



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

**“ELABORACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA ACTIVA
COMESTIBLE CON CAPACIDAD
ANTIMICROBIANA QUE AUMENTE LA VIDA DE
ANAQUEL EN PESCADO FRESCO A PARTIR DE
COLÁGENO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO INDUSTRIAL**

P R E S E N T A:

DIEGO ERNESTO MONROY GONZÁLEZ

(No. DE CUENTA: 1322472, 41 Generación)

MODALIDAD: TESIS INDIVIDUAL



El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, México. Mayo, 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

**“ELABORACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA ACTIVA
COMESTIBLE CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA
QUE AUMENTE LA VIDA DE ANAQUEL EN PESCADO
FRESCO A PARTIR DE COLÁGENO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
INGENIERO AGRÓNOMO INDUSTRIAL**

P R E S E N T A:

DIEGO ERNESTO MONROY GONZÁLEZ

(No. DE CUENTA: 1322472, 41 Generación)

MODALIDAD: TESIS INDIVIDUAL

COMITÉ DE TUTORES

**Dra. MARÍA DOLORES MARIEZCURRENA BERASAIN.
Tutor Académico**

Dra. DORA LUZ PINZÓN MARTÍNEZ. Tutor Adjunto.

El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, México. Mayo, 2019.



**“ELABORACIÓN DE UNA BIOPELÍCULA ACTIVA COMESTIBLE CON
CAPACIDAD ANTIMICROBIANA QUE AUMENTE LA VIDA DE ANAQUEL
EN PESCADO FRESCO A PARTIR DE COLÁGENO”**

Diego Ernesto Monroy González. Ingeniero Agrónomo Industrial. Universidad Autónoma Del
Estado México. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Asesores: Dra. María Dolores Mariezcurrena Berasain. Dra. Dora Luz Pinzón Martínez
. Universidad Autónoma Del Estado México. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Campus Universitario El Cerrillo Piedras Blancas. Mpio. de Toluca, Méx. Código Postal 50200.
Tel (fax) 2965529 ext. 192

monroyeg@hotmail.com nekkane16@hotmail.com dora_lpm@hotmail.com

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en dos etapas la primera consistió en el desarrollo de una biopelícula activa con extracto de ajo (*Allium sativum*) como antimicrobiano, a base de colágeno extraído de residuos de pescado. La segunda etapa, consistió en la aplicación de la biopelícula a los filetes de pescado de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y la evaluación en vida de anaquel, para determinar el efecto sobre características físicas y microbiológicas del pescado fresco.

Se realizó un análisis microbiológico a cuatro tratamientos. El tratamiento 1 (T1), estuvo representado por pescado sin recubrir. El tratamiento 2 (T2), representado por pescado recubierto con película sin antimicrobiano. El tratamiento 3 (T3), representado por

pescado recubierto con biopelícula activa con extracto de ajo (*Allium sativum*). El tratamiento 4 (T4), representado por pescado recubierto con película plástica comercial.

Se realizó la determinación de Mesófilos Aerobios, Psicotrópicos y Coliformes Totales, de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas NOM -110-SSA1-1994, NOM-092-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994, aunado a lo anterior, se llevó a cabo la medición de pH y color durante 12 días de estudio correspondiendo a 5 días escalados de medición.

Los resultados se analizaron utilizando el paquete estadístico Stat Graphics Plus versión 5.0. Cuando hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$), se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey al 95%.

Los resultados obtenidos mostraron que el T3 representado por pescado recubierto con biopelícula activa, fue el mejor tratamiento para el experimento mostrando diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en todas las pruebas, comprobando la hipótesis inicial que una biopelícula activa a base de colágeno activa con extracto de ajo como agente antimicrobiano permite aumentar la vida de anaquel del pescado fresco.

Los resultados obtenidos permiten demostrar que las biopelículas activas comestibles a base de colágeno activas con agentes antimicrobianos como el ajo (*Allium sativum*) como la desarrollada en la presente investigación, aumentó la vida de anaquel del producto filete de tilapia del Nilo y mejora sus características físicas.

Palabras clave: Biopelícula, antimicrobiano, residuos de pescado, colágeno, extracto de ajo (*Allium sativum*).

**“ELABORATION OF AN EDIBLE ACTIVE BIO-FILM WITH
ANTIMICROBIAL CAPACITY THAT INCREASES THE LIFE OF ANÁQUEL
IN FRESH FISH FROM COLLAGEN”**

Diego Ernesto Monroy González. Ingeniero Agrónomo Industrial. Universidad Autónoma Del
Estado México. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Asesores: Dra. María Dolores Mariezcurrena Berasain. Dra. Dora Luz Pinzón Martínez

. Universidad Autónoma Del Estado México. Facultad de Ciencias Agrícolas.

Campus Universitario El Cerrillo Piedras Blancas.Mpio. de Toluca, Mex. Código Postal 50200.

Tel (fax) 2965529 ext. 192

monroyeg@hotmail.com nekkane16@hotmail.com dora_lpm@hotmail.com

ABSTRACT

The present research was performed in two phases. At first, active edible films were developed using a garlic (*Allium sativum*) extract as antimicrobial agent and a collagen base obtained from fish waste. Second phase consisted in edible films application to Nile Tilapia fish steak (*Oreochromis niloticus*) and shelf life evaluation in order to determinate the edible film effect over the chemical, physical and microbiological fish steak characteristics.

Treatment 1 (T1) was fish steak without any film applied, treatment 2 (T2) was fish steaks covered by edible film without antimicrobial extract, treatment 3 (T3) were fish steaks

with active edible film with garlic (*Allium sativum*) extract, and finally, treatment 4 (T4) were fish steaks with a commercial plastic film.

Aerobic mesophilic, psychrotrophic and Total Coliforms microorganisms counts were made according to Official Mexican Norms NOM -110-SSA1-1994, NOM-092-SSA1-1994 and NOM-113-SSA1-1994. Colour and pH determination were also estimated in a 12 shelf life period by 0, 3, 6, 9 y 12th days.

Results were analysed using Stat Graphics version Plus 5.0 statistical program. Significant differences were compared using a Tukey Test ($P \leq 0.05$).

T3 results from fish steaks covered by active edible films was the best treatment found with significant differences ($P \leq 0.05$) with all the analyses done. Initial hypothesis that active edible films made with collagen base and garlic extract as antimicrobial agent allows an increase during Nile Tilapia fish steaks. Present results suggest that active edible films performed with collagen and natural antimicrobials as garlic (*Allium sativum*) as in the present research, increase fish steak shelf life and improve its physical characteristics.

Key words: Edible films, antimicrobial, fish waste, collagen, garlic (*Allium sativum*) extract.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
I INTRODUCCIÓN.....	13
II.REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1 Definición de pescado.....	15
2.2 Propiedades nutrimentales del pescado.....	15
2.3 Proteínas, vitaminas y minerales del pescado.....	16
2.4 Consumo de pescado fresco en México.....	17
2.5 Residuos generados por la industria pesquera	17
2.6 Microorganismos que afectan la vida de anaquel en pescado.....	18
2.7 Definición de vida útil	18
2.8 Bioconservación.....	19
2.9 Definición de recubrimiento comestible	19
2.10 Películas comestibles como alimento funcional	20
2.11 Principales funciones y aplicaciones de los envases comestibles	20
2.12 Barrera a la transferencia de materia y a la luz	21
2.13 Diferencia entre película y recubrimiento comestible	22
2.14 Envases activos y bioactivos comestibles.....	23
2.15 Envases biodegradables comestibles: películas y recubrimientos	24
2.16 Agentes activos incorporados a películas y recubrimientos comestibles.....	24
2.17 Función de una biopelícula comestible	25
2.18 Biopolímeros.....	25
2.19 Composición de películas comestibles	26
2.20 Colágeno	26

2.22 Gelatina.....	28
2.23 Gelatina procedente de subproductos de la pesca.....	29
2.24 Usos y aplicaciones del colágeno.....	29
2.25 Principales fuentes de obtención.....	30
2.26 Definición de antioxidante.....	31
2.13 Actividad antioxidante.....	32
2.13 Compuestos activos naturales de origen vegetal.....	32
2.14 Propiedades antimicrobianas del ajo (<i>Allium sativum</i>).....	34
III. JUSTIFICACIÓN.....	35
IV. HIPÓTESIS.....	36
V. OBJETIVOS.....	37
5.1. Objetivo General.....	37
5.1.2 Objetivos específicos.....	37
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
6.1. Métodos.....	38
6.2. Primera etapa experimental.....	39
6.3. Obtención del colágeno.....	39
6.4. Análisis fisicoquímicos.....	41
6.4.1. Color.....	41
6.4.3. Textura.....	41
6.5. Determinación de Fenoles totales por Folin al extracto de Ajo.....	41
6.6 Análisis microbiológicos.....	42
6.6.1. Determinación de mesófilos aerobios.....	43
6.6.2. Determinación de Psicotróficos.....	43
6.6.3. Determinación de Coliformes.....	43
6.6.4. pH.....	44
6.7. Diseño experimental.....	44
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1 Caracterización de la Biopelícula.....	45
7.2 Caracterización del extracto hidroalcohólico de ajo (<i>Allium sativum</i>).....	50
7.2.1 Fenoles totales en ajo (<i>Allium sativum</i>).....	50

7.2.2 Color para la biopelícula con y sin extracto.....	51
7.3. Vida de Anaquel	53
7.3.1. Variable a*	57
7.3.2. Variable b*	58
7.3.3. Variable L*	59
7.4. pH60	
7.4.1. Análisis Microbiológicos	61
7.4.2. Mesófilos Aerobios	62
7.4.3. Coliformes totales	63
7.4.4. Psicotróficos.....	64
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. SUGERENCIAS	51
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro1. ANOVA para la Prueba de textura empleada para fuerza de quiebre (N) de biopelícula 10, 20 y 30% de colágeno respectivamente.....	50
Cuadro 2. Resultados del ANOVA para L* a*y b*.....	53
Cuadro 3. Resultado para pH y color (L* a* y b*).....	55
Cuadro 4. Resultados microbiológicos	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Técnica para la obtención de Obtención de colágeno.....	41
Figura 2 Gráfica, prueba de textura para fuerza de quiebre de biopelícula con 10% de colágeno.....	46
Figura 3 Gráfica, prueba de textura para fuerza de quiebre de biopelícula con 20% de colágeno.....	47
Figura 4 Gráfica, prueba de textura para fuerza de quiebre de biopelícula con 30% de colágeno	48

I INTRODUCCIÓN

El pescado es un alimento muy importante en la población mexicana con grandes aportaciones nutrimentales, lo que ha llevado a un aumento en su consumo y a desarrollar una creciente industria en la producción de pescado. Es importante mencionar que el tratamiento del pescado como materia prima genera grandes cantidades de desechos y pocos son aprovechados para subproductos, es por eso que el presente trabajo utilizó desechos derivados de la industria del pescado, como escamas, espinas y piel. Lo anterior, para generar una biopelícula activa capaz de aumentar la vida de anaquel del pescado fresco, misma que respondió a una de las más grandes problemáticas de esta industria, la conservación (González, 2010).

Por otra parte, al aprovechar los desechos de pescado se reduce considerablemente el nivel de contaminación, es muy importante generar un producto más seguro y duradero para que la población tenga mayor acceso y seguridad al consumir pescado fresco. Así mismo, reducir los problemas con el abastecimiento en los centros de distribución alejado de las zonas de puertos pesqueros y granjas productoras (González, 2010).

