



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

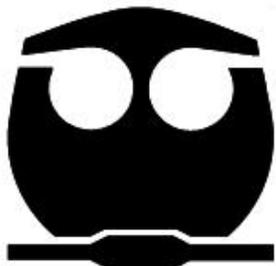
**EFFECTO DE LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS E  
INCORPORACIÓN DE ANTIOXIDANTES SOBRE  
LAS PROPIEDADES DE PELÍCULAS DE PIEL DE  
POLLO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**MAURICIO CASTRO BECERRIL**



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: VALDIVIA LÓPEZ MARÍA DE LOS ANGELES.**

**VOCAL: TECANTE CORONEL ALBERTO.**

**SECRETARIO: ZAVALA RIVAPALACIO ALEJANDRO.**

**1<sup>er.</sup> SUPLENTE: RAMIREZ CAHERO HIRAM FERNANDO.**

**2<sup>do.</sup> SUPLENTE: LOZANO VÁZQUEZ GUSTAVO.**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 313, 322 Y 323 CONJUNTO E, EDIFICIO DE ALIMENTOS Y QUÍMICA AMBIENTAL, FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASESOR DEL TEMA:**

M. en C. María de los Ángeles Valdivia López.

---

**SUSTENTANTE:**

Mauricio Castro Becerril.

---

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 ESTUDIO PREVIOS</b> .....	8
<b>2. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO)</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1 POLLO</b> .....	9
<b>2.2 COLÁGENO</b> .....	11
<b>2.3 EMPAQUES</b> .....	12
<b>2.3.1 PELÍCULAS</b> .....	13
<b>2.4 ADITIVOS</b> .....	15
<b>2.5 PLASTIFICANTES</b> .....	16
<b>2.6 ANTIOXIDANTES</b> .....	17
<b>2.7 CHÍA</b> .....	17
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 PIEL DE POLLO OBTENCION Y CARACTERIZACIÓN</b> .....	20
<b>3.1.1 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL</b> .....	20
<b>3.2 METODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	21
<b>3.2.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN ALCALINO</b> .....	21
<b>3.2.2 MÉTODO MODIFICADO</b> .....	22
<b>3.3 EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DE LA SEMILLA DE CHÍA</b> .....	22
<b>3.3.1 EXTRACCIÓN CON ETANOL</b> .....	22
<b>3.3.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS</b> .....	23
<b>3.4 ELABORACIÓN DE PELÍCULAS A PARTIR DEL PELLET</b> .....	26
<b>3.5 ACONDICIONAMIENTO</b> .....	27
<b>3.6 PRUEBAS MECÁNICAS</b> .....	28
<b>3.6.1 RESISTENCIA A LA TRACCIÓN</b> .....	28
<b>3.6.2 RESISTENCIA A LA PENETRACIÓN</b> .....	30
<b>3.7 PRUEBAS DE BARRERA</b> .....	31
<b>3.7.1 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA</b> .....	32
<b>3.7.2 PERMEABILIDAD AL OXIGENO</b> .....	34
<b>3.8 ELECTROFORESIS</b> .....	36
<b>3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	36
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1 ANÁLISIS COMPOSICIONAL</b> .....	37
<b>4.1.1 RENDIMIENTOS</b> .....	39

<b>4.2 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES</b> .....	41
<b>4.2.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	41
<b>4.2.2 CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL DPPH</b>	42
<b>4.2.3 CAPACIDAD SECUESTRANTE DEL RADICAL ABTS</b> .....	42
<b>4.3 PELÍCULAS FORMADAS</b> .....	44
<b>4.4 RESISTENCIA A LA TRACCIÓN</b> .....	45
<b>4.5 RESISTENCIA A LA PENETRACIÓN</b> .....	48
<b>4.6 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA</b> .....	49
<b>4.7 PERMEABILIDAD AL OXIGENO</b> .....	51
<b>4.8 ELECTROFORESIS</b> .....	52
<b>4.9 COMPARACIÓN GENERAL ENTRE LOS 2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN</b> .....	54
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>57</b>
<b>6. CONSIDERACIONES FINALES</b> .....	<b>59</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>60</b>

## RESUMEN

La generación de plásticos utilizados como empaques en alimentos ha aumentado en los últimos años, por ello se deben crear alternativas de envases que sean amigables con el medio ambiente, una opción es utilizar películas a base de biopolímeros como sustituto o en combinación en la elaboración de estos.

En el presente trabajo se elaboraron películas provenientes de la proteína extraída de la piel de pollo (*Gallus gallus domesticus*) por dos diferentes métodos de extracción, uno llamado método alcalino y otro método alcalino modificado, y se estableció que existían diferencias entre ambos métodos de extracción en la formación de las películas. De manera adicional se elaboraron películas con incorporación de polifenoles extraídos de la semilla de chía (*Salvia hispánica*), para ofrecer además de las propiedades de barrera, una protección contra la oxidación.

Se observó que los dos métodos de extracción de proteína generaron películas con adecuadas propiedades mecánicas y de barrera, comparadas con un empaque comercial, además que con el método modificado se logró elaborar películas translúcidas, y mejoró las propiedades mecánicas. La adición de polifenoles modificó las propiedades mecánicas y de barrera para los dos métodos de extracción.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Las principales ventajas de los plásticos en general, es que tienen la propiedad de ser ligeros, versátiles, durables y aislantes eléctricos. Sus funciones primordiales son permitir el envasado de alimentos y el transporte de productos, debido a esto es que se producen en grandes cantidades (ANIPAC 2015).

La generación de plásticos ha aumentado considerablemente en los últimos años. En el año 2012 a nivel mundial se generaron 288 millones de toneladas. El mayor porcentaje de esta producción, casi el 40%, está destinado al empaque y almacenamiento (Gongora 2014). En el mismo año en México se generaron 6.1 millones de toneladas. La creciente producción de plásticos ha creado un impacto negativo en el medio ambiente. Debido a esta problemática ambiental, es que se desea disminuir el uso de estos plásticos, aplicando alternativas que no dañen el planeta.

Una alternativa para contrarrestar el impacto de la contaminación producida por plásticos se encuentra en la elaboración de películas alimentarias, las cuales se desea cumplan esencialmente con dos criterios; el primero es que sean sistemas biodegradables y el segundo es que ayuden a prolongar la vida de anaquel de productos alimentarios que sirvan como barrera protectora. Los empaques en la actualidad buscan reunir por un lado la biodegradabilidad y por otro tener una funcionalidad adicional para extender la vida de anaquel de alimentos procesados. Estos pueden incorporar moléculas que permitan transformar al empaque en uno denominado activo.

En este estudio se plantea desarrollar un método de extracción de proteína que permita altos rendimientos, utilizando pieles de aves.

Adicionalmente se propone desarrollar un empaque activo con capacidad antioxidante.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **General**

- ❖ Evaluar el efecto del método de extracción de proteínas de piel de ave (*Gallus gallus domesticus*) sobre las propiedades de formar películas, para utilizarlas como empaque alimentario o coadyuvante en la elaboración de estos.

### **Particulares**

- ❖ Lograr la formación de películas activas a partir de la proteína extraída de la piel de pollo, por dos diferentes métodos de extracción, a través de la adición de polifenoles provenientes de la semilla de chía (*Salvia hispánica, L*), para conferirle propiedades adicionales a la película.
- ❖ Evaluar las propiedades mecánicas, resistencia a la tracción, resistencia a la penetración, y de barrera, permeabilidad al vapor de agua y permeabilidad al oxígeno, de las películas formadas, para proponer un uso adecuado según las propiedades que presente.

## **1.2 ESTUDIOS PREVIOS**

El grupo de investigación en el que se hizo este trabajo, se ha estudiado y establecido el potencial de los residuos de pieles de pesquerías y aves como fuente de proteína, con capacidad de formar películas que sirvan como barreras protectoras.

El presente trabajo se derivó esencialmente de tres estudios previos. El primero realizado por Reyes et al. (2007), en el cual se mostró que la semilla de chía contiene una concentración significativa de compuestos fenólicos, así como una capacidad antioxidante elevada comparada con estándares comerciales, por lo que es posible utilizarla para diversos fines enfocados al área de alimentos.

Posteriormente Alcocer (2011) logró formar películas alimentarias provenientes de la proteína extraída de piel de ave (*Gallus gallus domesticus*). Además, demostró que las películas presentaban propiedades de barrera adecuadas para ser usadas como empaque alimentario, debido a su baja permeabilidad al oxígeno.

Finalmente Chávez (2014), logró establecer las condiciones adecuadas para obtener un mayor rendimiento en la extracción de la proteína de piel de pollo y dichas condiciones permanecieron para el desarrollo del presente estudio. Es por ello, que un segmento de esta tesis se enfocó en elaborar películas alimentarias provenientes de piel de pollo con la adición de compuestos fenólicos extraídos de la semilla de chía y si sus propiedades mecánicas y de barrera se ven afectadas en comparación con los estudios previos.

Para fines de este estudio, al método de extracción realizado por Alcocer (2011) y Chávez (2014) lo llamaremos "método de extracción alcalina" para poder diferenciarlo de un segundo método de extracción llevado a cabo, al que llamaremos "método alcalino modificado", el cual está

basado en la metodología propuesta por Limpisophon (2009) con algunas modificaciones.

## **2. ANTECEDENTES (MARCO TEÓRICO)**

### **2.1 POLLO**

En los últimos años la avicultura ha sido un ejemplo de eficiencia productiva, la cual se manifiesta en un incremento en los niveles de nutrición de la población.

En el caso del pollo de engorda, los sistemas de producción han evolucionado notablemente. Por ejemplo en 1950, el pollo al mercado salía a las 12 semanas, con una conversión alimenticia de 3.2:1 (kg de alimento: kg de carne de pollo). Actualmente se pueden obtener mejores resultados con el pollo finalizado a las 7 semanas con una conversión de 1.9:1 (Carmona et al. 2009)

Durante el año 2013, la producción de pollo en México fue de 2 millones 905 mil 498 toneladas, colocando a México en quinto lugar como productor de pollo en el ámbito internacional y siendo su consumo per cápita de 24.8 kg/año.

La producción de carne de pollo se concentra en 14 estados, que abarcan 90% de la producción total y se localizan principalmente en el centro del país. La carne de pollo representa aproximadamente el 50% del consumo de carnes en México.

Los principales estados productores de carne de pollo son:

- ❖ Veracruz y Querétaro 11%
- ❖ Coahuila (La Comarca Lagunera) 10%
- ❖ Puebla 7%
- ❖ Jalisco y Yucatán 6%
- ❖ Chiapas, Estado de México, Guanajuato y Sinaloa con 5% cada uno; Nuevo León, San Luis Potosí e Hidalgo con 3%; Morelos y Michoacán con 2%.

Según las proyecciones de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) y la FAO (Food and Agriculture Organization), la producción y el consumo de pollo se incrementará 28.5% entre 2010 y 2021 y el comercio aumentará 19.8% en el mismo período. De esta manera el consumo mundial de pollo crecerá a 24,975 millones de toneladas.

### **2.1.1 SISTEMA TEGUMENTARIO**

Las cubiertas exteriores protectoras del cuerpo del ave son; la piel, principalmente tegumento cutáneo, y su fanera más abundante es el plumaje. La piel de las aves está formada por dos capas, la epidermis y la dermis, bajo casi toda la extensión de la dermis, se encuentra una delgada fascia de tejido conectivo y adiposo. Sin embargo, las aves no almacenan gran cantidad de grasa debajo de la piel sino que la acumulan en el interior del abdomen.

