaron diferentes cambios en la morfología del tejido. Esta diferencia en como las fibras musculares se vieron afectadas comparando la descongelación en microondas y la descongelación en agua, pudo ser debida a las diferencias en los mecanismos de descongelación de estos dos métodos.

Los filetes congelados lentamente y descongelados a baja temperatura presentaron una alteración leve de las fibras musculares al compararla con la morfología de las fibras musculares de los filetes que fueron descongelados en horno de microondas y en agua. Pero también se apreció cierto grado de encogimiento de las mismas así como también la presencia de huecos en las fibras causados por los cristales formados durante el proceso de congelación lenta (Figura 17a). En cuanto a los filetes descongelados a baja temperatura, pero congelados rápidamente, se observó que las fibras musculares presentaron mínima alteración al compararla con el músculo sin congelar (Figura 17b).

Con base en estos resultados, de los tres métodos de descongelación aplicados, el de descongelación a bajas temperaturas es el que ocasiona un menor daño en la morfología de las fibras musculares después del primer mes de almacenamiento en congelación. Esto nuevamente, puede estar relacionado con el tiempo de descongelación observado al descongelar a bajas temperaturas, el cual fue el tiempo más alto al compararlo con los otros dos métodos de descongelación.

a



b

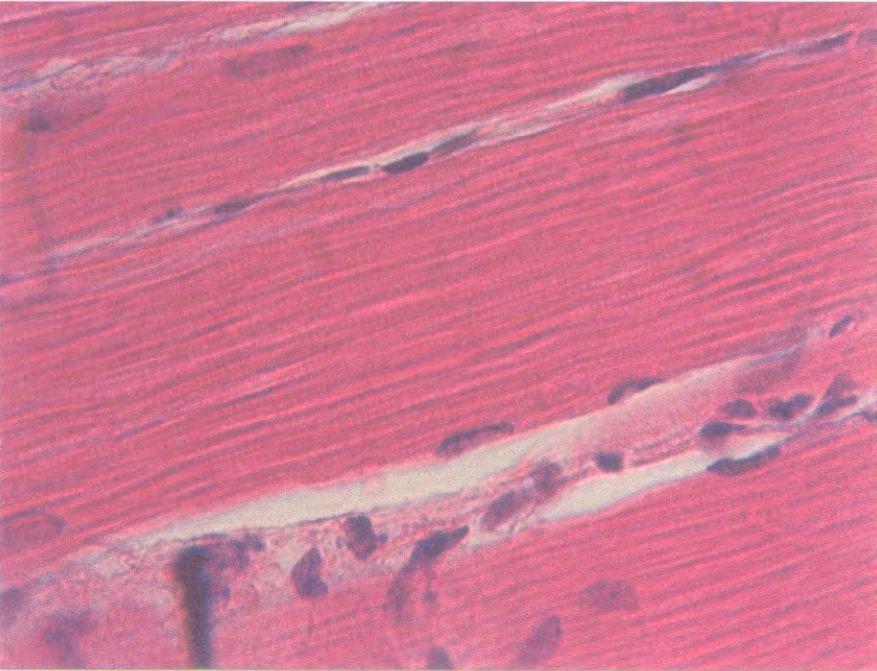


Figura 17. Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (100x).

Con respecto a lo anterior se puede pensar que la descongelación “lenta” permitió que la mayoría de las moléculas de agua en estado líquido regresaran a su posición original en la estructura del músculo, lo que ocasionó que a nivel de fibra muscular hubiera más agua disponible entre las miofibrillas (elementos contráctiles de la célula o fibra muscular), lo que evitó el encogimiento de la fibra muscular. Además es importante mencionar que en estas muestras fue donde se observó el menor porcentaje de goteo durante todo el periodo de almacenamiento en congelación.

Después del segundo mes de almacenamiento en congelación se pudo apreciar que para el caso de los filetes congelados lenta y rápidamente y descongelados en horno de microondas (Figura 18a y 18b) el daño en las fibras musculares es más severo con respecto al primer mes de almacenamiento. Se observó una mayor distorsión en la morfología de las fibras musculares, así como también el aumento en el rompimiento de las fibras. El mismo comportamiento es observado en el caso de los filetes congelados lenta y rápidamente y descongelados en agua (Figura 19a y 19b) que en función del tiempo de almacenamiento el daño en la morfología de las fibras se volvió más pronunciado. En el caso de los filetes congelados lenta y rápidamente y descongelados a bajas temperaturas (Figuras 20a y 20b) también se observó el aumento en el daño en las fibras musculares, sin embargo dicho daño al igual que después del primer mes de almacenamiento fue en menor grado al compararlo con los filetes descongelados en microondas

a



b

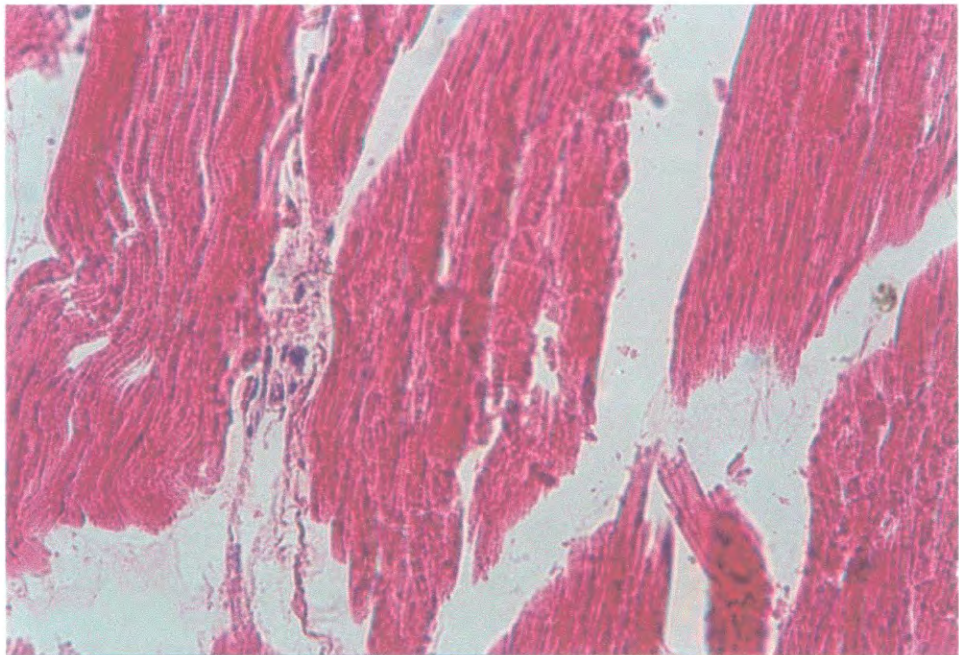


Figura 18. Fibras musculares de músculo de cazón descongelado en horno de microondas después de dos meses de almacenamiento. (a): congelado lento (100x). (b): congelado rápido (100x).

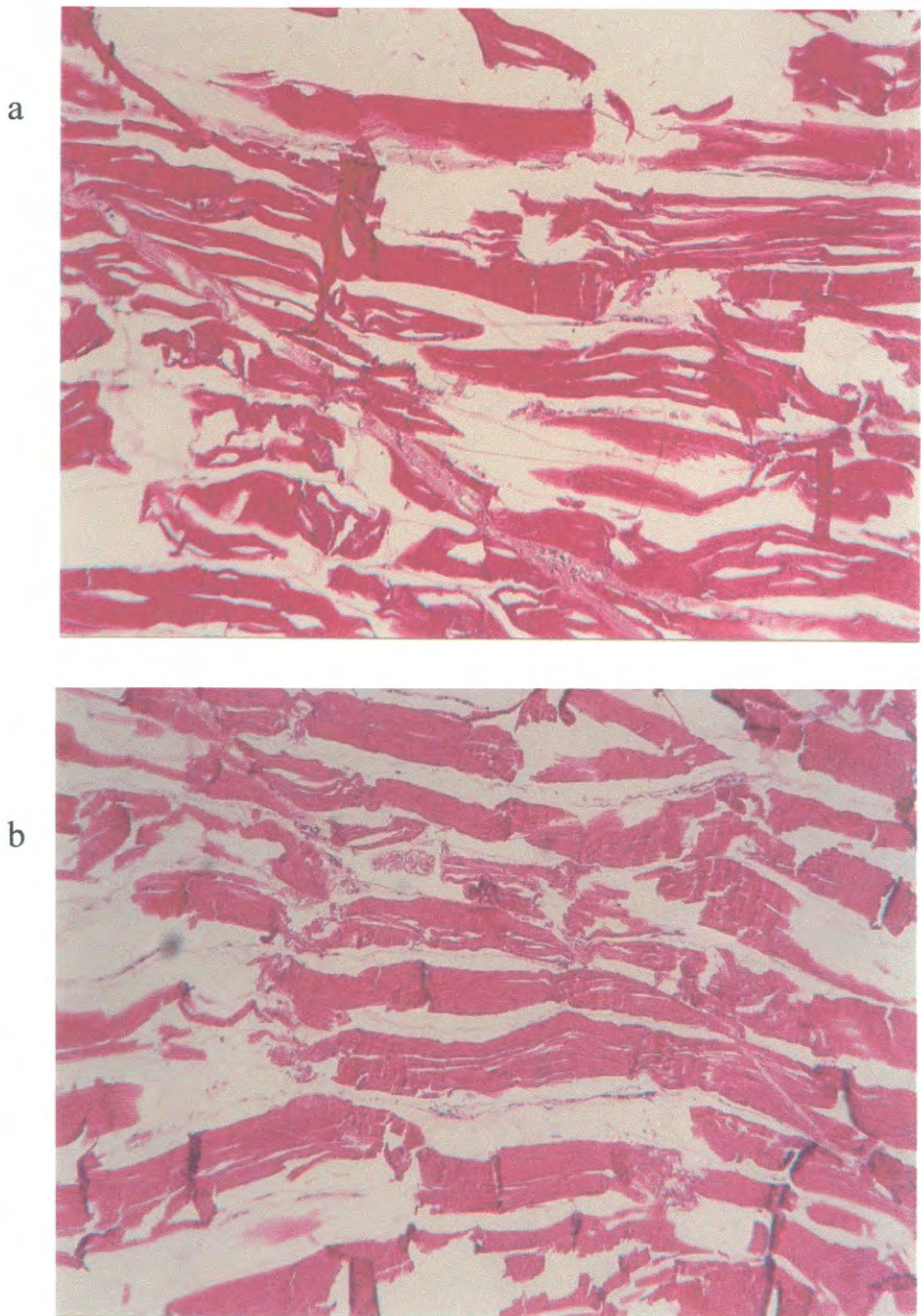


Figura 19 . Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado en agua a temperatura ambiente después de dos meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x).