El uso de extracto de ajo (*Allium sativum*) como agente antimicrobiano permite inhibir grupos de bacterias importantes que son clave en la calidad de los alimentos, como mesófilos y coliformes, entre otros. Al mismo tiempo puede aportar características adicionales como sabor, e incluso al marinado del producto como componente final. (Salem *et al.*, 2011)

Elaborar una biopelícula comestible a base de colágeno y agentes antimicrobianos de ajo (*Allium sativum*) aumenta la vida de anaquel de pescado fresco en vida de anaquel, a partir de colágeno.

Usar una biopelícula activa con capacidad antimicrobiana capaz de aumentar la vida de anaquel en pescado, da mayores beneficios a la industria, dado que el pescado será mejor apreciado por el consumidor y tendrá mejores parámetros de calidad debido a su evidente aumento de vida útil (López, 2011).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Definición de pescado

El pescado es un concepto que deriva del latín *piscatus*. Se trata del nombre que recibe el pez que, una vez extraído de su hábitat (océano, río y lago, entre otros.), puede convertirse en alimento para el ser humano (Gardey, 2013).

2.2 Propiedades nutrimentales del pescado

SAGARPA (2016), se ha determinado por organismos gubernamentales de salud han determinado, que el contenido de proteínas en pescados y mariscos oscila entre 15-20%, y son de alto valor porque contienen todos los aminoácidos esenciales que el organismo necesita (SAGARPA 2016). Además, contienen ácidos grasos omega-3 que ayudan a fortalecer las membranas celulares del sistema nervioso y de la retina (Aguilar, 2005).

Las calorías que aporta el pescado son bajas (70 y 80 kcal por cada 100 g), y constituye una buena opción para formar parte de la alimentación de la población. Lo cual, lo convierte en alimento funcional que contribuye a una sana nutrición (SAGARPA, 2016).

Los pequeños peces, como la sardina, que se consumen con todo y su esqueleto, son una fuente de calcio, fósforo y potasio que ayuda en el fortalecimiento de los huesos de quien

lo consume, la contracción de los músculos, la transmisión del impulso nervioso y a la coagulación de la sangre (Tang *et al.*, 2012).

El pescado también es una fuente de yodo que ayuda a la tiroides a sintetizar las hormonas tiroxina y triyodotironina, que evitan el bocio, y favorecen el desarrollo del feto humano, lo que lo hace fuerte candidato alimenticio para las zonas serranas y desérticas lejanas a los litorales, en donde el bocio es endémico (SAGARPA, 2016).

2.3 Proteínas, vitaminas y minerales del pescado

El pescado contiene un amplio espectro de vitaminas del grupo B, como B1, B2, B3 y B12, además de vitaminas liposolubles, entre las que destacan la vitamina A, D y E, presentes principalmente en el hígado de estos organismos (Potaros, 2009).

Las vitaminas A y E son de interés nutricional porque poseen acción antioxidante y constituyen un factor protector frente a ciertas enfermedades degenerativas, cardiovasculares y al cáncer. La vitamina D actúa en el intestino favoreciendo la absorción de calcio y fosfato. A diferencia de otros alimentos de origen animal, el pescado contiene ácidos grasos poliinsaturados en cantidades comprendidas entre un 25%-45% (porcentajes referidos a ácidos grasos totales). Entre ellos se encuentran el ácido linoleico, de la familia omega-6 y los ácidos EPA (eicosapentaenoico) y DHA (docosaheptaenoico), de la familia omega-3. También contiene ácidos grasos monoinsaturados (Gardey, 2013).

El pescado no aumenta los niveles de colesterol en sangre, a diferencia de otros alimentos ricos en colesterol, gracias a su elevada proporción de grasas insaturadas (SAGARPA, 2016).

2.4 Consumo de pescado fresco en México

En el año 2015, el consumo anual por persona era de 8.9 kilos, actualmente en 2019, en México hemos alcanzado la meta sexenal de 12 kg, por persona, gracias al fomento en producción y consumo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA, 2017).

2.5 Residuos generados por la industria pesquera

La industria dedicada al procesamiento de productos pesqueros genera una gran cantidad de residuos, tales como pieles, espinas, escamas, vísceras, cabezas y restos de músculo; residuos que dependiendo de la especie y el tipo de procesamiento pueden ser entre 30 y 50% del peso (Giménez *et al.*, 2012). Sin embargo estos desechos son una gran fuente de minerales, proteínas, grasa, pigmentos, vitaminas, etc., por lo que una parte de los mismos se utiliza para la alimentación animal (peces, cerdos) y para la elaboración de fertilizantes; la parte no aprovechada constituye una importante fuente de contaminación ambiental (Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008).

2.6 Microorganismos que afectan la vida de anaquel en pescado

Los microorganismos que afectan la calidad y vida de anaquel del pescado son en su mayoría bacterias mesófilas, entre ellas *Proteus morgani*, *Hafnia alvei* y *Klebsiella pneumoniae*. La conservación del pescado a 0°C impide la formación de estos compuestos. *Clostridium botulinum* tipo E puede crecer y sintetizar toxinas a 3°C y la prevalencia en pescado crudo varía de 10 a 40% según las especies y en los productos envasados al vacío es 5%, por lo que constituye un riesgo en la industria pesquera. *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. vulnificus* son las principales especies de *vibrios* causantes de las infecciones relacionadas a los pescados y mariscos. También se suelen aislar *Salmonella* y *Shigella*, aunque no sean contaminantes normales del pescado (Potaros, 2009).

2.7 Definición de vida útil

La vida útil de un alimento, es decir, el periodo que retendrá un nivel aceptable de su calidad alimenticia desde el punto de vista de la seguridad y del aspecto organoléptico, depende de cuatro factores principales; conocer la formulación, procesado, empaçado y las condiciones de almacenamiento (Labuza, 1999).

Actualmente, dentro de la terminología del procesamiento moderno estos factores son orientados en el concepto de HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point por sus siglas en inglés), donde se comprende una metodología del control de calidad que apunta a asegurar una "alta calidad". Estos cuatro factores son críticos pero su relativa importancia depende de la peresibilidad del alimento (Gardey, 2013).

2.8 Bioconservación

se define como la extensión de la vida útil y el aumento de la seguridad de un alimento a través del uso de una microflora natural o controlada y de sus productos antimicrobianos (Leroi, 2010).

Las bacterias más empleadas en este método de conservación son las bacterias ácido lácticas (BAL), que pueden estar habitualmente presentes o no en la microflora natural del alimento al cual se aplican, dentro de este grupo de bacterias se incluye un amplio número de microorganismos Gram +, que presentan la característica común de producir como metabolito mayoritario el ácido láctico, a partir de la fermentación de los carbohidratos (Leroi, 2010). Las bacterias ácido-lácticas pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenoccus*, *poralactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* y *Bifidobacterium* (Leroi, 2010).

2.9 Definición de recubrimiento comestible

Los recubrimientos comestibles son envolturas finas que recubren o separan los componentes del alimento y, estas películas pueden prolongar la vida de anaquel del alimento, dicha barrera protege, inhibiendo o retrasando la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono entre otros. A demás puede servir como vehículo para la incorporación de aditivos, compuestos antioxidantes o antimicrobianos (Aguilar, 2005).

2.10 Películas comestibles como alimento funcional

En los últimos años, un creciente interés por el desarrollo de productos que reemplazan a los plásticos convencionales, principalmente por motivos medioambientales, ha generado la búsqueda de nuevos materiales biodegradables (Giménez *et al.*, 2013). En esta línea, las películas comestibles constituyen un producto novedoso, creadas principalmente para alargar la vida útil de los productos que recubren y están diseñados para consumirlas junto al producto (Rojas-Graü *et al.*, 2007). Para la elaboración de películas comestibles se utilizan materiales capaces de formar una matriz estructural, especialmente biopolímeros como proteínas y polisacáridos (Guillén *et al.*, 2009).

También pueden estar diseñados para formar parte del producto como un diseño de novel cousin, o como un sistema de transporte de aromas, compuestos bioactivos, entre otros de tal manera que la película manifieste su efecto en la boca o en el intestino, según el compuesto que transporte (Guillén *et al.*, 2009).

2.11 Principales funciones y aplicaciones de los envases comestibles

Los envases comestibles se aplican en alimentos de muy diversa naturaleza (frutas, verduras, carnes, dulces, cereales, pescados.), normalmente en combinación con otras tecnologías de conservación (refrigeración, atmósferas modificadas o controladas, tratamientos térmicos.) con el fin de mejorar su calidad, seguridad o aumentar su vida útil, ya que estos envases pueden realizar diferentes funciones beneficiosas sobre el alimento como son la de actuar de barrera, mejora de las propiedades, proteger pequeñas porciones,

adherir diferentes partes de un alimento o servir de soporte de aditivos, entre otras (Pavlath y Orts, 2009).

2.12 Barrera a la transferencia de materia y a la luz

Algunos envases tienen la capacidad de actuar de barrera frente a la transferencia de determinados componentes presentes en el alimento o en el ambiente. Esta característica resulta interesante cuando la calidad de un producto está vinculada a la pérdida o ganancia de algunos componentes como por ejemplo el agua, compuestos volátiles (aromas deseables o indeseables) o solutos (aceite, azúcares o sales) (Pavlath y Orts, 2009).

Algunas películas y recubrimientos se han aplicado con el fin de controlar la transferencia de determinados gases (oxígeno, dióxido de carbono, etc.), de tal manera que se genera dentro del envase una atmósfera idónea que retrasa el deterioro. Esta atmósfera varía en función del tipo de alimento; en frutas y verduras se utilizan películas y recubrimientos semipermeables, es decir, tienen cierta permeabilidad al oxígeno, ya que las envolturas extremadamente impermeables pueden inducir a la creación de un ambiente anaeróbico que provoca cambios indeseables en este tipo de productos, como por ejemplo la pérdida de aromas. Por otro lado, las películas impermeables al oxígeno se aplican sobre todo en productos ricos en grasa (pescado azul, frutos secos, etc.) puesto que la calidad de estos productos disminuye principalmente por la oxidación de sus lípidos. La oxidación de la grasa genera compuestos con sabores desagradables (sabor rancio) u olores indeseables (Krochta, 2002).

2.13 Diferencia entre película y recubrimiento comestible

Tanto las películas como los recubrimientos comestibles son elaborados con sustancias poliméricas naturales de composición heterogénea. Las cuales, pueden ser ingeridas sin riesgo para el consumidor, aportándole algunos nutrimentos tales como: proteínas, almidones hidrolizados, gomas, pectinas, carrageninas y alginatos, entre otros, por lo que pueden ser comestible o simplemente ser biodegradable (Aguilar, 2005).

Los términos película y recubrimiento se utilizan indistintamente para indicar que la superficie de un alimento se encuentra recubierta por una capa relativamente fina, de un material con una cierta composición. Sin embargo, las películas (también denominadas films) son estructuras independientes que han sido previamente elaboradas y posteriormente aplicadas sobre el alimento, mientras que los recubrimientos son finas capas de material formadas directamente sobre la superficie del producto alimentario con la intención de protegerlo o mejorarlo de alguna manera (Rodríguez, 2011).

2.14 Envases activos y bioactivos comestibles

Son realizados con materiales a los cuales se les ha añadido agentes activos (Antimicrobiano, antioxidante.), con el objeto de alargar la vida útil y mantener o incluso aumentar la calidad o seguridad del alimento, para el diseño y desarrollo de envases activos se utilizan como bases materiales no comestibles (papel, cartón, plásticos, metales o una combinación de ellos) y materiales comestibles (biopolímeros, aunque en este último caso en menor escala. (Dainelli, 2008).

