

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO – CHILE



**“PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS
ANTIOXIDANTES LIOFILIZADOS PARA LA
APLICACIÓN EN PECHUGAS DE POLLO”**

MICHELLE MELANIE DONOSO GUTIÉRREZ

**MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
INGENIERA CIVIL QUÍMICA**

PROFESOR GUÍA: DR. SERGIO ALMONACID MERINO

PROFESORA CORREFERENTE: DRA. SULEIVYS NUÑEZ GONZÁLEZ

PROFESOR CORREFERENTE: DR. PEDRO VALENCIA ARAYA

Agosto - 2025



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): ☒ Memoria o trabajo de título ☐ Tesis de Postgrado

Título del trabajo: “Producción de péptidos antioxidantes liofilizados para la aplicación en pechugas de pollo”

Nombre del candidato(a): Michelle Melanie Donoso Gutiérrez

Carrera / Grado: Ingeniería Civil Química

Campus: Casa Central Valparaíso **Departamento:** Ingeniería Química y Ambiental

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Sergio Almonacid M., en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

☒ El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

☐ El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 2 años ☐ 3 años ☐ 5 años ☐ 10 años

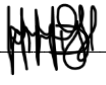
Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: 14/10/2025 **Firma:** 

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: 14/10/2025 **Firma:** 

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mi familia por su eterno apoyo y paciencia en este largo proceso. Ellos han sido un pilar fundamental para formar a la persona que soy hoy. A mi mamá, María Ester, mi mayor inspiración, una mujer brillante que me ha llenado de amor y alegría; ella siempre me aseguró que podía lograr lo que quisiera, y aunque quizás ella no lo note, la persona que más admiro y a la que aspiro parecerme es ella. A mi papá, Juan, por transmitirme su fortaleza inigualable, motivándome a creer en mí y superarme con resiliencia. A mi hermano, Justin, por contagiarme con su optimismo y sonrisas, y a mi gata, Kitty, por ser compañía fiel en días y noches interminables de estudio. También agradezco a mis padrinos y familiares que me brindaron su apoyo y buenas energías.

Gracias a cada persona con quién tuve lindos recuerdos en clases, laboratorios, estudio en la biblioteca, almuerzos en el casino, caminatas de desestrés por la universidad, o amistades que hice fuera de esta, siempre estarán en mis recuerdos. En especial a Daniela, una amiga admirable con quien compartí incontables conversaciones y risas, siempre apañando en lo que sea. A mis compañeros de carrera y de laboratorio, en particular a José, por hacer que hasta los trabajos más pesados se volvieran mucho más divertidos. A la JIM, un lindo refugio en la universidad, donde conocí personas maravillosas como Martín, un gran amigo, siempre apañador y con quien logramos subirnos el ánimo mutuamente mientras ambos trabajábamos en nuestras memorias. A mis compañeros del taller de Baile Social, por todos las coreografías que bailamos con mucha alegría y gracias a mis compañeros de taller de Debate, por regalarme instancias de diversión y crecimiento.

Un especial agradecimiento a Matías, que apareció casi al final de este proceso y aun así se volvió parte fundamental de él. Gracias por estar, por las palabras de ánimo, por la compañía constante y por recordarme que incluso en medio del cansancio siempre había motivos para sonreír.

Agradezco también a mi profesor guía, Dr. Sergio Almonacid, por su constante apoyo y orientación, así como al proyecto Fondecyt que hizo posible este trabajo. A mis profesores coguía, Dra. Suleivys Nuñez y Dr. Pedro Valencia, por su gran disposición y colaboración en el desarrollo de esta memoria.

Finalmente, gracias a Taylor Swift, cuya música me inspiró y acompañó en los momentos más desafiantes. Como ella misma dice:

*“The scary news is: **You're on your own now.** But the cool news is, **You're on your own now**”.*

*Gracias a todas las personas que formaron parte de mi vida universitaria, tanto en los momentos difíciles y en los que pude disfrutar. **In Omnia Paratus** – lista para todo lo que venga.*

RESUMEN EJECUTIVO

La industria avícola es un sector clave en la producción alimentaria global, destacando por el consumo masivo de carne de pollo, fuente accesible y de calidad proteica. En Chile, la producción alcanzó 344.000 toneladas en 2024, con un 29% de aumento en exportaciones. Sin embargo, este crecimiento genera gran cantidad de subproductos como la piel de pollo, que suelen desecharse pese a su riqueza en colágeno. En paralelo, la industria alimentaria enfrenta el desafío de controlar la oxidación lipídica, principal causa de deterioro en alimentos, actualmente controlada con antioxidantes sintéticos que generan preocupación por sus efectos tóxicos. En este contexto, los péptidos antioxidantes derivados de subproductos proteicos surgen como una alternativa natural con potencial para extender la vida útil y calidad de productos cárnicos.

El presente trabajo tiene por objetivo establecer, probar y ajustar procedimientos experimentales para evaluar cómo el grado de hidrólisis y la temperatura en el proceso de liofilización afectan la actividad antioxidante de péptidos obtenidos desde piel de pollo, con el fin de maximizar su funcionalidad y aplicabilidad en pechugas de pollo como ingrediente funcional. Para ello, se extrajo colágeno con 1,40% de contenido proteico mediante cocción controlada, seguido de hidrólisis enzimática a 55°C, pH 6,5 nativo sin control, con Alcalase a tres grados de hidrólisis: sin hidrólisis (GH1), intermedio (GH2: ~5%) y alto (GH3: ~10%). Posteriormente, los hidrolizados fueron sometidos a liofilización con diferentes temperaturas de bandeja (30, 40 y 50°C). Se evaluaron parámetros clave como tiempos de secado primario, humedad, capacidad antioxidante mediante los métodos DPPH y ABTS⁺ y tiempo total del proceso.

De los resultados se destaca que el grado de hidrólisis incrementa la actividad antioxidante de los péptidos, observándose en GH2 valores entre 38,84% y 44,65% en DPPH y entre 44,79% y 47,78% en ABTS⁺. El aumento de la temperatura de liofilización redujo el tiempo de secado, especialmente en GH1 y GH2 (42 y 31%, respectivamente). La humedad fue menor y más estable en GH2 (4,30% a 40 °C) y GH1 (5,93% a 50°C), en comparación con GH3 (7,86% a 50°C). La liofilización provocó una leve disminución de la capacidad antioxidante, atribuible a desnaturalización y oxidación, pero los efectos no resultaron estadísticamente significativos.

Se concluye que es viable obtener péptidos antioxidantes funcionales a partir de piel de pollo, siendo la condición GH2–50 la más favorable, al combinar una alta actividad con menores tiempos de proceso, especialmente en la liofilización. Dado que este es un procedimiento de alto costo, debe considerarse como criterio el menor tiempo de uso del equipo. Se recomienda optimizar la hidrólisis y liofilización para maximizar las propiedades funcionales y evaluar la aplicación en matrices cárnicas como pechugas de pollo, donde podrían obtenerse resultados distintos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN EJECUTIVO	3
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Introducción	9
1.2. Objetivos	12
1.2.1. <i>Objetivo General</i>	12
1.2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	12
3. ANTECEDENTES GENERALES.....	13
3.1 Industria Avícola.....	13
3.1.1. Producción de Carne de Pollo	13
3.1.2. Mercado de Carne de Pollo	13
3.1.3. Generación de Subproductos Avícolas.....	14
3.2. Extracción de Colágeno como Gelatina	15
3.2.1. Colágeno como Aditivo Alimentario	16
3.3. Hidrólisis de Proteínas	16
3.3.1. Hidrólisis Química	17
3.3.2. Hidrólisis Enzimática	18
3.4. Grado de Hidrólisis (GH).....	18
3.4.1. Método basado en la valoración del protón: pH-stat.....	19
3.4.2. Método basado en la cuantificación por espectrofotometría: OPA.....	20
3.5. Propiedades Funcionales de Hidrolizados de Proteína.....	21
3.5.1. Péptidos Antioxidantes.....	21
3.5.2. Antioxidantes Sintéticos (BHA, BHT).....	22
3.6. Liofilización	23
3.6.1. Descripción del Proceso	24
3.6.2. Etapas del Proceso.....	24
3.6.3. Métodos de Determinación del Fin del Secado Primario.....	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1. Metodología General.....	28
4.2. Materiales	29
4.2.1. Equipos.....	29
4.2.2. Materia Prima	30
4.3. Método	30
4.3.1. Diseño Experimental	30

4.3.2. Extracción de colágeno	31
4.3.3. Determinación del contenido de proteína.....	31
4.3.4. Hidrólisis Enzimática	33
4.3.5. Cuantificación grupos α -amino liberados	34
4.3.6. Grado de Hidrólisis	35
4.3.7. Liofilización	35
4.3.8. Determinación Actividad Antioxidante (%AA).....	38
4.3.9. Análisis estadístico: ANOVA LSD Fisher.....	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
5.1. Extracción de colágeno	40
5.2. Hidrólisis Enzimática	42
5.2.1. Curva de Concentración de Grupos α -amino libres en el tiempo y Grado de Hidrólisis	42
5.3. Liofilización	44
5.3.1. Determinación Tiempo de Secado Primario.....	44
5.3.2. Medición de la Humedad	48
5.4. Análisis Capacidad Antioxidante.....	49
5.5. Relación entre el Tiempo total del proceso y Actividad antioxidante obtenida	52
CONCLUSIÓN	55
REFERENCIAS	56
ANEXOS	61
Anexo A: Cálculo Dosis de Proteasa Adicionada	61
Anexo B: Método Kjeldahl	61
Anexo C: Método Reactivo OPA.....	63
Anexo D: Datos de concentración de grupos α -amino libres obtenidos con OPA.	65
Anexo E: Gráficos determinación de fin del secado primario por Prueba de incremento de presión	67
Anexo F: Determinación Humedad en muestras liofilizadas.....	78
Anexo G: Medición de la Capacidad Antioxidante en muestras.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de equipos utilizados	29
Tabla 2. Valor del factor de conversión de nitrógeno total a proteína para distintas muestras (VELP, 2023)	32

Tabla 3. Composición y rendimiento de la extracción de colágeno	40
Tabla 4. Cálculo del número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) y grado de hidrólisis (GH) a partir de la concentración teórica ajustada mediante regresión logarítmica no lineal.	43
Tabla 5. Datos experimentales en triplicado con la concentración de grupos α -amino libres en el tiempo [mM] y grado de hidrólisis [%] para corroborar tiempo escogido para las hidrólisis enzimática.....	44
Tabla 6. Asignación de código para cada combinación de tratamientos.....	44
Tabla 7. Tiempos de secado primario y su reducción porcentual de tiempo respecto a la condición base de 30°C	47
Tabla 8. Resumen del tiempo total del proceso y la actividad antioxidante asociada a cada grado de hidrólisis y temperatura de liofilización.	52
Tabla 9. Equipos utilizados en cada etapa del método Kjeldahl	62
Tabla 10. Datos de Absorbancia y Concentración real de grupos α -amino libres en el tiempo (Duplicado 1).....	65
Tabla 11. Datos de Absorbancia y Concentración real de grupos α -amino libres en el tiempo (Duplicado 2).....	66
Tabla 12. %Humedad en muestras GH1-30	79
Tabla 13. %Humedad en muestras GH1-40	79
Tabla 14. %Humedad en muestras GH1-50	79
Tabla 15. %Humedad en muestras GH2-30	79
Tabla 16. %Humedad en muestras GH3-40	80
Tabla 17. %Humedad en muestras GH2-50	80
Tabla 18. %Humedad en muestras GH3-30	80
Tabla 19. %Humedad en muestras GH3-40	80
Tabla 20. %Humedad en muestras GH3-50	81
Tabla 21. Análisis ANOVA y LSD Fisher para %Humedad en muestras liofilizadas mediante software InfoStat	81
Tabla 22. Actividad antioxidante de las muestras según método DPPH.....	81
Tabla 23. Muestra control promedio en Método DPPH.....	82
Tabla 24. Análisis ANOVA y LSD Fisher para %AA en método DPPH mediante software InfoStat	82
Tabla 25. Actividad antioxidante de las muestras según método ABTS ⁺	83

Tabla 26. Muestra control promedio en Método ABTS ⁺	83
Tabla 27. Análisis ANOVA y LSD Fisher para %AA en método ABTS ⁺ mediante software InfoStat	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución Producción de carnes en Chile (Chile Carne, s.f.)	14
Figura 2. Reacción entre grupos α -amino libres y OPA (Nielsen et al., 2001)	21
Figura 3. Diagrama de las Etapas del proceso de Liofilización (Kawasaki et al., 2019).	25
Figura 4. Diagrama de fases del agua (Ratti, 2013)	26
Figura 5. Metodología general de trabajo	28
Figura 6. Reacción del ensayo de DPPH (Vázquez Matías, 2024)	38
Figura 7. Reacción del ensayo de ABTS ⁺ (Vázquez Matías, 2024)	39
Figura 8. Perfil de temperatura primera extracción.	41
Figura 9. Perfil de temperatura segunda extracción	41
Figura 10. Concentración grupos α -amino libres ajustado al modelo logarítmico	43
Figura 11. Liofilización de la muestra GH1-30 (Triplicado 1)	45
Figura 12. Liofilización de la muestra GH1-30 (Triplicado 2)	46
Figura 13. Liofilización de la muestra GH1-30 (Triplicado 3)	46
Figura 14. Humedad promedio de cada condición en las muestras liofilizadas	48
Figura 15. Actividad antioxidante de las muestras según el método DPPH	50
Figura 16. Actividad antioxidante de las muestras según el método ABTS ⁺	51
Figura 17. Resultados que relacionan GH, Temperatura de liofilización, tiempo del proceso y %AA por método DPPH	54
Figura 18. Resultados que relacionan GH, Temperatura de liofilización, tiempo del proceso y %AA por método ABTS ⁺	54
Figura 19. Identificación de equipos a utilizar y su disposición	62
Figura 20. Curva de calibración experimental obtenida con Serina para la medición con método OPA	65
Figura 21. Liofilización de la muestra GH1-40 (Triplicado 1)	67
Figura 22. Liofilización de la muestra GH1-40 (Triplicado 2)	67

Figura 23. Liofilización de la muestra GH1-40 (Triplicado 3)	68
Figura 24. Liofilización de la muestra GH1-50 (Triplicado 1)	68
Figura 25. Liofilización de la muestra GH1-50 (Triplicado 2)	69
Figura 26. Liofilización de la muestra GH1-50 (Triplicado 3)	69
Figura 27. Liofilización de la muestra GH2-30 (Triplicado 1)	70
Figura 28. Liofilización de la muestra GH2-30 (Triplicado 2)	70
Figura 29. Liofilización de la muestra GH2-30 (Triplicado 3)	71
Figura 30. Liofilización de la muestra GH2-40 (Triplicado 1)	71
Figura 31. Liofilización de la muestra GH2-40 (Triplicado 2)	72
Figura 32. Liofilización de la muestra GH2-40 (Triplicado 3)	72
Figura 33. Liofilización de la muestra GH2-50 (Triplicado 1)	73
Figura 34. Liofilización de la muestra GH2-50 (Triplicado 2)	73
Figura 35. Liofilización de la muestra GH2-50 (Triplicado 3)	74
Figura 36. Liofilización de la muestra GH3-30 (Triplicado 1)	74
Figura 37. Liofilización de la muestra GH3-30 (Triplicado 2)	75
Figura 38. Liofilización de la muestra GH3-30 (Triplicado 3)	75
Figura 39. Liofilización de la muestra GH3-40 (Triplicado 1)	76
Figura 40. Liofilización de la muestra GH3-40 (Triplicado 2)	76
Figura 41. Liofilización de la muestra GH3-40 (Triplicado 3)	77
Figura 42. Liofilización de la muestra GH3-50 (Triplicado 1)	77
Figura 43. Liofilización de la muestra GH3-50 (Triplicado 2)	78
Figura 44. Liofilización de la muestra GH3-50 (Triplicado 3)	78

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

La industria avícola es uno de los sectores alimentarios más dinámicos a nivel global, siendo la carne de pollo un producto que se destaca por ser de las fuentes de proteína animal más consumidas, experimentando una creciente demanda mundial debido mayormente a su asequibilidad en medio de los altos costos de alimentos y una disminución del poder adquisitivo de los consumidores, además ser una fuente clave de proteínas, de calidad y por su gran versatilidad en la cocina. A pesar de que en el año 2023 se reportaron varios brotes de influencia aviar altamente patogénicas, se logró producir 146 millones de toneladas de carne de ave a nivel mundial, logrando el incremento del 1,9% respecto del año anterior, siendo un aumento que se ha generado en todas las principales regiones, exceptuando a África (FAO, 2024). En el contexto nacional, Chile logró una notable recuperación tras el brote, según datos del Instituto Nacional de Estadísticas de Chile y la Aduana, la producción de pollo creció un 4% el año 2024, alcanzando las 344.000 toneladas, cifra cercana a los niveles previos al brote. En cuanto a las exportaciones, estos aumentaron un 29% en volumen y un 33% en valor, siendo exportados 85.000 toneladas de carne de pollo a Estados Unidos, México y Puerto Rico principalmente, pudiendo posicionarse como un proveedor clave en este mercado. La recuperación del sector avícola tras la crisis avícola fue gracias a las medidas adoptadas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) en conjunto con la Asociación de Exportadores de Carnes de Chile (ChileCarne, 2024).

Sin embargo, este crecimiento en la industria de producción de carne de pollo de engorde conlleva, a su vez, la generación de grandes volúmenes de subproductos en sus mataderos, tales como sangre, huesos, patas, plumas, picos, crestas, piel y vísceras. A pesar de que estos residuos tienen un menor impacto medioambiental que otras especies ganaderas, generan de igual forma gases de efecto invernadero como CO₂ respiratorio, CH₄ en el estiércol y emisiones de N₂O, produciéndose anualmente 61, 0,97 y 0,57 millones de toneladas métricas, respectivamente. En el contexto de impulsar la economía circular, es necesario desarrollar estrategias para disminuir la acumulación de estos subproductos y la contaminación, a partir de la transformación de estos residuos en bienes de alto valor, que puedan ser utilizados como nuevos recursos posteriormente. Entre las alternativas impulsadas hoy en día se encuentra el aprovechamiento de estos desechos ricos en carbono y aminoácidos, como fertilizantes o compost, a pesar de contener alta concentración de nitrógeno. Mediante otro tratamiento, se pueden convertir en bioestimulantes que benefician el crecimiento de las plantas. Por otra parte, en el marco de transición a energías renovables, estos subproductos son sometidos a hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis para producir biogás y, posteriormente, electricidad. Además, la industria textil ha comenzado a reciclar desechos avícolas para transformar las plumas en filamentos de queratina con mejores propiedades mecánicas. Convencionalmente, se han destinado mayormente sangre y huesos como alimentación del ganado, pero investigaciones recientes han sugerido que, por su alta concentración proteica, siendo el colágeno una de las

principales proteínas en estos subproductos, este colágeno podría extraerse de los pies, huesos, piel y cartílago esternal de pollo para valorizarlos en componentes de mayor valor agregado. En particular, la piel de pollo es uno de los subproductos de matadero con mayor impacto para valorizar por su alto contenido proteico, siendo una potencial materia prima para obtener nuevos compuestos funcionales como los péptidos bioactivos.

Los péptidos bioactivos son cadenas cortas de 2 a 30 aminoácidos y poseen de 400 a 2.000 Da de peso molecular. Su actividad biológica y biodisponibilidad vienen determinadas por la composición y orden de sus aminoácidos. Se destacan por poseer propiedades bioactivas: antihipertensivas, antioxidantes, antidiabéticas, antimicrobianas y antiinflamatorias, siendo beneficiosas para la salud humana (Romero-Garay *et al.*, 2022). Además, se han estudiado como posibles ingredientes alimentarios debido a su capacidad antioxidante y antimicrobiana, para prolongar la vida útil de los alimentos, evitando la oxidación o crecimiento de microorganismo no deseados, al añadir directamente estos péptidos en los productos alimentarios (Tkaczewska, 2020). Dado los efectos positivos que tienen los péptidos, diversas industrias los utilizan en distintas aplicaciones, como las empresas farmacéuticas, que los usan para la promoción de la salud, la industria cosmética los usa en sus productos de belleza y en la industria de alimentos se muestra gran potencial para su uso como nutracéuticos y agentes terapéuticos.

En la industria alimentaria, la oxidación de los lípidos es uno de los principales indicadores del deterioro de los alimentos, afectando no solo a los propios lípidos, sino también a las proteínas y carbohidratos. Este proceso es la principal causa de la disminución de la calidad, rancidez y reducción de la vida útil del producto, y el método más común para combatir estos efectos es el uso de antioxidantes, que pueden actuar bloqueando los radicales libres, inhibiendo la actividad de enzimas oxidativas o formando complejos con metales que catalizan la oxidación (Tkaczewska, 2020). Hoy en día, en la industria se emplea ampliamente el uso de antioxidantes sintéticos, como el BHA (butilhidroxianisol) y BHT (butilhidroxitolueno), que son rentables y eficientes, pero existe la preocupación en el impacto en la salud, ya que presentan algunos efectos tóxicos y peligrosos (Sarmadi & Ismail, 2010), lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas naturales. De esta forma, los péptidos antioxidantes, a partir de subproductos proteicos, han demostrado ser una opción natural para extender la vida útil de productos cárnicos según algunas investigaciones, logrando reducir la oxidación lipídica y mejorando características sensoriales como el color, sabor, jugosidad, textura y aceptabilidad general del producto (Tkaczewska, 2020).

Los hidrolizados son una mezcla compuesta por péptidos y aminoácidos que pueden ser obtenidos a partir de diferentes proteínas, como los subproductos del pollo, mediante diversos métodos, como la fermentación microbiana, cuyo proceso ha sido utilizado históricamente por el efecto de prolongar la vida útil de los alimentos y mejorar su valor nutracéutico. Otro método empleado ampliamente es la hidrólisis de proteínas mediante tratamiento ácido, alcalino o enzimático. Muchos estudios han investigado la hidrólisis enzimática por su efectividad, siendo

un proceso que logra la producción de péptidos a partir del rompimiento de los enlaces peptídicos de la proteína con enzimas digestivas o enzimas derivadas de microorganismos y plantas. Este método logra mejorar las propiedades funcionales y nutricionales de las proteínas, como la actividad antioxidante, ya que, durante la hidrólisis, se genera una mayor exposición de grupos R de los aminoácidos activos, favoreciendo una mayor actividad antioxidante. Es importante considerar el tipo de proteasa a escoger, ya que esta elección influirá en el tamaño, cantidad y composición de los aminoácidos y péptidos libres, afectando finalmente las propiedades funcionales. La Alcalase se ha investigado en varios estudios, siendo la enzima que mayor actividad antioxidante obtiene de los hidrolizados producidos, en comparación con otras proteasas, además de producir péptidos de menor tamaño (Sarmadi & Ismail, 2010). Otros factores de la hidrólisis que impactan en la eficiencia de los hidrolizados obtenidos son el tiempo de reacción, temperatura, la relación enzima/sustrato (E/S) y el pH del medio. Estos parámetros, a su vez, determinan el grado de hidrólisis (% GH) alcanzado en el proceso, siendo un indicador clave para saber el grado de degradación de la proteína. Además, estudios han demostrado teórica y empíricamente que, si el grado de hidrólisis se controla adecuadamente, las demás variables del proceso pueden mantenerse sin control estricto, ya que esta variable reflejará directamente el avance de la hidrólisis y el efecto que tiene en las propiedades funcionales de los hidrolizados formados (Kristinsson & Rasco, 2000).

Una vez obtenidos los péptidos por hidrólisis enzimática, en este trabajo se procede a su liofilización para conservar sus propiedades funcionales y organolépticas. Este proceso consta de tres etapas principales: congelación, secado primario y secado secundario. Durante el secado primario, ocurre la sublimación del hielo, etapa en la que se elimina entre un 70-90% del agua presente en el alimento. Posteriormente, el secado secundario permite retirar el agua ligada mediante un aumento controlado de temperatura (Hua *et al.*, 2010). La liofilización es una técnica ampliamente utilizada para la estabilización de compuestos bioactivos, ya que permite obtener productos en polvo con mayor vida útil y facilidad de manejo, sin comprometer significativamente su funcionalidad. En la literatura, los hidrolizados proteicos suelen ser liofilizados como estrategia de estabilización; sin embargo, en la mayoría de los estudios no se reportan parámetros críticos del proceso, como la temperatura de bandeja durante el secado primario, ni se discute su posible efecto sobre las propiedades funcionales de los productos obtenidos. En este contexto, el presente estudio evalúa el impacto de dicha variable sobre la actividad antioxidante de los hidrolizados, con el fin de aportar evidencia acerca de cómo la temperatura de liofilización puede incidir en la funcionalidad del producto estabilizado.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Generar un hidrolizado enzimático a partir de piel de pollo, estabilizado por liofilización, con alta capacidad antioxidante, mediante la evaluación del efecto del grado de hidrólisis y la temperatura del proceso de secado.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar el proceso de extracción térmica de colágeno a partir de piel de pollo como etapa previa al proceso de hidrólisis enzimática, cuantificando su rendimiento.
- Generar la curva de hidrólisis enzimática mediante la cuantificación de grupos alfa-amino libres, y seleccionar tres grados de hidrólisis representativos a partir de dicha curva.
- Aplicar el proceso de liofilización a los hidrolizados, evaluando el efecto de diferentes temperaturas de plato sobre la estabilidad del producto.
- Determinar la actividad antioxidante de los hidrolizados antes y después del proceso de liofilización, en función del grado de hidrólisis y la temperatura de secado.
- Realizar un diseño experimental definiendo como variables de entrada el grado de hidrólisis y la temperatura de liofilización, evaluando el efecto de estas variables en la actividad antioxidante, con el objetivo de determinar la mejor combinación de los hidrolizados obtenidos.

3. ANTECEDENTES GENERALES

3.1 Industria Avícola

En los últimos años, en la industria avícola se ha observado un gran crecimiento a nivel mundial, logrando, entre los años 1961 y 2016, un aumento en la producción anual de carne de pollo de 9 millones a 120 millones de toneladas, siendo una cifra significativa en este sector. En 2016, la carne de pollo representó el 36% de la producción mundial de carne, y para el año 2020 esta cifra creció al 40% según la FAO, alcanzando 136 millones de toneladas aproximadamente (Ungureanu *et al.*, 2023).

3.1.1. Producción de Carne de Pollo

La producción de carne de pollo se caracteriza por poseer un sistema de engorde intensivo para maximizar la conversión alimenticia y el uso del espacio. La alta capacidad reproductiva de las aves es clave en este proceso, además de un manejo cuidadoso en etapas previas al sacrificio, ya que son factores significativos en la calidad de la carne. La alimentación de las aves incluye ingredientes como las microalgas y aceites de origen vegetal y marino, diseñado para fortalecer el perfil nutritivo del producto final. Sin embargo, estos componentes, usados en su enriquecimiento, son susceptibles a la oxidación, pudiendo afectar negativamente la calidad si no se utilizan antioxidantes adecuados, como el selenio o la vitamina E, durante su producción (Kralik *et al.*, 2018).

3.1.2. Mercado de Carne de Pollo

Actualmente, la carne de pollo ha sido uno de los tipos de carne con mayor consumo, del cual ha ido incrementando gradualmente respetando el crecimiento de la población mundial, siendo una de las principales opciones alimentarias en diversos mercados. Esta tendencia se debe a la ausencia de restricciones religiosas o culturales asociadas a su consumo, como también a su perfil nutricional y calidad, el cual se destaca por poseer bajo contenido en grasa y alto porcentaje de ácidos grasos insaturados. Agregado a lo anterior, la carne de pollo es un alimento percibido accesible para los consumidores, tanto en términos de precio como su disponibilidad, reforzando su competitividad y aceptación en el mercado global (Kralik *et al.*, 2018).

En Chile, la producción de carne de pollo alcanzó 685.270 toneladas en el año 2023, lo que corresponde a un crecimiento significativo por parte de la avicultura en el sector agroalimentario. Durante ese mismo año, la exportación de esta carne de pollo fue de 110.860 toneladas netas, representando un 20% de la producción total. Por otro lado, el consumo interno de carne de pollo es de 33,5 kg/PP, representando un 41,6% del consumo total de carnes (Chile Carne, s.f.). A continuación, se puede visualizar la evolución de la producción de los distintos tipos de carne a nivel nacional:

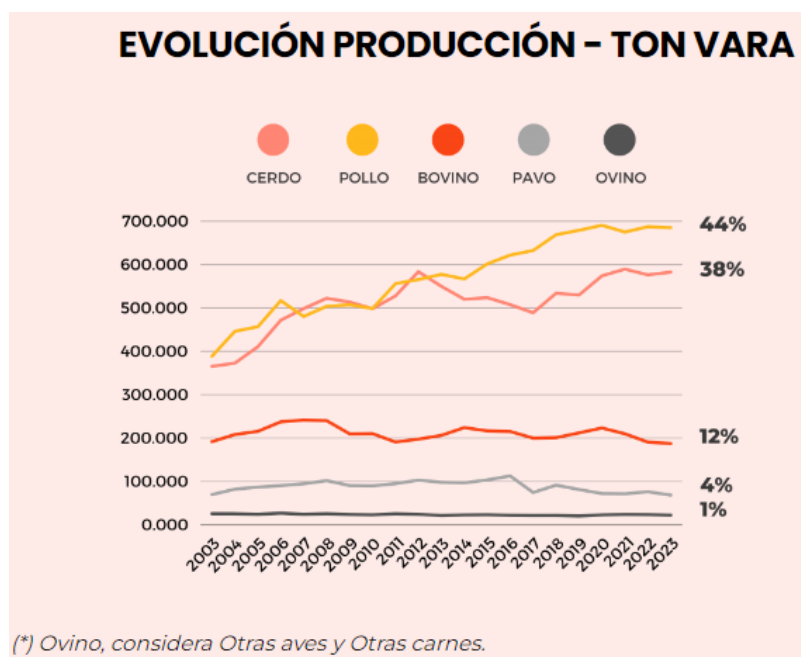


Figura 1. Evolución Producción de carnes en Chile (Chile Carne, s.f.)

A través de la Figura 1, se destaca el incremento sostenido del sector de carne de pollo, alcanzando aproximadamente 700.000 toneladas vara, que corresponde a un 44%, consolidando su importancia económica y su relevancia como una de las principales fuentes de proteína animal en el país (Chile Carne, s.f.).

3.1.3. Generación de Subproductos Avícolas

Con la demanda actual de carne de ave que crece constantemente, la producción extensiva de esta carne, principalmente de pollo, genera cantidades significativas de subproductos avícolas, obtenidas en todas las fases de la cadena alimentaria, desde la obtención de materias primas hasta la etapa posterior al consumo. En el marco de la economía circular, los subproductos avícolas, como los de otras industrias alimentarias, son considerados recursos valiosos debido a las moléculas funcionales que poseen, otorgándoles un potencial como bio-recursos para generar productos alimentarios, cosméticos, farmacéuticos, químicos y energéticos y otros de alto valor agregado (Ungureanu *et al.*, 2023).

Estos subproductos representan hasta el 30% de la producción total, pudiendo ser comestibles o no comestibles, y presentarse en forma líquida como la sangre o sólida, donde se incluyen la piel, corazones, hígados, estómagos, intestinos y otros órganos (Gál *et al.*, 2020). Sin embargo, si no se gestionan eficazmente, estos subproductos pueden convertirse en fuentes de contaminación y ser vectores de enfermedades, pudiendo afectar la calidad del aire, suelo y del agua. Estos problemas radican desde la degradación de aguas superficiales y subterráneas debido a los nutrientes y microorganismos patógenos presentes en los desechos avícolas, así como las emisiones de gases como el amoníaco y sulfuro de hidrógeno. Por ello, se han desarrollado estrategias de mitigación, como el compostaje, su uso como fertilizantes o para la

producción de piensos para el ganado, con el fin de minimizar el impacto ambiental de la producción avícola (FAO, s.f.).