### **2.1.2 PIGMENTACIÓN DE LA PIEL**

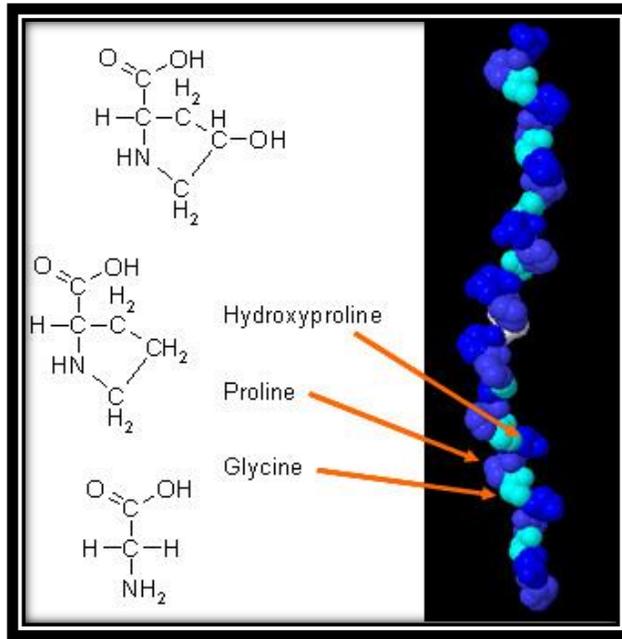
La piel de las gallinas es blanca. Sin embargo, cuando la dieta incluye pigmentos amarillos puede almacenarlos en la grasa de la piel, el pico y las escamas. Los pigmentos xantofilas naturales y los carotenoides concentrados se adicionan al alimento a fin de lograr la pigmentación comercial requerida, esta puede estar compuesta por harina de pétalo de caléndula, harina de algas, pasto bermuda, harina de alfalfa, harina del gluten de maíz, maíz amarillo (North & Bell 1993).

### **2.2 COLÁGENO**

El colágeno es un material extracelular fabricado por los fibroblastos y es una proteína fibrosa que resulta relativamente insoluble en agua, en él existen 20 aminoácidos fundamentales.

El colágeno que se encuentra en todos los animales multicelulares, es la proteína más abundante en los vertebrados. Sus fibras fuertes e insolubles dan mayor resistencia a los tejidos conectivos como hueso, dientes, cartílago, tendón y las matrices fibrosas de la piel y los vasos sanguíneos. Una molécula de colágeno solo presenta tres cadenas polipeptídicas.

El colágeno tiene una composición aminoácida característica: cerca de un tercio de sus residuos son glicina (Gly), otro 15 a 30% de sus residuos son prolina (Pro) y 4-hidroxiprolina (Hyp). La Figura 1 muestra la estructura química del colágeno.



**Figura 1. Estructura química del colágeno.**

### 2.3 EMPAQUES

Los empaques tienen como función primaria contener al producto, proteger contra el daño físico y servir como barrera a gases, humedad, luz, contaminación física, química y biológica, para con ello prolongar la vida de anaquel de un producto.

Entre las características que se deben tener en cuenta en su fabricación son:

- ✓ Costo
- ✓ Normatividad
- ✓ Conveniencia
- ✓ Impacto ambiental

Actualmente se puede clasificar a los empaques en dos categorías:

1) Pasivos o tradicionales

- ✓ Barrera inerte

2) Funcionales

- ✓ Inteligente: Son aquellos que responden y comunican cambios en la condición del producto
- ✓ Activos: Neutralizan reacciones de deterioro
- ✓ Atmosferas modificadas
- ✓ Películas y recubrimientos comestibles

### **2.3.1 PELÍCULAS**

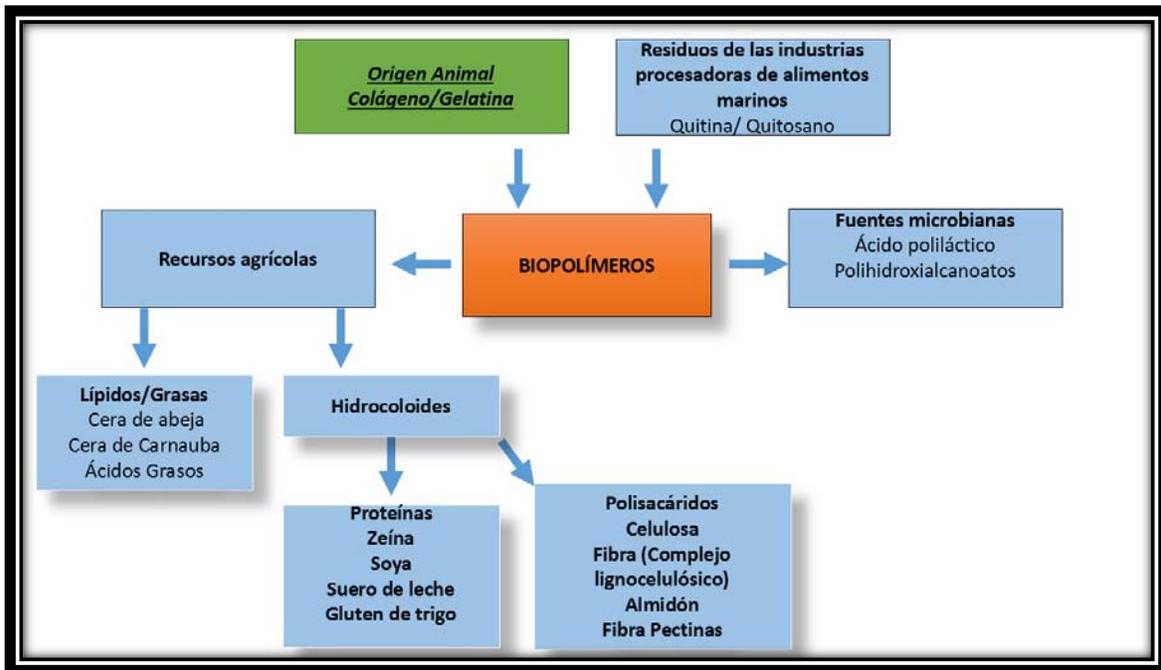
Se define como película comestible a una o varias capas delgadas de un material, que puede ser consumido por los seres vivos y que a su vez puede actuar como barrera a la transferencia de agua, gases y solutos hacia el alimento (Bamdad et al. 2006).

Las funciones de las películas son:

- ✓ Contener el producto
- ✓ Proteger contra daño físico
- ✓ Actuar como barrera contra humedad, gases y contaminación

La diferencia entre las películas y los recubrimientos consiste en que por lo general, las películas son preformadas y los recubrimientos se forman directamente sobre los productos en los que se aplican.

Las cubiertas y películas comestibles se han utilizado en alimentos para protegerlos del ataque microbiano y prevenir la pérdida de la actividad de agua durante su almacenamiento. Los biopolímeros que son usados para producir películas como empaques biodegradables y recubrimientos se muestran en la Figura 2 (Tharanathan 2003).



**Figura 2 Biopolímeros utilizados para la elaboración de películas alimentarias.**

Las proteínas son usadas comúnmente como materiales formadores de películas, las cuales son capas finas que actúan como barrera a factores externos. Estas películas son consideradas generalmente como barreras efectivas contra los gases a una humedad relativamente baja (Gennadios 2002; Ghanbarzadeh & Oromiehi 2009).

Las películas de proteínas se adhieren fácilmente a superficies hidrófilas, pero en la mayoría de los casos no son resistentes a la difusión de agua. Las fuentes más comunes son: Caseína, zeína, soya, albúmina de huevo, lacto albúmina, suero de leche, gluten de trigo y colágeno.

Las películas a base de proteínas, tal vez puedan ayudar con la reducción de los residuos de envases a través de la reducción de fuentes. Si las características de barrera de una película permiten la conversión de un empaque plástico con multicapas a un envase de un solo componente el reciclaje de empaques podría ser mejorado (Damodaran & Paraf, 1997).

Las películas elaboradas con polímeros de proteínas pueden sufrir diferentes tipos de degradación los cuales se enlistan en la Tabla 1 (Avendaño 2009).

**Tabla 1 Agentes externos que provocan distintos tipos de degradación.**

<b>Agente externo</b>	<b>Tipo de degradación</b>
Luz Solar	Fotodegradación
Calor	Térmica
Agentes atmosféricos	Oxidativa
Humedad	Hidrolítica
Hongos y microorganismos	Biodegradación
Luz y Oxígeno	Fotodegradación oxidativa
Calor y Oxígeno	Degradación Termo-oxidativa
Luz y Humedad	Degradación Fotohidrolítica

En este trabajo se desarrollaron películas elaboradas a partir de la proteína extraída de piel de pollo, ya que esta es desechada en muchos lugares en el punto de venta. Según el estudio realizado por Fereidoun (2007) para un pollo de 2000 gramos, la piel y la grasa representan el  $15.2 \pm 2.1\%$ , debido a esto es que se decidió aprovecharla.

## **2.4 ADITIVOS**

Diversos materiales pueden ser adicionados a las películas comestibles para impartir propiedades mecánicas, nutricionales, protectoras y sensoriales de las películas, como son: agentes antimicrobianos, ácidos orgánicos, antioxidantes, colorantes, saborizantes y otros aditivos nutricionales (Guilbert 1986).

Los aditivos pueden ser:

- a) Plastificantes (ceras, aceites, ácidos grasos)
- b) Conservadores químicos (ácido benzoico, ácido sórbico)
- c) Surfactantes y emulsionantes (grasas, aceites) (Yu 2004)

## **2.5 PLASTIFICANTES**

Un plastificante es definido como una sustancia no volátil, de alto punto de ebullición, no separadora de sustancias, que cuando se adiciona a otro material cambia las propiedades físicas, mecánicas o ambas de dicho material.

Los plastificantes son añadidos para incrementar la flexibilidad, la resistencia al corte y la dureza, así como para reducir la fractura. Esto es así porque reducen las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del polímero e incrementan el volumen libre, en consecuencia existe más espacio para que las moléculas de agua migren. Además, los plastificantes hidrofílicos como el glicerol son compatibles con el material polimérico que forma la película y aumentan la capacidad de absorción de moléculas polares tales como el agua (Avendaño 2009).

Los plastificantes usados en la elaboración de películas fueron Glicerol y Sorbitol, debido a que estudios previos dentro de nuestro grupo de trabajo han demostrado ser altamente efectivos para la formación de películas, brindando flexibilidad y menor aspecto quebradizo, además de no interferir en la coloración de las películas.

En general las películas y recubrimientos a base de proteínas son rígidas y frágiles debido al gran número de interacciones entre las cadenas de proteínas: puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro. Por esta razón, y para mejorar el

comportamiento mecánico de estas películas es necesario agregar un plastificante en la formulación. En general estas pequeñas moléculas compiten por los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas con las proteínas, disminuyendo de esta manera el entrecruzamiento entre las cadenas de proteínas (Krochta 2002).

## **2.6 ANTIOXIDANTES**

Existen estudios en elaboración de películas, en los que se reporta que al agregar sustancias llamadas aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes, colorantes y otros, se incrementan las funciones para proteger a los alimentos (Ou et al. 2005).

Entre los aditivos que se pueden agregar a las películas se encuentran los antioxidantes, cuya funcionalidad al añadirse es la de prevenir:

- ✓ Rancidez
- ✓ Deterioro de aroma y sabor
- ✓ Deterioro de color

Entre los antioxidantes comerciales que se pueden adicionar a las películas se encuentran:

- BHA, BHT, TBHQ, PG
- **Monofenoles, fenoles ( $\alpha$  tocoferol)**
- Ácido ascórbico
- Glucosa oxidasa
- Extractos de romero y salvia. (Ponce 2007).