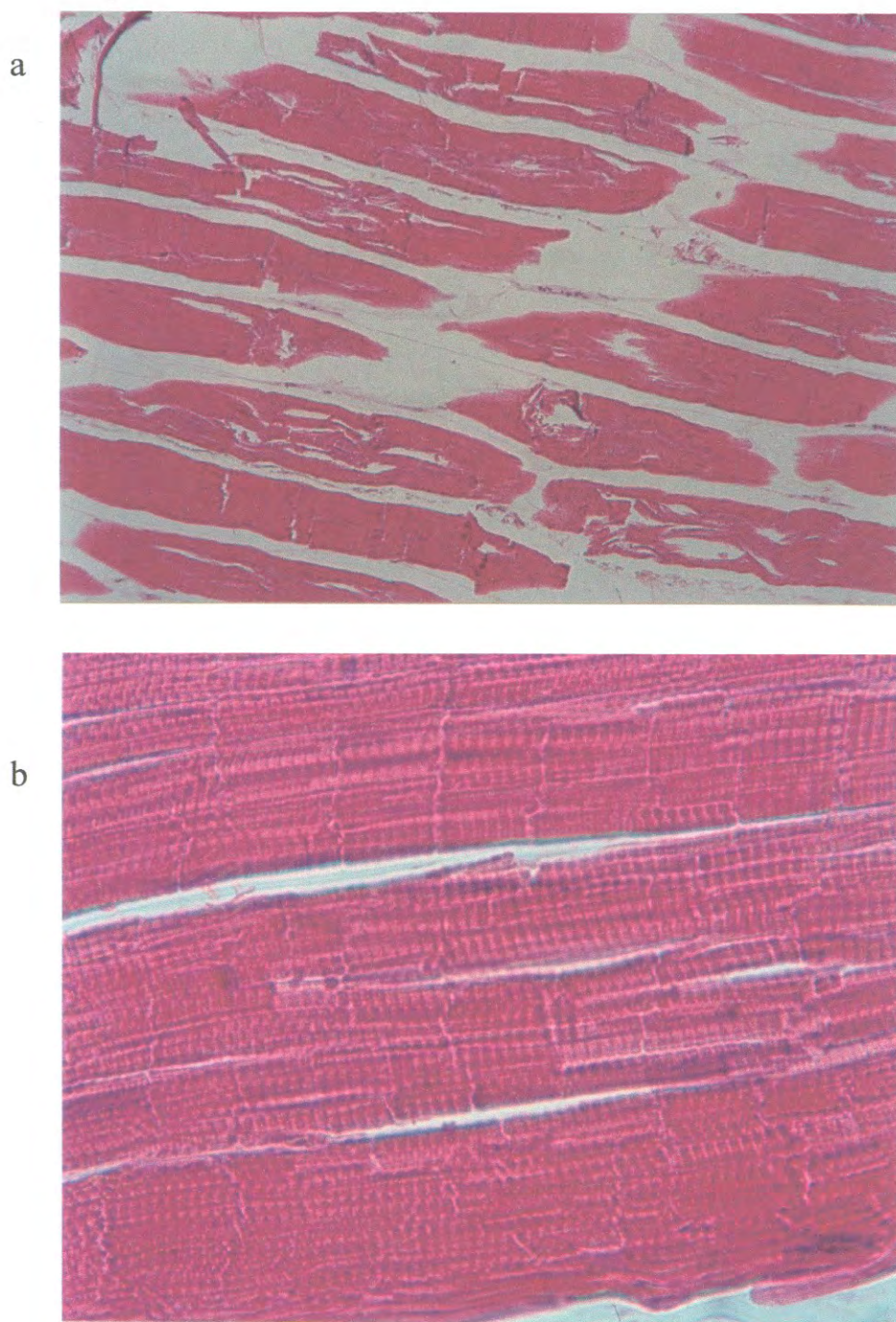


Figura 20. Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de dos meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x) (b): congelado rápido (100x).

y descongelados en agua. Al finalizar el tercer mes de almacenamiento en congelación se apreció una mayor alteración de las fibras musculares, manifestado por la torsión y rompimiento de fibras más pronunciado con respecto al músculo sin congelar y a las muestras del primero y segundo mes de almacenamiento en todos los métodos de congelación y descongelación aplicados (Figuras 21, 22 y 23).

Este aumento en la alteración de las fibras musculares con respecto al tiempo de almacenamiento podría estar relacionado con el posible crecimiento o recristalización del hielo en el músculo de cazón almacenado en congelación; Rahman (1999) menciona que la recristalización del hielo durante el almacenamiento en congelación puede llegar a influir en la calidad del producto de diversas maneras; el citado autor puntualiza que las fluctuaciones de temperatura durante el almacenamiento, pueden llegar a ocasionar una “maduración” o crecimiento de los cristales de hielo, los cuales se pueden llegar a unir y moverse hacia la superficie del producto. De acuerdo con dicho autor, el fenómeno de recristalización o crecimiento de cristales durante el almacenamiento en congelación puede ser debido al hecho de que en todo producto o material cristalino existen cristales de menor tamaño que el resto, y estos cristales pequeños son más inestables comparándolos con los cristales de mayor tamaño; por lo que bajo ciertas condiciones se puede llevar a cabo el crecimiento de los cristales de hielo.

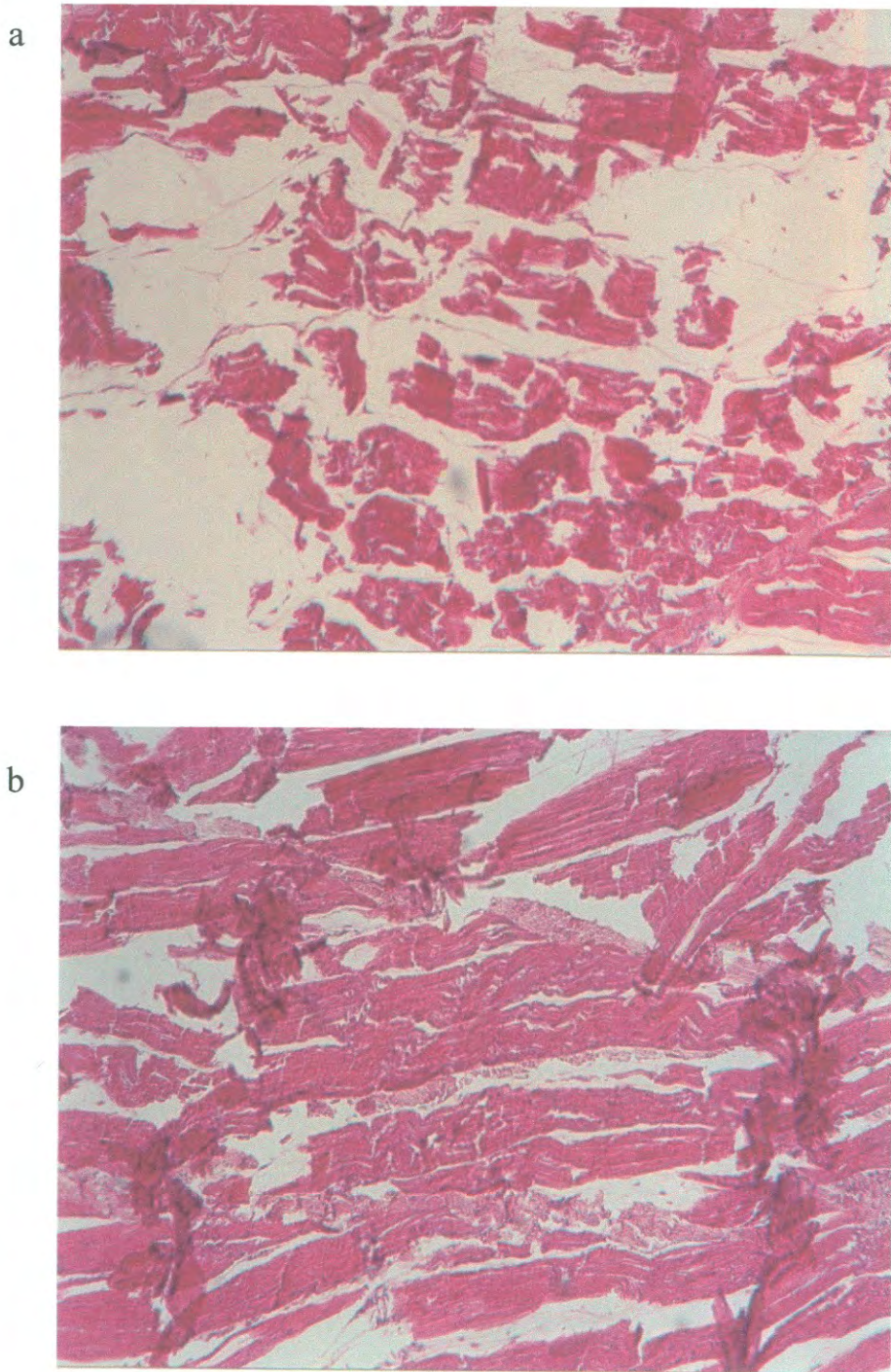


Figura 21. Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado en horno de microondas después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x).

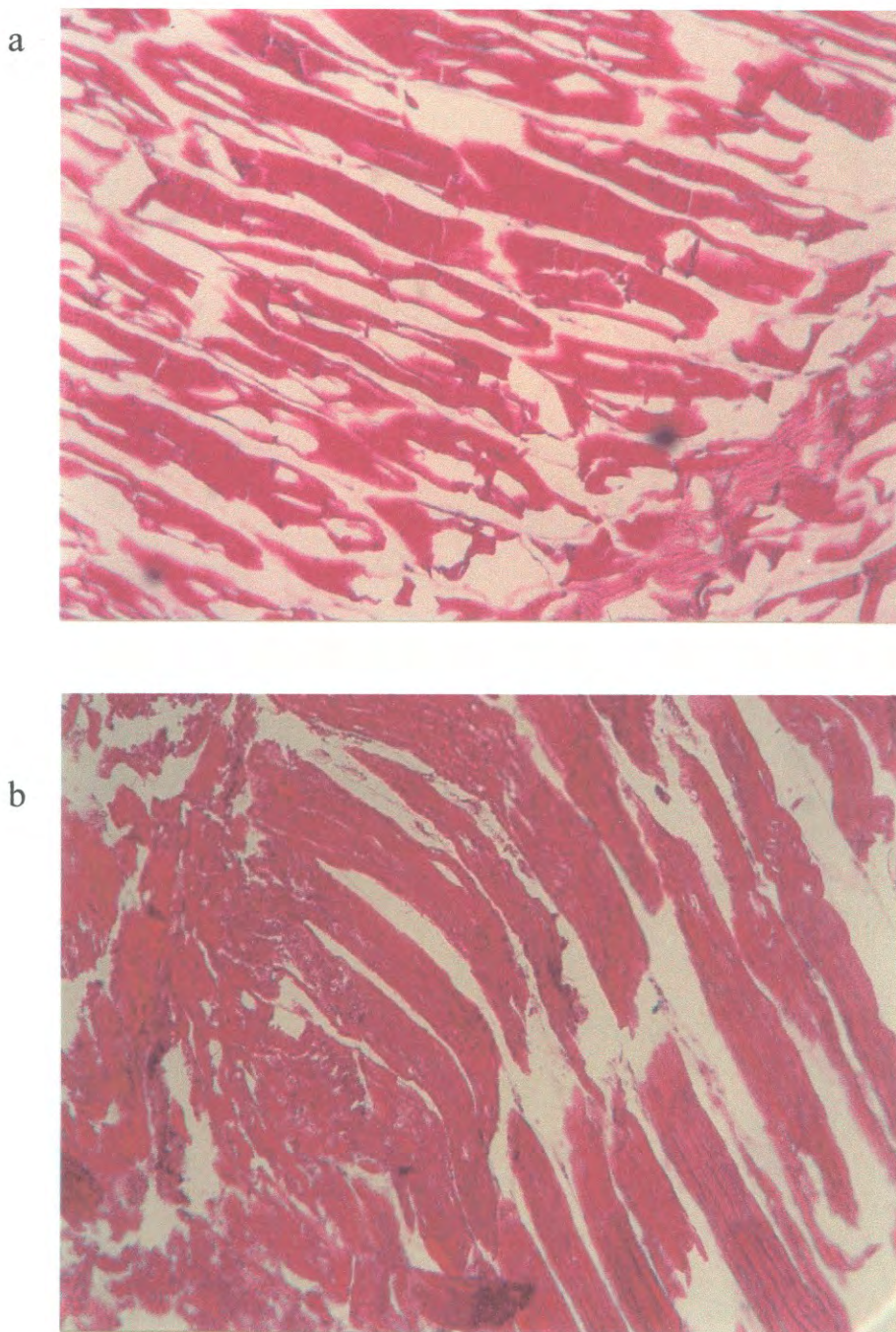


Figura 22. Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado en agua a temperatura ambiente después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x).

