



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO DE PELÍCULAS ACTIVAS POR
UNIÓN QUÍMICA DE COLÁGENO DE PIEL DE
POLLO A POLIFENOLES DE LA CHÍA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

NANCY CARMEN ARI ZMENDI CHAVEZ



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora. María de los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Profesor. Alberto Tecante Coronel

SECRETARIO: Profesor. Alejandro Rafael Zavala Rivapalacio

1er. SUPLENTE: Profesora. Lorena de Anda Aguilar

2° SUPLENTE: Profesor. José Alfredo Vázquez Martínez.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorios 322 y 323, Conjunto E, Facultad de Química. Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. José Alfredo Vázquez Martínez

SUSTENTANTE:

Nancy Carmen Arizmendi Chavez

CONTENIDO

CONTENIDO	3
ACRÓNIMOS.....	5
1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. ANTECEDENTES.....	11
3.1 Chía (Salvia hispanica L.).....	11
3.2 Antioxidantes.....	14
3.3 Compuestos fenólicos.....	16
3.4 Empaques de Alimentos.....	19
3.4.1 Empaques plásticos.....	19
3.4.2 Empaques activos.....	21
3.4.3 Biopelículas.....	21
3.5 Piel de pollo.....	23
3.6 Proteína de Colágeno.....	24
3.7 Lípidos. Rancidez oxidativa.....	27
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo general.....	30
3.2 Objetivos particulares.....	30
4. METODOLOGÍA.....	31
4.1 MÉTODOS.....	34
4.1.1 Extracción e identificación de compuestos fenólicos de la semilla de chía.....	34
4.1.2 Formación de las biopelículas activas.....	37
4.1.3 Evaluación de las propiedades de barrera de las películas activas.....	43
4.1.4 Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.....	46
4.1.5 Pruebas de deterioro microbiano y oxidativo.....	48
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
5.1 Extracción e identificación de compuestos fenólicos de la semilla de chía.....	51

5.1.1	Separación de polifenoles mediante cromatografía preparativa en columna	55
5.1.2	Determinación estructural de polifenoles mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	57
5.1.3	Confirmación de la masa molecular de los polifenoles obtenidos en las fracciones mediante HPLC-MS	80
5.2	Formación de películas activas	93
5.2.1	Análisis químico proximal de la piel de pollo y del extracto de proteína obtenido a partir de la misma	93
5.2.2	Reacción de acoplamiento del ácido cafeico a la proteína.....	96
5.2.3	Comprobación de la unión química aglicona-proteína	99
5.2.4	Formulación de las biopelículas.....	104
5.2.5	Evaluación de las propiedades de barrera de las películas activas	117
5.3	Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.....	120
5.4	Pruebas de deterioro microbiano y oxidativo	125
5.4.1	Determinación indirecta de la carga microbiana (método del 2,3,5-trifeniltetrazolio)	127
5.4.2	Índice de peróxidos (método colorimétrico)	128
5.4.3	Índice de Kreis	130
6.	CONCLUSIONES.....	131
7.	PERSPECTIVAS	133
8.	BIBLIOGRAFÍA	134
	ANEXO 1	142

ACRÓNIMOS

- ABTS: **ácido 2,2'**-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
- AcOEt: acetato de etilo
- AOAC: Asociación de Comunidades Analíticas (Association of Analytical Communities)
- AQP: análisis químico proximal
- B: película blanco
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
- EAA: equivalentes de ácido ascórbico
- EAG: equivalentes de ácido gálico
- EDC·HCl: clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida
- ER: equivalentes de rutina
- Hex: hexano
- HPLC-MS: sistema acoplado de cromatografía en columna de alta eficacia y espectrometría de masas
- IK: índice de Kreis
- IP: índice de peróxidos
- PO: permeabilidad a oxígeno
- ppm: partes por millón
- PVA: permeabilidad a vapor de agua
- Rf: factor de retención
- RMN¹H: resonancia magnética nuclear de protón
- RMN¹³C: resonancia magnética nuclear de carbono
- TMS: tetrametilsilano
- TNBS: ácido trinitrobencensulfónico
- tr: tiempo de retención
- USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture)

- WCA: película con ácido cafeico
- WCAN: película con ácido cafeico y nisina
- WH: película con hexanal
- WHCA: película con hexanal y ácido cafeico
- WHCAN: película con hexanal, ácido cafeico y nisina

1. RESUMEN

En el presente estudio se extrajeron y separaron por cromatografía en columna preparativa polifenoles procedentes de la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) del estado de Puebla. Los compuestos obtenidos se analizaron cualitativamente utilizando la técnica espectroscópica de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H) y un sistema acoplado de cromatografía en columna de alta eficacia-espectrometría de masas (HPLC-MS), respectivamente.

Asimismo, se desarrolló un procedimiento para obtener películas plásticas a partir de biopolímeros generados de desecho de la industria de pollo, con el fin de obtener envases alimentarios multifuncionales y amigables con el medio ambiente capaces de proteger al alimento de la degradación oxidativa y retardar el crecimiento microbiano. Estas películas se prepararon a partir de proteínas de la piel de pollo (colágeno) con una combinación de glicerol y sorbitol como plastificantes, y como componentes activos; ácido cafeico proveniente de las semillas de la chía y nisina, como agente antioxidante y agente antimicrobiano, respectivamente.

Se establecieron las condiciones de la reacción de unión colágeno-antioxidante. Las películas obtenidas fueron posteriormente caracterizadas para estudiar sus propiedades de barrera, tales como permeabilidad a vapor de agua y oxígeno. De acuerdo con los resultados, ninguna película presentó permeabilidad a oxígeno y las películas a las que se adicionó un aldehído no presentaron ningún efecto significativo en la permeabilidad a vapor de agua, aunado a que esta sustancia inhibió la función antioxidante del ácido cafeico.

Por otro lado, se determinó su actividad antioxidante y antimicrobiana en una matriz alimentaria haciendo un monitoreo de la oxidación lipídica y crecimiento microbiano durante un período de 49

días a una temperatura de 22-24 °C y una humedad relativa de 60%.

Para este estudio, se observó que las películas WCA (con ácido cafeico) y WCAN (con ácido cafeico y nisina) retardaron la oxidación lipídica del alimento, mientras que las películas WCAN (con ácido cafeico y nisina) y WHCAN (con ácido cafeico, hexanal y nisina) lograron retardar el crecimiento microbiano de bacterias Gram positivas en el alimento.

2. INTRODUCCIÓN

El envasado se ha usado en los alimentos con la finalidad de protegerlos de su entorno y mantener su calidad.

Se han utilizado diversos materiales para la fabricación de envases en alimentos, entre ellos, los envases plásticos que tienen un uso generalizado debido a su eficacia como barrera al oxígeno y agua. No obstante, las películas sintéticas representan riesgos medioambientales debido a que no son biodegradables.

Recientemente, los empaques activos han llamado mucho la atención de la industria de alimentos por su potencial impacto en la prolongación de la vida de anaquel y la calidad del producto.

La demanda de empaques activos, que por definición interactúan con el producto y el ambiente para prolongar la vida de anaquel, hechos de polímeros ambientalmente benignos y agentes activos naturales, está creciendo significativamente debido a que estos sistemas podrían reducir los impactos adversos de los empaques alimentarios sobre el medio ambiente, así como aumentar la seguridad del consumidor (Woranuch *et al.*, 2014).

Estudios anteriores, han demostrado que las biopelículas basadas en biopolímeros funcionales, son una alternativa en la industria alimentaria al empaque tradicional de alimentos con materiales sintéticos. Se han utilizado diversos materiales, todos reconocidos como seguros para consumo humano, siendo los de mayor aplicación los obtenidos de proteína del suero, caseína, proteína de soya y algunas gomas (González *et al.*, 2015).

La piel de pollo es considerada como un desecho industrial, ya que representa el 15% en peso y cuenta, según la base de datos reciente de la USDA, con un 13.33% de proteína. Chávez (2014) ha elaborado

películas procedentes de proteínas de la piel de pollo utilizando una extracción por solubilización a 45, 50 y 55 °C y confirmó su funcionalidad al emplearlas para la formación de películas.

Las películas, además de contar con la característica de barreras para la migración de agua, ácidos grasos, oxígeno y otros compuestos del flavor; pueden ser usadas como vehículos de aditivos funcionales, tales como antioxidantes, agentes antimicrobianos, colorantes y saborizantes; lo cual mejora la funcionalidad del envase (Granda-Restrepo *et al.*, 2014).

La semilla de chía contiene 1909 EAA/100 g, lo cual la hace una buena fuente de antioxidantes, en comparación con otros vegetales evaluados mediante la misma metodología (Ixmucañé *et al.*, 2011), que pueden tener, además de los efectos nutracéuticos, un uso tecnológico como aditivos en alimentos y/o empaques.

3. ANTECEDENTES

3.1 Chía (*Salvia hispanica* L.)

Salvia hispanica L. es una especie de planta de la familia *Labiatae*, de la superdivisión *Spermatophyta*. Esta planta es nativa de México y del norte de Guatemala (Ayerza, 1995).

La semilla tiene una forma ovalada de aproximadamente 1-2 mm y el color varía entre negro, gris y blanquecino (ver Figura 1).

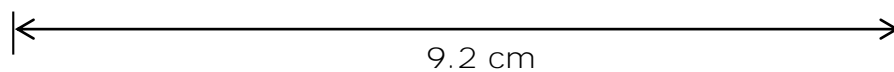


Figura 1. Semillas de chía (*Salvia hispanica* L.)

Generalmente, la planta de chía se comercializa en forma de semillas enteras, harina, mucílago e incluso se extrae el aceite. Las

semillas de la chía son una buena fuente de proteína, aceite, fibra dietética y minerales (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008).

Cabe destacar que la semilla contiene de 25 a 40% de aceite, del cual 60% pertenece a **ácido ω -3 α linolénico** y ácido **ω -6 α linoleico**, ambos ácidos grasos esenciales (Coates y Ayerza, 2009). Dado lo anterior, la chía es una fuente rica en antioxidantes naturales, como los tocoferoles, fitoesteroles, carotenoides (Álvarez-Chavez *et al.*, 2008) y compuestos fenólicos, tales como ácido clorogénico, ácido cafeico, quercetina, miricetina y kaempferol (Capitani *et al.*, 2012).

Un estudio (Mohd Ali *et al.*, 2012) indica que la semilla de la chía está compuesta por 15-25% de proteína, 30-33% de grasa y 18-30% de fibra dietética, 4-5% de cenizas y que contiene una alta cantidad de antioxidantes. Asimismo, según la base de datos de la USDA, se tiene la siguiente composición de semillas de chía (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de semillas de chía.

Componente	g/100 g semillas de chía
Agua	5.80
Proteína	16.54
Lípidos totales	30.74
Carbohidratos	42.12
Fibra dietética total	34.4

Fuente: Base de datos de la USDA. (2015) Basic Report: 12006, Seeds, chia seeds, dried.

Estudios recientes sobre *Salvia hispanica* L. se han enfocado en el estudio de sus fitoquímicos y su extracción. Estos se pueden encontrar en diferentes concentraciones dependiendo del ambiente en donde

crecen, cambios climáticos, disponibilidad de nutrientes o condiciones del suelo.

En México, esta planta es originaria de las áreas montañosas del oeste central. Las formas silvestres se dispersan a través de la Sierra Madre Occidental de Sonora y Chihuahua.

En cuanto al contenido de polifenoles, Reyes Caudillo *et al.*, (2008) han demostrado que las semillas de chía de dos diferentes regiones en México tienen un contenido con valores entre 0.89 y 0.92 mg EAG/g y han evidenciado la presencia de ácido clorogénico, quercetina, miricetina y kaempferol.

Otras técnicas como la electroforesis capilar también se han empleado para la identificación de compuestos fenólicos en semillas de chía. Por ejemplo, González (2010), encontró mediante esta técnica en varias muestras de semilla mexicana desengrasada, la presencia de ácido ferúlico, ácido vainillínico, ácido trans-cinámico, ácido gálico, ácido cafeico, miricetina, quercetina y kaempferol. Mientras que en aceite de chía de las mismas muestras solo detectó, por la misma técnica, ácido trans-cinámico, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico y quercetina.

Por otro lado, Marineli *et al.*, (2014) han encontrado la presencia de ácido clorogénico, quercetina, miricetina y ácido decarboxilmetil elenólico, pero la ausencia de kaempferol en chía chilena procedente de Santiago de Chile.

En la Tabla 2, se muestra la concentración de compuestos antioxidantes presentes en la semilla de chía de los estados de Jalisco y Sinaloa en un estudio realizado por Reyes-Caudillo, Tecante y Valdivia-López en 2008.

Tabla 2. Antioxidantes en extractos de semilla de chía.

Compuesto	Concentración (mol/kg de semilla de chía)
Ácido cafeico	6.6×10^{-3}
Ácido clorogénico	7.1×10^{-3}
Miricetina	3.1×10^{-3}
Quercetina	0.2×10^{-3}
Kaempferol	1.1×10^{-3}
Ácido cafeico	13.5×10^{-3}

3.2 Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación de dicho sustrato (Halliwell, 1990). Basándose en sus mecanismos de acción, los antioxidantes se pueden clasificar en primarios y secundarios.

Los antioxidantes primarios reaccionan con radicales alcoxilo, hidroperoxilo o peroxilo produciendo alcóxidos, hidroperóxidos, peróxidos y radicales de antioxidantes ($A\bullet$) que son más estables y de baja energía, los cuales son significativamente menos reactivos en las reacciones de propagación (McClements y Decker, 2000). De esta forma, actúan donando hidrógenos $H\bullet$ y eliminando radicales de alta energía. Los antioxidantes primarios como el BHA, BHT, TBHQ, tocoferoles y flavonoides, son generalmente mono o polihidroxifenoles.

El factor más importante que determina la capacidad secuestrante de los compuestos fenólicos se relaciona con su capacidad de donar radicales $H\bullet$, lo que depende del número de grupos hidroxilo en posiciones *orto* y *para* y su energía de disociación (Chaiyasit *et al.*, 2007).

Algunos antioxidantes primarios son multifuncionales, ya que tienen más de una de las siguientes funciones antioxidantes: eliminación de radicales libres, secuestrante de oxígeno, quelante de metales y absorción de energía luminosa. Ejemplos de antioxidantes primarios funcionales son el propilgalato, proantocianidinas y ácido ascórbico (Chaiyasit *et al.*, 2007).

Por otro lado, los antioxidantes secundarios o sinergistas, previenen la oxidación y en presencia de los primarios, aumentan la actividad inhibitoria. Esta clase de antioxidantes cumplen función de quelantes de metales (EDTA, ácido cítrico y ácido fítico) y eliminadores de oxígeno. Otros estudios han demostrado que también tienden a reducir el efecto, no completamente explicado hasta ahora, de otros agentes como aminoácidos y fosfolípidos (Choe y Min, 2006).

El mecanismo exacto de acción de los antioxidantes secundarios no se ha entendido con certeza hasta el momento, pero algunas de sus especuladas actividades incluyen la quelación de agentes pro-oxidantes o catalizadores, donando radicales hidrógeno $H\bullet$ a antioxidantes primarios, descomponiendo ROOH en especies no radicales, eliminando oxígeno singulete y absorbiendo luz UV (McClements y Decker, 2000). El sinergismo entre antioxidantes primarios y secundarios disminuye efectivamente la velocidad de reacción de oxidación.

Existen antioxidantes naturales contenidos en los alimentos y también sintéticos, elaborados por la industria y adicionados intencionalmente a los alimentos. En particular, los antioxidantes naturales que pueden ser hidrosolubles y liposolubles, pueden funcionar como compuestos reductores, interrumpen la cadena de formación de radicales libres, inhiben o impiden la formación de oxígeno triplete o singulete e inactivan los metales pro-oxidantes. Los radicales libres se forman en el organismo mediante la respiración aeróbica y existen en diferentes formas como: anión superóxido, hidroxilos, peróxidos, y

alcoxilos. Son dañinos ya que pueden reaccionar con componentes celulares importantes como el ADN o las membranas (Shi, 2001).

En los últimos años, se ha incrementado un interés por el uso de antioxidantes de origen natural y son muchos los vegetales que han sido sometidos a investigación científica para extraer antioxidantes naturales. Los extractos de salvia, especias, hierbas, cereales, cortezas y raíces son fuentes de compuestos naturales con actividad antioxidante. Dichos compuestos son tocoferoles, fosfolípidos, aminoácidos, péptidos y compuestos fenólicos (Matthäus, 2002).

Los aceites vegetales son protegidos por agentes antioxidantes polifenólicos de origen endógeno. Dichos antioxidantes están de forma natural en las plantas y ejercen principalmente un efecto protector de los ácidos grasos poliinsaturados, los cuales están en mayor concentración. Su función se debe a que son capaces de secuestrar radicales libres o reducen parte de los hidroperóxidos formados.

Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes primarios y estos compuestos se dividen en dos grupos: flavonoides y no flavonoides (Cedillo, 2006).

3.3 Compuestos fenólicos

En plantas, se han identificado muchos polifenoles, que son metabolitos secundarios que se clasifican de acuerdo al número de anillos aromáticos y a sus enlaces (ver Figura 2).

Los compuestos fenólicos o polifenoles, son las sustancias que poseen un anillo aromático, unidos a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales (ésteres, glucósidos, etcétera) (Macheix *et al.* 1990)

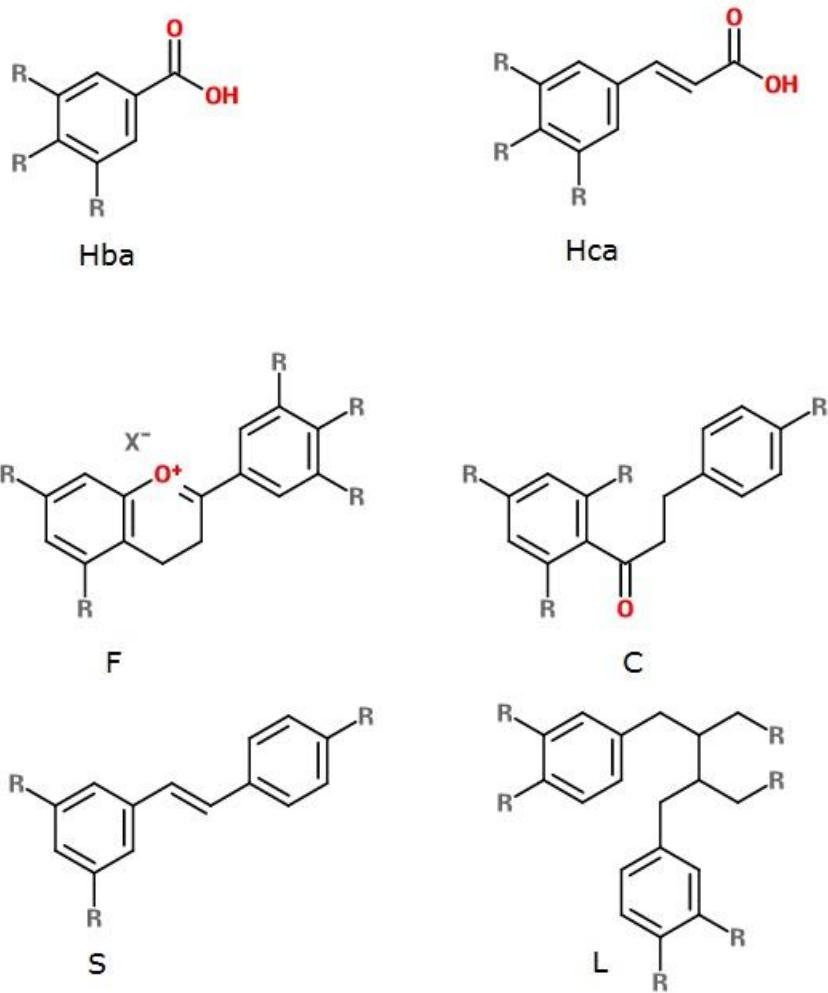


Figura 2. Estructuras químicas de polifenoles: ácidos hidroxibenzoicos (Hba), ácidos hidroxicinámicos (Hca), flavonoides (F), chalconas (C), estilbenos (S) y lignanos (L). Tomada de Belitz et al, (2009).

Los flavonoides presentan muchas variaciones y con base en su estructura se pueden clasificar en 6 subclases (ver Figura 3). Asimismo, los polifenoles generalmente se encuentran como glucósidos y algunos como ésteres; tienen actividad antioxidante que depende directamente del número y posición de grupos hidroxilo (-OH) y del pH.

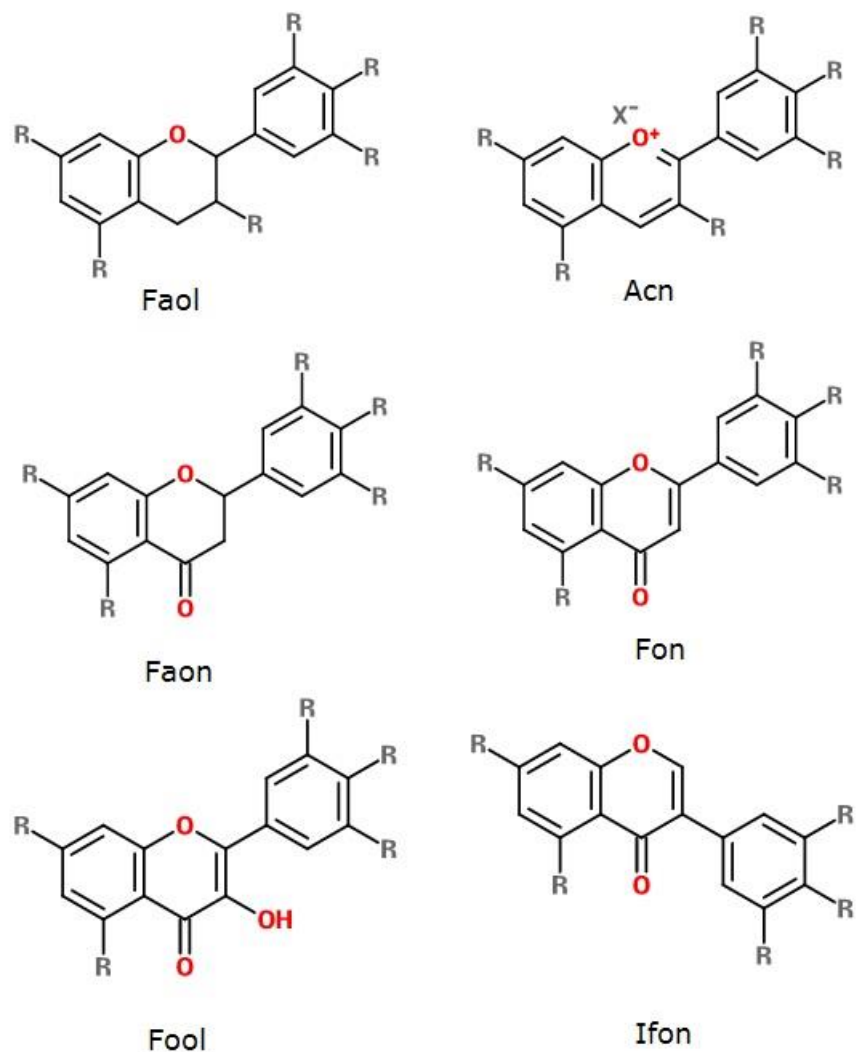


Figura 3. Estructura química de flavonoides: Flavanoles (Faol), antocianinas (Acn), flavanonas (Faon), flavonas (Fon), flavonoles (Fool) e isoflavonas (Ifon). $R=H, OH, OCH_3$. Tomada de Belitz et al., (2009).

Los polifenoles se consideran importantes en los alimentos y en la misma alimentación. Estos compuestos son el ácido gálico, sináptico, ferúlico, cafeico, *p*-cumárico, y sus derivados, así como los flavonoides y sus glucósidos. Las antocianinas y flavonoles son pigmentos importantes en una gran variedad de frutas y verduras. Mientras que la mayoría de los polifenoles no son pigmentos, son de igual manera

importantes, ya que son responsables de la pérdida de color, principalmente el oscurecimiento, que se desarrolla durante el almacenamiento y procesamiento de frutas y verduras, formando parte de las reacciones de oscurecimiento enzimático y no enzimático (Fennema *et al.*, 2007).

3.4 Empaques de Alimentos

Los empaques son estructuras de diversos materiales que, primordialmente, actúan como barreras que delimitan, contienen y promueven la conservación de los alimentos.

La tecnología de empaques tiene importancia estratégica en las empresas de alimentos dado que provee ventajas competitivas. Lo anterior puede lograrse debido a que puede abrir nuevos canales de distribución, mejora la calidad de la presentación, permite bajar costos, contribuye a la diferenciación de productos y mejora la logística; todo ello ajustado a los requerimientos técnicos para lograr la inocuidad e integridad del alimento.

La industria de empaques de alimentos tiene una demanda que ha ido cambiando continuamente debido al desarrollo del mercado internacional, adaptación al consumidor, distribución y requerimientos tecnológicos y legales (Coles *et al.*, 2003).

Actualmente, existe una tendencia a reducir la cantidad de empaques que se utilizan, disponer de estos para posteriormente reutilizarlos o fabricar empaques biodegradables.

3.4.1 Empaques plásticos

Con base en la definición de la Unión Europea, (2001/62/EC, apartado 1 del artículo 1), los empaques plásticos utilizados para el empacado de alimentos están constituidos por materiales poliméricos obtenidos de la polimerización, policondensación y poliadición de moléculas de bajo peso

molecular o por la alteración de compuestos macromoleculares naturales.

Los primeros plásticos fueron derivados de materiales naturales y posteriormente, desde principios del siglo XX, de derivados del petróleo.

En Europa, el 39.6% de la producción de plástico está destinada a la industria de empaques (APME Association of Plastic Manufacturers in Europe, 2015) y el 50% de los plásticos se utilizan para la producción de envases alimentarios (British Plastics Federation).

Los plásticos son utilizados en el empaque de alimentos debido a que proporcionan una gran gama de propiedades derivadas de las características inherentes de cada tipo de plástico. El vapor de agua, los disolventes orgánicos y gases como el oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno, pueden permear a través de los plásticos y la velocidad en la que esto ocurre depende de varios factores, tales como el tipo de plástico, grosor, superficie, método de procesamiento, presión parcial de las moléculas que permean y temperatura de almacenamiento.

Los plásticos pueden ser coloreados, impresos, decorados o etiquetados en muchas formas, dependiendo del tipo de empaque en cuestión. Asimismo, diversos plásticos son translúcidos, o pueden tener diversos grados de transparencia y su superficie puede ser brillante o mate (Coles *et al.*, 2003).

Son usadas para envolver directamente al alimento o para funcionar como envoltura de varios paquetes, forman sacos y son combinadas con otros plásticos u otros materiales en láminas.

La transparencia de los plásticos depende del polímero que lo constituya, así como la forma en que ha sido producido. Si el enfriamiento se lleva a cabo lentamente, se pueden formar grandes cristales, los cuales provocan una apariencia opaca debido a la difracción y dispersión de la luz incidente.

La vida de anaquel de los alimentos puede ser prolongada usando materiales de empaques que controlen o minimicen la permeabilidad a ciertos gases hacia la atmósfera interna. La tecnología de punta de los empaques comprende 3 clasificaciones: de alta barrera, de atmósfera modificada y barrera activa (Vermeiren *et al.*, 1999).

3.4.2 *Empaques activos*

Los empaques activos son un concepto innovador en el que el empaque, el producto y el ambiente interactúan para prolongar la vida de anaquel o asegurar la inocuidad o las propiedades sensoriales del alimento (Suppakul *et al.*, 2014).

La tecnología de empaques con antioxidantes es una de las nuevas técnicas de empaques activos, que se pueden definir como una interacción entre el empaque, el alimento y el ambiente que limita o previene la oxidación lipídica por medio de la donación de electrones (e^-) y protones (H^+) ya sea al oxígeno o a otros radicales libres (Phoopuritham *et al.*, 2012).

La adición de dichos antioxidantes consiste ya sea; en incorporarlos en el material del empaque (Suppakul *et al.*, 2003), o en el recubrimiento de los mismos (Pereira de Abreu *et al.*, 2011). Por consiguiente, los alimentos empacados quedan efectivamente protegidos y la rancidez oxidativa se retarda (Tian-Tian Han *et al.*, 2014).

3.4.3 *Biopelículas*

Las películas y los recubrimientos comestibles han sido considerados para la conservación de alimentos debido a que pueden mejorar su calidad global (Franssen *et al.*, 2003).

Los usos de las biopelículas engloban cubrir superficies alimentarias, separar zonas e ingredientes incompatibles, formar una barrera contra gases y aromas (González *et al.*, 2015).

Los biopolímeros degradables que se han desarrollado para el empaque de alimentos, están compuestos generalmente de polisacáridos y proteínas (González *et al.*, 2015). Los más estudiados han sido la goma gelana, almidón, celulosa modificada, quitosano, proteínas como las del suero de la leche, caseínas, de soya y colágeno (Hua Xang *et al.*, 2014). En el proceso de formación de las películas, además de los polímeros anteriores, es necesaria la adición de plastificantes para aumentar la flexibilidad y elasticidad. Los plastificantes, suelen ser polioles, azúcares o almidones, debido a su compatibilidad con las proteínas (Hernández-Izquierdo *et al.*, 2008), los más comunes son el glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa y polietilenglicol.

Las interacciones proteínicas que se desarrollan durante la formación de biopelículas consisten en puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes disulfuro.

Al añadir plastificantes hidrofílicos de bajo peso molecular, estos compiten por los puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas de las cadenas polipeptídicas. Lo anterior produce una disminución de las interacciones proteína-proteína, abatiendo de la temperatura de transición vítrea de las proteínas y mejora flexibilidad de las películas.

Cabe destacarse que la humedad relativa también contribuye a las propiedades de la película, debido a la adición de plastificantes hidrofílicos.

Las películas cumplen con la función de prolongar la vida de anaquel de los alimentos porque son barreras que controlan la transferencia de masa y sirven como protección mecánica. La

transferencia de masa involucra la migración de agua, de gases, ingredientes y aditivos en el mismo sistema (Chávez, 2014).

Las propiedades finales de las biopelículas dependen de factores extrínsecos, tales como, condiciones ambientales, temperatura y humedad relativa; pero también de factores intrínsecos como la formulación, proceso de fabricación y aditivos agregados.

Las películas activas pueden acarrear diversos agentes funcionales, tales como los antioxidantes y agentes antimicrobianos para mejorar la seguridad y estabilidad de los alimentos (Lin y Zhao, 2007).

3.5 Piel de pollo

El pollo (*Gallus gallus domesticus*) es un ave doméstica perteneciente a la familia de los *Phasianidae*, del orden de los *Galliformes*. El pollo doméstico es el ave más abundante de la Tierra, con una población superior a 8 billones (Likoff, 2007). La piel constituye aproximadamente un 15% en peso y su composición es la siguiente (ver Tabla 3).

Tabla 3. Composición de la piel de pollo

Componente	g/100g de piel
Humedad	54.22%
Proteína	13.33%
Grasas totales	32.35%

Fuente: USDA (2015). Basic report 05015. Raw skin from chicken, broilers or fryers.

Los pollos de engorda que generalmente se emplean para la producción de carne en México pertenecen a las líneas Ross, Hybro, Cobb, Hubbard, Avian Shaver, Leghorn White, Petterson y Arbor Acres (Hernández, 2001). Actualmente, son seleccionadas con base en su

musculatura, especialmente los músculos del pecho, que son mucho más pesados que los de los ancestros.

Un creciente consumo de pollo en variadas presentaciones, ha dejado una alta sobreproducción de subproductos tales como las vísceras y la piel. Una cantidad de piel de pollo es frecuentemente utilizada para producir alimento para animales y otra pequeña proporción para emulsiones cárnicas (Cliché *et al.*, 2003). La piel de pollo contiene aproximadamente 3% de colágeno, del cual 75% corresponde a colágeno tipo I y 15% a colágeno tipo III (Abedin y Riemchneider, 1984).

3.6 Proteína de Colágeno

El colágeno constituye la principal fracción de tejido conjuntivo, tiene alto contenido en glicina y prolina, y cabe destacar que la presencia de 4-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina es característica. Contiene glucosa y galactosa unidas a los residuos de hidroxilisina mediante enlaces o-glucosídicos (Belitz *et al.*, 2009).

Por otro lado, en mamíferos, el colágeno carece casi completamente de triptófano, la glicina constituye un 30% y la hidroxiprolina constituye un 10% aproximadamente de los residuos que lo componen.

Dado que la hidroxiprolina está en pocas cantidades en otras proteínas y en cantidades significativas en el colágeno, generalmente se utiliza para determinar la cantidad de colágeno en alimentos.

Asimismo, el colágeno consiste en 3 cadenas polipeptídicas, las cuales pueden ser idénticas o diferentes, dependiendo del tipo de colágeno que se trate. Las 3 cadenas polipeptídicas poseen generalmente una estructura helicoidal, que a su vez se unen mediante puentes de hidrógeno de extremo a extremo para formar una superhélice; la estructura básica de las unidades de fibra de colágeno se

denomina tropocolágeno, con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa (ver Figura 4).

La prolina estabiliza la estructura helicoidal impidiendo la rotación del enlace N-C. También la hidroxiprolina parece estabilizar la molécula de colágeno, dado lo anterior, se establece que la estabilidad térmica de aquellos tipos de colágeno con bajo contenido de estos iminoácidos es baja con respecto a los que contienen altas cantidades de estos.

También la presencia y cantidad de proteoglicanos y glicoproteínas contribuyen a la estabilidad térmica (Fennema *et al.*, 2007).

El colágeno tipo I, está formado por 2 cadenas polipeptídicas idénticas $\alpha 1$ (I) y una tercera cadena distinta $\alpha 2$.

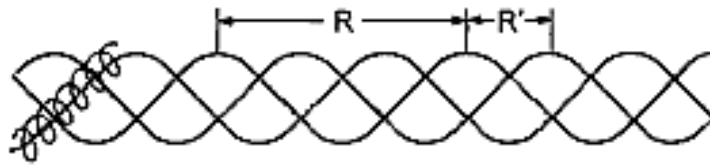


Figura 4. Representación esquemática de la conformación del tropocolágeno. (**Período $R=8.7$ nm, pseudo período $R'=2.9$ nm**). Tomada de Belitz *et al.*, (2009).

A su vez, el tropocolágeno se organiza de una forma específica para formar las fibras de colágeno (ver Figura 5).

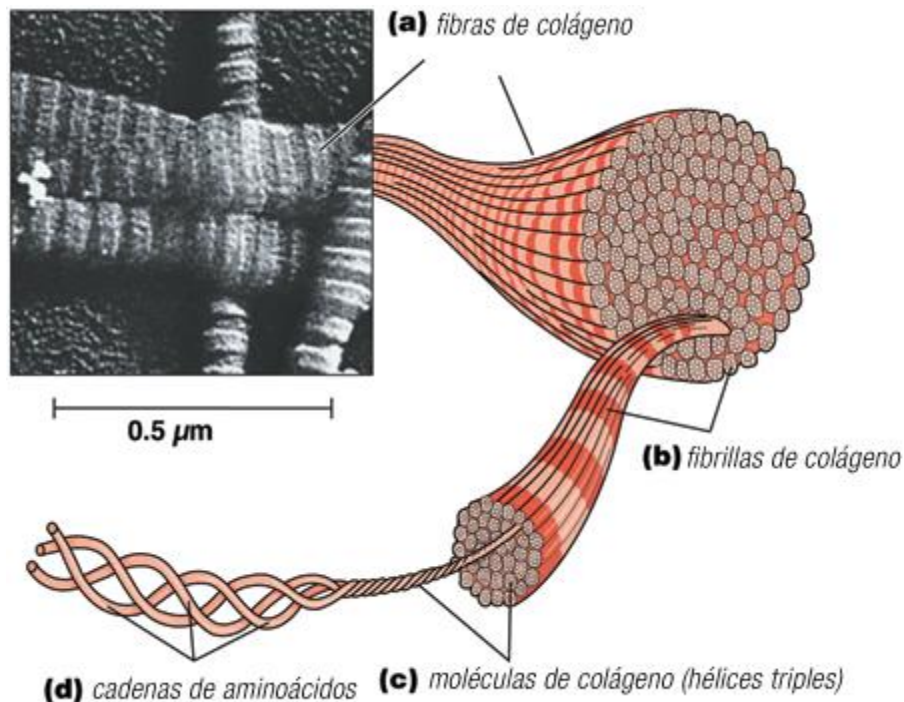


Figura 5. Organización microestructural del colágeno. Tomada de Scitec Nutrition®, (2016).