## **2.7 CHÍA**

El género *Salvia* consiste de cerca de 900 especies de la familia Lamiaceae, entre los usos que se le han dado se encuentran el actuar con fines terapéuticos y culinarios (Silva 2009)

En esta semilla se ha reportado la presencia de ácido cinámico, clorogénico y cafeíco junto con los flavonoides myricetina, quercetina y kaempferol en extractos hidrolizados (Reyes et al. 2007)

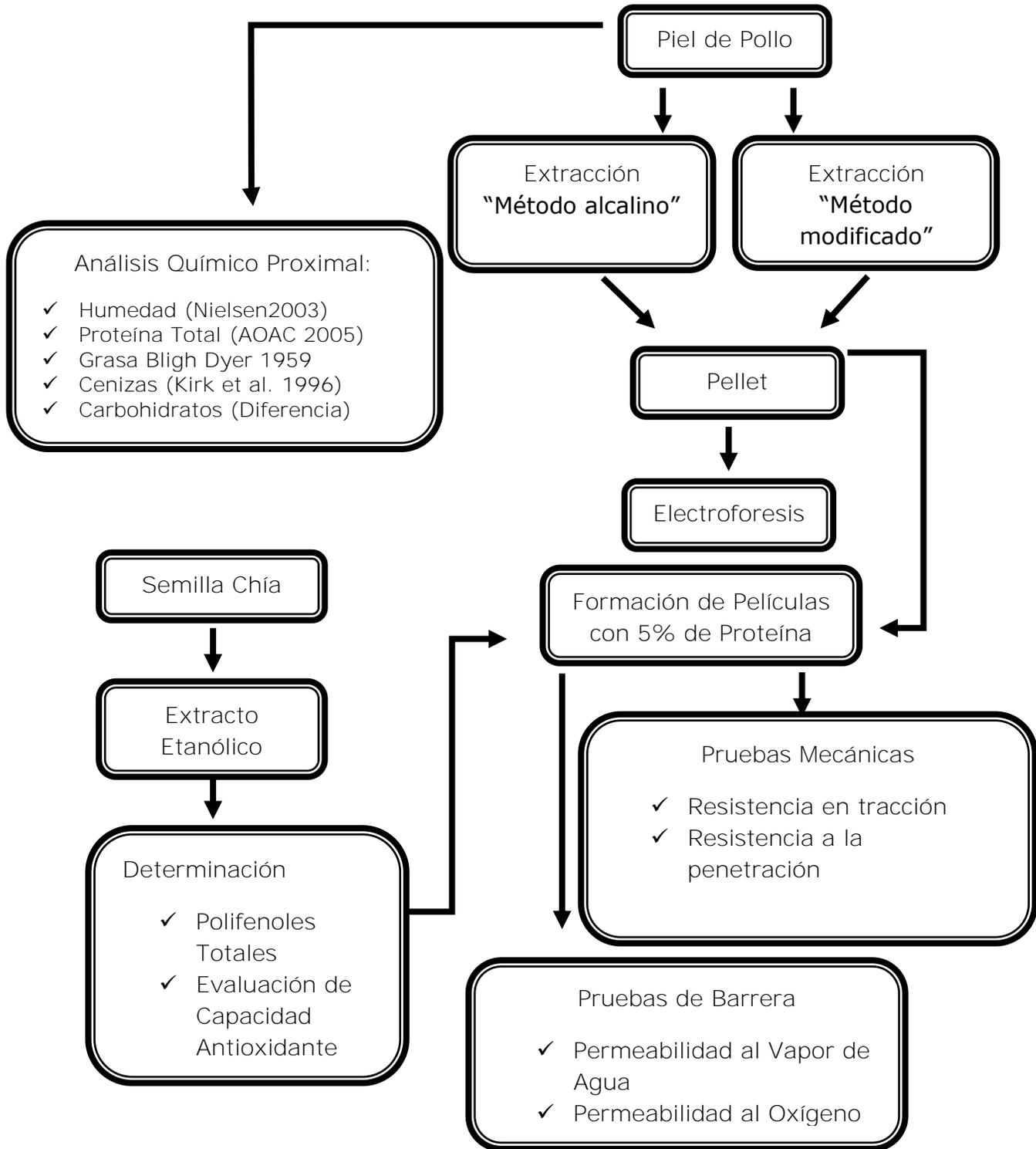
En el estudio realizado por Reyes et al. (2007), se reportó que la semilla de chía presenta una actividad antioxidante comparable con un estándar comercial, llamado Trolox<sup>®</sup>, por lo que se concluye que las semillas de chía podrían utilizarse para producir potentes antioxidantes naturales o ingredientes funcionales con aplicaciones comerciales.

La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos y sus ésteres depende del número de grupos hidroxilo en la molécula.

Los compuestos fenólicos poliméricos poseen mayor capacidad antioxidante que los fenoles simples. La presencia de grupos  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  en derivados de ácidos cinámicos da una gran habilidad como donadores de hidrógeno junto con una estabilización radical (Cruz 2008).

### **3. METODOLOGÍA**

La Figura 3 muestra el diagrama general de experimentación.



**Figura 3. Diagrama general de experimentación.**

## **3.1 PIEL DE POLLO OBTENCION Y CARACTERIZACIÓN**

### **3.1.1 ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL**

La piel de pollo fue adquirida en el mismo lugar durante todo el ensayo en una pollería local, se realizó una limpieza física que consistió en quitar toda la grasa posible así como uñas, patas, hueso músculo.

Posteriormente se realizó el análisis químico proximal (AQP) con la finalidad de conocer las características iniciales de la piel de acuerdo a los siguientes métodos:

- Se determinó la humedad por estufa al vacío (Nielsen 2003)
- Se determinó el contenido de proteína cruda total por el método de Kjeldahl (AOAC 2005)
- Se determinó el contenido de grasa por el método Bligh – Dyer (1959)
- Se determinaron las cenizas por el método de calcinación (Kirk et al. 1996)
- El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia.

A continuación se describen las dos metodologías para extraer las proteínas y obtener el concentrado proteínico.

## **3.2 METODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

### **3.2.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN ALCALINO**

Una vez realizado el AQP, la piel se troceó y se le adicionó agua destilada en una proporción de 1:2.5 m/v, se dejó en agitación en una parrilla con agitación magnética marca Thermo Scientific, modelo Cimarec con microprocesador para mantener la temperatura constante, con velocidad de agitación número 5, durante 30 minutos a 50 °C. Transcurrido este tiempo la piel se molió con una licuadora doméstica (marca **Oster**) y el licuado obtenido se pasó por un colador de plástico casero con malla número 10 con la finalidad de retener los restos que no se molieron. Los restos no molidos se exprimieron con manta de cielo para obtener un mayor rendimiento. La piel molida se regresó al agua madre, después se adicionó hidróxido de sodio 1 mol/L hasta llegar a pH 10.5. Se continuó el calentamiento a 50 °C con agitación durante 30 minutos, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y posteriormente se dejó en refrigeración por 12 horas como mínimo a una temperatura de 4°C. Transcurrido este tiempo se retiró la grasa que corresponde a la capa superior de la mezcla, con ayuda de una espátula.

La mezcla restante se centrifugó (Centrifuga Beckman Coulter Modelo J2 MC, Modelo de Rotor JA10 Fixed Angle Rotor United States) a 7500 rpm y 4 °C durante 15 minutos con la finalidad de separar la grasa restante. La disolución remanente se filtró al vacío en un embudo Büchner con papel filtro para retener los glóbulos de grasa que aún podrían existir. A la disolución filtrada se le adicionó una disolución de hexametáfosfato de sodio 10% en una relación de 1 mL de polifosfatos por cada 50 mL del filtrado. A la disolución obtenida se le adicionó HCl 2 mol/L con agitación en una parrilla con agitación magnética marca Thermo Scientific, modelo Cimarec, con velocidad de agitación número 5, hasta alcanzar pH 4.6, se continuó la agitación por 15 minutos, se dejó en refrigeración por 12

horas, con la finalidad de precipitar las proteínas. La disolución obtenida se centrifugó a 6500 rpm a 4 °C durante 15 minutos, y se obtuvo el concentrado proteínico en forma de pellet. El pellet se analizó para determinar proteína total y humedad por los métodos mencionados anteriormente.

### **3.2.2 MÉTODO MODIFICADO**

Para realizar dicha extracción se siguió la metodología propuesta por Limpisophon et al. (2009) con modificaciones basadas en el método de extracción alcalina, realizando lavados a la piel con hidróxido de sodio, y posteriormente realizar los lavados con ácido acético glacial, removiendo la grasa durante el proceso.

Se adicionó una disolución de hexametafosfato de sodio, 1 mL de hexametafosfato por cada 50 mL de disolución, para ayudar a precipitar las proteínas. Se adicionó HCl 2 mol/L hasta que se alcanzó pH de 4.6 y se dejó en reposo y refrigeración por 12 horas. El sobrenadante se decantó y el precipitado se centrifugó a 6500 rpm por 15 minutos a 20 °C para obtener el concentrado proteínico llamado pellet. Al pellet se le determinó el contenido de humedad y el contenido de proteína por los métodos mencionados anteriormente.

## **3.3 EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS A PARTIR DE LA SEMILLA DE CHÍA**

### **3.3.1 EXTRACCIÓN CON ETANOL**

Para la extracción de compuestos fenólicos se realizó la metodología propuesta por Reyes et al. (2007). La semilla de chía se desengrasó usando el método de Soxhlet (James 1999) empleando éter de petróleo como disolvente.

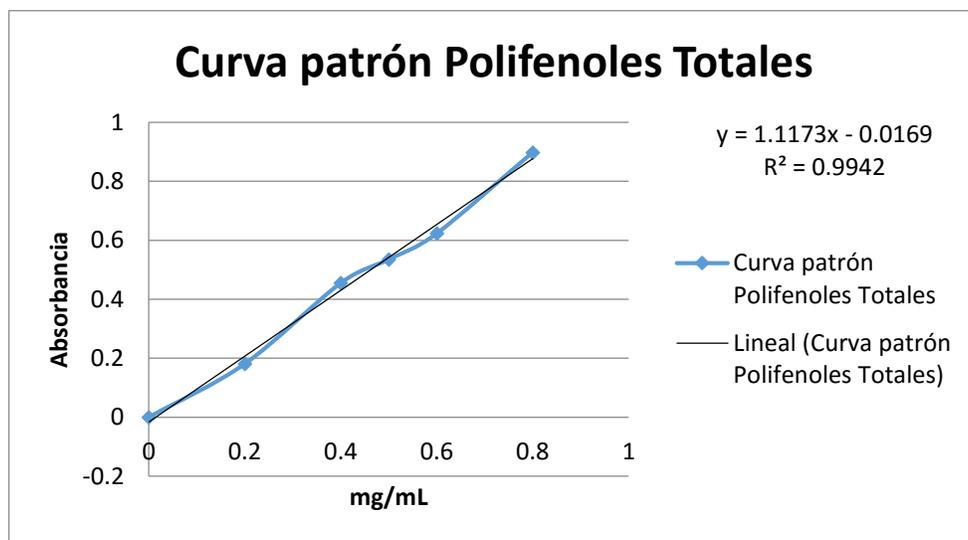
A la muestra desengrasada se le adicionó etanol en una proporción 1:10 m/v y se agitó en una parrilla con agitación magnética marca Thermo Scientific, modelo Cimarec, con velocidad de agitación número 4 por 48 horas a temperatura ambiente. La disolución se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos.

El sobrenadante fue evaporado a 40 °C en un rotavapor Büchi R-200-205, Flawil Switzerland y el remanente fue removido soplando el gas nitrógeno con ayuda de una punta de plástico. El residuo fue sometido a una segunda extracción con 15 mL de etanol y filtrado para recuperar el extracto crudo.