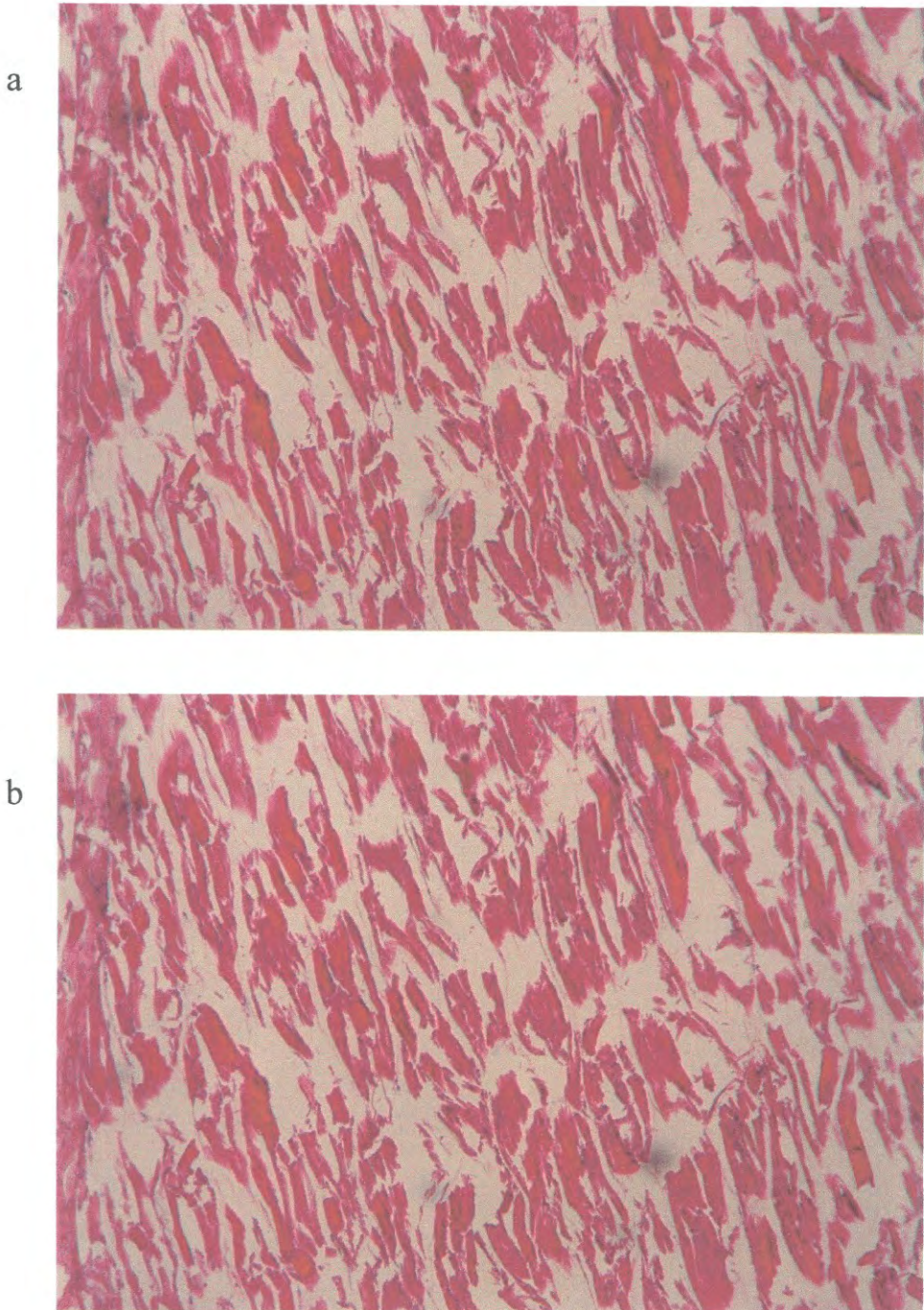


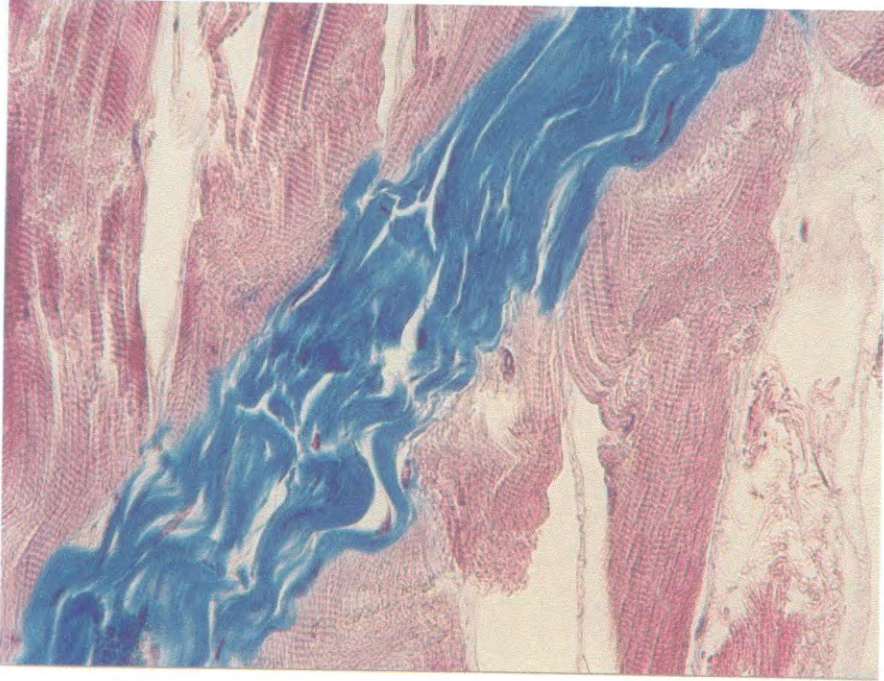
Figura 23. Cortes histológicos de músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x).

Rahman (1999) además menciona que aunque el producto se haya sometido a un proceso de congelación rápida, donde se obtienen cristales de menor tamaño, también se puede llevar a cabo el crecimiento de cristales lo que provoca cierto rompimiento celular. Con respecto a lo anterior, Foucat *et al.* (2001) observaron que en músculo de trucha almacenado a -20°C las fibras musculares presentaron un mayor daño en su morfología conforme aumento el tiempo de almacenamiento; estos autores atribuyeron dicho comportamiento a que durante el almacenamiento en congelación pudo haberse llevado a cabo el crecimiento de los cristales de hielo, lo que provocó un aumento en el volumen extracelular, y consecuentemente un mayor rompimiento y torsión de las fibras.

En lo correspondiente al tejido conectivo se observó que después de un mes de almacenamiento en congelación la estructura del tejido conectivo no presentó mayores cambios con respecto al músculo sin congelar; la unión del tejido conectivo con las fibras musculares así como la morfología del tejido conectivo es muy similar al músculo sin congelar, además entre los métodos de congelación y descongelación aplicados no se observaron diferencias marcadas en la morfología de dicho tejido (Figuras 24, 25, 26 y 27).

Al finalizar el segundo mes de almacenamiento se observó que los cambios tanto en la morfología y unión del tejido conectivo con las fibras musculares son mínimos al compararlos con el primer mes de almacenamiento y con el músculo sin congelar; además nuevamente no se observaron cambios

a



b

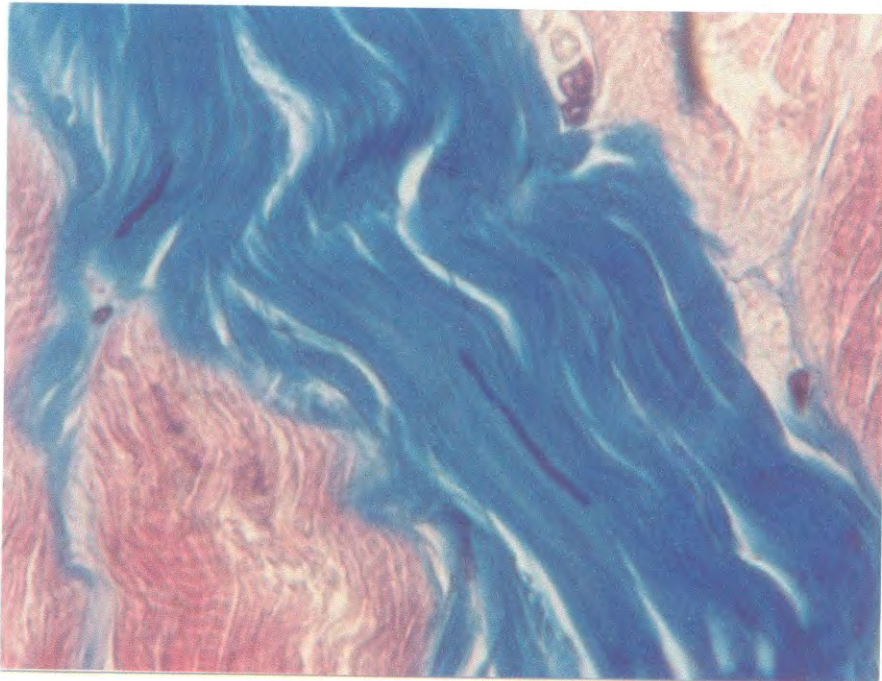
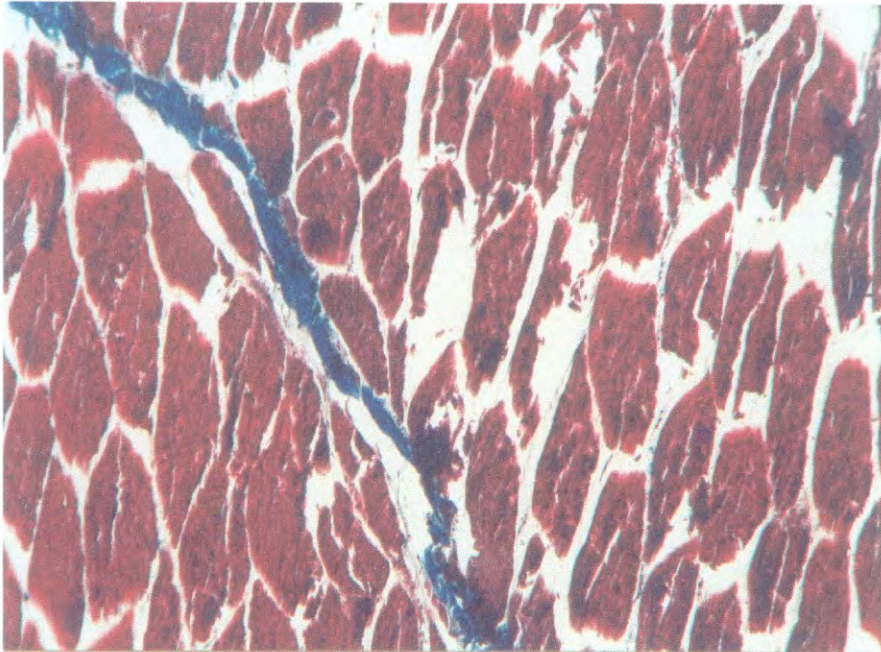