Cuando la estructura nativa es calentada, la superhélice de 3 hebras es destruida, resultando cadenas peptídicas solubles en agua, lo que es llamado gelatina.

Dependiendo de la concentración de la solución de gelatina y del gradiente de temperaturas, se puede alcanzar una transición a una estructura organizada durante el enfriamiento. Por lo que a bajas concentraciones, hay mayor interacción intramolecular entre hebras solas y a altas concentraciones y enfriamiento lento, los péptidos se organizan de tal forma que se asemeja a la estructura nativa.

Asimismo, a concentraciones aún más altas y enfriamiento rápido, los segmentos helicoidales se alternan azarosamente con porciones de bucles de las hebras.

La extracción del colágeno insoluble, normalmente consiste en calentar el colágeno en agua a temperaturas arriba de 45 °C, con lo cual

se rompen los enlaces covalentes y puentes de hidrógeno, para desestabilizar la triple hélice (Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

3.7 Lípidos. Rancidez oxidativa

Los triglicéridos son los componentes lípidos mayoritarios presentes en las matrices de alimentos. Los ácidos grasos insaturados presentes en los triglicéridos juegan un papel importante como nutrimentos en los alimentos, y contribuyen en las propiedades sensoriales tales como la textura y el sabor (Shahidi *et al.*, 2010).

Se sabe que la oxidación lipídica ocurre en 3 fases principales: iniciación, propagación y terminación (Kamal-Eldin *et al.*, 2003). La **teoría desarrollada en 1940's sobre la autocatálisis de la oxidación de lípidos** que produce hidroperóxidos ROOH ha sido ampliamente aceptada porque hace una descripción lógica de las reacciones que ocurren en este proceso (Choe y Min, 2006).

La rancidez oxidativa de los lípidos es la principal razón de los malos sabores y el metamorfismo que disminuyen tanto la calidad sensorial y nutrimental en los alimentos (Phoopuritham *et al.*, 2012).

Se puede llevar a cabo por foto-oxidación, que es el conjunto de reacciones en las que participa el oxígeno singulete [$^1\text{O}_2$]; este es generado a partir de la interacción con un fotosensibilizador, que puede ser luz UV o pigmentos. El oxígeno singulete es una molécula muy electrofílica, por lo que ataca directamente a los enlaces dobles de los ácidos grasos.

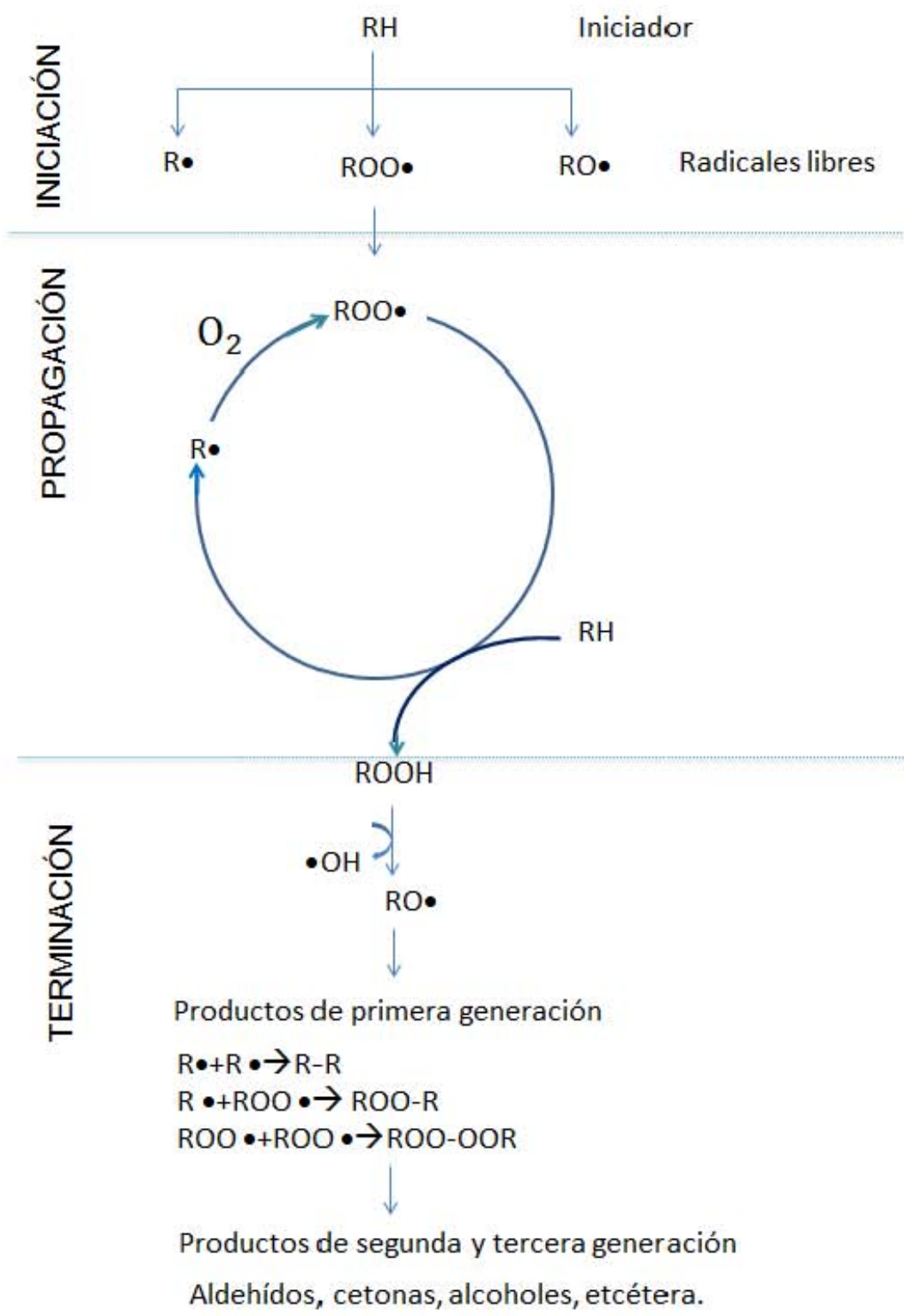
Asimismo, la rancidez oxidativa puede llevarse a cabo por medio del proceso de auto-oxidación, en el cual participa el oxígeno triplete [$^3\text{O}_2$]; este requiere un radical de iniciación debido a que no es muy electrofílico.

La velocidad con la que ocurren la auto-oxidación depende de factores intrínsecos como la composición de ácidos grasos; es mayor en los ácidos insaturados, y de factores extrínsecos como la concentración y actividad de agentes pro y antioxidantes, la presión parcial de O₂ y las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad, luz).

El mecanismo de la reacción lipídica desarrollado por Farmer *et al.*, (1943) involucra la participación de radicales libres, el Esquema 1 muestra el mecanismo simplificado en 3 etapas.

La oxidación lipídica es uno de los principales factores determinantes en la disminución de la calidad de los alimentos y limita su vida de anaquel. Por lo tanto, existe un gran interés por parte de los productores alimentarios para retrasar el proceso de deterioro lipídico (Tian-tian *et al.*, 2014).

La rancidez oxidativa de los alimentos, se puede retardar por medio de la adición de antioxidantes. Por ejemplo, adicionando sesamol y tocoferoles en aceite vegetal (Yoshida y Takagi, 1999), o bien, se puede retardar usando un empaque activo. La adición de antioxidantes a los empaques representa una tecnología emergente (Colin-Chavez *et al.*, 2013).



Esquema 1. Fases principales de la oxidación lipídica.

3. OBJETIVOS

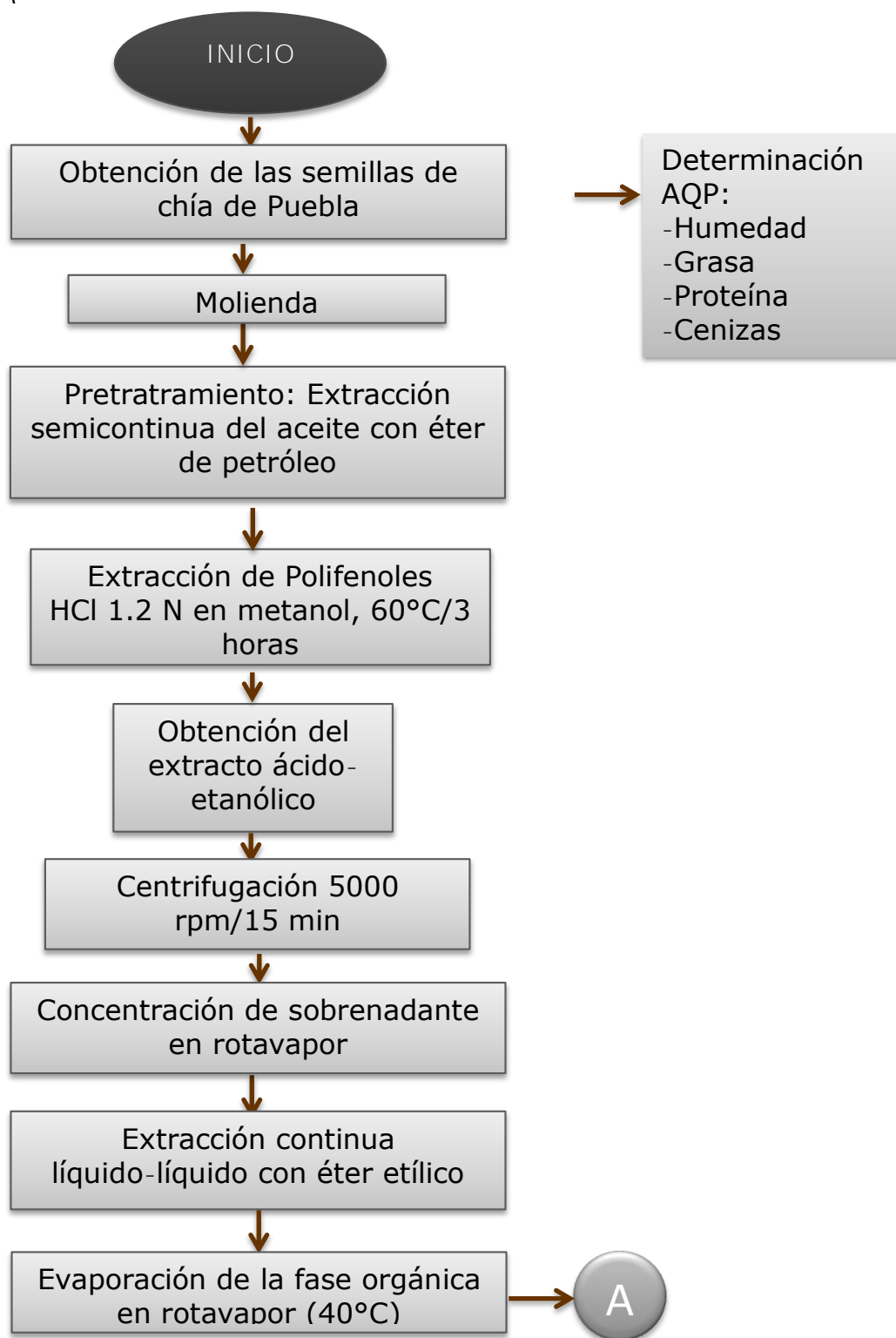
3.1 Objetivo general

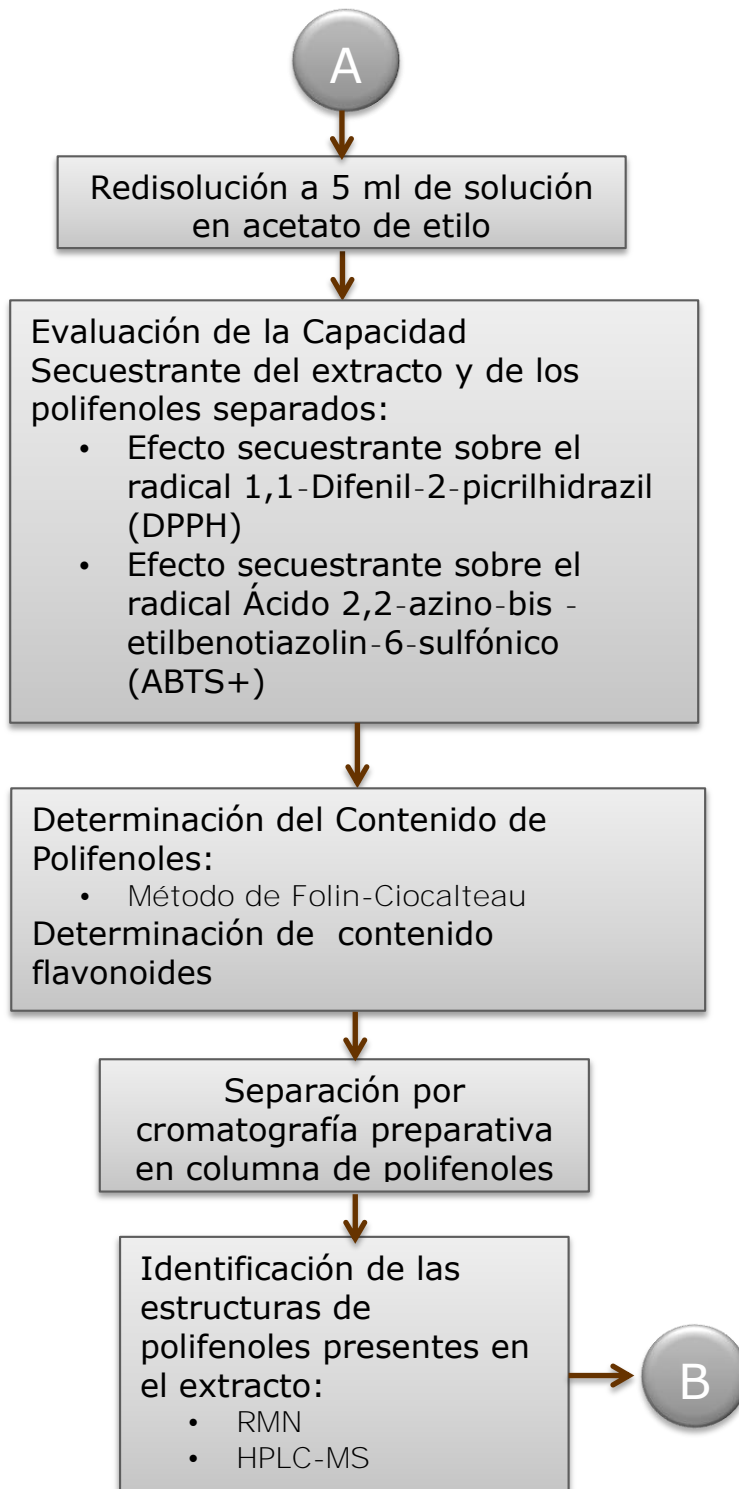
Desarrollar un empaque activo multifuncional proteínico de piel de pollo con unión química de ácido cafeico obtenido a partir de la semilla de chía y adición de nisina para la protección de alimentos frente a la oxidación lipídica y crecimiento microbiano, respectivamente.

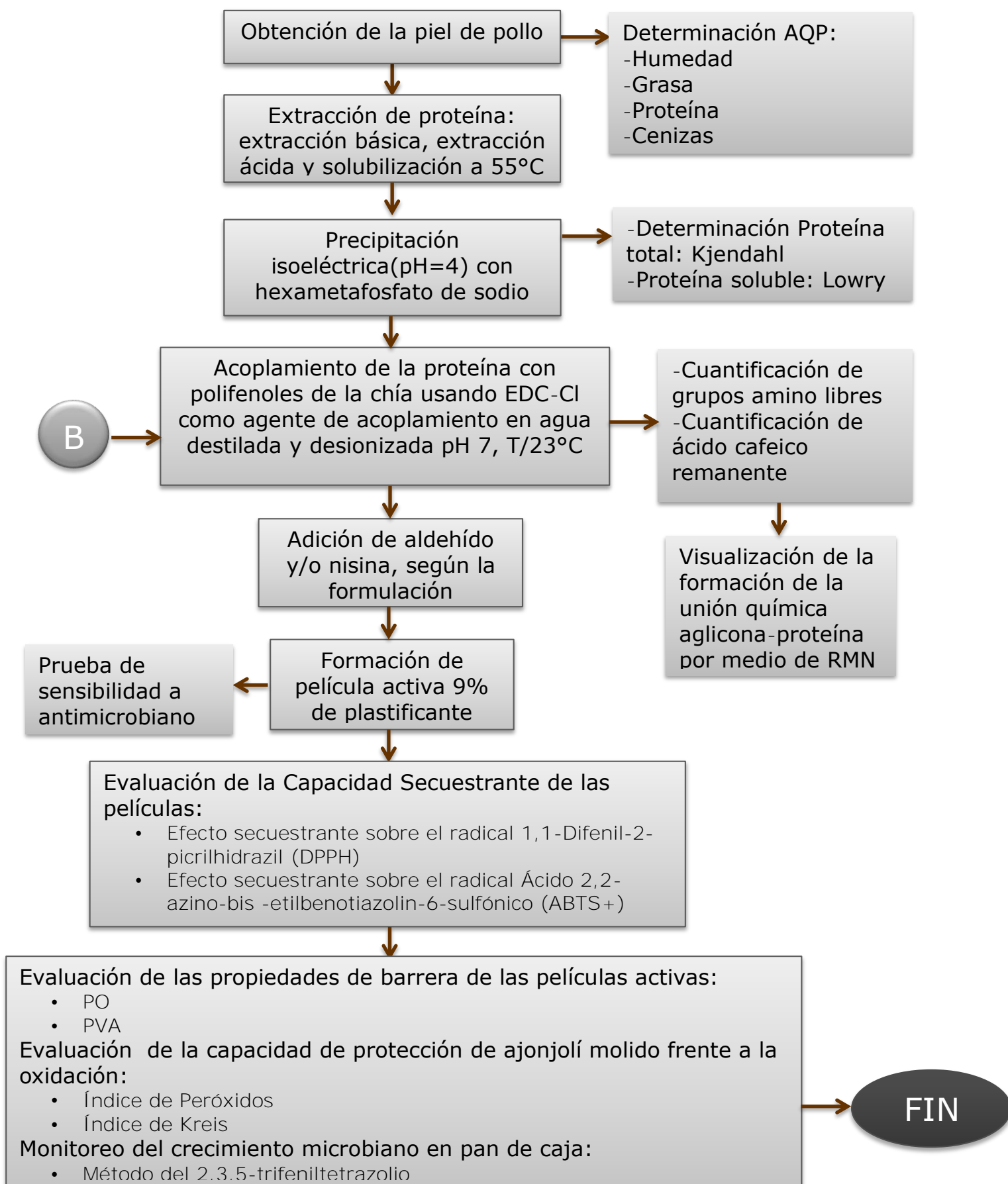
3.2 Objetivos particulares

- Separar los compuestos fenólicos del extracto ácido etanólico de semillas de chía mediante cromatografía en columna preparativa e identificarlos utilizando la técnica de RMN¹H, RMN¹³C y HPLC-MS.
- Establecer condiciones de reacción para realizar la unión química de ácido cafeico a la proteína extraída de la piel de pollo.
- Evaluar las propiedades de barrera de las películas activas para comparar la permeabilidad a oxígeno y vapor de agua con respecto a las películas comerciales.
- Determinar el factor de protección de las películas activas en matrices alimentarias para evaluar si promueven la prolongación de la vida útil.

4. METODOLOGÍA







4.1 MÉTODOS

4.1.1 *Extracción e identificación de compuestos fenólicos de la semilla de chía*

Las muestras de granos de chía se obtuvieron en la central de abastos del Estado de México y se congelaron a -18 °C. Posteriormente fue finamente molida en un molino IKA WERKE MF 10, primero a 6000 y posteriormente a 6500 rpm. 1 kg de polvo de chía seca se desengrasó mediante el método Soxhlet con 5 L de hexano (PE. 35-60 °C) durante 36 horas. Una vez molida y desengrasada, 50 g de la harina de chía se mezclaron con 500 mL de solución etanólica de HCl 1.2 M. Dicha mezcla se dejó en agitación constante en un sistema a reflujo a 60 °C durante 3 horas. Con este paso, se aseguró la hidrólisis de enlaces glucosídicos, para posteriormente obtener las agliconas. La mezcla se diluyó con 250 mL de etanol y se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos.

El sobrenadante obtenido se concentró en un evaporador rotatorio (Büchi Rotavapor R-205) a 40 °C hasta obtener una mezcla color café oscura. Se realizó una extracción continua líquido-líquido de la mezcla utilizando 100 mL de éter etílico hasta que el disolvente presentara poco o nulo color. Luego, la fase orgánica se evaporó en un evaporador rotatorio, en un baño a 40 °C y el residuo se redisolvió en un volumen mínimo (5 mL) en acetato de etilo.

4.1.1.1 *Determinación de polifenoles totales*

El contenido de polifenoles se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu, con una curva patrón de ácido gálico monohidratado en una concentración de 20 a 500 µg/mL; se midió la absorbancia de las disoluciones a 750 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 3B y se obtuvieron los resultados como miligramos Equivalentes de Ácido Gálico por gramo de muestra (mg EAG/ g de muestra).

Posteriormente, se midió el contenido de polifenoles del extracto utilizando la ecuación obtenida con el estándar.

4.1.1.2 Determinación de flavonoides

La concentración de flavonoides en los extractos, se determinó utilizando un método espectrofotométrico (Quettier *et al.*, 2000), usando rutina como compuesto de referencia. Las soluciones estándar de rutina fueron preparadas y posteriormente se añadió 1 mL de la solución estándar, 1 mL de la solución metanólica de AlCl₃ al 2% y se diluyó a 25 mL; después se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, para finalmente medir la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 3B. Por otro lado, para la muestra, se añadió 1 mL del extracto diluido en metanol a 1 mg/mL, se añadió 1 mL de la disolución de cloruro de aluminio y se diluyó a 25 mL con etanol.

Con base en la curva de calibración, se obtuvo el contenido de flavonoides en el extracto de polifenoles de la chía, expresado en mg Equivalentes de Rutina por gramo de extracto (mg ER/g extracto).

4.1.1.3 Separación de polifenoles mediante cromatografía en columna

Se realizó cromatografía preparativa en columna con base en la metodología descrita por Leonard *et al.* (1998), utilizando gradientes de acetato de etilo-hexano (2:1 y 1:1) y metanol-diclorometano (1:9) como eluyentes y sílica gel 0.04-0.063 mm (malla 230-400 ASTM) marca Macherey Nagel como adsorbente.

4.1.1.4 Determinación estructural de polifenoles mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Se realizó el análisis de las fracciones obtenidas mediante la cromatografía preparativa en columna, en las cuales se evidenciara la presencia de compuestos puros. Se obtuvieron los espectros de RMN ^1H en los equipos Varian Unity Inova (300 MHz) y Agilent MR (400 MHz).

Para ello, se disolvieron las fracciones en disolventes deuterados (CD_3OD) a 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C , utilizando TMS como referencia interna, y se colocó en un tubo de vidrio delgado entre los polos del imán. Los datos obtenidos fueron procesados con el software MestReNova versión 8.1.

Los **desplazamientos químicos (δ)** y **las constantes de acoplamiento (J)** fueron determinados asumiendo un comportamiento de primer orden. La multiplicidad de las señales es indicada como: s (simple), d (doble), t (triple), c (cuarteto), q (quinteto), m (múltiple).

Las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hz. Las señales en RMN ^1H fueron asignadas con base en el desplazamiento químico, multiplicidad y consistencia con una serie de estructuras similares. Las señales en RMN ^{13}C fueron asignadas con base en el desplazamiento químico y consistencia con una serie de estructuras similares.

4.1.1.5 Cuantificación y determinación de las masas moleculares de los polifenoles obtenidos mediante un sistema acoplado HPLC-MS

Se cuantificaron los polifenoles obtenidos mediante la separación del extracto de polifenoles de la chía en un cromatógrafo Agilent 1200, y a su vez, se determinó su peso molecular mediante el sistema acoplado con un espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000.

El sistema de HPLC Agilent 1200 consistía en una bomba desgasificadora, una bomba binaria, un inyector y un detector Waters UV 2487. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna **Kinetex C8 (50x2.1 mm, 2.6 μ m, 100 Å)**. El volumen de inyección fue de 10 μ L.

La fase móvil consistió en metanol (solvente A) y ácido fórmico 0.1% en agua (solvente B). Las condiciones de gradiente fueron las siguientes: 0-5 min 5% A y 5-35 min 100% A, con tiempo total de 35 minutos y flujo de 0.3 mL/min. La longitud de onda a la cual se monitorearon los polifenoles fue a 254 nm.

Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker Esquire 6000. La ionización por electroasperción APCI, con nebulización a 50 psi, con una temperatura de secado y vaporización de 350 y 400 °C, respectivamente; un analizador de masas (cuadrupolo trampa de iones) y un detector que con una resolución de 100-1200 m/z.

4.1.2 Formación de las biopelículas activas

4.1.2.1 Separación de la piel de pollo

La piel fresca de pollo se obtuvo de una tienda local del Estado de México y transportada el mismo día al laboratorio. Una vez llegada al laboratorio, la grasa visible de la piel se removió mecánicamente. Posteriormente la piel limpia se lavó, se pesó y se cortó con tijeras en trozos de 2-3 cm².

Posteriormente, la piel de pollo se almacenó a -18 °C.

4.1.2.2 *Análisis químico proximal de la piel de pollo y del extracto de proteína obtenido a partir de la misma*

Previamente a la extracción de proteína, se analizó la piel de pollo en su composición mediante las siguientes metodologías.

Tabla 4. Metodologías realizadas por triplicado para cada lote empleado para el análisis químico proximal de la piel de pollo y pellet obtenido en la extracción de proteína.

Componente	Método
Determinación de humedad	Método gravimétrico: estufa al vacío (AOAC 950.46)
Determinación de grasa	Extracción semicontinua de Soxhlet (AOAC 960.39)
Determinación de proteína	Método de Kjendahl (AOAC 955.04)
Determinación de cenizas.	Calcinación (AOAC 920.153)

4.1.2.3 *Extracción de la proteína de la piel de pollo*

Para extraer el colágeno, 1.5-2.0 kg de piel sin grasa se mezcló con una disolución de NaOH 0.2 N con agitación constante en una tina de acero inoxidable y con un motor eléctrico Marca Lightnin Modelo L1U03 a 500 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente (~23 °C). Posteriormente, la solución alcalina se cambió y se agitó en las mismas condiciones durante otras 2 horas, con la finalidad de remover proteínas solubles, grasa y pigmentos.

La piel tratada con disolución básica se enjuagó con abundante agua hasta alcanzar la neutralidad; después se realizó una segunda

extracción agregando ácido acético 0.05 N, durante 4 h, a 500 rpm y a temperatura ambiente. Se extrajo la proteína mediante una extracción a 55 °C y se recuperó el sobrenadante y se desecharon los sólidos. A la solución restante se le dejó reposar en refrigeración. Posteriormente, a la fase acuosa remanente se le adicionó una solución de hexametáfosfato de sodio al 10% en una proporción 2:100 mL. Se precipitó la proteína ayudando mecánicamente con presión sobre el mismo precipitado.

Para caracterizar al extracto proteico, se le determinó humedad en estufa al vacío (70 °C, 24 h), proteína total por método de Kjendahl y proteína soluble por el método de Lowry (Nielsen *et al.*, 1951).

4.1.2.4 Acoplamiento del ácido cafeico a la proteína

La reacción de acoplamiento está basada en la reacción del uso de una carbodiimida soluble en agua, para ello se agregó clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC·HCl) como agente de acoplamiento y ácido cafeico en medio acuoso.

4.1.2.5 Cuantificación de grupo amino primario

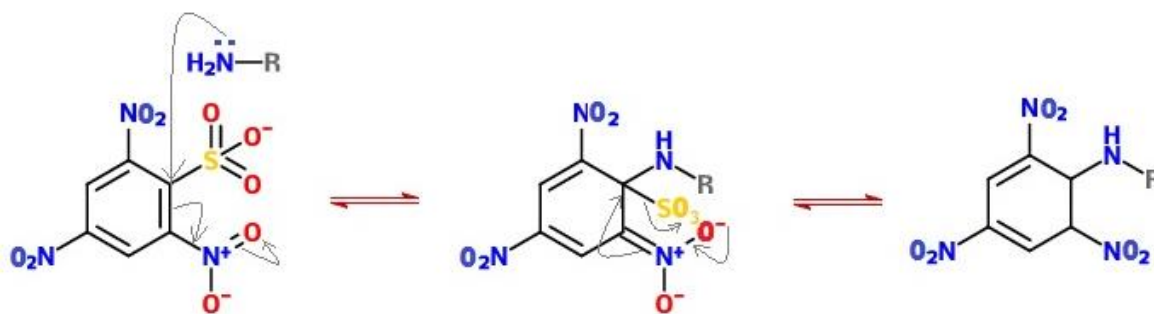
La cantidad de grupos amino de la proteína extraída de la piel de pollo fue determinada por el método de Krasaechol *et al.* (2008). Para ello se **tomaron 20 µL** de la solución de proteína soluble acoplada con ácido cafeico y se **adicionaron 980 µL** de solución buffer de tetraborato de sodio 0.1 M pH=9.3 y se homogeneizaron. Posteriormente, se **adicionaron 20 µL** de una solución de ácido trinitrobencensulfónico 0.03 M, se agitó la mezcla y se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25. La

concentración de grupo amino se obtuvo mediante el coeficiente de extinción molar reportado por Krasaechol *et al.*, (2008).

$$\text{NH}_2 \left(\frac{\text{mol}}{\text{g proteína}} \right) = \frac{\text{Abs}^{420\text{nm}} \times 0.001020(\text{L})}{20300 \left(\frac{\text{L}}{\text{mol}} \times \text{cm} \right) \times 1 \text{ cm} \times \text{masa proteína (g)}}$$

Para el blanco, se tomaron 20 μL de una solución de proteína soluble no sometida a la reacción de acoplamiento, siguiendo el mismo procedimiento mencionado.

Se asume que existe una relación lineal entre la intensidad de color y la concentración de grupos α -amino, ya que la reacción que se lleva a cabo en este método (ver Esquema 2), produce un compuesto cromóforo debido a la deslocalización electrónica.



Esquema 2. Reacción de TNBS con grupo amino.

4.1.2.6 Formulación de las biopelículas

Después de llevar a cabo la unión química de los antioxidantes, el pH se ajustó a 10.5 utilizando una solución de NaOH 1 N y se disolvió con agitación constante hasta que la concentración de proteína quedara al 5% (m/v) en base seca. Posteriormente, se añadió plastificante al 9% de concentrado proteico. Dicho plastificante consistía en una mezcla de sorbitol-glicerol 1:1. La mezcla se vació en recipientes de 15 cm de diámetro con teflón en cantidades de 60 mL, dejándose reposar por 3 días para completar la plastificación y secado. Asimismo, se elaboraron

otras películas con antimicrobiano y aldehído, con la finalidad de hacer una biopelícula multifuncional; es decir, que además de poseer capacidad antioxidante; tuviera la capacidad de retardar el crecimiento microbiano y disminuyera la permeabilidad al vapor de agua. En la siguiente tabla se muestran las formulaciones de las películas preparadas.

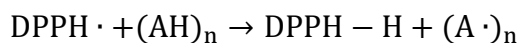
Tabla 5. Formulación de películas.

Película	Formulación
Blanco (B)	Proteína 5% Plastificante 9%
Con ácido cafeico (WCA)	Proteína 5% Plastificante 9% Ácido cafeico 200 ppm
Con ácido cafeico y nisina (WCAN)	Proteína 5% Plastificante 9% Ácido cafeico 200 ppm Nisina 200 ppm
Con hexanal (WH)	Proteína 5% Plastificante 9% Hexanal 500 ppm
Con hexanal y ácido cafeico (WHCA)	Proteína 5% Plastificante 9% Hexanal 500 ppm Ácido cafeico 200 ppm
Con hexanal, ácido cafeico y nisina (WHCAN)	Proteína 5% Plastificante 9% Hexanal 500 ppm Ácido cafeico 200 ppm Nisina 200 ppm

4.1.2.7 *Determinación de la capacidad antioxidante de las películas adicionadas con ácido cafeico mediante el método del radical DPPH 2,2-difenil picrilhidracilo*

Se evaluó la actividad antioxidante mediante el uso del radical DPPH•, en una solución metanólica de la película adicionada con ácido cafeico.

En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando reacciona con un antioxidante, dicha absorción desaparece. La desaparición del radical se explica con el siguiente modelo.



Se preparó una solución de 2,2-difenil picrilhidracilo 0.1 mM en metanol, una solución patrón de ácido cafeico 1 mM y soluciones de las películas con ácido cafeico ajustadas a 1 mM. Posteriormente, se realizó la medición de la absorbancia a 515 nm tanto de blanco de reactivo como de blanco de muestra, de la solución patrón y de las películas durante 10 minutos, observándose un decremento en la absorbancia.

4.1.2.8 *Determinación de la capacidad antioxidante de las películas adicionadas con ácido cafeico mediante el método del radical ABTS•+*

La actividad antioxidante se determinó usando el radical ABTS•+, para lo cual, se generó el cromóforo azul/verde ABTS•+ a través de la reacción entre el ABTS y persulfato de amonio. Para ello, el ABTS se disolvió en agua desionizada a una concentración 7 mM; posteriormente, el catión del radical ABTS (ABTS•+) se produjo mediante la reacción del ABTS con persulfato de amonio 2.45 mM en una relación 1:1 y permitiendo que la mezcla estuviera en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas antes de su uso.

Posteriormente, **se realizó una dilución del ABTS•+ con etanol**, para obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.020 a 732 nm. Para la reacción con las soluciones estándar de ácido cafeico, TBHQ y muestra de proteína acoplada con ácido cafeico a 200 ppm, se hicieron reaccionar **20 µL de muestra/solución estándar con 1980 µL de ABTS•+** y se leyó el decremento de absorbancia por minuto hasta llegar a los 6 minutos.

4.1.2.9 Comprobación de la formación de la unión química aglicona- proteína por medio de RMN ¹H

Se realizó el análisis de todas las películas obtenidas, para ello se disolvieron en ácido trifluoroacético deuterado y se obtuvieron los espectros de RMN ¹H en un espectrómetro Varian Unity Inova (300 MHz) y Agilent MR (400 MHz). Posteriormente, los espectros fueron procesados con el software MestReNova versión 8.1.

4.1.3 Evaluación de las propiedades de barrera de las películas activas

4.1.3.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Se utilizó el método ASTM E96-00 (2003) que consiste en determinar el coeficiente de transmisión de vapor de agua, por medio del monitoreo del cambio de la masa en el tiempo provocado por la transferencia de agua a través de la película.

Primeramente las películas se acondicionaron a una humedad relativa de 60% y temperatura de 20 ± 5 °C constantes durante 48 horas. Se cortaron en forma circular y se colocaron en las celdas de acrílico previamente puestas a peso constante.

Las celdas se llenaron con 35 g de CaCl_2 anhidro secado a peso constante en estufa.

Las películas se colocaron en la celda con un anillo, tornillos y una capa de silicón para asegurar la hermeticidad.

Posteriormente, se determinó la masa de la celda ensamblada con la película y se colocó en una cámara con humedad relativa de $62 \pm 2\%$.

Se determinó la masa cada 24 horas durante 5 días, registrando también la temperatura y la humedad con un termohigrómetro. Dicha prueba se realizó por triplicado.