### **3.3.2 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

Se determinaron los compuestos fenólicos totales del extracto etanólico de la chía por el método descrito por Reyes et al. 2007. Los compuestos fenólicos totales se determinaron como equivalentes de ácido gálico (GAE), Figura 4.

Dos mililitros del extracto crudo fueron mezclados con 3 mL de HCl 0.3% en etanol. Posteriormente una alícuota de 100 µL fue mezclada con 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% agitando y mezclando con un volumen igual del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 agua-reactivo Folin Ciocalteu). Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (≈ 25°C) la absorbancia fue leída a 750 nanómetros en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 3 United States, y se comparó con la curva patrón de ácido gálico.



**Figura 4 Curva patrón de polifenoles totales.**

### **3.3.3 DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Se evaluó la capacidad antioxidante de los polifenoles provenientes de la semilla de chía por dos métodos, el primero se realizó por el ensayo ABTS, este método mide la capacidad de los diferentes componentes de atrapar el radical catiónico ácido 2,2'-azinobis-(3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Se midió la actividad antioxidante en una mezcla de reacción que contiene 0.5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 µmol/L, 0.5 mL de ABTS 2 mmol/L y 0.5 mL de peróxidasa de rábano (1 mg/mL) en una disolución buffer de fosfato de sodio 50 mmol/L, a pH 7.5. El donador fue la hidrógeno-peroxidoreductasa. La reacción fue monitoreada a 730 nm hasta que alcanzó una absorbancia estable. Entonces 0.5 mL del extracto (0.2 mg de compuestos fenólicos/mL de extracto) se añadió al medio de reacción y la disminución de la absorbancia se registró durante 12 min. La capacidad de atrapar el radical se calculó utilizando la ecuación 1, donde A<sub>0</sub> es la absorbancia en t = 0 min y A<sub>12</sub> es la absorbancia a t = 12 min.

## Ecuación 1

$$SA_{ABTS+} = \left( \frac{A_0 - A_{12}}{A_0} \right) 100$$

También se evaluó la actividad antioxidante por el método DPPH (Matthäus 2002) y se comparó contra un estándar comercial llamado Trolox®.

El método DPPH se basa en la capacidad del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazil para reaccionar con donadores de H<sup>+</sup>. El radical DPPH tiene un máximo de absorbancia a 517 nm y genera un producto incoloro cuando captura un antioxidante. De esta forma se mide la disminución de la absorbancia de una disolución estable del radical DPPH en presencia de sustancias antioxidantes con grupos OH activos donadores de H<sup>+</sup> capaces de capturar los radicales libres (Kaneda et al. 1995)

El porcentaje de la capacidad secuestrante sobre el radical DPPH se calculó de la siguiente manera:

$$\%CS_{DPPH} = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=14min}}{Abs_{t=0}} \times 100$$

### 3.4 ELABORACIÓN DE PELÍCULAS A PARTIR DEL PELLET

Se realizaron los cálculos para elaborar películas con 5% de proteína base seca. Se elaboraron tres tipos de películas para el método de extracción alcalina.

1. Películas control sin adición de antioxidantes.
2. Películas con adición de antioxidante comercial (Trolox<sup>®</sup>) en una concentración de 200 ppm.
3. Películas con adición de antioxidante proveniente de la chía en una concentración de 200 ppm.

Se elaboraron dos tipos de películas para el método modificado.

1. Películas control sin adición de antioxidantes.
2. Películas con adición de antioxidante proveniente de la chía en una concentración de 200 ppm.

La formulación de la película basada en proteínas es de 5% (m/v) y 9% (m/v) plastificantes (sorbitol-glicerol 1:1). Para conocer la cantidad del concentrado proteínico (C.P.) y del plastificante por adicionar se realizaron los cálculos como se muestra en el siguiente ejemplo.

Partiendo del pellet que tiene una concentración conocida de 9.67 g de proteína, se desea elaborar 500 mL de la disolución que contenga 5% de proteína.

$$500 \text{ mL formulación} \left( \frac{5 \text{ g proteína}}{100 \text{ mL formulación}} \right) \frac{100 \text{ g pellet}}{9.67 \text{ g proteína}} = 258.53 \text{ g pellet}$$

$$258.53 \text{ g pellet} \left( \frac{9 \text{ g Plastificantes}}{100 \text{ g proteína B.H de C.P}} \right) = 23.26 \text{ g plastificantes}$$

Una vez conocida la cantidad de pellet a pesar, este se calentó a 70 °C para disolverlo, después se adicionó NaOH 1 mol/L hasta llegar a pH 10.5, en este punto se adicionó el antioxidante (Trolox o el proveniente de la extracción de la semilla de chía) para las películas que lo requieran, en una concentración de 200 ppm.

A continuación se adicionó una mezcla de polioles (sorbitol y glicerol) que fungen como plastificantes (9 g de combinación de plastificante/100 g pellet), estos se agregaron en una proporción 1:1 m/m. La disolución anterior se aforó a un volumen de 500 mL con agua destilada.

La mezcla se calentó en un baño de agua en un equipo Boekel Scientific Shaking tubes a 70 °C por 10 minutos, posteriormente se realizó un filtrado al vacío en caliente. El filtrado se calentó nuevamente a las mismas condiciones. Posteriormente la mezcla se vertió en una superficie de silicona, procurando distribuirla de manera uniforme, se cubrió con manta de cielo, evitando tocar la película para evitar contaminarla con impurezas del aire, se dejó secar a temperatura ambiente por dos días o el tiempo necesario para que sea posible remover la película.

### **3.5 ACONDICIONAMIENTO**

Se realizaron las pruebas mecánicas y de barrera para conocer las características de las películas elaboradas, en cuanto a su capacidad de resistencia en tracción, resistencia a la penetración, permeabilidad al vapor de agua y permeabilidad al oxígeno.

Las películas fueron acondicionadas antes de realizar las determinaciones para mantener las mismas características en todos los especímenes; Primero se midió el espesor de las películas con un micrómetro (Fowler High Precision modelo 09920-80 United States).

Las condiciones a las que se ajustaron las películas fueron:

- ✓ Humedad relativa (HR)  $60\% \pm 2\%$
- ✓ Temperatura  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$

Estas condiciones fueron medidas con un termohigrómetro (Wheater Controls marca Oakton modelo 35700-10. Japón).

### **3.6 PRUEBAS MECÁNICAS**

#### **3.6.1 RESISTENCIA A LA TRACCIÓN**

Una vez que se acondicionaron las películas, se cortaron en tiras de 8 cm de largo por 1 cm de ancho, se midió el espesor con un micrómetro en 5 puntos diferentes de la tira y se obtuvo un valor promedio de cada tira, con la finalidad de tener el espesor correspondiente. La tira se sujetó por los extremos con las mordazas conectadas al equipo de pruebas mecánicas (marca Sintech 1/S, MTS, EE.UU.) y estas se estiraron en forma unidireccional hasta su ruptura como se muestra en la Figura 5.

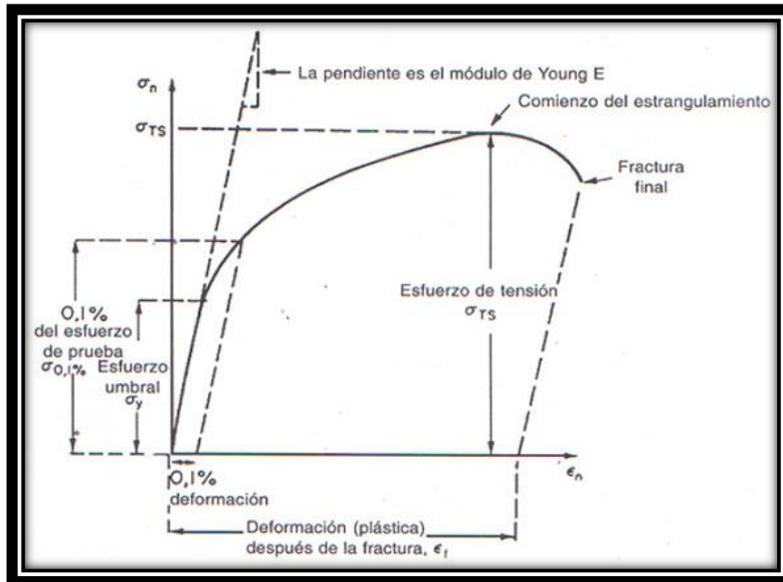


**Figura 5. Prueba de resistencia a la tracción.**

En la Figura 6 se muestra el comportamiento típico que sigue la prueba de resistencia en tracción y a partir de ella se calcularon:

- El Esfuerzo Normal Verdadero ( $\sigma_v$ ).
- La Deformación de Hencky ( $\xi_H$ ).
- El Esfuerzo de Tracción Máximo Verdadero.
- El Módulo de Young.

El esfuerzo es la razón de una fuerza aplicada entre el área sobre la que actúa y la deformación es el cambio relativo en las dimensiones o en la forma de un cuerpo como resultado de la aplicación de un esfuerzo.



**Figura 6. Comportamiento típico de esfuerzo vs deformación.**

### Esfuerzo Normal

$$\sigma = \frac{F}{A} [=] \frac{N}{m^2} [=] Pa$$

En donde:

A es el área inicial de la película  $A = \text{espesor} \times \text{ancho}$

✓ **Longitud**

$$L = v \times t$$

En donde:

v es la velocidad, constante, de la prueba y t es el tiempo

**Deformación de Cauchy**

$$e = \frac{\Delta L}{L_0}$$

Donde:

$\Delta L$  tracción es igual a la *Longitud al tiempo t – longitud inicial*

$\Delta L$  penetración es igual a la *Longitud al tiempo t + 20 mm*

**Esfuerzo Normal Verdadero**

$$\sigma_v = \sigma (1 + e)$$

**Deformación de Hencky**

$$\varepsilon_H = \ln (1 + e)$$

También se realizaron las pruebas mecánicas y de barrera a una bolsa Ziploc® (LDPE), con la finalidad de comparar las películas con un producto comercial.

**3.6.2 RESISTENCIA A LA PENETRACIÓN**

Se cortó una película circular de 10 cm de diámetro y se fijó entre dos placas circulares de soporte las cuales tienen un orificio central para permitir el paso de la punta de prueba. El soporte se colocó en el equipo de pruebas mecánicas y la punta de prueba, consistente en un cilindro

metálico de 11.9 mm de diámetro, se hizo descender a una velocidad de 250 mm/min hasta romper la película como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7. Equipo Sintech durante la prueba de resistencia a la penetración.**

Los datos que proporcionó el equipo fueron extensión, tiempo y carga. A partir de ellos se obtuvieron el esfuerzo máximo verdadero y la deformación de Hencky.

### **3.7 PRUEBAS DE BARRERA**

En la elaboración de películas lo que se busca es establecer una barrera adecuada entre el alimento y el medio ambiente, por ello se evaluaron dos parámetros. El primero es la permeabilidad al vapor de agua y el segundo es la permeabilidad al oxígeno. Lo que se desea es que la película ayude a controlar la migración de gases, aromas y vapor de agua.

En las películas, el transporte de gas puede ocurrir por dos mecanismos: difusión capilar y difusión activa. El primero ocurre en materiales que porosos o con imperfecciones, y la difusión activa incluye la disolución

del gas en la película, difusión a través de la película y finalmente el paso al otro lado de la misma. La velocidad de difusión aumenta con el tamaño y el número de cavidades, cuya formación es causada por la presencia de sustancias como los plastificantes. Por lo tanto, la difusión activa dependerá del tamaño y de la polaridad del agente penetrante, de la cristalinidad, de los enlaces y los movimientos de las cadenas poliméricas.