Figura 24. Corte histológico del tejido conectivo del músculo de cazón. (a) y (b): músculo sin congelar. 40 y 100 x, respectivamente.

a



b

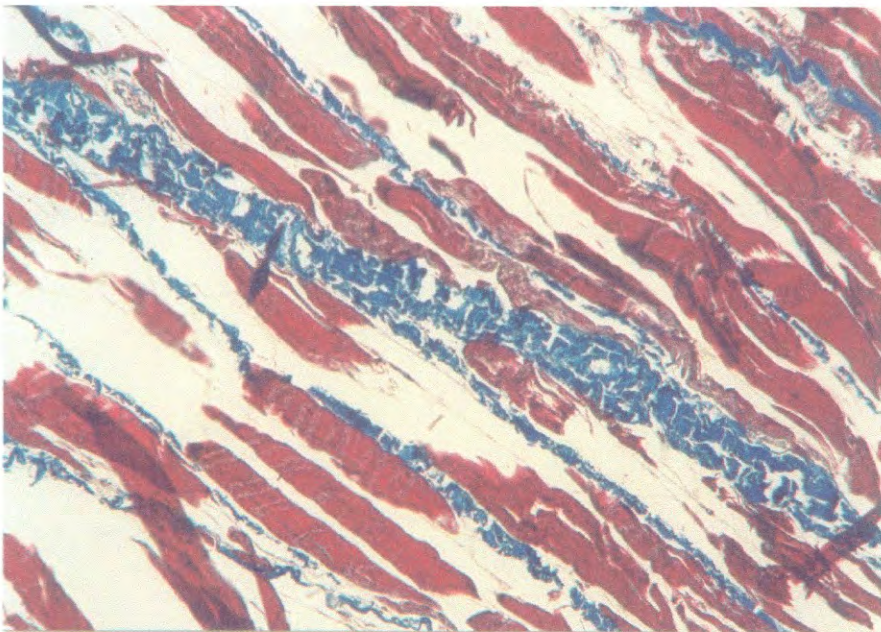


Figura 25. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en horno de microondas después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x).

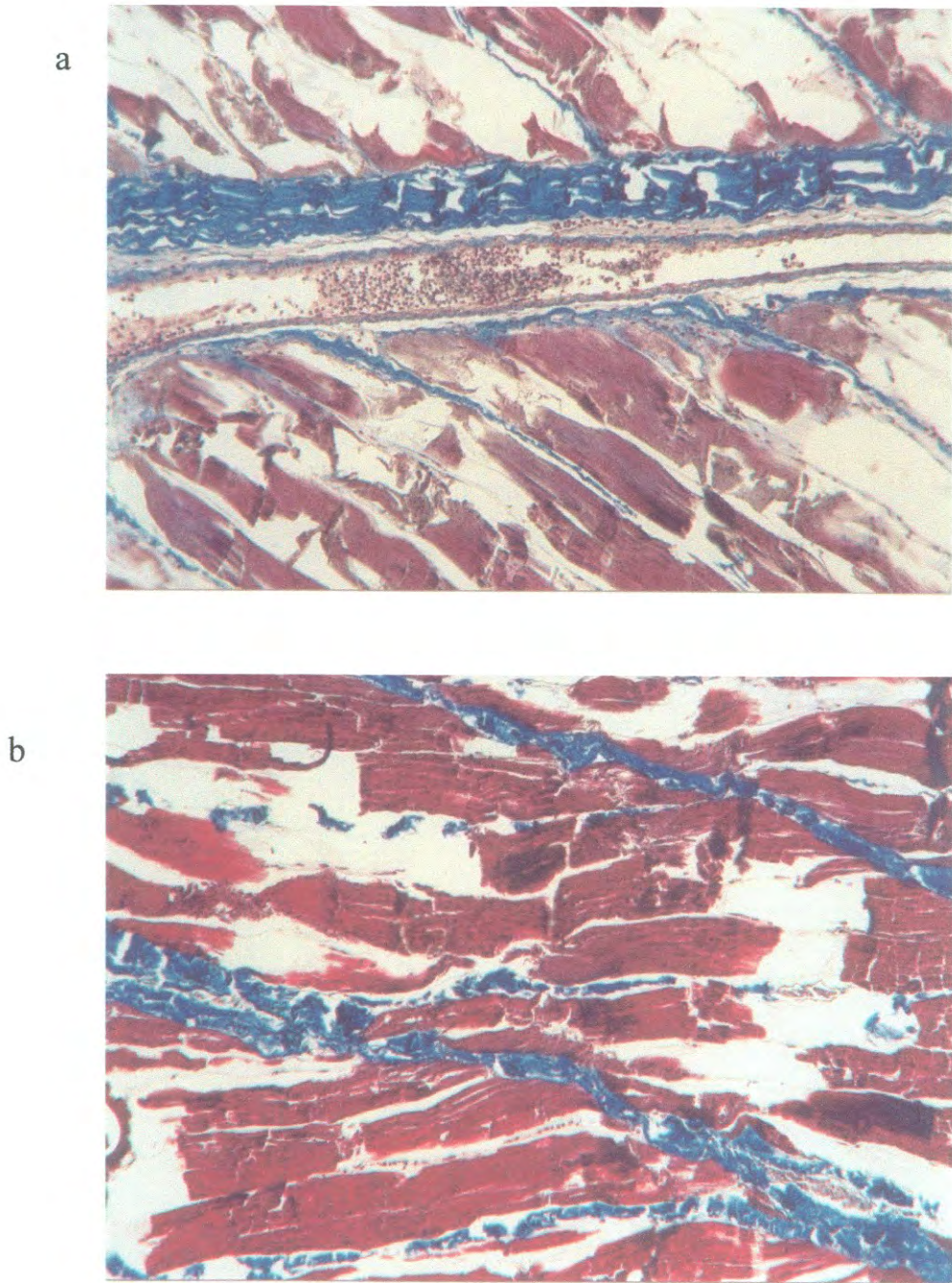
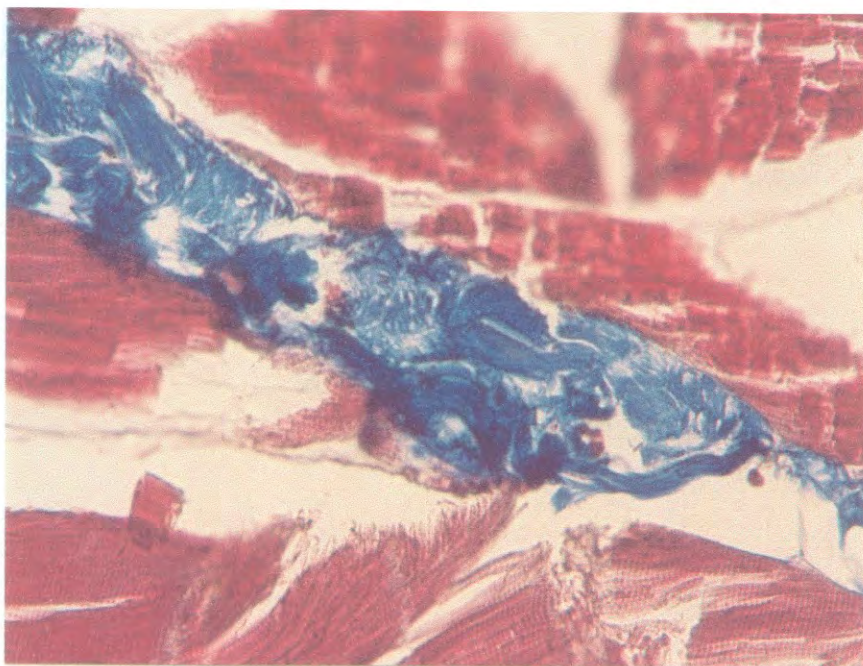


Figura 26. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en agua a temperatura ambiente después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10 x). (b): congelado rápido (10x).

