



**UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA Y TECNOLOGÍA
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

ARTICULO ACADEMICO

**PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

TEMA:

DESARROLLO DE UNA PELICULA COMESTIBLE A BASE DE PROTEINA EXTRAIDA
DE LA MENBRANA TESTÁCEA DE HUEVO (*Gallus domesticus*) Y EXTRACTO DE
GERMINADO DE BROCOLI (*Brassica Oleracea var.italica*).

AUTOR:

RIVERA MOREIRA JOSTIN JESÚS

TUTOR:

VICTOR OSWALDO OTERO TUÁREZ, PhD.

MANTA – MANABÍ – ECUADOR

2025(1)



DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo Jostin Jesús Rivera Moreira con número de cedula 135129972-0 estudiante de la Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnología, declaro que todos los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación con el tema “DESARROLLO DE UNA PELICULA COMESTIBLE A BASE DE PROTEINA EXTRAIDA DE LA MENBRANA TESTÁCEA DE HUEVO (*Gallus domesticus*) Y EXTRACTO DE GERMINADO DE BROCOLI (*Brassica Oleracea var.italica*).”, previo a la obtención del titulo de Ingeniera Agroindustrial, bajo la supervisión del tutor Ing. Victor Oswaldo Otero Tuárez, PhD ,son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas, por lo que son de mi exclusiva responsabilidad.

Jostin Rivera

Rivera Moreira Jostin Jesús

CI: 135129972-0



CERTIFICACIÓN

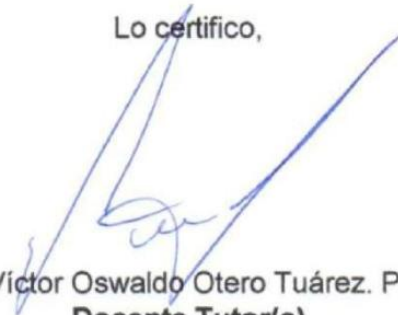
En calidad de docente tutor(a) de la Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías de la Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí, CERTIFICO:

Haber dirigido, revisado y aprobado preliminarmente el Trabajo de Integración Curricular bajo la autoría de la estudiante **Rivera Moreira Jostin Jesús**, legalmente matriculado/a en la carrera de Agroindustria, período académico 20251, cumpliendo el total de 16 horas, cuyo tema del proyecto es **"Desarrollo de una película comestible a base de proteína extraída de la membrana testácea de huevo (*Gallus domesticus*) y extracto de germinado de brócoli (*Brassica Oleracea var. italica*)"**. La presente investigación ha sido desarrollada en apego al cumplimiento de los requisitos académicos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico y en concordancia con los lineamientos internos de la opción de titulación en mención, reuniendo y cumpliendo con los méritos académicos, científicos y formales, y la originalidad de este, requisitos suficientes para ser sometida a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

Lugar, Manta 05 de agosto de 2025.

Lo certifico,


Ing. Víctor Oswaldo Otero Tuárez. PhD.
Docente Tutor(a)
Área: Agroindustria

Nota 1: Este documento debe ser realizado únicamente por el/la docente tutor/a y será receptado sin enmendaduras y con firma física original.

Nota 2: Este es un formato que se llenará por cada estudiante (de forma individual) y será otorgado cuando el informe de similitud sea favorable y además las fases de la Unidad de Integración Curricular estén aprobadas.



AGRADECIMIENTO

Expreso mi más sincero agradecimiento a Dios, por brindarme la vida, la salud y la fortaleza necesarias para culminar con éxito esta etapa académica.

A la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, a sus autoridades, y en especial a la Facultad de Ingeniería Agroindustrial, por abrirme las puertas al conocimiento y ser la institución que forjó en mí valores y principios fundamentales para mi desarrollo profesional.

De manera especial, agradezco a mis docentes y tutores, quienes con paciencia, exigencia y dedicación compartieron su experiencia y sabiduría, dejando huellas imborrables en mi formación.

A mis compañeros de carrera, con quienes compartí aprendizajes, debates, largas horas de estudio y también momentos de amistad que hicieron de este camino una experiencia enriquecedora.

Extiendo también mi agradecimiento a todas las personas y profesionales que, directa o indirectamente, colaboraron con este trabajo de investigación, brindando su apoyo, tiempo y conocimientos para hacerlo posible.

Finalmente, a cada persona que confió en mis capacidades y me motivó a continuar, le debo parte de este logro que hoy se convierte en el inicio de un nuevo compromiso con la sociedad y con mi profesión.



DEDICATORIA

Con profundo amor y gratitud, dedico este trabajo a mis abuelos maternos y mis padres, quienes con su esfuerzo, disciplina y ejemplo me enseñaron que los sueños se alcanzan con perseverancia, humildad y fe. Ustedes fueron y seguirán siendo la base de mi impulso y la inspiración constante para no rendirme en los momentos difíciles, gracias por toda su ayuda. A mi abuelo Ángel Custodio quien me ayudaba con cada trayecto hacia mis clases, a mi abuela Dolores Eneil por brindarme los almuerzos deliciosos todos los días para continuar con mi jornada de estudio, siempre a tiempo.

A Dios, fuente de vida y sabiduría, por sostenerme en silencio, por regalarme salud y por guiar mis pasos en cada etapa. Por las personas valiosas que puso en mi camino: amigos, maestros y compañeros que han aportado a mi formación académica y personal.

A mis amigos, con quienes compartí desvelos, números, dudas y certezas; ustedes fueron abrigo en las noches largas y alegría en los días de cansancio. Sus risas y consejos son parte de este logro, tanto como mis horas de estudio.