No obstante, el realizar estas prácticas tradicionales, mencionadas anteriormente, presentan algunas limitaciones. Por ejemplo, el compostaje aeróbico genera productos de bajo valor añadido, el uso de subproductos en alimentos para animales puede incrementar el riesgo de propagación de enfermedades y la digestión anaeróbica logra generar metano y otros compuestos útiles, pero su alta humedad y bajo poder calorífico dificultan la conversión en energía de manera eficiente, siendo todavía un desafío (Ungureanu *et al.*, 2023). Además, con estas prácticas no se logra aprovechar su rica composición en proteínas, enzimas y lípidos, el cual les confiere un potencial nutricional y económico alto para poder valorizarlos (Mrázek *et al.*, 2019).

3.1.3.1. Aprovechamiento de Subproductos Avícolas

Al igual que las gelatinas e hidrolizados de colágeno a partir de sustratos proteicos como el bovino y el porcino como fuentes tradicionales, también se puede aprovechar el potencial de los subproductos avícolas. Los desechos avícolas son generados desde la etapa de incubación hasta el empaque y consumo de la carne, por lo que existe la posibilidad de extraer compuestos de alto valor desde diferentes etapas del proceso. Además, se ha demostrado mediante investigaciones que estos subproductos poseen funcionalidades tecnológicas comparables a las fuentes convencionales, como la capacidad de dar estabilidad, cohesión y elasticidad a los alimentos, además de mejorar las propiedades como la capacidad de retención de agua y grasa, emulsificación y formación de espuma. Las características mencionadas son valiosas en el proceso de alimentos procesados cárnicos, donde el colágeno obtenido a partir de sustratos proteicos lograría contribuir con la mejora de la textura, palatabilidad y lograr extender la vida útil del producto (Mrázek *et al.*, 2019).

3.1.3.2. Piel de Pollo

La piel de pollo es un subproducto que representa entre el 8 y 20% (p/p) del canal del pollo. Su composición proteica resulta atractiva ya que posee entre un 8-12% de proteína, siendo la proteína principal el colágeno, además contiene altas concentraciones de ácidos grasos n-3 y n-6 y entre un 30-40% de grasa. Al eliminar la grasa, su contenido proteico aumenta a más del 60%, siendo una potencial materia prima para obtener nuevos compuestos funcionales como hidrolizados y péptidos bioactivos (Ibarz-Blanch *et al.*, 2023).

3.2. Extracción de Colágeno como Gelatina

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano, representando el 25% del total de proteína en el cuerpo, presentes principalmente en los huesos, tendones, pieles, cartílagos, entre otros tejidos (ELSEVIER CONNECT, 2019). Esta proteína de triple hélice, soluble en agua y fácilmente digerible, contiene moléculas principalmente estabilizadas por enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares, producto de la repetición casi continua de la secuencia de aminoácidos glicina-prolina-hidroxiprolina (Rawdkuen *et al.*, 2013). Esta secuencia es

fundamental para la estabilidad de la estructura helicoidal del colágeno, representando el 50% del contenido proteico total (Hashim *et al.*, 2015).

El proceso de extracción de colágeno es comúnmente aplicado en diferentes industrias, incluida la industria alimentaria, para obtener gelatina, materia prima conocida como la forma cocida del colágeno, la cual cuenta con muchas características beneficiosas que le proveen de alto grado alimenticio, como la formación de gel, propiedades clarificantes, espesantes y estabilizadoras en los alimentos cárnicos. Para extraer la gelatina, el colágeno nativo insoluble se debe pretratar mediante calentamiento a altas temperaturas superiores a 60°C (Gál *et al.*, 2020) o mediante el uso de reactivos químicos. Durante este tratamiento térmico, el colágeno se hincha y logra romper los enlaces de hidrógeno y no covalentes, que logran desestabilizar la triple hélice y la transición de hélice a espiral, que permiten obtener la gelatina soluble (Rawdkuen *et al.*, 2013). La desnaturalización de la proteína mediante esta hidrólisis parcial conlleva a posteriores cambios fisicoquímicos en la gelatina, sin embargo, el grado de la conversión del colágeno en gelatina está directamente relacionado con las condiciones del pretratamiento, tratando al tejido animal con ácido (gelatina tipo A) o álcali (gelatina tipo B), y del proceso de extracción. Los tres factores claves que influyen en las propiedades de la gelatina son el tiempo, la temperatura y el pH (Mrazek *et al.*, 2018). La obtención del colágeno se realiza a partir de pieles de bovino y cerdo tradicionalmente, al estar disponibles de manera universal. Sin embargo, investigaciones orientadas a ampliar las posibilidades de producción, han demostrado que la gelatina también se puede obtener a partir de otras fuentes animales, como las aves de corral, pescado, carne de cabra, insectos, entre otros (Gál *et al.*, 2020).

3.2.1. Colágeno como Aditivo Alimentario

El colágeno o sus fracciones se han utilizado en la industria alimentaria como aditivos, que consisten en sustancias que se añaden a los alimentos durante su procesamiento para lograr mejorar cualidades organolépticas como el color, sabor, textura, entre otras cualidades del producto. Esto se debe a que poseen propiedades funcionales que mejoran significativamente las características tecnológicas y reológicas de los diversos productos, mayoritariamente cárnicos. Algunos ejemplos de estos aditivos alimentarios se encuentran los antioxidantes, emulsionantes, espesantes, conservantes, colorantes, entre otros. Esta gran versatilidad les proporciona potencial de mejorar la calidad general de los alimentos procesados (Hashim *et al.*, 2015).

3.3. Hidrólisis de Proteínas

La hidrólisis de proteínas es un proceso que consiste en la ruptura de enlaces peptídicos a partir de métodos químicos o enzimáticos, logrando obtener péptidos de diferentes tamaños y aminoácidos libres. Estos hidrolizados son ampliamente utilizados en la industria alimentaria en alimentos cárnicos, suplementos proteicos, sustitutos de la leche, estabilizantes en bebidas y potenciadores de sabor en productos de confitería, entre otras aplicaciones (Kristinsson & Rasco, 2000). Los hidrolizados de proteína formados son una mezcla de péptidos y aminoácidos preparadas mediante hidrólisis química con ácido o álcali o hidrólisis enzimática. Estos

contienen diversas propiedades funcionales y nutricionales en los alimentos, como la absorción de agua y solubilidad, además de proporcionar nitrógeno de fácil absorción y ser biológicamente activos (Fallah-Delavar & Farmani, 2018).

A pesar de la producción masiva de hidrolizados para diferentes campos, se requiere de amplio conocimiento en el control y la comprensión de los mecanismos que se involucran del proceso, los cuales aún no se dominan completamente. Según las investigaciones recientes de hidrólisis mediante enzimas, se han mejorado la selección de estos catalizadores enzimáticos y las condiciones del proceso, lo que permite un mayor control sobre la reacción y las características del producto final (Kristinsson & Rasco, 2000).

3.3.1. Hidrólisis Química

El método de hidrólisis química es uno de los más comúnmente utilizados en la transformación de proteínas en hidrolizados. Este proceso consiste en la ruptura de proteínas a través de la acción de productos químicos. Si bien este método es efectivo, puede llevar a la formación de hidrolizados con propiedades funcionales menos deseables en comparación con la hidrólisis enzimática, esto debido a que su mecanismo y la comprensión de los factores involucrados aún son desafíos significativos para controlar el proceso. No obstante, a gran escala se sigue realizando esta técnica para diversas aplicaciones por su capacidad de descomponer proteína de manera segura (Kristinsson & Rasco, 2000).

3.3.1.1. Hidrólisis Ácida

Este proceso consiste en una reacción de proteínas con ácidos fuertes, como el ácido clorhídrico, a altas temperaturas y presiones, lo que resulta en una descomposición completa de las proteínas. La hidrólisis de proteínas ácida es más comúnmente utilizada que la hidrólisis enzimática, especialmente para producir hidrolizados de proteínas vegetales que posteriormente son usados como agentes saborizantes en carnes procesadas, galletas y mezclas para sopas.

A pesar de que esta técnica es efectiva, presenta limitaciones en su proceso, tales como la destrucción del triptófano, un aminoácido esencial, además de la generación de altas cantidades de sal (NaCl) en los hidrolizados, afectando su funcionalidad en sistemas alimentarios (Kristinsson & Rasco, 2000).

3.3.1.2. Hidrólisis Alcalina

La hidrólisis alcalina, a diferencia de la ácida, utiliza productos alcalinos, principalmente hidróxido de sodio. Este método también se emplea para recuperar proteínas de diferentes sustratos, para luego ser empleados en la industria alimentaria. Sin embargo, este método puede reducir de manera significativa el valor nutricional de los hidrolizados generados, debido a la aparición de reacciones indeseables en el proceso, como ocurrir una racemización de aminoácidos, la pérdida de aminoácidos sensibles al calentamiento o cambios en el pH como la cisteína, serina y treonina, y la formación de sustancias tóxicas como la lisinoalanina. A pesar de lo anterior, la hidrólisis alcalina en ciertas condiciones, como utilizar concentrados de proteína

de pescado insolubles, han logrado mejorar algunas propiedades funcionales de estas proteínas, como su solubilidad (Kristinsson & Rasco, 2000).

3.3.2. Hidrólisis Enzimática

Este proceso realiza la reacción mediante el uso de enzimas proteolíticas, comúnmente llamadas proteasas, las cuales pueden ser endógenas o añadidas desde fuentes externas. La ventaja de elegir este método radica en la especificidad de la enzimas para catalizar la ruptura de los enlaces peptídicos para ciertos sustratos, permitiendo obtener productos con amplia funcionalidad y valor nutritivo. Las enzimas proteolíticas, utilizadas en la industria alimentaria, actúan como catalizadores bioquímicos y son clasificadas según el grupo funcional principal del sitio activo, donde se pueden encontrar las serinas, tioles, carboxilas y metaloproteasas. Además, según su mecanismo para catalizar se encuentran las endoproteinasas, que son aquellas enzimas que rompen los enlaces peptídicos dentro de las moléculas, produciendo péptidos de distintos tamaños en vez de liberar aminoácidos individuales, y las exopeptidasas, las cuales eliminan aminoácidos de los extremos de las cadenas peptídicas. Las proteasas son altamente específicas, logrando mejorar la textura y sabor de los alimentos. La hidrólisis enzimática es un técnica comprometedora para el futuro ya que este proceso logra un mayor control sobre las propiedades funcionales, sensoriales y fisicoquímicas finales en comparación con los métodos químicos mencionados anteriormente (Kristinsson & Rasco, 2000).

3.4. Grado de Hidrólisis (GH)

Para obtener la proporción de enlaces peptídicos que han sido rotos durante la hidrólisis, en relación con el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína original, se utiliza el grado de hidrólisis (GH). Este término se define como la razón, expresado en porcentaje, entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) y el número total de enlaces peptídicos presentes (h_{tot}). El valor que corresponde a h_{tot} depende de la composición de aminoácidos que tenga la materia prima. A continuación, se muestra su ecuación:

$$GH [\%] = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100 \quad (1)$$

Para su determinación, se pueden utilizar diversos métodos. El método pH-stat es uno de los más simples y comúnmente utilizados, el cual estima el GH midiendo la cantidad de base, como NaOH, que se requiere para neutralizar los ácidos liberados durante la hidrólisis. Su precisión puede ser afectada por factores como el tipo de enzima a utilizar, el tamaño de los péptidos producidos y la temperatura de la reacción. Por otro lado, los métodos TNBS (Ácido trinitrobencenosulfónico) y OPA (O-ftaldialdehído) cuantifican los grupos amino mediante absorbancia, generados de manera directa en la hidrólisis, proporcionando una medida precisa del GH. Sin embargo, el método TNBS requiere largos periodos de tiempo de incubación y enfriamiento, impidiendo su monitoreo en tiempo real y es sensible a interferencias de la lisina y prolina. Por otro lado, el método OPA si permite el monitoreo en tiempo real, pero es menos efectivo para sustratos ricos en cisteína y requiere derivatización. Otros métodos como el SN-

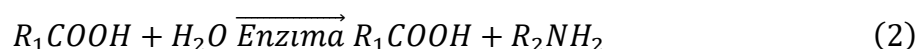
TCA (Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético) y Titulación con formol, son rápidos y logran monitorear en tiempo real, pero el SN-TCA cuantifica nitrógeno soluble en lugar del GH y la titulación con formol puede conseguir resultados variables y no siempre refleja con precisión el GH. La elección final del método para obtener el GH dependerá de las condiciones de la reacción y el sustrato proteico (Rutherford, 2010).

3.4.1. Método basado en la valoración del protón: pH-stat

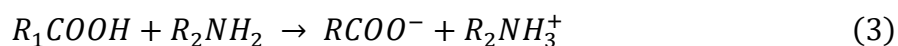
El método pH-stat es una técnica utilizada para determinar el grado de hidrólisis (GH) de proteínas, el cual se basa en la medición de los protones liberados durante la reacción. En la hidrólisis se liberan grupos carboxilo y amino, donde a un pH neutro o alcalino, los grupos carboxilo se desionizan completamente, liberando protones que disminuyen el pH de la mezcla de la reacción. Para contrarrestar este efecto, este método ajusta continuamente el pH de la solución agregando una base, y la cantidad de esta base requerida para lograr mantener el pH constante se utiliza como un indicador de la extensión de la hidrólisis, permitiendo calcular su GH. Es importante señalar que este método no mide directamente los enlaces peptídicos rotos, sino que estima el grado de hidrólisis a partir de la cantidad de base necesaria para neutralizar los ácidos producidos durante el proceso (Rutherford, 2010).

El mecanismo de hidrólisis enzimática, tras romper un enlace peptídico, genera la liberación de un grupo α -amino y un α -carboxílico, lo cual se describe mediante las siguientes etapas (Qi & He, 2006):

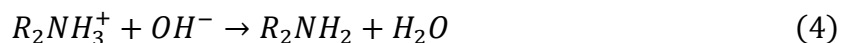
Ruptura del enlace peptídico:



Intercambio de protones:



Valoración del grupo amino:



Para estimar el GH en el método pH-stat, se utiliza la ecuación de Adler-Nissen (1986), el cual se observa a continuación:

$$GH [\%] = \frac{B * N_b}{\alpha * h_{tot} * MP} * 100 \quad (5)$$

Donde:

B: es el consumo de base en mL (o ácido en el caso de proteasas ácidas),

N_b: es la normalidad de la base (o ácido),

α : es el grado promedio de disociación de los grupos -NH (o COOH),

MP: es la masa de la proteína que se está hidrolizando en gramos (%N x 6,25),

h_{tot} : es el número total de enlaces por unidad de peso (meq/kg de proteína, calculado mediante la composición de aminoácidos del sustrato).

El grado de disociación se logra calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (6)$$

La fórmula para obtener el porcentaje de hidrólisis (%GH) es aplicable cuando la reacción se realiza a un pH superior al pK del grupo α -NH. En esta condición, la ruptura de enlaces peptídicos provoca la liberación neta de protones (H^+), además de que el consumo de la base es directamente proporcional al número de enlaces quebrados. Cuando el pH es mayor a 6,5, la disociación del grupo α -NH protonado es significativa, por lo que se requiere conocer el valor de pK para ajustar de manera adecuada el pH y calcular la disociación. Los valores de pK, que están en función de la temperatura, pueden calcularse con la fórmula de Steinhardt y Beychok, que se muestra a continuación:

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 * T} * 2400 \quad (7)$$

Donde T es la temperatura en Kelvin (Kristinsson & Rasco, 2000).

3.4.2. Método basado en la cuantificación por espectrofotometría: OPA

El método de ácido ortoftalaldehído (OPA) es una técnica sencilla utilizada para la cuantificación del grado de hidrólisis (GH) en proteínas. Como se puede observar en la Figura 2, este método se basa en la reacción de los grupos α -aminos libres (de péptidos o aminoácidos) con el reactivo OPA en presencia de ditioneitol (DTT), reaccionando con su grupo tiol (terminal SH). Esta reacción forma un compuesto detectable a 340 nm en un espectrofotómetro.

Originalmente esta técnica es descrita por Church *et. al* (1983) en estudios sobre la proteólisis de proteínas lácteas. Nielsen (2001) hizo modificaciones en el método, al utilizar DTT en vez de β -mercaptoetanol, debido al impacto ambiental que genera este último. Otra modificación del método es el uso de serina como estándar para realizar la curva de calibración, ya que su respuesta en la reacción es similar al promedio de los aminoácidos (Nielsen *et al.*, 2001). La serina, un aminoácido con un grupo amino y un grupo carboxilo, permite establecer una relación cuantitativa entre su concentración y la absorbancia medida por el espectrofotómetro. Su concentración es equivalente a la de los grupos α -amino, lo que facilita la correlación de la absorbancia de las muestras de hidrolizado con la concentración de los grupos α -amino presentes.

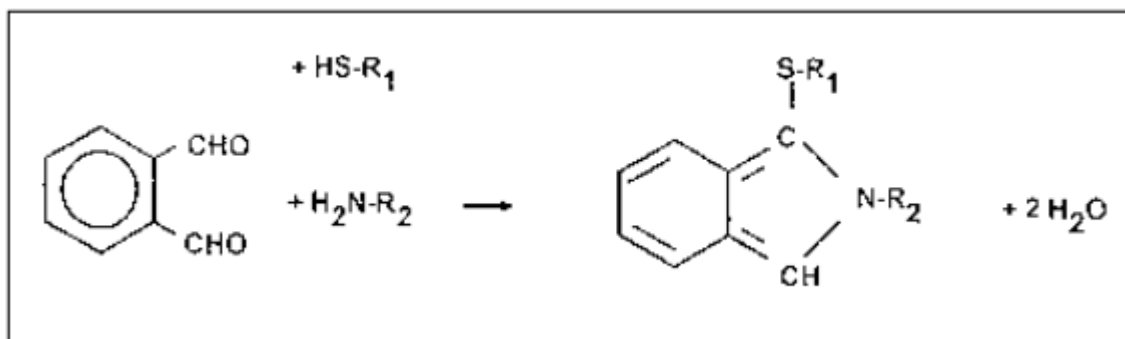


Figura 2. Reacción entre grupos α -amino libres y OPA (Nielsen *et al.*, 2001)

3.5. Propiedades Funcionales de Hidrolizados de Proteína

Las propiedades funcionales provenientes de las proteínas han sido definidas como “aquellas características fisicoquímicas que influyen en el procesamiento y comportamiento en los sistemas alimentarios, en función de la calidad del producto final” (Kinsella & Melachouris, 1976). Algunos ejemplos de estas propiedades incluyen la gelificación, espumado, cohesión, retención de agua, emulsificación, entre otras, las cuales son esenciales para la producción de productos como carnes procesadas, productos lácteos y panificación.

Existen muchos factores que afectan a las propiedades funcionales como, por ejemplo, la fuente de la proteína, el método de aislamiento, la modificación de la proteína en el caso de realizar hidrólisis enzimática, y también afectan condiciones ambientales, como la temperatura, pH, fuerza iónica. A pesar de que existan métodos empíricos para evaluar estas propiedades, en la actualidad se requieren de métodos estandarizados que podrían permitir predecir mejor el comportamiento de las proteínas en matrices alimentarias complejas a través de la optimización de las propiedades funcionales en función de diferentes condiciones, logrando facilitar el desarrollo de nuevos productos (Kinsella & Melachouris, 1976).

3.5.1. Péptidos Antioxidantes

La capacidad antioxidante indica el potencial que tiene un compuesto para inhibir la oxidación de un sustrato, incluso en concentraciones muy bajas (<1%, generalmente entre 1 y 1.000 mg/L). La evaluación de este parámetro es primordial para la evaluación de la calidad de los alimentos, la concentración de antioxidantes en un sistema, y la biodisponibilidad de estos antioxidantes en el organismo (Benítez-Estrada *et al.*, 2020).

Los antioxidantes son sustancias primordiales en los organismos vivos para mantener el equilibrio oxidativo ya que, si bien el cuerpo gestiona la generación de especies reactivas, la acumulación de estas podría dañar los tejidos, metabolismo e incrementar riesgos de padecer enfermedades graves. Algunos estudios en animales han logrado demostrar que los péptidos antioxidantes que provienen de proteínas, tales como pechuga de pollo o hígado, previenen la oxidación de lípidos y elevan niveles de antioxidantes en órganos importantes. Además, los péptidos antioxidantes han demostrado ser prometedores en productos alimenticios, especialmente en productos cárnicos para lograr mantener la calidad de estos durante su almacenamiento. Estudios de

péptidos derivados de hemoglobina bovina, hígado y pechuga de pollo, fueron aplicados en carne picada y salchichas curadas, mostrando un rendimiento antioxidante similar al antioxidante sintético BHT, en la inhibición de la oxidación de lípidos (Lorenzo *et al.*, 2018). No obstante, se requiere mayor investigación sobre la forma en la que los péptidos pueden afectar las propiedades tecnológicas y características sensoriales de los productos, como el sabor textura y la aceptación del consumidor.

El contenido de antioxidantes en alimentos puede ser evaluado mediante dos diferentes métodos: midiendo su capacidad de donar electrones o átomos de hidrógeno como mecanismos. El método de transferencia de electrones evalúa la capacidad del compuesto para actuar como agente reductor, lo que provoca un cambio de color cuando se dona un electrón en la sustancia reducida. Por otra parte, el método de transferencia de átomos de hidrógeno determina el potencial antioxidante del compuesto mediante la capacidad que tiene para neutralizar un radical libre cuando se dona un átomo de hidrógeno (Lafarga *et al.*, 2017).

A pesar de que existe controversia acerca de la capacidad de extrapolar los resultados de estos métodos obtenidos en ensayos *in vitro* a efectos *in vivo*, estos siguen siendo esenciales para poder identificar y distinguir compuestos antioxidantes en soluciones complejas, como los hidrolizados y péptidos de proteínas. Dado que la interacción de los antioxidantes con radicales libres es compleja, se considera necesario aplicar más de un método para su evaluación.

Los métodos más utilizados son el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). El método ABTS⁺ permite evaluar antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos y es independiente del pH, sin embargo, el tiempo de reacción es dependiente del compuesto analizado, y el radical ABTS no se encuentra de forma natural en sistemas biológicos. Por otra parte, el método DPPH mide la capacidad de transferir electrones o átomos de hidrógeno a un radical libre estable, provocando un cambio en la absorbancia medida en el espectrofotómetro. La ventaja de esta técnica es la simpleza y rapidez, pero requiere de un medio orgánico y puede presentar interferencias si los antioxidantes que son probados tienen absorbancias similares a la del radical DPPH.

Existen otros métodos, como el FRAP (Poder Antioxidante Reductor Férrico), el cual analiza la capacidad de los antioxidantes de reducir iones férricos (Fe³⁺) a ferrosos (Fe²⁺), siendo un método sencillo tiene limitaciones, como su sensibilidad a compuestos donadores de electrones o la falta de reactividad cuando actúa con antioxidantes que usan el mecanismo de transferencia de hidrógeno. Por su parte, el ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno) logra detener reacciones en cadena y mide la capacidad que tienen los antioxidantes, tanto hidrofílicos como lipofílicos, de neutralizar radicales libres. Sin embargo, requiere de evaluación separada para ambos tipos de antioxidantes, pudiendo reducir su sensibilidad (Lorenzo *et al.*, 2018).

3.5.2. Antioxidantes Sintéticos (BHA, BHT)

Los antioxidantes pueden ser definidos como aquellas sustancias que, incluso en presencia de concentraciones muy bajas en comparación con las del sustrato oxidable, estos compuestos son

capaces de ralentizar o inhibir notablemente el proceso de oxidación de dicho sustrato (Antolovich *et al.*, 2002). Se han desarrollado antioxidantes sintéticos como el BHA (butilhidroxianisol) y el BHT (butilhidroxitolueno) con la finalidad de evitar la oxidación de lípidos de productos de la industria alimentaria, como las carnes, aceites y sus derivados, siendo utilizados ampliamente por ser efectivos para ralentizar el deterioro oxidativo.

No obstante, el uso de estos antioxidantes ha generado preocupación y críticas por los posibles riesgos para salud de las personas. Existen diversas investigaciones donde se ha vinculado al BHT con efectos negativos, como toxicidad hepática y renal en animales, además de alteraciones en el sistema inmunológico y reacciones alérgicas en algunos individuos. No es considerado un carcinogénico, sin embargo, puede promover el crecimiento de tumores en ciertos órganos, dependiendo de sus condiciones de exposición. A pesar de los riesgos mencionados, este antioxidante es de los más utilizados en alimentos que contienen grasas, donde la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) permite concentraciones de hasta el 0,02% basándose en el contenido de grasa de los productos alimenticios terminados. Además, la ingesta diaria aceptable (ADI) es de 0 a 0,125 mg/kg según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS), con límites más exigentes en la Comunidad Económica Europea (0 a 0,05 mg/kg) (Lanigan & Yamarik, 2002).

Por otra parte, con el BHA se han realizado estudios en animales que han sugerido que, en dosis crónicas elevadas, puede tener efectos cancerígenos, lo que genera preocupación de la seguridad de este antioxidante en el organismo humano a largo plazo (Conning & Phillips, 1986). Esta clasificación como posible carcinógeno proviene de estudios en roedores, que fueron expuestos a dosis altas de BHA, lo que les provocó hiperplasia y tumores en el estómago. A pesar de ello, los niveles presentes de BHA en la dieta alimentaria humana no se consideran peligrosos, pero persiste la preocupación sobre el riesgo a la salud con relación a su uso prolongado. Es por lo anterior, que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) han establecido límites para el uso en alimentos, donde la EFSA determinó una ADI de 1,0 mg/kg/día, basados en estudios de toxicidad en ratas. Por otra parte, la FDA permite el uso en alimentos donde el contenido total de antioxidantes no exceda el 0,02% de la grasa del producto (Felter *et al.*, 2021).

3.6. Liofilización

En 1993, Jennings definió la liofilización como el proceso de estabilización en el que el material se congela y se concentra el solvente (comúnmente agua), para luego reducirlo mediante sublimación y desorción. Por otra parte, Orrego (2003) definió a la liofilización como un proceso de secado mediante sublimación, el cual fue desarrollado con el propósito de disminuir pérdidas de los compuestos responsables del sabor y aroma de los alimentos, ya que estos suelen ser afectados durante procesos tradicionales de secado (Ramírez-Navas, 2007).

3.6.1. Descripción del Proceso

El objetivo de este método es eliminar el agua de productos sensibles sin dañarlos, como lo son los productos biológicos de la industria alimentaria, logrando conservar los compuestos relevantes que suelen perderse con los métodos convencionales de secado, por lo que da a lugar a productos de más alta calidad. Este proceso permite que los productos puedan ser fácilmente almacenados permanentemente y reconstituirse aplicándoles agua de forma sencilla.

La liofilización ha sido utilizada en la industria alimentaria, farmacéutica y química, gracias a su capacidad para minimizar reacciones de degradación al usar bajas temperaturas, permitiendo ofrecer ventajas en la preservación de los alimentos y materiales biológicos, como mantener sus propiedades y estructura originales tras la rehidratación. Aunque este método es costoso debido a su velocidad lenta de secado y la necesidad de vacío, produce alimentos de alta calidad por su sabor intenso y consistencia crocante (Ramírez-Navas, 2007).

3.6.2. Etapas del Proceso

La liofilización es un proceso de secado en el cual el producto a deshidratar es congelado a presión atmosférica en su primera etapa, reduciendo la temperatura del producto hasta que el agua en su interior se convierta en hielo en forma de cristales. Luego, se realiza la etapa de secado primario, en el cual el agua congelada (o solvente congelado) se elimina mediante sublimación a condiciones de vacío en la cámara. En la Figura 3, se puede visualizar las curvas durante el proceso de liofilización, la línea verde representa la temperatura de las bandejas o platos donde se dispondrá el producto, la cual se mantiene relativamente constante ya que suministra calor al producto. La línea roja corresponde a la temperatura del producto, la cual va variando en cada etapa debido a la transferencia de calor y materia de este proceso.

Posteriormente, en la etapa de secado secundario, el agua restante ligada al producto se elimina mediante desorción, incrementando la temperatura del producto para facilitar el proceso. Finalmente, se restablece la presión atmosférica y el producto final queda en forma de polvo o sólido poroso, dependiendo del material tratado.

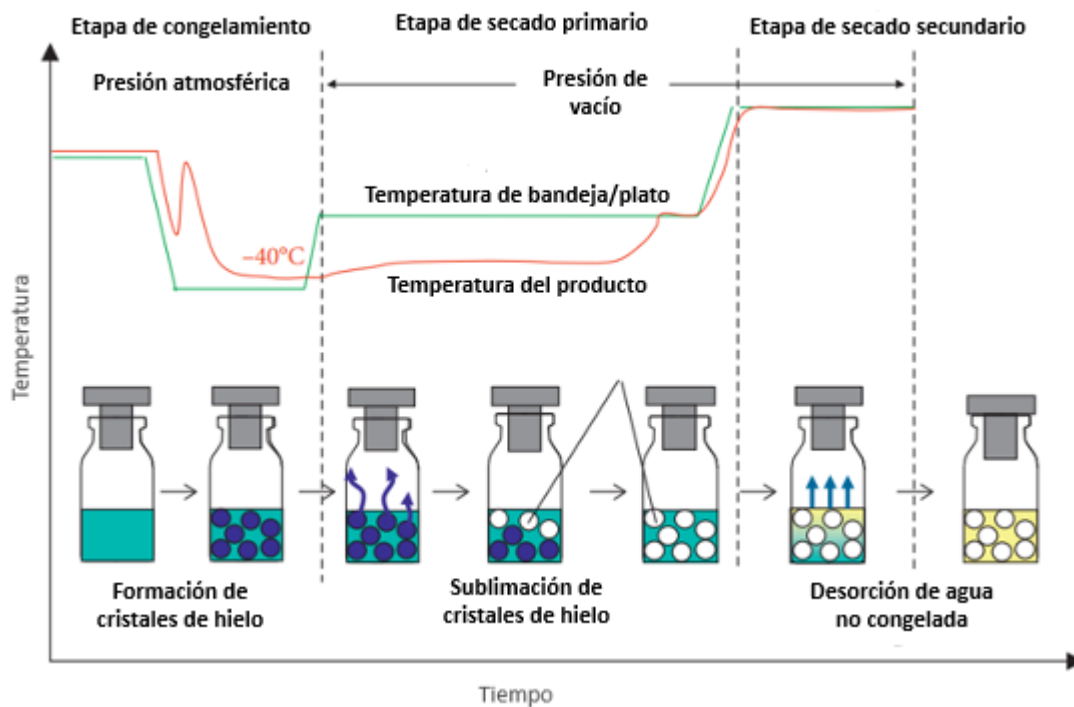


Figura 3. Diagrama de las Etapas del proceso de Liofilización (Kawasaki *et al.*, 2019).

3.6.2.1. Congelación

En esta etapa inicial de la liofilización, el agua contenida en los alimentos se cristaliza al disminuir la temperatura por debajo del punto de congelación, siendo un paso clave para las propiedades finales del producto, tales como la velocidad de sublimación, color y densidad (Orrego A., 2008). En la congelación del material se logra observar con frecuencia un cambio discontinuo de temperatura, como se puede ver en la Figura 3, esto se denomina “sobrefusión” (Kawasaki *et al.*, 2019).

La velocidad de la congelación del producto afecta la formación de los cristales de hielo y también de su tamaño, en el caso de congelarse lentamente se generarán cristales más grandes, mientras que, a una rápida congelación, se producirán cristales más pequeños. El tamaño de estos cristales es relevante en la eficiencia del posterior secado, ya que los cristales más grandes se subliman con mayor facilidad que los pequeños, lo que acelera el secado primario (Joel *et al.*, 2023).

3.6.2.2. Secado Primario (Sublimación)

En esta etapa se elimina el agua libre del alimento, a través de la sublimación, siendo un proceso donde existe un cambio de fase de sólido a vapor de manera directa, sin pasar por el estado líquido. Este método se efectúa bajo vacío, lo que permite que el agua sea eliminada (entre un 75-90%) de manera eficiente debido al gradiente de presión entre la muestra y el entorno (Orrego A., 2008). Para facilitar la sublimación, la temperatura de las bandejas o platos aumenta controladamente, asegurando la transferencia de calor desde la superficie de los platos hacia el

producto lo que, a su vez, induce la sublimación del hielo del material dentro de los viales o, en el caso de este trabajo, en las placas de Petri. En este proceso se genera vapor el cual se dirige al condensador, donde se enfría y se convierte nuevamente en hielo.