La PVA se obtiene mediante las siguientes ecuaciones:

a) Transmisión de vapor de agua

$$\text{WVT} = \frac{m}{A \times t}$$

Donde:

m → ganancia en masa durante la prueba (g)

t → tiempo de duración de la prueba (horas)

A → área de la boca de las celdas (m^2)

b) Permeanza

$$P = \frac{\text{WVT}}{S \times R}$$

Donde:

WVT → Transmisión de vapor de agua ($\frac{\text{g}}{\text{h} \times \text{m}^2}$)

S → Presión de vapor de agua a la temperatura de la prueba (Pa)

R → Humedad relativa (%)

c) Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

$$\text{PVA} = P \times e$$

Donde:

P → Permeanza ($\frac{\text{g}}{\text{h} \times \text{m}^2 \times \text{Pa}}$)

e → espesor (m)

4.1.3.2 Permeabilidad al oxígeno (PO)

Se utilizó el método volumétrico ASTM D1434-82(2003), mediante el cual se determina el coeficiente de transmisión de oxígeno debido al cambio de volumen en el tiempo generado en el capilar por la transferencia de moléculas de O₂ en la película.

Primeramente, se acondicionaron las películas y se cortaron en círculos con un diámetro de 11 cm; se colocaron en la parte inferior de una celda CSI-135 Permeability Cell Tester, junto con una banda de teflón que se adhiere a la película. Se colocaron 2 piezas de papel filtro como medio de retención. La celda que se conecta al tanque de oxígeno tiene 4 válvulas, de las cuales una corresponde al capilar que mide el volumen de 4-metil-2-pentanona, que es un líquido de baja densidad, otra válvula de flujo del tanque (presión atmosférica), otra de escape y una de entrada de flujo menor (inferior). Primeramente, se purga la celda aplicando una presión positiva mayor a la atmosférica (válvula superior) y se cierran las válvulas de flujo menor y de escape. Después de purgar la celda de aire y saturarla con oxígeno, se aplica una presión positiva del gas por 10 minutos, dejando abiertas todas las válvulas.

Posteriormente, se cerraron las válvulas inferior y superior y la del capilar; se agregaron **3 µL de 4-metil-2-pentanona** en el capilar y se dejó estabilizar; una vez que alcanzó el equilibrio, se cerró la válvula de escape superior y se leyó el desplazamiento de la 4-metil-2-pentanona.

La PO se obtiene mediante las siguientes ecuaciones:

a) Velocidad de transmisión del gas

$$GTR = \frac{(\rho_0)(V_r)(10^{-6})}{(A)(R)(T)}$$

Donde:

ρ_0 → presión ambiental (Pa)

V_r → volumen de líquido en el capilar (mm³/s)

A → área de transmisión del espécimen (mm²)

R→ constante universal de gas ideal (8.314x10³L *Pa/mol*K)

T→ temperatura ambiente (K)

b) Permeanza

$$P = \frac{GTR}{\Delta P}$$

Donde:

GTR→ Velocidad de transmisión del gas (mol/s × m²)

ΔP→ Diferencia de presión parcial del gas en ambos lados de la película a la temperatura de la prueba (kPa)

c) Permeabilidad a oxígeno

$$PO = P \times e$$

Donde:

P→ Permeanza (mol/s × m² × Pa)

e→ espesor (m)

4.1.4 Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos

4.1.4.1 Elaboración y siembra del medio de cultivo sólido Agar Mueller Hinton

Se utilizó el medio de cultivo Mueller Hinton, el cual no es selectivo y promueve el desarrollo microbiano (ver Tabla 6). Su pH final es de 7.3±0.1; por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute, para ser utilizado en antibiogramas en medio sólido, debido a que tiene muy buena reproducibilidad entre lotes en las pruebas de sensibilidad y la mayoría de los microorganismos patógenos se desarrollan de manera óptima.

Tabla 6. Formulación del Agar Mueller Hinton

Componente	Concentración (g/L)
Infusión de carne (polvo)	3.0
Peptona ácida de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	15.0

Primeramente, se suspendieron los ingredientes en polvo en 1 litro de agua, dejándose embeber durante 10 minutos. Posteriormente, se calentó con agitación constante, se dejó hervir durante 1 minuto y posteriormente se esterilizó el medio a 121 °C durante 15 minutos.

Se dejó enfriar el medio a 45-50 °C para posteriormente distribuir en cajas de Petri estériles (30 mL aproximadamente por caja), se dejó solidificar y se almacenó a 2-4 °C.

Para la siembra se utilizaron dos diluciones líquidas de cepas de microorganismos comunes en alimentos; *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativos) y *Staphylococcus aureus* (Gram positivos), ambos a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL.

Para los medios de cultivo control, se inocularon 100 µL de la dilución y se extendió en la placa con una varilla de vidrio estéril, se incubaron durante 16-18 horas a 37 °C, en condiciones aeróbicas.

4.1.4.2 *Prueba de sensibilidad a la nisina*

Para evaluar la sensibilidad a la nisina, las películas se cortaron en círculos de 1.0 cm de diámetro y se esterilizaron durante 2 horas bajo luz UV. Para los medios de cultivo con películas, igualmente se **inocularon 100 µL de la dilución y se extendió en la placa con una varilla** de vidrio estéril, se dejaron secar y se colocaron con unas pinzas estériles los círculos de películas sobre el medio de cultivo, luego se incubaron durante 16-18 horas a 37 °C en aerobiosis.

Los resultados se interpretaron observando, si era el caso, el halo de inhibición y midiéndolo.

4.1.5 *Pruebas de deterioro microbiano y oxidativo*

4.1.5.1 *Determinación indirecta de la carga microbiana (método del 2,3,5-trifeniltetrazolio)*

Se mezclaron 5 g de muestra y 30 mL de agua destilada esterilizada, se homogeneizó y a continuación se agregaron 0.5 mL de solución de trifeniltetrazolio al 0.5% y 5.0 mL de solución buffer de fosfatos pH=7.

Se incubó a 38 °C durante 7 horas, para posteriormente extraer el formazan obtenido por centrifugación con 30 mL de alcohol butílico. Se midió la absorbancia a 485 nm.

La curva estándar se obtuvo mediante la reducción de 1 g de trifeniltetrazolio con 1 g de ácido ascórbico, se añadieron 5 mL de NaOH 10% y se completó el volumen a 25 mL de agua destilada. Se dejó reposar durante 20 minutos, se neutralizó, se filtró y se lavó el formazan formado sobre papel filtro. Se secó a 37 °C.

Se prepararon las diluciones en butanol y se leyó la absorbancia a 485 nm.

El método se basa en el proceso de transferencia de electrones catalizado por enzimas conocidas como dehidrogenasas, presentes en algunos microorganismos, para lo cual se emplean indicadores redox que pueden actuar como transportadores de electrones en las células, en lugar de la función del oxígeno.

Dentro de los indicadores redox que han resultado útiles para medir la actividad de la deshidrogenasa, y por consiguiente, de manera indirecta, la carga microbiana, se encuentra el 2,3,5-trifeniltetrazolio, el cual puede ser medido espectrofotométricamente a 485 nm y se reduce a 1,3,5-trifeniltetrazolio formazano.

4.1.5.2 Índice de peróxidos (método colorimétrico)

Se realizó con base en la metodología AOAC 965.33; la grasa extraída del ajonjolí se pesó 0.001-0.1 g y se disolvieron en 10 mL de una mezcla de diclorometano-metanol (70:30). Posteriormente, se adicionaron 0.05 mL de una solución de tiocianato de amonio al 30% y 0.05 mL de una solución de FeCl₂ al 0.35% con 2% de HCl 10 M, se homogeneizó y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se leyó la absorbancia a 500 nm frente a un blanco de disolventes.

Asimismo, se preparó la curva de calibración con diluciones de FeCl₃ **entre 0.5 y 5 µg/mL**, en la misma mezcla de disolventes, añadiendo 0.05 mL de tiocianato de amonio y HCl 0.2 M, para finalmente homogeneizar y leer la absorbancia a la misma longitud de onda.

Los resultados se expresan como miliequivalentes de peróxido por kilogramo de grasa, para el cual se relaciona la cantidad de Fe, **expresados como µg/mL** obtenidos en la reacción con el peso de la muestra.

4.1.5.3 Índice de Kreis

Al aceite extraído del ajonjolí se le realizó la prueba con base en la metodología descrita por Yeshajahu *et al.*, (2000)

Se disolvieron 50-500 mg de grasa en 5 mL de diclorometano, se añaden a 10 mL de solución de ácido trifluoroacético al 30% en ácido acético glacial y 1 mL de floroglucinol en ácido acético al 1%. Se homogeneizó y se incubó en un baño a 45 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se enfrió y se agregaron 4 mL de etanol.

Se midió la absorbancia a 540 nm frente a un blanco de reactivos.

El fundamento de este método se basa en la reacción de la floroglucina en medio ácido con aldehído epihidrínico, dando como resultado una coloración roja, cuya intensidad aumenta con el deterioro oxidativo.

Los resultados se expresan como Abs (540 nm)/ g de grasa.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Extracción e identificación de compuestos fenólicos de la semilla de chía

Con el interés de caracterizar a las semillas de chía que se iban a utilizar en el presente estudio para la extracción de polifenoles, se realizó el análisis químico proximal con la metodología mencionada anteriormente.

En la Tabla 7 se muestra la composición de la semilla de chía, comparando los datos obtenidos promedio de 3 repeticiones con respecto a lo reportado por la USDA en 2015.

Tabla 7. Análisis químico proximal de las semillas de chía (*Salvia hispanica* L.)

Datos	Experimentales	USDA (2015)
Humedad	6.37 ±0.71%	5.80%
Cenizas	0.19 ±0.05%	--
Grasa	30.01 ±0.22%	30.74%
Proteína	23.13±3.07%	16.54%
Carbohidratos (por diferencia)	40.38%	42.12%

Una vez caracterizadas las semillas de chía, se hizo una extracción ácido-etanólica (60 °C/3 h) de los polifenoles, como se menciona en la metodología.

Muchos métodos y técnicas cromatográficas han reportado la extracción y determinación de compuestos fenólicos. Diversos disolventes como el metanol, etanol, acetona, agua y acetato de etilo y sus mezclas se han utilizado para la extracción de diferentes clases de compuestos fenólicos (Borges *et al.*, 2011). En lo que respecta a la eficiencia de extracción, se ha observado que esta aumenta entre más polaridad tiene el disolvente.

Tabart *et al.*, (2007) han demostrado que la mejor extracción de compuestos fenólicos unidos a matrices se lleva a cabo con una mezcla de metanol-agua, debido a la alta polaridad.

El extracto se caracterizó en cuanto a contenido de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, obteniéndose 1.831 mg EAG/g semilla de chía. Este resultado se comparó con los resultados obtenidos anteriormente por Cruz Pérez (2008) y Silva Navarro (2009), quienes utilizaron la misma metodología de extracción de polifenoles y el mismo método de cuantificación de compuestos fenólicos.

Se observa un menor rendimiento en la extracción de polifenoles realizada en el presente estudio, lo cual se puede justificar debido a las diferentes procedencias de las semillas de chía, ya que al considerar su extensa área de distribución, su sistema de polinización altamente autógeno asociado con sus flores diminutas y homostílicas (Haque y Ghoshal, 1981) y la topografía accidentada de las montañas que da origen a un aislamiento geográfico de las áreas donde crece (Ramamoorthy y Elliot, 1998), es probable que exista una amplia diversificación entre poblaciones naturales de *S. hispanica* L.

Tabla 8. Concentración de polifenoles obtenida mediante el método de Folin-Ciocalteu del extracto obtenido por vía ácido-alcohólica de semillas de chía.

Muestra	mg EAG/ g semilla de chía
Extracto ácido de semilla de chía*	1.831±0.109
Extracto ácido de semilla de chía**	2.881±0.012
Extracto ácido de semilla de chía***	2.539±0.117

* Promedio de 3 repeticiones de la determinación.

** Dato de Cruz Pérez (2008)

*** Dato de Silva Navarro (2009)

Taga (1984) por su parte, reportó 47 mmol/1000 g de semillas de chía, empero utilizando ácido cafeico como estándar. También, Reyes-Caudillo *et al.*, (2008), reportaron valores de 0.88-0.92 mg EAG/g de semilla, y Marineli *et al.*, (2014) obtuvieron 0.92 mg EAG/g de semilla.

Sin embargo, cabe destacarse que el método de extracción que utilizaron fue con etanol a temperatura ambiente, con agitación constante durante 3 horas.

El contenido de flavonoides en el extracto de polifenoles fue de 5.4002 ± 1.8816 mg ER/g extracto, lo que significa que por gramo de chía hay 0.1080 ER, y esto a su vez corresponde al 5.26% de los polifenoles totales determinados por el método de Folin-Ciocalteu.

Una vez hecha la caracterización cuantitativa anterior del extracto de polifenoles, se determinó la capacidad antioxidante del mismo mediante los métodos de los radicales DPPH• y ABTS+•. En la Tabla 9 se muestran los valores obtenidos para la capacidad antioxidante del extracto.

Tabla 9. Capacidad antioxidante del extracto de polifenoles de la chía.

Método ABTS•+ (*)	Método DPPH• (*)
89.7±5.9 %	73.6±2.3%

(*)Pruebas realizadas por triplicado.

Por el método del radical DPPH •, Reyes Caudillo *et al.*, (2006) determinaron una capacidad antioxidante en el extracto de polifenoles de la chía de aproximadamente 93%, mientras que tanto Cruz Pérez (2008) como Silva Navarro (2009), que extrajeron polifenoles mediante el mismo método; determinaron una capacidad de hasta 71.9% y 83.2%, respectivamente. Los valores anteriores se diferencian por la

temperatura de extracción y debido a la procedencia de las semillas de chía. En las siguientes gráficas se muestra la cinética de la capacidad antioxidante del extracto obtenido por ambos métodos. En ambas gráficas se observa que el radical se satura entre 1 y 2 minutos.

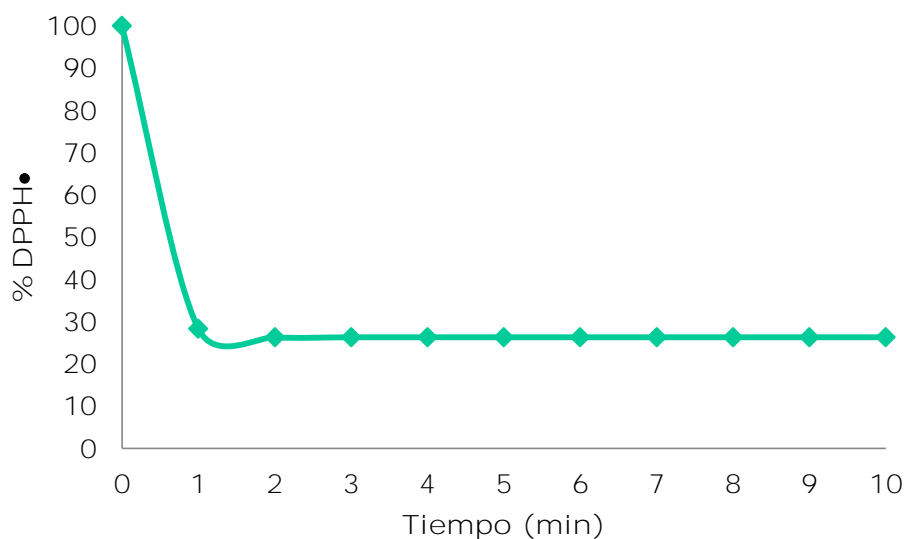


Figura 6. Cinética de la capacidad antioxidante del extracto de polifenoles de la chía diluido a 1 mM sobre el radical DPPH•.

Comparando los resultados de ambas pruebas, se obtuvo un valor promedio de la capacidad antioxidante mayor por el método de ABTS+•, ya que es menor su selectividad en la reacción con los donadores de hidrógeno H• con respecto al DPPH•. No obstante, cabe destacarse que en ambas pruebas se corrobora que los polifenoles de la chía tienen una buena capacidad de donar radicales H•.

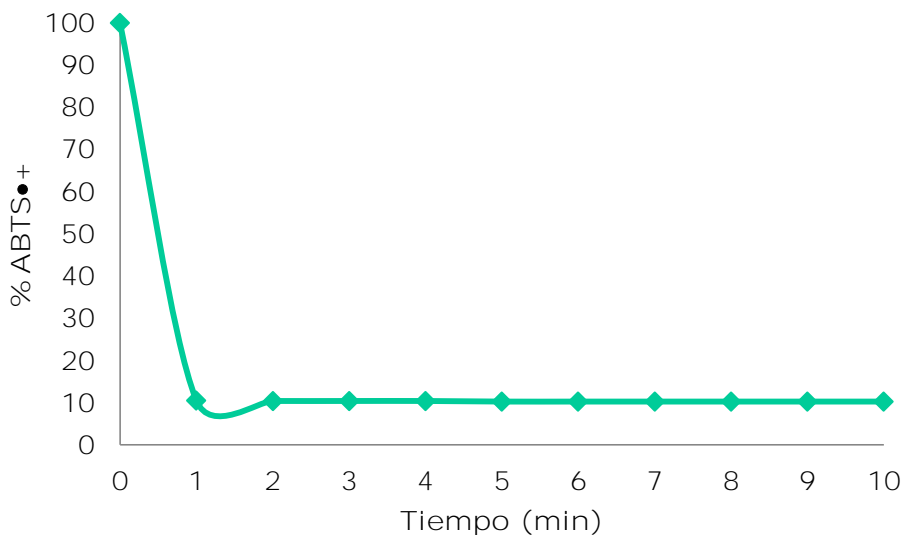


Figura 7. Cinética de la capacidad antioxidante del extracto de polifenoles de la chíá diluido a 200 ppm sobre el catión radical ABTS•+.

5.1.1 Separación de polifenoles mediante cromatografía preparativa en columna

Se realizó cromatografía en columna flash utilizando una mezcla de AcOEt- Hex 2:1 como eluyente y gel de sílice como adsorbente. Se colectaron 30 fracciones de 15 mL cada una y se verificó la separación mediante cromatografía en placa fina de cada eluato, utilizando las soluciones estándar de ácido cafeico, ácido gálico, quercetina y kaempferol.

De las fracciones anteriormente mencionadas, por comparación de los Rf con las soluciones estándar, se decidió mezclar las fracciones 12, 13 y 14; para verificar la presencia de kaempferol. Mientras en la fracción 20 se reveló la presencia de ácido gálico y en la fracción 24, la de ácido cafeico.

Para purificar la primera mezcla (12+13+14), se montó una columna utilizando una mezcla de AcOEt- Hex 1:1 y gel de sílice como adsorbente; se obtuvieron 20 fracciones de 6 mL cada una.

Comparando contra el estándar, se observó que era posible la presencia de kaempferol en las fracciones 11 y 12, así que se decidió mezclarlas para posteriormente re-purificarlas utilizando el mismo gradiente y fase estacionaria y separar así las impurezas. Se obtuvieron 15 fracciones de 10 mL y se observó en la fracción 9 un compuesto con el mismo Rf del kaempferol (K).

Asimismo, las fracciones 20 y 24 de la primera columna, se re-purificaron con un gradiente de Metanol-CHCl₂ 9:1 y sílica gel como fase estacionaria, obteniéndose 30 fracciones de 15 mL cada una, se obtuvieron 3 fracciones con valores de Rf parecidos al del ácido cafeico (C1) y del ácido gálico (G), 15 Y 6, respectivamente, y otro desconocido (X) con valor de Rf de 0.30. Asimismo, la fracción que podría contener ácido cafeico se re-purificó en las mismas condiciones para separarlo de la posible presencia de otros compuestos. Se colectaron 20 fracciones de 10 mL cada una y se obtuvieron las fracciones 8 y 9, la primera, con un valor de Rf cercano al del ácido cafeico (C2) y el segundo que es desconocido (Z) con un Rf cercano al del ácido cafeico.

Posteriormente, una vez obtenidas las fracciones, se les realizó el análisis por RMN ¹H y HPLC-MS, como herramientas para dilucidar sus estructuras y obtener sus pesos moleculares.

En la Tabla 10 se muestran los eluatos obtenidos con sus respectivos valores de Rf y el posible compuesto que podría estar presente.

Tabla 10. Rf obtenidos por cromatografía en placa de los compuestos separados comparados contra estándar eluidos con fase móvil AcOEt-Hex (2:1).

Eluato	Rf	Compuesto
C1	0.25	Ácido cafeico
C2	0.33	Ácido cafeico
G	0.27	Ácido gálico
K	0.63	Kaempferol
K2	0.62	Kaempferol
X	0.30	Desconocido
Z	0.29	Desconocido

5.1.2 Determinación estructural de polifenoles mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Se obtuvieron los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C de los compuestos purificados mediante la cromatografía preparativa en columna, del extracto de polifenoles y del aceite de la semilla de chía. Para ello, se utilizaron los equipos Varian Unity Inova (300 MHz) y Agilent MR (400 MHz), utilizando TMS como referencia interna.

En los espectros se observa en el eje horizontal el desplazamiento químico (δ) en partes por millón (ppm) resultante de la fuerza del campo efectivo en los núcleos.

Debido a que cada hidrógeno electrónicamente diferente en una molécula tiene su propia absorción única, los siguientes espectros nos muestran cuántos tipos de hidrógenos no equivalentes están presentes en cada fracción. La multiplicidad de las señales es indicada como:

s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuarteto), q (quinteto), m (multiplete).

El disolvente que se utilizó para las fracciones y el extracto de polifenoles fue el metanol deuterado (CD_3OD), el cual al entrar en contacto con la muestra intercambia el deuterio por protones con la muestra en pequeña proporción, este disolvente residual proporciona señales en 4.87 y 3.31 ppm, razón por la cual se observan en todos los siguientes espectros unas señales en aproximadamente 4.5-5 ppm y en 3.25-3.5 ppm.

Por otro lado, el disolvente que se utilizó para el análisis del aceite de chía fue deuterocloroformo (CDCl_3), que generalmente al muestra un pico de disolvente residual en 7.26 ppm.

Asimismo, en algunos espectros se observan impurezas como "grasa", que son picos que aparecen en $\text{CH}_3=0.88$ ppm y $\text{CH}_2=1.29$ ppm.

FRACCIÓN C1 y C2

En ambas fracciones (ver Figuras 8 y 9) se propone la estructura del **ácido cafeico**, el cual muestra señales con δ entre 6 y 8 ppm, características de los compuestos aromáticos. Se observa que las 5 señales integran cada una para 1H. Las señales 1 y 3, en 6.92 y 6.77 ppm, respectivamente, se encuentran acopladas en el anillo aromático ($J=8.2\text{Hz}$). Mientras que los protones 4 y 5 también están acoplados directamente, ya que también presentan una constante de acoplamiento muy parecida. El protón 5 corresponde al doblete que se encuentra hacia campo alto debido a la deslocalización de electrones que se genera con el grupo carboxilo vecino. Finalmente, se observa que el multiplete **con δ 7.11-7.00** ppm, corresponde al protón restante que está unido al anillo aromático, el cual se presenta como un multiplete debido a que está acoplado también con los protones de los grupos hidroxilos

adyacentes y en cierta forma con los 2 protones restantes debido a la nube electrónica en la estructura aromática.

En los espectros de RMN ^{13}C , se observa la señal del metanol deuterado en 49 ppm, y en el espectro de la fracción C2 (ver Figura 10) aparecen los 9 tipos de átomos de carbono que se encuentran en la molécula de ácido cafeico, en donde está menos protegido el carbono del ácido carboxílico, debido a la electronegatividad del oxígeno, apareciendo con un desplazamiento de 169.7 ppm. De igual forma, los carbonos unidos a los grupos hidroxilos se desplazan hacia campo bajo debido a su cercanía con estos átomos que atraen más los electrones hacia ellos mismos, por lo que quedan desprotegidos.

RESUMEN ESPECTRO DE C1:

RMN ^1H (400 MHz, Metanol- d_4) δ 7.53 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.11 – 7.00 (m, 1H), 6.92 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.21 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H).

RESUMEN ESPECTRO DE C2:

RMN ^1H (400 MHz, Metanol- d_4) δ 7.53 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.92 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H), 6.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.21 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, Metanol- d_4) δ 169.7 (s), 148.0 (s), 145.7 (s), 145.3 (s), 126.5 (s), 126.4 (s), 121.5 (s), 115.1 (s), 114.0 (s), 113.9 (s).

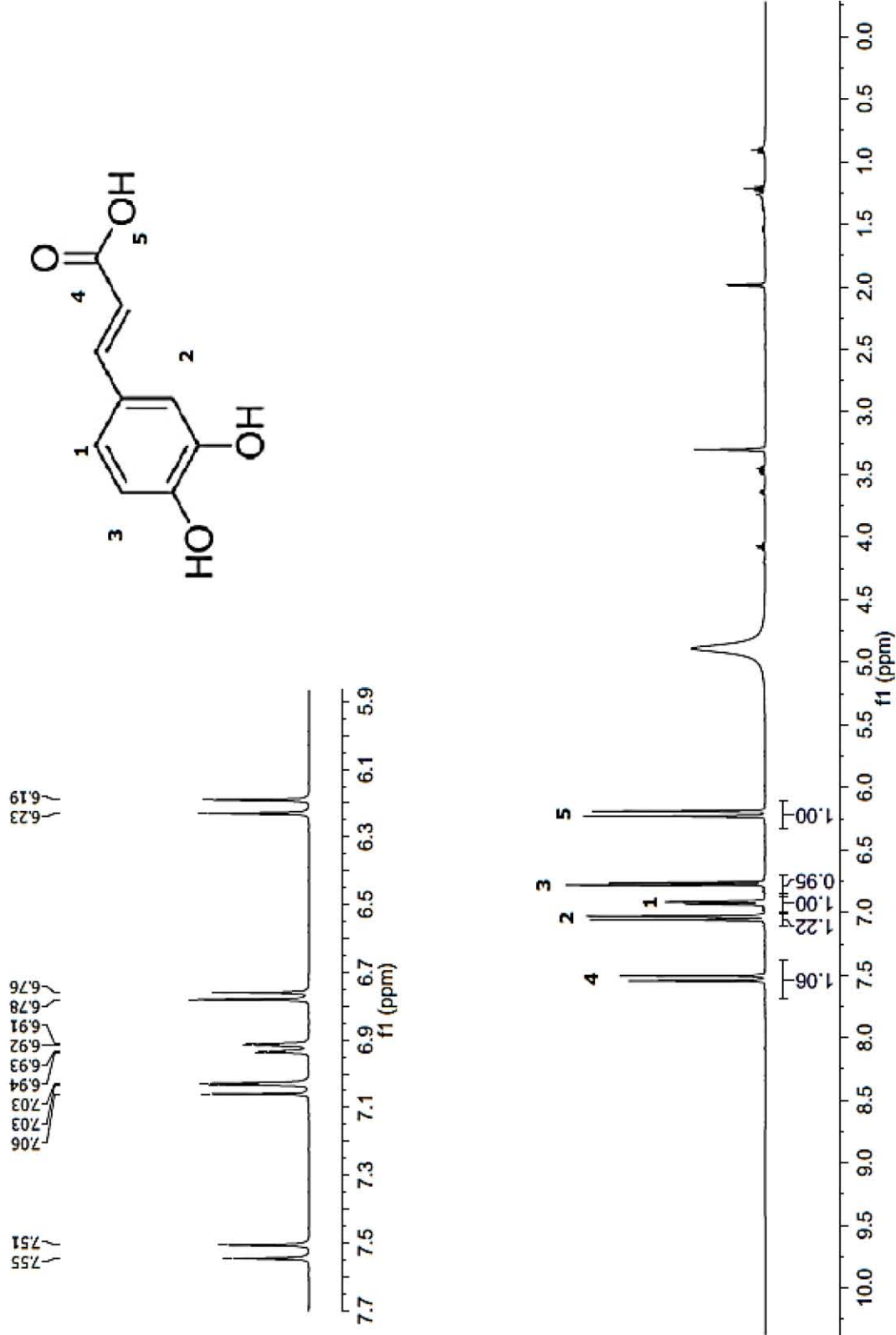


Figura 8. Espectro de RMN ¹H de la fracción C1 (se propone estructura del ácido cafeico + impurezas).

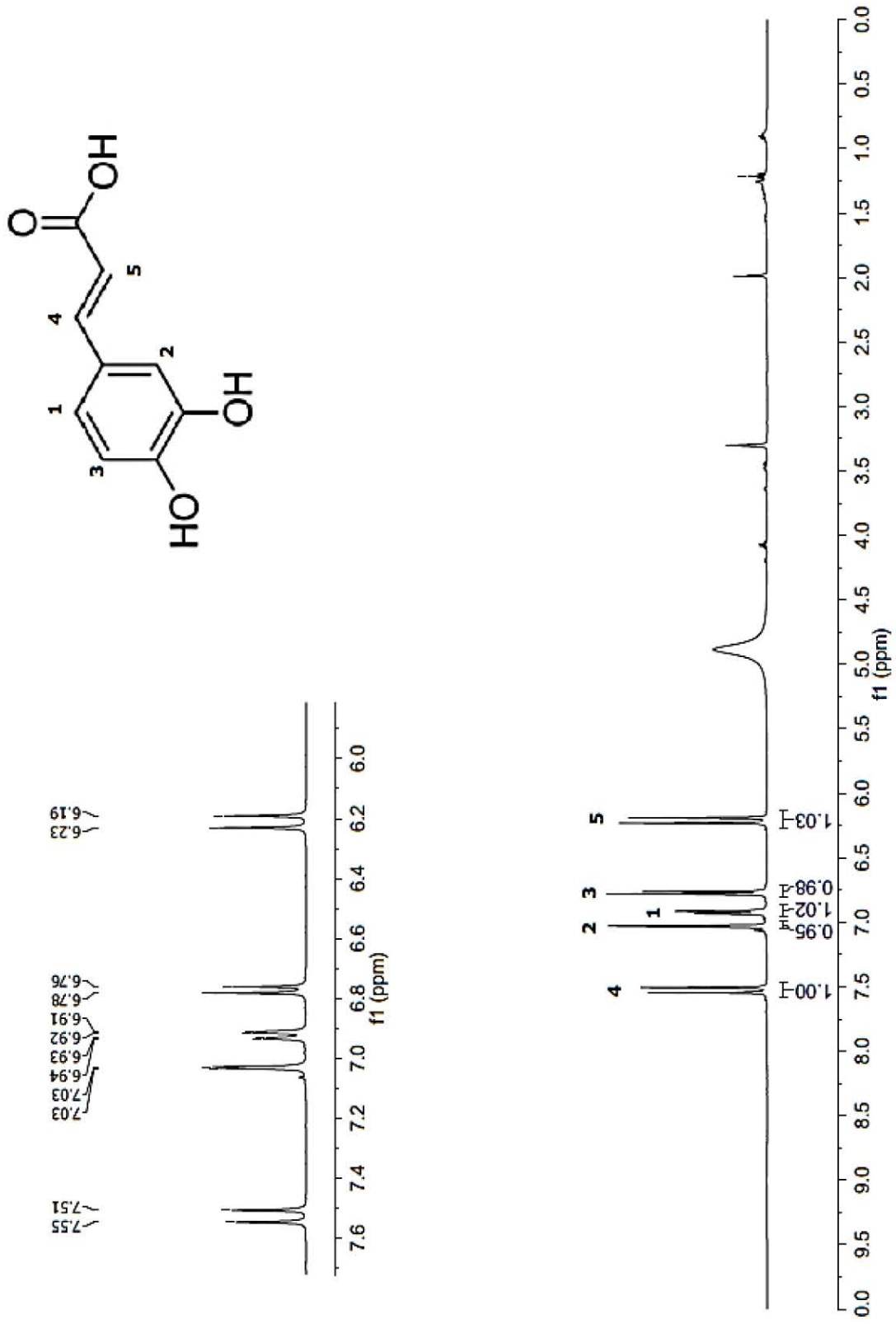


Figura 9. Espectro de RMN ^1H de la fracción C2 (se propone estructura del ácido cafeico + impurezas).

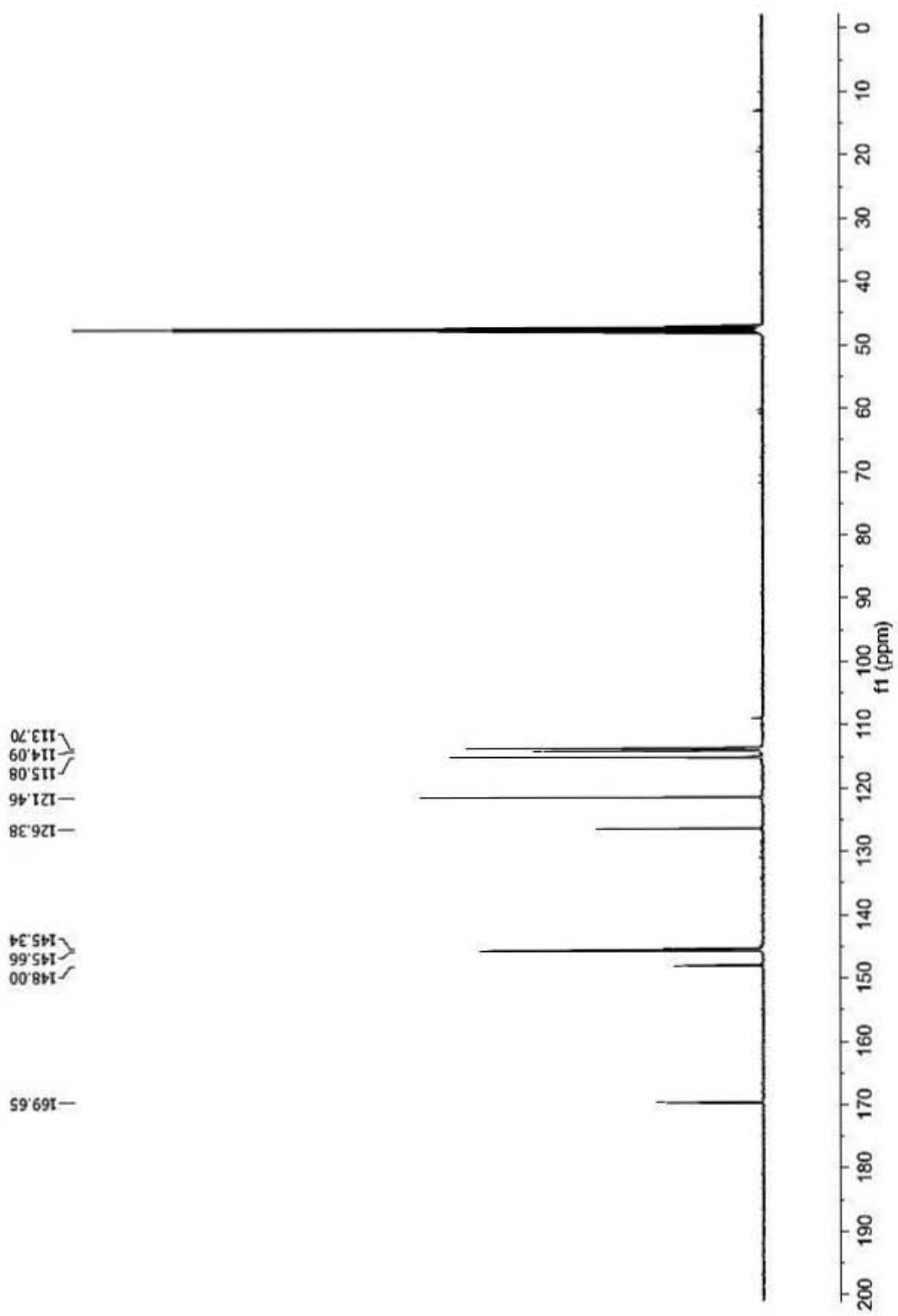


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción C2 (se propone estructura del ácido cafeico + impurezas).

FRACCIÓN G

En esta fracción (ver Figura 11) se observa, además de las señales del disolvente, un singulete que integra para 2 protones, los cuales tienen un desplazamiento característico de los protones unidos al anillo aromático por lo cual se propone la estructura del ácido gálico.

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 12), se observa nuevamente la señal del metanol deuterado en 49 ppm; la molécula del ácido gálico cuenta con 5 carbonos químicamente diferentes, por lo que a campo bajo se observa la señal que corresponde al carbono del ácido carboxílico y posteriormente los del anillo aromático que están unidos a los grupos hidroxilo. Las señales en 144.9 ppm (unidos a OH) y 108.9 ppm (unidos solo a H), es posible que correspondan 2 carbonos cada una, ya que se debe recordar que en el espectro de RMN ^{13}C no es posible integrar; mientras que la señal en 138.2 ppm corresponde a 1 C, sin embargo está hacia campo bajo debido a la cercanía con el oxígeno.