Los agentes activos con o sin propiedades bioactivas se incorporan a la formulación del envase comestible de tal forma que la liberación de éstos se realice por contacto directo entre la película y el alimento. Una vez liberado el compuesto debe ejercer su acción biológica sobre el alimento. Dicho así parece una tarea sencilla, pero no lo es tanto porque en ocasiones los componentes de la formulación del envase dificultan la liberación del principio activo, mientras que también puede suceder que el principio activo no difunda porque interacciona con el alimento, así, por ejemplo, para la selección de los principios activos que formarán parte del envase comestible se debe tener en cuenta no sólo su efectividad frente al microorganismo diana sino también las posibles interacciones entre el principio activo, envase y los componentes del alimento. Estas interacciones pueden modificar la actividad antimicrobiana o antioxidante, la liberación o difusión del principio activo o modificar las características finales de los envases comestibles (Martín Belloso, *et al*, 2009).

2.15 Envases biodegradables comestibles: películas y recubrimientos

Los materiales comúnmente utilizados para la elaboración de envases biodegradables de uso alimentario proceden de fuentes renovables y se caracterizan por ser capaces de formar películas que presentan unas propiedades (mecánicas, de barrera y de transmisión de la luz) similares a los plásticos convencionales, pero con una alta capacidad de biodegradación. Muchos de estos materiales presentan la ventaja adicional de ser comestibles a diferencia de los plásticos convencionales. Por esta última razón, los materiales biodegradables, como son por ejemplo algunos biopolímeros, se estudian exhaustivamente en los últimos años, por su posible aplicación en el desarrollo y diseño de envases comestibles, como una forma más de proteger los alimentos (Campos, *et al* 2011).

2.16 Agentes activos incorporados a películas y recubrimientos comestibles

Una forma de conseguir envases con propiedades activas es mediante la incorporación de agentes activos. Para el diseño y desarrollo de los envases activos comestibles, se han utilizado agentes potencialmente bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, puesto que la oxidación y el crecimiento microbiano (bacterias, levaduras y mohos) son dos procesos íntimamente relacionados con el deterioro de los alimentos (Campos *et al.*, 2011).

2.17 Función de una biopelícula comestible

En estudios recientes la investigación relacionada con el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles ha contribuido de manera importante en el área de empaques de alimentos ofreciendo innovadoras alternativas para mejorar la calidad y vida de anaquel de múltiples alimentos perecederos (García, 2014).

Dada la creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos de buen sabor, nutritivos, naturales o mínimamente procesados y de fácil manipulación, la industria de alimentos investiga el reemplazo de los métodos tradicionales de preservación por nuevas técnicas (García, 2014).

2.18 Biopolímeros

Los biopolímeros que también son llamados polímeros renovables se pueden clasificar en dos tipos: los provenientes directamente de organismos vivos y los que requieren ser sintetizados pero su procedencia es de un recurso renovable (Tang *et al.*, 2012). El primer tipo incluye a proteínas (colágeno, queratina, gelatina, gluten de maíz o de trigo, proteínas de leche o de soya); polisacáridos (almidón, derivados de celulosa, quitosano, alginatos, carragenatos y pectinas) y lípidos (ceras, ácidos grasos y monoglicéridos). En el segundo, grupo se encuentra el ácido poliláctico (PLA), así como algunos poliésteres producto del metabolismo de bacterias (polihidroxialcanoatos o PHA). El PLA es un biopolímero

sintetizado a partir de productos agrícolas con un alto contenido en almidón como el maíz, trigo, arroz entre otros (Cruz-Morfin *et al.*, 2013).

2.19 Composición de películas comestibles

Generalmente, una película comestible está integrada por tres componentes: un biopolímero de alto peso molecular que es la base fundamental de la película, un plastificante (de bajo peso molecular) y un solvente (Romero y Estrada, 2011).

2.20 Colágeno

El colágeno es probablemente la proteína más abundante en el organismo de los vertebrados. Su molécula consiste en tres cadenas polipeptídicas helicoidales denominadas cadenas α , cada una de éstas conformadas por aproximadamente 1000 aminoácidos. Estas cadenas se enrollan formando una triple hélice que se mantiene mediante puentes de hidrógeno intermoleculares, hasta el momento se han identificado 46 diferentes cadenas polipeptídicas en vertebrados, las cuales componen 28 diferentes tipos de colágeno (Brinckmann, 2005).

Cada uno de estos tipos de colágeno lleva a cabo funciones especializadas en diversos tejidos y tienen modos distintivos de organización supramolecular. Los más abundantes forman la base estructural de la piel, tendones, huesos y cartílagos entre otros tejidos, concentrándose en mayor proporción los de tipo I, II y III, siendo el colágeno de tipo I el predominante en la mayoría de animales (Brodsky, 2005).

2.21 Colágeno tipo I

El colágeno tipo I es el más abundante del organismo, constituyendo alrededor del 90% del colágeno presente en el cuerpo, existen pocas diferencias en las cadenas de colágeno tipo I entre las diferentes especies de vertebrados. Está compuesto por 2 cadenas helicoidales $\alpha 1$ y una cadena helicoidal $\alpha 2$ formando una triple hélice. La hélice simple de colágeno es levógira con 3.3 residuos por vuelta y una altura del giro de 0.87 nm (La conformación molecular de las cadenas helicoidales la compone un patrón repetitivo de Gly-X-Y permitiendo el entrelazamiento de las cadenas mediante puentes de hidrógeno intercatenarios N-H(Gly) O=C(Xaa) (Shoulders y Raines, 2009).

La estructura terciaria del colágeno la forman tres cadenas polipeptídicas entrelazadas formando la triple hélice dextrógira con una altura de giro de aproximadamente 8.6 nm. Esta estructura, conocida como tropocolágeno, tiene una masa molecular de aproximadamente 300 kDa, una longitud de 300 nm y un diámetro de 1.5 nm Las

moléculas de tropocolágeno interactúan entre sí, asociándose lateralmente mediante enlaces covalentes formando fibrillas colagenosas, que tienen un diámetro entre 10 y 500 nm, dependiendo del tipo de tejido y la etapa de desarrollo. Al formar las fibrillas, las moléculas de tropocolágeno se escalonan entre sí presentando una estriación transversal repetida de 67 nm y una brecha adicional de 40 nm entre moléculas subsiguientes (Serrano, 2011).

2.22 Gelatina

La gelatina es una proteína compleja que se obtiene mediante la hidrólisis parcial del colágeno. La estructura de triple hélice del colágeno se desintegra mediante la destrucción de los puentes de hidrógeno y los enlaces hidrofóbicos, seguido del desenredo de las cadenas y la disociación de las moléculas en componentes más pequeños provocando la solubilización del colágeno. La gelatina, por tanto, está constituida por un conjunto de cadenas polipeptídicas que tienen un peso molecular inferior al del colágeno, y dependiendo de la especie y del proceso de extracción puede variar entre ~10 y ~300 kDa (Kolodziejska *et al*, 2008). Las cadenas de gelatina son altamente solubles y dan lugar a la formación de una red tridimensional en frío, resultado de su tendencia a volver a formar parcialmente la estructura de colágeno nativo. De la extensión en la formación de enlaces y entrecruzamientos en la red dependerá la fuerza del gel y la estabilidad térmica. Estos dos parámetros son los principales indicadores de la calidad de la gelatina comercial (Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

2.23 Gelatina procedente de subproductos de la pesca

La producción industrial de gelatina procedente de subproductos de la pesca ha ido incrementando en los últimos años. Esto responde a la creciente demanda de gelatinas de fuentes distintas a las procedentes de especies terrestres, así como a la gran cantidad de residuos ricos en colágeno generados por la industria pesquera. De estos, los recortes de pieles, espinas y escamas son las principales fuentes de colágeno (Gómez-Guillén *et al.*, 2009).

Sin embargo, la gran variedad de especies acuáticas dan como resultado gelatinas con muy diversas características. Esto ha despertado el interés dentro de la comunidad científica por caracterizar las gelatinas obtenidas de las diferentes especies, tanto sus características físico-químicas como sus propiedades funcionales, además de optimizar las condiciones de extracción, así como los rendimientos (Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

2.24 Usos y aplicaciones del colágeno

Gracias a sus características químicas únicas, el colágeno se ha utilizado en diversos campos de la industria (Bae *et al.*, 2008), tiene aplicaciones en materiales biomédicos, en la industria farmacéutica, cosmética y en alimentos (Potaros *et al.*, 2009).

2.25 Principales fuentes de obtención

La principal fuente de extracción de colágeno ha sido hasta el momento de los residuos del beneficio de especies bovinas y de la piel, huesos y cartílagos de cerdo (Wang *et al.*, 2008). Estas fuentes tradicionales de colágeno presentan dificultades y son inapropiados para muchos grupos religiosos y étnicos debido a limitaciones socioculturales. En el caso del judaísmo y el islam, se prohíbe el consumo de productos relacionados con el cerdo, y para los hindúes se prohíbe el consumo de productos relacionados con las vacas (Karim y Bhat, 2009).

También se reportaron restricciones en su consumo por condiciones de salud ya que se teme ante enfermedades como la de la encefalopatía espongiforme bovina y la fiebre aftosa (Potaros *et al.*, 2009). También existen otro tipo de limitaciones como son los costos de obtención de colágeno de bovinos, ya que se ve afectado por el alto valor que tiene el levante de este tipo de animales y de la baja productividad en colágeno (Wang *et al.*, 2008).

Debido a la problemática anterior ha sido de gran importancia encontrar fuentes alternativas de materia prima para la obtención de colágeno, entre las estudiadas se encuentran las que se pueden obtener del medio acuático como son la piel, huesos y escamas de pescado (Senaratne *et al.*, 2006).

2.26 Definición de antioxidante

Se entiende por antioxidante aquellas moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otros compuestos tales como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos (Gülçin, 2012).

Estas moléculas actúan mediante uno o varios mecanismos “secuestro” de los radicales libres o especies reactivas (llamados oxidantes o pro-oxidantes) y posterior transformación de los mismos en radicales estables, inertes o de baja reactividad; prevención de la formación enzimática de especies reactivas, inhibiendo la expresión, la síntesis o la actividad de enzimas pro-oxidantes (. xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa, ciclooxigenasa.); inhibición de la formación de especies reactivas dependiente de metales; activación o inducción de la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa.); absorción de la luz UV; creación de una capa protectora entre el aceite y la superficie del aire (fosfolípidos); regeneración parcial de otros antioxidantes, como por ejemplo, la vitamina E, mediante la captación de oxígeno (Gramza y Korczak, 2005).

2.13 Actividad antioxidante

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son moléculas altamente reactivas involucradas en la oxidación lipídica y la descomposición oxidativa de ácidos grasos insaturados (Lee, 2010).

En condiciones normales, las ERO y los radicales libres son eliminados eficazmente por sistemas de defensa antioxidante, tanto enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa) como no enzimáticos (vitamina E, vitamina C, glutatión). Sin embargo, en condiciones patológicas, se rompe el equilibrio entre la generación y eliminación de ERO, dando como resultado el deterioro de biomacromoléculas como el ADN, los lípidos de membrana y las proteínas. La generación incontrolada de radicales libres que atacan los lípidos de membrana, proteínas y ADN se cree que está implicada en muchos trastornos de la salud como diabetes mellitus, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias y enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer (Qian *et al.*, 2008).

2.13 Compuestos activos naturales de origen vegetal

Desde la antigüedad, las hierbas y especias han sido empleadas como condimentos y como conservantes naturales para prevenir el deterioro y aumentar la vida útil de los alimentos debido a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas que exhiben (Fernández y Pérez, 2011). Sin embargo, el interés por los extractos y aceites esenciales

de hierbas y especies ha crecido en los últimos años debido a la tendencia actual por reducir o incluso remplazar el uso de los conservantes convencionales químicos, menos “naturales”, y por aportar las propiedades beneficiosas de estos productos al alimento y al consumidor (Morros, 2009).