La sublimación se puede explicar a través del diagrama de fases del agua, el cual se muestra en la Figura 4. En este diagrama, la línea de sublimación se encuentra a temperaturas inferiores al punto triple del agua ($0,01^{\circ}\text{C}$ o $273,16\text{ K}$) y a presiones de vapor menores a 612 Pa (o 4.580 mTorr). Para que pueda ocurrir el procedimiento de sublimación, el producto debe pasar por varios puntos, según la Figura 4: en primer lugar, el producto en condiciones normales (punto A) debe ser congelado, disminuyendo su temperatura hasta el punto B, luego se reduce la presión de vapor de agua por debajo de la presión correspondiente al punto triple del agua (punto C). Finalmente, para concretar el procedimiento y convertir el hielo en vapor, se le aplica calor al producto hasta alcanzar el punto D (Ratti, 2013).

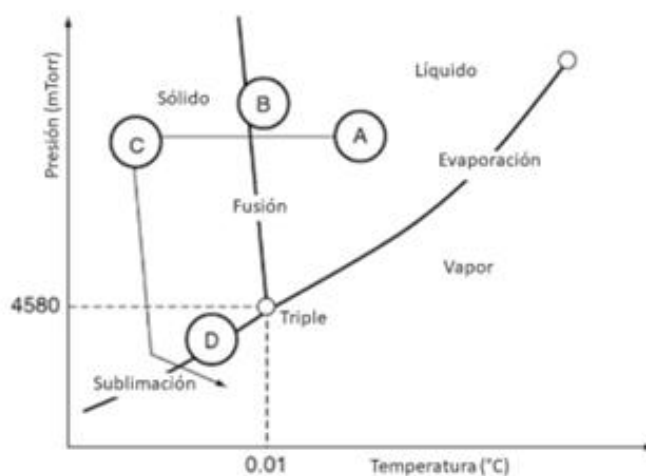


Figura 4. Diagrama de fases del agua (Ratti, 2013)

En las condiciones de vacío a la que opera el liofilizador, el gradiente de presión entre la muestra y el entorno facilita la sublimación. Además, a modo de compensar la pérdida de calor que sufra el producto durante este proceso, se transfiere energía desde los platos del liofilizador sin provocar colapsos en la estructura del material. Dependiendo de las características del material y condiciones establecidas en el liofilizador, esta etapa puede prolongarse por varias horas como se visualiza en la Figura 4, representando el mayor consumo energético del proceso (Kawasaki *et al.*, 2019).

Como en todo proceso de secado, la transferencia de calor y materia dependen de las condiciones de temperatura, presión y propiedades físicas de la muestra. A mayor espesor de la muestra, aumenta la resistencia al flujo de calor y vapor, prolongando el tiempo de secado (Ramírez-Navas, 2007). Respecto a la temperatura del producto, este debe ser controlado para evitar alteraciones en su estructura. En el caso de soluciones amorfas, como las formulaciones proteicas, la temperatura debe mantenerse entre 2 y 3°C por debajo de la temperatura de

transición vítrea (T_g) y temperatura de colapso (T_c), que son límites críticos para evitar el colapso del material. La T_g representa el punto donde la muestra congelada se mantiene rígido y estable, mientras que la T_c marca la temperatura a partir de la cual la muestra puede perder su estructura debido al reblandecimiento de la matriz (Depaz *et al.*, 2016).

3.6.2.3. Secado Secundario (Desorción)

La segunda etapa del secado inicia cuando ya no queda hielo en el producto para sublimar y la humedad proviene del agua parcialmente ligada al material en proceso de secado. La temperatura del material se incrementa aún más que en el secado primario, para lograr la desorción del agua adsorbida, logrando reducir el contenido de humedad hasta llegar a un nivel óptimo donde el producto final liofilizado se encuentre estable, evitando posibles problemas de degradación o pérdida de propiedades en el material tratado.

3.6.3. Métodos de Determinación del Fin del Secado Primario

La determinación del secado primario contempla el final cuando el último cristal de hielo sea sublimado, quedando solo agua ligada en el producto. Existen diversos métodos para identificar este momento, en los cuales se detectan variables claves del proceso como la temperatura del material, humedad o presión de vapor de agua en la cámara del liofilizador (Nowak & Jakubczyk, 2020). Entre los principales métodos utilizados se encuentran:

- Medición comparativa de presión de Pirani: este método se basa en medir la diferencia entre la presión medida por el sensor Pirani y el medidor capacitivo. El sensor Pirani mide la presión en función de la conductividad térmica del gas que está presente en la cámara del equipo, mientras que el medidor capacitivo mide la presión absoluta en la cámara, la cual no se ve afectada por la composición del gas. Cuando la sublimación se completa y el vapor de agua desaparezca, la presión medida por el sensor Pirani cae bruscamente, lo que indica que el fin del secado primario.
- Prueba de aumento de presión o PIT (“*Pressure Increase Test*”): este método consiste en el cierre temporal de la válvula que conecta la cámara de secado con la cámara de condensación. Cuando existe sublimación de hielo del material, el vapor de agua acumulado en la cámara provocará un aumento de presión. Por otra parte, cuando la sublimación ha finalizado, la presión se mantendrá estable, indicando el fin de esta etapa. Existen factores que afectan este método, que incluyen el tamaño de la cámara, el tamaño del lote de producto y la temperatura del producto. Una cámara de menor volumen genera un aumento en la presión más rápida. Un mayor tamaño de lote libera mayor vapor liberado, por lo que acelera el aumento de la presión. Además, a mayor temperatura del producto, se intensifica la sublimación, lo que también resulta en un incremento de la presión (Ghorpade *et al.*, 2022).
- Respuesta de la temperatura del producto o de la superficie de la bandeja: la temperatura del material permanece relativamente constante en el secado primario, debido a la absorción del calor latente necesario para el proceso de sublimación del hielo. Cuando finaliza la sublimación, se puede detectar al observar que la temperatura del producto

comienza a aumentar. Sin embargo, esta respuesta también podría indicar un sobrecalentamiento del producto y fusión del hielo, lo que debe ser interpretado con precaución y complementando con otros métodos para mayor seguridad.

- Cinética de los cambios de masa: este método evalúa el peso del producto, el cual irá disminuyendo progresivamente. Si el peso deja de cambiar en un periodo de 30 minutos, se puede asumir que alcanzó el contenido de agua en equilibrio bajo las condiciones del proceso, finalizando la etapa de secado primario (Nowak & Jakubczyk, 2020).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Metodología General

Se realiza la producción de péptidos antioxidantes a diferentes grados de hidrólisis, algunos de los cuales serán liofilizados a distintas temperaturas de bandeja, mientras que otros se conservarán en su forma de hidrolizado. Finalmente, se comparará la capacidad antioxidante entre los péptidos liofilizados y aquellos que no fueron sometidos a liofilización. A continuación, se puede visualizar en la Figura 5 la metodología a grandes rasgos del presente trabajo.

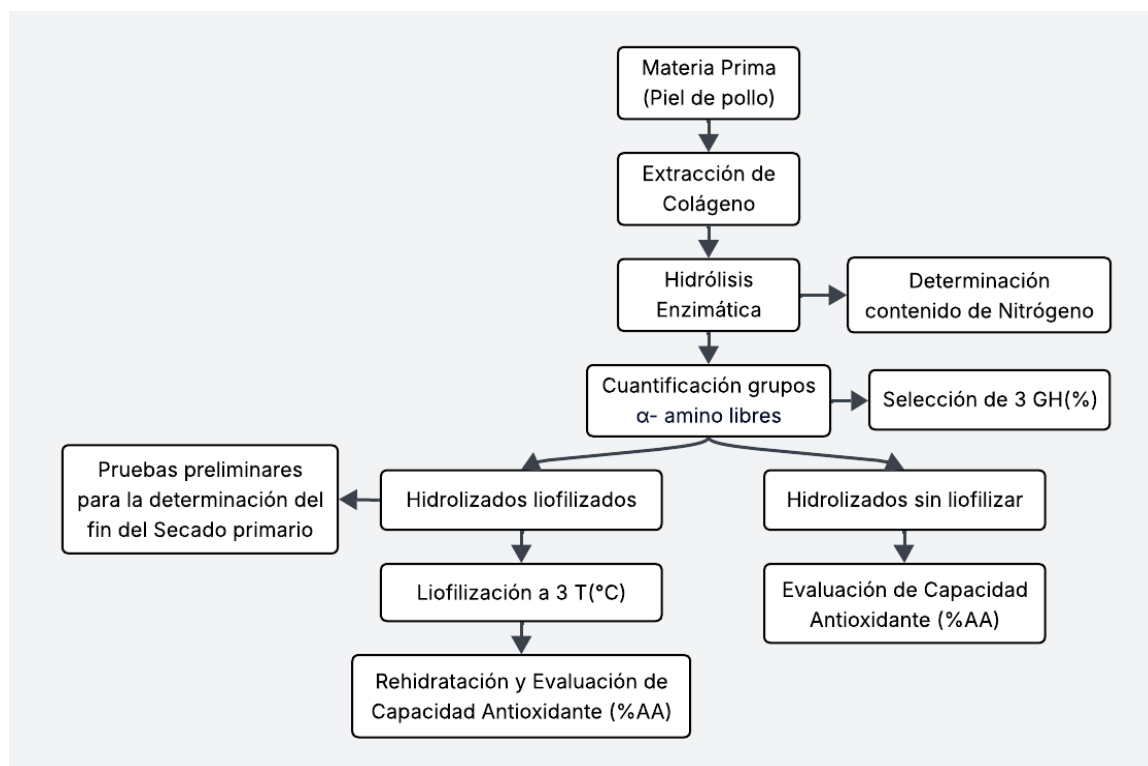


Figura 5. Metodología general de trabajo

4.2. Materiales

4.2.1. Equipos

En la realización del trabajo y los distintos experimentos llevados a cabo, se utilizaron una serie de equipos, los cuales se detallan a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Listado de equipos utilizados

Actividad Experimental	Equipo	Marca
Extracción de colágeno	Olla presión eléctrica multipropósito	Nex
	Balanza 5,2 g	BEL
Centrifugación de Extracto	Centrifugadora	Prism Microcentrifuge
Hidrólisis enzimática	Baño termorregulador	Thermo Fisher Scientific
	Baño termorregulador	Memmert
	Rotor de agitación	IKA Eurostar
	Agitador	Fabricado en UTFSM
	Termocupla	Mettler Toledo
	Electrodo de pH	Mettler Toledo
Medición método OPA	Espectrofotómetro Orion AquaMate 8000	Thermo Scientific
Liofilización	Liofilizador modelo Alpha 2-4 LSCplus	Christ
	Estufa modelo UM200	Memmert
	Balanza analítica	-
	Congelador de temperatura ultra baja	Haier Biomedical
Medición Actividad Antioxidante	Agitador rotatorio 3D	-

	Agitador vortex	-
	Espectrofotómetro	Biobase

4.2.2. Materia Prima

- Piel de pollo (Sustrato):

Se utilizó como materia prima piel de pechuga de pollo, obtenido de la empresa Agrosuper (Viña del Mar, Valparaíso, Chile). La piel de pollo es el subproducto escogido para el desarrollo de este trabajo, al ser alta en proteínas, zinc, grasas y colágeno. Para facilitar la posterior extracción de colágeno, fueron cortadas en pequeños trozos de aproximadamente 1,5 kg y congeladas para su posterior uso.

- Enzima:

La enzima utilizada es una proteasa tipo subtilisina (endoproteinasa de *Bacillus licheniformis*) proveniente de la preparación comercial Alcalase 2,4 L FG de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Esta preparación presenta una actividad enzimática específica de 2,5 U/g y una densidad de 1,08 g/mL, lo que corresponde a una actividad total de 2,7 U/mL de preparación enzimática. Para las reacciones de hidrólisis, la enzima se utilizó a una concentración final de 27 U/L de solución.

Además, en relación con su temperatura y pH óptimo de operación, esta enzima tiene un rango de operación recomendado de 50-60°C y 6 a 10, respectivamente. El volumen de enzima necesario (V_e [mL]) para las hidrólisis es obtenido mediante la Ecuación 8.

$$V_e = \frac{e_0 \cdot S}{a_e} \quad (8)$$

Donde e_0 es la concentración de la enzima [mUA/g_e] y la S es la masa del subproducto o sustrato utilizado [g_e]. Finalmente, el volumen obtenido corresponde exclusivamente al volumen de enzima requerida, el cual se añadió directamente a la mezcla sin necesidad de dilución, el cálculo de este se puede ver en el “**Anexo A**”.

4.3. Método

4.3.1. Diseño Experimental

El trabajo consiste en la realización de 9 experimentos, resultado de la combinación de 3 grados de hidrólisis y 3 temperaturas de bandeja en el proceso de liofilización. Los grados de hidrólisis a estudiar son: sin hidrolizar (GH1), grado de hidrólisis medio (GH2: ~5%) y grado de hidrólisis alto (GH3: ~10%). Las temperaturas de bandeja estudiadas son 30°C (T1), 40°C (T2) y 50°C (T3). Para facilitar la identificación de cada experimento, se utiliza un código que combina el

grado de hidrólisis (GH) y la temperatura de bandeja (T), asignando valores específicos a cada variable.

4.3.2. Extracción de colágeno

La extracción de colágeno desde piel de pollo se realizó en una olla a presión “*Instant Pot*”, donde se introdujo 1,5 kg de agua destilada y 1,5 kg de piel de pollo por 1 hora a presión media. Al término de este proceso, se procedió a colar la piel de pollo (sólido residual), el extracto y el aceite obtenido. Se debe realizar cuando aún este caliente el procedimiento, para que las fases de extracto y aceite (grasa) se puedan separar de manera eficiente, debido a que si se enfría la fase acuosa gelatiniza y, de ser así, se debe volver a calentar o bien separar por centrifugación. Este extracto acuoso, obtenido de la cocción de piel de pollo, contiene el colágeno de interés para realizar la hidrólisis y preparación de los péptidos antioxidantes. Finalmente, se pesa el extracto total obtenido, se dispuso en botellas y se mantienen en el congelador.

Dado que la olla a presión no proporciona un registro de la temperatura alcanzada en función del tiempo y la presión establecida, se utilizó un registrador de datos de alta precisión “HiTemp140-TD-2” (MadgeTech) para monitorear la temperatura durante el proceso. Este dispositivo permite medir temperaturas en un rango de -40°C a +140°C, y los datos obtenidos fueron posteriormente analizados mediante el software MadgeTech Data Logger, diseñado para facilitar la descarga y revisión de la información registrada.

Luego de la extracción de colágeno, el extracto obtenido se sometió a un proceso de centrifugación para eliminar los sólidos en suspensión y mejorar la pureza del colágeno soluble. Para ello, las muestras previamente congeladas fueron sometidas a un termorregulador a 50°C durante 30 minutos para su descongelación. Posteriormente, se realizó la centrifugación a 4.200 RPM durante 13 minutos. Una vez completada esta etapa, el sobrenadante fue filtrado con gasa para eliminar posibles residuos sólidos remanentes. Finalmente, el extracto purificado se almacenó en congelación hasta su uso en las etapas posteriores del estudio.

Se realizó un análisis de humedad al extracto extraído, arrojando un contenido promedio de humedad del 83,55%, lo que corresponde a un 16,45% de sólidos totales. Este resultado indica que la mayor parte del extracto corresponde a agua, lo cual es esperable considerando que el proceso de extracción se llevó a cabo en un medio acuoso y que el colágeno extraído se encuentra mayormente disuelto o suspendido en dicha fase.

4.3.3. Determinación del contenido de proteína

La cuantificación del porcentaje de proteína presente en el extracto de colágeno es necesario para, posteriormente, calcular el grado de hidrólisis (GH). Este contenido se obtiene a partir de la cuantificación de nitrógeno soluble orgánico por el Método Kjeldahl (ver procedimiento en “**Anexo B**”). Este método estándar consiste en tres etapas consecutivas, siendo la primera Digestión, seguida de la Destilación y, por último, la Valoración. La digestión se realiza con ácido sulfúrico y un catalizador para descomponer la muestra, destilación con hidróxido de

sodio para liberar el ion amonio retenido en ácido bórico y, finalmente, valoración con un ácido fuerte estandarizado para poder cuantificar el nitrógeno total presente en la muestra.

El método Kjeldahl permite determinar el nitrógeno total (TKN), que incluye tanto el nitrógeno orgánico, presente en proteínas, aminoácidos, entre otros compuestos, como el nitrógeno inorgánico en forma de amoníaco (NH_3) o ion amonio (NH_4^+) (VELP, 2023).

A partir de este procedimiento, la cantidad de nitrógeno en la muestra se calcula con la siguiente ecuación:

$$TKN (mg) = V_{eq} (mL) \cdot PM_N \left(\frac{g}{mol} \right) \cdot Normalidad \left(\frac{mol}{L} \right) \quad (9)$$

Donde V_{eq} es el volumen equivalente del ácido consumido en la titulación, PM_N es el peso molecular del nitrógeno (14,007 g/mol) y la normalidad corresponde a la concentración equivalente del ácido valorante.

El porcentaje de nitrógeno se determina mediante la ecuación:

$$\%TKN = \left(\frac{TKN(g)}{muestra(g)} \right) \cdot 100 \quad (10)$$

Para determinar la masa de muestra utilizada en el procedimiento se requiere de la densidad del hidrolizado, por lo que se tomaron cinco alícuotas utilizando una micropipeta de volumen fijo. Cada muestra fue pesada en una balanza analítica y, a partir de los valores obtenidos, se calculó el promedio de la masa. Como resultado, se obtuvo una densidad de 0,996 g/mL.

Luego, para estimar el contenido de proteínas a partir del TKN, se utiliza un factor de conversión específico (f_N [g_P/g_N]), según se muestra en la Ecuación 11. Este factor varía en función del tipo de muestra analizada; algunos de los valores más comunes se presentan en la Tabla 2.

$$Contenido\ de\ proteína = TKN * f_N \quad (11)$$

Tabla 2. Valor del factor de conversión de nitrógeno total a proteína para distintas muestras (VELP, 2023)

Muestra	Valor Factor de conversión f_N
Lácteos	6,38
Carnes, huevos, maíz	6,25
Harina de trigo	5,70

Se analizaron cinco muestras, obteniéndose un contenido de nitrógeno promedio de 0,22% y contenido de proteína de 1,40% $\pm$ 0,111.

4.3.4. Hidrólisis Enzimática

Las hidrólisis enzimáticas se llevaron a cabo en un reactor batch agitado mecánicamente, equipado con un baño termostático a 55°C. El pH de reacción se mantuvo en 6,5, sin control externo, dado que este valor es el nativo del sistema. La hidrólisis se realizó durante 4 horas, con el objetivo de determinar la concentración de grupos α -aminos en el extracto de colágeno mediante el método OPA.

El equipo titulador utilizado cuenta con un rotor, vástago agitador y una termocupla, lo que permite realizar un seguimiento preciso de la agitación y la temperatura dentro del recipiente de reacción. Mientras el sistema alcanzaba la temperatura deseada, se prepararon y etiquetaron 11 tubos Eppendorf de 1,5 mL, cada uno conteniendo 500 μ L (0,5 mL) de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (v/v), añadidos mediante micropipeta. El TCA tiene el objetivo de inactivar la enzima de manera inmediata en las muestras extraídas.

Al alcanzar el recipiente la temperatura de 55°C, se retiró una primera muestra de 500 μ L en el "tiempo 0" (tiempo previo a la adición de la enzima) y se depositó en un tubo preparado con TCA. A continuación, se añadió el volumen correspondiente de enzima Alcalase, asegurando previamente que su pH fuera de 6,5 para evitar alteraciones en el pH del sistema, y se comienza a cronometrar la reacción. Posteriormente, se tomaron muestras en los siguientes tiempos: 0, 4, 7, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos, depositándolas en los tubos correspondientes. En caso de ser necesario, las muestras fueron centrifugadas para obtener el sobrenadante hidrolizado en estado soluble y depositarlos en tubos Eppendorf vacíos y nuevamente etiquetados. Finalmente, los tubos con sobrenadante fueron congelados para su posterior análisis y cuantificación de grupos α -aminos.

Inicialmente, se realizó una hidrólisis exploratoria bajo las condiciones establecidas (55°C, pH 6,5, 50 mL de extracto y 1 mL de Alcalase) para evaluar la evolución del grado de hidrólisis. La cantidad de enzima utilizada se determinó a partir de la relación entre la concentración de Alcalase, el volumen de extracto y la actividad enzimática de la enzima. Sin embargo, con base en estudios previos, se decidió emplear el doble del volumen calculado, es decir, 1 mL de Alcalase, para garantizar una hidrólisis eficiente. Esto se fundamenta en la diferencia de composición del extracto utilizado en este estudio respecto al trabajo previo, en el cual la hidrólisis se realizó con un extracto diluido al 50% con agua desionizada. En este caso, al emplear extracto puro, el cual tiene un 83,55% de humedad, fue necesario ajustar la dosificación de la enzima para mantener una actividad comparable.

A partir de la curva de hidrólisis obtenida, se seleccionarán dos grados de hidrólisis representativos: uno medio y otro máximo, además del stock de extracto sin hidrolizar. Estos valores servirán como referencia para la producción del stock de hidrolizados, los cuales serán utilizados en las siguientes etapas del estudio, incluyendo liofilización y determinación de actividad antioxidante (%AA).

Es importante destacar que, para inactivar la enzima en las hidrólisis realizadas con los grados de hidrólisis determinados, se aplica un tratamiento térmico a alta temperatura. Este proceso se lleva a cabo en un baño a 90°C durante 15 minutos. Además, se retira el recipiente de la solución de hidrólisis 2 minutos antes de finalizar el tiempo estipulado, con el objetivo de asegurar la detención adecuada de la reacción.

4.3.5. Cuantificación grupos α -amino liberados

La formación de péptidos durante la hidrólisis se evalúa mediante la cuantificación de grupos α -amino libres, ya que su cantidad es directamente proporcional al número de enlaces peptídicos que se han roto en el proceso. Para este procedimiento se utilizó el reactivo OPA y un espectrofotómetro ajustado a una longitud de onda de 340 nm. Considerando que es la primera vez realizando este método con estas muestras, se realizó una dilución previa 1:10 y luego 1:20 para medirlas.

La medición se realizó añadiendo 0,200 mL de muestra diluida a la celda de vidrio de espectrofotometría, añadiendo después 1,5 mL de reactivo OPA (ver procedimiento en “**Anexo C**”), dejando transcurrir dos minutos antes de la lectura. Todas las mediciones se realizaron por duplicado o triplicado con el fin de asegurar la precisión de los resultados.

La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva de calibración construida a partir de soluciones de serina en concentraciones conocidas. Para la preparación de la curva de calibración, se disolvieron 1 mL de serina en 9 mL de agua desionizada, obteniendo una solución madre con una dilución 1:10. A partir de esta solución, se prepararon diferentes concentraciones de serina, tomando 200, 400, 600, 800 y 1000 μ L de la solución madre y añadiendo agua desionizada para completar el volumen correspondiente. Estas concentraciones fueron luego utilizadas en el mismo procedimiento de medición que las muestras del proceso, mezclándolas con 1,5 mL de reactivo OPA y esperando 2 minutos antes de medir la absorbancia. Los resultados de absorbancia de las muestras se compararon con los obtenidos en la curva de serina. En caso de que la absorbancia de alguna dilución se mantuviera dentro del rango de la curva de serina, se utilizó esa dilución como referencia para las muestras de la misma hidrólisis. Por otro lado, si con el paso del tiempo las muestras presentaban absorbancias fuera del rango de la curva de serina, se optó por aumentar la dilución de la muestra en relación con la original (en el tiempo 0) para asegurar que los resultados se mantuvieran dentro del rango adecuado.

El blanco se determinó utilizando agua en lugar de muestra o estándar, con la misma adición de reactivo OPA. La curva de calibración, construida a partir de estos estándares, permitió obtener una ecuación lineal que relaciona la absorbancia con la concentración de grupos α -amino libres. A partir de esta ecuación y de las absorbancias obtenidas en las muestras de hidrólisis, se determinaron las concentraciones de los grupos α -amino liberados durante el proceso.

La concentración de grupos α -amino libres en determinado tiempo de la reacción ($C_{(t)}$) se calculó como la diferencia entre la concentración de grupos alfa amino libres presentes en ese tiempo t y la concentración presente en el $t=0$, como se muestra en la Ecuación 12:

$$C_{(t)}[mM] = C_{\alpha \text{ amino libres},t}[mM] - C_{\alpha \text{ amino libres},t=0}[mM] \quad (12)$$

La concentración de grupos alfa amino libres en cada tiempo ($C_{\alpha \text{ amino libres},t}$) considera tanto la dilución realizada al preparar la muestra como la dilución adicional provocada por la adición de TCA al 10% (v/v) durante la fase de hidrólisis enzimática, utilizada para inactivar las enzimas, como se indica en la Ecuación 13:

$$C_{\alpha \text{ amino libres},t}[mM] = C_{\alpha \text{ amino libres},medición \text{ OPA}}[mM] \cdot Dilución_{muestra} \cdot Dilución_{TCA} \quad (13)$$

4.3.6. Grado de Hidrólisis

Como anteriormente se menciona en la sección de “*Antecedentes Generales*”, el grado de hidrólisis se define por la Ecuación 1. Para determinar el h_{tot} , este se estima en función del porcentaje de proteína presente en la piel de pollo en su estado original (donde P: proteína, E: extracto de piel de pollo y N: nitrógeno):

$$h_{tot} \left[\frac{mmol}{g_P} \right] = \frac{moles \text{ N por } g_E \left[\frac{mmol}{g_E} \right]}{Proteína \frac{[\%]}{100}} \quad (14)$$

$$moles \text{ N por } g_{ext.} = \frac{N \left[\frac{g_N}{g_E} \right]}{PM(N) \left[\frac{g_N}{mol} \right]} \cdot 1000 \left[\frac{mmol}{g_E} \right] \quad (15)$$

La cantidad de nitrógeno se calcula a partir del 1,40% de proteína obtenido previamente:

$$N = \frac{Proteína \frac{[\%]}{100}}{Factor \text{ de conversión}} = \frac{0,014 \left[\frac{g_P}{g_E} \right]}{6,25 \left[\frac{g_P}{g_N} \right]} = 0,00224 \left[\frac{g_N}{g_E} \right] \quad (16)$$

Finalmente, el valor de los enlaces peptídicos totales por gramo de proteína (h_{tot}) es de 11,42 [mmol/g_P].

Para evaluar la hidrólisis mediante el método OPA, se realizó un seguimiento de la reacción hasta las 4 horas (240 minutos) para obtener la curva de hidrólisis, realizando esta metodología en duplicado con los mismos tiempos en la toma de muestras. A partir de estos datos, el valor de “h” puede calcularse en cualquier tiempo de reacción utilizando la siguiente Ecuación 17:

$$h = \frac{C_{(t)}[mM]/1000}{(Proteína \text{ } [\%]/100) * \rho_{Extracto} [g/mL]} \quad (17)$$

Donde ρ_E es la densidad del hidrolizado de piel de pollo.

4.3.7. Liofilización

El liofilizador utilizado en este estudio es el modelo Alpha 2-4 LSCplus. Durante el proceso, las muestras se colocarán en una de las bandejas dentro de la cámara de liofilización, la cual operará bajo las condiciones específicas establecidas para el procedimiento. En la fase de liofilización,

el condensador se encargará de condensar los vapores generados por la sublimación del agua contenida en el producto (etapa de secado primario), antes de que estos sean conducidos al sistema de bomba de vacío. Por último, la bomba de vacío generará la presión necesaria para garantizar el correcto desarrollo del proceso de liofilización.

Para la liofilización, se distribuyeron 138 g de hidrolizado en tres placas de Petri de 90 mm de diámetro, ubicadas dentro de una bandeja del liofilizador de 200 mm de diámetro. La disposición de las placas se realizó de manera que se cubriera la mayor superficie posible de la bandeja, favoreciendo la transferencia de calor y materia durante el proceso de secado. Esta configuración permitió una distribución homogénea del hidrolizado, mejorando la eficiencia de la liofilización.

Previo a la liofilización, las muestras fueron inicialmente congeladas en un congelador convencional a -18°C . Posteriormente, una hora antes del inicio del proceso de liofilización, se trasladaron a un congelador de ultra baja temperatura (-85°C) marca *Haier Biomedical*, con el objetivo de asegurar una congelación más completa y homogénea del material, condición fundamental para favorecer la sublimación durante la etapa de secado primario.

Una vez finalizado el proceso de liofilización, las muestras secas fueron inmediatamente envasadas en bolsas tipo *Mylar* de aluminio, selladas al vacío de forma manual, con el fin de protegerlas de la humedad, la luz y el oxígeno. Posteriormente, se almacenaron en un lugar seco y a temperatura ambiente hasta su uso.

El control del liofilizador se realiza mediante el software SCADA LPCplus, el cual permite programar y monitorear de manera automática los parámetros operativos, tales como la temperatura de las bandejas, la presión en la cámara y el tiempo del proceso. Para llevar a cabo las pruebas de liofilización, se estudiaron tres temperaturas de bandeja: 30, 40 y 50°C , bajo una presión de 0,3 mbar.

4.3.7.1. Determinación fin del secado primario

El fin del secado primario será determinado mediante la aplicación del método Prueba de aumento de presión o PIT (*“Pressure Increase Test”*), el cual consiste en cerrar temporalmente la válvula que conecta la cámara de secado con el condensador durante 30 segundos y en intervalos de 10 minutos, con el objetivo de observar el comportamiento de la presión dentro de la cámara.

Se considerará que el secado primario ha finalizado cuando, tras la aplicación del PIT, la presión no aumente de manera continua ni significativa, observándose una disminución gradual y luego manteniéndose estable, lo que indica que ya no se está generando vapor de agua a partir de la sublimación del hielo.

Este criterio será complementado con el Análisis del perfil de temperatura del producto, considerando que durante la sublimación el material mantiene una temperatura constante debido al consumo de calor latente. Así, una vez que la sublimación finaliza, se espera observar un leve aumento en la temperatura del producto, lo cual será interpretado como un criterio adicional

para verificar el término del secado primario. La combinación de ambos criterios tiene el propósito de una verificación más precisa y segura de esta etapa del proceso.

4.3.7.2. Medición de humedad

La medición de la humedad tiene como objetivo la obtención de la humedad al finalizar la etapa de secado primario en la liofilización. Para la determinación del porcentaje de humedad, se rotularon placas de Petri y se realizó el análisis por duplicado. Primero, se pesó la base seca de cada placa de Petri sin tapa y se registró su masa (m_1). Luego, se pesaron 0,100 g de muestra liofilizada (m_2) sobre la placa utilizando una espátula. Las placas, semi destapadas, se colocaron en una estufa de vacío a 105°C por 2 horas. Finalizado el tiempo, se apagó la estufa, se retiró el vacío, y las placas se taparon y trasladaron a un desecador hasta enfriar a temperatura ambiente (30–45 minutos). Posteriormente, se pesó nuevamente cada placa con la muestra seca y se registró el valor (m_3) (Flores *et al.*, 2021). El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de peso, según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{m_2 - (m_3 - m_1)}{m_2} \right) \cdot 100 \quad (18)$$

Donde:

m_1 : masa de la placa de Petri vacía (g)

m_2 : masa de la muestra liofilizada (g)

m_3 : masa de la placa con la muestra seca (g)

4.3.7.3. Rehidratación

Con el objetivo de comparar de forma equitativa los hidrolizados líquidos originales y las muestras posteriormente liofilizadas, estas últimas fueron rehidratadas ajustando la concentración de sólidos al mismo nivel que presentaban antes de la liofilización (16,45% m/v).

Este procedimiento se sustenta en metodologías previas aplicadas a matrices biológicas liofilizadas. Por ejemplo, en el estudio de Castro-Albarrán *et al.* (2017) reconstituyeron leche humana materna liofilizada mediante la adición de agua en proporción al contenido original de humedad, lo que restablece el estado previo de la leche al proceso de secado. Este procedimiento permitió asegurar la comparabilidad entre la muestra líquida original y la muestra rehidratada para posteriores análisis de propiedades bioactivas.