RESUMEN ESPECTRO DE G:

RMN ^1H (300MHz, Metanol- d_4) δ 7.12(s, 2H).

RMN ^{13}C (300 MHz, Metanol- d_4) δ 164.1 (s), 159.1 (s), 146.6 (s), 129.2 (s), 114.9 (s), 97.8 (s), 93.0 (s).

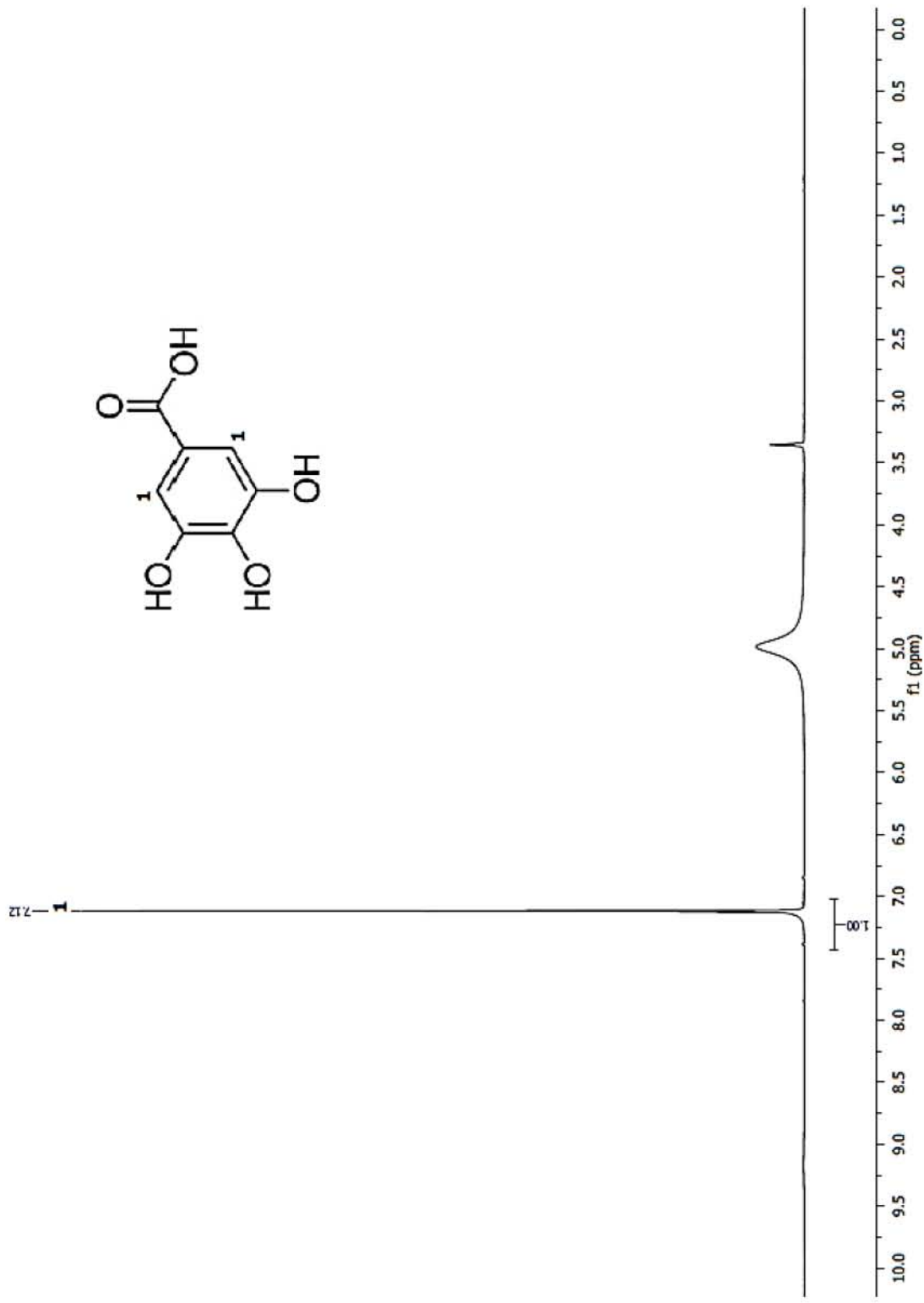


Figura 11. Espectro de RMN ¹H de la fracción G (se propone estructura del ácido gálico).

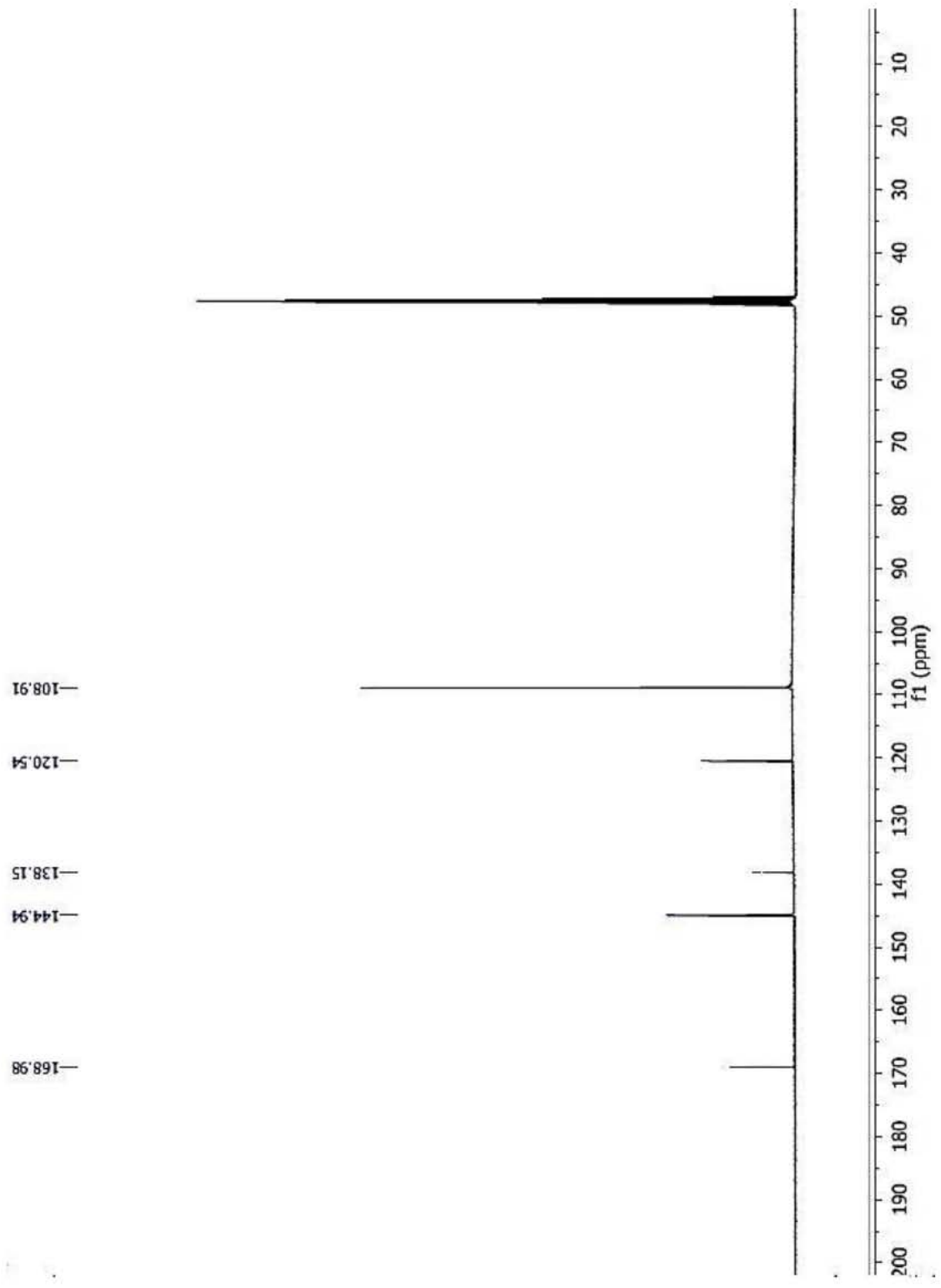


Figura 12. Espectro de RMN ¹³C de la fracción G (se propone estructura del ácido gálico).

FRACCIÓN K y K2

En estas fracciones (ver Figuras 13 y 14) se propone la estructura molecular del kaempferol; se observa que en ambas, las señales 3 y 4 integran para 2H, mientras que la 1 y 2, integran cada una para 1H.

Asimismo, los multipletes 3 y 4, con desplazamientos en aproximadamente 8 y 7 ppm, están fuertemente acoplados. La multiplicidad en estos espectros se observa debido a la presencia de protones químicamente diferentes vecinos. Dado que el efecto por el que un protón hace escindir a los protones próximos (acoplados) es mutuo y de la misma magnitud, la constante de acoplamiento es igual en protones acoplados.

Los protones 1 y 2, que también están unidos a un anillo aromático, igualmente están acoplados en la estructura y muestran constantes idénticas. Estos últimos son señales que aparecen a campo más alto debido a la interacción del anillo aromático con los grupos funcionales carbonilo (atractor de electrones), hidroxilo y éter (donadores de electrones), por lo que están más protegidos electrónicamente.

También, en el espectro RMN ^{13}C , se observan 12 carbonos químicamente diferentes, de los cuales son idénticos los que corresponden a los del grupo arilo, los más cercanos al carbono unido a OH tienen un desplazamiento a 114.8 ppm, mientras que los otros se desplazan a 129.2 ppm.

En principio, aquellos átomos de carbono unidos a los grupos hidroxilos se desplazan hacia campo bajo, mientras que los que solo están unidos solo a átomos de H se encuentran más protegidos (ver Figura 15).

RESUMEN ESPECTRO DE K:

RMN ^1H (400MHz, Metanol- d_4) δ 8.08 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J=9.325$ 1H), 6.39 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.18 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H).

RMN ^{13}C (300 MHz, Metanol- d_4) δ 164.1 (s), 161.03 (s), 160.3 (s), 159.1 (s), 156.8 (s), 146.6 (s), 129.2 (s), 122.3 (s), 114.9 (s), 97.8 (s), 93.0 (s).

RESUMEN ESPECTRO DE K2:

RMN ^1H (400MHz, Metanol- d_4) δ 8.12 (m, $J=8.302\text{Hz}$, 2H), 7.02 – 6.88 (m, $J= 8.302$ Hz, 2H), 6.44 (d aparente, $J = 2.1, 0.5$ Hz, 1H), 6.29 – 6.17 (d aparente, $J=2.51$, 1H).

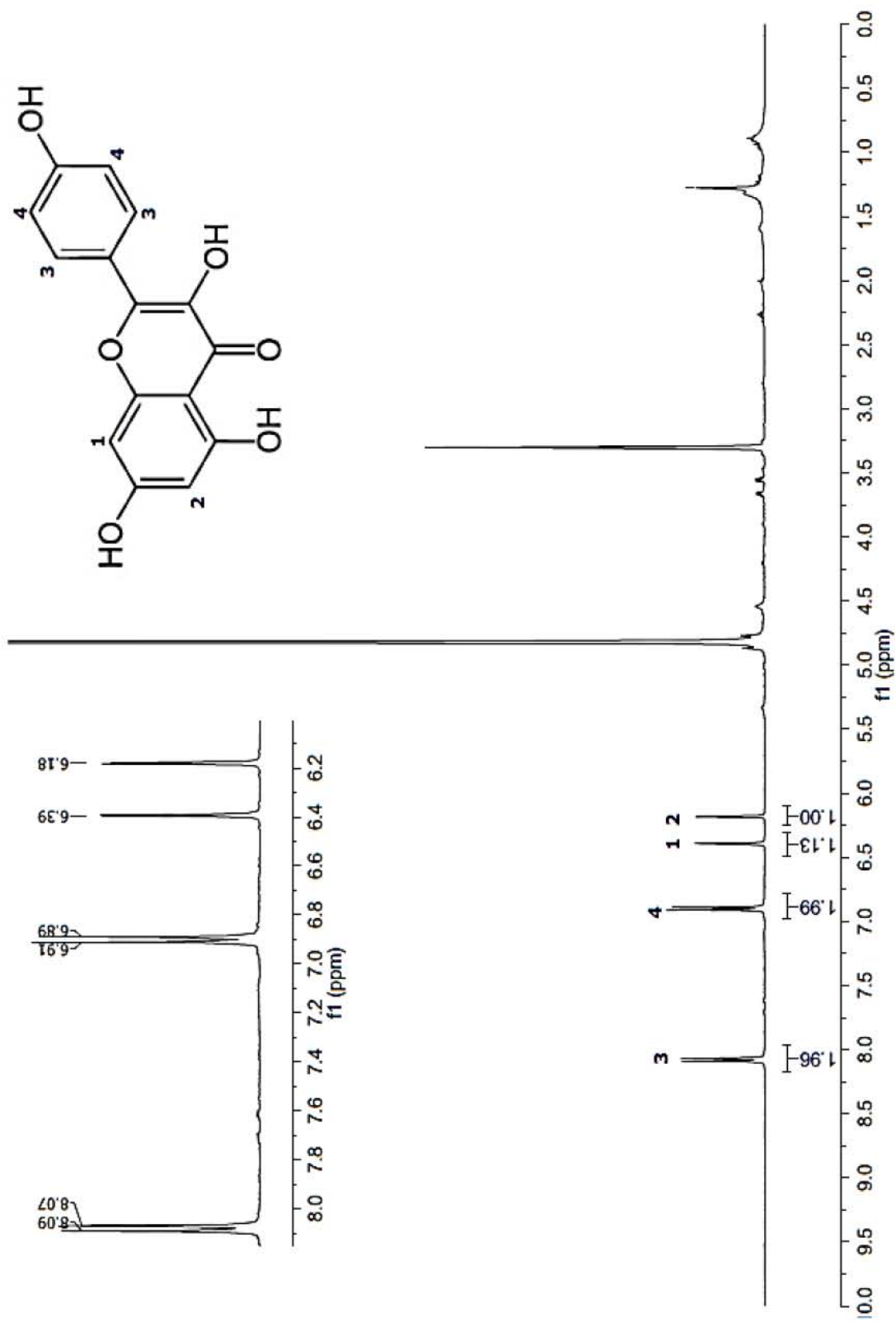


Figura 13. Espectro de RMN ^1H de la fracción K (se propone estructura del kaempferol).

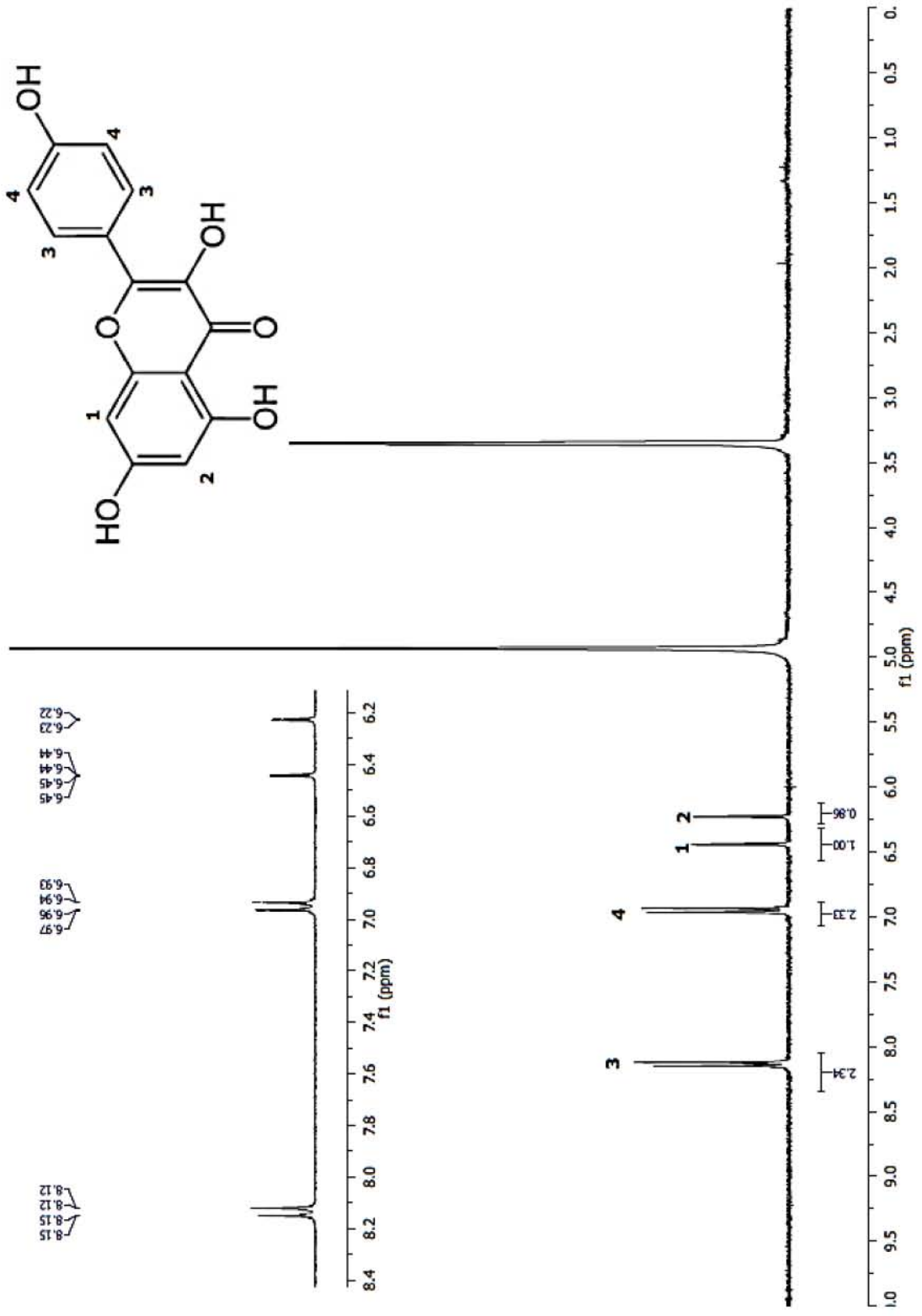


Figura 14. Espectro de RMN ¹H de la fracción K2 (se propone estructura del kaempferol).

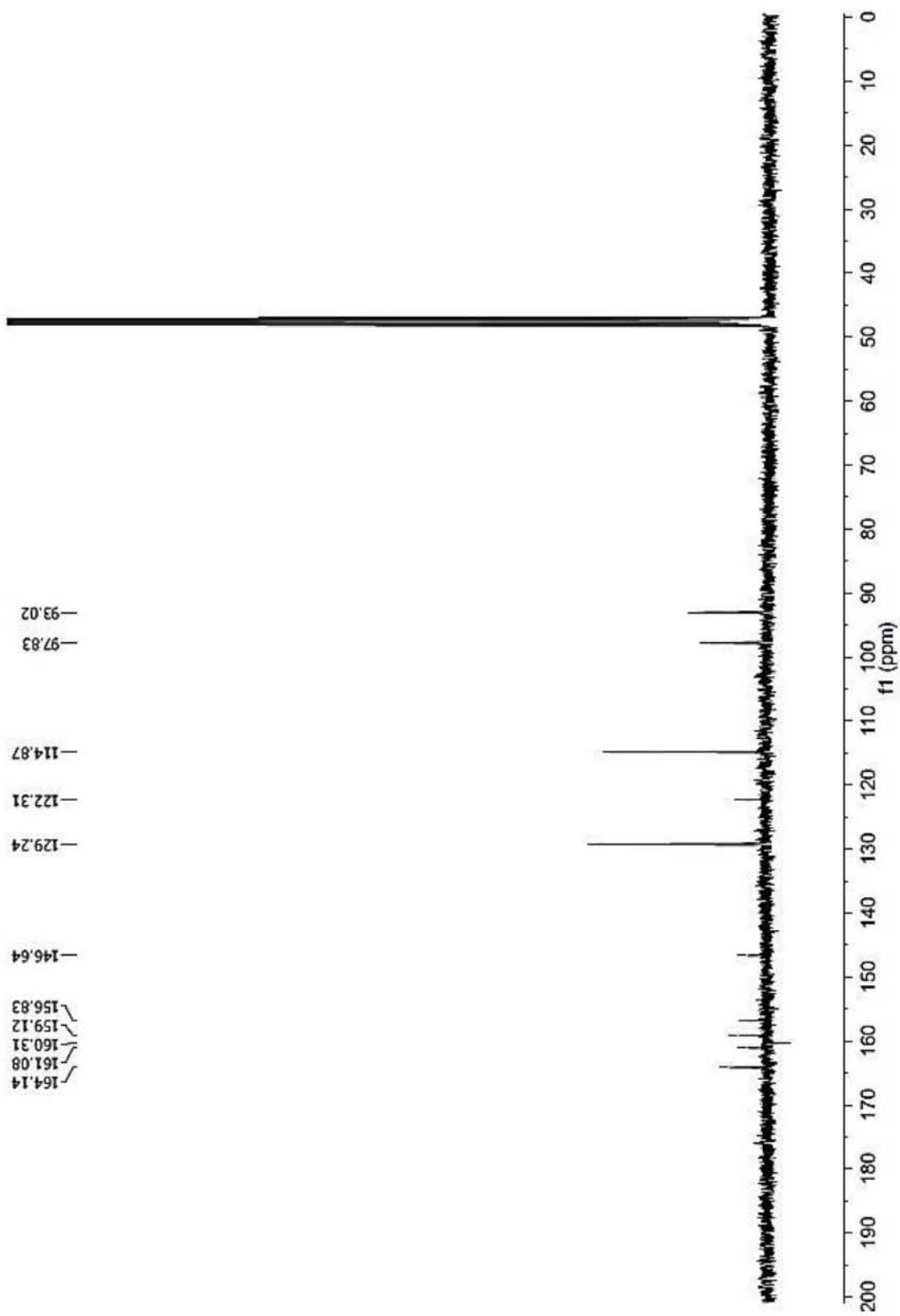


Figura 15. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción K2 (se propone estructura del kaempferol).

FRACCIÓN X

La fracción X (ver Figura 16) parece ser ácido vainílico, para el cual las señales 1 y 2, integran para 2 y 1 protones, respectivamente; los cuales, debido al desplazamiento se deduce que están unidos al anillo aromático. Por otro lado, la señal 3 se encuentra desplazada a campo alto debido a que corresponde a la señal de un metilo, con un desplazamiento característico a 3.94 ppm debido a que están unidos a un carbono de configuración sp^3 , por lo que están más protegidos.

También, el espectro de RMN ^{13}C (ver Figura 17), muestra además de la señal del metanol deuterado en 49 ppm, 8 señales correspondientes a los 8 tipos de carbonos que se encuentran en la molécula de ácido vainílico, por lo cual se vuelve a proponer la presencia de este polifenol.

Nuevamente, el carbono unido al ácido carboxílico se encuentra más desplazado hacia campo bajo (168.58 ppm), mientras que los demás que forman parte del anillo aromático muestran unos desplazamientos de 147.1 y 147.8 ppm. Finalmente, el carbono del grupo éter se encuentra muy protegido, con un desplazamiento característico a 54.9 ppm.

RESUMEN ESPECTRO DE X:

RMN 1H (300MHz, Metanol- d_4) δ **7.67** - 7.54 (m, 2H), 6.88 (dd aparente, $J = 8.8, 0.5$ Hz, 1H), 3.94 (d, $J = 0.5$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (300 MHz, Metanol- d_4) 168.6 (s), 151.2 (s), 147.2 (s), 123.8 (s), 121.7 (s), 114.4 (s), 55.0 (s).

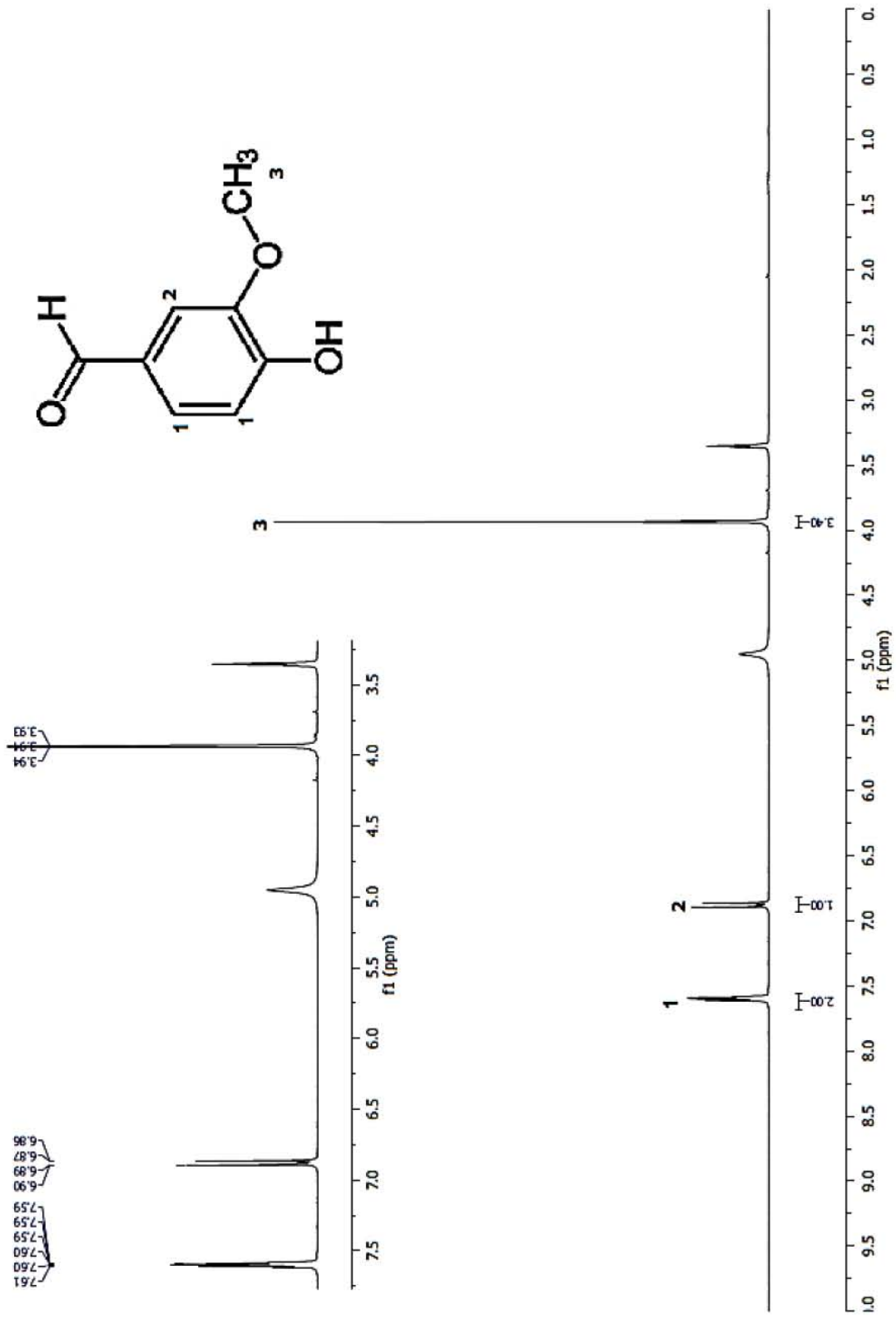


Figura 16. Espectro de RMN ¹H de la fracción X (se propone estructura del ácido vainílico).

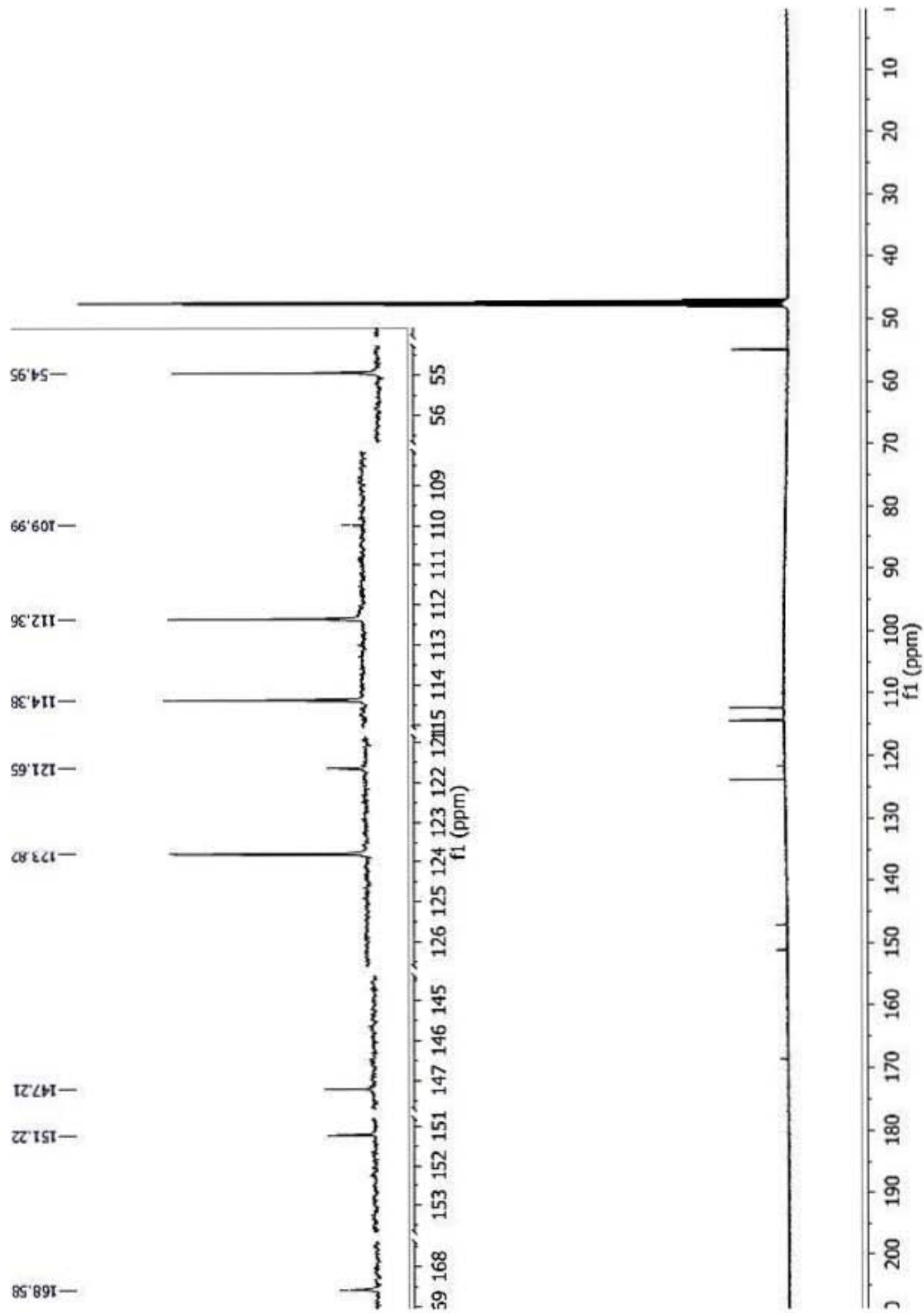


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción X (se propone estructura del ácido vainílico).

FRACCIÓN Z

Finalmente, la fracción Z (ver Figura 18), cada señal integra para 1H, se observa que en el enlace doble nuevamente se muestra la señal particular de dos dobletes que están acoplados ($J=15.9$ Hz), el doblete 5 está desplazado hacia campo alto debido a la cercanía con el grupo carboxilo que se une al carbohidrato, por lo que está más protegido. Las señales 1, 2 y 3 corresponden a los protones unidos al anillo aromático, de los cuales el 2 y el 3 están acoplados ($J=8.1$ Hz). La señal 6 integra para 1H y se muestra como un multiplete debido a que está acoplado con todos los protones del carbohidrato, mientras que la señal 7 y 8 también están interaccionando con los protones del grupo hidroxilo. Los protones 9, 10, 11 y 12, están fuertemente acoplados también con todos los protones vecinos; sin embargo, estos están hacia campo alto debido a su configuración sp^2 .

En el espectro de RMN ^{13}C (ver Figura 19), se observa la señal del disolvente en aproximadamente 49 ppm; mientras que se observan 6 señales desplazadas a campo alto (36.8, 36.4, 69.9, 70.6, 72.1 y 74.9 ppm) que corresponden a los carbonos que conforman el ciclo alifático.

Mientras que el carbono menos protegido es el del grupo éster con un desplazamiento de 167.2 ppm.

RESUMEN ESPECTRO DE Z:

RMN 1H (300MHz, Metanol- d_4) δ 7.60 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.99-6.97 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 6.82-6.80 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.30 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 5.56 – 5.15 (m, 1H), 4.30 – 4.08 (m, 1H), 3.77 (dd, $J = 8.6, 3.1$ Hz, 1H), 2.47 – 1.89 (m, 4H).

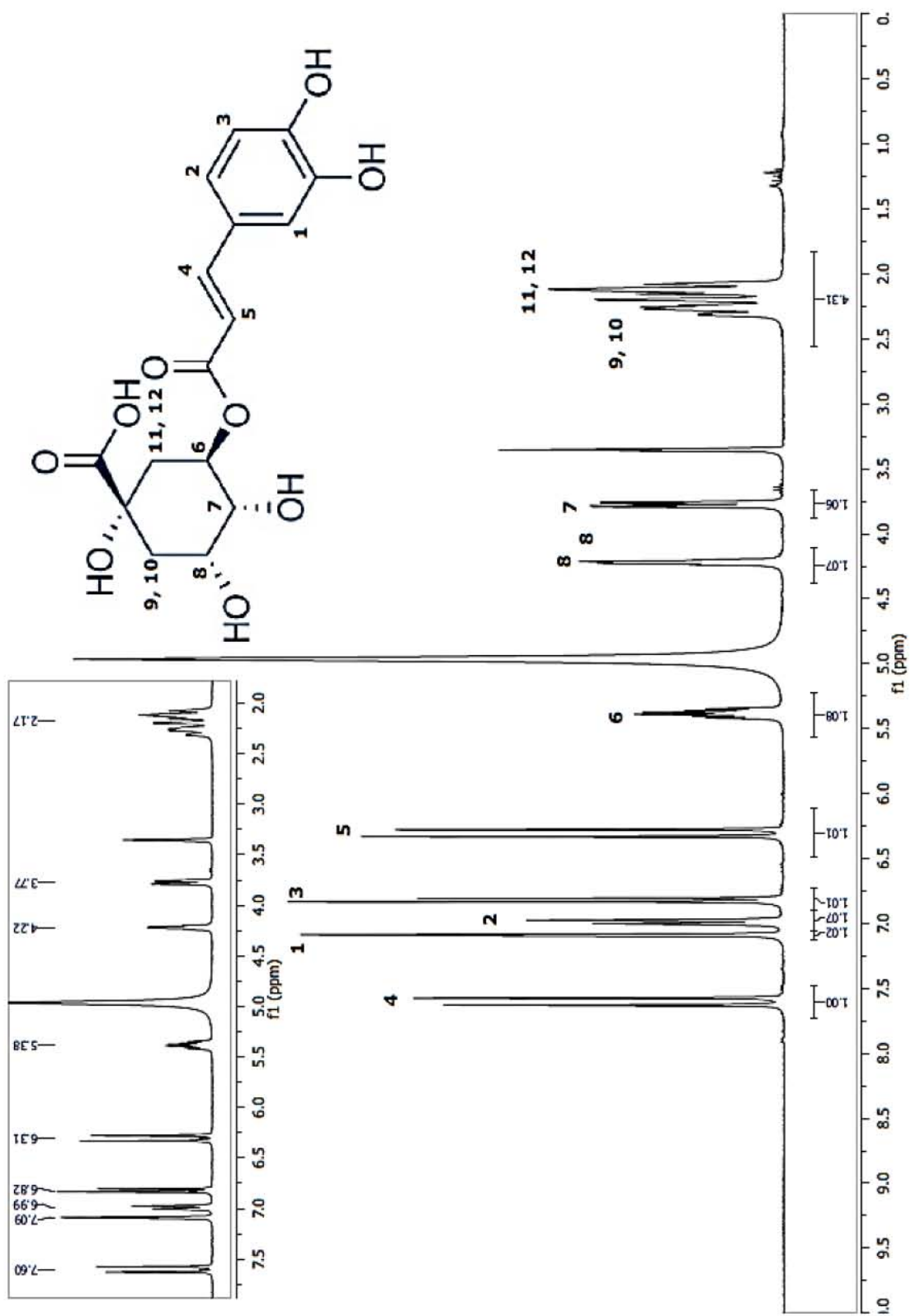


Figura 18. Espectro de RMN ¹H de la fracción Z (se propone estructura del ácido clorogénico).