La eficacia antimicrobiana y antioxidante de estos extractos vegetales se determina por la estructura química de sus componentes y por la concentración de los mismos. Los principales grupos presentes en los extractos de plantas son los compuestos fenólicos (fenoles sencillos, ácidos fenólicos y sus derivados, cumarinas, lignanos, taninos, flavonoides, quinonas, etc.), alcaloides, terpenoides, lecitina y otros compuestos (poliaminas, isotiocianatos, tiosulfatos y glucosidos) (Morros, 2009).

2.14 Propiedades antimicrobianas del ajo (*Allium sativum*)

El ajo (*Allium sativum*) por sus tantas virtudes es el más estudiado sobre todo en el ámbito farmacéutico. Sus características van desde la aplicación culinaria hasta efectos en la medicina natural como: su acción antioxidante, hipolipemiente, antiaterogénica, antitrombótica, hipotensora, antimicrobiana y antifúngica posee componentes azulfurados donde el principal de ellos es el sulfóxido de alilo, la alicina cuya característica es antibiótica idónea para la inhibición del desarrollo de gérmenes patógenos sobre todo en agentes como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (López, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

El uso de biopelículas es importante para prolongar la vida de anaquel de los alimentos frescos, es un producto necesario para reducir la pérdida de pescado en los mercados y súper mercados locales, ya que actualmente, si no se consume con rapidez este no se vende y se deshecha.

México produce anualmente en promedio 70 millones de toneladas de productos pesqueros, los cuales, generan desechos que ascienden al 65% que corresponde a 45.5 millones de toneladas. Para el Estado de México que ocupa el tercer lugar de producción pesquera en la región V del país, corresponde al 9.1 % de los desechos generados a nivel nacional (SAGARPA, 2016).

Usar materias primas que se consideran desechos, tiene impacto positivo en cuestión comercial y ambiental, se fomenta el uso de esta parte olvidada del sector agroindustrial y al mismo tiempo se reducen los niveles de contaminación ambiental.

Una biopelícula a base de colágeno extraído de los residuos de pescado sirve como barrera para microorganismos patógenos, control de humedad, con el objetivo de aumentar la vida de anaquel del pescado fresco, de esta manera los agentes antimicrobianos añadidos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en el alimento.

IV. HIPÓTESIS

El uso de una biopelícula a base de colágeno de pescado y extracto de ajo (*Allium sativum*) aumenta la vida de anaquel del filete de pescado fresco.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Elaborar una biopelícula comestible a partir de colágeno y extracto de ajo (*Allium sativum*) que aumente la vida de anaquel de pescado fresco.

5.1.2 Objetivos específicos

- Desarrollar una biopelícula comestible biodegradable a base de colágeno a partir de desechos de pescados (escamas, espinas y hueso) glicerol y extracto de ajo.
- Determinar el efecto de la biopelícula activa sobre la vida de anaquel en filete de pescado fresco de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*).
- Comparar las biopelículas aplicadas a filetes de pescado de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) en vida de anaquel contra pescados sin recubrimiento y con un recubrimiento comercial.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La fase experimental del trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Calidad de Productos Agropecuarios de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. Campus Universitario “El Cerrillo”, El Cerrillo Piedras Blancas, México.

La materia prima, empleada para la elaboración de la biopelícula fue piel y escamas obtenidos de la localidad de San Luis Mextepec de diferentes mercados (Morelos y central de abastos) de Toluca Edo. de México.

6.1. Métodos

La investigación propuesta constó de dos etapas. Para lo cual, se obtuvo primero la formulación y desarrollo de una biopelícula comestible a partir de colágeno. En la segunda etapa, se aplicó la película comestible al modelo de alimento (filete de Tilapia del Nilo). El modelo desarrollado será el tratamiento 3 (T3), compuesto entonces por colágeno, extractos de ajo, mismo que será comparado con el tratamiento 2 biopelícula sin extracto sin extracto (T2), tratamiento 1 sin biopelícula (T1) y tratamiento 4 recubierto con película comercial (T4). Se analizó por triplicado en vida de anaquel las características físicas (textura, color, sabor y olor) y microbiológicas como Mesófilos aerobios (MA), coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF), y psicotróficos (PSC). La biopelícula se elaboró mediante la combinación de los componentes de acuerdo con las especificaciones

propuestas por el fabricante de cada uno de los materiales. El colágeno se extrajo mediante la técnica desarrollada por Serrano (2011).

6.2. Primera etapa experimental

La colecta de pieles escamas y hueso de pescado se llevó a cabo en la localidad de San. Luis Mixtepec y en los Mercados Morelos y Central de abastos de la zona de Toluca. Edo de México

Para la recolección de los materiales (pieles, escamas y hueso), se realizó un acuerdo verbal con los comerciantes de los mercados.

6.3. Obtención del colágeno

La obtención del colágeno se realizó por el método propuesto por Serrano (2011).

En la Figura 1 se presenta en un diagrama de flujo, del proceso para la obtención del colágeno. En el que se muestran los procesos a los que se somete la muestra para obtener el colágeno los cuales van desde decolorar la muestra, hidrolizar, realizar una precipitación salina, conservar el sobrenadante para pasar una solubilización acida y así llegar al último filtrado que nos dará como producto final colágeno.

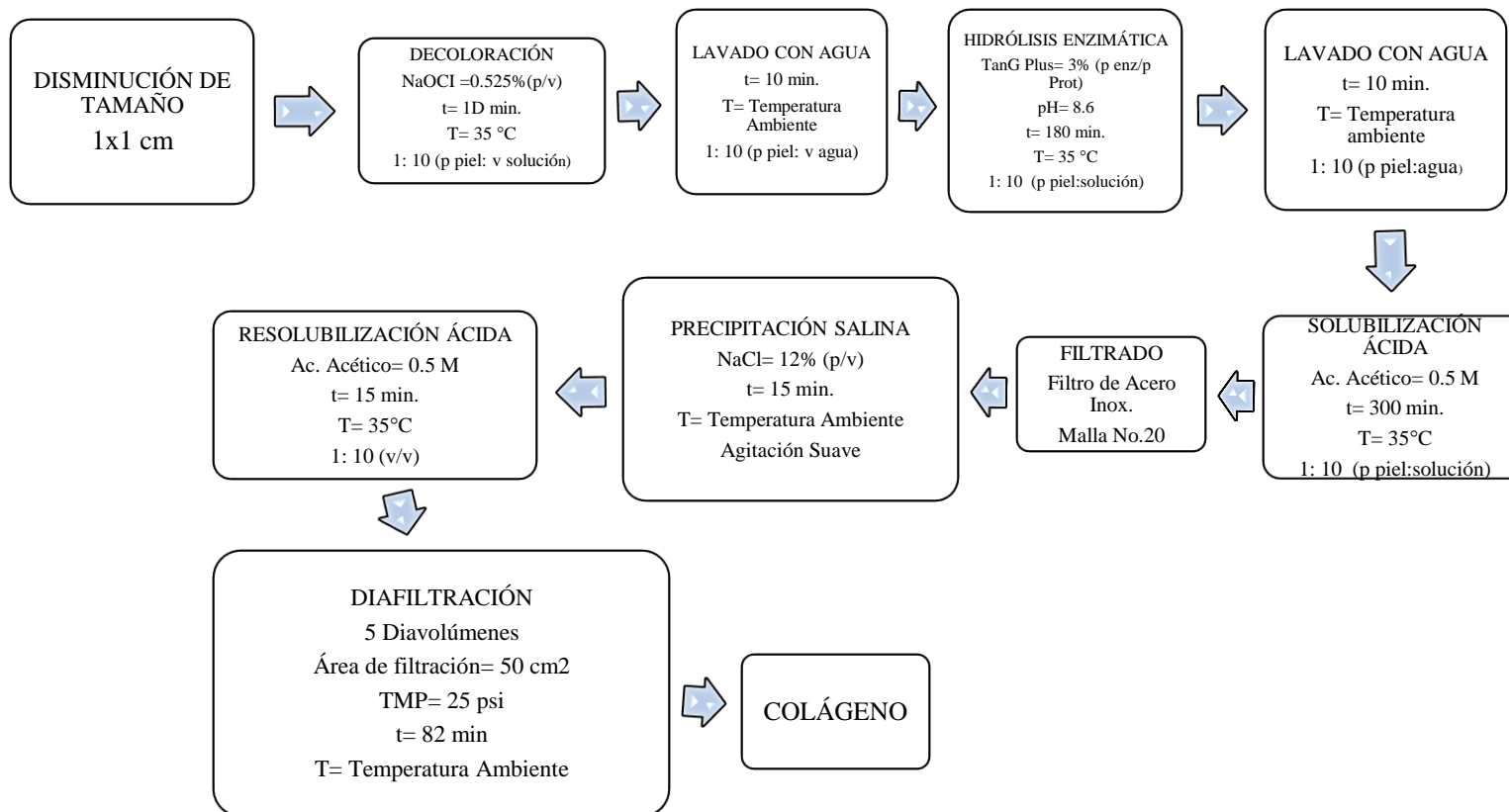


Figura 1. Técnica de obtención de colágeno (Serrano, 2011).

6.4. Análisis fisicoquímicos

6.4.1. Color

Se empleó un colorímetro Konica Minolta, modelo CR-400 Chroma Meter, Sesing, Inc., Japan, previamente calibrado. (Minolta, Osaka Japan), para los valores de L*, a* y b*.

6.4.3. Textura

Se midió a partir de la “Prueba de módulo de tensión” fuerza, tiempo y distancia descrita por la norma ATSM D-638 2014 (Standard test method for tensile properties of plastics) indicando que de 11.5 a 16.5 se encuentran los plásticos más flexibles y resistentes en la industria, aplicado a 3 tratamientos 10 % de colágeno 20 y 30%. Para lo cual, se utilizó un texturómetro modelo TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems Texture Technologies, Corp). El cual, consistió en caracterizar el comportamiento de un material elástico sometido a una fuerza de tensión. Registrando la deformación del material y su punto máximo de resistencia, por lo que se obtuvieron los resultados siguientes descritos en las gráficas.

6.5. Determinación de Fenoles totales por Folin al extracto de Ajo

Se realizó, primeramente, una curva de calibración. Para lo cual, se prepararon en una balanza analítica (Sartorius) los reactivos para realizar soluciones de carbonato de sodio

al 1.5 %, y ácido gálico al 0.1 % y posteriormente, se llevó al equipo de agitación (Vórtex Genie 2) por 3 min (Salem *et al.*, 2011).

En tubos eppendorf se colocó 1 mL de agua destilada con 10 µL de extracto de ajo, se agitó cada muestra durante 1 min y finalmente, se tomaron viales limpios donde con micropipetas se colocó el siguiente orden:

- 75µL Reactivo Folin
- 120µL de la concentración a 100, colocada en microtubos
- 1005µL agua destilada
- 300µL carbonato de sodio 1.5%
- Se dejaron reposar las muestras inmediatamente después de mezclar durante 2 h

Pasadas las 2 h se colocó cada muestra en un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S Uv/visible a 760 nm.

6.6 Análisis microbiológicos

El día que se adquirió el pescado se determinó la presencia de Ma, CT, CF y PSICO, primeramente, con la dilución de la muestra de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994. Esta metodología está dirigida a la preparación de diluciones primarias para obtener una dilución uniforme de los microorganismos que pudiera estar presentes en una muestra,

posteriormente se sembraron MA bajo la metodología de la norma NOM-092-SSA1-1994, Para coliformes se siguió el método establecido por la NOM-113-SSA1-1994, Se realizó a dos muestras cada una con dos repeticiones como carga bacteria inicial, por lo que solo se encontró presencia en MA y PSICO y a partir de este resultado, fueron los únicos tomados en cuenta para vida de anaquel.