Procedimiento:

1. Se pesó la cantidad de liofilizado correspondiente al contenido de sólidos presente en 1 mL del hidrolizado líquido original (164,5 mg).
2. Se disolvió esta masa en agua destilada hasta completar un volumen final de 1 mL.
3. La mezcla se agitó suavemente (vórtex, 30 segundos) y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente, asegurando la completa reconstitución sin desnaturalizar los péptidos.

4.3.8. Determinación Actividad Antioxidante (%AA)

4.3.8.1. Método DPPH

Para la determinación de la capacidad antioxidante se emplea un método basado en la captura de radicales libres. La actividad antioxidante se evalúa mediante una reacción de captura de radicales libres utilizando 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), un reactivo que presenta un color violeta que se vuelve incoloro cuando es reducido por el efecto de un compuesto antioxidante. El DPPH en su forma oxidada presenta un color morado intenso, que se va desvaneciendo hacia un color amarillo conforme se reduce en presencia de antioxidantes (ver Figura 6).

El efecto de captura del radical DPPH se cuantifica mediante la relación entre las absorbancias, utilizando la siguiente ecuación (Nuñez *et al.*, 2023):

$$\text{Efecto de captura (\%)} = \left[\frac{\text{Abs control} - (\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco})}{\text{Abs control}} \right] \cdot 100 \quad (19)$$

Donde:

- Abs muestra: es la absorbancia de los hidrolizados de piel de pollo con DPPH
- Abs control: es la absorbancia del DPPH sin los hidrolizados,
- Abs blanco: es la absorbancia de los hidrolizados de piel de pollo sin DPPH.

Para la preparación de la solución de DPPH, se disolvió en etanol de grado analítico (99%) a una concentración de 30 mg/L. Para cada muestra, se cargaron 140 µL de muestra y 1,4 mL de la solución de DPPH en tubos Eppendorf, los cuales se cubrieron con papel de aluminio para evitar la exposición a la luz, y se agitaron en un agitador orbital durante 1 hora a temperatura ambiente (25°C).

El control se preparó una sola vez por tanda de análisis durante el día, mezclando 140 µL de agua destilada con 1,4 mL de la solución de DPPH, y se sometió a las mismas condiciones de agitación. Por su parte, los blancos se elaboraron mezclando 140 µL de muestra con 1,4 mL de agua destilada. Finalmente, la absorbancia de todas las muestras fue medida a 520 nm en un espectrofotómetro.

Cabe destacar que las absorbancias medidas deben dar mayores a 0,1 y la absorbancia del control debe dar entre 0,7-0,9.

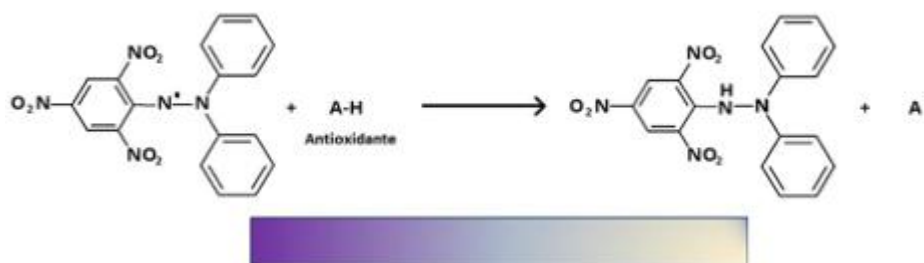


Figura 6. Reacción del ensayo de DPPH (Vázquez Matías, 2024)

4.3.8.2. Método ABTS⁺

El método ABTS⁺ es ampliamente utilizado por su sensibilidad y reproducibilidad para evaluar la capacidad antioxidante de las diferentes muestras mediante la medición de la reducción del ion ABTS⁺ en presencia de un antioxidante. Este ion se genera a partir de la oxidación del ABTS con persulfato de potasio, adquiriendo un color azul verdoso característico. En esta reacción, el ABTS y el persulfato de potasio reaccionan estequiométricamente en una proporción 1:0,5, lo que resulta en una oxidación parcial y controlada del ABTS, generando ABTS⁺ en equilibrio. A medida que el ABTS⁺ es reducido por compuestos antioxidantes, su color se desvanece progresivamente hasta volverse casi incoloro (ver Figura 6). Esta variación de color permite calcular el efecto de captura del radical ABTS⁺ por parte de los antioxidantes presentes en la muestra, utilizando la Ecuación 20 (Nuñez *et al.*, 2023):

$$\% \text{ Captura del radical libre} = \frac{(A_o - A_m)}{A_o} \cdot 100 \quad (20)$$

Donde

- A_m es la absorbancia de la muestra evaluada
- A_o es la absorbancia del blanco.

Para preparar la solución de ABTS⁺ (López do Campo, 2017), se disuelven 7 mM de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) y 2,45 mM de persulfato de potasio en agua destilada. Ambas soluciones se mezclan en una proporción 1:1 (v/v) y se dejan reposar a temperatura ambiente, protegidas de la luz, durante 12 a 16 horas. La solución obtenida es estable durante un máximo de 2 días a temperatura ambiente.

Posteriormente, se diluye la solución resultante (ABTS + Persulfato de potasio) con etanol 99,99% hasta alcanzar una absorbancia de aproximadamente 0,7 a 734 nm, utilizando un factor de dilución de 50.

Para la medición de la actividad antioxidante, se añaden 15 µL de la muestra a evaluar a 1,5 mL de la solución de ABTS⁺ diluida. La mezcla se agita durante 6 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se mide a 734 nm utilizando un espectrofotómetro.

El control (blanco A_o) se prepara sustituyendo la muestra por 15 µL de etanol 99,99% y manteniendo los 1,5 mL de ABTS⁺ diluido previamente.

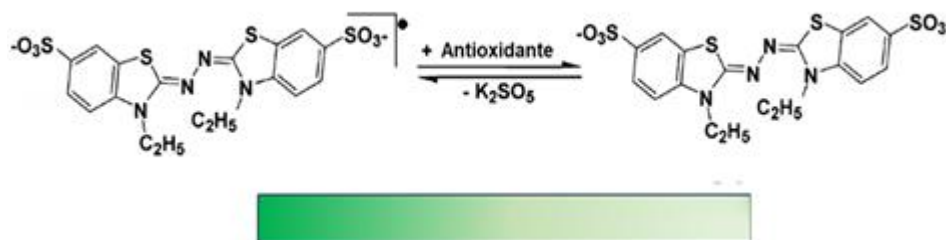


Figura 7. Reacción del ensayo de ABTS⁺ (Vázquez Matías, 2024)

4.3.9. Análisis estadístico: ANOVA LSD Fisher

Los resultados se presentan como el valor medio $\pm$ desviación estándar de tres réplicas, cuyo análisis estadístico se realizó mediante el software *InfoStat*. Para evaluar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó un Análisis de Varianza (ANOVA). Este análisis permite establecer si, en general, las medias de los grupos comparados presentan variaciones que se atribuyen al tratamiento y no al azar, a través del cálculo de un valor estadístico F y su respectivo valor de significancia (p -valor). Se consideró un nivel de significancia del 95%, correspondiente a $\alpha = 0,05$.

Una vez comprobada la significancia del modelo ($p < 0,05$), se procedió a realizar una prueba de comparaciones múltiples de Fisher (LSD; *Least Significant Difference*), el cual permite comparar pares de medias con el objetivo de identificar específicamente cuáles tratamientos presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí. Este método calcula una Diferencia Mínima Significativa (DMS) que funciona como umbral para establecer la significancia entre pares de tratamientos. Si la diferencia entre dos medias es mayor a la DMS calculada, se considera que estas difieren significativamente.

En los resultados generados por *InfoStat*, las medias de los tratamientos se presentan con letras asignadas automáticamente por el programa. Tratamientos que comparten una misma letra no presentan diferencias significativas, mientras que aquellos con letras distintas son considerados significativamente diferentes ($p < 0,05$). Además, el programa reporta el valor del error estándar (E.E.), el error cuadrático medio (CM error) del ANOVA, el valor de la DMS y el coeficiente de variación (CV), lo que permite interpretar con mayor detalle los resultados obtenidos (Di Rienzo *et al.*, 2008).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Extracción de colágeno

Para la extracción de colágeno, se realizaron tres extracciones térmicas utilizando piel de pollo y agua destilada en proporciones 1:1. Al término de cada extracción, se separaron las fracciones principales: el extracto acuoso, grasa (aceite), residuo sólido (cuero) y la pérdida de agua. En la Tabla 3 se presentan las masas correspondientes a cada fracción, respecto a la masa inicial utilizada, y el rendimiento del extracto calculado en función de la masa inicial de piel de pollo (1.500 g).

Tabla 3. Composición y rendimiento de la extracción de colágeno

Extracto acuoso (g)	Grasa (g)	Sólido residual (g)	Pérdida de agua (g)	Rendimiento extracto (%)
1.617 $\pm$ 89	581 $\pm$ 79	617 $\pm$ 25	184 $\pm$ 73	108 $\pm$ 6

El rendimiento del extracto acuoso tuvo un valor promedio de 108%, este comportamiento se explica por la liberación de agua contenida naturalmente en los tejidos de la piel de pollo durante

su cocción, además de la disolución de compuestos solubles de la piel de pollo en el medio acuoso. Estos resultados sugieren que este método resultó ser efectivo para la extracción de colágeno, bajo condiciones controladas de tiempo y presión, y monitoreo de la temperatura. Se obtiene una gran fracción de grasa, la cual se separó mediante decantación. Por otra parte, la pérdida de agua calculada en cada extracción es atribuible principalmente a las pérdidas por evaporación inherentes a la cocción.

Durante el proceso de extracción, se realizó el monitoreo de la temperatura interna de la olla a presión en dos de las tres extracciones realizadas. A continuación, se presentan los perfiles de temperatura en función del tiempo en la Figura 6 y 7:

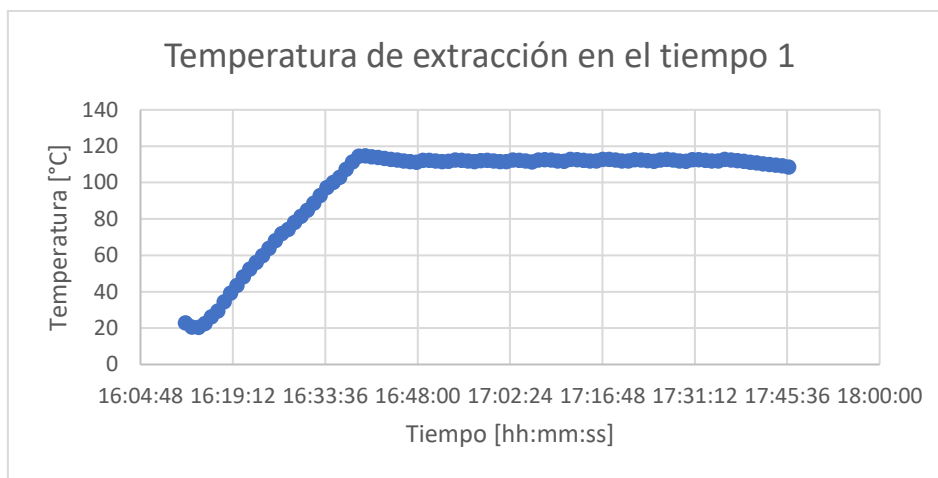


Figura 8. Perfil de temperatura primera extracción.

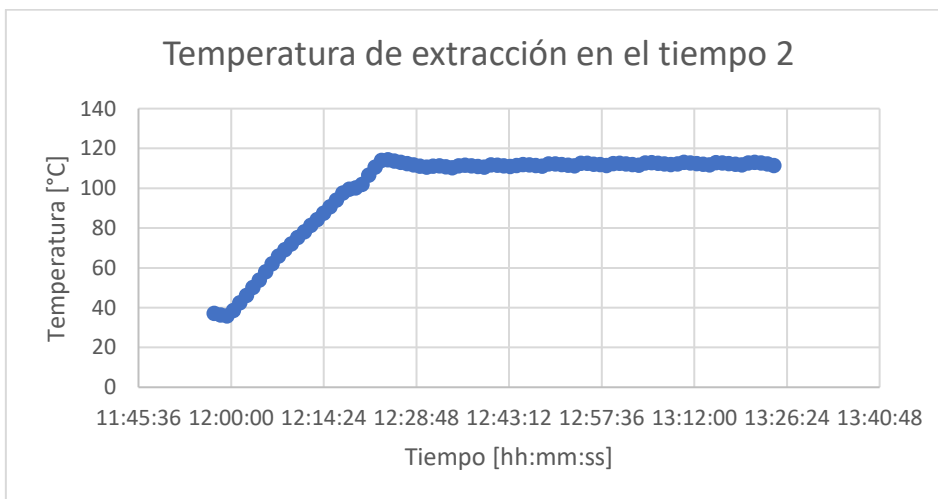


Figura 9. Perfil de temperatura segunda extracción

En ambas extracciones, la temperatura máxima registrada fue de 114,63°C y 114,46°C, respectivamente, con un promedio de 114,29°C. Esta temperatura máxima se mantuvo estable bajo las mismas condiciones de presión y tiempo de cocción. No se registró el perfil de

temperatura para la tercera extracción, sin embargo, se asumió un comportamiento térmico similar considerando la consistencia observada bajo las mismas condiciones.

5.2. Hidrólisis Enzimática

5.2.1. Curva de Concentración de Grupos α -amino libres en el tiempo y Grado de Hidrólisis

Se realizó la curva de concentración de grupos α -amino libres en el tiempo (4 horas) en duplicado, determinada mediante el método OPA a lo largo del tiempo. Con el objetivo de seleccionar dos grados de hidrólisis cercanos al 5% y 10%, se identificaron, en ambos duplicados (ver Tablas 8 y 9 del “**Anexo D**”), los tiempos correspondientes más cercanos a dichos valores, los cuales fueron 7 y 120 minutos, respectivamente.

Para estimar la concentración teórica promedio de grupos α -amino libres durante la hidrólisis, se aplicó un modelo cinético no lineal del tipo logarítmico, descrito por la siguiente ecuación (Valencia *et al.*, 2019):

$$P = \frac{1}{b} \ln(abt + 1) \quad (21)$$

La Ec. 21 representa la concentración de producto (P) como función del tiempo (t) durante la hidrólisis enzimática. Este modelo describe adecuadamente la cinética de la hidrólisis proteica, mostrando un rápido incremento inicial en la concentración de producto seguido de una estabilización conforme avanza el proceso. No obstante, los parámetros cinéticos “ a ” y “ b ” consisten en un grupo de constantes cinéticas que dependen de los mecanismos cinéticos postulados para la reacción. Estas constantes fueron ajustadas mediante la herramienta *Solver* de Excel, minimizando la suma de errores cuadráticos entre los valores experimentales y teóricos. A continuación, en la Figura 10 se muestra el ajuste en la curva de concentración de grupos α -amino libres en el tiempo:

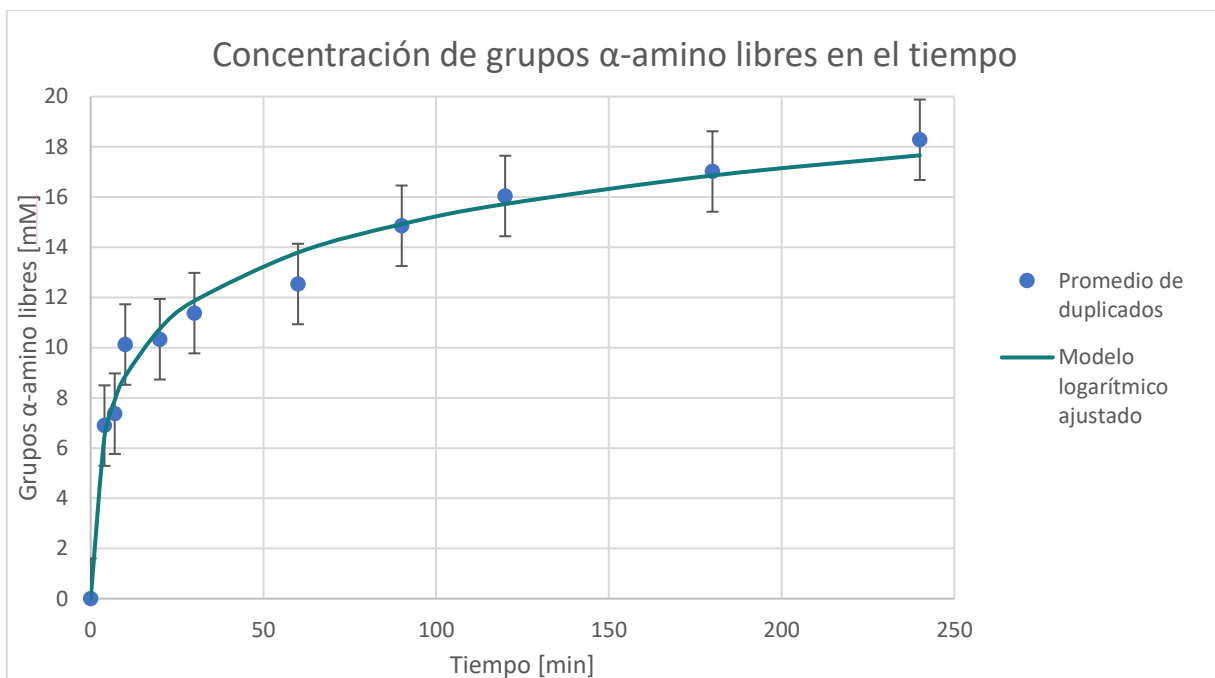


Figura 10. Concentración grupos α -amino libres ajustado al modelo logarítmico

Esta modelación permitió suavizar la variabilidad entre duplicados y obtener una concentración promedio más precisa, utilizada posteriormente para el cálculo de los valores de “h” y, en consecuencia, del Grado de Hidrólisis. De este modo, a los 7 minutos de hidrólisis se alcanzó un GH de 4,97%, mientras que a los 120 minutos se obtuvo un GH de 9,87%, como se puede observar en la siguiente Tabla 4:

Tabla 4. Cálculo del número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) y grado de hidrólisis (GH) a partir de la concentración teórica ajustada mediante regresión logarítmica no lineal.

Tiempo [min]	Conc. Prom. Experimental [mM]	Conc. Prom. Ajustado al modelo [mM]	h [mmol/g]	GH [%]
0	0	0	0	0
4	6,894 $\pm$ 0,72	6,462	0,46	4,06
7	7,368 $\pm$ 1,04	7,909	0,57	4,97
10	10,123 $\pm$ 0,36	8,859	0,64	5,56
20	10,333 $\pm$ 0,39	10,744	0,77	6,75
30	11,375 $\pm$ 0,72	11,861	0,85	7,45
60	12,534 $\pm$ 0,43	13,786	0,99	8,66
90	14,854 $\pm$ 0,75	14,917	1,07	9,37
120	16,040 $\pm$ 0,82	15,721	1,13	9,87
180	17,015 $\pm$ 0,75	16,855	1,21	10,58
240	18,281 $\pm$ 0,80	17,660	1,27	11,09

Se realizó el proceso de hidrólisis en esos dos tiempos, calculando el Grado de Hidrólisis en triplicado, cuyos resultados confirman la consistencia del procedimiento, respaldando su replicabilidad:

Tabla 5. Datos experimentales en triplicado con la concentración de grupos α -amino libres en el tiempo [mM] y grado de hidrólisis [%] para corroborar tiempo escogido para las hidrólisis enzimática

Tiempo [min]	h [mmol/g]	GH [%]
0	0	0
7	$0,45 \pm 0,08$	$4,68 \pm 0,66$
120	$1,14 \pm 0,06$	$9,97 \pm 0,54$

5.3. Liofilización

5.3.1. Determinación Tiempo de Secado Primario

Para cada combinación de grado de hidrólisis y temperatura de bandeja, se obtuvieron los respectivos gráficos generados por el liofilizador, los cuales se presentan a continuación. Para facilitar la identificación de cada experimento, se les asignó de a siguiente manera:

Tabla 6. Asignación de código para cada combinación de tratamientos

Grado de hidrólisis [%]	Temperatura de bandeja [°C]	Código Experimento
0	30	GH1-30
0	40	GH1-40
0	50	GH1-50
~5	30	GH2-30
~5	40	GH2-40
~5	50	GH2-50
~10	30	GH3-30
~10	40	GH3-40
~10	50	GH3-50

Cada condición experimental fue realizada en triplicado, registrándose parámetros como la temperatura de la bandeja, la temperatura del producto y la medición comparativa de la presión con medidores sensibles al vapor (Pirani y Capacitivo). Además, se aplicó al menos una vez por combinación la prueba de incremento de presión, el cual permite estimar el término del secado

primario. Esta prueba fue clave para evaluar el momento en que la muestra dejaba de contener agua libre, lo que se interpreta al observar la estabilización en el comportamiento de la prueba.

A continuación, se presentan los gráficos en triplicado con los registros de temperatura y presión en el tiempo, para la combinación de GH1-30. Los resultados obtenidos para las demás combinaciones pueden revisarse en el “Anexo E”.

Experimento GH1-30:

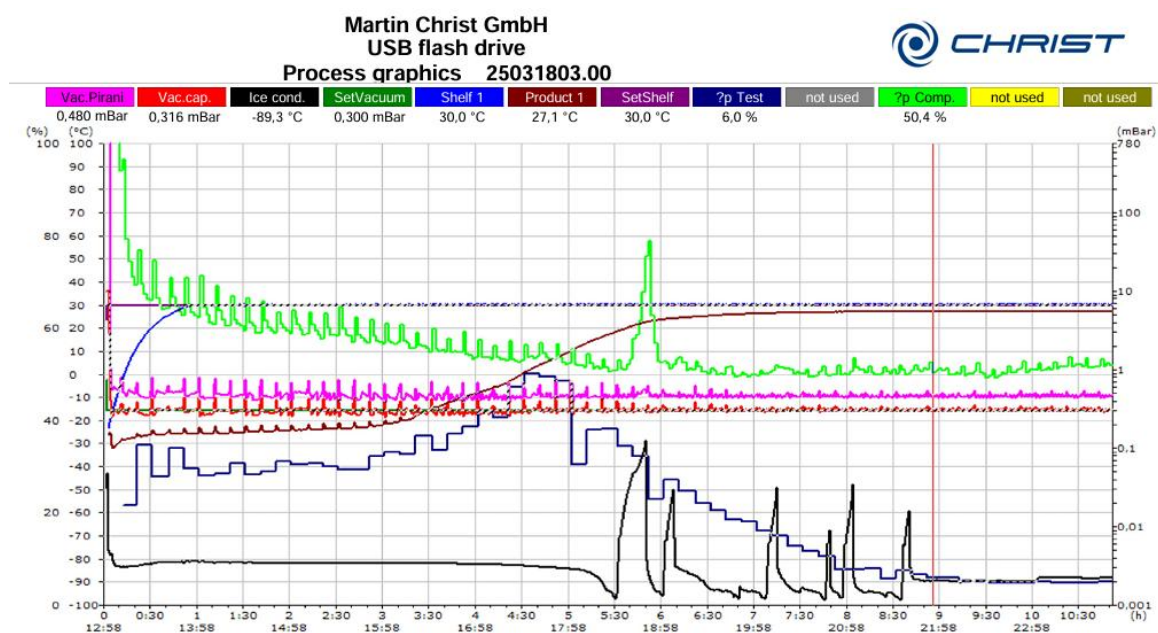


Figura 11. Liofilización de la muestra GH1-30 (Triplicado 1)

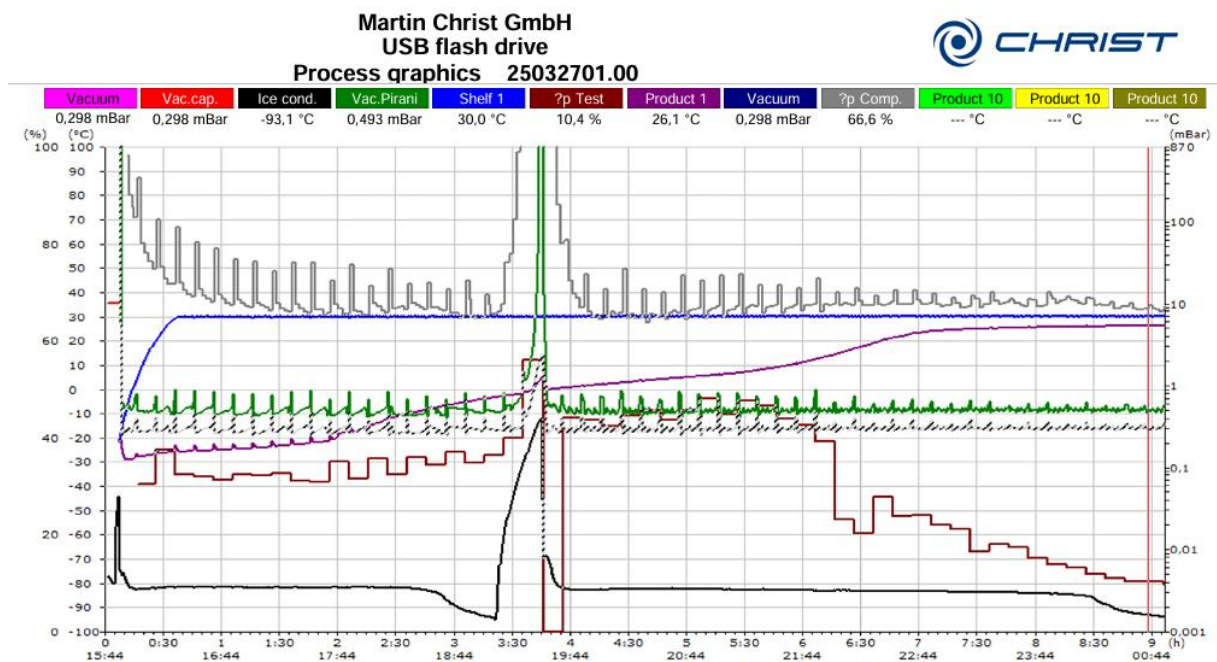


Figura 12. Liofilización de la muestra GH1-30 (Triplicado 2)

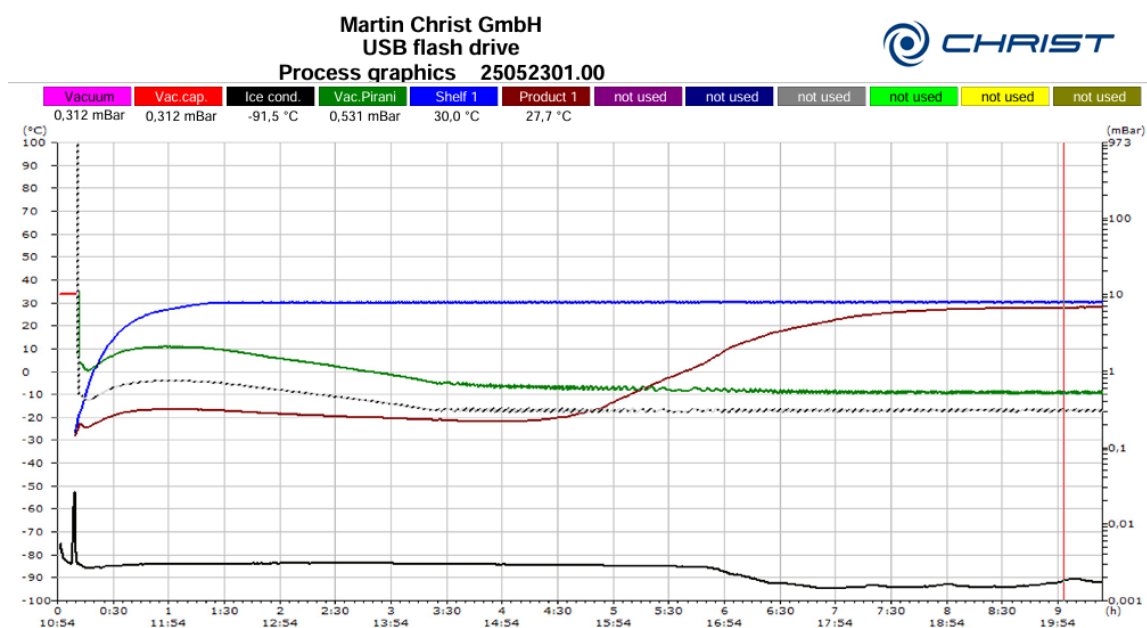


Figura 13. Liofilización de la muestra GH1-30 (Triplicado 3)

En esta condición, el secado primario se consideró finalizado tras aproximadamente 9:00 horas del proceso, momento en el cual la curva de presión se mantuvo constante, sin variaciones significativas.

Análisis general del tiempo de secado primario

Los resultados obtenidos muestran que, en todas las condiciones evaluadas, el aumento de la temperatura de bandeja del liofilizador se relacionó con una disminución en el tiempo de finalización del secado primario. Esta tendencia se presentó de forma consistente en las tres condiciones evaluadas de grado de hidrólisis (GH1, GH2 y GH3), lo que confirma la influencia directa de la temperatura sobre la velocidad del proceso de sublimación.

Además, se evidenció que el grado de hidrólisis también tuvo un efecto sobre la duración del secado primario. Para una misma temperatura de bandeja, las muestras sin hidrolizar (GH1) requirieron tiempos ligeramente mayores de secado primario en comparación con GH2 y GH3, lo cual puede estar asociado a diferencias en la estructura del material, que afectan su capacidad de retención de agua y su comportamiento durante el secado. A continuación, se presentan en la Tabla 7 los tiempos estimados anteriormente para cada condición, junto con el porcentaje de reducción del tiempo de secado primario, utilizando como referencia base la condición de temperatura de bandeja de 30°C para cada grado de hidrólisis. Para las combinaciones en las que el fin del secado primario se registró en tiempos distintos entre réplicas, se calculó un promedio de los tiempos obtenidos. Esto permitió representar de manera consistente la duración del secado primario para cada combinación experimental.

Tabla 7. Tiempos de secado primario y su reducción porcentual de tiempo respecto a la condición base de 30°C

Condición	Tiempo [h]	Reducción de tiempo [%]
GH1-30	9	-
GH1-40	6,5	27,8%
GH1-50	6,13	31,9%
GH2-30	8,25	-
GH2-40	7,13	13,6%
GH2-50	5,88	28,7%
GH3-30	8	-
GH3-40	6,67	16,6%
GH3-50	5,92	26%

A partir de estos resultados, GH1 presentó la mayor reducción de tiempo de secado primario (hasta 39,9 %), lo que indica una mayor respuesta al aumento de temperatura de bandeja. Se

observa que los tiempos de secado para 40 y 50°C, en los tres grados de hidrólisis, se mantuvieron en un rango estrecho; no obstante, se aprecia una tendencia a menores tiempos de secado a 50°C.

En algunos duplicados no fue posible aplicar la prueba de incremento de presión debido a una falla técnica en la válvula del equipo. No obstante, se observó que la temperatura del producto tendía a estabilizarse en los mismos rangos de tiempo determinados previamente mediante dicha prueba, lo que permitió respaldar las estimaciones de finalización del secado primario en esas muestras.

Cabe mencionar que, en algunas oportunidades, se detectaron comportamientos irregulares atribuibles a fallas puntuales del condensador del liofilizador. Aunque no fue posible identificar la causa exacta de estas irregularidades, esto podría haber dificultado parcialmente el avance del secado primario en ciertos duplicados. Sin embargo, su impacto fue limitado y no alteró significativamente las tendencias generales observadas en el comportamiento de cada condición.

5.3.2. Medición de la Humedad

Se determinó el contenido de humedad de las muestras liofilizadas realizando cuatro mediciones por condición experimental. Los resultados fueron promediados y se expresaron junto a su desviación estándar, los cuales se presentan en la Figura 14. Además, se aplicó un análisis estadístico de comparación de medias, cuyos resultados detallados, junto con las tablas individuales de mediciones de humedad, se incluyen en el “Anexo F”.