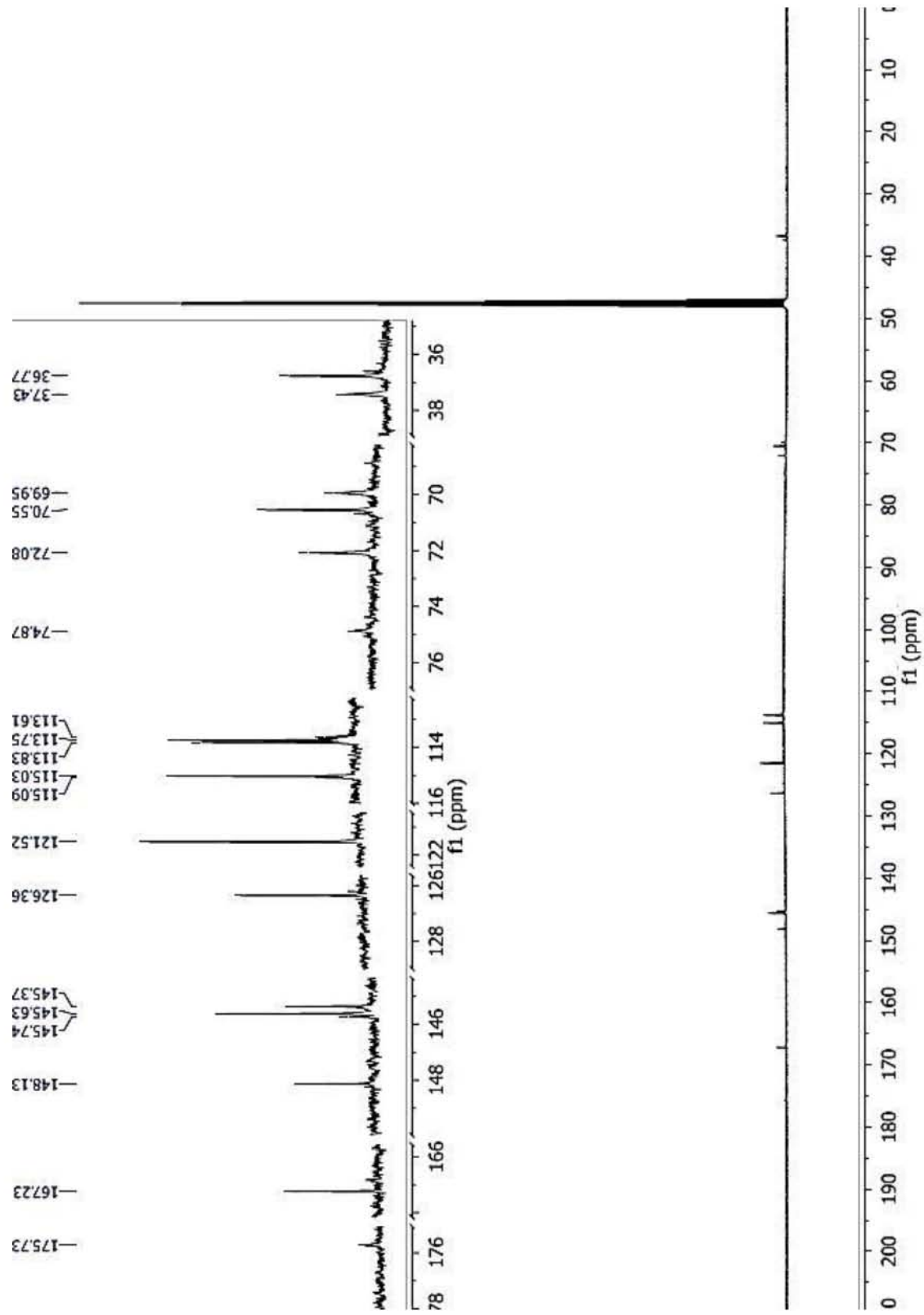


Figura 19. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción Z (se propone estructura del ácido clorogénico).

EXTRACTO DE POLIFENOLES DE LA SEMILLA DE CHÍA.

RMN ^1H (400 MHz, Metanol- d_4). En la Figura 20, se observan las señales del disolvente y cabe destacar la presencia de numerosas señales entre 6 y 7.5 ppm, lo que indica la presencia de estructuras aromáticas, como son los polifenoles. No se pueden identificar ni diferenciar las señales de cada compuesto fenólico, por lo que es preciso separarlos para poder hacer la dilucidación de la estructura molecular con técnicas como resonancia magnética nuclear, espectroscopia de infrarrojo y espectrometría de masas. Asimismo, se muestran señales hacia campo alto, lo que sugiere también la presencia de compuestos alifáticos, que pueden ser también otros antioxidantes presentes en la chía como tocoferoles y carotenoides.

ACEITE DE LA SEMILLA DE LA CHÍA.

RMN ^1H (400MHz, Cloroformo $-d$). En la Figura 21, se observa la señal del disolvente en aproximadamente 7.3 ppm, en este espectro son mucho más intensas las señales que se encuentran en campo alto pertenecientes a compuestos alifáticos, tales como ácidos grasos, fosfolípidos, carotenoides, tocoferoles, vitaminas liposolubles y pigmentos.

No obstante, también se encuentran señales en aproximadamente 7 ppm, lo que indica la presencia algunos compuestos aromáticos, como los del extracto de polifenoles.

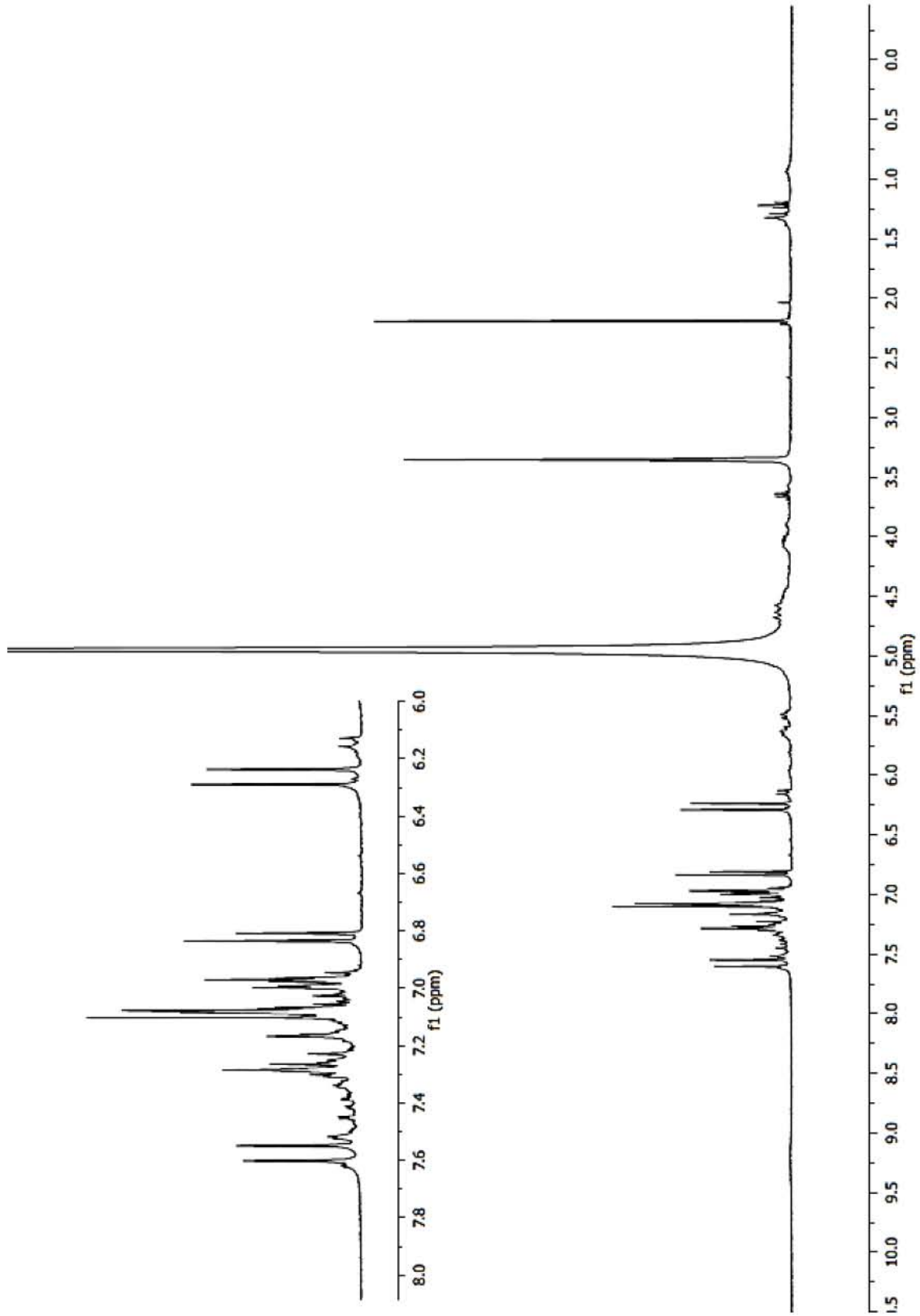


Figura 20. Espectro de RMN ^1H del extracto de polifenoles de la chía.

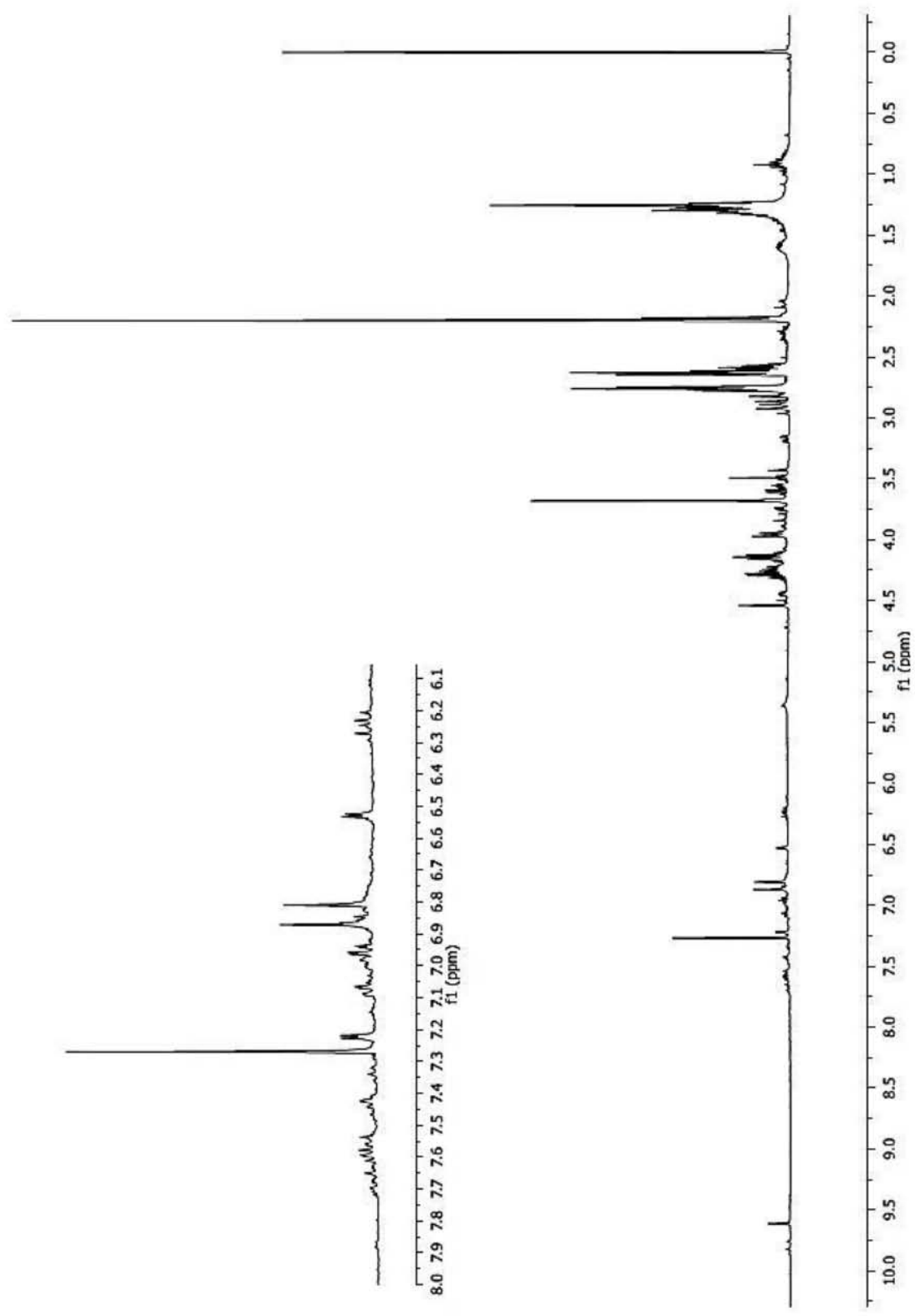


Figura 21. Espectro de RMN ^1H del aceite de chía.

5.1.3 *Confirmación de la masa molecular de los polifenoles obtenidos en las fracciones mediante HPLC-MS*

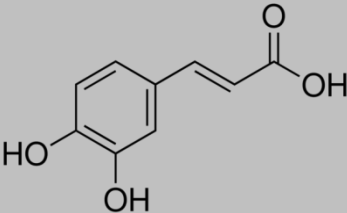
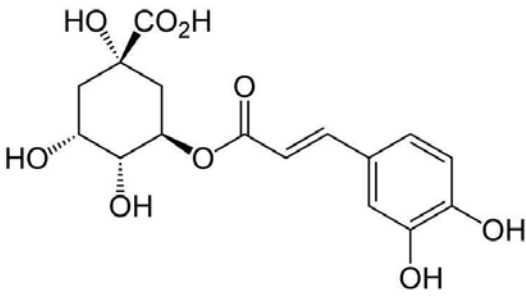
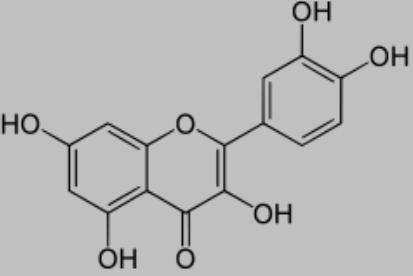
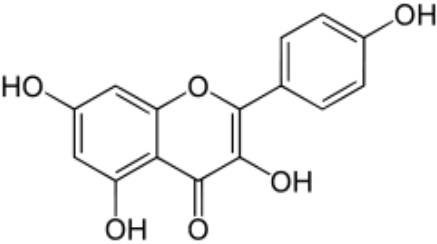
Marineli, *et al.*, (2008) evidenciaron la presencia de ácido clorogénico, quercetina, miricetina y ácido decarboxilmetil elenólico unido a hidroxitirosol. Sin embargo, Reyes-Caudillo *et al.*, (2008) reportaron también la presencia de ácido cafeico y kaempferol. Las diferencias se pueden deber al tipo de extracción, técnicas de identificación empleadas y procedencia de las semillas empleadas en los experimentos mencionados.

Las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna y posteriormente analizadas mediante espectroscopia de resonancia magnética protónica, puede ayudar a dilucidar una estructura molecular con base en la presencia de protones químicamente no equivalentes.

Con el análisis de las fracciones mediante HPLC-MS se pretende diferenciar las fracciones con base en su tiempo de retención y su masa molecular. Asimismo, se han analizado con esta técnica el extracto de polifenoles y el aceite de chía con el fin de conocer la proporción en que los compuestos identificados se encuentran en ellos.

Se utilizaron 4 compuestos estándar, los cuales se muestran en la tabla 10 con su estructura y peso molecular reportado.

Tabla 11. Compuestos estándar utilizados en el análisis HPLC-MS.

Compuesto	Estructura	Peso molecular (g/mol)
Ácido cafeico		180.16
Ácido clorogénico		354.31
Quercetina		302.24
Kaempferol		286.24

Primeramente, para tener el punto de comparación de los tiempos de retención, se obtuvo el cromatograma con un equipo Agilent 1200 de la mezcla de los compuestos estándar. En la siguiente figura se

muestran el cromatograma y los respectivos tiempos de retención de los compuestos.

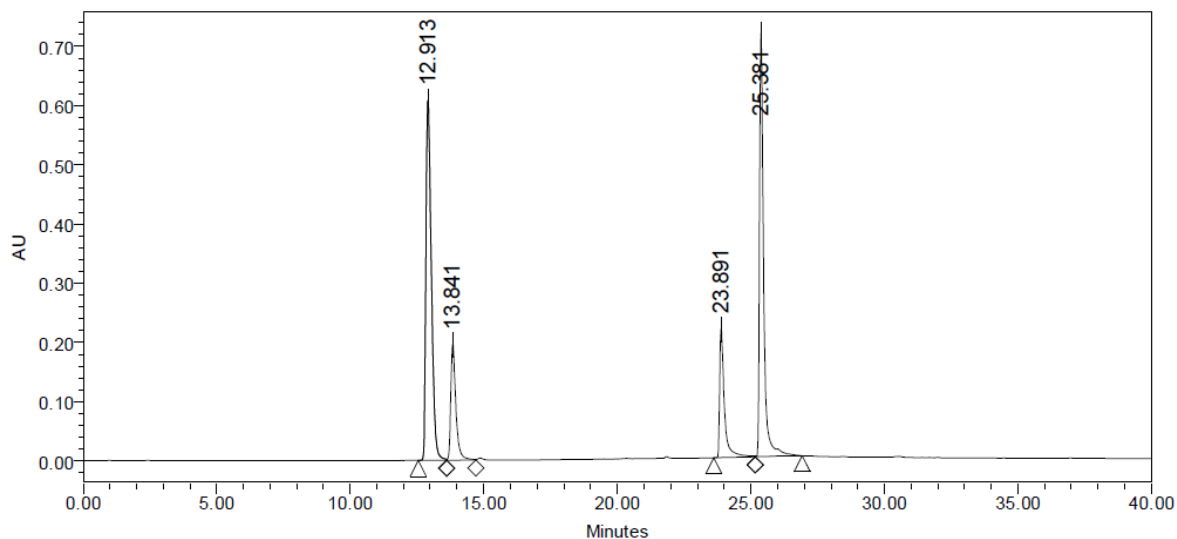


Figura 22. Cromatograma de los compuestos estándar.

Tabla 12. Tiempos de retención y áreas de los compuestos estándar.

Compuesto	t_r' (minutos)	Área	% Área
Ácido cafeico	12.913	8712736	39.96
Ácido clorogénico	13.841	2615800	12.00
Quercetina	23.891	2661581	12.21
Kaempferol	25.381	7814226	35.84

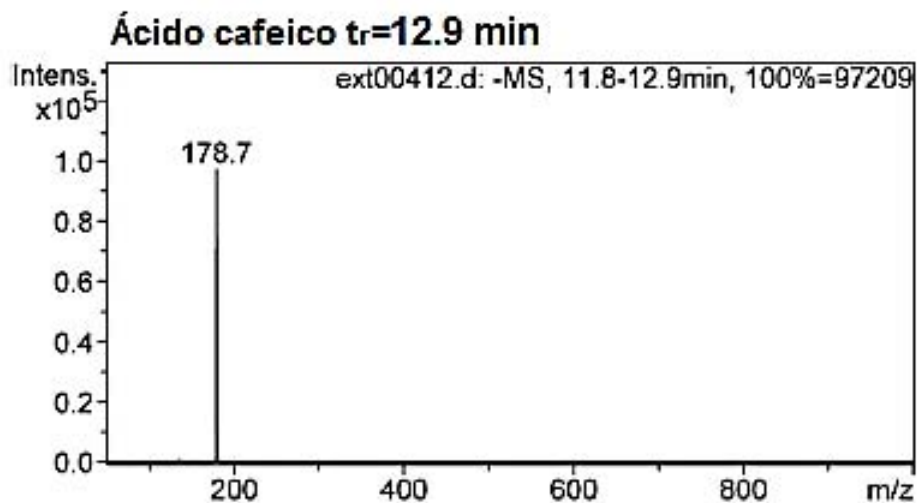
A continuación se observan los espectros de masas de dichos compuestos, por orden de tiempo de retención, se observa primero el ácido cafeico que tiene una masa molecular calculada de 180.16 g/mol, que tiene un ion molecular de 180.6 con una intensidad de 770×10^5 A, no obstante el ion de mayor abundancia es el que tiene una masa molecular de 178.7, o sea, $(M-1)^+$.

El ion que le sigue en abundancia corresponde a la masa de la estructura sin el grupo carboxilo (135.4)

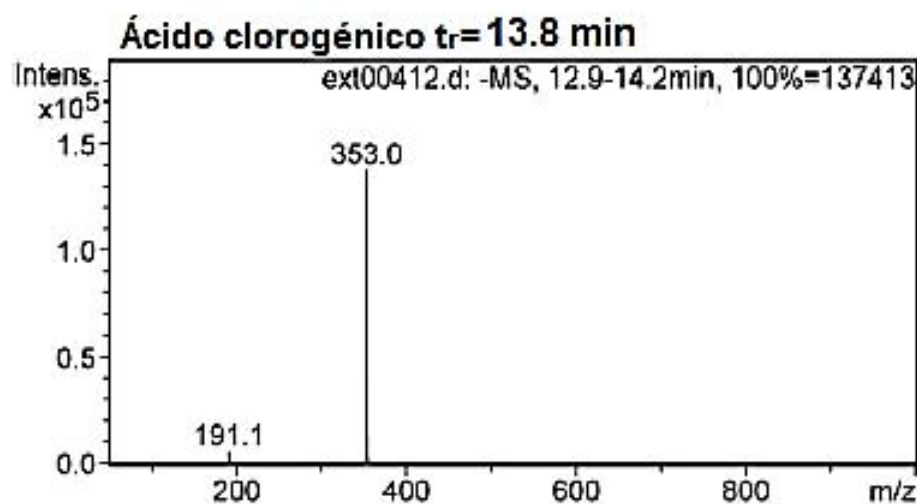
Después, se observa el espectro del ácido clorogénico, que teóricamente tiene una masa molecular de 354.3 g/mol, para el cual se encontró que su ion molecular tuvo una intensidad de 2185×10^5 A, mientras que el pico base de 353.0 es nuevamente $(M-1)^+$ y el ion molecular que le sigue en abundancia corresponde al carbohidrato (191.1.)

Para el espectro de la quercetina, con una masa molecular calculada de 302.24g/mol, el pico base nuevamente es $(M-1)^+$ con un valor de 300.8, mientras que para el espectro del kaempferol, la masa molecular teórica es de 286.24 g/mol y el pico base otra vez vuelve a ser $(M-1)^+$, de 284.8, mientras que el ion molecular, en menor abundancia, se encuentra al 1.36%.

Las corrientes de iones que salen del analizador son de una intensidad que van del orden de 10^{-8} - 10^{-14} A, estas bajas intensidades originan un problema a la hora de realizar la detección, que debe de ser rápida y precisa.



#	m/z	I
1	135.4	669
2	155.5	480
3	177.5	390
4	178.7	97209
5	180.6	770
6	192.7	179
7	270.8	214



#	m/z	I
1	191.1	5462
2	353.0	137413
3	354.6	2185
4	355.7	251
5	368.9	372

Figura 23a. Espectros de masa de los compuestos estándar.

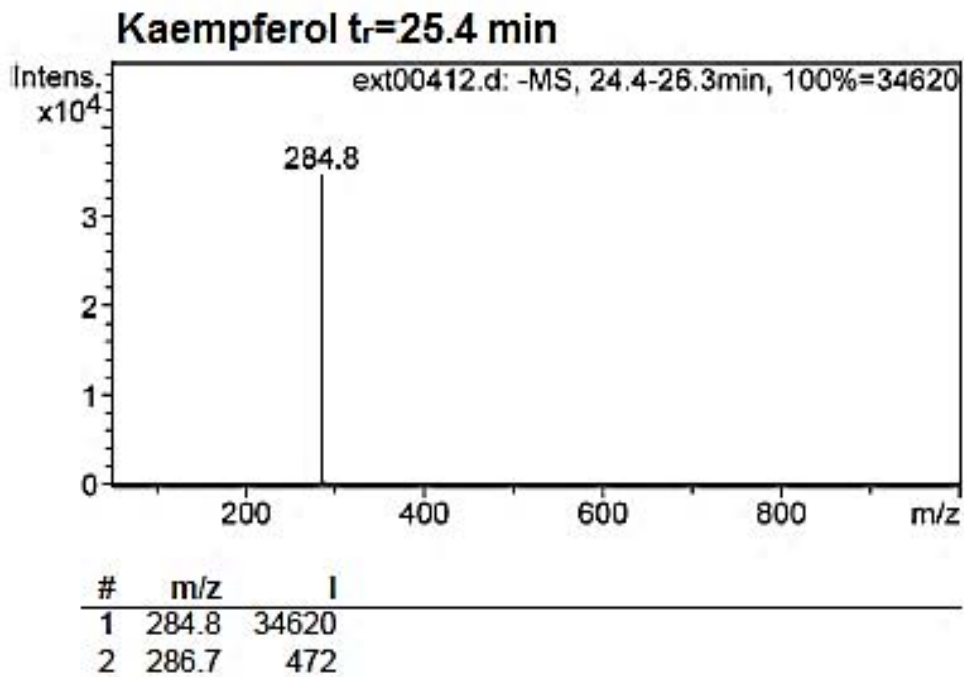
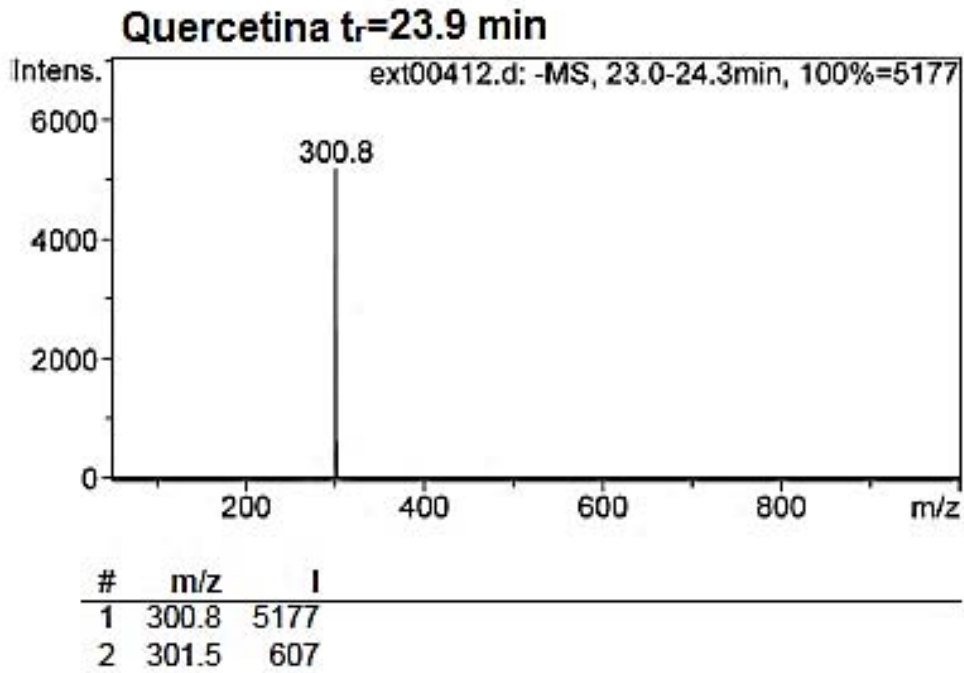


Figura 23b. Espectros de masa de los compuestos estándar.

Se hizo el análisis de HPLC-MS de las fracciones obtenidas mediante cromatografía preparativa en columna. Para la fracción C1, se

muestra el cromatograma y el espectro de masas (ver Figura 24), para los cuales se observa coincidencia en el tiempo de retención (13.0) y el pico base y los iones moleculares con el ácido cafeico, que confirman junto con el espectro de resonancia magnética nuclear la presencia de ácido cafeico en el extracto de polifenoles de la chía estudiada.

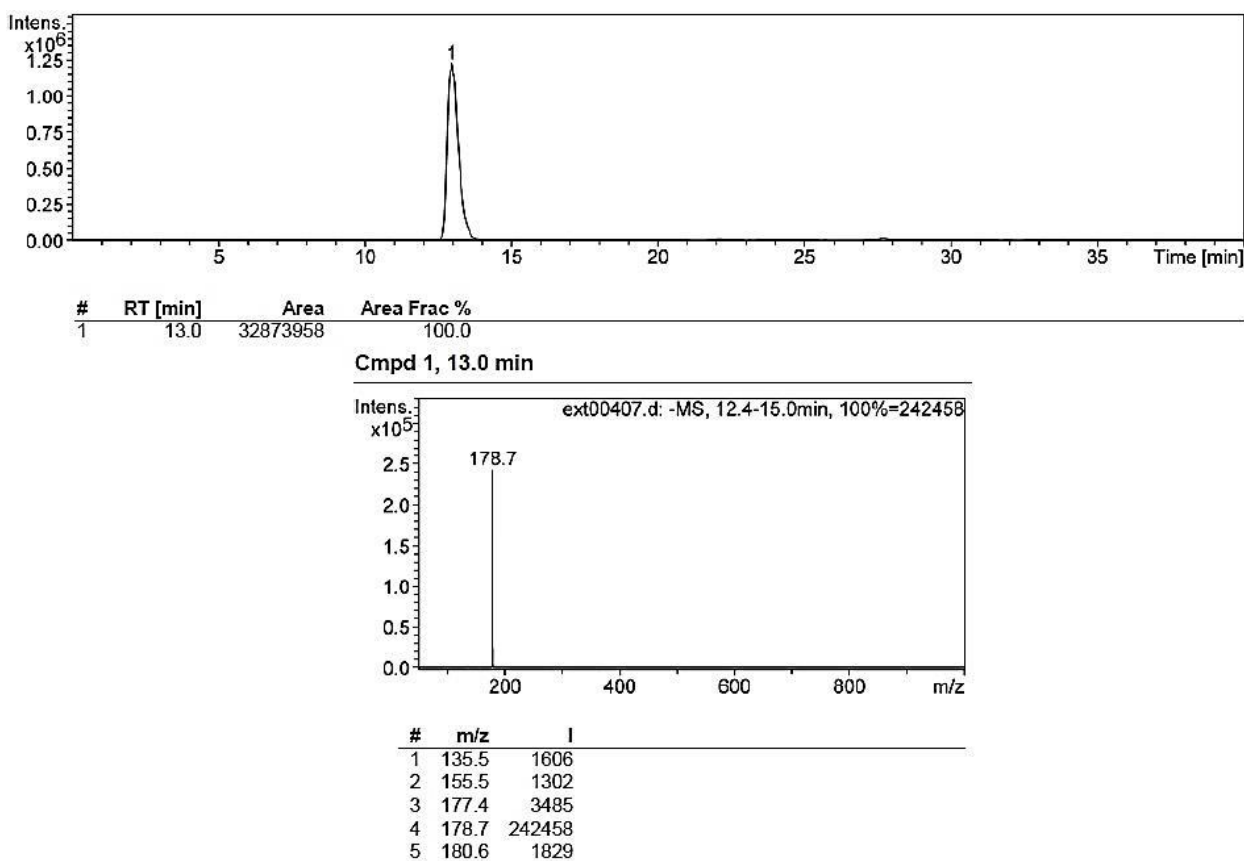


Figura 24. Análisis HPLC-MS de la fracción C1 que corresponde al ácido cafeico.

Para la fracción C2, se confirmó también, junto con el espectro de RMNH¹ la presencia de ácido cafeico, la Figura 25 muestra el estudio en el cual se observa un tiempo de retención (13.1) y los iones moleculares que corresponden a dicha molécula.

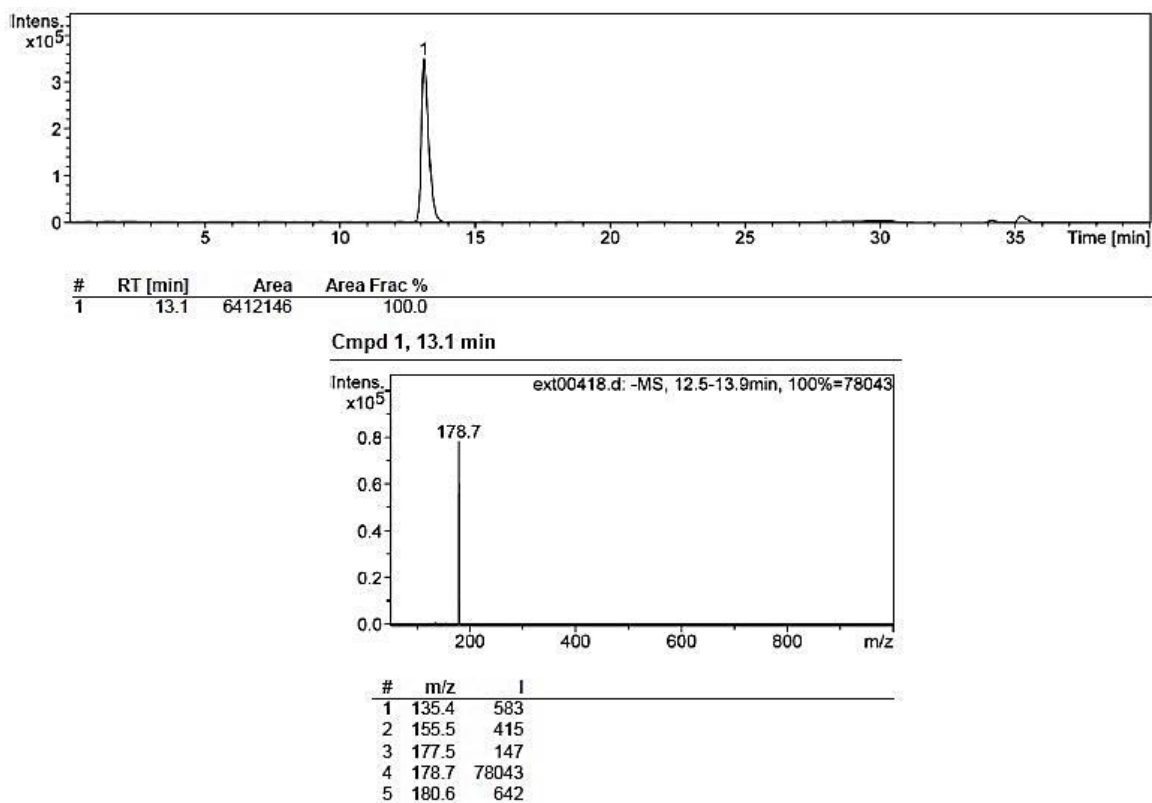
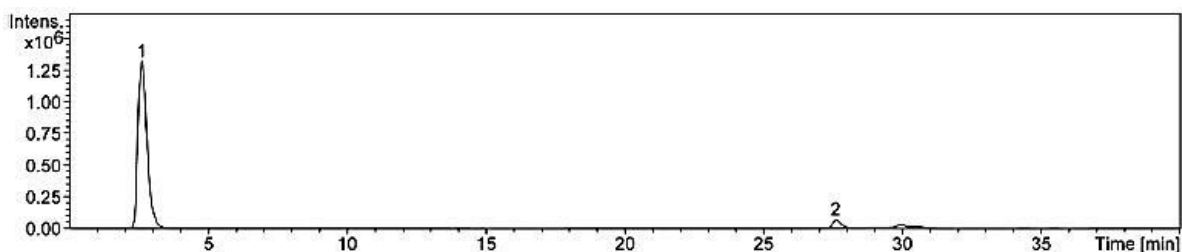


Figura 25. Análisis HPLC-MS de la fracción C2 que corresponde al ácido cafeico.