a



b

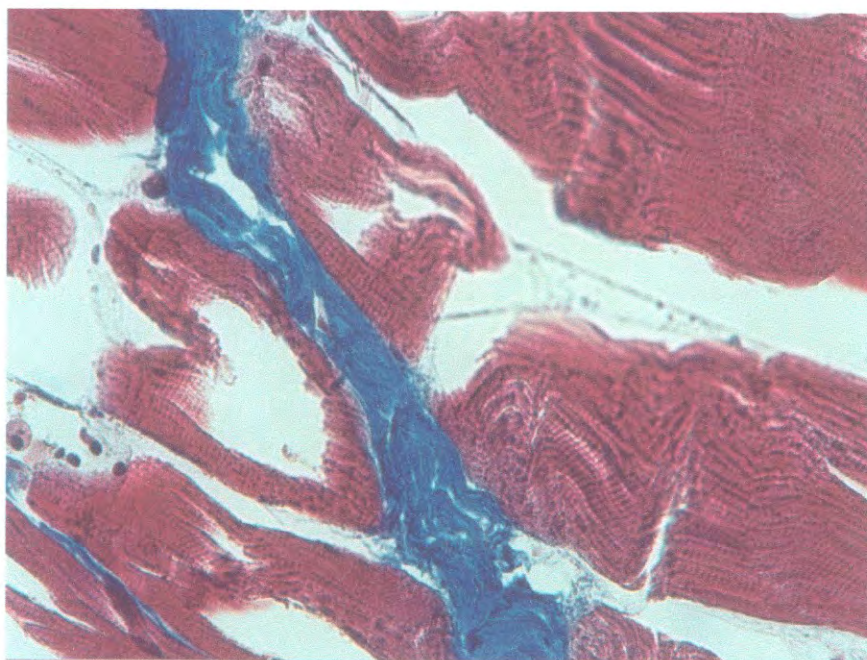


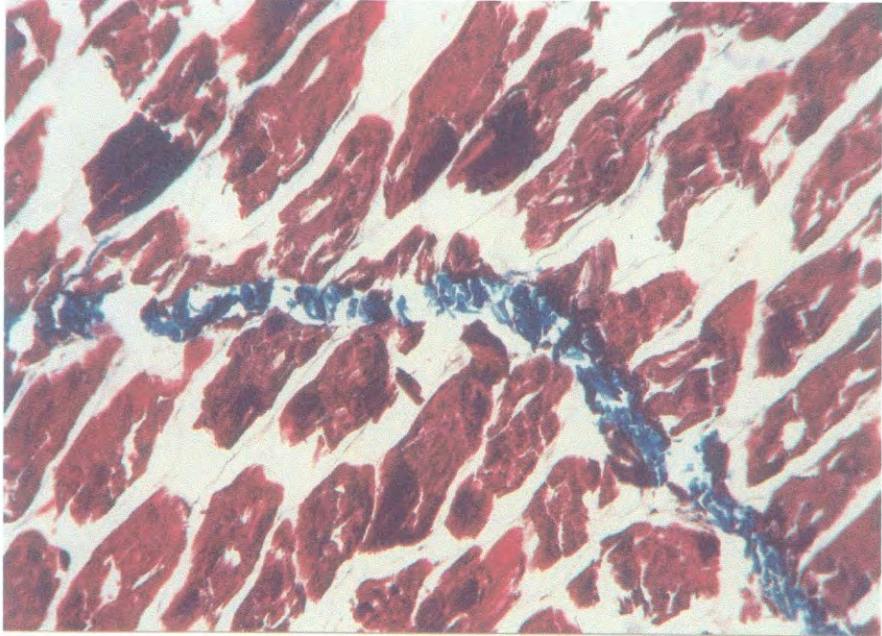
Figura 27. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de un mes de almacenamiento. (a): congelado lento (40 x). (b): congelado rápido (40x).

marcados en el tejido conectivo entre los diferentes métodos de congelación y descongelación aplicados (Figuras 28, 29 y 30).

Después del tercer mes de almacenamiento, se observó que la unión del tejido conectivo con las fibras musculares fue alterada en mayor grado, pues se observó desprendimiento del tejido conectivo de las fibras musculares y rompimiento en su estructura, pero no se observaron mayores diferencias en la morfología del tejido conectivo en cuanto a los métodos de congelación y descongelación utilizados (Figuras 31, 32 y 33).

Los resultados obtenidos en el estudio histológico en cuanto al tejido conectivo indican que el colágeno que es el mayor componente en dicho tejido, presentó cierta estabilidad a los procesos tanto de congelación como de descongelación aplicados en este estudio. Probablemente el daño observado en la estructura del tejido conectivo después de el tercer mes de almacenamiento, pudo estar relacionado con el marcado daño en las fibras musculares presentado a este mismo tiempo de almacenamiento, el cual fue atribuido al crecimiento de los cristales de hielo en el músculo durante el almacenamiento en congelación.

a



b

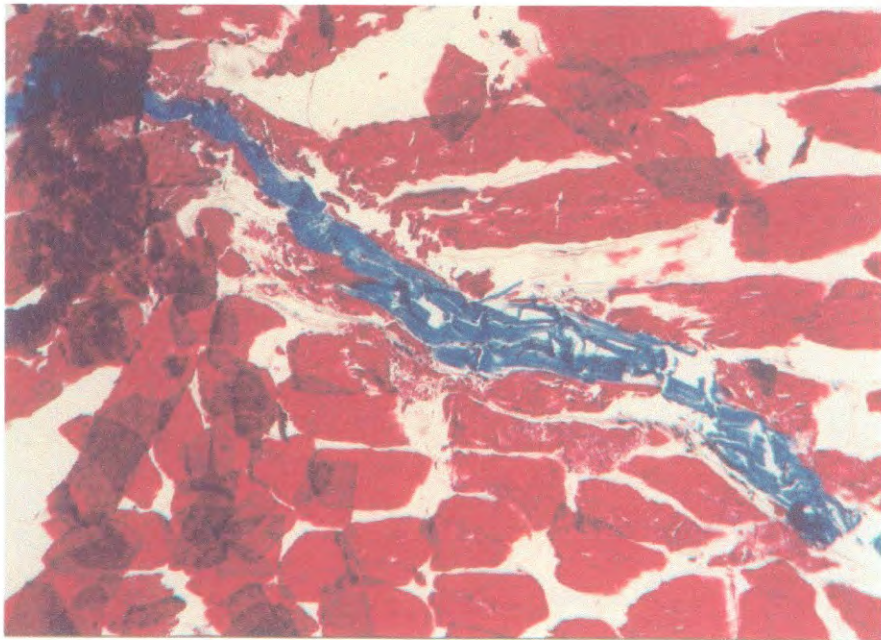
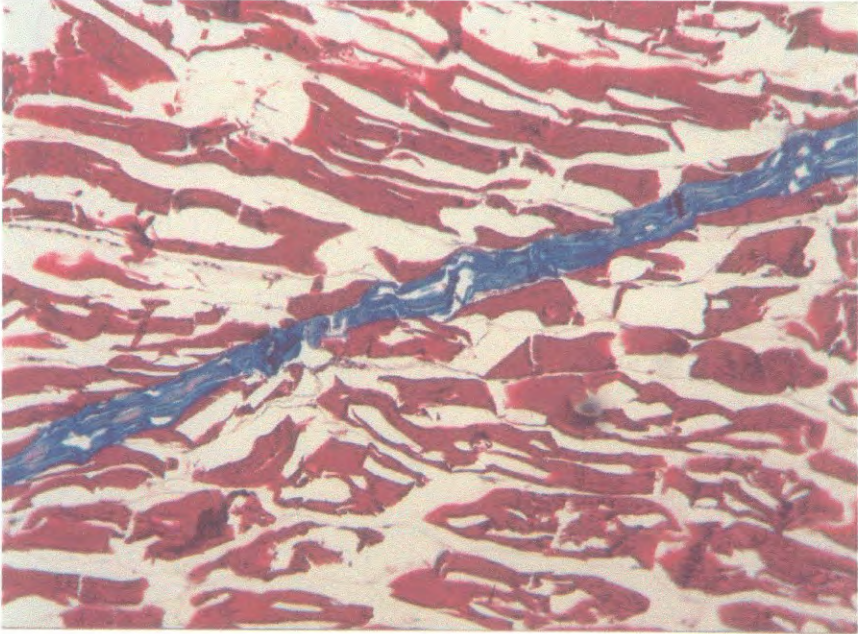


Figura 28. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en horno de microondas después de dos mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x).

a



b

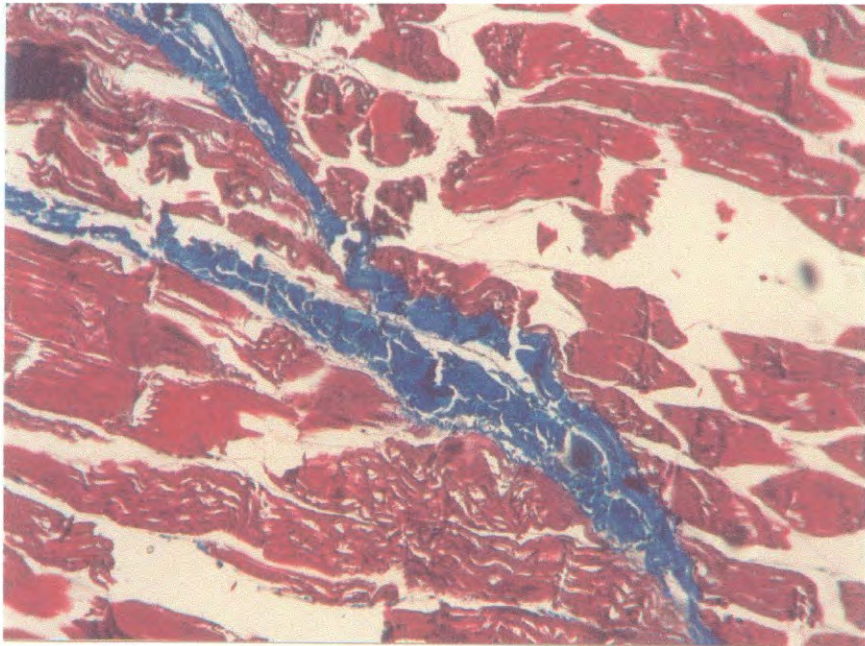
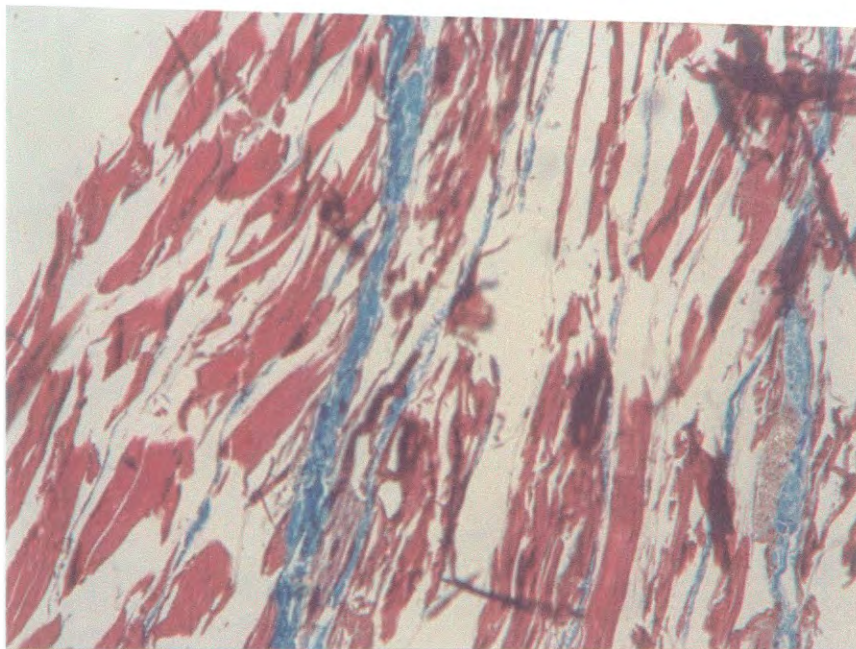


Figura 29. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en agua a temperatura ambiente después de dos meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x).