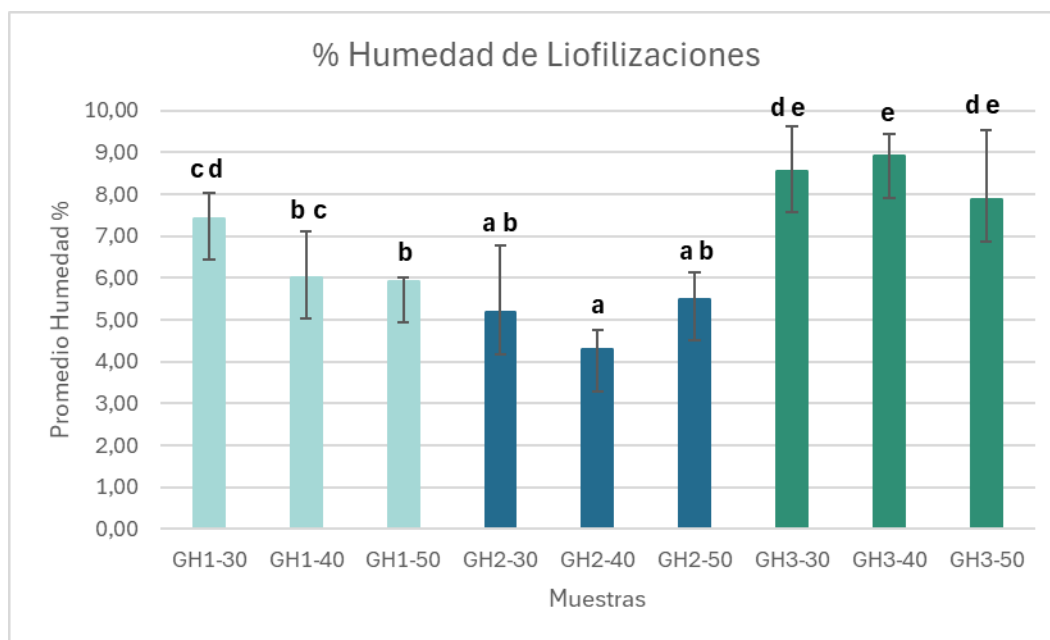


Figura 14. Humedad promedio de cada condición en las muestras liofilizadas

El análisis de varianza (ANOVA) evidenció diferencias significativas entre las condiciones evaluadas ($p < 0,0001$). Posteriormente, la prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) permitió agrupar las

medias según similitudes estadísticas: aquellas que comparten al menos una letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

Las muestras con menor contenido de humedad correspondieron principalmente a GH2-40 (4,30%) y GH2-30 (5,18%), ambas estadísticamente distintas de los valores más altos. Por otro lado, los valores más altos de humedad se observaron en las muestras GH3-40 (8,92%), GH3-30 (8,57%) y GH3-50 (7,86%), que se agruparon en los niveles superiores (“d” y “e”), mostrando una diferencia significativa respecto a la mayoría de las otras condiciones.

En términos generales, las muestras con mayor grado de hidrólisis (GH3) tendieron a presentar un mayor contenido de humedad, especialmente a temperaturas más bajas. Por el contrario, GH2 mostró los menores valores, sugiriendo que esta condición podría favorecer una mayor eficiencia en la remoción de agua durante la liofilización. Las muestras GH1 presentaron valores intermedios, con una tendencia a disminuir la humedad a medida que aumentaba la temperatura de bandeja.

5.4. Análisis Capacidad Antioxidante

Los péptidos obtenidos mediante hidrólisis enzimática (GH2 y GH3) con Alcalase presentaron una mayor actividad antioxidante, evaluada mediante los métodos DPPH y ABTS⁺, en comparación con la muestra sin hidrolizar (GH1). La actividad antioxidante aumentó progresivamente con el incremento del grado de hidrólisis, siendo mayor en GH3 que en GH2. En el caso de los hidrolizados sin liofilizar, evaluados mediante el método DPPH, el mayor porcentaje de actividad antioxidante (%AA) fue de 48,25 % para GH3, seguido de 44,54 % para GH2 y 27,33 % para GH1. Por otro lado, con el método ABTS⁺, la mayor actividad se observó en GH3 (61,13 %), seguida de GH2 (47,78 %) y GH1 (32,63 %). Estos resultados se pueden observar en las Figura 37 y 38, mientras que el detalle de los resultados y el análisis estadístico se encuentra en el “**Anexo G**”.

Este comportamiento ha sido ampliamente reportado en la literatura, donde se ha demostrado que el aumento del grado de hidrólisis promueve la formación de péptidos de menor peso molecular, favoreciendo su capacidad de neutralizar radicales libres (Onuh *et al.*, 2014).

Asimismo, se observó que los valores de %AA obtenidos mediante el método ABTS⁺ fueron mayores a los obtenidos por el método DPPH. Esta diferencia puede atribuirse a la mayor sensibilidad del radical ABTS⁺ para detectar péptidos hidrofílicos y de bajo peso molecular, ya que este radical puede disolverse tanto en medios acuosos como orgánicos. En cambio, el radical DPPH, de naturaleza más lipofílica y soluble solo en medios orgánicos, presenta menor afinidad por compuestos hidrosolubles como los péptidos generados por hidrólisis enzimática. Además, se ha reportado que DPPH puede presentar interferencias espectrales cuando se utiliza en soluciones con péptidos disueltos, lo que afecta la precisión de los resultados. Por esta razón, diversos estudios han concluido que ABTS⁺ es un método más confiable y sensible para evaluar la capacidad antioxidante de proteínas y péptidos hidrosolubles en solución acuosa (Aloğlu & Öner, 2011).

En el método DPPH se realizó la comparación de las muestras liofilizadas y no liofilizadas con el antioxidante ácido ascórbico (Vitamina C), todos evaluadas a la misma concentración fija de 16,45% (m/v). En este ensayo, los hidrolizados mostraron una actividad antioxidante elevada, aunque inferior a la del control positivo (vitamina C, 97,87%). Este resultado concuerda con lo reportado en la literatura, donde los péptidos bioactivos exhiben una capacidad antioxidante significativa, pero no alcanzan los valores de compuestos puros como el ácido ascórbico. No obstante, su nivel de actividad resulta relevante, considerando que pueden actuar de forma complementaria en matrices alimentarias.

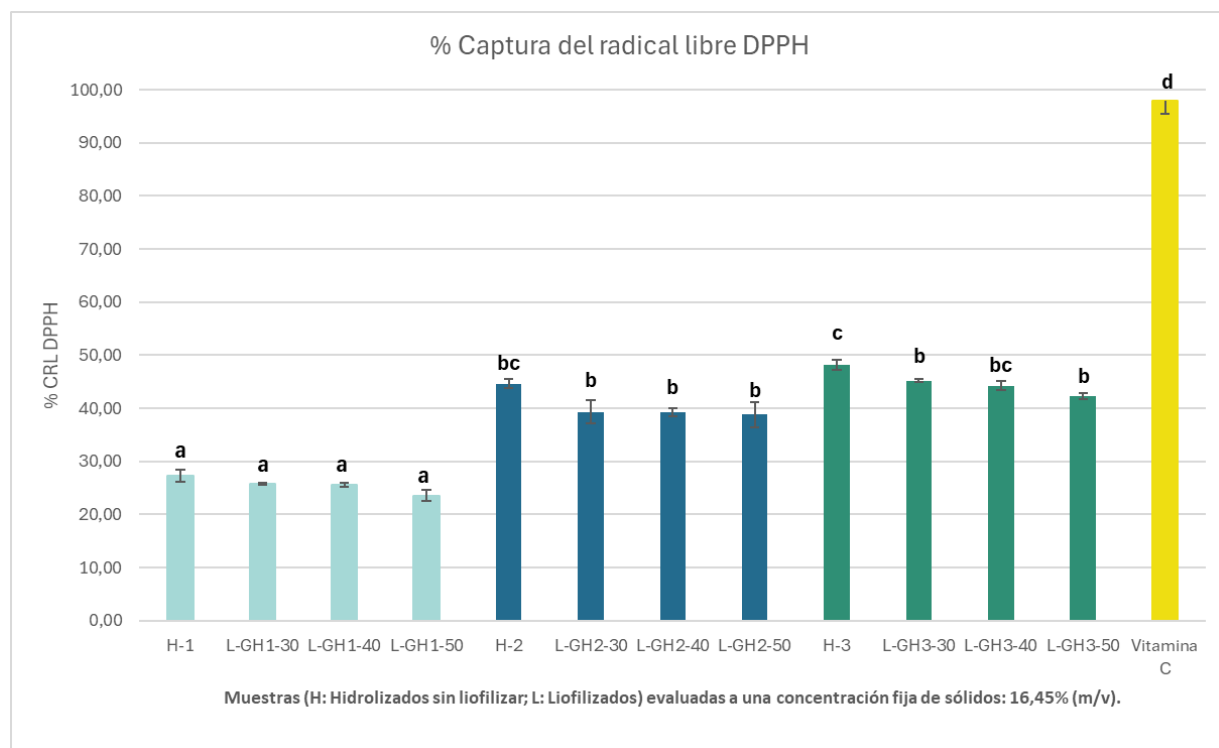


Figura 15. Actividad antioxidante de las muestras según el método DPPH

Según el análisis estadístico para los resultados del método DPPH, los hidrolizados con bajo grado de hidrólisis (GH1) no mostraron diferencias significativas, tanto en su forma líquida como liofilizada, ya que todas las muestras se agruparon en la letra “a”, lo que sugiere que la liofilización no afectó su actividad antioxidante. En el caso del grupo con grado de hidrólisis intermedio (GH2), todas las muestras, independientemente del tratamiento, compartieron la letra “b”, sin presencia de diferencias significativas. Esta consistencia estadística sugiere que en el grupo GH2 la actividad antioxidante de los péptidos se mantuvieron estables frente al proceso de liofilización.

Por otro lado, en el grupo de mayor grado de hidrólisis (GH3) no mostraron diferencias significativas respecto a GH2, ya que compartieron la misma letra “b” en la mayoría de los tratamientos. Además, los hidrolizados sin liofilizar (H-2 y H-3) de ambos grupos, no mostraron diferencias significativas, compartiendo letra “c” entre ambos. Esto implica que,

estadísticamente, GH3 no difiere de GH2 tras la liofilización. La vitamina C presenta diferencias significativas respecto a todas las combinaciones. Estos resultados en conjunto pueden indicar que el grupo GH2 podría considerarse, en todas sus combinaciones, la mejor elección en este ensayo, ya que mantiene su actividad antioxidante de forma estable, con o sin liofilizar, y sin presentar variaciones significativas frente al grupo con mayor hidrólisis.

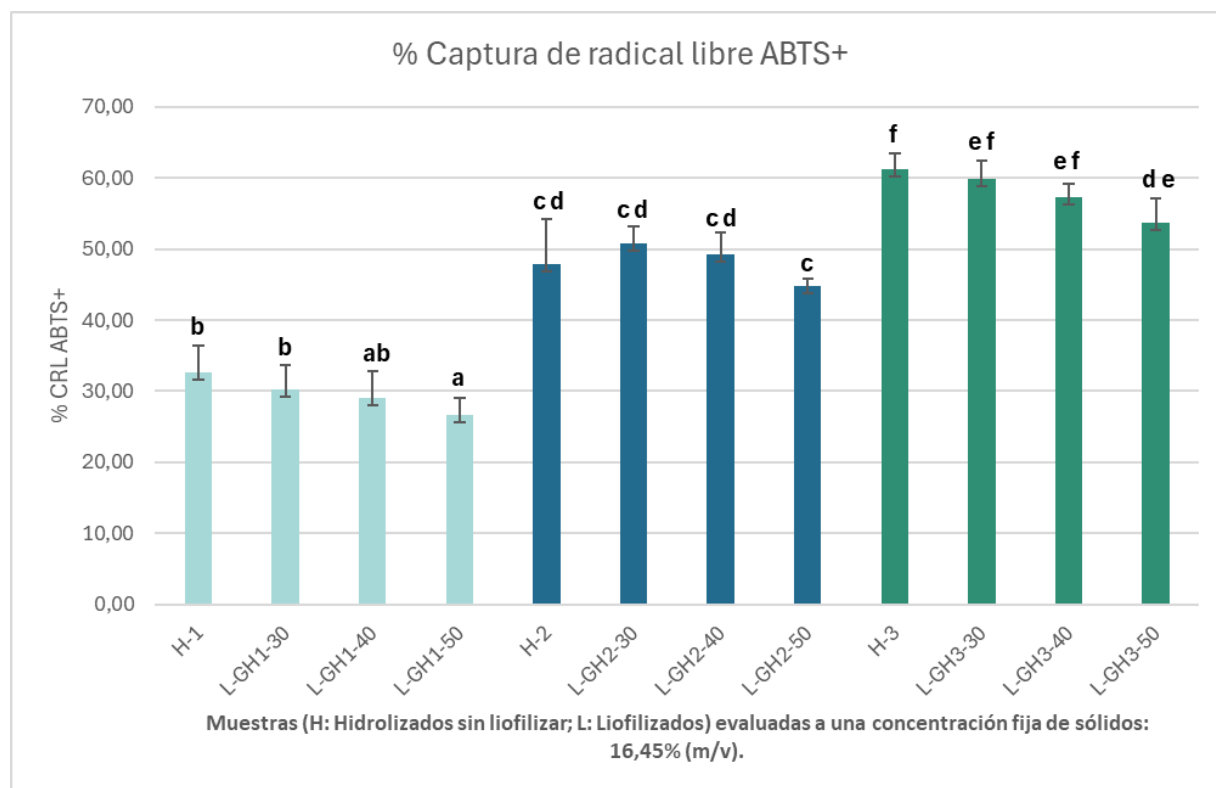


Figura 16. Actividad antioxidante de las muestras según el método ABTS⁺

Según el análisis estadístico para los resultados del método ABTS⁺, las muestras del grupo GH1 mostraron diferencias significativas entre sí, ya que algunas liofilizadas (40 y 50°C) se agruparon con letras distintas (“b”) al hidrolizado líquido (“a”). En GH2, no se detectaron diferencias significativas entre muestras líquidas y liofilizadas, ya que todas se agruparon consistentemente entre las letras “c” y “d”. Por otra parte, GH3 presentó una separación clara entre el hidrolizado líquido (letra “f”) y los tratamientos liofilizados, distribuidos entre “d” y “f”, evidenciando una mayor variabilidad dentro de este grupo. Este comportamiento indica que, en el método ABTS⁺, el grupo GH2 mostró una mayor estabilidad en su actividad antioxidante frente al proceso de liofilización, en comparación con las muestras de GH1 y GH3.

A nivel general, tanto en el método DPPH como en ABTS⁺, se observó una disminución de la actividad antioxidante (%AA) en los hidrolizados liofilizados, en comparación con las muestras sin liofilizar. Este resultado es consistente con lo reportado por Lee *et al.* (2024), quienes indican que, durante el proceso de liofilización, los productos proteicos pueden verse enfrentados a tensiones como la desnaturalización por frío y la oxidación debido a la concentración de solutos en el agua no congelada. Además, la pérdida de agua durante el secado puede desestabilizar las

proteínas, ya que el agua desempeña un papel clave en el mantenimiento de su estructura nativa, lo cual puede comprometer su estabilidad y funcionalidad. Aunque dicho estudio se enfoca en productos cárnicos enteros, los mecanismos descritos son extrapolables a sistemas como los hidrolizados proteicos, particularmente aquellos con péptidos de bajo peso molecular, como los generados en GH3, que son potencialmente más sensibles a condiciones de secado.

Paralelamente, durante la evaluación visual de las muestras liofilizadas, se observó un cambio de color en función del grado de hidrólisis, siendo más notorio en las muestras GH2 y especialmente GH3, mostraron tonalidades más oscuras en comparación con GH1, que mantuvo una tonalidad clara. Este oscurecimiento podría atribuirse a un pardeamiento no enzimático, posiblemente derivado de la reacción de Maillard, ya que los productos de hidrólisis enzimática contienen una mayor cantidad de grupos amino libres que pueden reaccionar con azúcares reductores durante el procesamiento. De hecho, Xiong *et al.* (2020) reportaron que, en hidrolizados de proteínas de hígado de pollo, el incremento del pardeamiento se correlacionó positivamente con la actividad antioxidante medida por DPPH, debido a la formación de compuestos con capacidad reductora. Sin embargo, en este estudio no se observó dicha correlación: las muestras más oscuras (GH3) no presentaron un mayor %AA, lo que sugiere que los compuestos responsables del color podrían no haber sido funcionales desde el punto de vista antioxidante. Esto refuerza la hipótesis de que, bajo ciertas condiciones, la liofilización puede afectar negativamente la bioactividad de los péptidos, incluso cuando se desarrollan reacciones visualmente asociadas a beneficios funcionales.

5.5. Relación entre el Tiempo total del proceso y Actividad antioxidante obtenida

En la Tabla 8 se presenta el tiempo requerido para cada etapa del proceso (extracción acuosa de colágeno, hidrólisis enzimática y liofilización) según el grado de hidrólisis (GH) y la temperatura de liofilización empleada. Asimismo, se muestra el porcentaje promedio de actividad antioxidante obtenida mediante los métodos DPPH y ABTS+. Esta información permite observar la relación entre el tiempo total requerido por cada combinación experimental y la actividad antioxidante obtenida, lo que facilita identificar condiciones que ofrecen una mayor capacidad antioxidante con un menor tiempo de procesamiento.

Tabla 8. Resumen del tiempo total del proceso y la actividad antioxidante asociada a cada grado de hidrólisis y temperatura de liofilización.

Grado de Hidrólisis	Tiempo de Hidrólisis [min]	Temperatura de Liofilización [°C]	Tiempo de Liofilización [h]	Tiempo (Extracción + Hidrólisis + Liofilización) [h]	Actividad Antioxidante Promedio DPPH [%]	Actividad Antioxidante Promedio ABTS+ [%]
---------------------	----------------------------	-----------------------------------	-----------------------------	--	--	---

1 [h] de Extracción acuosa de colágeno	GH1	0	0	0	1	27,33 ± 1,20	32,63 ± 3,69
			30	9	10	25,8 ± 0,24	30,15 ± 3,46
			40	6,5	7,5	25,63 ± 0,32	29,02 ± 3,86
			50	6,13	7,13	23,54 ± 1,06	26,7 ± 2,41
	GH2	7	0	0	1,12	44,65 ± 0,81	47,78 ± 6,48
			30	8,25	9,37	39,35 ± 2,17	50,72 ± 2,38
			40	7,13	8,25	39,33 ± 0,78	49,28 ± 3,02
			50	5,88	7	38,84 ± 2,41	44,79 ± 1,08
	GH3	120	0	0	3	48,25 ± 0,97	61,13 ± 2,38
			30	8	11	45,22 ± 0,32	59,9 ± 2,51
			40	6,67	9,67	44,23 ± 0,85	57,22 ± 2,01
			50	5,92	8,92	42,29 ± 0,56	53,66 ± 3,41

El tiempo total de proceso aumenta considerablemente con la liofilización, pasando de 1–3 h en muestras sin secado a más de 9 h cuando se emplean temperaturas de 30°C, sin que ello implique incrementos en la actividad antioxidante de los hidrolizados. Esto evidencia que, si bien la liofilización es necesaria para la obtención de un producto estable, temperaturas más bajas y grados de hidrólisis mayores ofrecen un mejor equilibrio entre la actividad antioxidante y el tiempo requerido para el procesamiento. A continuación, se presentan dos gráficos combinados de barras y líneas que representan los resultados de la Tabla 8 para los métodos DPPH y ABTS⁺, mostrando la relación entre la actividad antioxidante (%) y el tiempo total del proceso para cada grado de hidrólisis y temperatura de liofilización:

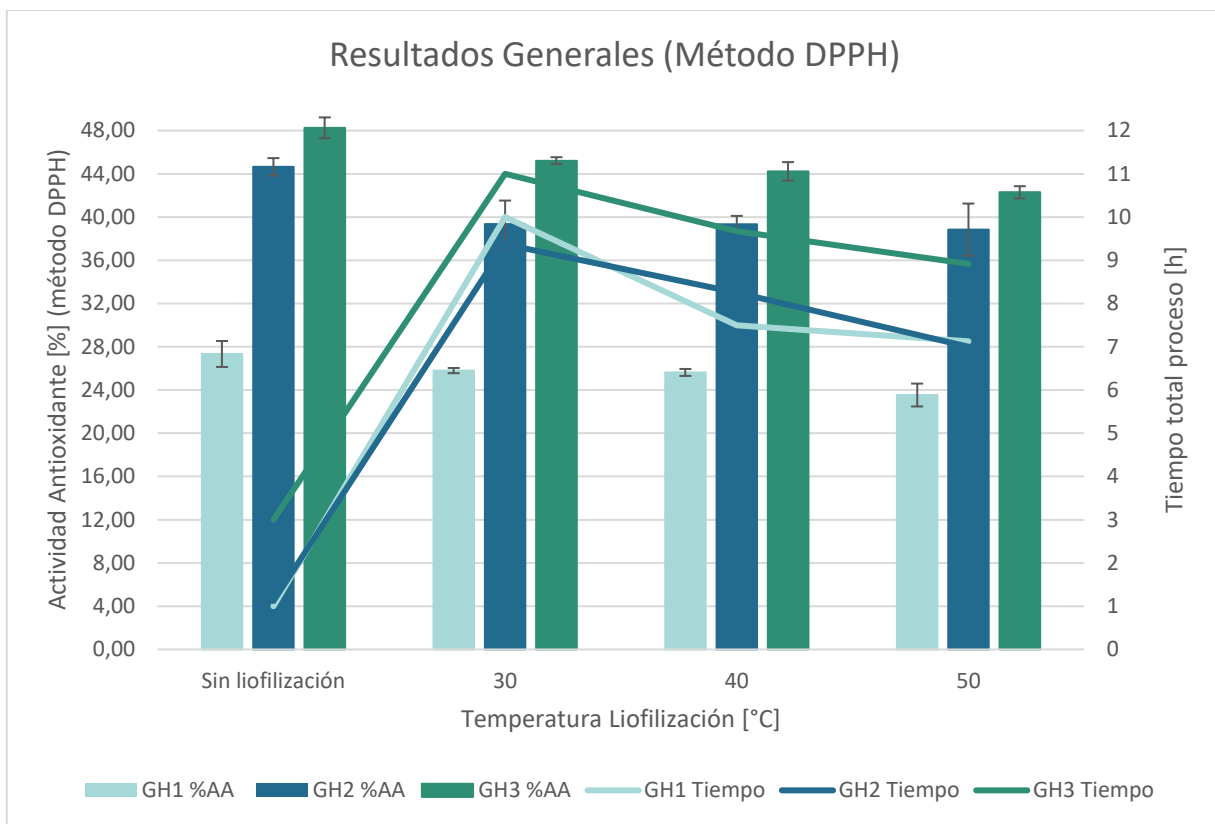


Figura 17. Resultados que relacionan GH, Temperatura de liofilización, tiempo del proceso y %AA por método DPPH

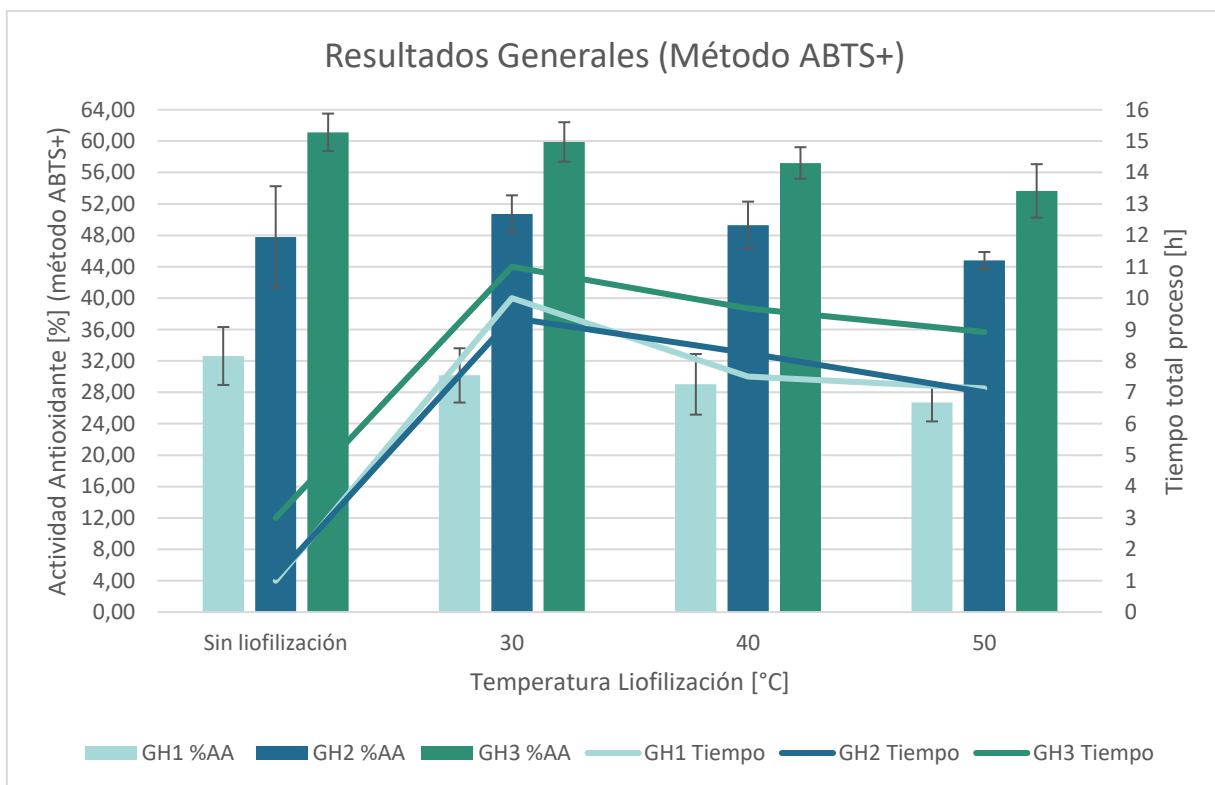


Figura 18. Resultados que relacionan GH, Temperatura de liofilización, tiempo del proceso y %AA por método ABTS+

Al analizar los hidrolizados liofilizados mediante los ensayos DPPH y ABTS⁺, se observa en las Figuras 17 y 18 que, en general, la temperatura de liofilización de 30°C genera los mayores porcentajes de actividad antioxidante para todas las combinaciones de GH. Sin embargo, esta condición también corresponde a los tiempos de proceso más largos, lo que limita su aplicabilidad práctica. Por ello, la comparación se centra en las condiciones de 40 y 50°C, donde los tiempos de secado son más manejables y no poseen diferencias significativas en los porcentajes de actividad antioxidante para las distintas combinaciones de GH. Por ello, el criterio de selección puede basarse en el tiempo total del proceso. Considerando este factor, GH2-50 se presenta como la combinación más favorable, ya que mantiene una actividad antioxidante elevada mientras minimiza la duración del secado.

CONCLUSIÓN

El presente estudio demostró la viabilidad de valorizar la piel de pollo, un subproducto avícola con alto contenido de colágeno, para la obtención de péptidos con capacidad antioxidante, a través de un proceso integral que incluyó extracción térmica, hidrólisis enzimática con Alcalase y liofilización bajo diferentes temperaturas de bandeja. Desde el inicio, la extracción de colágeno mediante cocción controlada (~114°C) mostró un rendimiento destacado del extracto acuoso (108%), con un contenido proteico del 1,40%, validando su potencial como materia prima para la generación de péptidos funcionales. La hidrólisis enzimática permitió generar tres niveles de ruptura peptídica: sin hidrólisis (GH1), intermedia (GH2: ~5%) y alta (GH3: ~10%), lo que facilitó el análisis del impacto del grado de hidrólisis sobre la capacidad antioxidante de los péptidos. Posteriormente, se aplicó liofilización a tres temperaturas de bandeja (30, 40 y 50°C), para estudiar cómo estos dos parámetros (GH y T) influían sobre la actividad antioxidante y la estabilidad del producto final.

Los resultados demostraron que el aumento del grado de hidrólisis se asoció con un incremento en la actividad antioxidante (%AA), medido mediante los métodos DPPH y ABTS⁺. Sin embargo, GH2 se destacó como la condición más robusta: mantuvo su capacidad antioxidante de forma más estable frente al proceso de liofilización y mostró menores diferencias significativas entre ambos tratamientos (con o sin liofilizar) especialmente en el método DPPH. A pesar de que GH3 presentó valores más altos de %AA respecto a GH2, estas muestras mostraron mayor variabilidad estadística y sensibilidad al secado primario, lo que sugiere una pérdida de estabilidad en los péptidos de bajo peso molecular generados a mayor GH.

En cuanto al proceso de liofilización, se observó una disminución progresiva del tiempo de secado al aumentar la temperatura de bandeja, siendo más marcada en GH1. En GH2, se registraron reducciones moderadas y estables (hasta 30,9 % a 50°C). Sin embargo, considerando la estabilidad y calidad del producto, una temperatura intermedia de 40°C representa un balance entre eficiencia en el secado y preservación de las propiedades funcionales. Respecto a la humedad final, todas las muestras lograron valores inferiores al 10 %, como se espera tras el secado primario; sin embargo, GH2 presentó los valores más bajos y homogéneos, siendo

estadísticamente distintos de los más altos observados en GH3, lo que refuerza su comportamiento estable durante el secado.

Adicionalmente, se observó un oscurecimiento mayor en muestras GH2 y, especialmente en GH3, probablemente por reacciones de pardeamiento no enzimático. Sin embargo, este cambio visual no se asoció directamente con un aumento en la actividad antioxidante. Por el contrario, hubo reducción de %AA tras la liofilización, lo que puede indicar que el secado comprometió la bioactividad de los péptidos, especialmente en los de mayor hidrólisis. Estos resultados confirman que la liofilización es una etapa clave para obtener hidrolizados estabilizados y aptos para su almacenamiento y transporte, ya que permite conservarlos en estado seco con baja humedad, aunque la temperatura de bandeja utilizada puede influir de manera directa tanto en la retención de la bioactividad como en el tiempo total del proceso. En particular, temperaturas más bajas preservan mejor la actividad antioxidante, pero prolongan significativamente la duración del secado, mientras que temperaturas más altas aceleran el proceso a costa de una mayor pérdida de funcionalidad.

En conjunto, los resultados demuestran que es posible obtener péptidos antioxidantes funcionales y estables a partir de la piel de pollo. Entre las combinaciones evaluadas, GH2-50 se destacó por ofrecer un balance favorable entre actividad antioxidante elevada y menor tiempo de secado, lo que la convierte en la alternativa más conveniente considerando el efecto sobre el producto final. La consideración simultánea de la actividad antioxidante y del tiempo total de procesamiento resulta clave para asegurar la calidad del producto. Estos hidrolizados presentan un gran potencial como ingredientes funcionales en alimentos, especialmente productos cárnicos enriquecidos, contribuyendo al manejo del estrés oxidativo y pudiendo reemplazar antioxidantes artificiales. Asimismo, se recomienda estudiar y ajustar las variables críticas de cada etapa del proceso, como el tiempo y la relación enzima/sustrato en la hidrólisis enzimática, así como presión, temperatura y duración en la liofilización, con el fin de maximizar el rendimiento de péptidos con propiedades antioxidantes, profundizar en su caracterización funcional y evaluar su aplicación en matrices cárnicas, como pechugas de pollo, fortaleciendo así su potencial industrial.

REFERENCIAS

- Aloğlu, H. Ş., & Öner, Z. (2011). Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *Journal of Dairy Science*, 5305-5314. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4285>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 127, 183-198. doi:10.1039/B009171P
- Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP*.

Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 23, 1-9.
doi:<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>

- Bhambere, D., Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., & Nirgude, P. S. (2015). LYOPHILIZATION / FREEZE DRYING – A REVIEW. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4 (8), 516-543.
- Castro-Albarrán, J., Navarro-Hernández, R. E., Solís-Pacheco, J. R., Salazar-Quñones, I. C., Macías-López, G. G., Barrera-De León, J. C., & Aguilar-Uscanga, B. R. (2017). Impacto de la pasteurización/lioofilización en el contenido disponible de inmunoglobulinas en leche humana madura. Estudio de aplicación en bancos de leche humana en hospitales. *Nutrición Hospitalaria*, 34(4), 802-809. doi:<https://dx.doi.org/10.20960/nh.627>
- Chile Carne. (s.f.). *Chile Carne. Exportadores de Carne de Chile*. Obtenido de <https://www.chilecarne.cl/la-industria-en-cifras/>
- ChileCarne. (2024). *Exportadores de Carne de Chile*. Obtenido de <https://www.chilecarne.cl/en/chilean-poultry-production-and-exports-bounce-back-during-the-first-half-of-2024/>
- Conning, D. M., & Phillips, J. C. (1986). Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. *Food and Chemical Toxicology*, 24(10-11), 1145-8. doi:10.1016/0278-6915(86)90300-5.
- Depaz, R. A., Pansare, S., & Manubhai, S. (2016). Freeze-Drying Above the Glass Transition Temperature in Amorphous. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(1), 40-49. doi:<https://doi.org/10.1002/jps.24705>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2008). *Manual del Usuario*. Córdoba, Argentina: Brujas.
- ELSEVIER CONNECT. (30 de enero de 2019). *Colágenos: tipos, composición, características y distribución en tejidos*. Obtenido de <https://www.elsevier.com/es-es/connect/colagenos-tipos-composicion-caracteristicas-y-distribucion-en-tejidos>
- Fallah-Delavar, M., & Farmani, J. (2018). Recovery and Characterization of Enzymatic Protein Hydrolyzates and Fat from Chicken Skin. *AOCS*, 95(9), 1151–1161. doi:<https://doi.org/10.1002/aocs.12131>
- FAO. (2024). Overview of global market developments in 2023. *MEAT MARKET REVIEW*.
- FAO. (s.f.). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Obtenido de <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/management-and-housing/waste-management/es/>
- Felter, S. P., Zhang, X., & Thompson, C. (2021). Butylated hydroxyanisole: Carcinogenic food additive to be avoided or harmless antioxidant important to protect food supply?

- Flores, L., Ruiz, A., & Oscanoa, A. (2021). *PROTOCOLO PARA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN MICROALGAS LIOFILIZADAS*. Instituto del Mar del Perú. Perú : IMARPE. Obtenido de <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3539>
- Gál, R., Mokrejš, P., Mrázek, P., Pavlačková, J., Janáčová, D., & Orsavová, J. (2020). Chicken Heads as a Promising By-Product for Preparation of Food Gelatins. *Molecules*, 25(3), 494. doi:10.3390/molecules25030494
- Ghorpade, K. B., Shinde, S. M., & Bhalke, R. (2022). Primary Drying End point Determination in Lyophilization: a Review. *Journal of Research in Pharmaceutical Science*, 8(3), 10-14.
- Hashim, P., Ridzwan, M., Bakar, J., & Hashim, D. (2015). Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*, 22(1), 1-8.
- Hua, T.-C., Liu, B.-L., & Zhang, H. (2010). *Freeze-Drying of Pharmaceutical and Food Products*. Oxford.
- Ibarz-Blanch, N., Alcaide-Hidalgo, J. M., Cortés-Espinar, A. J., Albi-Puig, J., Suárez, M., Mulero, M., . . . Bravo, F. I. (2023). Chicken slaughterhouse by-products: A source of protein hydrolysates to manage non-communicable diseases. *Trends in Food Science & Technology*, 139(104125). doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104125>
- Joel, J., Adeyemi Adu, E., Oladimeji Salaudeen, K., & Maiyanga, I. E. (2023). Application of Freeze-Drying in Food Processing and Storage - A Review. *Badeggi Journal of Agricultural Research and Environmen*, 5(2), 21-35. doi:10.35849/BJARE202302/97/003
- Kawasaki, H., Shimanouchi, T., & Kimura, Y. (2019). Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. *Journal of Chemistry*, 2019, 1-14. doi:<https://doi.org/10.1155/2019/9502856>
- Kinsella, J. E., & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7(3), 219-280. doi:<https://doi.org/10.1080/10408397609527208>
- Kralik, G., Kralik, Z., Grčević, M., & Hanžek, D. (2018). Quality of Chicken Meat. *Animal Husbandry and Nutrition*, 63-94. doi:10.5772/intechopen.72865
- Kristinsson, H., & Rasco, B. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81. doi:10.1080/10408690091189266

- Lafarga, T., Álvarez, C., & Hayes, M. (2017). Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 41(6). doi:<https://doi.org/10.1111/jfbc.12418>
- Lanigan, R. S., & Yamarik, T. A. (2002). Final Report on the Safety Assessment of BHT. *International Journal of Toxicology*, 19-94. doi:10.1080/10915810290096513
- Lee, S., Han, S., Jo, K., & Jung, S. (2024). The impacts of freeze-drying-induced stresses on the quality of meat and aquatic products: Mechanisms and potential solutions to acquire high-quality products. *Food Chemistry*, 459, 140437. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140437>
- López do Campo, J. (2017). *Memoria del Trabajo de Fin de Grado: Estudio comparativo de la actividad antioxidante en fresas de*. Universidad Da Coruña, La Coruña.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Gómez, B., Barba, F. J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C., & Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends in Food Science & Techonology*, 79, 136-147. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>
- Mrazek, P., Mokrejs, P., & Gal, R. (2018). Assessment of possibilities of food grade gelatines preparation from chicken skin. *Proceedings of 25th International PhD Students Conference (MENDELNET 2018)*, 290-295.
- Mrázek, P., Mokrejš, P., Gál, R., & Orsavová, J. (2019). Chicken skin gelatine as an alternative to pork and beef gelatines. *Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 224-233. doi:10.5219/1022
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Nowak, D., & Jakubczyk, E. (2020). The Freeze-Drying of Foods—The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. *Foods*, 9(10), 1488. doi: <https://doi.org/10.3390/foods9101488>
- Núñez, S. M., Cárdenas, C., Valencia, P., Pinto, M., Silva, J., Pino-Cortés, E., & Almonacid, S. (2023). Effect of Adding Bovine Skin Gelatin Hydrolysates on Antioxidant Properties, Texture, and Color in Chicken Meat Processing. *Foods*, 12(1496). doi:<https://doi.org/10.3390/>
- Onuh, J. O., Girgih, A. T., Aluko, R. E., & Aliani, M. (2014). In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. *Food Chemistry*, 166, 366-373. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.107
- Orrego A., C. (2008). *Congelación y Liofilización de Alimentos*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10647>

- Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, 1, 308–314. doi:<https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9>
- Ramírez-Navas, J. S. (2007). Liofilización de alimentos. *Revista ReCiTeLA*, 6(2), 1-39.
- Ratti, C. (2013). Freeze drying for food powder production. *Handbook of Food Powders*, 57-84. doi:<https://doi.org/10.1533/9780857098672.1.57>
- Rawdkuen, S., Thitipramote, N., & Benjakul, S. (2013). Preparation and functional characterisation of fish skin gelatin. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(5), 1093–1102. doi:<https://doi.org/10.1111/ijfs.12067>
- Romero-Garay, M. G., Montalvo-González, E., Hernández-González, C., Soto-Domínguez, A., Becerra-Verdín, E. M., & García-Magaña, M. (2022). Bioactivity of peptides obtained from poultry by-products: A review. *Food Chemistry: X*, 13(100181). doi:<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100181>
- Rutherford, S. M. (2010). Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 93(5), 1515–1522. doi:<https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. doi:<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Tkaczewska, J. (2020). Peptides and protein hydrolysates as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings - A review. *Trends in Food Science & Technology*, 106, 298–311. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.022>
- Ungureanu, N., Vlăduț, V., Biriș, S.–Ș., Dincă, M., & Gheorghită, N.–E. (2023). Management of by-products and waste from poultry meat industry. *Annals of Faculty Engineering Hunedoara – International Journal of Engineering*, Tome XXI., 165-174.
- Valencia, P. L., Solis, T., Rojas, P., Ibañez, F., Astudillo-Castro, C., Pinto, M., & Almonacid, S. (2019). Proteolytic susceptibility of food by-product proteins: An evaluation by means of a quantitative index. *Process Biochemistry*, 77, 63-69. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.11.009>
- Vázquez Matías, R. (2024). *Desarrollo de un microdispositivo analítico de papel (μ PAD) para la determinación simultanea de capacidad antioxidante por FRAP, DPPH y ABTS en café, cacao y vino*. Tesis para obtener el Título de Química de Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, CDMX.
- VELP. (2023). Obtenido de VELP SCIENTIFICA: <https://www.velp.com/es-sa/el-metodo-kjeldahl-1.aspx>
- Xiong, G. Y., Chen, X., Zhang, X. X., Miao, Y., Zou, Y., Wang, D. Y., & Xu, W. M. (2020). Process optimization and the relationship between the reaction degree and the

ANEXOS

Anexo A: Cálculo Dosis de Proteasa Adicionada

La cantidad de proteasa comercial requerida para la obtención de 1.000 mL de hidrolizado se calculó utilizando la ecuación presentada previamente en el ítem 4.2.2. *Materia prima*. Bajo estas condiciones, se determinó que era necesario adicionar 20 mL de Alcalase. Este cálculo fue aplicado a ambos grados de hidrólisis seleccionados para este estudio y a continuación se presenta el cálculo realizado:

$$V_e = \frac{0,027 \left[\frac{U}{mL} \right] \cdot 1000 [mL]}{2,7 \left[\frac{U}{mL} \right]} \cdot 2 = 20 [mL] \text{ de Alcalase} \quad (22)$$

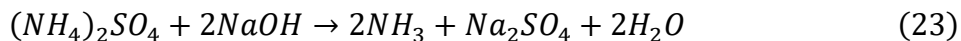
Anexo B: Método Kjeldahl

El método Kjeldahl es un método para la determinación del nitrógeno total contenido en una muestra orgánica, el cual se utiliza principalmente para determinar el contenido de proteína en alimentos, analizar muestras ambientales, químicas y farmacéuticas.

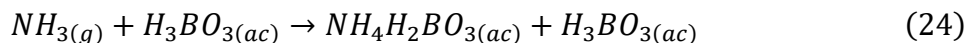
A continuación, se detallan las tres etapas de este método:

- 1. Digestión:** Descomposición del nitrógeno contenido en la muestra. Esto se logra hirviendo una muestra homogénea en ácido sulfúrico concentrado. El resultado final es una sal de sulfato de amonio.
- 2. Destilación:** Adición de una base a la mezcla de digestión ácida para convertir NH_4^+ en NH_3 , seguido de ebullición y condensación de amoníaco NH_3 gaseoso en una solución receptora. La solución receptora recomendada es ácido bórico (H_3BO_3), con la cual se tienen las siguientes reacciones:

Adición base:



Recepción en ácido bórico:



- 3. Titulación:** Cuantificación de la cantidad de amoníaco en la solución receptora. La cantidad de nitrógeno en una muestra se puede calcular a partir de la cantidad cuantificada de iones amoníaco en la solución receptora.

Equipos utilizados en cada etapa:

Tabla 9. Equipos utilizados en cada etapa del método Kjeldahl

Etapa	Equipo	Nº Identificación
1. Digestión	Digestor automático	1
	Depurador de gases	2
	Bomba de vacío	3
	Balanza analítica	-
2. Destilación	Destilador con vapor	4
3. Titulación	Titulador automático	-



Figura 19. Identificación de equipos a utilizar y su disposición

Soluciones y reactivos:

- Solución NaOH 17% (m/v) con indicador de azul de bromotimol.
- Ácido sulfúrico al 98% o más.
- Pastillas catalizadoras de cobre Kjeldahl.
- Agua desionizada.
- Solución NaOH 35% (m/v).
- Solución de ácido bórico al 4% (m/v).
- Solución tituladora; ácido sulfúrico o ácido clorhídrico de concentración normalizada.

Preparación equipos:

- Se recomienda disponer el depurador de gases (2) y la bomba de vacío (3) bajo campana o en un sector ventilado.

- (3) Llenar con agua el recipiente azul de la bomba de agua, verificar conexiones de agua.
- (2) Agregar a la botella grande del depurador, entre 0,8 y 1 L de solución de hidróxido de sodio al 17% con indicador Azul de bromotimol. El indicador azul cambiará a amarillo cuando la solución ya se encuentre saturada y se deberá cambiar por una nueva solución de NaOH cuando esto ocurra.
- Verificar conexión de todas las mangueras, de agua y gases.
- (4) verificar alimentación de solución de hidróxido de sodio al 35% (grado P.A.) para el equipo destilador.
- (4) ambientar conexiones del destilador y verificar funcionamiento haciendo funcionar el programa en un tubo vacío o con agua.

Procedimiento Etapa de Digestión:

- Agregar 0,5 mL de muestra a cada tubo.
- Agregar 1 pastilla Kjeldahl a cada tubo.
- Agregar entre 10 a 20 mL de ácido sulfúrico al 98% a cada tubo.
- Colocar tubos en el equipo digestor (1).
- Encender bomba de vacío (3), dar agua al condensador del depurador de gases (2), quitar bandeja anti-goteo en la parte superior del digestor (1) y comenzar programa.
- Una vez terminada la digestión enfriar tubos a temperatura ambiente.

Procedimiento Etapa de Destilación:

- Tomar uno de los tubos a temperatura ambiente, agregar agua desionizada (50 mL aproximadamente). Esto facilita la detección de todo el amoníaco.
- Colocar el tubo en el equipo destilador y cerrar ventana azul traslúcida.
- Seleccionar la cantidad de solución de NaOH al 35% que agregará el equipo (65 mL aproximadamente)
- Colocar en la salida del equipo un recipiente (o vaso titulador) con solución receptora de ácido bórico al 4%, cuidando que la manguera quede al fondo del recipiente.
- Comenzar programa. Una vez finalizado desechar el contenido del tubo y guardar solución receptora para realizar la cuantificación de nitrógeno por titulación volumétrica.

Anexo C: Método Reactivo OPA

a) Preparación Reactivo OPA:

Pesar 7,62 g de Borax (borato de sodio decahidratado) en vaso de 500 mL y agregar 150 mL de agua, diluir con agitación y con temperatura de 60°C (tapar con vidrio reloj). Una vez disuelto añadir 0,200 g de SDS (dodecilsulfato de sodio). Diluir 0,160 g de OPA (ortoftadialdehído) en 4 mL de Etanol Absoluto (utilizar micropipeta) y añadir a mezcla Borax/SDS enjuagando con agua destilada. Agregar a la misma mezcla, 0,176 g de DTT (ditrotreitol). Disuelta la mezcla, aforar a 200 mL con agua destilada. Almacenar en botella color ámbar con tapa.

Consideraciones:

- *Se pueden preparar distintas cantidades, pero se debe mantener la proporción entre los reactivos.*
- *Trabajar atentamente dado que el SDS es tóxico y DTT cancerígeno.*
- *Recordar quitar el agitador antes de aforar.*
- *Al aforar se debe evitar formar espuma, por lo que se debe hacer lentamente.*
- *El preparado vence 5 días después de preparado.*

b) Procedimiento Método OPA:

- Seleccionar Absorbancia de 340 nm en espectrofotómetro.
- Con micropipeta añadir 0,200 mL de muestra diluida a la celda de espectrofotometría. Agregar 1,5 mL de reactivo OPA.
- Medir absorbancia a los 2 minutos de haber agregado el reactivo.
- Realizar en duplicado o triplicado.

c) Curva de calibración:

Pesar 0,1 g de Serina, diluir y aforar con 100 mL de agua. Etiquetar con fecha y mg/L. Es importante pesar la serina en balanza analítica y registrar todas las unidades. Del preparado, extraer 1 mL de serina y añadirle 9 mL de agua (dilución 10 veces). Luego, de esta dilución preparar, en duplicado:

- 200 μ L de serina + 800 μ L de agua
- 400 μ L de serina + 600 μ L de agua
- 600 μ L de serina + 400 μ L de agua
- 800 μ L de serina + 200 μ L de agua
- 1000 μ L de serina.

Medir las preparaciones, tal cual fuera una muestra de proceso, es decir, 0,200 mL de cada preparación con 1,5 mL de OPA (esperar 2 minutos para medir).

El blanco se mide con agua en lugar de muestra o preparación, más 1,5 mL de OPA (esperar 2 minutos).

La curva de calibración quedará formada con estos estándares de serina conocidos, los cuales tendrán una concentración entre 20 y 100 mg/L (graficar absorbancia vs concentración).

Se obtiene una curva como la de la Figura 40, en donde el ajuste entregará una ecuación lineal de absorbancia (y) en función de la concentración (x). A partir de esta ecuación y de la absorbancia obtenida al medir cada muestra (de las hidrólisis) es que se determina la concentración de grupos α -aminos correspondiente.

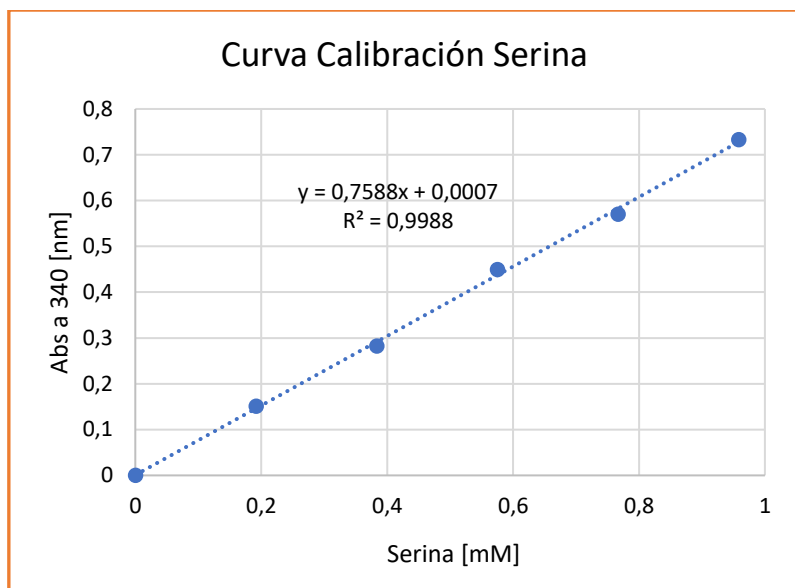


Figura 20. Curva de calibración experimental obtenida con Serina para la medición con método OPA

Cada día que se mida con el reactivo OPA, se debe generar una nueva curva.

Anexo D: Datos de concentración de grupos α -amino libres obtenidos con OPA.

A continuación, se presentan los datos de concentración real de grupos amino libres obtenidos con el método OPA en duplicado, con sus respectivas lecturas de las 11 muestras y la dilución ocupada.

Tabla 10. Datos de Absorbancia y Concentración real de grupos α -amino libres en el tiempo (Duplicado 1)

Tiempo [min]	Muestra	Lectura Abs.	Promedio Abs.	Desviación	% Error	Conc. [mM]	Dilución	Conc. Total en el tiempo [mM]
0	1	0,511	0,494	0,017	3,44%	0,6501	10	13,002
	1	0,477						
4	2	0,354	0,365	0,0105	2,88%	0,4794	20	19,178
	2	0,375						
7	3	0,370	0,368	0,0025	0,68%	0,4834	20	19,336
	3	0,365						
10	4	0,428	0,433	0,0045	1,04%	0,5691	20	22,762
	4	0,437						
20	5	0,430	0,436	0,006	1,38%	0,5737	20	22,947
	5	0,442						
30	6	0,445	0,450	0,0045	1,00%	0,5915	20	23,659
	6	0,454						
60	7	0,480	0,477	0,003	0,63%	0,6277	20	25,108
	7	0,474						
90	8	0,522						

	8	0,508	0,515	0,007	1,36%	0,6778	20	27,112
120	9	0,532						
	9	0,540	0,536	0,004	0,75%	0,7055	20	28,219
180	10	0,554						
	10	0,558	0,556	0,002	0,36%	0,7318	20	29,273
240	11	0,582						
	11	0,576	0,579	0,003	0,52%	0,7621	20	30,486

Tabla 11. Datos de Absorbancia y Concentración real de grupos α -amino libres en el tiempo (Duplicado 2)

Tiempo [min]	Muestra	Lectura Abs.	Promedio	Desviación	% Error	Conc. [mM]	Dilución	Conc. Total en el tiempo [mM]
0	1	0,518						
	1	0,489	0,504	0,0145	2,88%	0,6626	10	13,253
4	2	0,398						
	2	0,395	0,397	0,0015	0,38%	0,5216	20	20,865
7	3	0,425						
	3	0,398	0,412	0,0135	3,28%	0,5414	20	21,655
10	4	0,449						
	4	0,453	0,451	0,002	0,44%	0,5934	20	23,738
20	5	0,459						
	5	0,452	0,456	0,0035	0,77%	0,5994	20	23,975
30	6	0,489						
	6	0,474	0,482	0,0075	1,56%	0,6336	20	25,346
60	7	0,493						
	7	0,503	0,498	0,005	1,00%	0,6554	20	26,215
90	8	0,553						
	8	0,543	0,548	0,005	0,91%	0,7213	20	28,851
120	9	0,568						
	9	0,576	0,572	0,004	0,70%	0,7529	20	30,116
180	10	0,585						
	10	0,593	0,589	0,004	0,68%	0,7753	20	31,013
240	11	0,630						
	11	0,598	0,614	0,016	2,61%	0,8083	20	32,331

Anexo E: Gráficos determinación de fin del secado primario por Prueba de incremento de presión

Experimento GH1-40:

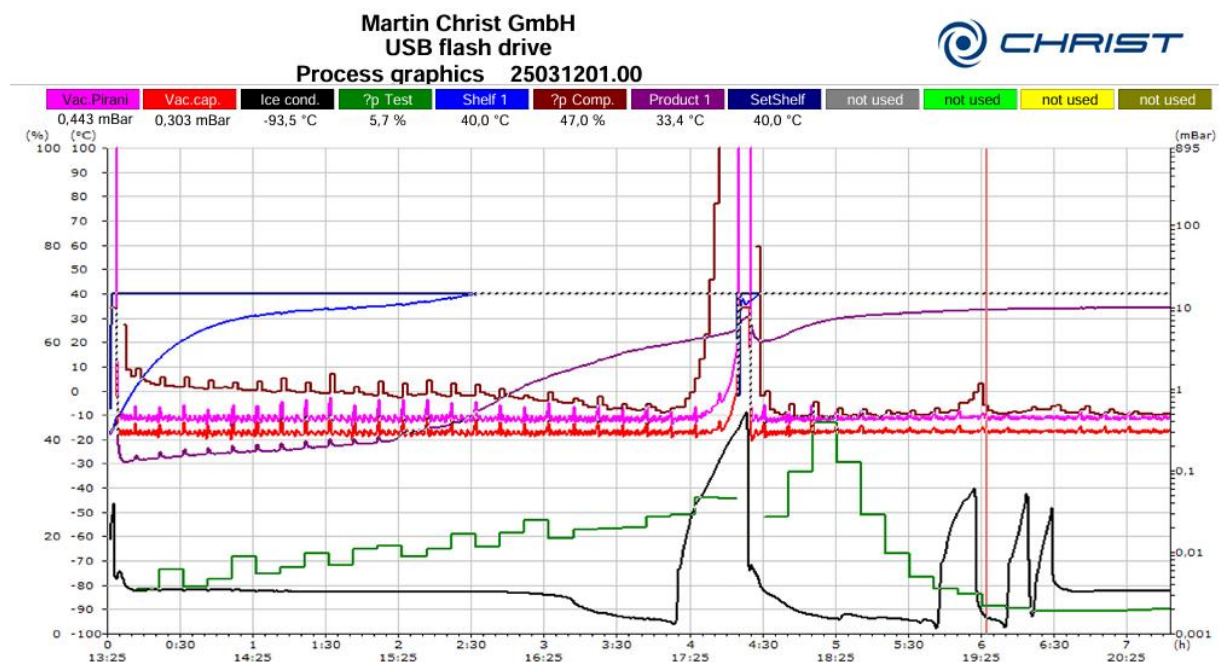


Figura 21. Liofilización de la muestra GH1-40 (Triplicado 1)

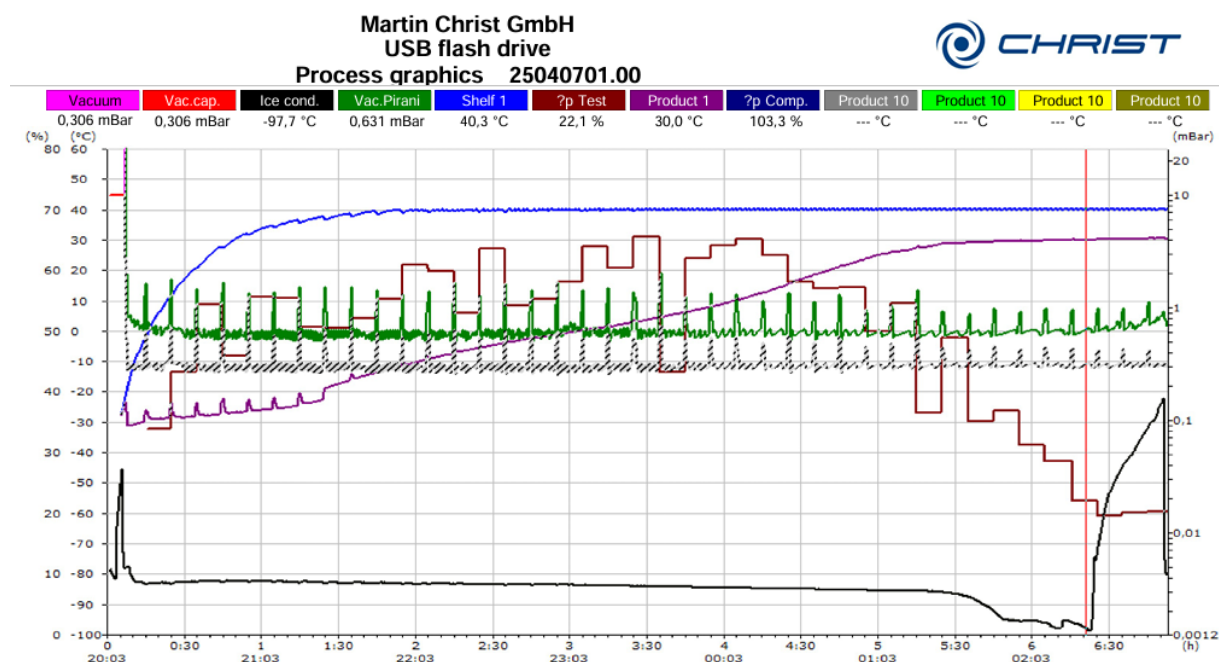


Figura 22. Liofilización de la muestra GH1-40 (Triplicado 2)

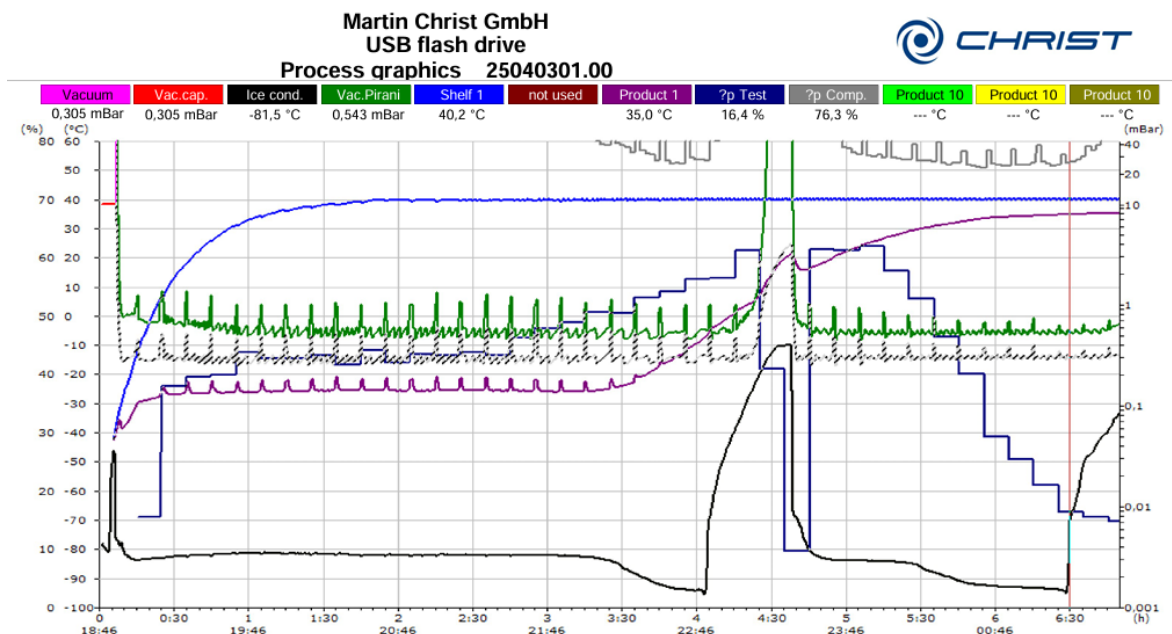


Figura 23. Liofilización de la muestra GH1-40 (Triplicado 3)

En esta condición, el secado primario finalizó entre las 6:00 y 6:30 horas de proceso, determinado por la estabilización de la curva de presión y la ausencia de respuesta a la prueba de incremento de presión.