6.6.1. Determinación de mesófilos aerobios

Para llevar a cabo la siembra de mesófilos aerobios, se utilizó la metodología establecida en la NOM-092-SSA1-1994. El conteo de colonias se realizó en el contador de colonias y se basó en el método de cuenta total en placa, que describe la norma después de haber sido incubadas a temperatura de 37 ± 2 °C durante 48 ± 2 h, con agar para cuenta estándar.

6.6.2. Determinación de Psicotróficos

Para la siembra de psicotróficos. Se utilizó la metodología descrita por la NOM-092 y se realizó la cuenta total en placa después de haber sido incubada a una temperatura de $7^{\circ}\text{C} \pm 2$, 5 días (NOM-092-SSA1-1994).

6.6.3. Determinación de Coliformes

Para llevar a cabo la siembra de Coliformes Totales y Fecales se utilizó agar bilis violeta VRB las muestras fueron sembradas por duplicado, los coliformes se incubaron a una

temperatura de 45° durante 24±2h, la siembra como lo establece la NOM-113-SSA1-1994. Se contaron las UFC como lo indica la misma norma.

6.6.4. pH

Se utilizó el método aprobado por la American Society for Testing and Materials ASTM D (1293-84, 1990), con un potenciómetro Hanna, modelo HI99163, previamente calibrado con disoluciones buffer de pH 4. pH 7 y pH 10.

6.7. Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizó un ANOVA al 95 % con tres repeticiones para cuatro tratamientos usando el software Statgraphics versión 5.1. y T1 (que será pescado sin recubrimiento), T2 (compuesto por colágeno) T3 (compuesto por colágeno y extracto antimicrobiano) y T4 (compuesto por recubrimiento comercial) durante 12 días en períodos de 5 días, de siembra en donde las variables de estudio fueron los cuatro tratamientos y las variables respuesta fueron los análisis fisicoquímicos (pH, color, y textura) y los microbiológicos (Mesófilos Aerobios, Coliformes Totales, Coliformes Fecales y Psicotróficos).

Al existir diferencia significativa ($P < 0.05$), éstas se analizaron mediante una comparación de medias de Tukey al 95%.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El orden en que se presentan los resultados es primero, la caracterización de la biopelícula enseguida la caracterización del extracto hidroalcohólico de ajo para terminar la vida de anaquel del pescado cubierto con la biopelícula y sus comparaciones.

7.1 Caracterización de la Biopelícula

La biopelícula fue realizada a base de colágeno, extracto de ajo y glicerol de acuerdo como se indicó en la metodología, de la mezcla base se realizaron tres formulaciones llamados tratamientos con diferentes concentraciones de colágeno, T1, T2, T3 (10, 20 y 30%, respectivamente) y se determinó la prueba de textura para fuerza de quiebre (N). En el apartado que nos ocupa, se presentan las tres gráficas obtenidas (2, 3 y 4) con los resultados de la prueba indicada.

En la Figura No. 2, se muestra la gráfica correspondiente al tratamiento con 10% de colágeno. En ella se observa el punto máximo de quiebre para determinar diferencias entre ellas, a continuación, se presentan la gráfica con los resultados de la prueba de textura fuerza de quiebre a 5.48 N, en un tiempo de 17 s. Después de lo cual, debido a la ruptura, la fuerza tiende a cero.

Las gráficas que se presenta a continuación representan la media de tres repeticiones

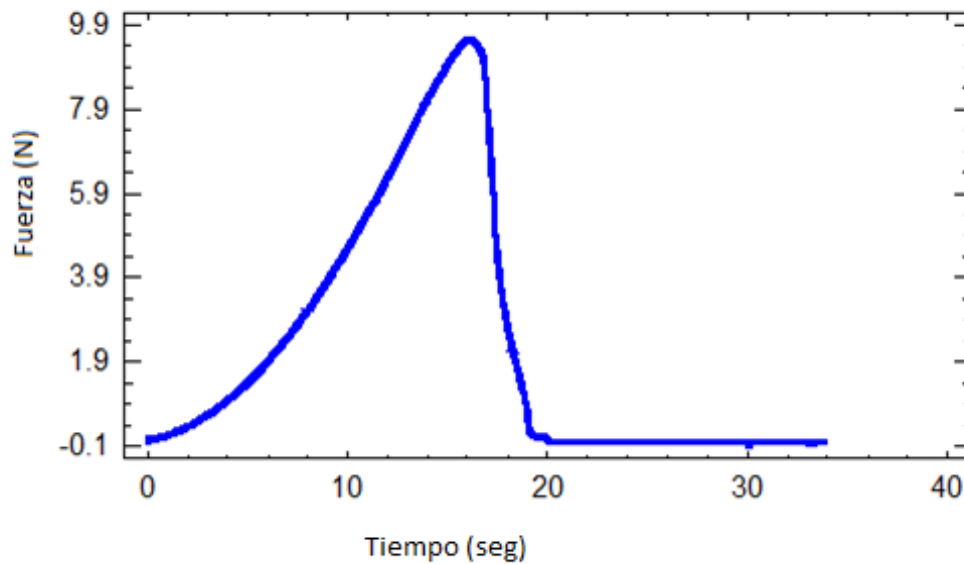


Figura No 2. Prueba de textura para fuerza de quiebre (N) de biopelícula al 10 % de colágeno.

La determinación de parámetros de textura en productos alimenticios de alto contenido de carbohidratos es particularmente difícil, debido a su composición heterogénea y a su estructura poco uniforme y usualmente este tipo de alimentos son frágiles y quebradizos. (Rodríguez *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2014).

Para determinar los parámetros texturales de forma instrumental, en este tipo de productos se emplea una prueba llamada “prueba de quiebre de tres puntos” (Milde *et al.*, 2014), esta

prueba es destructiva y se basa en la aplicación de fuerzas a la muestra para obtener cuantificaciones deductibles de gráficos (Torres *et al.*, 2015).

En la Figura No. 3, se muestra la gráfica correspondiente al tratamiento con 20% de colágeno. En la gráfica, se presentan ella los resultados de la prueba de textura denominada fuerza de quiebre, en donde el punto máximo son 9.53 N, en un tiempo de 15 s, momento en el que se rompe la biopelícula, por lo que la fuerza tiende a cero.

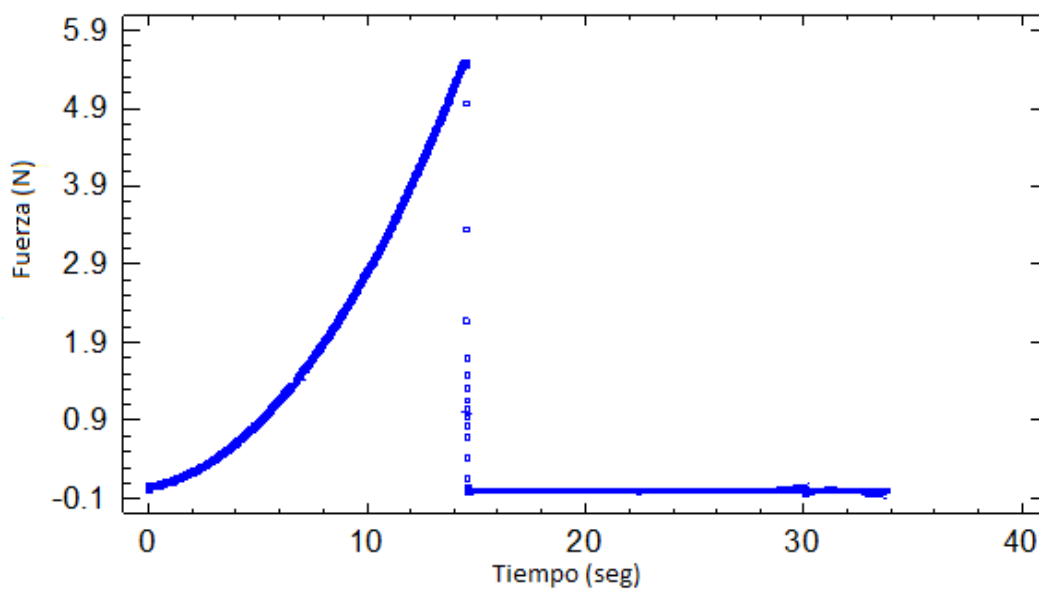


Figura 3. Prueba de textura para fuerza de quiebre (N) de biopelícula al 20 % de colágeno.

En la Figura No. 4, se muestra la gráfica correspondiente al tratamiento con 30% de colágeno. Al igual que las anteriores, se presenta la gráfica con los resultados de la prueba

de textura para fuerza de quiebre, en donde 12.69 N es el punto máximo a un tiempo de 20 s momento en el cual la fuerza tiende a cero, debido a la ruptura de la biopelícula.

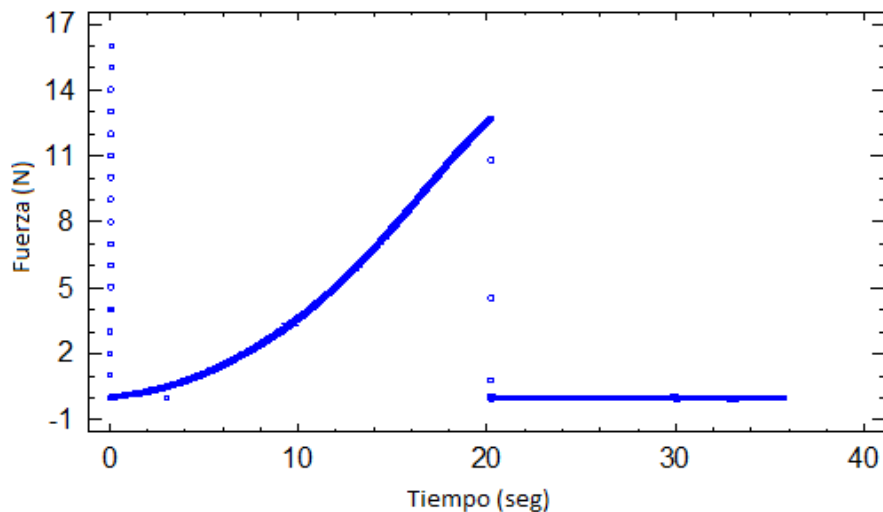


Figura 4. Prueba de textura para fuerza de quiebre (N) de biopelícula al 30 % de colágeno.

Es importante mencionar que el punto de quiebre para los tratamientos T1, T2 y T3, fue de 5.48, 9.53 y 12.69, respectivamente. Sin embargo, el punto de ruptura se dio en diferente momento, para el primer caso a los 17 s, el segundo a los 15 s y el tercero, a los 20 s.

En las pruebas de punto de quiebre se evalúa la fuerza máxima necesaria para producir el quiebre de la estructura del producto, así a valores más altos de fuerza se interpretaron que

mayor fue la resistencia del alimento (Rosenthal, 2010; Zhuab *et al.*, 2013., Milde *et al.*, 2014).

La prueba de quiebre en tres puntos conocida como puente de ruptura en la industria alimentaria es utilizada para evaluar la dureza y factibilidad de productos que tienen en su composición un carbohidrato (Castro *et al.*, 2003., Alves *et al.*, 2011).

Por lo tanto, en esta investigación se consideró que la biopelícula que corresponde al tratamiento tres (T3) necesitó mayor fuerza y tiempo para romperse, lo que hizo a esa biopelícula más resistente. Lo anterior concuerda con la norma ATSM-D-638-2014, que establece para plásticos biodegradables flexibles utilizados para protección de alimentos en vida de anaquel que el rango de punto de quiebre ideal va de 12.36 a 15.50 N, y como ya se indicó el tratamiento 3 (biopelícula activa) que tiene un valor de 12.69 es el que se encontró en el rango de fuerza óptimo para ser utilizado para hacer la misma función.