El mecanismo de capilaridad puede presentarse cuando no hay imperfecciones en la película y el gas permeante es insoluble en ella. La velocidad de permeabilidad disminuye con el diámetro de la molécula permeante cuando no hay interacción entre él y el polímero (Avendaño 2009).

### **3.7.1 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA**

La permeabilidad al vapor de agua es la cantidad de vapor (g) que pasa por unidad de superficie ( $m^2$ ) de un material de espesor unidad (cm) por unidad de tiempo (día) cuando entre sus paredes existe una diferencia de presión unitaria (mm Hg).

La prueba de PVA se realizó de acuerdo al método ASTM E96 (2010). Este es un método gravimétrico que determina la cantidad de agua que pasa a través de la película. Para ello se cortaron las películas de acuerdo al tamaño de la celda, se midió el espesor en cinco diferentes puntos y se acondicionaron como ya se ha descrito anteriormente.

Para realizar la prueba, el cloruro de calcio (desecante) se molió para homogeneizarlo, y posteriormente se secó en una estufa por un periodo de 2 horas. A continuación se colocó en celdas de acrílico una cantidad conocida, dejando un espacio de cabeza de 1 cm, se dejaron a peso constante.

Las películas se fijaron en las celdas a peso constante usando cuatro tornillos localizados alrededor de la boca de la celda que permiten fijar bien la película.

A las celdas ensambladas se les determinó el peso inicial para posteriormente colocarlas en un desecador con una disolución saturada de  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ , midiendo la temperatura y la humedad relativa (HR) con un termohigrómetro. Se registró el peso cada 24 horas por 4 días posteriores a la lectura inicial, Figura 6.

Con los datos recolectados se trazó la gráfica de ganancia de peso (g) vs tiempo (t). La pendiente, "m", resultante se sustituye en la ecuación 2, para calcular la Transmisión de vapor de agua (TVA), el valor de "A" corresponde al área de la película ( $m^2$ ).

Ecuación 2. Transmisión de vapor de agua ( $g/h \cdot m^2$ )

$$TVA = \frac{m}{A}$$

La permeanza se calculó con la ecuación 3

Ecuación 3.

$$Permeanza = \frac{TVA}{(s)(HR)}$$

En donde "s" es la presión de vapor de agua (Pa) a la temperatura de prueba y "HR" es la humedad relativa del aire.

Finalmente para calcular la PVA se usó la ecuación 4

Ecuación 4

$$PVA = (Permeanza)(\Phi)$$

En donde  $\Phi$  es el espesor promedio de las películas analizadas previamente medidas con el micrómetro.



**Figura 8. Realización de la prueba de permeabilidad al vapor de agua.**

### **3.7.2 PERMEABILIDAD AL OXIGENO**

Se evaluó la permeabilidad al oxígeno de las películas elaboradas por el método ASTM D1434 (1998). Se realizó la determinación por triplicado para todas las muestras.

Las películas previamente se cortaron en círculos de 9 cm de diámetro y se acondicionaron como ya se ha explicado con anterioridad, sobre dicha película se colocaron dos láminas de papel filtro cuya función es la de servir como medio de soporte.

Las películas junto con las láminas de papel filtro se colocaron en una celda de transmisión (CSI-135 Permeability Cell Tester, EE.UU) con un empaque de teflón cubierto con vaselina, para sellar sus dos compartimientos por medio de cuatro tornillos fijados de manera simétrica.

Para purgar la celda se aplicó una presión de gas positiva proveniente de un cilindro de oxígeno comprimido, durante 10 minutos. Durante ese tiempo las válvulas de la celda se mantuvieron abiertas para purgar el aire por desplazamiento con oxígeno. Posteriormente se inyectaron 15 microlitros de 4 metil-2 pentanona en el capilar, cuando este se encontró en equilibrio dentro del manómetro, y se cerró inmediatamente la válvula de escape superior y se ajustó la presión a 20 psi.

El coeficiente de transmisión de oxígeno permite a su vez determinar la permeabilidad usando la ecuación 5

Velocidad de transmisión de gas ( $\text{mol/m}^2 \cdot \text{s}$ )

Ecuación 5

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

En donde:

A= Área de transmisión del espécimen ( $\text{mm}^2$ )

$\rho_0$ = Presión ambiental (Pa)

R= Constante universal del gas ideal ( $8.314 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{Pa}/\text{mol} \cdot \text{K}$ )

T= Temperatura ambiente

Vr= Velocidad del líquido en el capilar ( $\text{mm}^3/\text{s}$ )

Para calcular la permeanza se usó la ecuación 6

Ecuación 6

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

En donde:

$\Delta P$ = Diferencia de presión parcial de gas en ambos lados de la película (kPa)

La permeabilidad al oxígeno se calcula utilizando la ecuación 7

Permeabilidad al oxígeno ( $\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m} / \text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}$ ).

Ecuación 7

$$P O = P * \text{Espesor de la película}$$

### **3.8 ELECTROFORESIS**

Esta técnica se basa en el desplazamiento de las proteínas cargadas en un campo eléctrico, para determinar los pesos moleculares, es por ello que se utilizó para saber cuáles proteínas están presentes en el pellet.

Se realizó una electroforesis mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), al concentrado proteínico de la extracción del colágeno.

Para ello, se prepararon geles desnaturalizantes, con una concentración de poliacrilamida de 10% para el gel separador, y 5% para el gel concentrador. Para determinar proteínas de alto peso molecular, se usaron como referencia marcadores de 10-200 kDa.

### **3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se analizaron los datos de las pruebas mecánicas y de barrera con un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95%, para saber si existe diferencia significativa entre las películas elaboradas con los dos métodos de extracción e incluyendo las adicionadas con polifenoles y nuestra referencia.

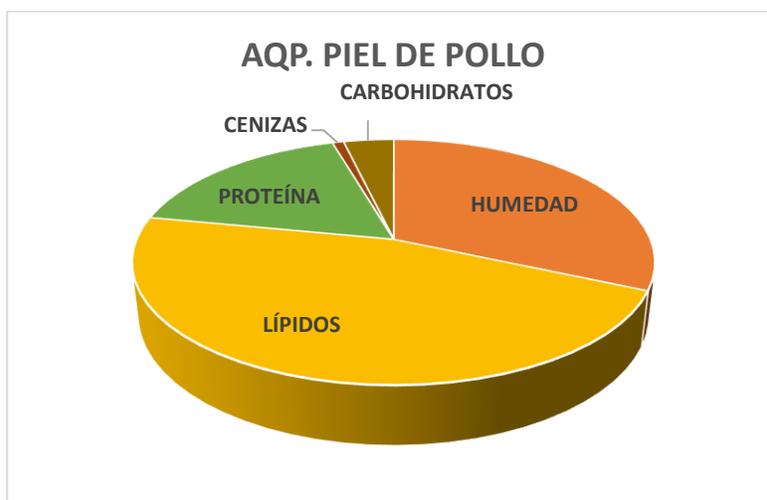
## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 ANÁLISIS COMPOSICIONAL**

Los resultados del análisis composicional de la piel de pollo se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 9.

**Tabla 2. Análisis químico proximal de la piel de pollo.**

<b>Componente</b>	<b>g/100g muestra</b>
<b>Humedad</b>	30.04±1.80
<b>Lípidos</b>	44.16±1.90
<b>Proteína</b>	<b>16.57±1.06</b>
<b>Cenizas</b>	0.79±0.12
<b>Carbohidratos</b>	≤ 3.52



**Figura 9. Composición de la piel de pollo.**

Se observa que la piel de pollo tiene una gran cantidad de lípidos, por lo que es importante realizar una extracción de este macro-componente, ya que interfiere en la elaboración de las películas, impidiendo la unión entre las cadenas de proteínas.

En cuanto al contenido de proteína se observa que el valor obtenido es similar al reportado por Alcocer (2011), 15.84%, y Chávez (2014), 14.37%. El contenido de proteína expresado en base seca es 25.47%.

Debido a que el contenido de proteína no es tan alto en comparación con la piel de otras especies como las acuáticas con las que se ha trabajado en proyectos anteriores (Tabla 3), es importante realizar una buena extracción para obtener la mayor cantidad de proteína.

**Tabla 3. Comparación en el contenido de proteína en la piel.**

Especie	Proteína base húmeda (%)
<b>Pollo (<i>Gallus gallus domesticus</i>)</b>	16.57
<b>Cazón (<i>Galeorhinus galeus</i>)</b>	31.95
<b>Mero (<i>Epinephelus</i>)</b>	26.36

**(Rizo 2013; Granados & Martínez 2010).**

Una vez realizada la extracción de proteína se realizó un análisis composicional al concentrado proteínico para verificar cuánto se extrajo de este componente, ya que a partir de estos datos es que se elaboraron películas con 5% de C.P.

Los resultados de la extracción se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Análisis composicional al Concentrado Proteínico.**

<b>Componente</b>	<b>Extracción alcalina g/100g pellet</b>	<b>Extracción alcalina modificada g/100g pellet</b>
Humedad	88.07±1.33	89.03±1.86
Lípidos	0.0358±0.0005	0.0343±0.0004
Proteína	9.67±0.27	10.62±0.67
Cenizas	0.038±0.001	0.029±0.003
Carbohidratos	Diferencia	Diferencia

Se observa que el porcentaje de proteína obtenida entre los 2 métodos es similar, posteriormente se calcularon los rendimientos de la extracción para los dos métodos.

#### **4.1.1 RENDIMIENTOS**

El rendimiento se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{16.57 \text{ g proteína}}{100 \text{ g piel}} * 2000 \text{ g piel} = 331.4 \text{ g proteína inicial}$$

Para la extracción de proteína por el método alcalino.

$$260 \text{ g pellet} \frac{9.67 \text{ g proteína}}{100 \text{ g pellet}} = 25.14 \text{ g deproteína}$$

$$\frac{25.14 \text{ g de proteína}}{331.4 \text{ g de proteína}} * 100 = 7.58\%$$

Para la extracción modificada

$$380\text{g pellet} \frac{10.62\text{g proteína}}{100\text{g pellet}} = 40.35\text{g de proteína}$$

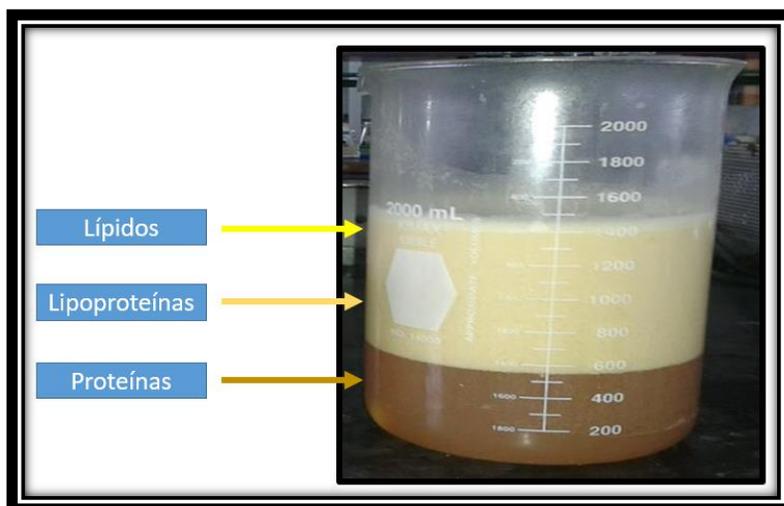
$$\frac{40.35\text{g de proteína}}{331.4\text{g de proteína}} * 100 = 12.17\%$$

Los rendimientos obtenidos se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Rendimientos de extracción de proteína.**

Tipo de extracción	Rendimiento
<b>Método alcalino</b>	7.58%
<b>Método modificado</b>	12.17%

Aunque no existe una gran diferencia en el porcentaje de proteína que tiene el concentrado proteínico, se observa que el método de extracción modificado es mejor comparado contra el método alcalino, ya que se obtuvo 60% más de rendimiento. Esto puede deberse a que durante la extracción alcalina, al separar la grasa en la primera etapa después de haberlo dejado reposar en refrigeración a 4 °C, se forma una tercera fase que contiene lipoproteínas, como se observa en la Figura 9, ahí se encuentra una parte del contenido de proteínas no recuperadas que sin embargo, no son proteínas estructurales.