Experimento GH1-50:

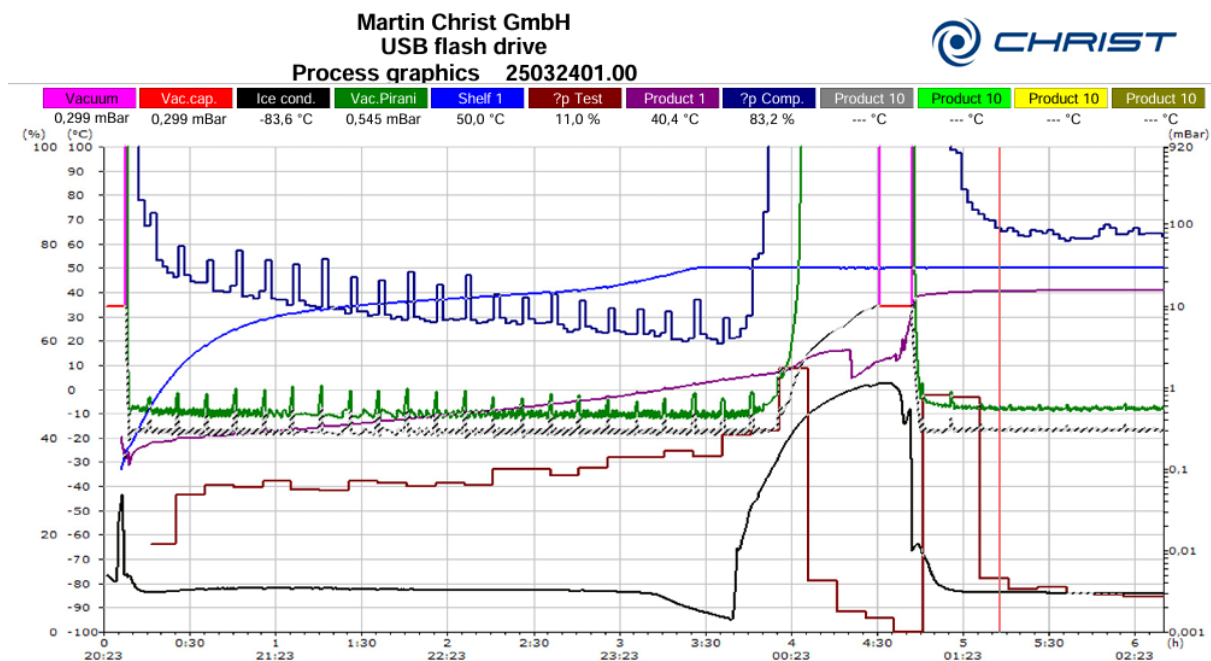


Figura 24. Liofilización de la muestra GH1-50 (Triplicado 1)

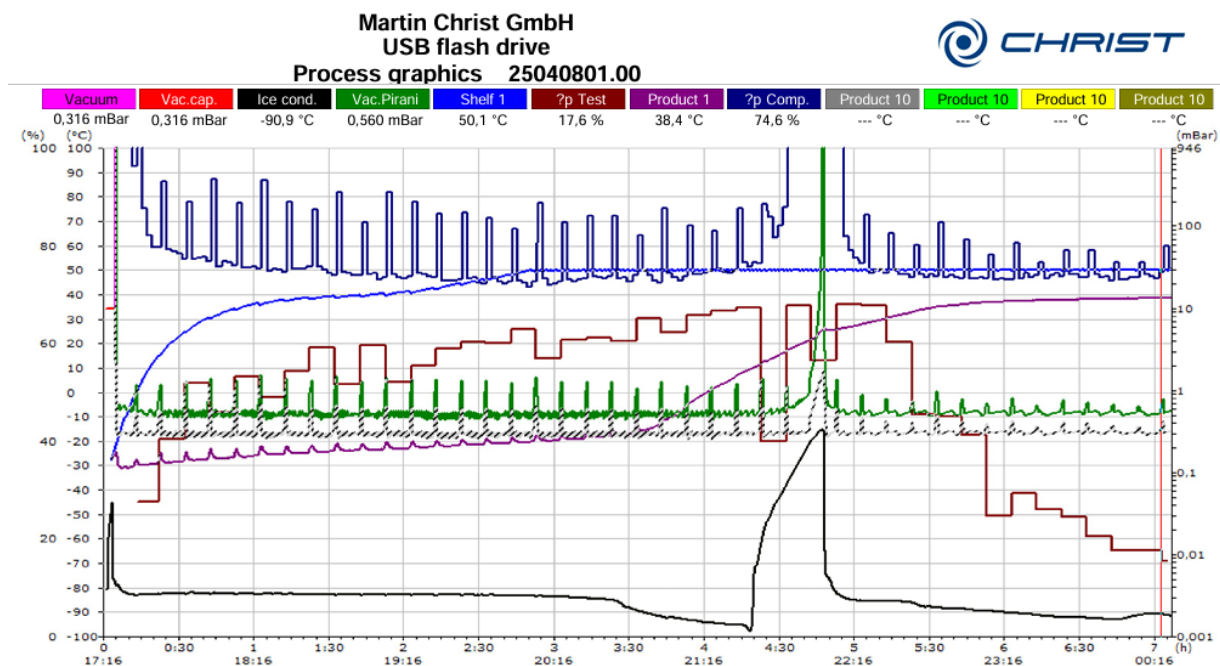


Figura 25. Liofilización de la muestra GH1-50 (Triplicado 2)

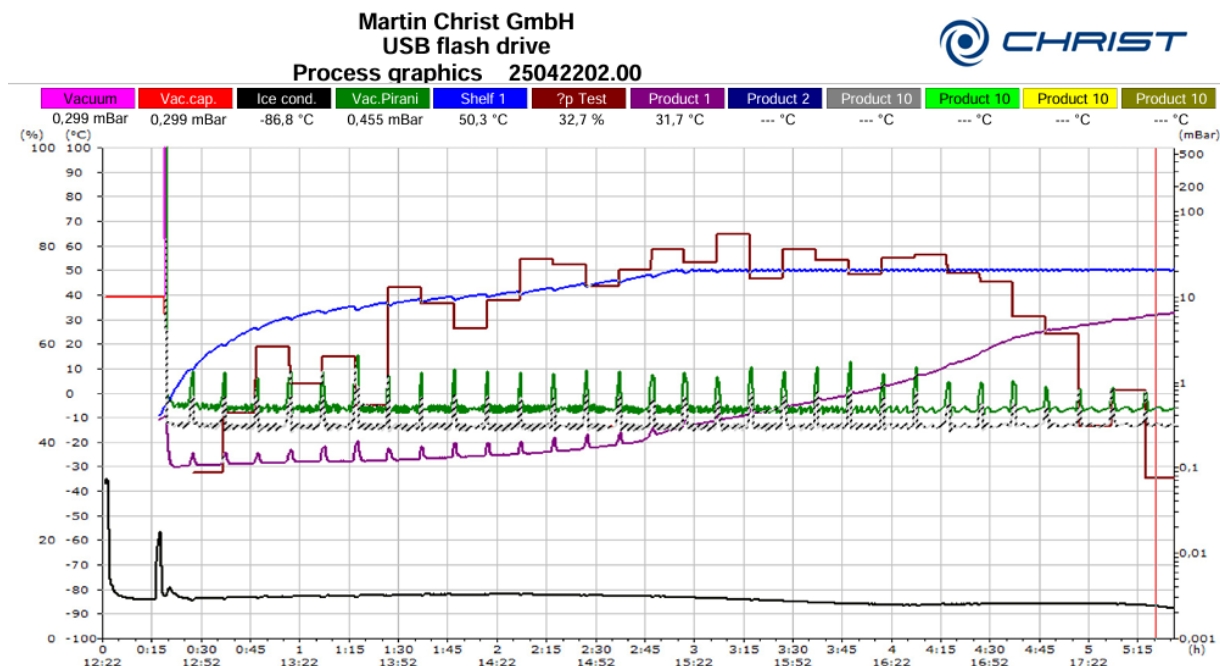


Figura 26. Liofilización de la muestra GH1-50 (Triplicado 3)

Para esta condición, el secado primario finalizó aproximadamente entre las 5:15 y 7:00 horas de proceso, con variaciones entre réplicas, pero todas muestran estabilización de la presión dentro de ese intervalo.

Experimento GH2-30:

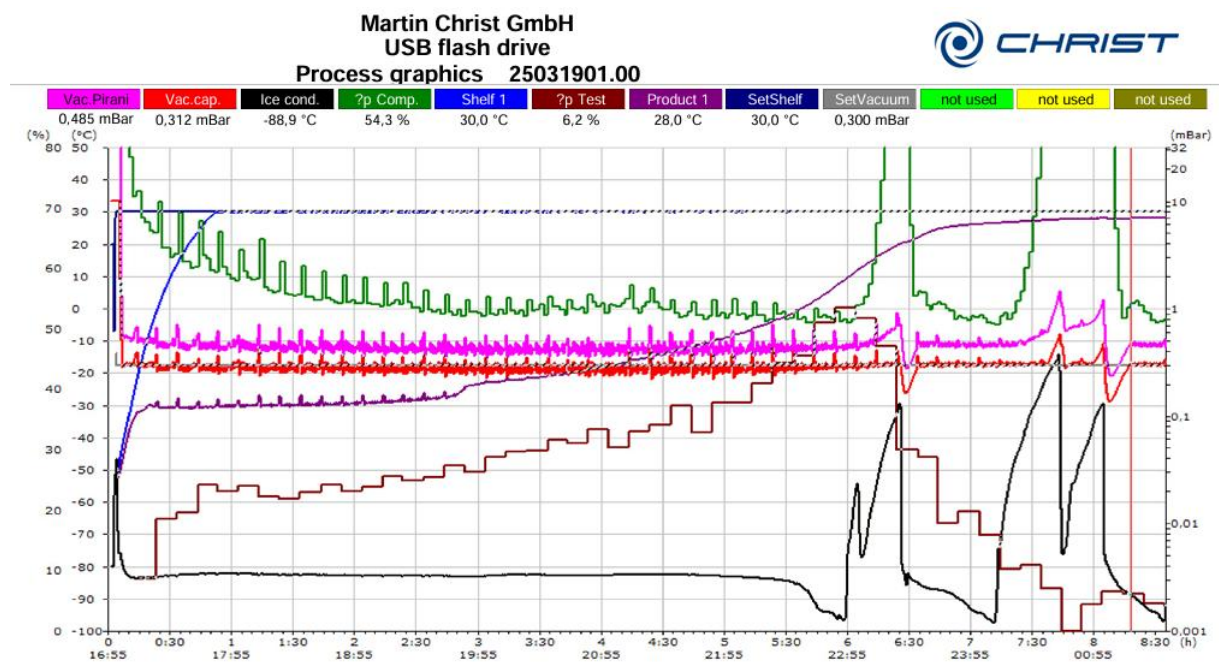


Figura 27. Liofilización de la muestra GH2-30 (Triplicado 1)

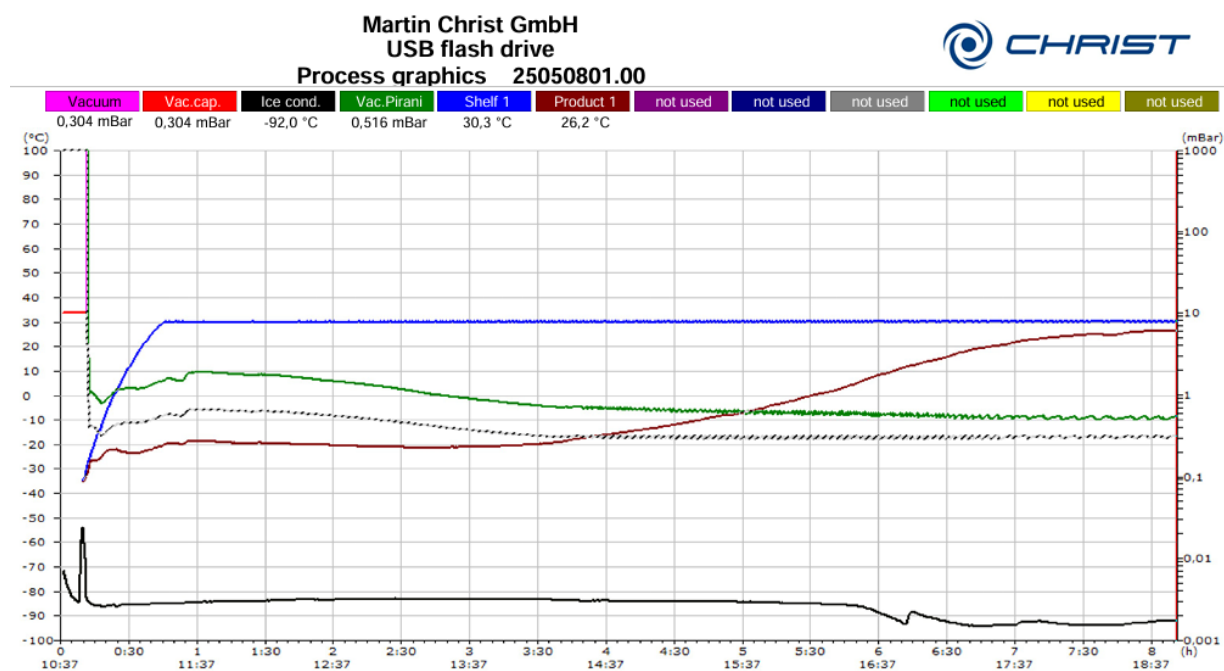


Figura 28. Liofilización de la muestra GH2-30 (Triplicado 2)

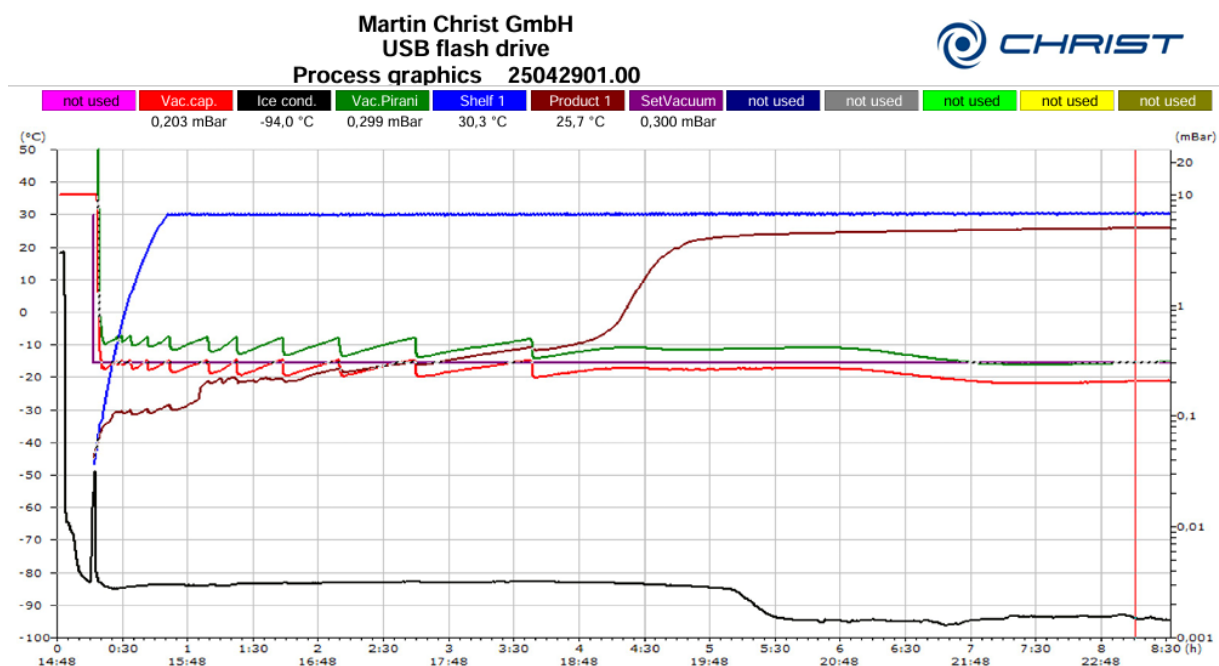


Figura 29. Liofilización de la muestra GH2-30 (Triplicado 3)

En esta condición, el secado primario se estimó finalizado entre las 8:10 y 8:20 horas, y en los duplicados se observa que la temperatura del producto también alcanza una estabilización en ese tiempo, lo que reafirma su término.

Experimento GH2-40:

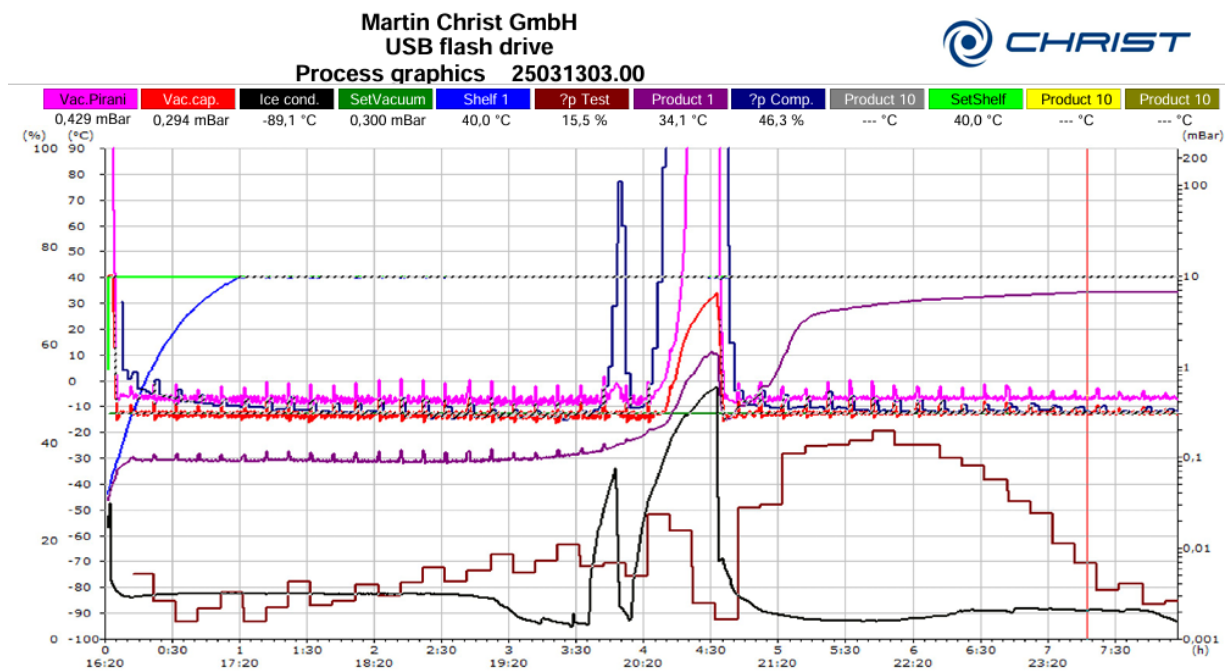


Figura 30. Liofilización de la muestra GH2-40 (Triplicado 1)

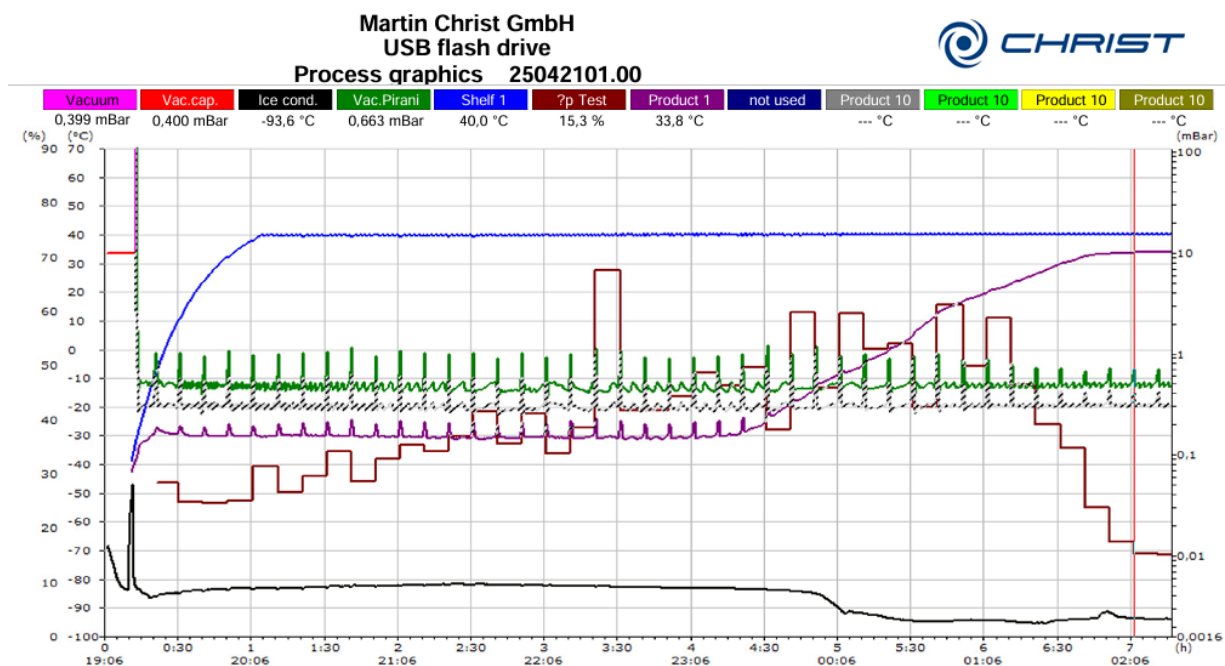


Figura 31. Liofilización de la muestra GH2-40 (Triplicado 2)

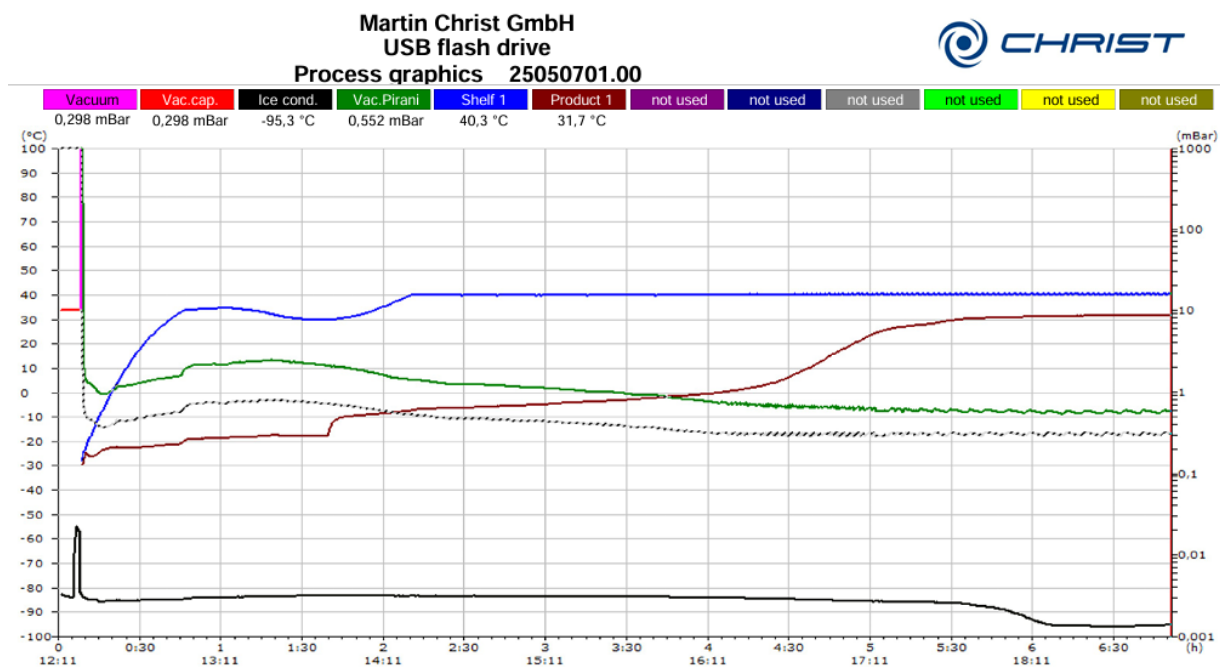


Figura 32. Liofilización de la muestra GH2-40 (Triplicado 3)

En esta condición, el secado primario se estimó finalizado entre las 7:00 y 7:17 horas de proceso, determinado por la estabilización de la curva de presión.

Experimento GH2-50:

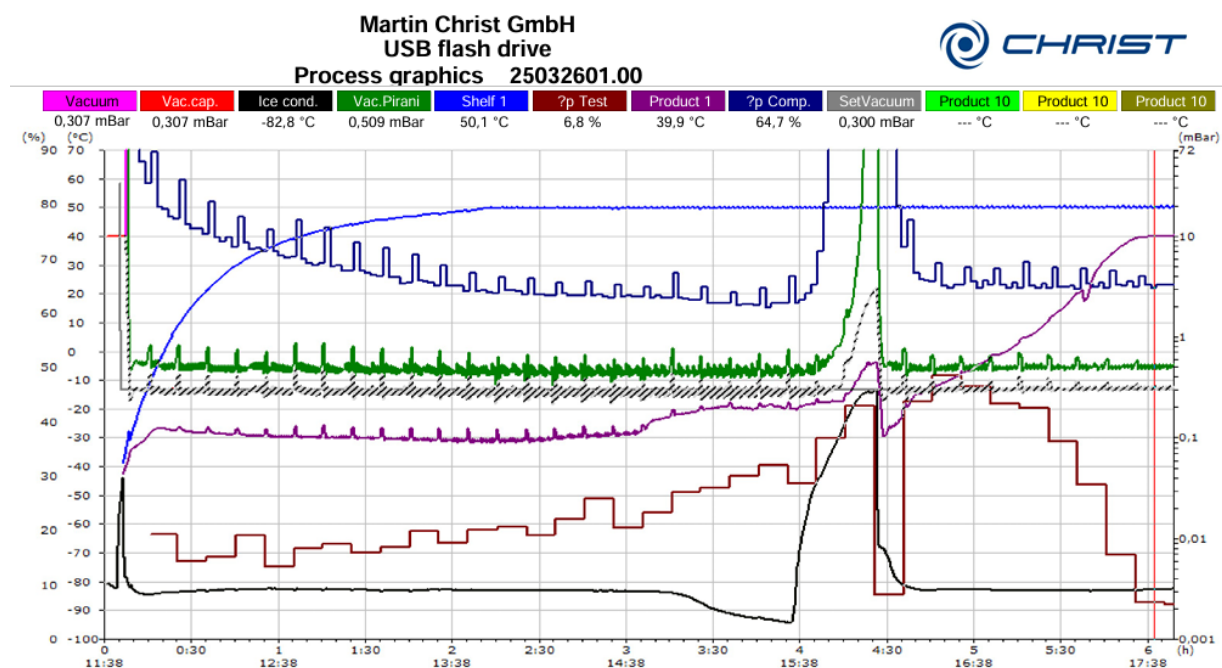


Figura 33. Liofilización de la muestra GH2-50 (Triplicado 1)

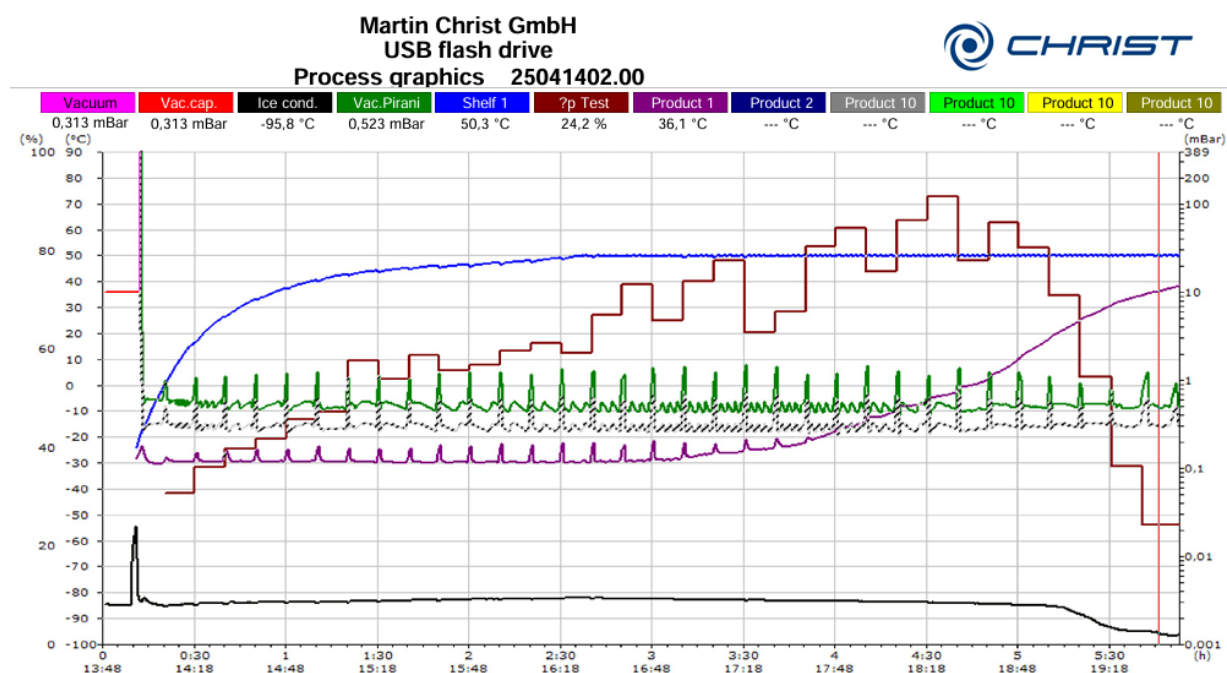


Figura 34. Liofilización de la muestra GH2-50 (Triplicado 2)

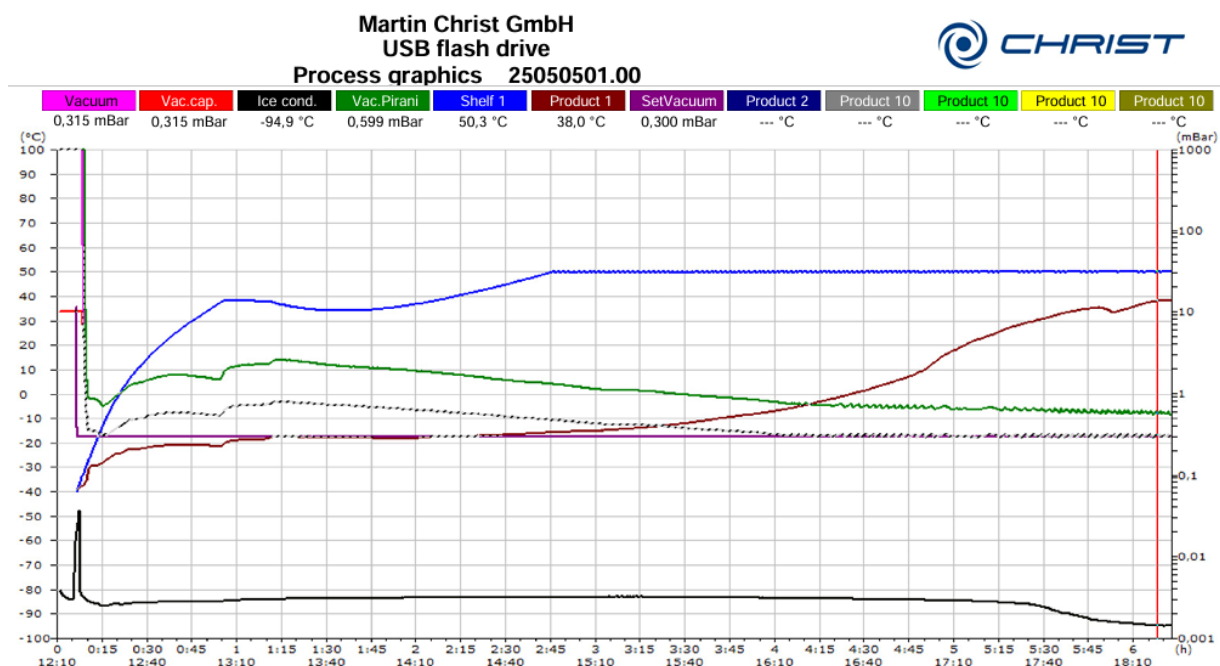


Figura 35. Liofilización de la muestra GH2-50 (Triplicado 3)

En esta condición, el secado primario finalizó aproximadamente entre las 5:45 y 6:00 horas.