a



b

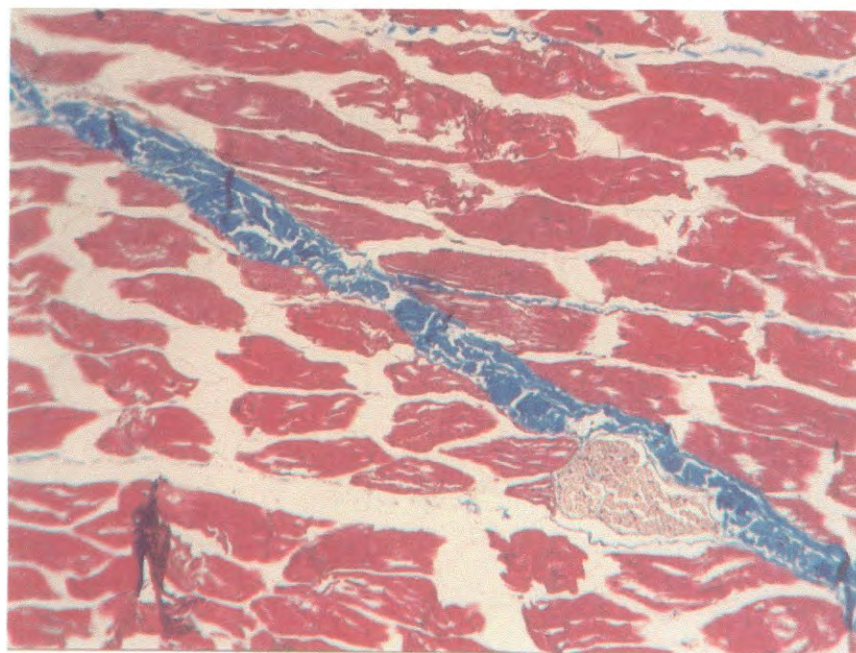
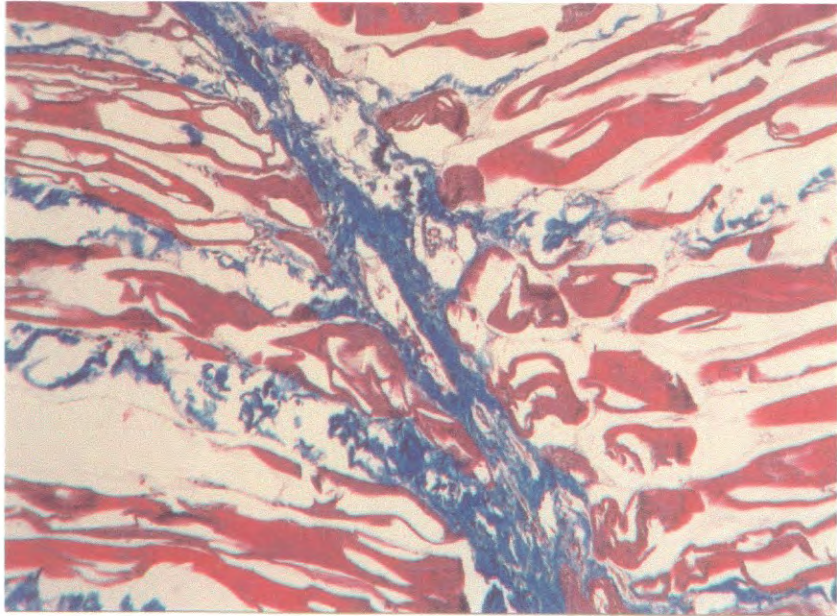


Figura 30. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de dos mes de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (10x).

a



b

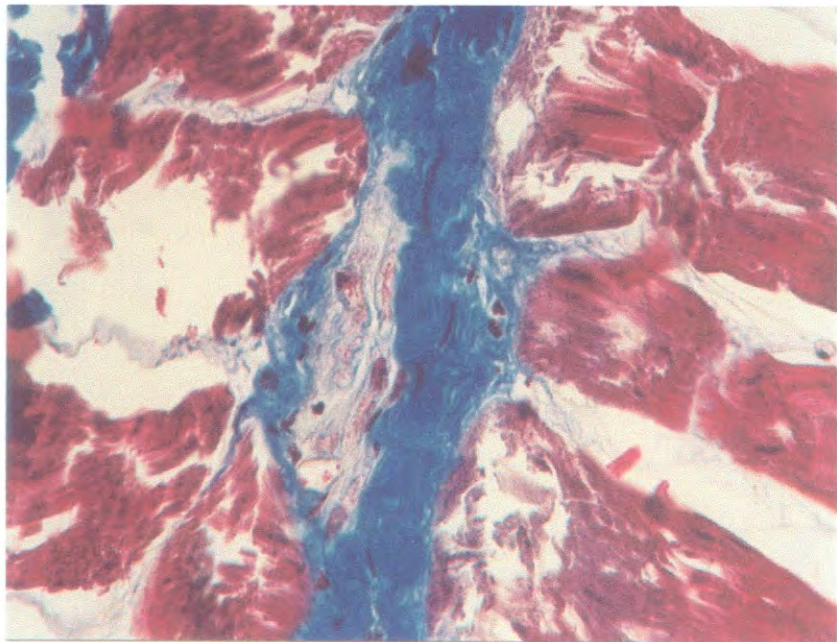


Figura 31. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en horno de microondas después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (40x).

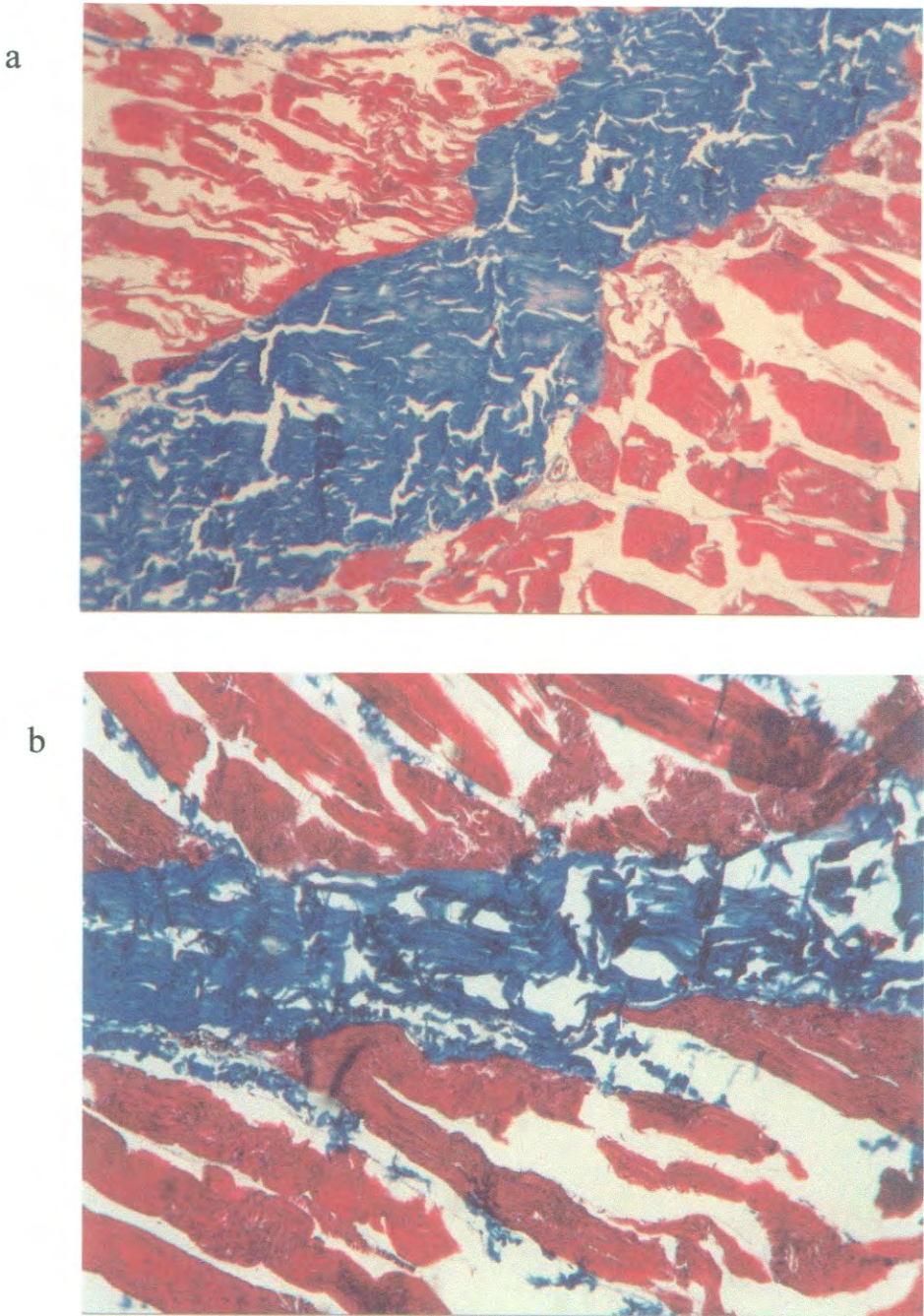


Figura 32. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado en agua a temperatura ambiente después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (40 x). (b): congelado rápido (40x).

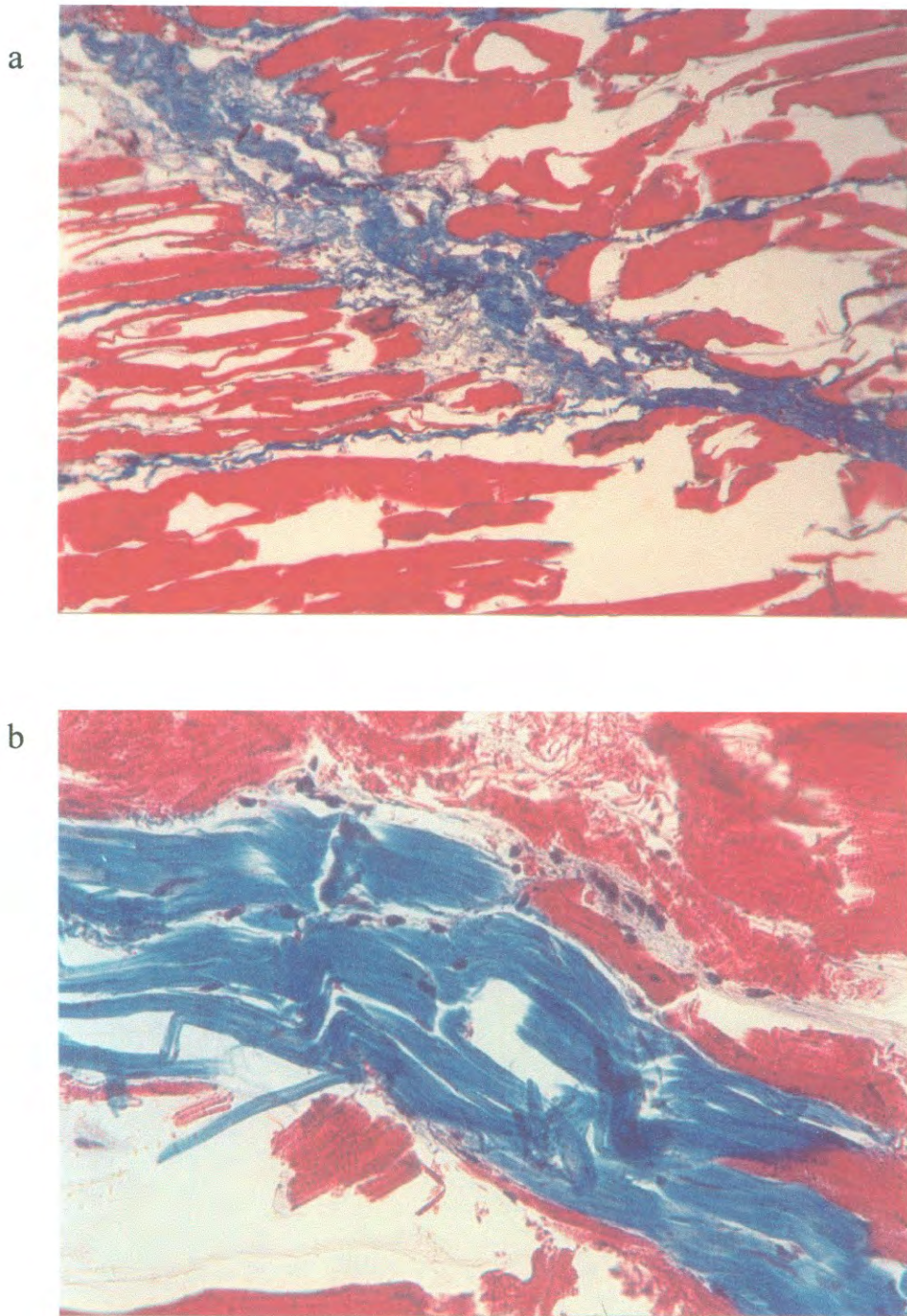


Figura 33. Cortes histológicos del tejido conectivo del músculo de cazón descongelado a baja temperatura después de tres meses de almacenamiento. (a): congelado lento (10x). (b): congelado rápido (40x).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los filetes descongelados a baja temperatura fueron los que presentaron el menor porcentaje de goteo durante todo el periodo de almacenamiento en congelación.