**Figura 10. Formación de 3 fases durante el proceso de extracción de proteínas por el método de extracción alcalina.**

## **4.2 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES**

Con ayuda de la curva patrón, se determinó que el extracto etanólico proveniente de la chía tiene una concentración de 0.7 mg/mL de polifenoles, lo cual es un valor superior comparado con el estudio realizado por Reyes 2007 en el que obtuvo 0.59 mg/mL, esta diferencia puede deberse a diversos factores como son tiempo y condiciones poscosecha, y se consideró adecuado para el uso de películas ya que se desea agregarse en una concentración de 200 ppm de la manera más concentrada posible.

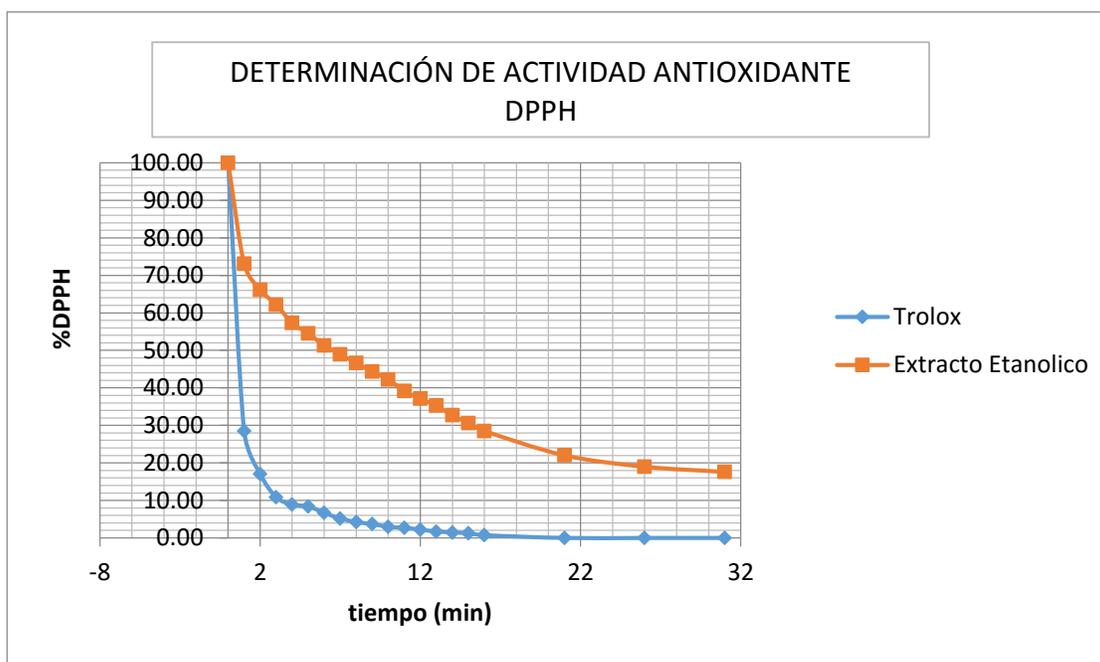
### **4.2.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Se realizaron los ensayos de actividad antioxidante (ABTS+ y DPPH) para verificar que el extracto obtenido fuera activo para su uso en el desarrollo de películas y pueda ser comparado con el Trolox<sup>®</sup>, usado como referencia, ya que este es un antioxidante análogo a la vitamina E.

#### 4.2.2 CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL DPPH

Como se muestra en la Figura 10 el Trolox® reduce rápidamente el porcentaje de DPPH. En los primeros 5 minutos disminuyó considerablemente, transcurridos 16 minutos aún no alcanza su mínimo, una lectura a los 21 minutos indica que se ha alcanzado el mínimo.

El extracto etanólico al minuto 16 capturó aproximadamente el 71.46% del DPPH, el valor es muy bajo comparado con el Trolox®, que al mismo tiempo capturó el 99.26%, sin embargo lo consideramos aceptable para la elaboración de películas.

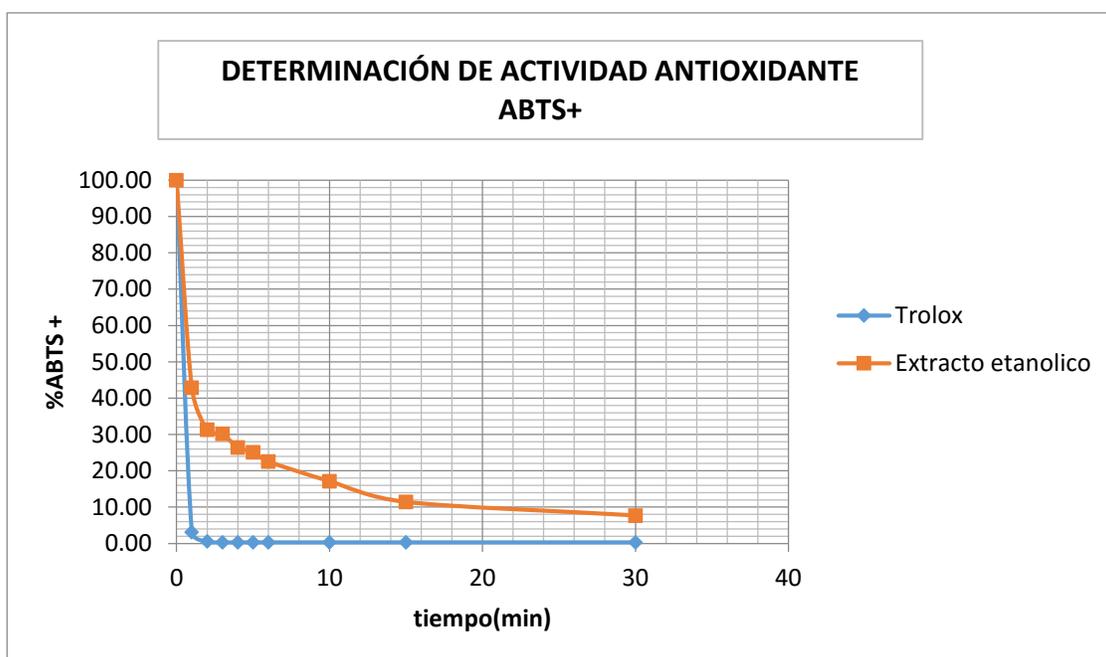


**Figura 11. Determinación de actividad antioxidante DPPH.**

#### 4.2.3 CAPACIDAD SECUESTRANTE DEL RADICAL ABTS

El método ABTS es un aplicable a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos, incluidos los flavonoides, carotenoides y antioxidantes del plasma. La preformación del radical monocatión del ácido 2,2'-azinobis-

(3etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS+) es generada por la oxidación del ABTS con el persulfato de potasio y se reduce en presencia de hidrógeno proveniente de la donación de esos antioxidantes. En el ABTS se observó que el Trolox<sup>®</sup> capturó 96.86% transcurrido 1 minuto, comparado con el extracto etanólico que capturó 57.1%. A los 15 minutos el Trolox<sup>®</sup> capturó 99.73% y el extracto etanólico 88.6% considerando estos valores adecuados para la elaboración de películas (Figura 11).



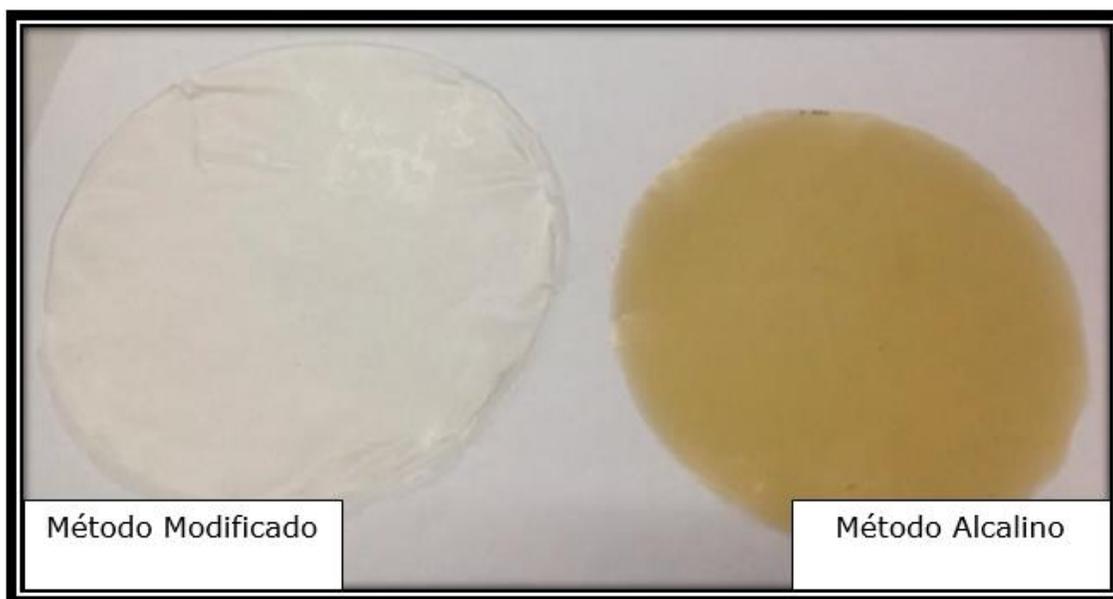
**Figura 12. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ABTS+.**

Una vez que se ha comprobado que el extracto de chía contiene gran cantidad de polifenoles (con ayuda de la curva de polifenoles totales) y sabiendo que estos compuestos son activos, se adicionaron en una concentración de 200 ppm del extracto de chía al concentrado proteínico para formar las películas.

### 4.3 PELÍCULAS FORMADAS

Una vez que se obtuvo el C.P y se elaboraron las películas, se compararon visualmente, se observa que las películas obtenidas por el método alcalino tienen un color amarillo, y las películas elaboradas a partir del método modificado son incoloras Figura 12.

La coloración amarillenta del método alcalino es debido a que la piel es sometida a un licuado y los pigmentos presentes en la piel son los que le imparten esta tonalidad, en cambio al método modificado se le realizan lavados previos para eliminar lo más posible esta pigmentación, y los restos de piel que quedan son removidos durante el proceso.



**Figura 13. Comparación visual entre las películas elaboradas por los dos diferentes métodos de extracción (Películas control).**

Al elaborar las películas con la adición de antioxidantes provenientes de la chía por ambas metodologías se observa que las películas logran formarse incorporando el antioxidante a su estructura impartándole un tono brillante.

Las películas elaboradas por el método alcalino son termosellables, pero al incorporarle los polifenoles provenientes de la chía o el Trolox<sup>®</sup> dejan de serlo.

Las películas elaboradas por el método modificado (Figura 13) son termosellables pero débil en comparación con el método alcalino, igualmente al incorporarle polifenoles provenientes de la chía esta propiedad desaparece.