De lo anterior se concluyó que la biopelícula que fue activada con extracto de ajo para realizar la vida de anaquel en pescado fue la correspondiente a 30 % de colágeno por las propiedades obtenidas en textura. A pesar de que el único valor considerado de acuerdo con la norma fue el tratamiento 3, se decidió realizar un ANOVA ($P \leq 0.05$) para determinar si los tratamientos eran estadísticamente diferentes, mismo que se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. ANOVA $\bar{x}\pm DS(N)$ para la Prueba de textura empleada para fuerza de quiebre (N) de las biopelículas. 10, 20 y 30% de colágeno respectivamente.

T1	T2	T3	P
$\bar{x}\pm DS(N)$	$\bar{x}\pm DS(N)$	$\bar{x}\pm DS(N)$	
5.48 \pm 0.002a	9.53 \pm 0.001b	12.69 \pm 0.001c	0.0001**

*Las letras diferentes en las columnas (a, b, c), indican que si hay diferencias significativas entre medias Tukey ($P\leq 0.05$) y las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre medias ($P\leq 0.05$). \bar{X} = Media. DS= Desviación estándar. T1, biopelícula con 10% de colágeno, T2 biopelícula con 20% de colágeno T3, biopelícula con 30% de colágeno.

Como se ve en el Cuadro No 1 se formaron tres grupos estadísticamente diferentes, y el valor más alto como ya se indicó lo tiene el tratamiento T3.

7.2 Caracterización del extracto hidroalcohólico de ajo (*Allium sativum*)

Una vez realizada la caracterización de la biopelícula pura se procedió a determinar la concentración de fenoles totales del extracto hidroalcohólico de ajo por el método Folin-Ciocalteu.

7.2.1 Fenoles totales en ajo (*Allium sativum*)

Los resultados del análisis de fenoles totales del extracto hidroalcohólico al 50% con 100g de ajo por el Método de Folin-Ciocalteu para ésta investigación fue de 49.92 \pm 3.3 ($\bar{x}\pm DS$) mg GAE g⁻¹, estos resultados corresponden con Zapata *et al* (2014), quienes en su

investigación determinaron la concentración de fenoles totales en coronas de ajo (*Allium sativum.*), en un extracto etanólico al 50% como el de la presente investigación los resultados fueron de a 44.6 y 49.2 mg GAE g⁻¹. (temperatura de 90 °C y tiempos de 120 y 240 min). De igual forma coincidió con los resultados de Espinoza *et al.* (2009) quienes estudiaron seis variedades de ajo con los valores encontrados estuvieron en un rango entre 30.7 y 62.6 bajo las mismas condiciones de estudio.

Los compuestos fenólicos y azufrados del ajo actúan sinérgicamente bloqueando la actividad del oxígeno reactivo sobre proteínas, lípidos y ADN, brindándole al ajo propiedades antioxidantes (Espinoza *et al.*, 2009).

7.2.2 Color para la biopelícula con y sin extracto

Antes de realizar la prueba de vida de anaquel se decidió hacer una prueba de color a la biopelícula para determinar de manera independiente la influencia del color sobre la luminosidad ya que es una variable de calidad que influye en la vida de anaquel. En este caso se consideró como T1 a biopelícula sin extracto y T2 biopelícula con extracto hidroalcohólico al 50 %.

Para la determinación de color se empleó un colorímetro Konica Minolta, modelo CR-400 Chroma Meter, Sesing, Inc., Japan, previamente calibrado.

Se realizó un ANOVA específico para el valor de L^* ($P \leq 0.05$), debido a que la intención era lograr una biopelícula activa transparente, ya que debía cubrir un producto alimenticio que debería verse. El rango de valores encontrado para L^* en los dos tratamientos fue de 90.46 a 91.77 es muy luminoso ya que se acerca al valor de 100 que es la máxima luminosidad.

Lo anterior, se aproximó a lo que indicó Figueroa *et al.* (2014), quienes en su investigación mencionaron que las biopelículas, que elaboraron obtuvieron un rango de luminosidad de 87.09 a 92.45, quien también activo sus biopelículas. Ellos indicaron que este valor sugiere estabilidad en las matrices poliméricas y sus componentes principales, y que son una excelente propuesta para cubrir pescado.

Independientemente del rango obtenido se realizó un ANOVA ($P \leq 0.05$) para L^* , para determinar si los tratamientos son estadísticamente diferentes. Al encontrar diferencias significativas ($P \leq 0.05$) se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), resultados que se aprecian en el cuadro No 2 en el cual, se ve que con media más alta estaba el T2.

Cuadro 2. Resultados del ANOVA para L*

	T1	T2	P
Variable	$\bar{x} \pm DS$	$\bar{x} \pm DS$	
L*	90.4697 \pm 1.374 ^a	91.778 \pm 1.374 ^b	0.0001**

Las letras diferentes en las columnas indican que si hay diferencias significativas entre medias Tukey ($P \leq 0.05$) y las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre medias ($P \leq 0.05$). =x Media. DS= Desviación estándar L*: luminosidad.

La luminosidad o brillo L*, permite clasificar el color como claro u oscuro. Lo cual, se define como la característica de una sensación que la hace equivalente a la producida por algún elemento de la escala de grises que va desde el blanco (máxima luminosidad, igual a 100) hasta el negro (mínima luminosidad, igual a 0) (como se ve en el cuadro No 2 ambos tratamientos tienden a 100) haciendo un elemento más claro u oscuro. Esta característica es una medida relativa de la luz reflejada frente a la absorbida, por lo tanto, no se considera como participe la de cromaticidad (González, 2010).

7.3. Vida de Anaquel

Para realizar el análisis de vida de anaquel se colocó un filete de pescado (Tilapia del Nilo) en una charola de aluminio misma que fue cubierta con las diferentes variantes de la biopelícula simula las condiciones reales de un centro comercial, para todos los tratamientos y entonces fueron medidas las características deseadas del pescado en vida de anaquel.

Después de haber realizado los análisis de laboratorio correspondientes, los resultados fueron evaluados para la vida de anaquel mediante un ANOVA ($P \leq 0.05$) a los tratamientos (T1=pescado sin recubrir, T2=pescado con biopelícula sin extracto, T3=pescado con biopelícula activa con extracto y T4= pescado con envoltura plástica convencional), en un periodo de evaluación de 12 días con evaluaciones escaladas (día 1, 3, 6, 9 y 12) para las variables de color (L^* , a^* , b^*), pH, MA, (Mesófilos Aerobios), CT (Coliformes Totales), PSI (Psicotróficos). Lo anterior se describe en los Cuadros No 3 y 4.

Cabe mencionar que CONAPESCA, (2017) y Karim y Bath, (2009) indicaron que la vida de anaquel en filete de pescado fresco es de 4 días en condiciones de refrigeración de 4 a 5 °C en tiendas de autoservicio, sin embargo, al dejar el pescado de ésta investigación como se pretendía aumentar la vida de anaquel se midió hasta que se consideró no viable debido a los daños por ocasionados por frío, en el tratamiento testigo T1 y pH, entre otros, como se podrá ver en la discusión que se describe después de los Cuadros No. 3 y 4.

Cuadro No 3. Resultados de las medias de los tratamientos para pH y color (L*, a* y b*) para los tratamientos (T1, T2, T3 y T4) de filetes de pescado cubiertos con la biopelícula en sus diferentes días de vida de anaquel.

variable	T1 $\bar{x} \pm DS$	Tratamientos T2 $\bar{x} \pm DS$	T3 $\bar{x} \pm DS$	T4 $\bar{x} \pm DS$	p $\bar{x} \pm DS$
L*					
Día 1	58.296±0.283aby	57.36±0.131ax	58.51±0.529bx	57.35±0.690ax	0.0094*
Día 3	59.18±0.323by	57.43±0.650ax	58.50±0.195bx	59.18±0.080bx	0.0014*
Día 6	48.6±0.578ax	61.36±0.408ay	57.64±0.627ax	2288,57±3847.25ax	0.4370 NS
Día 9	48.326±1.001ax	61.843±0.102cy	58.01±0.608bx	67.81±0.5dx	0.0001**
Día 12	48.003±0.558ax	61.356±0.330by	61.756±0.219by	61.68±0.353bx	0.0001**
p	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	
a*					
Día 1	2.56±0.173ax	2.52±0.03ax	2.57±0.110ax	2.70±0.030ax	0.2420 NS
Día 3	4.22±0.035by	4.21±0.01by	4.37±0.015cy	3.57±0.036az	0.0001**
Día 6	4.37±0.015by	4.59±0.144az	4.38±0.015by	3.26±0.025axy	0.0001**
Día 9	4.37±0.017by	4.66±0.360cz	4.06±0.528by	2.94±0.551ax	0.0028*
Día 12	4.34±0.020by	4.64±0.025cz	4.38±0.01by	3.25±0.035axy	0.0001**
p	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	
b*					
Día 1	14.9±0.1ay	14.83±0.115ay	14.7±0.1ay	14.66±0.057ay	0.0528 NS
Día 3	-1.173±0.011ax	1.24±0.02cx	1.23±0.01cx	1.190.01bx	0.0001**
Día 6	-1.176±0.015ax	1.25±0.01ax	1.253±0.030ax	1.19±0.01ax	0.0001**
Día 9	-1.176±0.005ax	1.3±0.01dx	1.236±0.01cx	1.18±0.01bx	0.0001**
Día 12	-1.176±0.015ax	0.946±0.490dx	1.23±0.01cx	1.193±0.015bx	0.0001**
P	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0094*
pH					
Día 1	6.243±0.005abv	6.32±0.01bw	6.26±0.01cw	6.236±0.005av	0.0001**
Día 3	7.23±0.01aw	7.32±0.01bx	7.23±0.011ax	7.34±0.02bw	0.0001**
Día 6	8.173±0.015xb	8.196±0.011by	7.51±0.01ay	8.336±0.005cx	0.0001**
Día 9	8.646±0.005cy	8.486±0.005by	7.54±0.015ay	8.723±0.005dy	0.0001**
Día 12	9.513±0.015cz	8.953±0.020bz	8.146±0.127az	9.556±0.015cz	0.0001**
P	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	

Las letras diferentes en las columnas indican que si hay diferencias significativas entre medias Tukey ($P \leq 0.05$) y las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre medias ($P \leq 0.05$). x= Media. DS= Desviación estándar**= Diferencia significativa T1 = pescado sin recubrir, T2 = pescado con biopelícula sin activar T3 =pescado con biopelícula activa T4 = pescado con biopelícula comercial

Cuadro 4. Resultados de las medias de los tratamientos para mesófilos aerobios (MA), coliformes totales (CT) y Psicotróficos (Psico) para los tratamientos (T1, T2, T3 y T4) de filetes de pescado cubiertos con la biopelícula en sus diferentes días de vida de anaquel.