Los diferentes procesos de congelación y descongelación no afectaron la resistencia al corte del músculo de cazón., sin embargo, aumento conforme avanza el tiempo de almacenamiento .

Los procesos de congelación y descongelación evaluados no afectaron las temperaturas máximas de desnaturalización de las proteínas miosina, sarcoplasmicas y/o estroma y actina del músculo de pescado.

La disminución del cambio de entalpía en los filetes que fueron sometidos a procesos de congelación lenta con procesos de descongelación rápida, indico un aumento en la desnaturalización de la miosina conforme paso el tiempo de almacenamiento .Sin embargo, esta variable respuesta no indico cambios conformacionales de la miosina en los filetes descongelados a baja temperatura.

Bajo las condiciones de este estudio, los procesos de congelación y descongelación evaluados no afectaron el cambio de entalpía de desnaturalización de las proteínas sarcoplasmicas y/o estroma ni de la actina del músculo de cazón.

El tiempo de almacenamiento afectó el perfil electroforético de la actina y la miosina. La actina presentó una mayor estabilidad que la miosina a los procesos de congelación y descongelación aplicados en este estudio.

Los picos del densitograma correspondientes a la miosina tendieron a disminuir en su proporción después del tercer mes de almacenamiento, indicando la desnaturalización de esta proteína debido a la posible formación de agregados proteicos de alto peso molecular.

El menor daño en la estructura de las fibras del músculo de cazón se observó en las muestras descongeladas a baja temperatura después del primer mes de almacenamiento; sin embargo, conforme aumentó el tiempo de almacenamiento, las fibras presentaron un mayor daño y alteración, independientemente del método de congelación y descongelación utilizado.

La estructura del tejido conectivo del músculo de cazón presentó cambios marcados después del tercer mes de almacenamiento en congelación; además no se observó una influencia de los métodos de congelación y descongelación.

Se recomienda trabajar con geles de acrilamida de menor porcentaje o en su defecto utilizar otro tipo de técnicas electroforéticas como la bidimensional, con la finalidad de corroborar la formación de agregados proteicos de alto peso molecular.

Utilizar técnicas de análisis más profundas, como resonancia magnética nuclear (RMN) que permitan observar los cambios sufridos a nivel estructural de las proteínas del músculo de pescado debido a los procesos de congelación y descongelación.

Por último es recomendable llevar a cabo la realización de estudios sensoriales con la finalidad de establecer la posible influencia de los cambios sufridos a nivel bioquímico en el músculo de pescado en la aceptación del consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- A.O.A.C. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, V.A.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Reff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. 1983. Capitulo 10. The Cytoskeleton. En: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. New York y London.. pp. 550-561.
- Applegate, S. P., Espinosa L., L, Menchaca L., y Sotelo F., 1979. Tiburones Mexicanos. Subsecretaría de Educación e Investigación Tecnológica, Dirección General de Ciencia y Tecnología del Mar, México. pp 147.
- ASHRAE Handbook. 1994. Refrigeration Systems and Applications. American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers. Atlanta, GA.
- Badii, F. y Howell, N.K. 2002. Effect of Antioxidants, Citrate and Cryoprotectans on Protein Denaturation and Texture of Frozen Cod (*Gadus morhua*). J. Agric. Food Chem. 50: 2053-2061.
- Baduij, S. 1993. Química de los Alimentos. Tercera Edición. Editorial Alhambra Mexicana, S.A.de C.V. pp 123-210.
- Beas, B.E., Wagner, J.R., Crupkin, M y Añon, M.C. 1990. Thermal Denaturation of Hake (*Merluccius hubbsi*) Myofibrillar Proteins. A Scanning Calorimetric and Electrophoretic Study. J. Food Sci. 55: 683-687.

- Belitz, H.D. y Grosch, W. 1999. Capítulo 2. Proteins. En: Food Chemistry. Segunda Edición. Springer-Verlag, Germany.
- Borderias, A.J. y Montero, P. 1985. Changes in Fish Muscle Collagen During Frozen Storage. En: Storage Lives of Chilled and Frozen Fish and Fish Products. Proceedings of Meetings of: Comissions C2 and D3. International Institute of Refrigeration. Paris, France.
- Brandon, A. y Tooze, B. 1999. Introduction to Protein Structure. Segunda Edición. Garland Publishing. Inc. NY. pp. 45-78.
- Burges, G. 1987. El Pescado y las Industrias Derivadas de la Pesca. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Campagno, L.J.V., Krupp, F. Y Scheneider, W. 1995. Guia FAO Para la Identificación de Especies Para los Fines de Pesca. Pacífico Centro Oriental. Volumen 2. pp. 730-740.
- Careche, M., Del Mazo, M.L., Torrejon, P. y Tejada, M. 1998. Importance of Frozen Storage in the Type of Aggregation of Myofibrilar Proteins in Cod (*Gadus morhua*) Fillets. J. Agric. Food Chem. 46: 1539-1546.
- Castillo-Géniz, J. L. 1992. Diagnóstico de la pesquería de tiburón en México. Secretaría de Pesca. México. pp 72
- Castillo-Géniz, J.L., Márquez-Farías J.F., Rodríguez de la Cruz M.C., Cortés E. y Cid del Prado A. 1998. The Mexican Artesanal Shark Fishery in the Gulf of Mexico: Toward a Regulated Fishery. Aust. J. Mar. Freshwater Res. 49: 611-620.

- Castro, J.I. 1993. The shark Nursery of Bulls Bay, South Carolina, with a Review of Sharks Nurseries of the Southern Coast of United States. *Envir. Biol. Fish* 38:37-48
- Compagno, L.J.V. 1984. Sharks of the World. An Annotated and Illustrated Catalogue of Sharks Species Known to Date. Part 1 & 2. Carcharhiniformes. *FAO Fish. Synop.* 125(4):251-655.
- Compagno, L.J.V. 1988. Sharks of the order Carcharhiniformes. Princeton University Press, Princeton.
- Compagno, L.J.V. 1990. Sharks Exploitation and Conservation. En: Pratt Jr., H.L., Gruber, S.H. y Taniuchi, T. (eds). *Elasmobranchs as Living Resources: Advances in the Biology, Ecology, Systematics, and the Status of the Fisheries*. NOAA Tech. Rep. NMFS 90:391-414.
- Chawla, P., MacKeigan, P. y Gould, S.P. 1988. Influence of Frozen Storage on Microsomal Phospholipase Activity in Myotomal Tissue of Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Can. Inst. Food Sci. Technol.* 21:399.
- Dunajski, E. 1979. Texture of Fish Muscle. *J. Text Studies.* 10: 301-318.
- Dyer, W.J. 1951. Protein Denaturation in Frozen and Stored Fish. *Food Res.* 16: 522-546.
- Dyer, W.J. 1971. Speed of Freezing and Quality of Frozen Fish. En: *Fish Inspection and Quality Control*. Kreuzer, R. (Ed). Fishing News Books, Farnham. pp. 75-78
- Foucat, L., Taylor, R.G., Labas, R. y Renou J.P. 2001. Characterization of Frozen Fish by NMR Imaging and Histology. *American Laboratory.* pp. 38-43.

- Garthwaite, G.A. 1997. Chilling and Freezing of Fish. Capitulo 4. En: Fish Processing Technology. Hall, G.M. (Ed). Blackie Academic and Professional. London, UK.
- George, R.M. 1993. Freezing Process Used in the Food Industry. Trends Food Sci. Technol. 4: 134.
- Gomez-Pastrana Rubio, J.M. 2002. Congelación de Pescados y Factores que Influyen en su Calidad. Alimentación, Equipos y Tecnología. 174: 71-73.
- Haard, N.F. 1990. Biochemical Reactions in Fish Muscle During Frozen Storage. En: Seafood Science and Technology Proceedings of the International Conference Seafood 2000, in the Canadian Institute of Fisheries Technology of the Technical University of Nova Scotia, Halifax, Canada. Graham, E. (Ed) Fishing News Books, Blacwell Scientific Publications Ltd. pp.176-209.
- Haard, N.F. 1995. Composition and Nutritive Value of Fish Proteins and Other Nitrogen Compounds. Capitulo 3. En: Fish and Fishery Products. Composition, Nutritive Properties and Stability. Ruitter, A. (Ed). CAB International.
- Hale, M.B. y Waters, M.E. 1981. Frozen Storage Stability of Whole and Headless Freshwater Prawns (*Machrobrachium rosenbergii*). Marine Fish. Rev. 42: 18-21.
- Hamada, I., Yabuno, F., Furumatsu, K. y Niwa, E. 1982. The Effect of Lipid on the Heat Denaturation of Actomyosin. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 48:189-193.

- Hamoir, G. 1975. *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press. New York. pp 227-288.
- Hastings, R.J., Rodger, G.W., y Anderson, E.M. 1985. *Diferential Scanning Calorimetry of Fish Muscle: The Effect of Processing and Species Variation*. *J. Food Sci.* 50(2): 503-506.
- Henn, E. y Karsti, O. 1965. *Fish and Shellfish Freezing*. En: *Fish as Food*. Vol. 4. Borstrom, G. (Ed). Academic Press, London. pp. 355-418
- Hill, A. 2001. *Microwave Ovens*. International Life Sciences Institute, Europe. Impreso en Bélgica. pp. 1-21.
- Hofmann, K. y Hamm, R. 1978. *Sulfhydryl and Disulfide Groups in Meats*. *Advances in Food Research*. 24, 1-111.
- Howgate, P. 1979. *Fish*. Capitulo 9. En: *Food Microscopy*. Vaughan, J.G. (Ed). Academic Press Inc. London. pp. 343-389.
- <http://www.inegi.gob.mx/estadistica/espanol>
- Hung, Y.C. y Kim, N.K. 1996. *Fundamental Aspects of Freeze Cracking*. *Food Technol.* 50:59.
- Hyldeg, G. y Nielsen, D. 2001. *A Review of Sensory and Instrumental Methods Used to Evaluate the Texture of Fish Muscle*. *J. Text Studies*. 32: 219-242.
- INE, 2000. *Ordenamiento Ecológico del Mar de Cortéz*. En: <http://www.ine.gob.mx/enautica>.
- INP, 2000. *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México. Evaluación y Manejo (1999-2000)*. En: <http://inp.semarnat.gob.mx/publicaciones/sustentabilidad/>
- Jhonston, W.A., Nicholson, F.J., Roger, A. y Stroud, G.D. 1994. *Freezing and Refrigerated Storage in Fisheries*. FAO Fisheries Technical Paper.