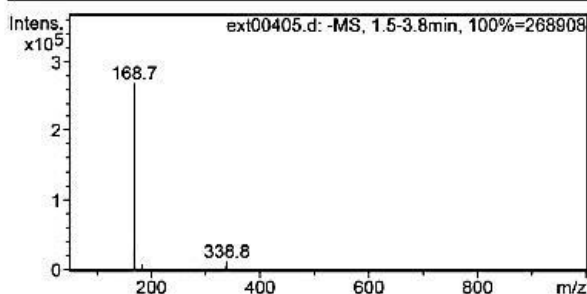
La fracción G (ver Figura 26), no tiene un compuesto estándar contra el cual se pueda comparar, sin embargo, en el cromatograma se observa un tiempo de retención del compuesto 1 de 2.6 min y de otra impureza que tiene un pico base con una relación m/z de 331.1.

El compuesto 1 tiene el ion molecular correspondiente a la masa molecular del ácido gálico en una proporción al 0.76%, mientras que el pico base corresponde al ion $(M-1)^+$.



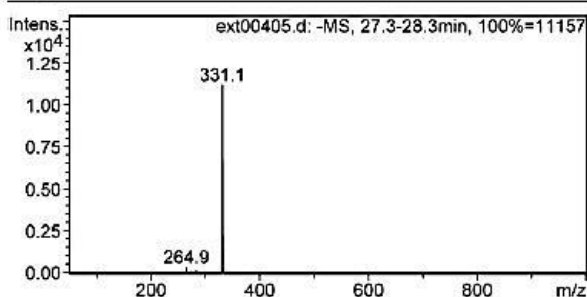
#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	2.6	29983418	96.1
2	27.6	1226043	3.9

Cmpd 1, 2.6 min



#	m/z	I
1	168.7	268908
2	170.7	2059

Cmpd 2, 27.6 min



#	m/z	I
1	264.9	299
2	331.1	11157
3	332.9	173

Figura 26. Análisis HPLC-MS de la fracción G que corresponde al ácido gálico.

En la Figura 27, se muestra el cromatograma y espectro de masas de la fracción K, en la cual se muestra la presencia de kaempferol, con un tiempo de retención de 25.6 min, ligeramente mayor con respecto al estándar (24.9min) y que obtiene un pico base con un ion molecular (M-1)⁺ de 284.4, igual al estándar. Junto con la evidencia del espectro de resonancia magnética nuclear, se confirma la presencia de este

polifenol. Asimismo, cabe destacar que en esta fracción, se observa la presencia de otro compuesto no detectado por resonancia magnética nuclear debido a que está considerablemente en menor proporción con respecto al kaempferol. Esta sustancia tiene un ion molecular con una relación m/z s 331.1, para el cual no se puede proponer estructura alguna puesto que no se tiene el espectro de RMN 1H .

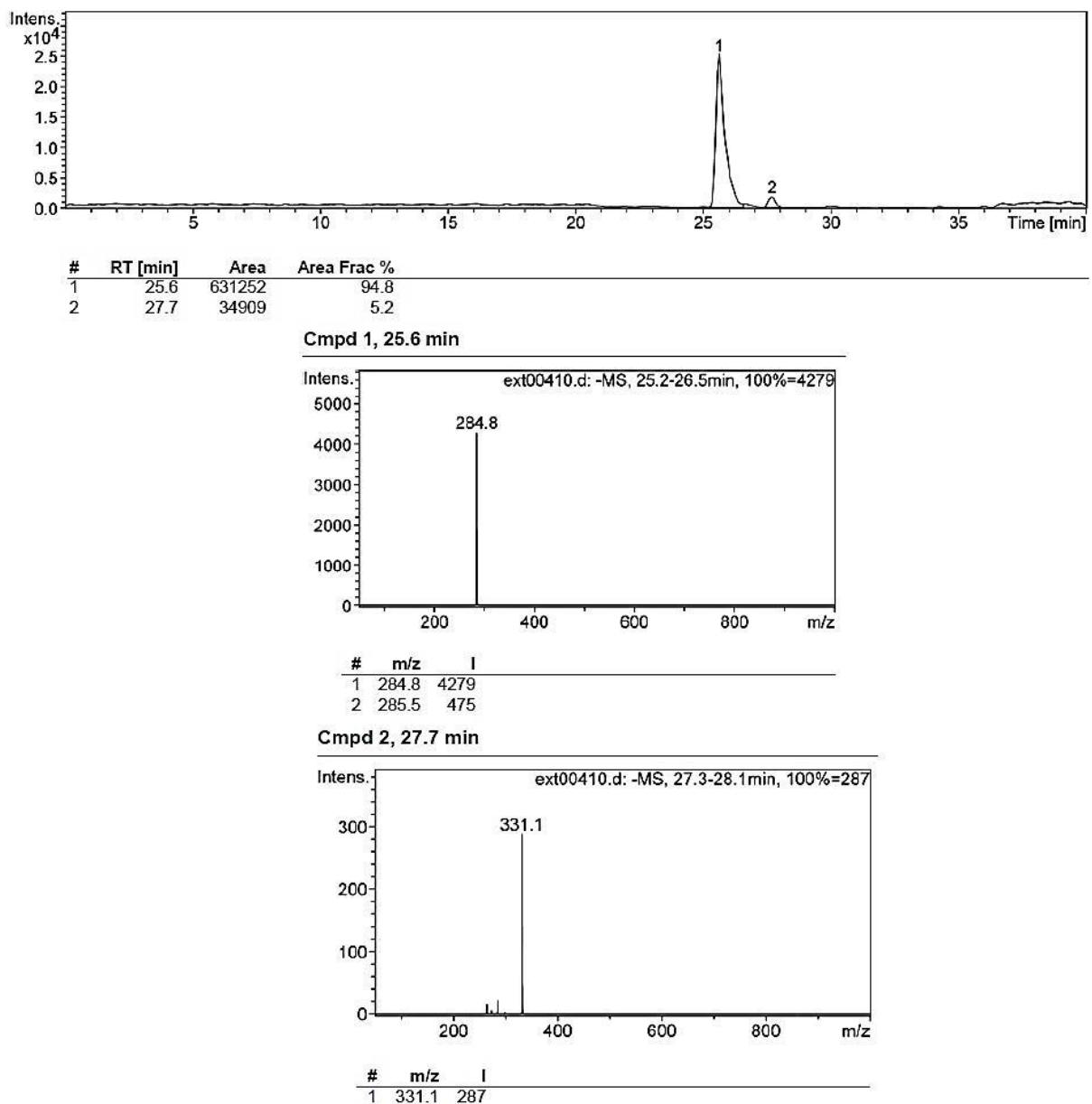


Figura 27. Análisis HPLC-MS de la fracción K que corresponde al kaempferol.

Para la fracción K2 (ver Figura 28), nuevamente se confirma la presencia de kaempferol, el cual en este análisis presenta un tiempo de retención ligeramente mayor (25.5 min) con respecto al estándar. El espectro de masas muestra el pico base con un ion $(M-1)^+$, mientras que el ion molecular está en una proporción del 1.24%.

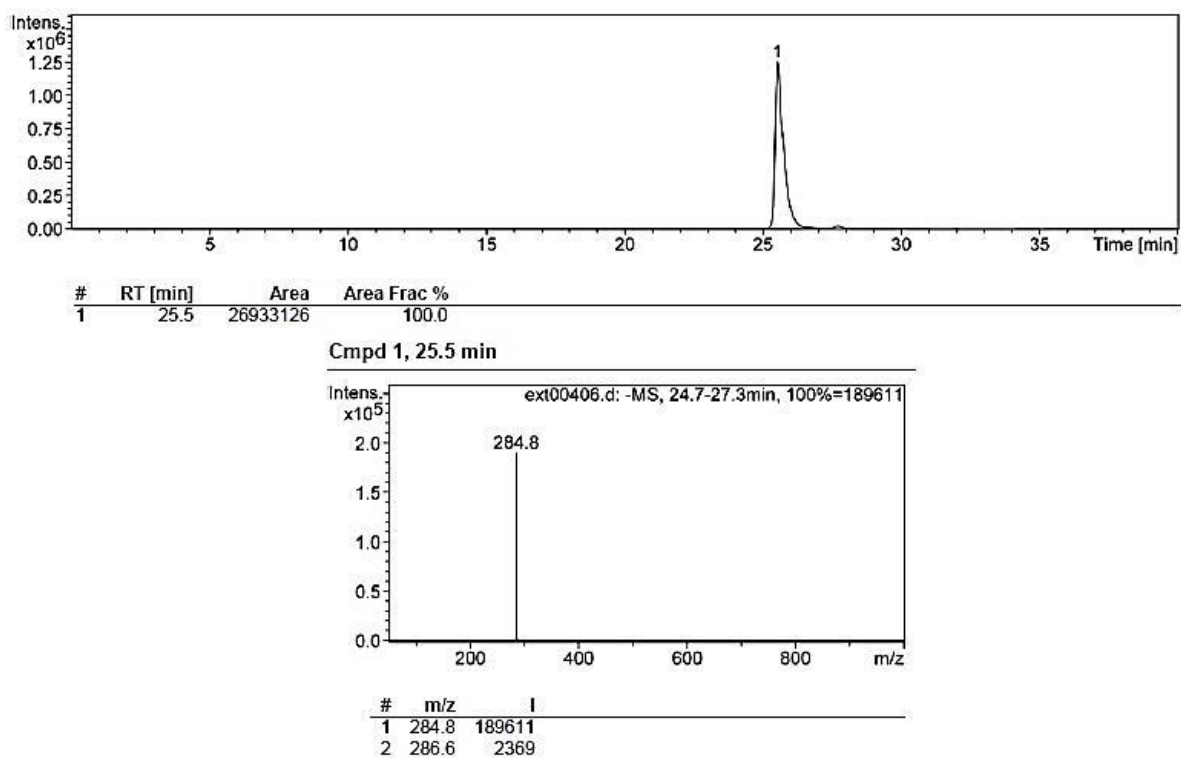


Figura 28. Análisis HPLC-MS de la fracción K que corresponde al kaempferol.

La fracción X (ver Figura 29), correspondiente a la estructura propuesta para el ácido vainílico (ácido 4-hidróxi-3-metoxibenzoico), se obtuvo el análisis de HPLC-MS, en el cual se observa un tiempo de retención de 12.1 minutos y en el espectro de masas se obtuvo un ion molecular con m/z de 168.7 con una proporción de 0.79% con respecto al pico base y que corresponde a la masa mol teórica de 168.14 g/mol.

Asimismo, el pico base corresponde a $(M-1)^+$ con una relación m/z de 166.7.

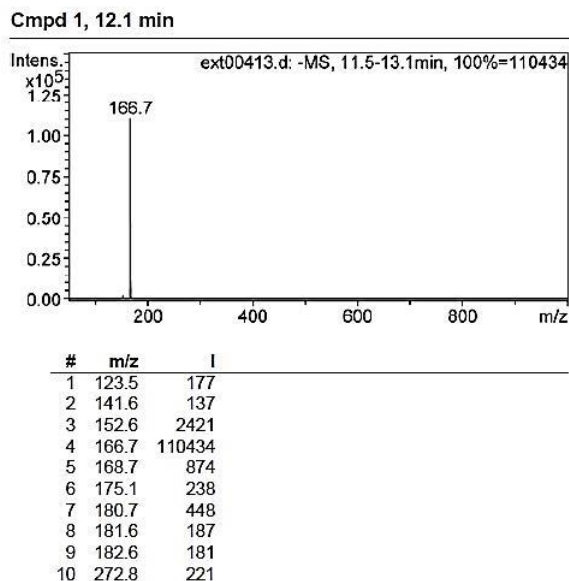
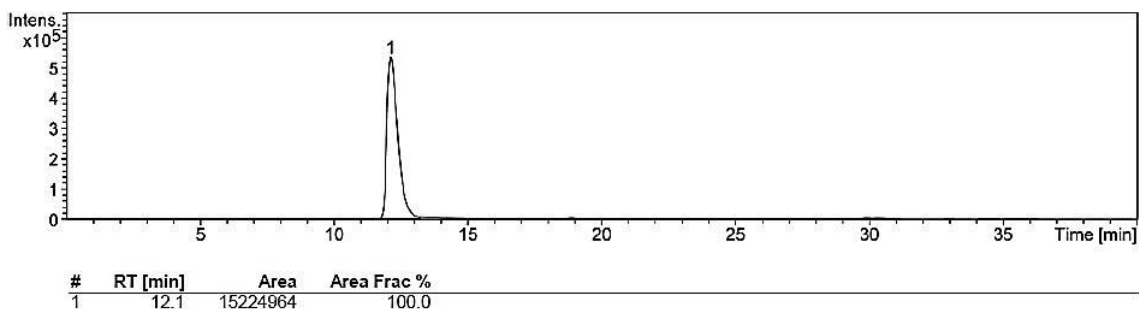
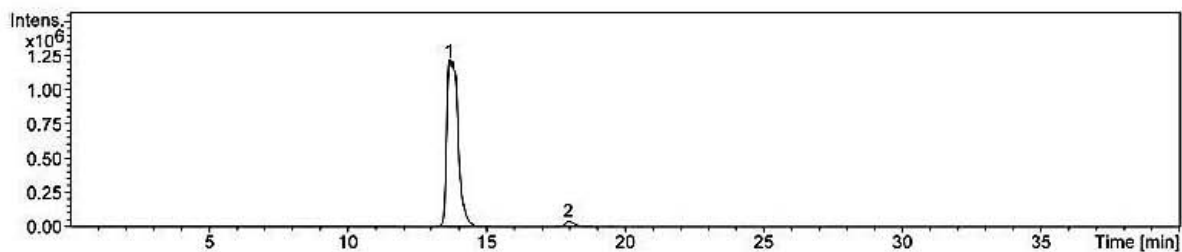


Figura 29. Análisis HPLC-MS de la fracción X que corresponde al ácido vainílico.

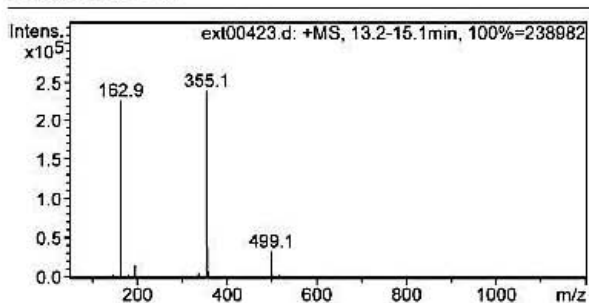
Finalmente, se realizó el análisis HPLC-MS de la fracción Z (ver Figura 30), el cual con base en el espectro de resonancia magnética protónica, se propone la estructura del ácido clorogénico. El compuesto muestra un tiempo de retención de 13.7 min, el cual es casi igual con respecto al compuesto estándar (13.8 min). También se observa una impureza desconocida con un tiempo de retención de 17.9 minutos y un espectro de masas con un pico base de 372.1. El compuesto 1, que supuestamente es ácido clorogénico, es diferente con respecto al del compuesto estándar, ya que en este el pico base tiene un valor de relación m/z de 355.1, el pico con un valor de 163.9 corresponde a la aglicona sin un grupo hidroxilo y posteriormente el pico con una

abundancia del 94.96% con un hidrógeno menos. Dado lo anterior, con base en los análisis de RMN ^1H y HPLC-MS, se corrobora de nuevo la presencia del ácido clorogénico.



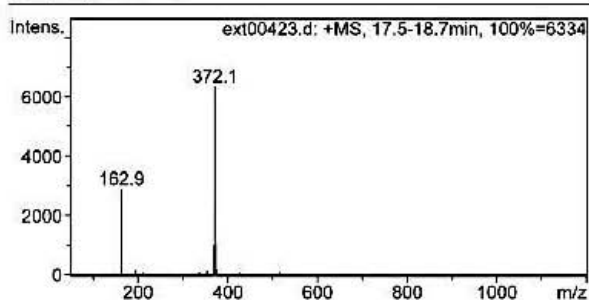
#	RT [min]	Area	Area Frac %
1	13.7	34309035	97.7
2	17.9	824965	2.3

Cmpd 1, 13.7 min



#	m/z	I
1	162.9	226951
2	163.9	22132
3	194.9	14922
4	337.1	4363
5	355.1	238982

Cmpd 2, 17.9 min



#	m/z	I
1	162.9	2883
2	163.9	262
3	194.9	151
4	354.1	134
5	369.2	993
6	370.2	152
7	372.1	6334
8	373.0	1103

Figura 30. Análisis HPLC-MS de la fracción Z que corresponde al ácido clorogénico.

5.2 Formación de películas activas

5.2.1 Análisis químico proximal de la piel de pollo y del extracto de proteína obtenido a partir de la misma

Se realizó el análisis químico proximal de la piel de pollo a partir de la cual se extrajo el colágeno, el componente de interés en esta es la proteína, para la cual se obtuvo un valor menor con respecto al último reportado en la base de datos más reciente de la USDA.

Tabla 13. Análisis químico proximal de la piel de pollo.

Datos	Experimentales(*)	USDA (2015)
Humedad	50.28 ±0.97%	54.22%
Cenizas	0.28 ±0.03%	No reportado
Grasa	36.77 ±0.87%	32.35%
Proteína	10.54±1.83%	13.33%

(*) Promedio de 3 determinaciones.

Se realizó la extracción de proteína por lotes, mediante el método descrito anteriormente; después de solubilizar las proteínas a 55 °C (ver Figura 31), se procedió a precipitarlas mediante la disminución de pH al punto isoeléctrico (pI=3.5), lo cual aumenta las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y promueve la precipitación (Omana *et al.*, 2010).



Figura 31. Sobrenadante obtenido de la extracción proteica a 55°C/4 h con agitación a 550 rpm.

Asimismo, se realizó el análisis químico del producto de la extracción de proteína, que consistió en un pellet de aspecto amorfo, elástico de color blanco (ver Figura 32), los resultados se muestran en la Tabla 14.

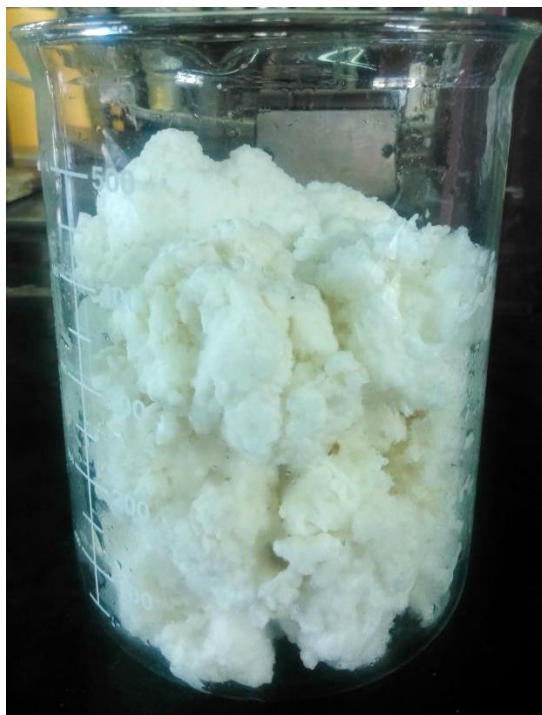


Figura 32. Pellet obtenido de la precipitación isoeléctrica de la proteína.

Tabla 14. Análisis químico proximal del pellet resultante de la extracción proteica.

Componente	Concentración (g/100 g de pellet) *
Humedad	68.73±1.50
Proteína total	23.29±2.42
de la cual:	
Proteína soluble	19.21±4.69
Grasa total	3.05±0.56
Cenizas	3.11±0.15

(*) Promedio de 25 repeticiones de diferentes lotes.

Con base en los resultados anteriores y tomando en cuenta que por cada lote de extracción, se obtuvo un rendimiento de obtención de pellet

a partir de la piel de pollo del $18.13 \pm 5.44\%$, se obtuvo un rendimiento total de 40.07% , en términos de proteína total extraída y de la proteína total procedente de la piel de pollo.

Por otro lado, debido a que para la formación de películas se requiere de proteína soluble en agua, se determinó su concentración en el pellet mediante el método de Lowry.

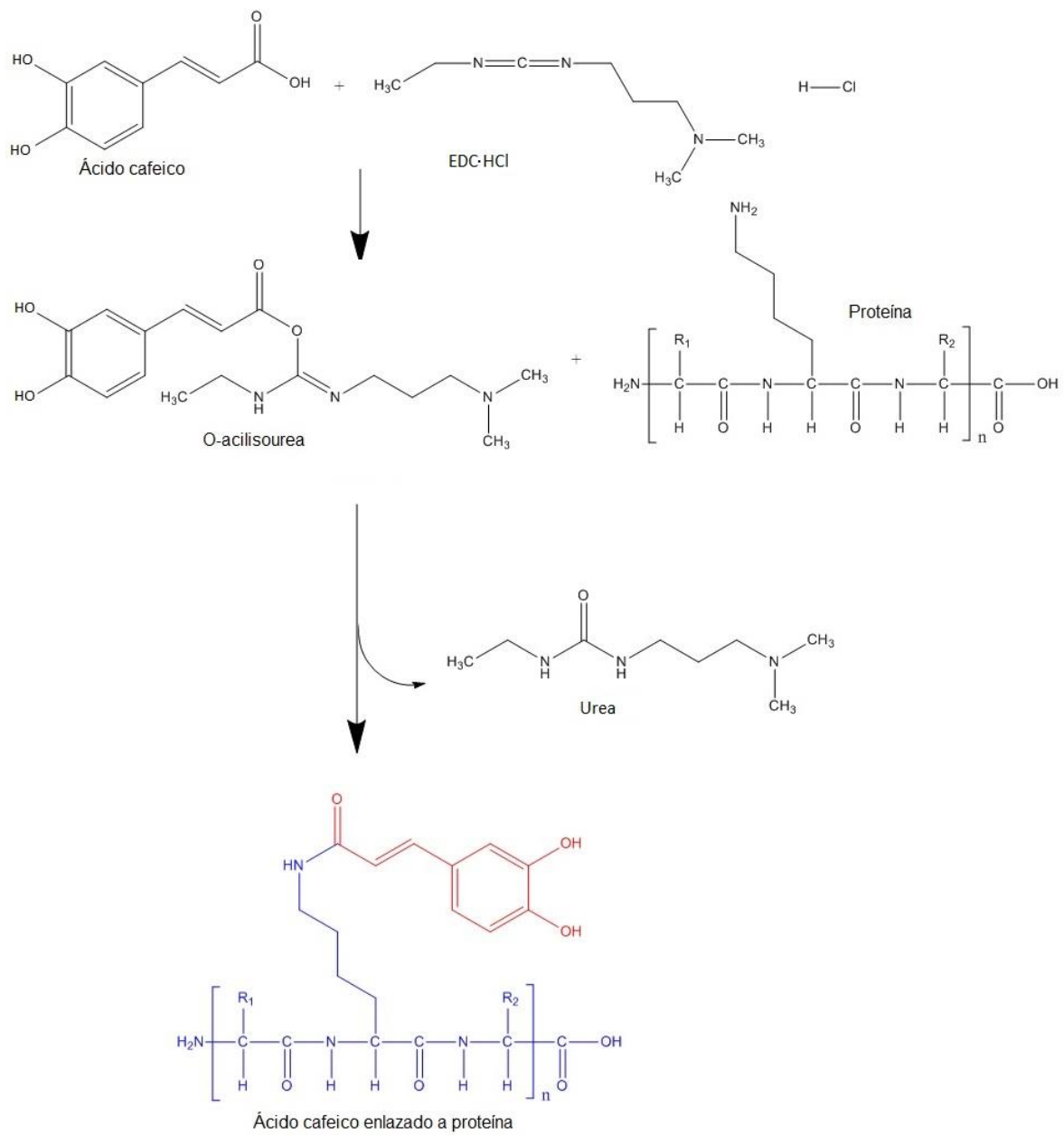
Por consiguiente, tomando en cuenta que el pellet tiene una concentración de 19.21% de proteína soluble, el rendimiento de extracción de esta resulta ser de 33.05% . Este resultado se debe a las pérdidas generadas durante el proceso de extracción, ya que pudo haber pérdidas en la extracción básica, en la ácida e incluso el alto contenido de grasa no removida de la materia prima puede interferir en el proceso. No obstante, cabe destacar que el rendimiento fue aún mayor que el reportado por Alcocer (2011), que fue de 2.67 g de proteína soluble por cada 100 g de proteína total de piel de pollo, el cual fue obtenido por un proceso de solubilización alcalina según una modificación del método de Selmane *et al.* (2008) y Omana *et al.* (2010). Con esto, se demuestra que se optimizó el proceso de extracción de proteína con la extracción ácida y básica previas a la extracción por solubilización a 55 °C y el tiempo empleado en cada una de ellas.

5.2.2 Reacción de acoplamiento del ácido cafeico a la proteína

La reacción de acoplamiento consiste en un ataque nucleofílico de una amina primaria (procedente de residuos de lisina de la proteína o grupo amino terminal) al carbono carbonílico del grupo carboxílico del ácido cafeico de la chía, formando así un enlace amida (ver Esquema 3). Se realizó el procedimiento anteriormente descrito, agregando primeramente al medio de reacción el ácido cafeico a una concentración de 200 ppm con respecto a la cantidad de proteína soluble en el pellet a

reaccionar y el reactivo de acoplamiento (EDC·HCl), el cual se agregó con base en la estequiometría de la reacción tomando en cuenta los mol de ácido cafeico agregados; se agitaron a temperatura ambiente a pH de 7 en agua destilada durante 1 hora, para posteriormente agregar el pellet desmenuzado y se dejó en agitación constante durante 24 horas en las mismas condiciones, obteniéndose un pellet ligeramente pigmentado de color amarillo al final de la reacción.

La formación de las películas, como se describe en la metodología, está formulada al 5 % de proteína, por lo cual, para la formación de 78.54 cm² de película, se requieren 3 g de proteína aproximadamente, que reaccionan con 200 ppm, es decir, con 0.6 g de ácido cafeico, para comprobar qué tanto de este se unió se realizaron las pruebas de determinación de ácido cafeico remanente y grupos amino libres.



Esquema 3. Posible ruta de reacción de acoplamiento ácido cafeico-proteína.

5.2.3 Comprobación de la unión química aglicona-proteína

5.2.3.1 Cuantificación de ácido cafeico remanente de la reacción

Una vez finalizada la reacción, se utilizaron varias vías para confirmar la unión del polifenol a la proteína. Para ello una vez terminada la reacción de acoplamiento, se separó la proteína y se le realizaron 5 lavados con agua destilada, con el fin de quitar el ácido cafeico remanente de la reacción. Se juntó con el agua del medio de reacción en donde también se esperaba la presencia de ácido cafeico para cuantificarlo por medio del método de Folin-Ciocalteu, esto con la finalidad de medir el ácido cafeico que no se unió a la proteína y solo quedó atrapado en el pellet y diferenciarlo del que sí se unió. Los resultados se observan en la siguiente tabla.

Tabla 15. Concentraciones de ácido cafeico remanente obtenidos mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Procedencia	Concentración de ácido cafeico (ppm) (*)
Agregado al principio de la reacción	200
Agua del medio de reacción	81.74±6.93
Agua de enjuague	10.98±2.82
Rendimiento de la reacción	53.63%

(*) Resultados de 10 repeticiones de diferentes lotes en partes por millón con respecto a la proteína.

Con base en los resultados de esta prueba, se observa indirectamente que el 53.63% del ácido cafeico agregado sí reaccionó

con la proteína, no obstante, no es prueba suficiente para decir que sí se llevó a cabo la formación del enlace amida.

Tomando en cuenta este rendimiento, se puede decir, que para una película de 78.54 cm², se unen solamente 0.32 g del ácido cafeico que se agregan al medio de reacción. No se comprueba que se haya formado la unión covalente proteína-aglicona, sin embargo, junto con los resultados de cuantificación de ácido cafeico remanente y grupo amino libre, se puede deducir que efectivamente se forma la unión química.

5.2.3.2 Cuantificación de grupo amino primario

El grupo amino primario presente en las proteínas, ya sea en residuos de lisina o amino terminal, es un grupo altamente reactivo que tiende a reaccionar con nucleófilos, para formar bases de Schiff, provocando una disminución en la concentración de grupos amino libres.

La reacción del TNBS con los grupos amino primarios es un método indirecto que permite confirmar el acoplamiento del ácido cafeico con los grupos amino de la proteína. En las Gráficas 33, 34 y 35 se muestra el resumen de los resultados de la concentración de grupo amino en los diferentes lotes de proteína de piel de pollo que fueron sometidos a reacción de acoplamiento con ácido cafeico en las condiciones señaladas anteriormente. Así, una reducción en la absorbancia implica una disminución en los grupos aminos libres de la proteína.

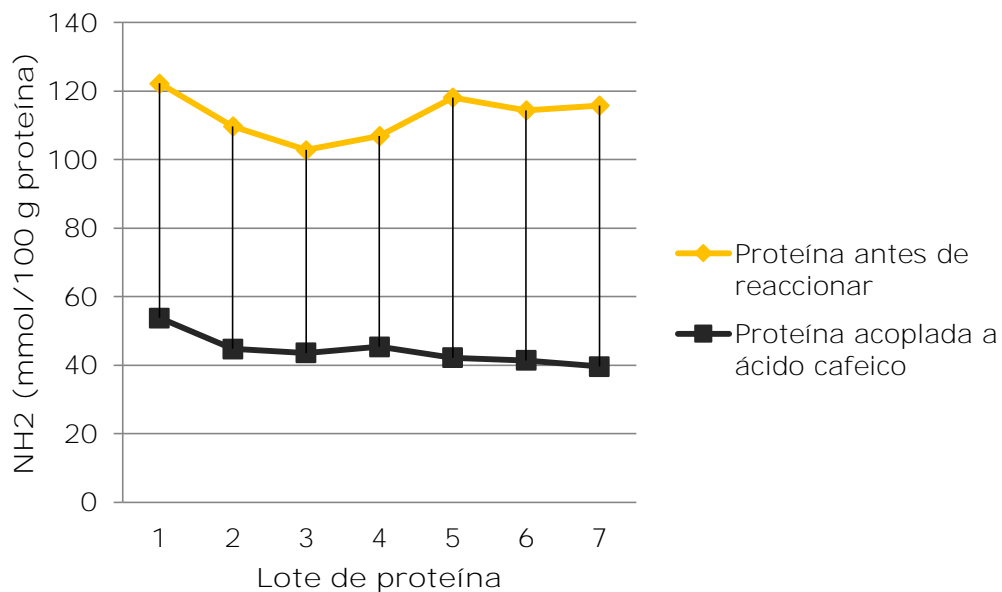


Figura 33. Concentración de grupos amino en proteína de piel de pollo antes y después de someterse a la reacción de acoplamiento con ácido cafeico.

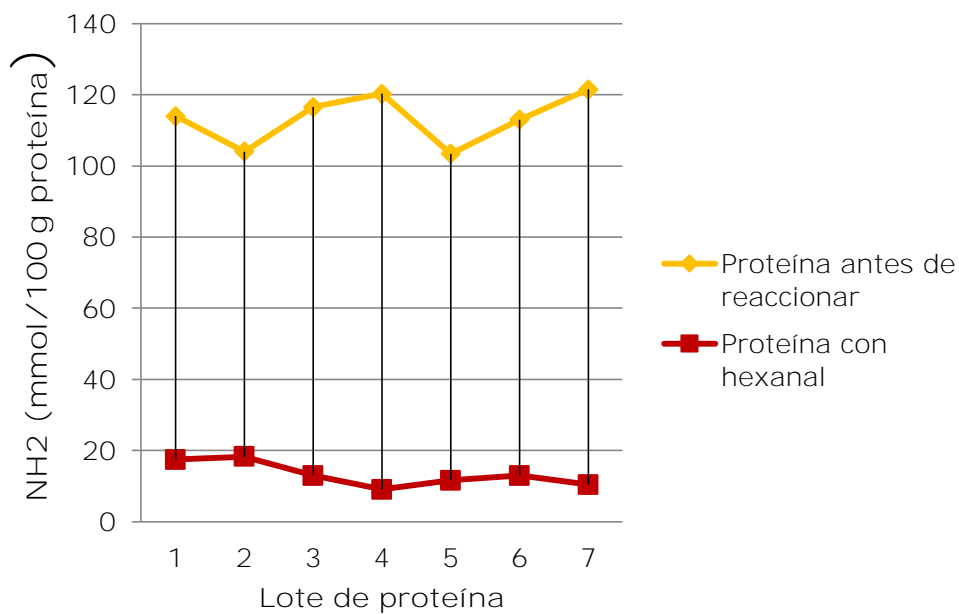


Figura 34. Concentración de grupos amino en proteína de piel de pollo antes y después de someterse a la reacción con hexanal.

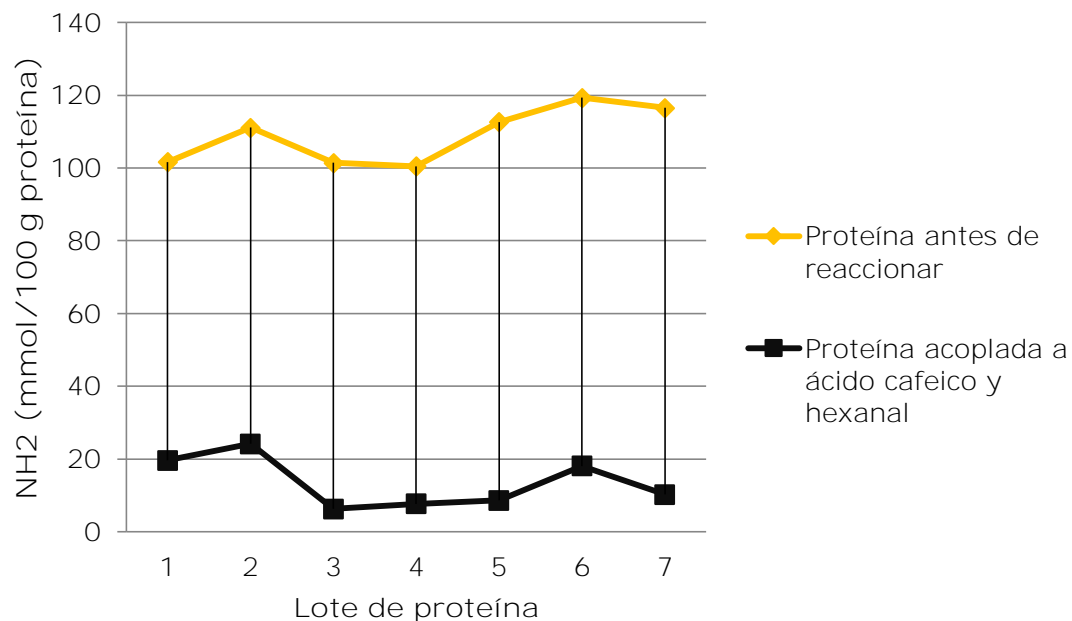


Figura 35. Concentración de grupos amino en proteína de piel de pollo antes y después de someterse a la reacción de acoplamiento con ácido cafeico y hexanal.

A continuación, se muestra una tabla con la diferencia de concentración de grupos amino en la proteína blanco y la ya acoplada con ácido cafeico (WCA), con hexanal (WH) y ácido cafeico con hexanal (WHCA); lo cual proporciona de forma indirecta la cantidad de grupos amino que reaccionaron con el polifenol y el aldehído.

Con base en el promedio de la cantidad de aminas primarias reaccionadas y el promedio de la cantidad de aminas primarias inicial de la proteína, se obtiene un rendimiento de reacción de 60.62%, resultado que es mayor con respecto al obtenido en la cuantificación de ácido cafeico remanente. Este resultado refleja la reacción de unión química del ácido cafeico a los grupos amino primarios de la proteína y que el rendimiento es alto al agregar 200 ppm del polifenol al inicio de la reacción, ya que provoca un alto grado de sustitución.

Por lo tanto, con base en el rendimiento anterior, para la formación de una película solamente de 78.54cm², en la cual se requieren 3 g de proteína para su formación, se unieron 0.6061 g de ácido cafeico por cada gramo de proteína.

Tabla 16. Cuantificación indirecta de grupos amino que reaccionaron.

Lote de proteína Diferencia de concentración de grupos amino
 (mmol NH₂/100 g proteína)

	Proteína WCA	Proteína WH	Proteína WHCA
1	68.50	96.57	82.04
2	64.97	85.77	86.95
3	59.27	103.63	95.19
4	61.63	111.29	92.84
5	75.96	91.85	104.02
6	73.01	100.10	101.28
7	76.15	111.09	106.38
PROMEDIO	68.50±6.82	100.04±9.52	95.53±9.00

Por otro lado, la reacción de la proteína con el aldehído (60 °C, 2 h) conlleva a un rendimiento de reacción de 88.2%, lo que significa que esta transformación procede con una sustitución 31.5% más alta con respecto a la reacción de acoplamiento con el ácido cafeico. Este resultado es muy similar en la proteína reaccionada con ácido cafeico y hexanal, puesto que se obtiene un rendimiento de 87.7%.