Experimento GH3-30:

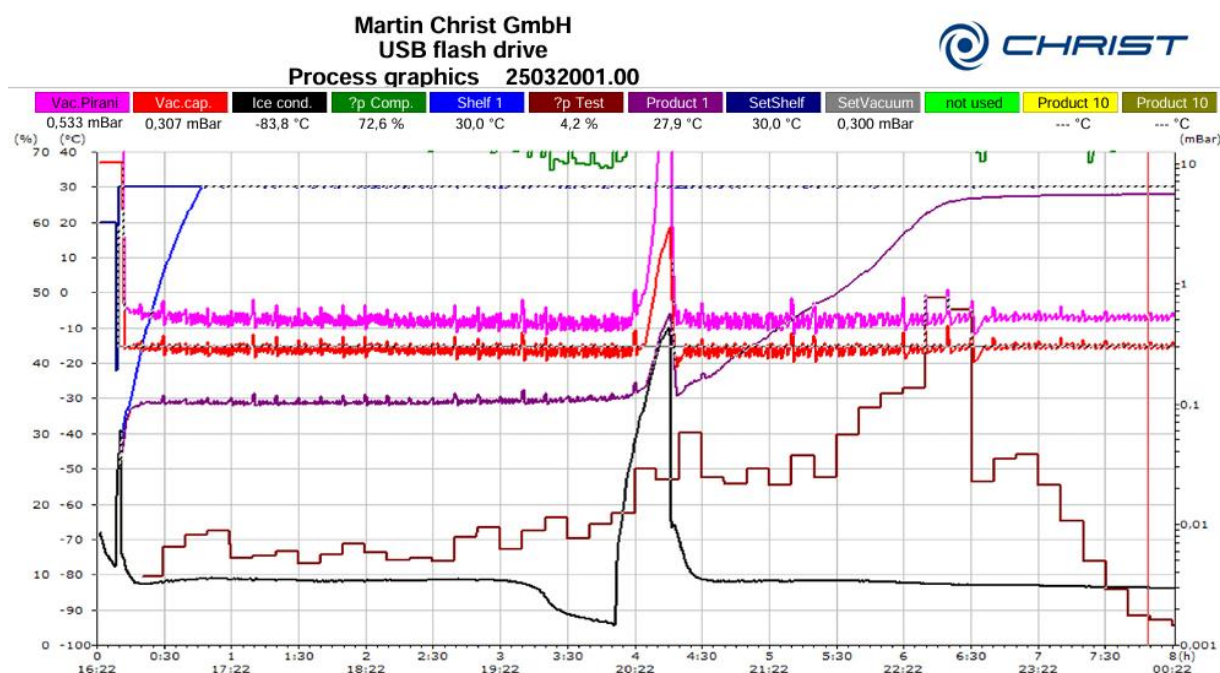


Figura 36. Liofilización de la muestra GH3-30 (Triplicado 1)

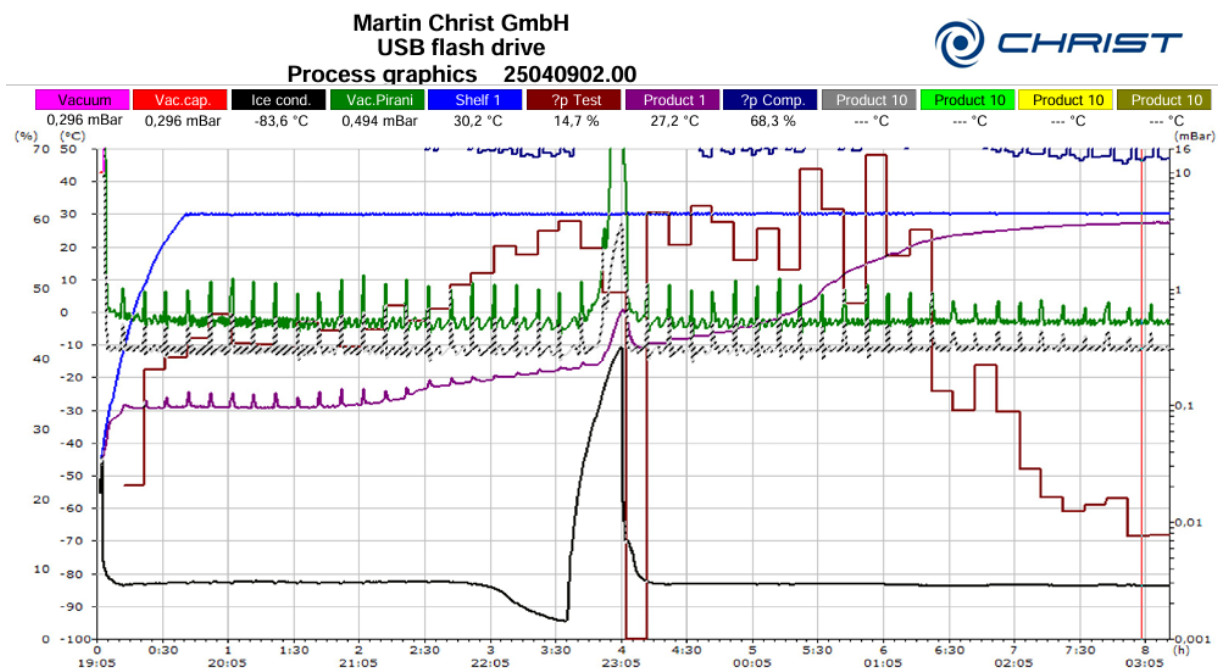


Figura 37. Liofilización de la muestra GH3-30 (Triplicado 2)

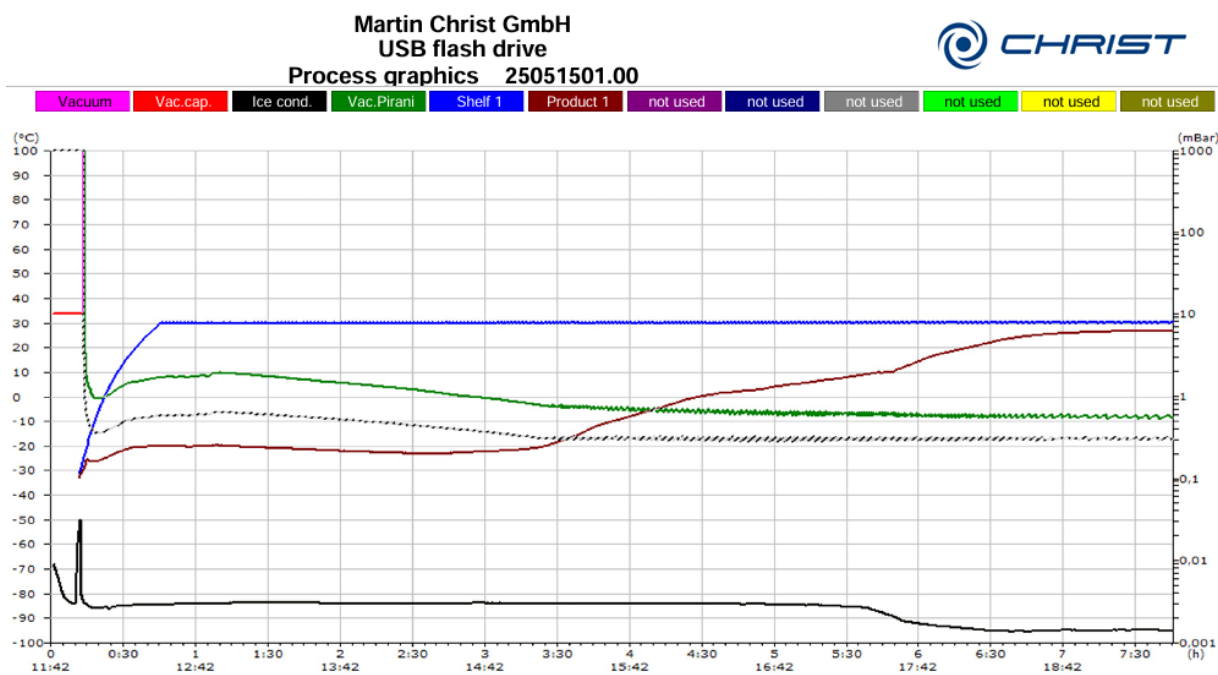


Figura 38. Liofilización de la muestra GH3-30 (Triplicado 3)

En esta condición, el secado primario finalizó aproximadamente entre las 7:50 y 8:00 horas, según lo determinado por la prueba de incremento de presión.

Experimento GH3-40:

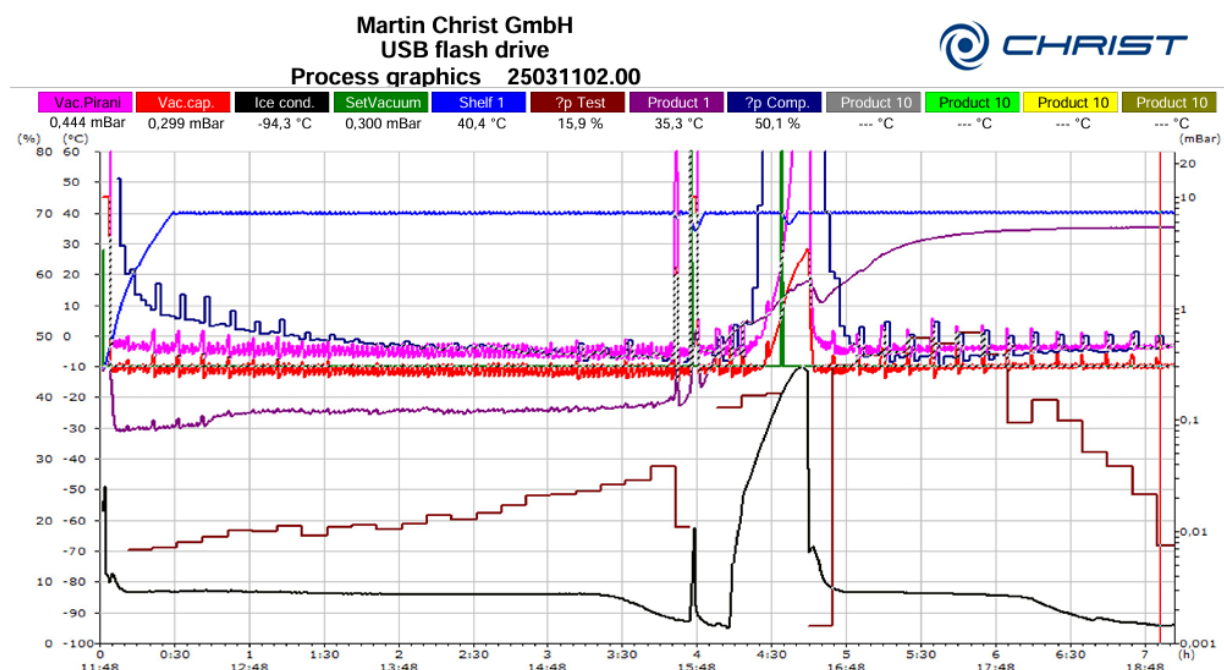


Figura 39. Liofilización de la muestra GH3-40 (Triplicado 1)

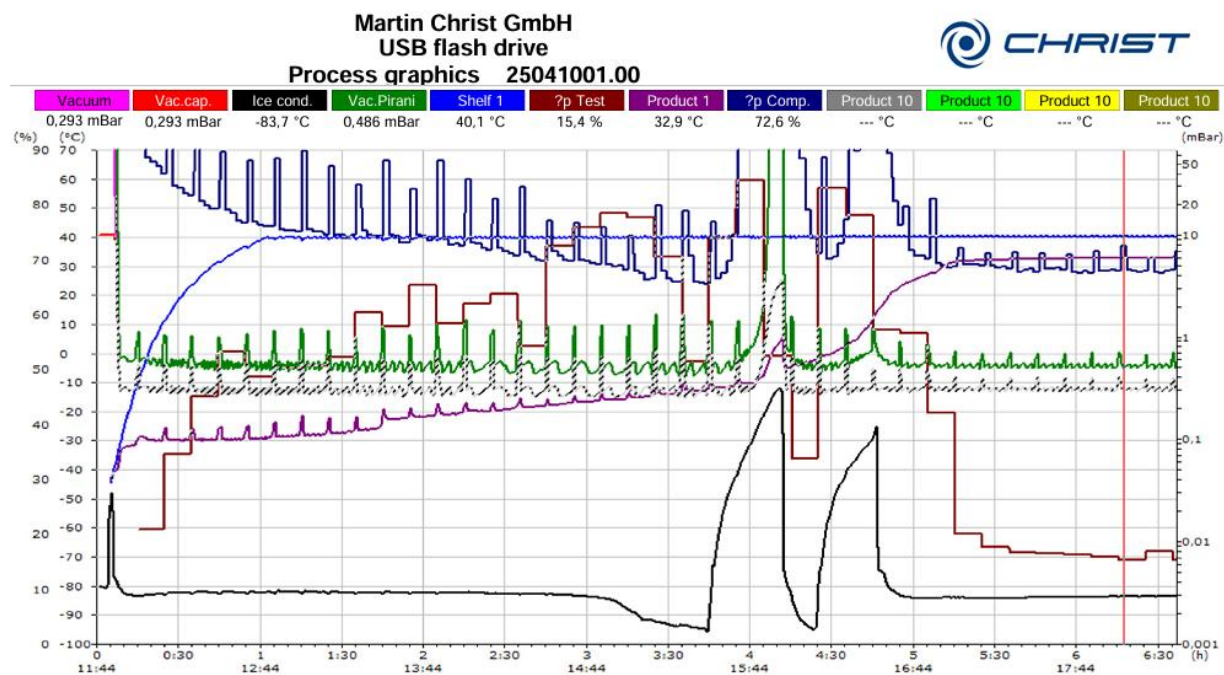


Figura 40. Liofilización de la muestra GH3-40 (Triplicado 2)

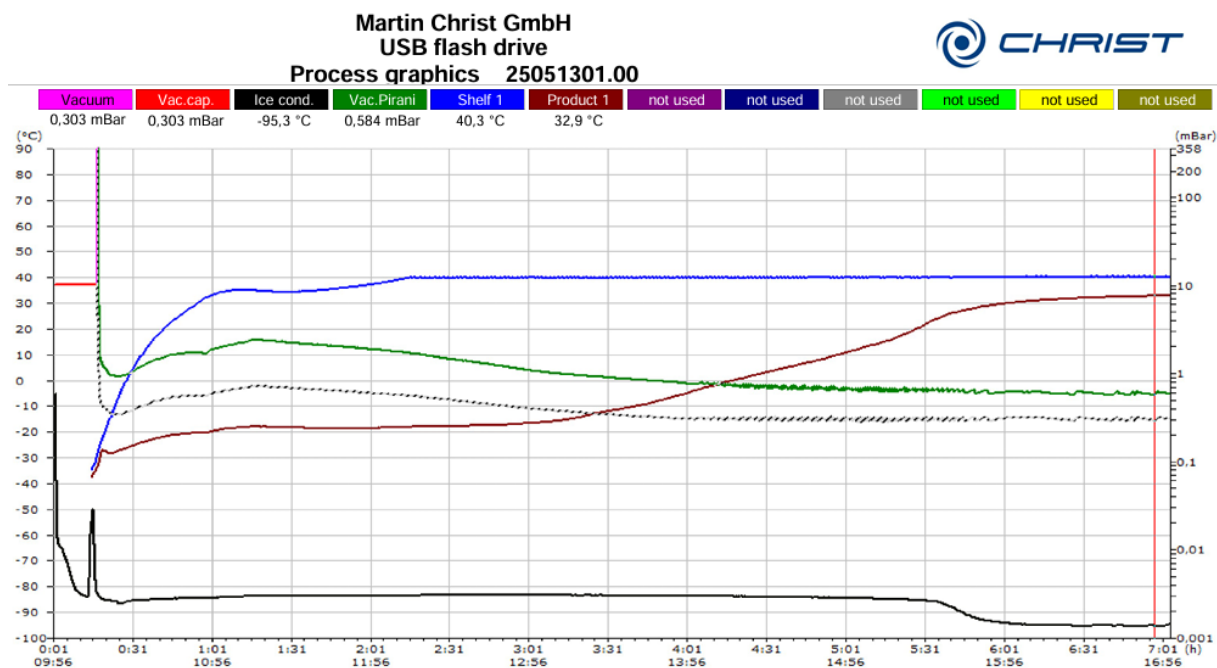


Figura 41. Liofilización de la muestra GH3-40 (Triplicado 3)

En esta condición, el proceso se estabilizó entre las 6:15 y 7:05 horas, según lo determinado por la prueba de incremento de presión.

Experimento GH3-50:

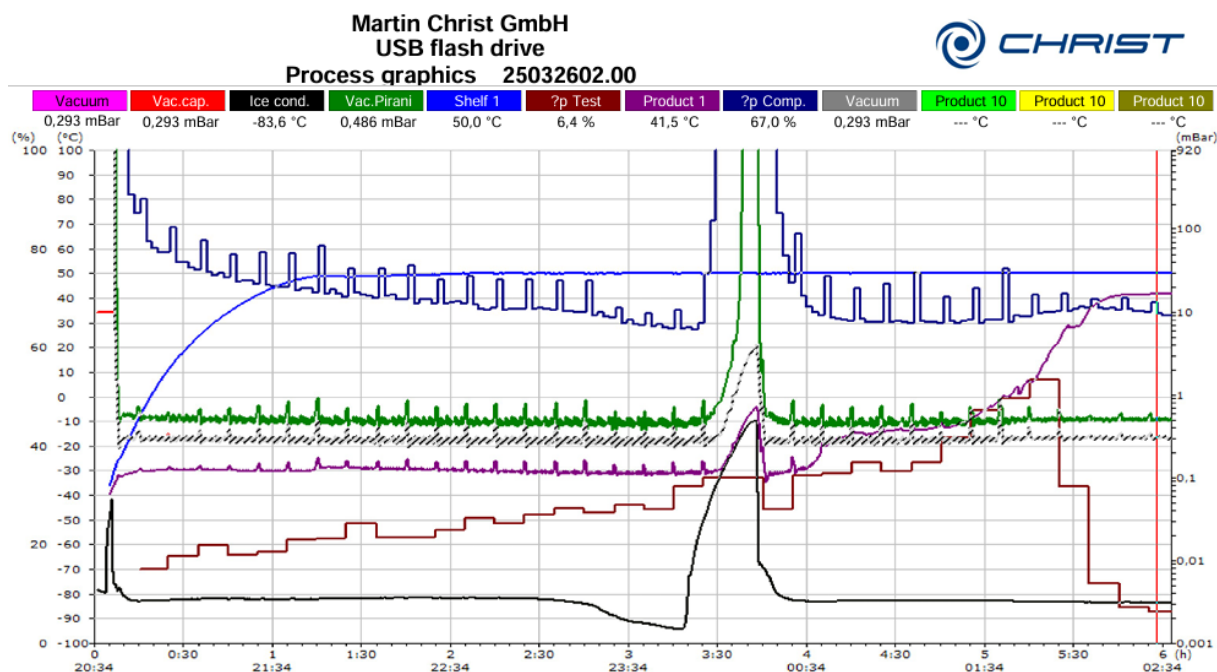


Figura 42. Liofilización de la muestra GH3-50 (Triplicado 1)

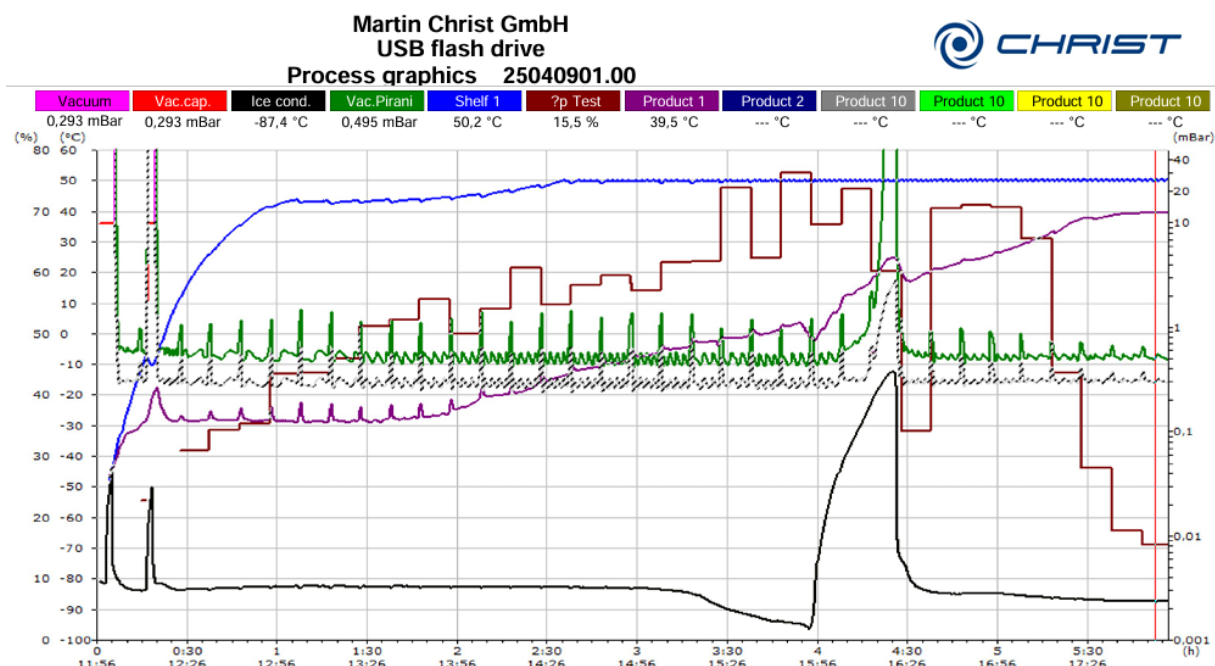


Figura 43. Liofilización de la muestra GH3-50 (Triplicado 2)

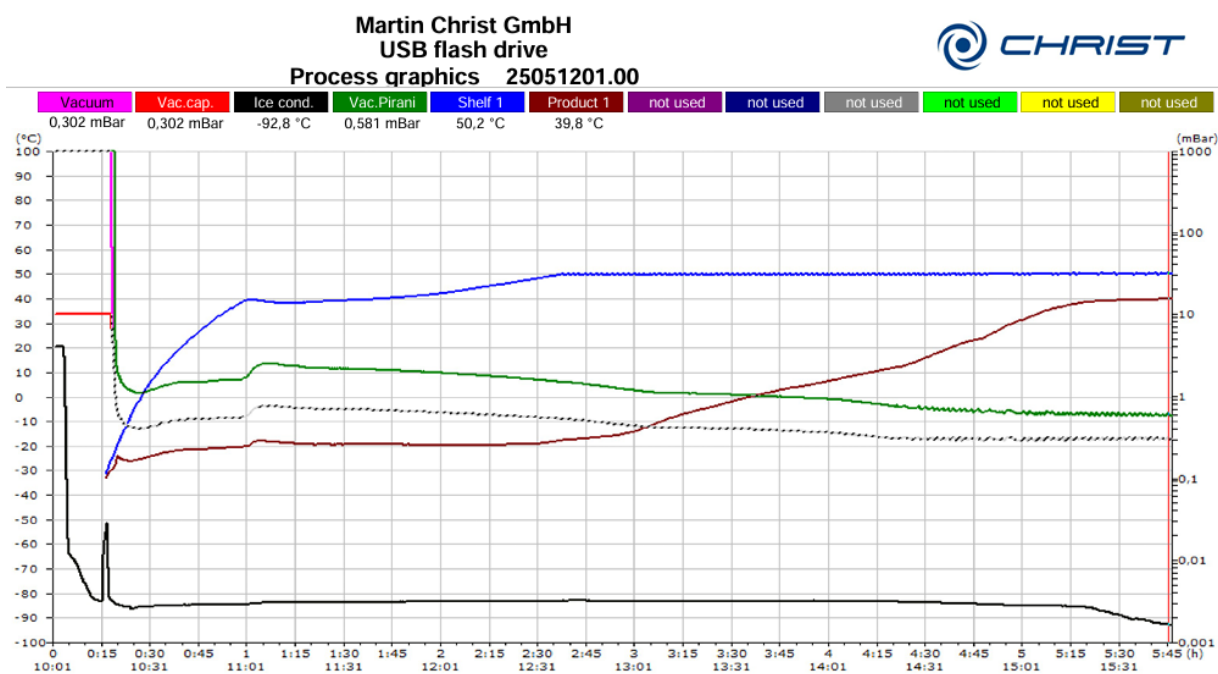


Figura 44. Liofilización de la muestra GH3-50 (Triplicado 3)

En esta condición, el secado primario finalizó aproximadamente entre las 5:50 y 6:00 horas, según lo determinado por la prueba de incremento de presión.

Anexo F: Determinación Humedad en muestras liofilizadas

a) Determinación de la humedad para cada condición:

Tabla 12. %Humedad en muestras GH1-30

Muestras	GH1-30	GH1-30	GH1-30	GH1-30
m1 [g]	44,766	45,618	44,786	49,41
m2 [g]	0,102	0,101	0,101	0,100
m3 [g]	44,861	45,711	44,880	49,502
Humedad %	6,86	7,92	6,93	8,00
Promedio Humedad %	7,43			
Desviación estándar	0,62			

Tabla 13. %Humedad en muestras GH1-40

Muestras	GH1-40	GH1-40	GH1-40	GH1-40
m1 [g]	45,757	45,613	44,765	49,391
m2 [g]	0,103	0,107	0,100	0,104
m3 [g]	45,855	45,712	44,859	49,489
Humedad %	4,85	7,48	6,00	5,77
Promedio Humedad %	6,03			
Desviación estándar	1,09			

Tabla 14. %Humedad en muestras GH1-50

Muestras	GH1-50	GH1-50	GH1-50	GH1-50
m1 [g]	45,625	47,471	49,396	46,931
m2 [g]	0,101	0,103	0,100	0,101
m3 [g]	45,72	47,568	49,49	47,026
Humedad %	5,94	5,83	6,00	5,94
Promedio Humedad %	5,93			
Desviación estándar	0,07			

Tabla 15. %Humedad en muestras GH2-30

Muestras	GH2-30	GH2-30	GH2-30	GH2-30
m1 [g]	45,613	45,612	49,392	49,292
m2 [g]	0,106	0,107	0,107	0,105
m3 [g]	45,714	45,715	49,491	49,392
Humedad %	4,72	3,74	7,48	4,76
Promedio Humedad %	5,17			
Desviación estándar	1,61			

Tabla 16. %Humedad en muestras GH3-40

Muestras	GH2-40	GH2-40	GH2-40	GH2-40
m1 [g]	45,609	47,472	49,39	46,934
m2 [g]	0,105	0,107	0,100	0,106
m3 [g]	45,71	47,574	49,486	47,035
Humedad %	3,81	4,67	4,00	4,72
Promedio Humedad %	4,30			
Desviación estándar	0,46			

Tabla 17. %Humedad en muestras GH2-50

Muestras	GH2-50	GH2-50	GH2-50	GH2-50
m1 [g]	45,616	45,613	49,392	49,392
m2 [g]	0,13	0,1	0,101	0,102
m3 [g]	45,738	45,708	49,487	49,489
Humedad %	6,15	5,00	5,94	4,90
Promedio Humedad %	5,50			
Desviación estándar	0,64			

Tabla 18. %Humedad en muestras GH3-30

Muestras	GH3-30	GH3-30	GH3-30	GH3-30
m1 [g]	45,616	45,613	49,398	49,392
m2 [g]	0,101	0,102	0,101	0,105
m3 [g]	45,707	45,707	49,49	49,489
Humedad %	9,90	7,84	8,91	7,62
Promedio Humedad %	8,57			
Desviación estándar	1,05			

Tabla 19. %Humedad en muestras GH3-40

Muestras	GH3-40	GH3-40	GH3-40	GH3-40
m1 [g]	45,618	45,614	49,391	49,391
m2 [g]	0,103	0,105	0,103	0,104
m3 [g]	45,712	45,71	49,484	49,486
Humedad %	8,74	8,57	9,71	8,65
Promedio Humedad %	8,92			
Desviación estándar	0,53			

Tabla 20. %Humedad en muestras GH3-50

Muestras	GH3-50	GH3-50	GH3-50	GH3-50
m1 [g]	45,619	47,469	49,389	46,934
m2 [g]	0,1	0,103	0,1	0,103
m3 [g]	45,712	47,563	49,483	47,027
Humedad %	7,00	8,74	6,00	9,71
Promedio Humedad %	7,87			
Desviación estándar	1,67			

b) Análisis estadístico de % Humedad en muestras liofilizadas:

Tabla 21. Análisis ANOVA y LSD Fisher para %Humedad en muestras liofilizadas mediante software InfoStat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% Humedad	36	0,76	0,68	15,05

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	83,32	8	10,41	10,45	<0,0001
Muestras	83,32	8	10,41	10,45	<0,0001
Error	26,91	27	1,00		
Total	110,23	35			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,44836

Error: 0,9966 gl: 27

Muestras	Medias	n	E.E.	
GH2-40	4,30	4	0,50	A
GH2-30	5,18	4	0,50	A B
GH2-50	5,50	4	0,50	A B
GH1-50	5,93	4	0,50	B
GH1-40	6,03	4	0,50	B C
GH1-30	7,43	4	0,50	C D
GH3-50	7,86	4	0,50	D E
GH3-30	8,57	4	0,50	D E
GH3-40	8,92	4	0,50	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Anexo G: Medición de la Capacidad Antioxidante en muestras

a) Medición de la captura de radical libre en muestras estudiadas por método DPPH:

Tabla 22. Actividad antioxidante de las muestras según método DPPH

	Muestras			Blanco			%CLR			Promedio	Desviación	Error
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Muestra	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	1	2	3			
H-1	0,765	0,746	0,732	0,116	0,109	0,104	26,08	27,45	28,47	27,33	1,20	3,06%
L-GH1-30	0,775	0,741	0,785	0,122	0,125	0,135	25,63	29,84	25,97	25,80	0,24	0,66%
L-GH1-40	0,778	0,789	0,71	0,123	0,138	0,139	25,40	25,85	34,97	25,63	0,32	0,89%
L-GH1-50	0,79	0,784	0,792	0,125	0,117	0,11	24,26	24,03	22,32	23,54	1,06	3,44%
H-2	0,599	0,584	0,643	0,108	0,103	0,112	44,08	45,22	39,52	44,65	0,81	1,28%

L-GH2-30	0,685	0,645	0,618	0,139	0,126	0,149	37,81	40,89	46,58	39,35	2,17	3,91%
L-GH2-40	0,628	0,653	0,62	0,09	0,118	0,095	38,72	39,07	40,21	39,33	0,78	1,48%
L-GH2-50	0,642	0,659	0,625	0,089	0,114	0,112	37,02	37,93	41,57	38,84	2,41	4,69%
H-3	0,568	0,587	0,521	0,098	0,105	0,11	46,47	45,10	53,19	48,25	0,97	1,42%
L-GH3-30	0,596	0,601	0,704	0,113	0,122	0,128	44,99	45,44	34,40	45,22	0,32	0,50%
L-GH3-40	0,599	0,587	0,621	0,109	0,105	0,124	44,19	45,10	43,39	44,23	0,85	1,32%
L-GH3-50	0,605	0,614	0,611	0,1	0,102	0,108	42,48	41,69	42,71	42,29	0,56	0,96%

Tabla 23. Muestra control promedio en Método DPPH

Control	
1	0,859
2	0,878
3	0,863
4	0,912
Promedio	0,878

b) Análisis estadístico método DPPH:

Tabla 24. Análisis ANOVA y LSD Fisher para %AA en método DPPH mediante software InfoStat

Análisis de la varianza

Variable N R² R² Aj CV
%CLR DPPH 39 0,98 0,97 7,75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	12409,96	12	1034,16	98,28	<0,0001
Muestras	12409,96	12	1034,16	98,28	<0,0001
Error	273,59	26	10,52		
Total	12683,54	38			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=5,44425

Error: 10,5225 gl: 26

Muestras	Medias	n	E.E.	
L-GH1-50	23,54	3	1,87	A
L-GH1-30	27,15	3	1,87	A
H-1	27,33	3	1,87	A
L-GH1-40	28,74	3	1,87	A
L-GH2-50	38,84	3	1,87	B
L-GH2-40	39,33	3	1,87	B
L-GH3-30	41,61	3	1,87	B
L-GH2-30	41,76	3	1,87	B
L-GH3-50	42,29	3	1,87	B
H-2	42,94	3	1,87	B C
L-GH3-40	44,23	3	1,87	B C
H-3	48,25	3	1,87	C
Vitam C	97,88	3	1,87	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

c) Medición de la captura de radical libre en muestras estudiadas por método ABTS⁺:

Tabla 25. Actividad antioxidante de las muestras según método ABTS⁺

Muestra	Muestras			%CLR			Promedio	Desviación	Error
	ABS 1	ABS 2	ABS 3	1	2	3			
H-1	0,419	0,463	0,425	35,21	28,40	34,28	32,63	3,69	0,09
L-GH1-30	0,426	0,467	0,462	34,12	27,78	28,56	30,15	3,46	0,09
L-GH1-40	0,487	0,439	0,451	24,69	32,11	30,26	29,02	3,86	0,10
L-GH1-50	0,485	0,463	0,548	25,00	28,40	15,26	26,70	2,41	0,06
H-2	0,386	0,312	0,315	40,31	51,75	51,29	47,78	6,48	0,10
L-GH2-30	0,329	0,326	0,301	49,12	49,59	53,45	50,72	2,38	0,04
L-GH2-40	0,347	0,329	0,308	46,34	49,12	52,37	49,28	3,02	0,04
L-GH2-50	0,357	0,364	0,35	44,79	43,71	45,88	44,79	1,08	0,02
H-3	0,241	0,269	0,244	62,73	58,40	62,27	61,13	2,38	0,03
L-GH3-30	0,256	0,245	0,277	60,41	62,11	57,16	59,90	2,51	0,03
L-GH3-40	0,264	0,276	0,29	59,18	57,32	55,15	57,22	2,01	0,02
L-GH3-50	0,301	0,321	0,277	53,45	50,36	57,16	53,66	3,41	0,04

Tabla 26. Muestra control promedio en Método ABTS⁺

Control	
C1	0,685
C2	0,598
C3	0,657
Promedio	0,647

d) Análisis estadístico método ABTS⁺:

Tabla 27. Análisis ANOVA y LSD Fisher para %AA en método ABTS⁺ mediante software InfoStat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%CLR ABTS	36	0,94	0,92	8,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5648,46	11	513,50	35,71	<0,0001
Muestras	5648,46	11	513,50	35,71	<0,0001
Error	345,07	24	14,38		
Total	5993,53	35			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=6,38984

Error: 14,3779 gl: 24

Muestras	Medias	n	E.E.	
L-GH1-50	22,89	3	2,19	A
L-GH1-40	29,02	3	2,19	A B
L-GH1-30	30,15	3	2,19	B
H-1	32,63	3	2,19	B
L-GH2-50	44,79	3	2,19	C
H-2	47,78	3	2,19	C D
L-GH2-40	49,28	3	2,19	C D
L-GH2-30	50,72	3	2,19	C D
L-GH3-50	53,66	3	2,19	D E
L-GH3-40	57,22	3	2,19	E F
L-GH3-30	59,89	3	2,19	E F
H-3	61,13	3	2,19	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)