- Keizer, C. 1995. Freezing and Chilling of Fish. Capitulo 10. En: Fish and the Fishery Products. Composition, Nutritive Properties and Stability. Ruiters, A. (Ed). CAB. International.
- LeBlanc, E.L. y LeBlanc, R.J. 1989. Separation of Cod (*Gadus morhua*) Fillet Proteins by Electrophoresis and HPLC After Various Storage Treatments. J. Food Sci. 54: 827-834.
- Lemli, U.K. 1970. Most Commonly Used Discontinuous Buffer System for SDS Electrophoresis. Nature. 227:680.
- Lewin, S. 1974. Displacement of Water and Its Control of Biochemical Reactions. Academic Press. London.
- Lim, H.K. y Haard, N.F. 1984. Protein Insolubilization in Frozen Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). J. Food Biochem. 8(3):163-187.
- Lou, X., Wang, C., Xiong, Y.L., Wang, B., Liu, G. Y Mims, S.D. 2000. Physicochemical Stability of Paddlefish (*Polyodon spathula*) Meat Under Refrigerated and Frozen Storage. J. Aq. Food Prod. Technol. 9(4): 26-39.
- Love, M.R. 1988. Aspects of Quality. Texture. Capitulo 6. En: The Food Fishes. Their Intrinsic Variation and Practical Implications. Love, M.R (Ed). Farrand Press, London, UK.
- Matsumoto, J.J. 1979. Denaturation of Fish Muscle Proteins During Frozen Storage. En: Proteins at Low Temperatures. O. Fennema (Ed). Advances in Chemistry Series. American Chemical Society. Washington D.C. pp. 205-224
- McClain, P.E., Wiley, E.R. y McCague, K.E. 1971. Species Variations in the Cross-linking Characteristics of Collagen From the Intramuscular Connective Tissues of Striated Muscles. Int. J. Biochem. 2: 167.

- Meza-Vazquez, R. 2000. Aplicación del Proceso de Escabeche en una Especie Magra de Pescado. Tesis de Licenciatura Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora. México.
- Montero, P. y Borderias, J. 1992. Influence of Myofibrillar Proteins and Collagen Agregation on the Texture of Frozen Hake Muscle. En: Quality Assurance in the Fish Industry. Huss, H.H., Jakobsea, M. y Liston, J. (Eds). Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam. pp. 149-167.
- Mortimer, Ch.E. 1983. Quimica. Quinta Edicion. Grupo Editorial Iberoamerica. pp 116-137.
- Musick, J.A., Burges, G., Cailliet, G., Camhi, M., y Fordham, S. 2000. Management of Sharks and Their Relatives (Elasmobranchii). AFS Policy Statement. 3(25):9-13.
- Myers, C.D. 1990. Study of Thermodynamics and Kinetics of Protein Stability by Thermal Analysis. Ch. 2. En: Thermal Analysis of Food. Harwalkar, V.R. y Ma, C.Y. (Ed). Elsevier Applied Science. London.
- Niwa, E., Koda, S. y Nakayama, T. 1986. Freezing-Induced Exposure of Hydrophobic Amino Acid Residues From Actomyosin. Nippon Suisan Gakkaishi.. 52:859-862.
- Norma Oficial Mexicana NOM-029-PESC-2000. Pesca Responsable de Tiburón y Especies Afines. Especificaciones Para su Aprovechamiento.
- Offer, G. 1987. Myosin Filaments. En: Fibrous Protein Structure. Squire, J.M. y Vibert, P.J. (Eds). Academic Press. London pp. 307-357

- Oshima, T., Wada, S. y Kouzimi, C. 1984. Effect of Accumulated Fatty Acid on Reduction of Salt Soluble Protein of Cod Flesh During Frozen Storage. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 50:1567.
- Owusu-Ansah, Y.J. y Hultin, H.O. 1986. Chemical and Physical Changes in Red Hake Filets During Frozen Storage. J. Food Sci. 51 (6): 1402-1406.
- Owusu-Ansah, Y.J. y Hultin, H.O. 1992. Differential Insolubilization of Red Hake Muscle Proteins During Frozen Storage. J. Food Sci. 57(2):265-266.
- Poulter, R.G., Ledward, D.A., Godber, S., Hall, G. y Rowlands, B. 1985. Heat Stability of Fish Muscle Proteins. Journal of Food Technol. 20:203-217.
- Prophet, E. y Mills, B. 1992. Metodos Histotecnologicos. Instituto de Patologia de las Fuerzas Armadas de America pp. 27-35.
- Pyeun, J.H., Hashimoto, K. y Matsuura, F. 1973. Isolation and Characterization of Abalone Paramyosin. Jap Soc Sci Fish. pp 39-395.
- Ragnarsson, K. and Regenstein, J.M. 1989. Changes in Electrophoretic Patterns of Gadoid and Non-gadoid Fish Muscle During Frozen Storage. Journal of Food Sci. 54: 819-823.
- Rahman, M.S. 1999. Food Preservation by Freezing. Capitulo 8. En: Handbook of Food Preservation. Rahman, M.S. (Ed). Marcel Dekker, Inc.
- Rehbein, H. 1988. Relevance of Trimethylamine Oxide Demethylase Activity and Haemoglobin Content to Formaldehyde Production and Texture Deterioration in Frozen Stored Minced Fish Muscle. J. Sci. Food Agric. 43: 261.

- Saad, F., Kominz, D.R. y Laki, K. 1959. A Study of the Tropomyosins of Three Cold-Blooded Vertebrates of Different Classes. *J. Biochem Chem.* 234: 551-555.
- Santos, E.E.M. y Regenstein, J.M. 1990. Effects of Vacuum Packaging, Glazing and Erythorbic Acid on the Shelf Life of Frozen White Hake and Mackerel. *J. Food Sci.* 55(1): 64-70.
- Sato, K., Yoshinaka, R. y Sato, M. 1989. Hydroxyproline Content in the Acid Soluble Collagen From Muscle of Several Fishes. *Jap Soc Sci Fish.* 55: 1467.
- Sato, K., Yoshinaka, R., Itoh, Y. y Sato, M. 1986. Molecular Species on the Intramuscular Connective Tissue of Fish. *Comp. Biochem. Physio.* 92: 87-91.
- Schubring, R. 1999. DSC Studies on Deep Frozen Fishery Products. *Thermochimica Acta.* 337:89-95.
- Seafood Industry Training Organization (Seafood ITO). 2000. Learning Resource for Unit Standard 6203. Thaw Seafood Products.
- Seki, N., Kitao, M., Konno, K., y Arai, K. 1973. On the Purification of Actin From Fish Muscle. *Jap Soc Sci. Fish.* 39: 1211-1219.
- Sevilla, M.L. 1983. *Biología Pesquera. Los Conocimientos Biológicos y su Aplicación a las Actividades Pesqueras.* Compañía Editorial Continental. S.A. de C.V. pp 77-78.
- Shahidi, F. 1992. Seafood Proteins and Preparation of Protein Concentrates. En: *Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality.* Shahidi, F. y Botta, J.R. (Ed). pp 2-9.

- Shenouda, S.Y.K. 1980. Theories of Protein Denaturation During Frozen Storage of Fish. *Adv Food Res.* 26: 275-307.
- Shenouda, S.Y.K. y Piggot, G.M. 1977. Fish Myofibrillar Protein and Lipid Interaction in Aqueous Media as Detected by Isotope Labeling, Sucrose Gradient Centrifugation, Polyacrylamide Electrophoresis and Electron Paramagnetic Resonance. En: *Protein Crosslinking: Biochemical and Molecular Aspects*. Friedman, M. (Ed). pp. 657-699.
- Sikorski, Z. y Kostuch, S. 1982. Trimethylamine *N*- Oxide Demethylase: Its Occurrence, Properties and Role in Technological Changes in Frozen Fish. *Food Chem.* 9:213-234.
- Sikorski, Z., Olley, J. y Kostuch, S. 1976. Protein Changes in Frozen Fish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. CRC. Press, Cleveland. 8: 97-129.
- Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. y Pan, B.S. 1990. The Nutritive Composition of the Major Groups of Marine Food Organisms. En: *Seafood Resources, Nutrition, Composition and Preservation*. Sikorski, Z.E. (Ed). CRC. Press Inc. Boca Raton, Florida. pp. 29-54
- Sikorski, Z.E., Scott, D.N. y Buisson, D.H. 1984. The Role of Collagen in the Quality and Processing of Fish. *Crit. Rev. in Food Sci. Nut.* 20: 301.
- Skaara, T. y Regenstein, J.M. 1990. The Structure and Properties of Myofibrillar Proteins in Beef, Poultry and Fish. *J. Muscle Foods.* 1, 269-291.
- Soto, H. 2002. Comunicación Personal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora.

- Srinivasan, S. Xiong, Y.L., Suzanne, P. y Tidwell, J.H. 1997. Physicochemical Changes in Prawns Subjected to Multiple Freeze-Thaw Cycles. *J. Food Sci.* 62:123-127.
- Srinivasan, D. 1996. Amino Acids, Peptides and Proteins. Capitulo 6. En: *Food Chemistry*. Fennema, O.R (Ed). Tercera Edición. Marcek Dekker Inc. N.Y. pp 321-431.
- Stabursvik, R. y Martens, H. 1980. Thermal Denaturation of Proteins in Post Rigor Muscle Tissue as Studied by Differential Scanning Calorimetry. *J. Sci. Food Agric.* 31:1034-1042.
- Suzuki, T. 1987. *Tecnología de las Proteínas de Pescado y Krill*. Editorial Acribia, S.A. pp 1-49.
- Tejada, M., Careche, M., Torrejon, P., Del Mazo, M.L., Solas, M.T., Garcia, M.L. y Barba, C. 1996. Protein Extracts and Agregates Forming in Minced Cod (*Gadus morhua*) During Frozen Storage. *Journal Agric. Food Chem.* 44: 3308-3314.
- Tsuchiya, T., Yamada, N. y Matsumoto, J.J. 1978. Extraction and Purification of Squid Myosin. *Jap Soc Sci. Fish.* 44: 175-179.
- Varma, T.N.R. 1967. Protein- Lipid Interaction Affecting the Quality of Protein Foods. *J. Food Sci. Technol.* 4:12-23.
- Walker, T.I. 1992. Fishery Simulation Model for Shark Applied to the Gummy, *Mustelus Antarticus* Günther, from Southern Australian Waters. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 43:195-212.

Woyewoda, A.D., Shaw, S.J., Ke, P.G. y Burns, B.G. 1986. Recommended Laboratory Methods for Assessment of Fish Quality. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences p. 2-32.