Lo anterior permite inferir que el hexanal suprime la unión de ácido cafeico a la proteína mediante la reacción de acoplamiento en

estas condiciones. No obstante, hasta el momento no se cuenta con una explicación certera para el resultado anterior.

5.2.4 Formulación de las biopelículas

Se formaron las siguientes películas con su correspondiente codificación. En la siguiente tabla se detallan sus características organolépticas.

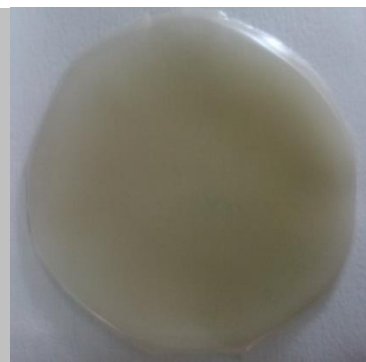
El ajuste del pH favorece tanto la disolución de la proteína como la inmersión del plastificante, evitando así las interacciones proteína-proteína, lo que resulta en una mayor flexibilidad.

Tabla 17. Características de las películas.

Película	Características	Imagen
Blanco (B)	Espesor*: 0.24 ± 0.06 mm Blanca y opaca, con superficie brillante. Textura lisa.	
Con ácido cafeico (WCA)	Espesor*: 0.24 ± 0.01 mm Color ámbar y ligeramente menos opaca que las películas blanco y WH, con superficie brillante. Textura lisa.	

Con ácido
cafeico y
nisina
(WCAN)

Espesor*: 0.22 ± 0.02 mm
Coloración ligera ámbar y
significativamente menos opaca
que las películas blanco y WH, con
superficie brillante.
Textura lisa.



Con hexanal
(WH)

Espesor*: 0.23 ± 0.04 mm
Blanca y opaca, con superficie
brillante.
Textura ligeramente rugosa.



Con hexanal
y ácido
cafeico
(WHCA)

Espesor*: 0.23 ± 0.03 mm
Color café y ligeramente menos
opaca que la película blanco, con
superficie brillante.
Textura lisa.



Con hexanal,
ácido cafeico
y nisina
(WHCAN)

Espesor*: 0.22 ± 0.03 mm
Color café y significativamente
menos opaca que todas las demás
películas, con superficie brillante.
Textura lisa.



**El grosor corresponde al promedio de 10 mediciones de 3 películas.*

5.2.4.1 Capacidad antioxidante de las películas

Se determinó la capacidad antioxidante de las películas mediante los métodos ya utilizados para los polifenoles de la chía, para ello se disolvieron y se ajustaron a la misma concentración de antioxidante. En las siguientes gráficas, los resultados se compararon con respecto a una solución estándar de ácido cafeico.

En la Figura 36 se muestra la cinética de la capacidad antioxidante de todas las películas obtenida por el método del radical DPPH•. Para la solución estándar de ácido cafeico, se obtuvo un valor de 81.9%.

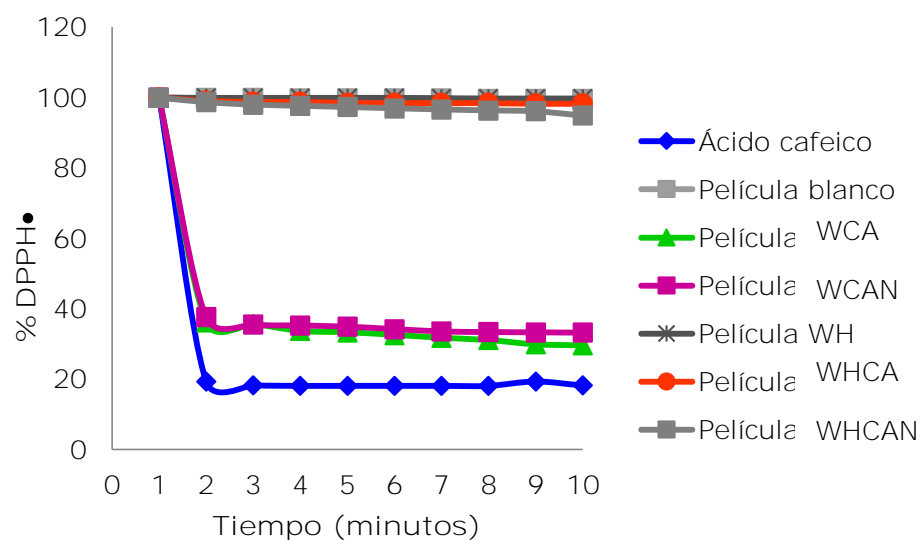


Figura 36. Cinética de la capacidad antioxidante de las películas obtenida con el método del radical DPPH•.

Se hizo un análisis de varianza para corroborar que la capacidad antioxidante promedio de las muestras es significativamente diferente al 95% de confianza, para la cual se rechazó la hipótesis nula (ver Anexo 1); después se hizo la prueba de Duncan, para la cual se obtuvo que la capacidad antioxidante de las películas B, WH, WHCA y WHCA es igual y menor que la de las películas WCAN y WCA y estas a su vez son menores que la de la solución estándar de ácido cafeico (ver Tabla 18).

En la Figura 37, se muestra la cinética de la capacidad antioxidante obtenida por el método del radical ABTS+• de todas las películas frente a una solución estándar de ácido cafeico; para la cual se obtuvo un promedio de 87.6%. Cabe destacar que las películas WCA y WCAN muestran buena capacidad secuestrante frente a la solución estándar, la reacción del antioxidante llega al estado estacionario entre los 2-3 minutos, al igual que la solución de ácido cafeico.

Se realizó la prueba de ANOVA, para la cual se obtuvo que la capacidad antioxidante promedio de las muestras son significativamente diferentes con un 95% de confianza. Posteriormente, se realizó la prueba de Duncan, para la cual se obtuvo que la capacidad antioxidante de las películas B, WH, WHCA y WHCAN es igual y menor que la de las películas WCA y WCAN y estas a su vez tienen una menor capacidad antioxidante que la solución estándar de ácido cafeico (ver tabla 18).

Las películas B, WH, WHCA y WHCAN, no presentan actividad antioxidante significativa, por lo que en las películas WHCA y WHCAN se infiere que la pérdida de la capacidad antioxidante es debido a la adición del hexanal.

Anteriormente, en la cuantificación de grupos amino primarios, se observó que la reacción de la proteína con hexanal tiene un rendimiento de reacción muy similar a la reacción que ocurre con la proteína ya acoplada al ácido cafeico. Desafortunadamente, no se tiene una explicación convincente hasta el momento, pero se propone que el hexanal reacciona en mayor proporción en esas condiciones y evita la reacción de acoplamiento dejando pocos grupos aminos libres para el acoplamiento del ácido cafeico.

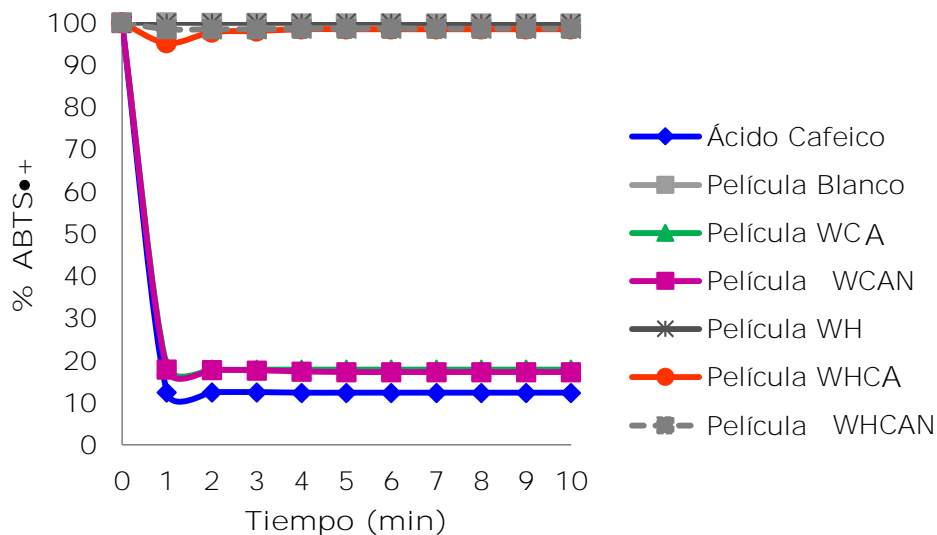


Figura 37. Cinética de la capacidad antioxidante de las películas obtenida con el método del radical $ABTS^{\bullet+}$.

En la Tabla 18 se muestran los valores de la capacidad antioxidante obtenida para cada película por ambos métodos. Como se había mencionado anteriormente, las películas WHCA y WHCAN perdieron su capacidad antioxidante por la adición de hexanal. La capacidad antioxidante del ácido cafeico unido a la proteína se debe a la presencia de los grupos hidroxilo en su estructura aromática, los cuales actúan donando átomos de hidrógeno. No obstante, se desconoce el mecanismo por el cual se pierde la actividad antioxidante del polifenol.

Tabla 18. Capacidad antioxidante obtenida de cada película.

Muestra	Método DPPH● ^{1,2}	Método ABTS+● ^{1,2}
Ácido cafeico	81.90±2.02 c	87.60±6.01 c
Película blanco	0.45±0.01 a	0.28±0.10 a
Película WCA	70.37±1.23 b	82.14±9.01 b
Película WCAN	66.01±1.30 b	82.72±6.1456 b
Película WH	1.01±0.60 a	0.14±0.0915 a
Película WHCA	0.21±0.02 a	1.57±0.5049 a
Película WHCAN	2.00±0.14 a	1.42±0.6817 a

1) Letras diferentes indican diferencia significativa $\alpha=0.05$

2) $a < b < c$

5.2.4.2 Espectro de resonancia magnética protónica de las películas

Se obtuvieron los espectros de RMN ¹H de cada una de las películas disueltas en D₂O con TFA-*d*, en un equipo Varian Unity Inova (300 MHz), utilizando TMS como referencia interna. En todos los espectros se observa un patrón de señales entre 0 y 6 ppm que son señales que corresponden a la proteína debido a la presencia de aminoácidos alifáticos, la señal entre 11.5 y 12 ppm corresponde al TFA-*d*. **Comparativamente, se observan señales protónicas con un $\delta = 6.5 - 8.0$ ppm en los espectros de las películas WCA y WCAN, las cuales corresponden al ácido cafeico (ver Figuras 39 y 40), debido a que son señales típicas de un compuesto aromático.** Estos espectros sugieren la unión química del ácido cafeico a la proteína de igual forma que la determinación del grado de sustitución de grupos amino primarios antes y después de la reacción.

Sorpresivamente, estas señales no se obtuvieron en las películas WHCA y WHCAN (ver Figuras 42 y 43), que corresponden a las películas formadas con una primera reacción con el aldehído (pH=7/70 °C/2 h).

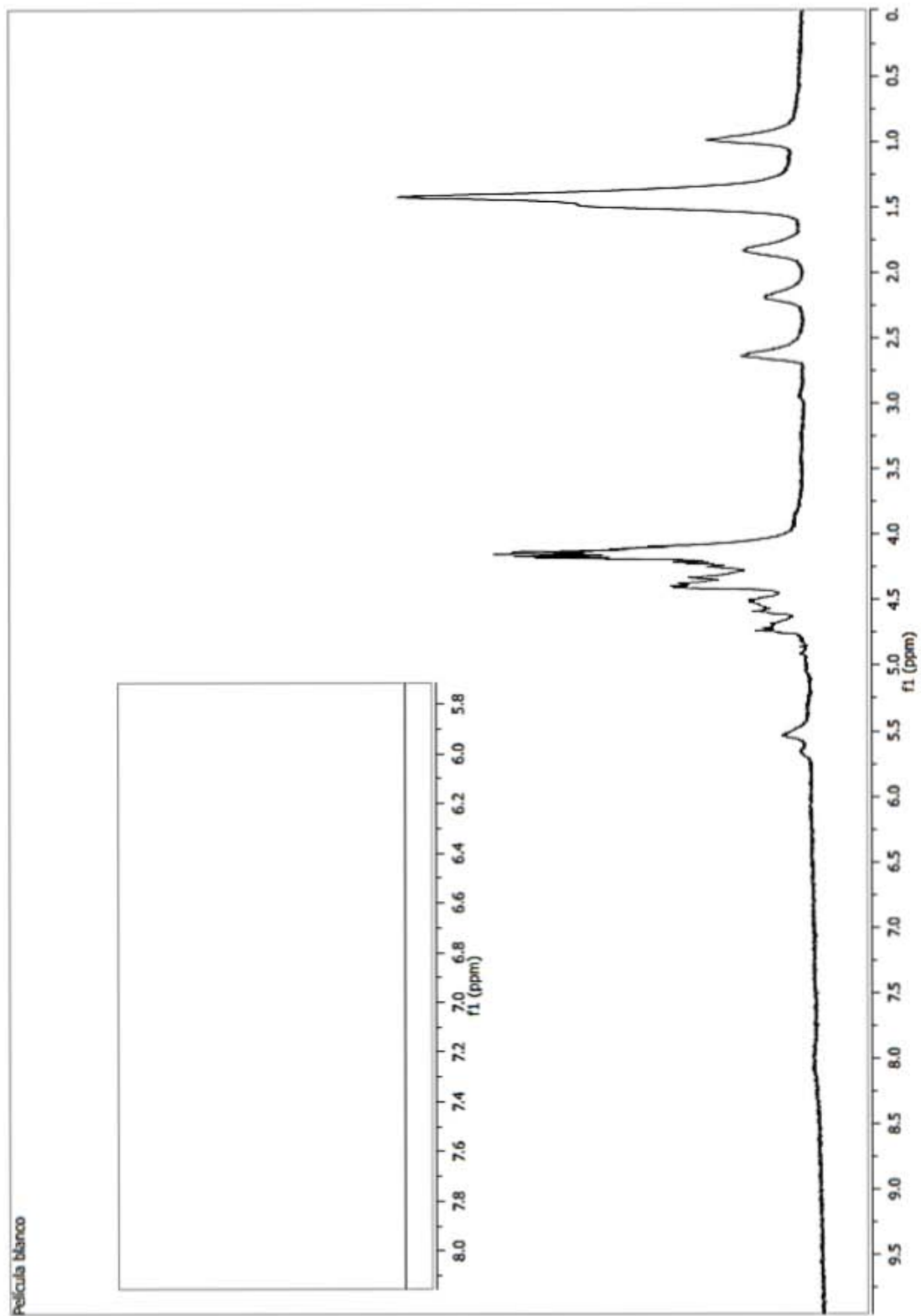


Figura 38. Espectro de RMN ^1H de la película blanco.

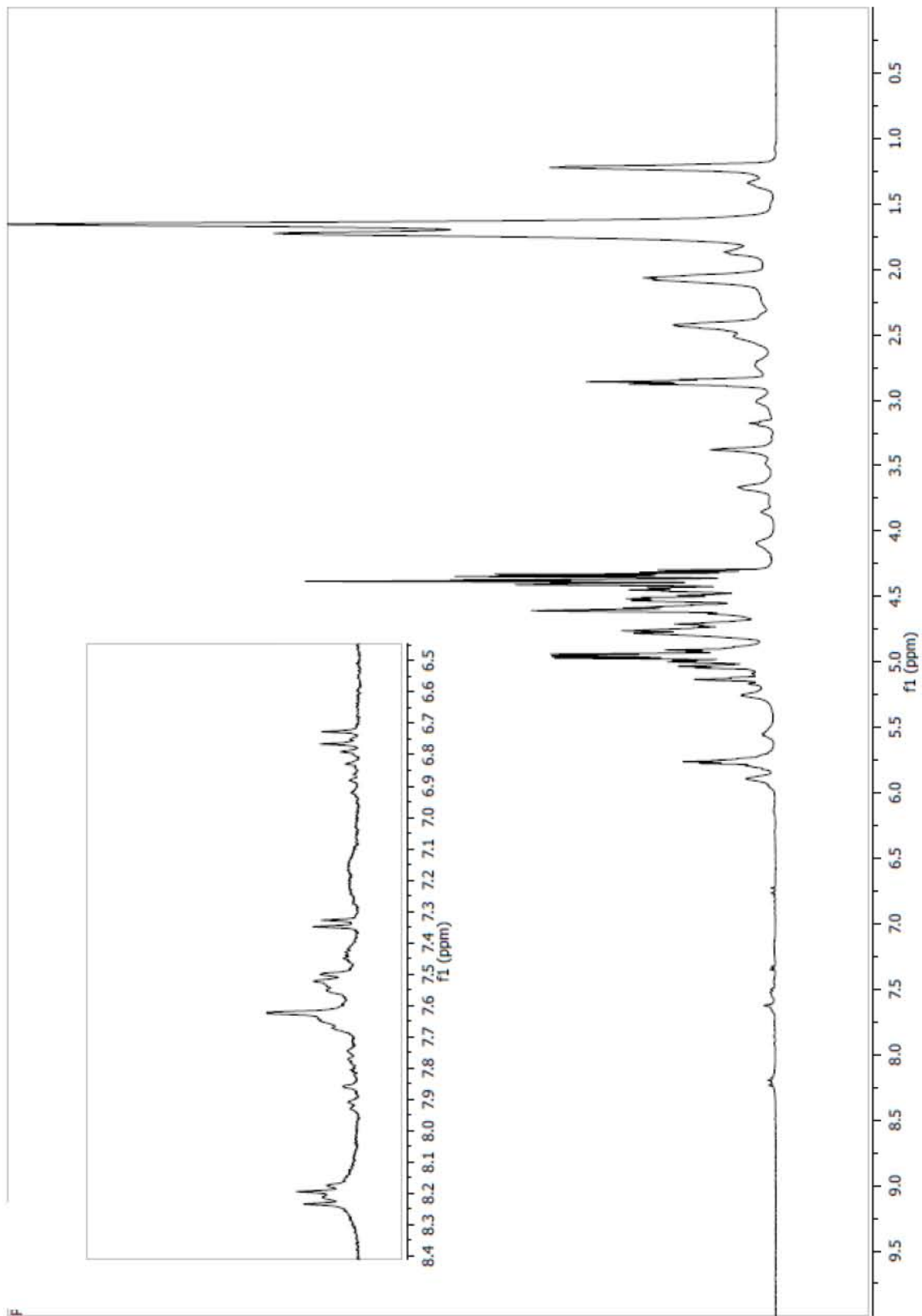


Figura 39. Espectro de RMN ^1H de la película con ácido cafeico.

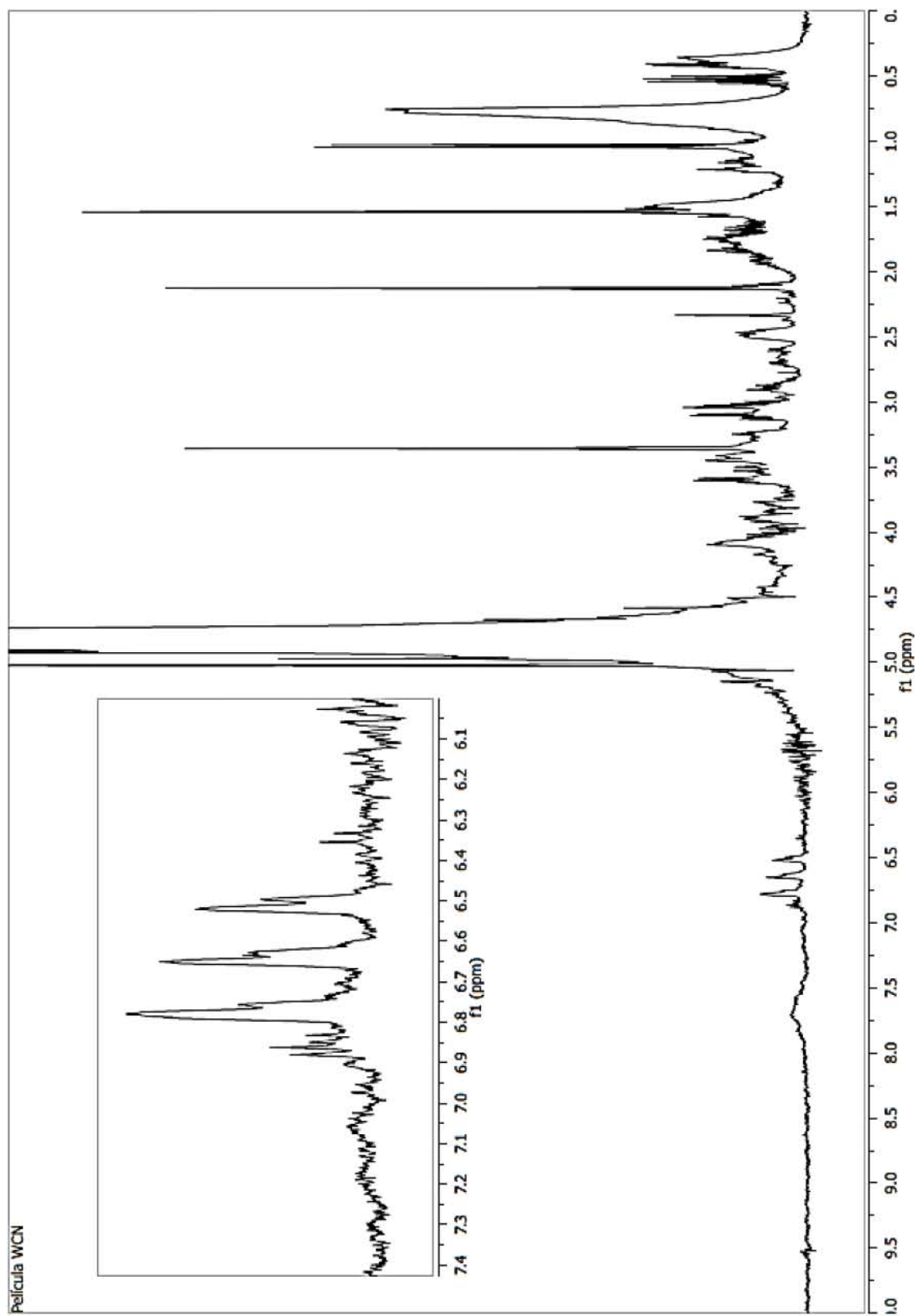


Figura 40. Espectro de RMN ^1H de la película con ácido cafeico y nisina.

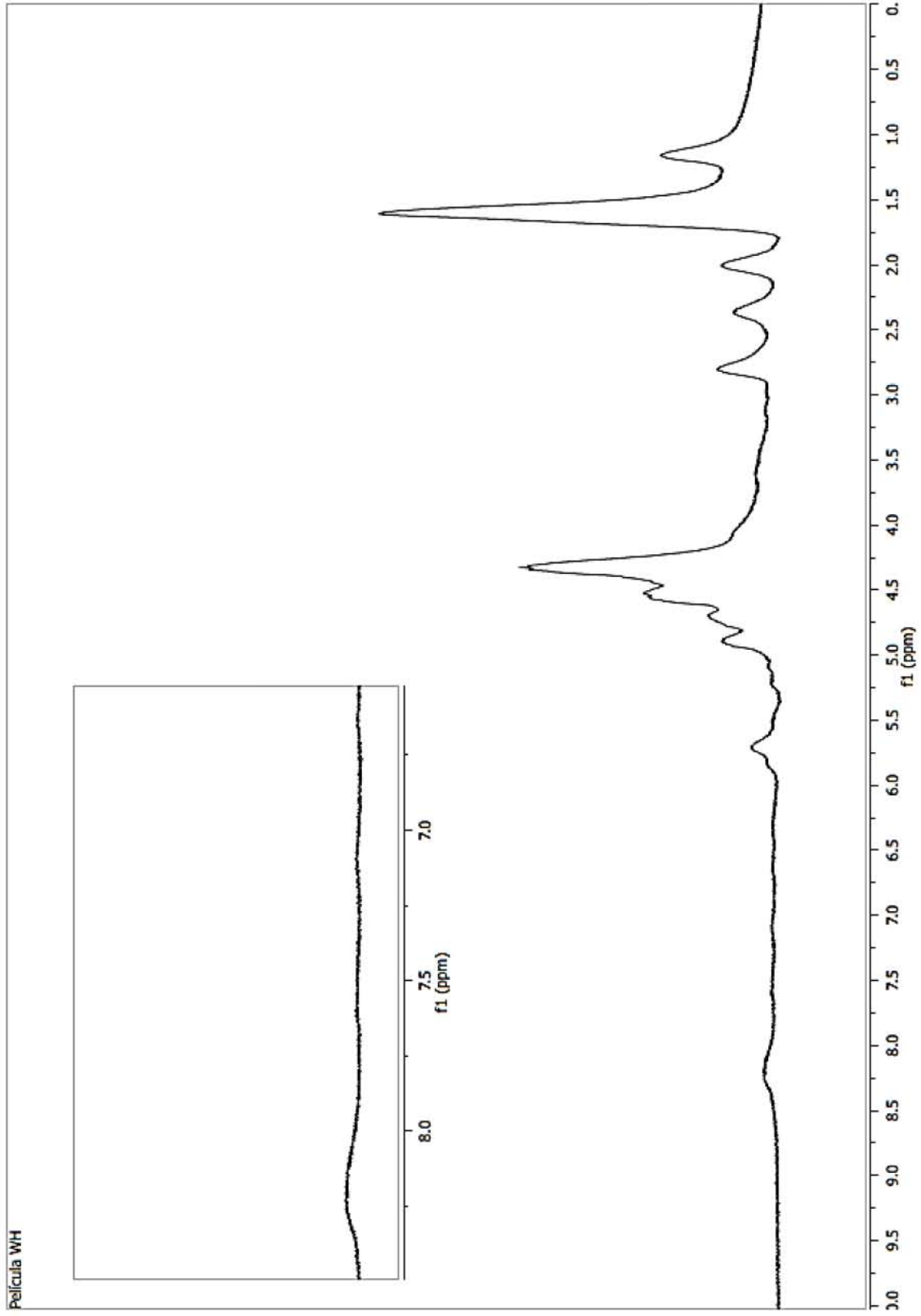


Figura 41. Espectro de RMN ^1H de la película con hexanal.

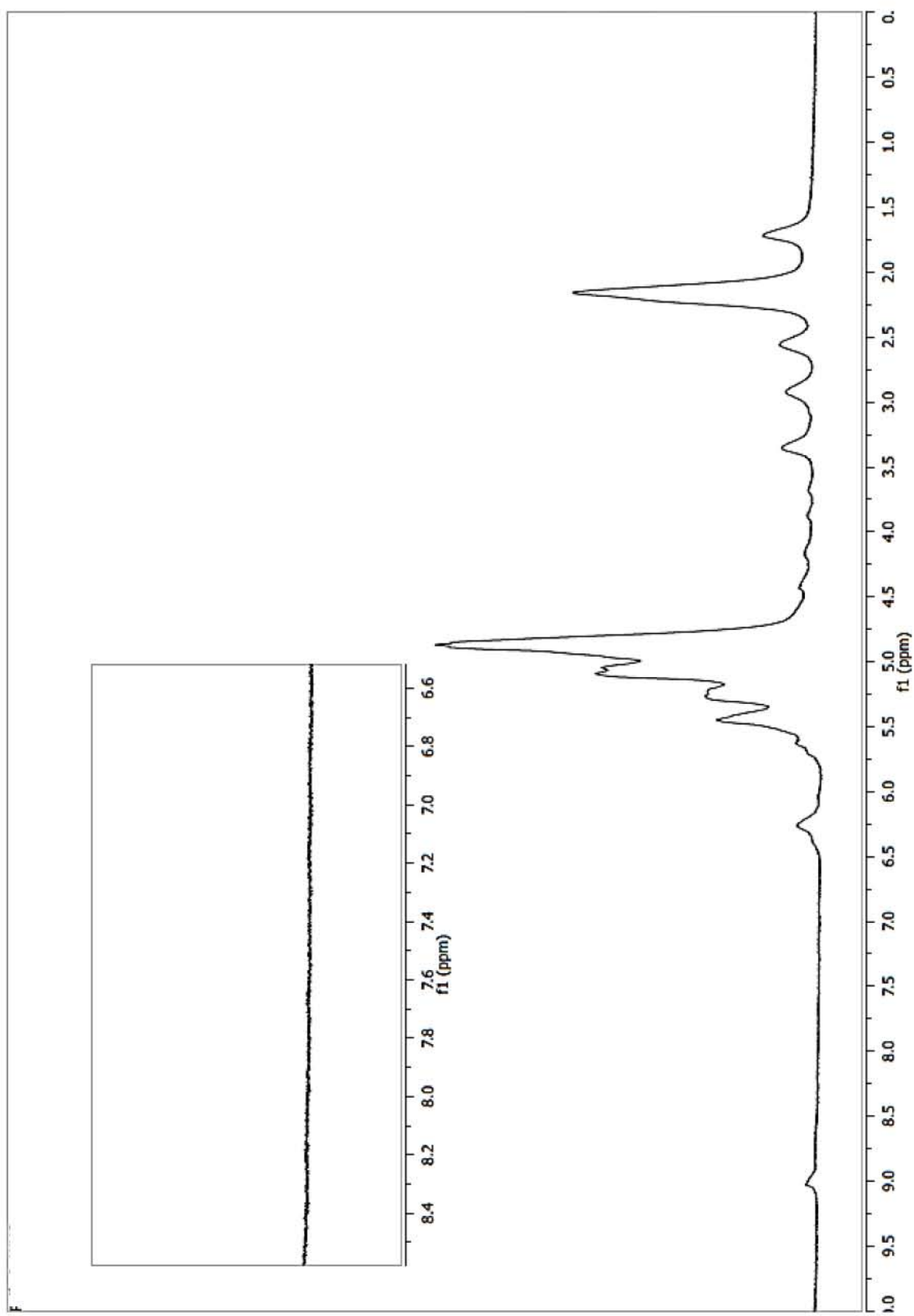


Figura 42. Espectro de RMN ^1H de la película con ácido cafeico y hexanal.

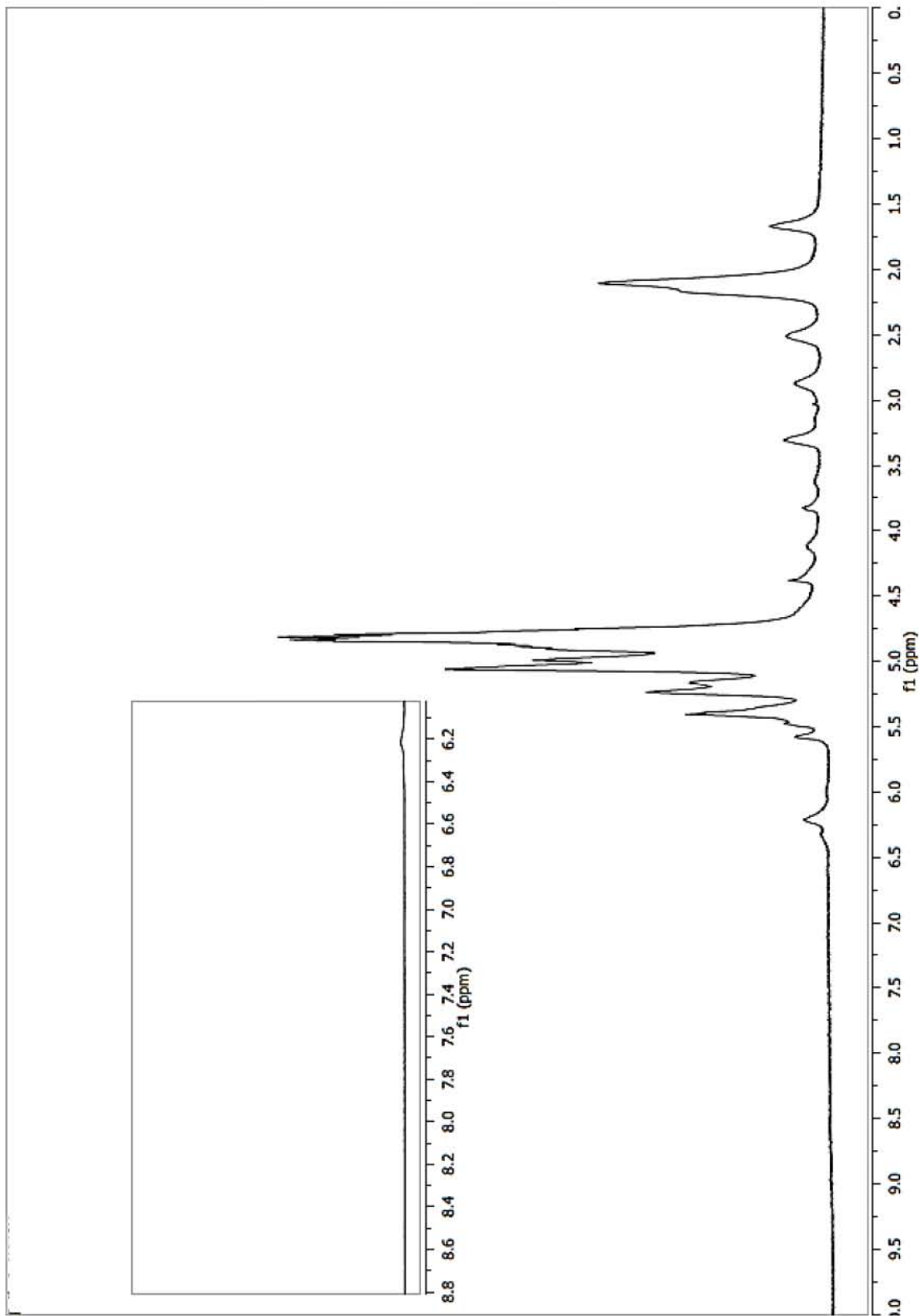


Figura 43. Espectro de RMN ^1H de la película con ácido cafeico, hexanal y nisina.

5.2.5 Evaluación de las propiedades de barrera de las películas activas

5.2.5.1 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

Se evaluó la permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas en el presente estudio, ya que las películas empleadas como empaques de alimentos deben de cumplir con características básicas de transferencia de vapor de agua y gases. Con respecto a estas biopelículas, se plantean 2 mecanismos de transferencia de masa: el fluido capilar y el de difusión activada. En el primero, las moléculas permeantes pasan a través de un medio altamente poroso, mientras que en el segundo la solubilización de agentes penetrantes es bajo un gradiente de concentración, por lo que en estas películas, los fenómenos que ocurren son de adsorción, difusión y desorción (Chao *et al.*, 1988).

Para evaluar la permeabilidad al vapor de agua (WVP), se seleccionó el método desecante de la técnica gravimétrica de la ASTM E-96; en esta técnica se cuenta con dos cámaras: la de ambientación y la de prueba.

Sellada la cámara de prueba con la película, se colocó en la cámara ambiental a las condiciones estandarizadas de humedad relativa y temperatura; la cámara de prueba fue extraída rápidamente de la ambiental registrando la ganancia de peso, después de haberse establecido el estado estacionario aproximadamente durante 2 h. La toma de lecturas fue cada 24 h hasta cubrir 5 días.

En la Tabla 19 se observan los resultados para esta prueba, para analizar los resultados se realizó un análisis de varianza, para con un nivel de significancia de 0.05 (ver Anexo 1), para el cual se obtuvo que la permeabilidad al vapor de agua en las películas es igual, por lo cual se concluye que la formulación no influye en esta propiedad de barrera, y

por consiguiente, que el hexanal no mejoró esta propiedad de la biopelícula.

Los valores de PVA oscilaron entre $4.1-6.9 \times 10^{-11}$, por lo que comparativamente son mayores con respecto a la permeabilidad que poseen los polímeros típicos de empaque HDPE y LDPE. No obstante, resultaron tener una PVA menor con respecto al celofán.

Por otra parte, comparando los resultados con los obtenidos para otras películas a base de proteínas, se observa que se encuentran por debajo de los valores presentados por películas comestibles elaboradas a base de proteínas.

Tabla 19. Permeabilidad al vapor de agua.