**Figura 14. Películas elaboradas por el método modificado adicionado con polifenoles provenientes de la semilla de la chía.**

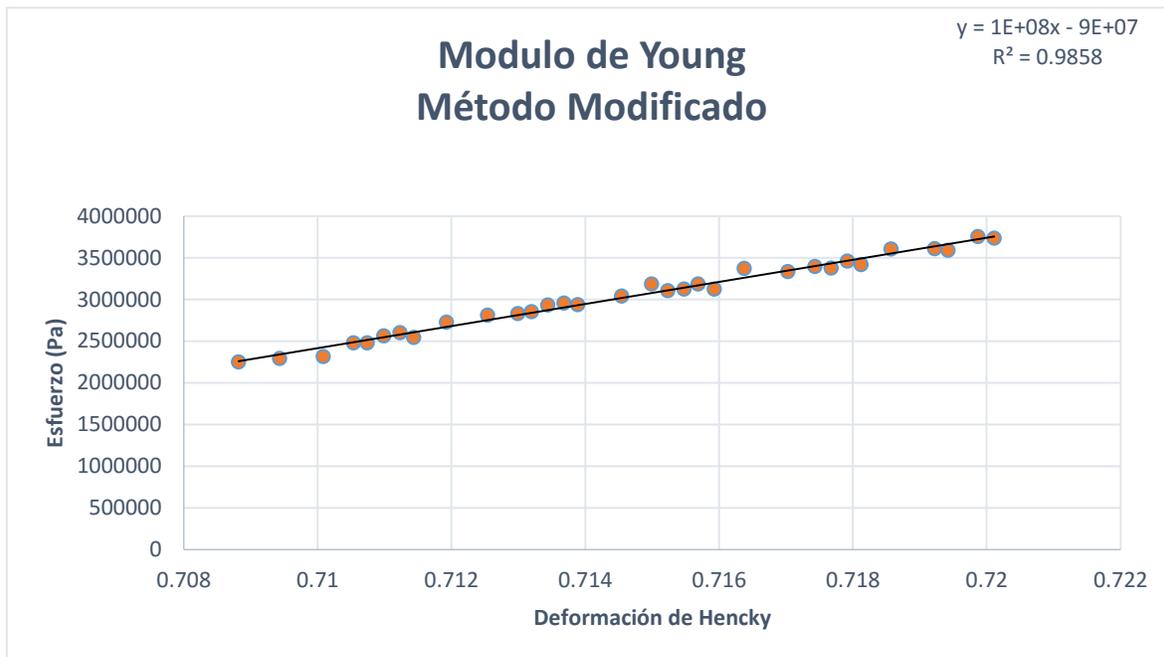
#### **4.4 RESISTENCIA EN TRACCIÓN**

Con los valores anteriores se construyeron las gráfica de Esfuerzo Normal Verdadero ( $\sigma_v$ ) vs Deformación de Hencky ( $\epsilon_H$ ). De esta gráfica se obtuvo el esfuerzo máximo en las ordenadas, mientras que la pendiente de la zona inicial, parte lineal de la curva, es el módulo de Young Figura 15.

En la Figura 14 se observa un ejemplo del esfuerzo normal verdadero en función de la deformación relativa en una película elaborada por el método modificado. El punto de ruptura de la película es el esfuerzo máximo verdadero; punto más alto en la gráfica antes de la ruptura.



**Figura 15. Esfuerzo normal verdadero en función de la deformación relativa para el método modificado**



**Figura 16. Módulo de Young para el método modificado.**

Los resultados obtenidos para la prueba de resistencia en tracción se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Resultados a la prueba de resistencia en tracción.**

<b>Módulo de Young (MPa)</b>	<b>Esfuerzo Máximo Verdadero (MPa)</b>	<b>Método</b>
92.83 ± 6.25	179.45 ± 6.36	Ziploc®
96.66 ± 5.77	128.21 ± 8.81	Modificado
44 ± 5.47	49.40 ± 3.97	Modificado + Polifenoles
1.98 ± 0.04	4.32 ± 0.20	Alcalino + Trolox®
0.98 ± 0.02	3.34 ± 0.07	Alcalino
1.49 ± 0.72	2.42 ± 0.22	Alcalino + Polifenoles

Se observa que el método modificado hace a la película más deformable en comparación con el método alcalino, esta información indica que las proteínas extraídas por los dos métodos son diferentes.

El adicionar polifenoles provenientes de la semilla de chía en los dos métodos disminuye el esfuerzo de tracción máximo verdadero, lo que indica que los polifenoles hacen que la red polimérica pierda parcialmente su capacidad de deformación. El límite elástico es el esfuerzo máximo que puede sufrir un cuerpo sin que la deformación sea permanente (Tippens 2001).

El módulo de Young para todas las determinaciones es muy grande en comparación con el esfuerzo de tracción máximo para las tiras, esto quiere decir que podemos estirar mucho nuestras películas y tengan la capacidad de regresar a su forma inicial antes de que se fracturen.

#### **4.5 RESISTENCIA A LA PENETRACIÓN**

Los resultados obtenidos para la prueba de resistencia a la penetración se muestran a continuación.

**Tabla 7. Resultados de resistencia a la penetración.**

<b>Módulo de Young (MPa)</b>	<b>Esfuerzo de Penetración Máximo Verdadero (MPa)</b>	<b>Método</b>
10 ± 0.54	11.70 ± 0.63	Ziploc®
8.10 ± 0.17	11.20 ± 0.01	Alcalino + Trolox®
8.12 ± 0.25	11.18 ± 0.05	Modificado
8.03 ± 0.05	11.16 ± 0.04	Alcalino + Polifenoles
8.25 ± 0.50	11.13 ± 0.05	Alcalino
9.25 ± 0.50	10.41 ± 0.25	Modificado + Polifenoles

Se observa que el esfuerzo de resistencia a la penetración no se ve influenciado por la adición de polifenoles, ya que el orden de magnitud de los valores obtenidos es muy similar, con excepción del método modificado adicionado con polifenoles el cual hace a la película menos resistente a la penetración.

**El análisis de varianza (ANOVA) unifactorial ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar si hay diferencia significativa entre los métodos muestra que:**

- ✓ No hay diferencia significativa entre las películas elaboradas por el método alcalino y las películas elaboradas con la extracción modificada.
- ✓ No existe diferencia significativa entre las películas elaboradas por el método alcalino y el alcalino adicionado con polifenoles
- ✓ Si existe diferencia significativa entre las películas elaboradas por el método modificado y el modificado adicionado con polifenoles.

#### **4.6 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA**

Los datos registrados fueron tratados como se indicó en el capítulo anterior.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de permeabilidad al vapor de agua.

**Tabla 8. Permeabilidad al Vapor de agua para las diferentes películas elaboradas.**

<b>Tipo de película</b>	<b>PVA (ng/Pa*s*m) x 10<sup>12</sup></b>	<b>Espesor (µm)</b>
Ziploc® (Referencia)	783	86.4
Modificado + Polifenoles	23.4	175
Alcalino + Polifenoles	37.3	174
Modificado	43.1	181
Alcalino + Trolox®	56.3	201
Alcalino	1.55	189

Se puede observar en los resultados, que el método de extracción modificado es mejor que el método de alcalino, ya que hay menor paso de vapor de agua a través de la película. Esto es debido a que el colágeno logró formar una red proteínica más eficiente, y la adición de polifenoles provenientes de la semilla de chía, hace que la red proteínica nuevamente parece haberse estructurado mejor. Esto concuerda con los resultados de resistencia en tracción que indican que la película tiene menos capacidad de deformarse y permite un menor paso de agua a través de ella.

El **análisis de varianza (ANOVA) unifactorial** ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar si hay diferencia significativa entre los métodos muestra que:

- ✓ Si hay diferencia significativa entre las películas elaboradas por el método alcalino y las películas elaboradas con la extracción modificada, presentando este último mejores características de permeabilidad al vapor de agua.
- ✓ También, existe diferencia significativa entre las películas elaboradas con la adición de polifenoles por los dos métodos.

- ✓ No existe diferencia significativa entre las películas elaboradas con la extracción modificada y las modificadas adicionadas con polifenoles.
- ✓ Sí existe diferencia significativa entre las películas elaboradas con el método alcalino comparadas con las adicionadas con polifenoles por el mismo método.
- ✓ Sí existe diferencia significativa entre las películas elaboradas por los dos métodos y las comerciales Ziploc®. Esto era de esperarse ya que están elaboradas con un material diferente (LDPE) y el espesor es mayor en comparación con las películas elaboradas.
- ✓ No hay diferencia significativa entre las películas elaboradas por el método alcalino adicionadas con polifenoles y las elaboradas por el método alcalino adicionadas con Trolox®.

#### **4.7 PERMEABILIDAD AL OXIGENO**

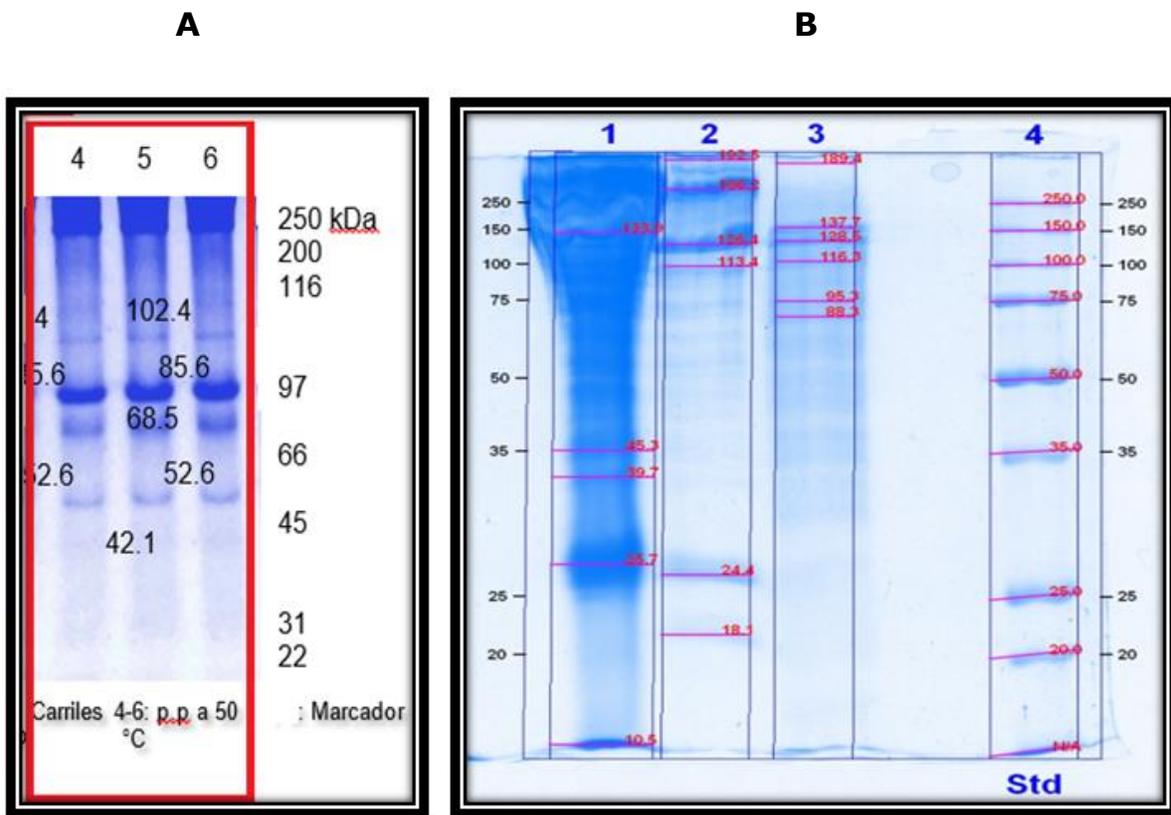
Como se muestra en la Tabla 9 ninguna de las películas elaboradas presenta permeabilidad al oxígeno en 24 horas, este es un buen resultado ya que se desea evitar la entrada del oxígeno ya que su presencia en alimentos con presencia de lípidos iniciara su reacción de oxidación y en general es uno de los factores que favorece el crecimiento de microorganismos.