Variable	Tratamientos				<i>p</i> $\bar{x} \pm DS$
	T1 $\bar{x} \pm DS$	T2 $\bar{x} \pm DS$	T3 $\bar{x} \pm DS$	T4 $\bar{x} \pm DS$	
MA UFC/mL					
Día 1	5.046±0.00az	5.011±0.03ax	5.046±0.0az	5.037±0.02aw	0.0951NS
Día 3	5.046±0.0az	5.011±0.03ax	5.046±0.0az	5.046±0.0aw	0.0951NS
Día 6	4.960±0.086bxy	5.011±0.03bx	2.221±0.0ax	5.067±0.0bx	0.0001**
Día 9	4.874±0.0bx	5.009±0.035cx	2.522±0.0ay	5.655±0.00dy	0.0001**
Día 12	4.898±0.00bx	5.01±0.035cx	2.522±0.0ay	5.663±0.00dz	0.0001**
<i>P</i>	0.0001**	0.0001**	0.00950NS	0.0001**	
CT UFC/mL					
Día 1	2.522±0.00bx	0.699±0.003ax	2.52±0.00by	2.37±0.15bx	0.0001**
Día 3	2.522±0.0ax	2.372±0.150ay	2.522±0.0ay	2.37±0.15ax	0.1927NS
Día 6	3.602±0.0cy	3.318±0.017bz	1.164±1.060ax	3.485±0.117cy	0.0001**
Día 9	3.602±0.0by	3.318±0.017bz	1.160±1.060ax	5.731±0.00cz	0.0001**
Día 12	3.602±0.0by	3.318±0.01az	1.333±0.0ay	5.809±0.0cz	0.0001**
<i>P</i>	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	
PSICO UFC/mL					
Día 1	4.601±0.00ax	4.34±0.0ax	0.1±0.0az	4.54±0.19ax	0.0600NS
Día 3	4.601±0.00bx	4.34±0.0bx	0.1±0.0ax	4.54±0.19bx	0.0001**
Día 6	4.601±0.00bx	4.34±0.0bx	0.1±0.0ax	4.54±0.19bx	0.0001**
Día 9	4.601±0.00cx	4.34±0.0bx	0.1±0.0ay	5.72±0.01dy	0.0001**
Día 12	4.601±0.00cx	4.34±0.0bx	0.1±0.0ay	5.72±0.01dy	0.0001**
<i>P</i>	0.0001**	0.0001**	0.0001**	0.0001**	

Las letras diferentes en las columnas indican que si hay diferencias significativas entre medias Tukey ($P \leq 0.05$) y las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre medias ($P \leq 0.05$). \bar{x} = Media. DS= Desviación estándar. T1 = pescado sin recubrir, T2 = pescado con biopelícula sin activar T3 =pescado con biopelícula activa y T4 = pescado con biopelícula comercial

7.3.1. Variable a*

Los resultados indicaron que para la variable a* durante la vida de anaquel existieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en los días 3, 6, 9 y 12, y no existieron para el día 1. En general el rango de valores obtenido para dicha variable se encontraron entre 2.52 y 4.66, información que se ve en el Cuadro 3.

El color es una respuesta mental al estímulo producido en la retina por una radiación luminosa visible. El estímulo cromático está caracterizado por la colorimetría triestímulo, el tono, la luminosidad y la saturación. El tono o matiz, se refiere a aquella característica que permite clasificar al color como rojo, amarillo, verde o azul y es, por tanto, un atributo cualitativo de color (González, 2010).

En el caso de a*, ésta es una coordenada cromática que va de +a* (positivo) que indica rojo y hasta -a* (negativo) que indica verde. Los valores máximos para esta variable son 60 positivo, pasando por 0, hasta 60 negativo, que sería verde (González, 2010).

Como se ve en el Cuadro No. 3 los valores de a*, no se modifican significativamente a través del tiempo de la vida de anaquel correspondiente a 12 días, lo que implica que no hay efecto del tratamiento sobre el color.

7.3.2. Variable b^*

El rango de valores obtenido para la variable b^* está entre 14.90 y -1.17, resultados que se encuentran en el Cuadro 3.

Los valores obtenidos indicaron que para dicha variable existieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en los días 3, 6, 9 y 12, y no existieron para el día 1. En general el rango de valores obtenido para dicha variable se encuentra entre 14.90 y -1.17, información que se ve en el Cuadro 3.

Para el caso de b^* es una coordenada cromática que va de $+b^*$ (positivo), que indica amarillo y de $-b^*$ (negativo) que indica el azul. De igual forma que a^* y b^* pueden tener valores de 60 hasta -60 (Boscarol, 2007).

Como se ve en el Cuadro 3, al igual que en a^* los valores de b^* no se modifican significativamente a través del tiempo de la vida de anaquel, lo que implica que no hay efecto del tratamiento sobre el color.

7.3.3. Variable L*

Para la variable L*, durante la vida de aquel, existieron diferencias significativas para los días 1, 3, 6,12 y no existieron para el día 9, en un rango de 48.6 a 67.81, como se muestra en el Cuadro No 3. Como ya se indicó, la luminosidad va desde el blanco (máxima luminosidad, igual a 100) hasta el negro (mínima luminosidad, igual a 0) haciendo un elemento más claro u oscuro. Esta característica es una medida relativa de la luz reflejada frente a la absorbida, por lo tanto, no se considera participe de la cromaticidad (González, 2010).

El rango de valores obtenidos para este estudio (48.6 a 67.81) es característico de la muestra (filete de pescado fresco), lo que infiere en que no hay efecto de la biopelícula sobre el color del pescado.

La mayor parte de la musculatura de los pescados crudos es blanca, y delicadamente translúcida si se compara con carne cruda de vaca o cerdo, cuyas células están rodeadas por más tejido conectivo y células grasas que dispersan la luz. Las porciones grasas del pescado especialmente el vientre tiene un aspecto claramente lechoso a diferencia del resto (Serrano, 2011; Boscarol, 2007).

Reforzando lo anterior, en tanto más cantidad de agua y ácidos grasos tenga la muestra, ésta será más luminosa, éste efecto puede verse en los resultados obtenidos , ya que como

se indicó los tratamientos inician siendo ligeramente opacos (48.6) y se van haciendo más luminosos (67.81) a través del paso de los días durante la vida de anaquel. La translucidez del músculo de pescado se convierte en opacidad al aplicar tratamientos de cocina que hacen que las proteínas musculares se desplieguen y se unan entre sí, formando grandes masas que dispersan la luz (Serrano, 2011; Boscarol, 2007).

Como puede verse en el Cuadro No 3, el tratamiento 1 pierde luminosidad a partir del día tres (48.00) a diferencia de los otros tres que tienen un valor alrededor de 61, es importante recordar que el tratamiento 4 no fue recubierto con la biopelícula, lo que sugiere un daño por frío el cual no presentan los tratamientos con biopelículas.

7.4. pH

Para pH, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en todos los días de la vida de anaquel, tal y como era de esperarse, y como se muestra en el Cuadro No 3. El rango de valores de pH que se encontraron en esta investigación en vida de anaquel va de 6.0 a 9.0 entre tratamientos. En general los microorganismos se desarrollan principalmente debido a que se alcanza un pH favorable para su crecimiento (entre 6,5 y 7.5). En el cuadro mencionado se ve para todos los tratamientos que el filete de pescado empieza a tener un pH de riesgo a partir del sexto día, situación por la cual, algunos investigadores se protegen dando una vida de anaquel de 4 días (CONAPESCA2017; Karim y Bath, 2009). El

deterioro que se inicia rápidamente se debe a la acción de enzimas microbianas que actúan sobre compuestos presentes en el filete de pescado (Adams, 2007).

El pH del pescado inmediatamente después de su captura es neutro, luego desciende a 6,2-6,5 para luego subir a 6,6-6,7. el pH indicado es ideal para la proliferación bacteriana. En tanto más extremo sea el pH (ácido, básico) los microorganismos crecerán más lentamente (Mossel, 2003).

Para el T3 (Biopelícula activa) se observó un comportamiento de pH en un rango de 6.26 del día 0 a 7.5 del día 9. el pH descrito podría considerarse un ambiente ideal para la proliferación de microorganismos.

No obstante, lo anterior (el valor de pH), se notó que se detuvo el crecimiento microbiano, lo que se sugiere podría tener relación con la presencia del extracto de ajo (biopelícula activa).

7.4.1. Análisis Microbiológicos

El crecimiento bacteriano es el principal factor que limita el tiempo de vida comercial del pescado produciendo su alteración y la aparición de olores desagradables.

La estimación del recuento total de bacterias viables como lo son putrescinas y cadaverinas o mejor aún, la determinación de las bacterias que están implicadas realmente en el proceso de alteración, así como el análisis de los indicadores químicos de sustancias

derivadas de su desarrollo, se han utilizado como medidas de aceptabilidad de la calidad del pescado (Frazier, 2003).

7.4.2. Mesófilos Aerobios

Para la variable Mesófilos Aerobios existieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para los días 6, 9 y 12 y no existieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para los días 1 y 3, para todos los tratamientos como se muestra en el Cuadro No 4.

Los mesófilos, crecen bien entre 8 y 42 °C. Por lo tanto, el pescado refrigerado a temperaturas menores a 5 °C no permite el desarrollo de los microorganismos patógenos en general. (Serrano, 2011).

Las bacterias comúnmente implicadas en la alteración son especies de *Shewanella* y *Pseudomonas*, siendo *Shewanella putrefaciens* la que predomina a bajas temperaturas. Las bacterias Gram negativas que predominan en el pescado descompuesto a temperaturas altas (10-37 °C) son *Aeromonas* y *Vibro cholerae* (Frazier, 2003).

Como se indica en el Cuadro 4 el pescado inició la vida de anaquel con 5 UFC/mL y a través del paso del tiempo estas fueron su concentración hasta 4.8 UFC/mL. Sin embargo, excepcionalmente en el T3 (Biopelícula activa) la disminución llegó hasta 2.5 UFC/mL.

7.4.3. Coliformes totales

Para Coliformes Totales existieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para los días 1, 6, 9 y 12 y no existieron para el día 3 en todos los tratamientos.

Como se indica en el Cuadro No 4, el pescado inicio la vida de anaquel en general con 0.69 UFC/mL hasta 5.80 UFC/mL, sin embargo, para los T1, T2 y T3 el comportamiento fue muy similar entre ellos, siendo en extremo más alto el T4 (película comercial).

Para el T1 se sugiere que el daño por frio ocasiono una deshidratación que provocó que se detuviera el crecimiento microbiano, para T2 y T3 que fueron las biopelículas elaboradas para la presente investigación, se estimó que el crecimiento microbiano se detuvo por acción de la biopelícula y en el caso del T4, con película comercial el crecimiento fue muy alto, como se ve en el mismo cuadro.

La pérdida de la calidad microbiológica puede ocasionar infecciones e intoxicaciones alimentarias, así como alteraciones en los alimentos. En 1991 en Perú se reportó una incidencia del 26% de casos de cólera originados por consumo de alimentos contaminados con *Vibrio colarae* (Uno de los coliformes más representativos del grupo). Dicha enfermedad es una causa importante de morbilidad y mortalidad, especialmente en niños (Carbajal *et al.*, 2003).

7.4.4. Psicotróficos

Para Psicotróficos existieron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para todos los días de vida de aquel, en todos los tratamientos como se muestra en el Cuadro No 4. Los valores fueron de 4.34 UFC/mL a 4.60 UFC/ml para T1, T2 y T3, y excepcionalmente para T4 subió a 5.72 UFC/mL.

Algunos patógenos que tienen capacidad de reproducirse a temperaturas de refrigeración en particular para carne de pescado son *Aeromonas hydrophila*. Los psicótrofos son patógenos adaptados a bajas temperaturas, sin embargo, la patogenicidad de un alimento refrigerado dependerá también de la carga bacteriana que tenía antes de conservarlo, cuanto más baja, más calidad y mejores resultados de conservación.

Almacenar los alimentos en el refrigerador no solo implica introducirlos. Mantener las condiciones óptimas del refrigerador es la clave para aumentar la vida de anaquel, algunas de las condiciones que deben de cuidarse son la temperatura y la limpieza (Carbajal *et al.*, 2003).

Los microorganismos Psicótrofos que descomponen el pescado crudo generalmente crecen bien a temperaturas cerca de 0 °C, los psicótrofos tienen fases de latencia más cortas, velocidades de crecimiento más rápidas y generalmente alteran el pescado antes de que los microorganismos patógenos alcancen niveles peligrosos (Adams, 2007).