Película	WVT* ($\frac{\text{g}}{\text{h}} \times \text{m}^2$)	Permeanza* ($\frac{\text{g}}{\text{h}} \times \text{m}^2 \times \text{Pa}$)	Permeabilidad* ($\frac{\text{g}}{\text{s}} \times \text{m} \times \text{Pa}$)
Blanco	0.53 ± 0.22	$3.96 \times 10^{-4} \pm 1.22 \times 10^{-4}$	$5.1 \times 10^{-11} \pm 2.2 \times 10^{-11}$
WCA	0.87 ± 0.13	$6.53 \times 10^{-4} \pm 9.44 \times 10^{-5}$	$4.1 \times 10^{-11} \pm 2.9 \times 10^{-11}$
WCAN	1.53 ± 0.12	$1.15 \times 10^{-3} \pm 8.88 \times 10^{-5}$	$4.2 \times 10^{-11} \pm 9.3 \times 10^{-12}$
WH	0.46 ± 0.31	$3.43 \times 10^{-4} \pm 2.30 \times 10^{-4}$	$4.8 \times 10^{-11} \pm 1.8 \times 10^{-11}$
WHCA	0.87 ± 0.16	$6.52 \times 10^{-4} \pm 1.18 \times 10^{-4}$	$4.7 \times 10^{-11} \pm 5.3 \times 10^{-12}$
WHCAN	1.01 ± 0.24	$7.55 \times 10^{-4} \pm 1.81 \times 10^{-4}$	$6.9 \times 10^{-11} \pm 4.8 \times 10^{-12}$
Polietileno de baja densidad (a)			2.4×10^{-13}
Polietileno de alta densidad (a)			$7.3-9.7 \times 10^{-13}$
Celofán (b)			$7.7-8.4 \times 10^{-11}$
Películas gluten de trigo (a)			$1.4-4.6 \times 10^{-9}$
Películas de aislado de proteína de soya (a)			$1.6-4.4 \times 10^{-9}$

(*) Prueba realizada en quintuplo de cada película.

(a) Gennadios *et al.*, 1994.

(b) Krochta, 1992.

5.2.5.2 Permeabilidad al oxígeno (PO)

Por su importancia en las reacciones de oxidación, el oxígeno se considera un factor determinante en la vida de anaquel de los alimentos, ya que puede promover la proliferación y crecimiento de microorganismos, el oscurecimiento enzimático y oxidación de lípidos y vitaminas. Dado lo anterior, la determinación de la permeabilidad a oxígeno en las películas es fundamental, para conocer la funcionalidad como barrera protectora de alimentos contra este gas. En la siguiente tabla se observan los resultados de la prueba, comparándose con valores reportados en la literatura para otros plásticos sintéticos.

Se puede observar que ninguna de las películas elaboradas en el presente estudio presentó permeabilidad a oxígeno durante la prueba, por lo que son barreras efectivas contra el transporte de oxígeno. Esta propiedad de barrera se puede atribuir a la formación de una matriz homogénea de proteína y polioles, y a que no hubo ningún efecto en la PVA de la adición de hexanal, nisina ni al acoplamiento de ácido cafeico, a las concentraciones en que se añadieron.

Tabla 20. Permeabilidad a oxígeno.

Película	Permeabilidad ($\frac{\text{g}}{\text{h} \times \text{m} \times \text{Pa}}$)
Blanco	No presenta
WCA	No presenta
WCAN	No presenta
WH	No presenta
WHCA	No presenta
WHCAN	No presenta



5.3 Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos

Se realizaron 2 pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos, para evaluar el efecto de la nisina en las películas a 200 ppm y para ver si existe un potencial efecto antimicrobiano del ácido cafeico unido a la proteína.

Como se mencionó anteriormente, se inocularon los medios de cultivo Agar Mueller Hinton con bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) y con Gram positivas (*Staphylococcus aureus*).

En las siguientes tablas se muestran los resultados de las pruebas con ambos microorganismos.

Tabla 21. Resultados de la siembra en placa de Agar Mueller Hinton con *Pseudomonas aeruginosa*.

Medio de cultivo de Imagen blanco	de Imagen	Medio de cultivo de Imagen con películas	
B: Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.		B: Sin halo de inhibición.	

WCA:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



WCA:
Sin halo de inhibición.



WCAN:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



WCAN:
Sin halo de inhibición.



WH:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



WH:
Sin halo de inhibición.



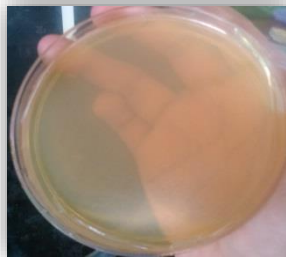
WHCA:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



WHCA:
Sin halo de inhibición.



WHCAN:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



WHCAN:
Sin halo de inhibición.



La nisina y, en general, todos los agentes antimicrobianos glicopeptídicos, comparten una compleja estructura química y su principal mecanismo de acción es mediante la inhibición de la síntesis de pared celular. Esta actividad es selectiva para bacterias aerobias Gram positivas, razón por la cual no se observó ningún halo de inhibición para *P. aeruginosa* y por lo tanto se infiere que este microorganismo es resistente a este antibiótico.

Tabla 22. Resultados de la siembra en placa de Agar Mueller Hinton con *Staphylococcus aureus*.

Medio de Imagen cultivo blanco

Medio de Imagen cultivo con películas

B:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



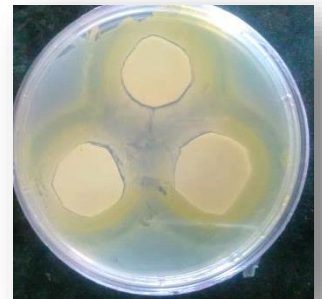
B:
Sin halo de inhibición.



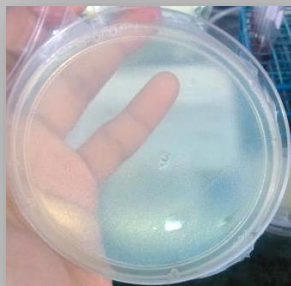
WCA:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



WCA:
Sin halo de inhibición.



WCAN:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



WCAN:
Diámetro del halo de inhibición:
 $16.7 \pm 0.5 \text{ mm}^*$



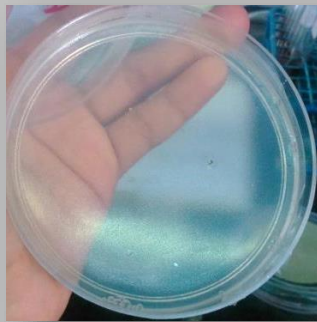
WH:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



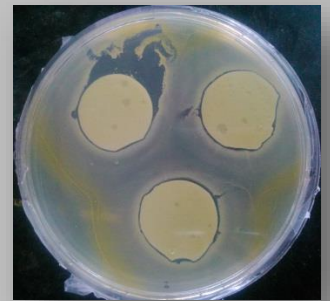
WH:
Sin halo de inhibición.



WHCA:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



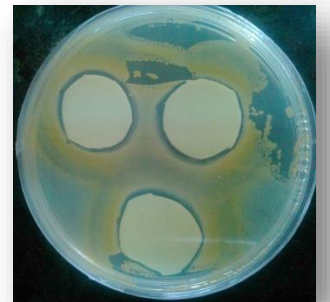
WHCA:
Diámetro del halo de inhibición:
 12.8 ± 0.8 mm *



WHCAN:
Crecimiento abundante de colonias blanquecinas en forma de capa superficial.



WHCAN:
Diámetro del halo de inhibición:
 16.2 ± 0.8 mm *



(*) Promedio y desviación estándar de 10 mediciones por halo de inhibición.

En las pruebas de sensibilidad con *S. aureus*, se observaron halos de inhibición de 14.7 y 14.2, para las películas WCAN y WHCAN, respectivamente, que en su formulación son las únicas que tienen nisina por inmersión. Este valor, comparado con los patrones estándar del halo

de inhibición para estafilococos con un antimicrobiano del grupo B **presentaron un halo $\geq 14\text{mm}$, lo que indica que *S. aureus* es sensible a la nisina**, no obstante, se desconoce en qué grado puesto que no hay estudios de *S. aureus* frente a este antibiótico.

Por otro lado, una película que inhibe el crecimiento, aunque en menor grado, fue la WHCA, la cual es posible que no haya sido buen sustrato debido al entrecruzamiento de proteínas

5.4 Pruebas de deterioro microbiano y oxidativo

Los empaques activos cambian las condiciones ambientales en las que se encuentra el alimento con la finalidad de mantener las propiedades sensoriales y garantizar la seguridad del producto.

Los empaques activos pueden actuar mediante dos mecanismos: liberando progresivamente agentes activos a la atmósfera que rodea al alimento o absorbiendo los compuestos que deterioran al alimento como el oxígeno o radicales libres (Wrona *et al.*, 2015).













En el caso de las películas del presente estudio se cree que en contacto directo con el alimento, el ácido cafeico acoplado retardará la oxidación lipídica de las grasas y la nisina, retardará el crecimiento microbiano, por lo que para ello, se decidió evaluar el efecto del antioxidante unido. Se empacaron, por su alto contenido en grasa, 10 g de ajonjolí molido y previamente tostado a una temperatura de 80°C durante 3 minutos y se termo-sellaron. Los 8 sacos con ajonjolí fueron almacenados a una temperatura de 22 °C y una humedad de 70%.

Posteriormente, se determinó el Índice de Peróxidos e Índice de Kreiss cada 7 días para monitorear la oxidación lipídica del alimento empacado. Asimismo, para evaluar el efecto del antimicrobiano añadido, se decidió empacar, por su A_w , 10 g de pan de caja blanco y

se termo-sellaron. Los 4 sacos resultantes fueron almacenados a la misma temperatura y humedad que los que contenían ajonjolí molido.

Se monitoreó el crecimiento microbiano por una cuantificación indirecta de la enzima deshidrogenasa mediante el método del 2,3,5-trifeniltetrazolio. De manera ilustrativa, en la tabla 23 se muestran los alimentos empacados.

Tabla 23. Matrices alimentarias empacadas de cada película.

Empaque	Ajonjolí molido	Pan de caja
B		
WCA		
WCAN		
WH		
WHCA		
WHCAN		

En la Gráfica 44, 45 y 46 se observan los resultados del monitoreo.

5.4.1 Determinación indirecta de la carga microbiana (método del 2,3,5-trifeniltetrazolio).

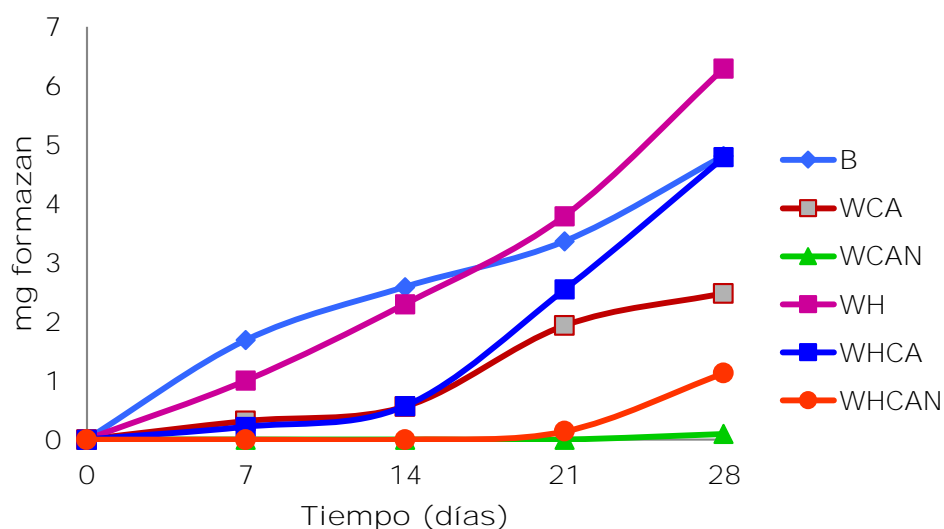


Figura 44. Seguimiento de la carga microbiana mediante el método del 2,3,5-trifeniltetrazolio.

El monitoreo de la carga microbiana muestra resultados en los cuales se observa que al día 28 prácticamente no hubo crecimiento microbiano desde el inicio de la prueba en el pan empacado en la película WCAN y que de manera similar, la película WHCAN presentó muy poco crecimiento microbiano, alcanzando a ese día solo 1.1267 mg de formazan/10 g pan.

Posteriormente, se observa que hubo crecimiento microbiano limitado en el pan empacado en la película WCA, lo que hace creer que el ácido cafeico podría tener una actividad antimicrobiana.

Los panes de las películas WHCA, B y WH no muestran ningún efecto antimicrobiano, ya que muestran resultados que indican la formación en 28 días de 4.8, 4.8 y 6.3 mg de formazan, respectivamente.

Cabe destacar, que no se realizó una correlación entre la cuenta microbiana y los mg de formazan.

5.4.2 Índice de peróxidos (método colorimétrico)

Se ha encontrado que el deterioro de los alimentos sigue modelos de orden cero o primer orden. En alimentos con un alto contenido de lípidos, predominan las reacciones de oxidación y estas siguen un comportamiento de orden cero.

Se determinó índice de peróxidos de la grasa del ajonjolí empacado en las películas mediante el método colorimétrico, el cual es una determinación indirecta, en la cual el hierro (II) se oxida a hierro (III) en proporción tal que depende de la concentración de peróxidos. El Fe^{3+} se cuantifica mediante una reacción de complejación con tiocianato.

En la siguiente gráfica se muestra el monitoreo del IP durante 49 días a una temperatura de 22-23°C y humedad del 70%.

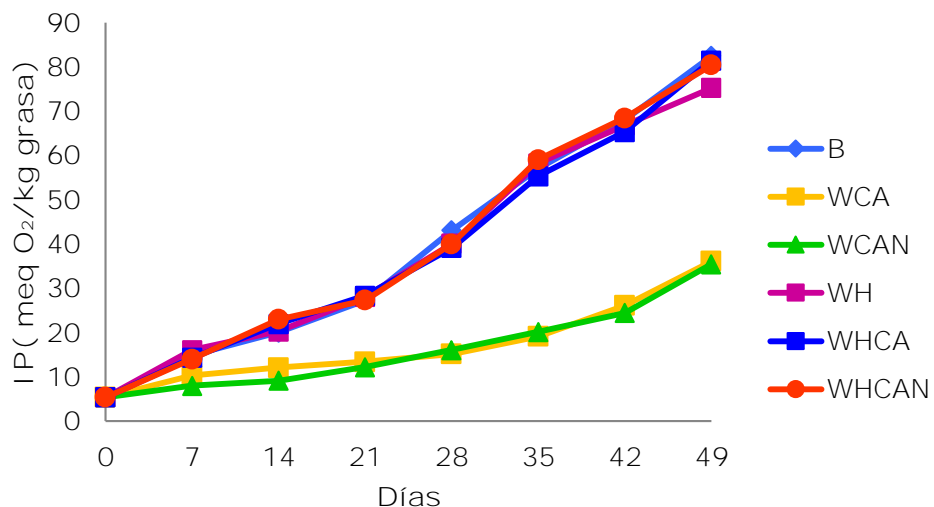


Figura 45. Seguimiento del índice de peróxidos mediante el método colorimétrico.

Al principio de la oxidación de las grasas en su mayoría los productos de la reacción son hidroperóxidos. En la gráfica anterior, se observa el efecto más evidente de que existe una actividad antioxidante del ácido cafeico incorporado a la proteína, además de que se confirman los resultados anteriores, que existe una muy poca incorporación de ácido cafeico cuando este está en presencia de hexanal, por lo que las películas WHCA y WHCAN no previenen la oxidación. El patrón de la oxidación para el ajonjolí empacado en las películas B y WH es similar y concuerda con lo esperado, puesto que no contienen antioxidante que prevenga la oxidación.

Asimismo, se observa que existe un claro retardo en el inicio de la oxidación de la grasa en el ajonjolí molido, ya que el IP inicial fue de 5.352 meqO₂/kg de grasa.

En estas gráficas, el cambio de pendiente se presenta después del día 28 en las películas WCA y después del día 35, en las películas WCAN.

5.4.3 Índice de Kreis

Asimismo, para el monitoreo de la oxidación lipídica se determinó igualmente durante 49 días el índice de Kreis, el cual proporciona información sobre el contenido de aldehído malónico o epidrínico.

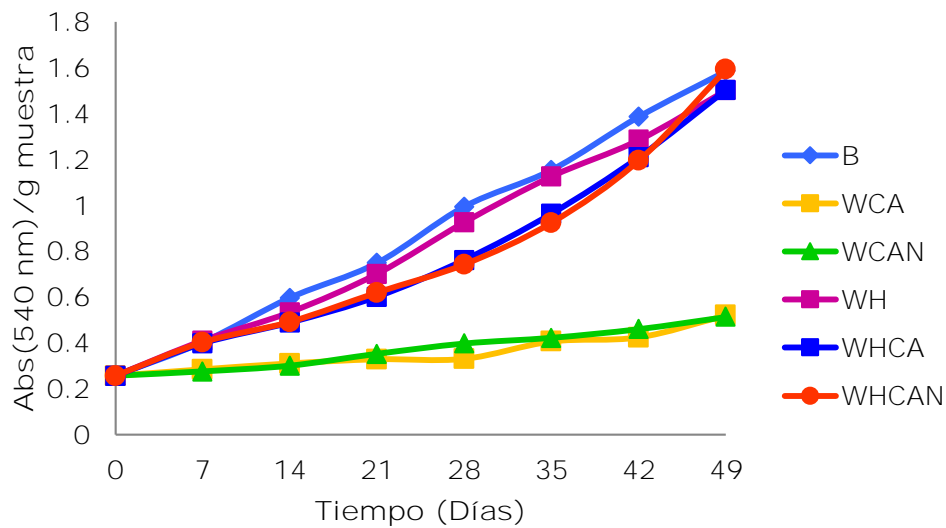


Figura 46. Seguimiento del índice de Kreis.

La Figura 46, al igual que la de la cinética de formación de peróxidos, muestra clara evidencia del efecto antioxidante del ácido cafeico en el ajonjolí empacado en las películas WCA y WCAN. Mientras que ocurre un comportamiento similar en la generación de aldehído epihidrínico en la grasa del ajonjolí empacado en las películas B, WH, WHCA y WHCAN. Calculando las de pendientes, se observa un cambio de esta hasta el día 35 en la película WCA, y hasta el día 42 en la WCAN.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Se obtuvieron polifenoles de semillas de chía procedentes del Estado de Puebla mediante una extracción ácido-etanólica a 60°C, con concentración de 1.831 ± 0.109 mg EAG/g semilla de chía.
- ✓ Se aislaron e identificaron el ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido gálico y kaempferol de la chía mediante las técnicas de cromatografía preparativa en columna, RMN y HPLC-MS.
- ✓ Se extrajo proteína de piel de pollo por solubilización a 55°C, mejorando el rendimiento de extracción reportado y se obtuvo 40.0689% proteína total pellet/proteína total pollo,
- ✓ La reacción de acoplamiento de ácido cafeico a la proteína tiene un rendimiento de reacción de 53.63% por determinación el polifenol no unido y de 61.63% por determinación de grupos amino libres.
- ✓ Mediante RMN comprobó la presencia de ácido cafeico en las películas WCA y WCAN, lo cual confirma la incorporación de ácido cafeico a la proteína.
- ✓ Se determinó la capacidad antioxidante de las películas, las cuales solo la WCA y la WCAN obtuvieron valores considerables y significativamente iguales de 70.4%/82.1% y 66.0%/82.7%, respectivamente, por los métodos DPPH/ABTS.
- ✓ La adición de hexanal a la proteína suprime la actividad antioxidante del ácido cafeico en las películas WHCA y WHCAN, esto se confirma con la determinación de la capacidad antioxidante y con los espectros de Resonancia Magnética Nuclear, en los cuales no se obtuvieron señales del polifenol.
- ✓ La adición de hexanal como componente hidrofóbico no disminuye la permeabilidad al vapor de agua significativamente.

- ✓ La adición de nisina por inmersión a las películas inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas como *S. aureus*.
- ✓ Las películas con nisina retardan el crecimiento microbiano en la matriz alimentaria que contienen.
- ✓ Las películas con ácido cafeico y sin hexanal (WCA y WCAN) retardan la inducción de la oxidación lipídica.
- ✓ Se desarrollaron películas hechas de proteína de piel de pollo y plastificante, activas debido a la unión química de ácido cafeico e inmersión de nisina.

7. PERSPECTIVAS

- Se propone hacer un estudio toxicológico para evaluar la inocuidad de las películas previamente sometidas a la reacción de acoplamiento y así poder saber si es seguro su uso como empaques primarios.
- Asimismo, es conveniente hacer un estudio de la biodegradación de la película, ya que las películas biopoliméricas se asumen biodegradables, no obstante, se ignora en qué tiempo y si se degrada parcial o completamente.
- Es sumamente importante llevar a cabo un estudio de vida de anaquel con el objetivo de conocer el factor de protección a diferentes temperaturas y condiciones de humedad controladas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abedin, M. y Riemschneider, R. (1984). Chicken skin collagen-molecular diversity and susceptibility to neutral-proteinases. *Pharm Ind*, 46, Pág. 532.
- Álvarez-Chávez, L. M., Valdivia-López, M. A., Aburto-Juárez, M. L., & Tecante, A. (2008). Chemical characterization of the lipid fraction of mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *International Journal of Food Properties*, 11, pp. 687-697.
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.), from five northeastern locations in northwestern Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, pp. 1079-1081
- Beliz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., (2009) *Food Chemistry*. 4a edición. Springer-Verlag. Alemania.
- Borges, G.D.S.C.; Vieira, F.G.K.; Copetti, C.; Gonzaga, L.V.; Fett, R. (2011) Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euterpe edulis* using the response surface methodology. *Food Res. Int.*, 44, pp. 708–715
- Caapitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45, pp. 94-102.
- Cedillo C.D. (2006) Tesis de maestría. Identificación de los compuestos fenólicos en el capulín *Prunus serotina* Ehrh y evaluación de su capacidad antioxidante y estabilidad en mermeladas. ENCB-IPN.
- Chang, R. (2008) *Fisicoquímica para las ciencias químicas y biológicas*. 3ra Edición. Mc Graw Hill. Pp. 731-740.

- Chao, R., Rizvi, S., (1988) Food and Packaging interactions. American Chemical Society.
- Chávez, A. (2014) Optimización de condiciones de extracción y elaboración de películas a partir de proteínas provenientes de la piel de pollo. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Chaayasit, W., Elias, R. J., McClements, D. J., Decker, E. A., (2007) Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 47, pp. 299–317.
- Choe, E. y Min, D. B., (2006) Mechanisms and factors for edible oil oxidation. Compr. Rev. Food Sci. F., 5, pp. 169–186.
- Cliché, S., Amiot, J., Avezard, C., Gariépy, C. (2003). Extraction and characterization of collagen with or without telopeptides from chicken skin. Poultry science, 82, pág. 503.
- Coates, W. y Ayerza, R. (2009). Chia (*Salvia hispanica* L.) seed as an {omega}-3 fatty acid source for finishing pigs: effects on fatty acid composition and fat stability of the meat and internal fat, growth performance, and meat sensory characteristics. Journal of Animal Science, 87, pp.3798-3804.
- Coles, R., McDowell, D., Kirwan, M. (2003) Food Packaging Technology. Blackwell Publishing Ltd. pp. 174-177.
- Colin-Chavez C, Soto-Valdez H, Peralta E, Lizardi-Mendoza J, Balandran-Quintana RR. (2013) Fabrication and properties of antioxidant polyethylene-based films containing marigold (*tagetes erecta*) extract and application on soybean oil stability. Packaging Technology and Science, 26, pp. 267–280.
- Cruz, N., (2008). Compuestos polifenólicos de la chía: efecto del método de extracción y temperatura sobre la estabilidad antioxidante. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.

- Commission, T. H. E., The, O. F., & Communities, E. (2001). Comission Directive 2001/62/EC. *Official Journal of The European Communities*, 5, pp. 18–36.
- Farmer, E. H., Koch, H. P., Sutton, D. A. J., (1943) The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds, part VII, rearrangement of double bonds during autoxidation. *J. Chem. Soc.* pp. 541–547.
- Fennema, O.R., Parkin, K.L., Damodaran, S., (2007) Food chemistry. 4a edición. CRC Press.
- Franssen, L, y J. Krochta, (2003) Edible coating containing natural antimicrobials for processed foods, in Soller, S(eds) *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*, CRC Press, Boca Raton, FL., USA.
- Gennadios A., Bradenburg A. H., Park J. W., Weller C. L, Testin R. F. (1994). Water vapor permeability of wheat gluten and soy protein isolate films. *Industrial Crops and Products*, 2, pp. 189-195.
- Gómez-Guillén, B., Giménez, B. y Montero, M. P. (2011) Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from **alternative sources: A review**. *Food Hydrocolloids*, 25(8), pp. 1813–1827.
- González Cuello, R. E., Urbina, N. A., & Morón Alcázar, L. (2015). Caracterización Viscoelástica de Biopelículas Obtenidas a Base de Mezclas Binarias. *Información Tecnológica*, 26(3), pp. 71–76.
- González, F. (2010) Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chía (*Salvia hispanica* L.), mediante electroforesis capilar. Tesis de maestría. Intituto Politécnico Nacional. México.

- Granda-Restrepo, D., Medina-Pinera, Y., Culebras-Rubio, M., y Gómez-Clari, C. (2014). Desarrollo y caracterización de una película activa biodegradable con antioxidantes (alfa-tocoferol) a partir de las proteínas de lactosuero. Academic Search Complete, EBSCOhost, (27 May 2015, 17:00h) pp. 11-19.
- Halliwell, B., (1990) How to characterize a biological antioxidant. Free Rad. Res. Com. 9, pp. 1-32.
- Haque M S, K K Ghoshal (1981) Floral biology and breeding system in the genus *Salvia* L. Proc. Indian Nat. Sci. Acad. 47, pp. 716-724.
- Harris, C. D. (2007) Análisis químico cuantitativo. 3ra edición. REVERTÉ. pp. 553-560, 607-621.
- Hernández-Izquierdo, V.M.; Krochta, J.M. Thermoplastic Processing of Proteins for Film Formation- A Review. Journal of Food Science, 2008, 73, pp.30-39.
- Hernández, María del Carmen. (2001). Crisis avícola en Sonora. El fin de un paradigma 1970-1999. 1er edición. Plaza y Valdés S.A. de C.V. Pág. 116.
- Hua Xang, Xiaofeng Guo, Xuexu Chen, Zibin Shu. (2014) Preparation and characterization of collagen food packaging film. Journal of chemical and pharmaceutical research. 6, pp.740-745
- Kamal-Eldin, A., Makinen, M., Lampi, A. (2003). Lipid oxidation pathways. **American Oil Chemist's** Society Publishing, Champaign. pp. 1-36.
- Ixmucané, D., (2011) Caracterización de semillas del chan (*Salvia hispanica* L.) y diseño de un producto funcional que la contiene como ingrediente. Revista de la Universidad del Valle de Guatemala. 23, pp. 43-49.

- Krochta J. M. (1992) Control of mass transfer in food with edible-coatings and films. In: Advances in Food Engineering. Singh RP, Wirakartakusumah MA editors. CRC Press, Florida. pp 517-537.
- Likoff, L., Bradbury, T. (2007) The encyclopedia of birds. International masters publishing. Pág. 745.
- Lin, D, y Y, Zhao,. (2007) Innovations in the developmet and application of edible coating for fresh and minimally processes fruit and vegetables. Comp Rev food sci food saf, 6(1), pp. 60 – 74.
- Macheix, J., Fleuriet, A. y Billiot, J.(1990). Fruit Phenolics.CRC Press, Inc. Boca Raton, Fl. EUA.
- Marineli, R., Aguiar, E., Alves, S., Teixeira, A., Nogueira, M. y Maróstica, M. (2014) Chemical characterization and anioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.) Food Science and Technology, 59, pp. 1304-1310.
- Matthäus, B. (2002) Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseed. Journal of Agricultural and Food Chemitry, 50, pp. 3444-3452.
- McClements, D. J., Decker, E. A., (2000) Lipid oxidation in oil-inwater emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. J. Food Sci. 65, pp. 1270–1282.
- Mohd Ali, Keong Yeap, Yong Ho, Kee Beh, Wei Tan y Guan Tan. (2012). The promising future of Chia, *Salvia hispanica* L., Journal of Biomedicine and Biotechnology, 171956, pp. 1-2.
- Nielsen, S., (1998) Food analysis. 2ª edición. ASPEN Publishers. 242.
- Omana, D., Xu, Y., Moayedí, V., Betti, M. (2010). Alkali-aided protein extraction from chicken dark meat: chemical and

functional properties of recovered proteins. *Process biochemistry*, 45, pp. 375-381

- Pereira de Abreu, D.A., Losada, P.P., Maroto, J., Cruz, J.M. (2011) Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*; 12, pp. 50–55.
- Phoopuritham P, Thongngam M, Yoksan R, Suppakul P. Antioxidant Properties of Selected Plant Extracts and Application in Packaging as Antioxidant Cellulose-Based Films for Vegetable Oil. *Packaging Technology and Science* 2012); 25, pp. 125–136.
- Plastics Europe. (2011). *Plastics - the Facts 2011 An analysis of European plastics production , demand and recovery for 2010*, pp. 1–32.
<http://www.plasticseurope.org/documents/document/20111107101127-final_pe_factsfigures_uk2011_lr_041111.pdf > (Revisado el 2/10/2015).
- Quettier, D.C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M.C., Cayin, J.C., Bailleul, F., Trotin, F. (2000): Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.* 72, pp. 35-42.
- Ramamoorthy T P, M Elliot (1998) Lamiaceae de México: diversidad, distribución, endemismo y evolución. *In: Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución*. T P Ramamoorthy, RBye, A Lot, J Fa (eds). Primera ed. en español. Universidad Autónoma de México, México, pp. 501-526.
- Reyes-Caudillo, E. (2006) La chía (*Salvia hispanica*): fuente de fibra dietética total con propiedades funcionales y antioxidantes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México.

- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., y Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107, pp. 656-663.
- Scitec Nutrition (2016) Síntesis de colágeno y vitamina C. <
http://www.scitecnutrition.com/es/catalog/guide_to_vitamins/>
(07-03-2016, 19:00h)
- Selmane, D., Christophe, V., Gholamreza, D. (2008). Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: influence of operating conditions on functional properties. *Meat science*, 79, pp. 640-647.
- Shahidi, F. y Zhong, Y. (2010) Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur. J. Lipid Science Technol.* 112, pp. 930-940.
- Shi, H. (2001) Introducing natural antioxidants. Chapter 8. Antioxidants in foods. Practical applications. Pokorny, J., Yanishlieva, N., y Gordon M. (editores) CRC Press Inc. Boca Raton, FL. EUA pp. 147-158.
- Silva, Navarro, B. (2009) Desarrollo de películas con actividad antioxidante y evaluación del factor de protección en alimentos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México. Pág. 38.
- Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. (2003) Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*, 68, pp. 408-420.
- Tabart, J.; Kevers, C.; Sipel, A.; Pincemail, J.; Defraigne, J.O.; Dommès, J. (2007) Optimisation of extraction of phenolics and

antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chem.*, 105, pp. 1268–1275.

- Taga, S., Miller, E. y Pratt, D., (1984). Chia seed as a source of natural lipid antioxidants. *JAOCS*. Vol. 6. No. 5.
- Tian-tian Han, Li-xin Lu, Changfeng Ge. (2014) Development and properties of high density polyethylene (HDPE) and Ethylene-vinyl acetate copolymer (EVA) blend antioxidant active packaging films containing quercetin. *Packaging technology and science*, 28, pp. 415-423.
- USDA, National Nutrient Database for Standard Reference. (2015) Basic report 05015. Chicken, broilers or fryers, skin only, raw.
- USDA, National Nutrient Database for Standard Reference. (2015) Basic report 12006. Seeds, chia seeds, dried.
- Vermeiren L, Devlieghere F, van Beest M, de Kruijf N, Debevere J. (1999) Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science & Technology*; 10(3), Pp.77–86.
- Woranuch, S., Yoksan, R., Akashi, M. (2015). Ferulic acid-coupled chitosan: Thermal stability and utilization as an antioxidant for biodegradable active packaging film. *Carbohydrate Polymers*, 115, pp. 744–51.
- Wrona, M., Bentayeb, K. y Nerín, C., (2015). A novel active packaging for extending the shelf life of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Control*, 54, pp. 200-207.
- Yeshajahu, P. Clifton E., Meloan. (2000) *Food analysis. Theory and practice*. 3ra edición. Aspen Publishers. Pág. 719
- Yoshida H, Takagi S. (1999) Antioxidative effects of sesamol and tocopherols at various concentrations in oils during microwave heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, pp. 220–226.

ANEXO 1

Tabla 24. Análisis de varianza de la actividad antioxidante de las películas por el método del radical DPPH (1 factor, 6 niveles, $\alpha=0.05$)

Factor de varianza	g.l.	M.C.	Fc	Ft (6,63, 0.05)	Decisión
Entre niveles	6	180286.6727	72.3262	3.740	H ₀ se rechaza
Error	63	249.5331			
Total	69				

Tabla 25. Prueba de Duncan de la actividad antioxidante de las películas por el método del radical DPPH ($\alpha=0.05$)

Sy	4.9953
Rp ₂ (r2 0.05(2,69))	14.1368
Rp ₃ (r3 0.05(3,69))	14.8860
Rp ₄ (r4 0.05(4,69))	15.3855
Rp ₅ (r5 0.05(5,69))	15.6852
Rp ₆ (r6 0.05(6, 69))	15.9850
Rp ₇ (r7 0.05(7, 69))	16.1848

Tabla 26. Matriz de diferencias de la prueba de Duncan de la actividad antioxidante de las películas por el método del radical DPPH.

	WH	B	WHCAN	WHCA	WCA	WCAN	Sol. estándar
WH		0.2388	0.7979	1.7909	65	70	81
B			0.5591	1.5521	65	69	81
WHCAN				0.9930	65	69	80
WHCA					64	68	79
WCA						4.3553	15.8
WCAN							11.52
Sol. estándar							

Actividad antioxidante de las películas en orden ascendente:

WHCA=B=WH=WHCAN < WCAN=WCA=Sol. estándar

Tabla 27. Análisis de varianza de la actividad antioxidante de las películas por el método del radical ABTS (1 factor, 6 niveles, $\alpha=0.05$)

Factor de varianza	g.l.	M.C.	Fc	Ft (6,63, 0.05)	Decisión
Entre niveles	6	19082.4293	336.7218	3.740	H ₀ se rechaza
Error	63	56.6712			
Total	69				

Tabla 28. Prueba de Duncan de la actividad antioxidante de las películas por el método del radical ABTS ($\alpha=0.05$)

Sy	2.3806
Rp ₂ (r2 0.05(2,69))	6.7371
Rp ₃ (r3 0.05(3,69))	7.0942
Rp ₄ (r4 0.05(4,69))	7.3322
Rp ₅ (r5 0.05(5,69))	7.4751
Rp ₆ (r6 0.05(6,69))	7.6179
Rp ₇ (r7 0.05(7,69))	7.7131

Tabla 29. Matriz de diferencias de la prueba de Duncan de la actividad antioxidante de las películas por el método del radical ABTS.

	WH	B	WHCAN	WHCA	WCA	WCAN	Sol. estándar
WH		0.1418	1.2733	1.4283	81.9998	82.5729	87.4614
B			1.1315	1.2864	81.858	82.4311	87.3196
WHCAN				0.1550	80.7265	81.2996	86.1881
WHCA					80.5715	81.1446	86.0331
WCA						0.5731	5.4616
WCAN							4.8885
Sol. estándar							

Actividad antioxidante de las películas en orden ascendente:

WHCA=B=WH=WHCAN < WCAN=WCA=Sol. estándar

Tabla 30. Análisis de varianza de la permeabilidad al vapor de **agua de las películas (1 factor, 6 niveles, $\alpha=0.05$)**

Factor de varianza	<i>g.l.</i>	M.C.	Fc	Ft (2,15,0.05)	Decisión
Entre niveles	2	1.01508×10^{-14}	3.0673	3.682	H ₀ se acepta
Error	15	3.30932×10^{-15}			
Total	17				