**Tabla 9 Permeabilidad al Oxígeno para las diferentes películas elaboradas**

<b>Tipo de película</b>	<b>Espesor(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Permeabilidad al oxígeno (<math>\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m} / \text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}</math>)</b>
Ziploc <sup>®</sup> (Referencia)	86.4	No registra PO en 24 horas
Modificado + Polifenoles	391	No registra PO en 24 horas
Alcalino + Polifenoles	212	No registra PO en 24 horas
Modificado	335	No registra PO en 24 horas
Alcalino + Trolox <sup>®</sup>	210	No registra PO en 24 horas
Alcalino	192	No registra PO en 24 horas

#### **4.8 ELECTROFORESIS**

En la Figura 16 se muestran los resultados obtenidos por la extracción del método alcalino realizado por Chávez (2014) (A) en comparación con los obtenidos por el método modificado (B).



**Figura 17. Comparación de los patrones de electroforesis de concentrado proteínico obtenido por diferentes métodos de extracción.**

Se observa que por el método modificado se obtienen bandas que se repiten entre 114 y 116 kDa, otra entre 126 y 128, otra entre 133 y 137 y finalmente una entre 189 y 192. Por lo general por este método se obtienen proteínas de mayor peso molecular en comparación con el método alcalino en el cual se obtienen proteínas de mediano peso molecular.

#### **4.9 COMPARACIÓN GENERAL ENTRE LOS 2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

Las Tablas 10, 11 y 12 resumen las diferentes características observadas entre ambos métodos de extracción.

**Tabla 10 Comparación entre el método alcalino y el modificado.**

<b>Tipo de extracción</b>	<b>Alcalina</b>	<b>Modificada</b>
<b>Rendimiento</b>	Menor	Mayor
<b>Apariencia de las películas</b>	Amarillentas	Translúcidas
<b>Fuerza de fractura en resistencia a la tracción</b>	Menor	Mayor
<b>Resistencia a la penetración</b>	Menor	Mayor
<b>Permeabilidad al vapor de agua</b>	Mayor permeabilidad	Menor permeabilidad
<b>Permeabilidad al oxígeno</b>	No hay permeabilidad	No hay permeabilidad

**Tabla 11 Comparación entre el método alcalino y el alcalino adicionado con polifenoles.**

<b>Tipo de extracción</b>	<b>Alcalina</b>	<b>Alcalina con polifenoles</b>
<b>Apariencia de las películas</b>	Amarillentas, homogéneas	Amarillentas, homogéneas
<b>Fuerza de fractura en resistencia a la tracción</b>	Mayor	Menor
<b>Resistencia a la penetración</b>	Igual	Igual
<b>Permeabilidad al vapor de agua</b>	Mayor permeabilidad	Menor permeabilidad
<b>Permeabilidad al oxígeno</b>	No hay permeabilidad	No hay permeabilidad

**Tabla 12 Comparación entre el método modificado y el modificado adicionado con polifenoles.**

<b>Tipo de extracción</b>	<b>Modificada</b>	<b>Modificada con polifenoles</b>
<b>Apariencia de las películas</b>	Translucidas, homogéneas	Translucidas, homogéneas
<b>Fuerza de fractura en resistencia a la tracción</b>	Mayor	Menor
<b>Resistencia a la penetración</b>	Mayor	Menor
<b>Permeabilidad al vapor de agua</b>	Mayor permeabilidad	Menor permeabilidad
<b>Permeabilidad al oxígeno</b>	No hay permeabilidad	No hay permeabilidad

## **5. CONCLUSIONES**

- ✓ Se la formación de películas con un concentrado proteínico obtenido por diferentes métodos de extracción. Además, se observó que la extracción sí influye en las propiedades del concentrado de formar películas, lo mismo pasa al incorporarle polifenoles extraídos de la chía.
- ✓ La extracción modificada del colágeno es mejor para extraer la proteína de la piel de pollo en comparación con el método alcalino, ya que se obtienen mejores rendimientos con que aquellos reportados en estudios previos por nuestro grupo de trabajo y los obtenidos en este estudio.
- ✓ La extracción modificada permite obtener películas con mejor aspecto visual, ya que son translúcidas, lo que es importante si se quieren usar como empaque primario.
- ✓ La extracción modificada produce un concentrado proteínico que forma películas con mayor resistencia en tracción. Esta característica debe aprovecharse ya que se supera notablemente a la obtenida por el método alcalino.
- ✓ Las películas elaboradas por ambos métodos incluyendo la adición de polifenoles son excelentes como barrera ya que permiten retener el paso de gases.

- ✓ La extracción modificada es mejor en cuanto a sus propiedades de barrera, ya que las películas no permiten el paso de oxígeno y permiten en menor grado el paso de vapor de agua a través de ellas en comparación con el método alcalino.
  
- ✓ La adición de polifenoles de la semilla de chía logra que las películas mejoren sus propiedades como barrera protectora e incrementen su funcionalidad.
  
- ✓ La importancia que tiene este estudio es que se desea contribuir a disminuir el daño al medio ambiente y se propone un método que ayude en la elaboración de películas que sirvan como empaque y sus propiedades se vean mejoradas.

## **6. CONSIDERACIONES FINALES**

Con el propósito de hidrolizar los lípidos presentes en el pellet para preparar películas libres de este componente, el pellet obtenido por el método alcalino en concentraciones de 1% y 2% fue tratado con una lipasa de *Burkholderia cepacia*. La película no se formó de manera homogénea; **mostró "ondas" posiblemente formadas por la separación de las fases acuosa y oleosa**. No obstante, las películas fueron termosellables.

El uso de una superficie de poliestireno permite despegar con facilidad la película formada. Por ello, se recomienda usar este tipo de superficie en estudios posteriores.

Se realizó una prueba en una prensa mecánica para formar una película con el pellet obtenido por el método alcalino. El calentamiento del pellet en la prensa se inició a 90 °C y una vez evaporada el agua se observaron restos de película sobre la placa de la prensa. Se sugiere disminuir la temperatura de calentamiento para formarla.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Alcocer, M.P. (2011). Evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera en películas de proteínas de piel de ave. Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- ✓ AOAC (2005). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- ✓ Avendaño, C.G. (2009). Diseño y evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera de un biopolímero obtenido a partir del almidón de papa para ser empleado en empaques para alimentos.
- ✓ ASTM E96 / E 96M - 10. (2010). Standard test method for water vapor transmission of materials. Annual Book of ASTM Standards, ASTM Internacional (EUA). Vol. 04.06
- ✓ ASTM D1434 (1998). Standard test method for determining gas permeability characteristic of plastic films and sheeting 2003 Annual Book of ASTM Standards, ASTM International (EUA) Vol 15.10, 196-207.
- ✓ Bamdad, F., Goli A.H. & Kadivar, M. (2006). Preparation and characterization of proteinous film from lentil (*Lens culinaris*). Edible film from lentil (*Lens culinaris*). *Food Research International*, 39, 106-111.
- ✓ Carmona, M, J. Hernández, V,X. Quintana, L,C. López, C, C (2009). "Zootecnia Avícola", 1era Edición. UNAM, pp. 61 -62.
- ✓ Chávez, G.A. (2014). Optimización de condiciones de extracción y elaboración de películas a partir de proteínas provenientes de piel de pollo. Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- ✓ Cruz, P. N. (2008). Compuestos polifenólicos de la chíá: efecto del método de extracción y temperatura sobre la estabilidad

antioxidante. Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

- ✓ Damodaran, S. & Paraf, A.D. (1997). Food Proteins. An Overview. Food Proteins and their applications. Marcel Dekker Inc, USA. Pp 529-545.
- ✓ Granados, N.S. & Martínez, G.C. (2010). Aprovechamiento de proteínas de pesquería del género *Epinephelus* para la obtención de películas modificadas. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- ✓ Gennadios, A. (2002) "Protein-based Films and Coatings", CRC Press, E.U.A. pp. 6-27, 275-298, 445-461.
- ✓ Ghanbarzadeh, B. & Oromiehi, A. (2009). Thermal and mechanical behavior of laminated protein films. Journal of Food Engineering 90, 517-524.
- ✓ Guilbert, S. (1986). Technology and Application of Edible Protective Films. Food packaging and preservation theory and practice, Mathlouthi, M, Elsevier Applied Science Publishers, Estados Unidos.
- ✓ James, C.S; Analytical Chemistry of Foods: An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland. 1999.
- ✓ Kirk, R.S., Sawyer, R. & Egan, H. (1996). Composición y análisis de alimentos Pearson, segunda edición. Compañía editorial continental, S.A. de C.V., México.
- ✓ Krochta J.M. (2002) Protein as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunities. In Proteins-Based films and coatings. Gennadios A. CRC Press. Florida USA. 2002 Pp. 220-221.
- ✓ Limpisophon, K. (2009). Characterization of gelatins films prepared from under-utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin, *Food Hydrocolloids*. Vol.23 1993-2000.

- ✓ Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50, 3444-3452.
- ✓ Nielsen S. (2003). Food Analysis. Laboratory Manual; Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, USA.
- ✓ North, M. & Bell, D. (1993). "Manual de Producción Avícola". 3a. Edición. Editorial El Manual Moderno pp. 91-95, México.
- ✓ Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C. & Jackson, M.G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering* 70, 205-210.
- ✓ Reyes, C.E., Tecante, A. & Valdivia, L. M. A. (2007). Dietary fibre content antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry* 107(2008). Science Direct. Pp. 656-663.
- ✓ Rizo, T.C. (2013). Optimización de las condiciones de extracción de proteína de la piel de cazón (*Galeorhinus galeus*) para el desarrollo de películas como envase alimentario. Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- ✓ Silva, N.B. (2009). Desarrollo de biopelículas con actividad antioxidante y evaluación del factor de protección en alimentos. Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- ✓ Tharanathan, R.N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology* 14 71-78
- ✓ Tippens, P, E. (2001) Física Conceptos y aplicaciones, sexta edición. Editorial Mc Graw – Hill, Southern Polytechnic State University Marietta Georgia, pp. 291-294.
- ✓ Yu H. P. (2004). Efecto de la mezcla de plastificantes en las propiedades físicas, mecánicas y de transporte de películas de quitosano. Tesis de licenciatura, Escuela de Ingeniería-UDLA, 6-26.

## Referencias electrónicas:

- ✓ Asociación Nacional de la Industria del plástico  
<http://www.anipac.com/informacion.php>
- ✓ Ponce, E. Empaques activos y empaques comestibles. Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

[http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=5&ved=0CD4QFjAE&url=http%3A%2F%2Fusapeec.org.mx%2Fpublicaciones%2Fpresentaciones%2Fpdf%2Fempaques\\_activos\\_y\\_comestibles.pdf&ei=4duDU76WGaGV8AHZnIH0BQ&usg=AFQjCNGg1LVZB9xnuqT0mEMhq\\_etO5Celw](http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=5&ved=0CD4QFjAE&url=http%3A%2F%2Fusapeec.org.mx%2Fpublicaciones%2Fpresentaciones%2Fpdf%2Fempaques_activos_y_comestibles.pdf&ei=4duDU76WGaGV8AHZnIH0BQ&usg=AFQjCNGg1LVZB9xnuqT0mEMhq_etO5Celw)

Gongora, P.J. (2014). La industria del plástico en México y en el mundo. Comercio Exterior. Volumen 64, número 5. Recuperado de [http://revistas.bancomext.gob.mx/rce/magazines/761/3/la\\_industria\\_del\\_plastico.pdf](http://revistas.bancomext.gob.mx/rce/magazines/761/3/la_industria_del_plastico.pdf)