VIII. CONCLUSIONES

Se elaboró una biopelícula comestible a base de colágeno, extracto de ajo, y glicerol.

El efecto de la biopelícula activa (T3) sobre el filete de pescado fresco de Tilapia del Nilo aumentó 8 días la vida de anaquel, considerablemente respecto a los otros tratamientos.

Los componentes de la biopelícula aumento el tiempo de vida de anaquel en el pescado, y redujo el tiempo de proliferación microbiana, debido al efecto antimicrobiano presente con la adición de extracto de ajo.

IX. SUGERENCIAS

- Continuar con investigaciones, relacionadas con el desarrollo de biopelículas con el fin de llegar a la sustitución definitiva de empaques que agredan al medio ambiente.
- Ampliar prácticas de higiene por parte de los proveedores con el fin de reducir la contaminación del producto fuera de su ambiente.
- La biopelícula elaborada en este estudio puede ser aplicada a otros alimentos debido a que sus componentes son compatibles con diferentes productos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adams, M. R. Moss, M. O. (2007). Microbiología de los alimentos. Editorial ACRIBIA Zaragoza. Pp 98-99.

Alvis A., Pérez L., Arrazola G. (2011). Determination of Textural Properties of Chocolate Tablets by Instrumental Techniques. Información Tecnológica, 22, 3: 11-18.

ASTMD.638-(2014). Standard Test Method for Tensile Properties of plastics (Mon may). 405:49:43 Edit 2015. Pp 43-49.

ASTMD.1293-84 (1990). Test Method for Tensile- Properties of thin Plastics Shieling. (Mon may). 405:49:43. Edit 2015. pp 41-43.

Ai, H., Wang, F., Yang, Q., Zhu, F. y Lei, C. (2008). Preparation and biological activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica*. Carbohydrate Polymers. Pp 25-26.

Aguilar, M. M. A. (2005). Propiedades físicas y mecánicas de películas biodegradables y su empleo en el recubrimiento en frutos de aguacate. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional. Pp16-19.

Arvanitoyannis, I. S., y Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(4), Pp. 726-745.

Bae, I., k Osatomi. (2008). “Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes” *food chemistry* 108 pp 13-16.

Boscarol M. (2007). El espacio de color L* c* h La administración y gestión del color Recuperado en Sitio web: http://gusgsm.com/espacio_color_lch Consultado: 20 de septiembre 2018.pp1-6.

Brinckmann, J. (2005). Collagens at a glance. In Anonymous *Collagen* (pp. 1-6). Springer Pp 39-47.

Brodsky, B. & Persikov, A. V., (2005). Molecular structure of the collagen triple Helix. *Advances in Protein Chemistry*, 70, Pp 301-339.

Campos, C. A., Gerschenson, L. N. y Flores, S. K. (2011). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), Pp. 849- 875.

Carbajal G, Sanchez J, Ayala ME., Atushi Hase. (2003). Differences among marine and hospital strains of *Vibrio cholerae* during peruvian epidemic. *J Gen Appl Microbiol*; 44(3):896-901.

Castro E., Verdugo M., Miranda M., Rodríguez A. (2003). Determinación de parámetros texturales de galletas. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Disponible en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/c20028221225determinacionparametros1.pdf. [Visitada en Marzo de 2019].

CONAPESCA (2017). Consumo percapita anual de pescados y mariscos. Comisión Nacional De Acuacultura y Pesca, fecha de publicación 26 de junio del 2016 fecha de consulta 21 de marzo de 2019.Pp. 12-17.

Cruz-Morfin. R Y. Martínez- Tenorio Y A. López-Malo-Vigil. (2013). Temas selectos de ingeniería de alimentos. Pp.42-52.

Dainelli, D. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. Trends in Food Science & Technology, 19(Suppl. 1), S99-Pp.108.

Fernández Pan, I. y Pérez Caballero, J. I. (2011). Películas y recubrimientos comestibles como herramienta emergente para la industria alimentaria Los retos actuales de la Industria alimentaria Madrid: Instituto Tomás Pascual Sanz. Pp. 27-50.

Figuroa L., K.J. Torres V., O.L., Prías B., J.J. Ariza C. (2014). Películas poliméricas reforzadas con nanopartículas de polvo de ajo. Fac.Nal. Agron. 67(2), 981-983.

Espinoza C.f., Rios. R.M., Elias.PC. (2009). Determinación de fenoles totales, frúctanos y pungencias en seis cultivares de ajos. Universidad Nac. San Luis Gonzaga del ICA Perú (1) Pp23-24.

Fraizer, W.C. (2003) Microbiología de los alimentos 4° edición. Editorial ACRIBIA Zaragoza. Pp. 56-59.

García, A. I. (2014). Efecto de un recubrimiento comestible adicionado con *Lactobacillus casei Shirota*, sobre las características fisicoquímicas, texturales, y sensoriales de una galleta tipo habanera. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de México. Pp.23-25.

Gardey A y Pérez P. Publicado. (2013) métodos de estudio de los alimentos Definición de pescado, [acceso abril 2017] Facultad de Ciencias e Ingeniería, Ingeniería de Alimentos Cartagena D.T. y C. Pp.19-21.

Giménez, B., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., y Gómez-Guillén, M. C. (2012). Antioxidant Peptides from Marine Origin. In G. Cirilo & F. Iemma, Antioxidant Polymers: Synthesis, Properties, and Applications. Wiley. Pp. 203-257.

Giménez, B., López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M. E., y Montero, P. (2013). Release of active compounds from agar and agar–gelatin films with green tea extract. Food Hydrocolloids, 30(1), Pp 264-271.

González I. (2010). Tesis de maestría. Caracterización química del color de diferentes variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.). Julio. Universidad Nacional de Colombia. Pp, 84.

Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Alemán, A., López de Lacey, A., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. Sea by-products as raw material: New ways of application, Pp89-115.

Gómez-Guillen, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), Pp 1813-1827.

Gramza, A. y Khokhar. S. (2006). Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), 351-362.

Gulcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), Pp 345-391.

Guillen, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), Pp. 1813-1827.

Karim, A. A. y R. Bhat (2009). "Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins." *Food Hydrocolloids* 23: Pp. 563-576.

Kolodziejska, I., Skierka, E., Sadowska, M., Kolodziejski, W., & Niecikowska, C. (2008). Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chemistry*, 107(2), Pp 700-706.

Krochta, J. M. y De Mulder-Johnston, C. (2002). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. [Review]. *Food Technology*, 51(2), Pp. 61-74.

Labuza T. (1999). Literature review on water activity and glass transition. University of Minnesota. Department of Food and Science and Nutrition. Pp.11-13.

Lee, S. (2010). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products. *Food Chemistry*, 123(2), Pp 216-220.

Leroi, F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27(6), Pp 698-709.

Lopez J. (2011). Observación de la actividad antimicrobiana del ajo (*Allium sativum*). *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*; 8: 491-4. Disponible en: <http://reuredc.uca.es/index.php/tavira/article/viewFile/242/>. Pp 61. [Visitado en marzo 2017].

Martín-Belloso, O., Rojas-Graü, M. A. y Soliva- Fortuny, R. (2009). Delivery of Flavor and Active Ingredients Using Edible Films and Coatings. Edible Films and Coatings for Food Applications. In K. C. Huber y M. E. Embuscado (Eds.) Springer New York Pp. 295-313.

Milde L., Cabral F., Ramírez R. (2014). Effect of frozen storage on bread of cassava starch: Physical textural and sensory properties. Revista Ciencia y Tecnología, 16, 21: 33-39.

Morros Galvárez, M. M. (2009). Aditivos alimentarios, una garantía de seguridad y salubridad en los alimentos Seguridad alimentaria e higiene de los alimentos Madrid: Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud. Pp. 49-83.

Mossel DAA. (2003). Microbiología de los Alimentos. 2ª Ed. Acribia, Zaragoza, Pp 518, 620,

NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa México D.F. Diario Oficial de la Federación.

NOM-110-SSA1-1994. Secretaria de salud Norma Oficial Mexicana. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. México D.f. Diario Oficial de la Federación.

NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. . México D.f. Diario Oficial de la Federación.

Pavlath, A. E. y Orts, W. (2009). Edible Films and Coatings: Why, What, and How. Edible Films and Coatings for Food Applications. In K. C. Huber & M. E. Embuscado (Eds.), Springer New York. Pp. 1-23:

Potaros, T., N. Raksakulthai, Kumar, P. (2009). "Characteristics of collagen from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin isolated by two different methods." *Kasetsart Journal*43: 584-593.

Qian, Z. -, Jung, W. -, & Kim, S. -. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource technology*, 99(6), Pp. 1690-1698.

Rodríguez E., Fernández A., Ayala A. (2005). Rheology and texture of doughs: Applications on wheat and corn. *Ingeniería e Investigación*, 25, 2: Pp 72-78.

Rodríguez Turienzo L. (2011) evaluación de recubrimientos comestibles proteicos aplicados a salmón del Atlántico (*salmo salar*) congelado: estudio de diferentes formulaciones y tratamientos tecnológicos. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. Pp. 33-55.

Rojas-Graü, M. A., Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva-Fortuny, R. C., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., & Martín-Belloso, O. (2007). Apple pureealgininate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45(2) Pp. 254-264.

Romero B.L. y Estrada B.J. (2011). Elaboración de una película comestible a base de colágeno incorporado con nisina como agente antimicrobiano para reducir la pérdida de humedad y oxidación de las grasas en filetes de carne de cerdo en refrigeración. Tesis de grado, Universidad de Cartagena Facultad de Ciencias e Ingeniería, Ingeniería de Alimentos Cartagena D.T. y C. Pp.13-17.

Romero D., Cambero M., Ordóñez J., De la Hoz L., Herrero A. (2014). Rheological behaviour of commercial cooked meat products evaluated by tensile test and texture profile analysis (TPA). *Meat Science*, 98, 2: 310-315.

Rosenthal A. (2010). Texture profile analysis: How important are the parameters. *Journal of Texture Studies*, 41, 5: Pp 672-684.

Salem, N., Msaada, K., Hamdaoui, G., Limam, F. y Marzouk, B. (2011) Variation in phenolic composition and antioxidant activity during flower development of safflower (*Carthamus tinctorius L.*) *Journal Agriculture Food Chemical*, 59, Pp. 4455-4463.

SAGARPA. (2016). El consumo regular de pescado mejora la salud y previene enfermedades cardiovasculares y cerebrales: CONAPESCA fecha de publicación abril 2015 fecha de consulta 29 de marzo del 2017.

Senaratne, L., P. Park. (2006). "Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin." *Bioresource technology*97: 191-197.

Serrano G.J.C. (2011). Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (*Oreochromis sp*) y cachama (*Piaractus brachypomus*). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Tang.X.Z. Kumar, P. Alavi, S. y Sande, K, P. (2012). Recent advances in biopolymers and biopolymer-based nanocomposites for food packaging materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.pp426.

Torres G.J., González K., Acevedo D. (2015). Análisis del Perfil de textura en frutas, productos cárnicos y quesos. *Revista Reciteia: Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*, 14,2: 63-75.

Wang, L. X An. (2008). "Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep- sea (*Sebaste mentella*)" *Food Chemistry* 108(2):616-623.

Zapata S, Piedrahita AM, Rojano B .2014. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspect Nutr Humana*. 2014;16: Pp 25-36.

Zhuab B., Lia B., Gaob Q. (2013). Predicting Texture of Cooked Blended Rice with Pasting. *International Journal of Food Properties*, 16, 3: Pp. 485-499.