Finalmente, dedico este triunfo a quienes creen que el poder viene del conocimiento y la nobleza de la educación constante, semillas eternas de transformación. Que esta página sea más que un resultado académico; sea testimonio de gratitud, esperanza y compromiso con la vida, con la sociedad y con los sueños que aún están por nacer.

Resumen: Las películas comestibles (PC) representan una opción viable para extender la vida útil de los alimentos frescos, al actuar como una barrera física que limita el paso de factores externos como el oxígeno y la humedad. Además, estas matrices permiten la liberación controlada de compuestos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas hacia la superficie del alimento. El presente estudio tuvo como objetivo el desarrollo y caracterización de PC a partir de colágeno hidrolizado extraído de la membrana testácea de huevo (MTH) (*Gallus domesticus*) y extracto de germinado de brócoli (EGB) (*Brassica oleracea* var. *italica*). La proteína fue obtenida mediante hidrólisis enzimática con papaína, mientras que el extracto vegetal se preparó favoreciendo la formación de sulforafano mediante activación enzimática de la mirosinasa. Se formularon seis tratamientos con diferentes concentraciones de colágeno (10 % y 20 %) y extracto vegetal (0 %, 3 % y 5 %) y se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, ópticas, de barrera, antioxidantes y antimicrobianas. El resultado de determinación de proteína mostro que el colágeno hidrolizado de membrana testácea de huevo (CHMTH) presento mayor contenido proteico en comparación con el colágeno hidrolizado comercial (CHC). La adición de extracto vegetal elevo significativamente la capacidad antioxidante y la inhibición frente a bacterias gran negativas en este caso a *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., además de alterar las características como el espesor, el color, la humedad y la permeabilidad al vapor de agua. Los tratamientos con 20 % de colágeno hidrolizado de membrana testácea de huevo (CHMTH) y 5 % de EGB mostraron el mejor rendimiento general. En conjunto, los hallazgos evidencian el potencial de esta PC como recubrimiento activo, sostenible y funcional para alimentos frescos, además de contribuir al aprovechamiento de subproductos agroindustriales.

INTRODUCCION

Actualmente, la industria alimentaria enfrenta retos progresivos relacionados con la sostenibilidad y la necesidad de tecnología de empaque que extienda la vida útil preservando la calidad y la inocuidad de los alimentos. Por esta situación, las películas comestibles (PC) se han situado como alternativa factible en relación a los envases tradicionales, por lo que estas disponen de capacidad de formar barreras que regulan el intercambio de humedad, gases y compuestos oxidativos, aportando estabilidad a los productos mínimamente procesados (Gupta et al., 2024).

Estas películas se elaboran a partir de biopolímeros naturales renovables como polisacáridos, lípidos y proteínas y pueden incorporar compuestos funcionales que refuercen sus propiedades fisicoquímicas y bioactivas. En este sentido, la membrana testácea de huevo (MTCH), subproducto comúnmente desechado en la industria avícola, constituye una fuente rica de proteínas poco estudiada, principalmente colágeno (Miteluț et al., 2021). Esta matriz natural, derivada del huevo, presenta una composición proteica de aproximadamente el 90 %, incluyendo colágeno de los tipos I, V y X, además de minerales como calcio y magnesio, características que la hacen prometedora para aplicaciones en el desarrollo de materiales biodegradables y funcionales (Shi et al., 2021).

Según datos reportados por Han et al. (2023), en el año 2020 la producción mundial de huevos de aves de corral alcanzó los 92.967 millones de toneladas, siendo los huevos de gallina los más representativos con un 93,2 % del total. Dentro de la estructura del huevo, se estima que la cáscara representa entre el 10 % y 12 %, mientras que la membrana interna equivale aproximadamente al 1,02 %. A partir de estos porcentajes, se infiere que anualmente se generan más de 9.500 millones de toneladas de cáscara y cerca de 884 mil toneladas de membrana testácea, lo cual evidencia el alto volumen de este subproducto que podría ser aprovechado en aplicaciones de valor agregado.

Por otro lado, el germinado de brócoli recientemente ha sido conocido por su gran cantidad de compuestos bioactivos en los primeros días de crecimiento (3 días), entre los cuales destaca el sulforafano, que se produce en el proceso de hidrólisis natural de glucosinolatos mediante la enzima

mirosinasa en el proceso de triturado (Sun et al., 2025). Este compuesto ha demostrado tener efectos antioxidantes y antimicrobianos representativos, volviéndolo ingrediente decisivo para incorporarlo en recubrimientos funcionales (Azizah et al., 2023). Estudios recientes han evidenciado que el sulforafano puede alterar la integridad de la membrana celular de las bacterias, produciendo una pérdida de potasio intracelular y desestabilizando la superficie celular, lo que contribuye a la inhibición y posterior muerte (Borges et al., 2015; Hinds et al., 2017).

Este trabajo plantea el desarrollo y caracterización de una película comestible desarrollada a partir de colágeno extraído de la membrana testácea de huevo y extracto de germinado de brócoli. Se espera que la combinación de ambos componentes proporcione una matriz con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, filmógenas y plastificantes, que pueda aplicarse como recubrimiento natural en alimentos frescos, contribuyendo así a su conservación y al aprovechamiento de residuos agroindustriales.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon cáscaras de huevos de gallinas (*Gallus domesticus*) procedentes de una granja de producción avícola (Granja Avícola El Secal), ubicada entre San Vicente de Paúl y Mariana Cueva, Machala, Ecuador. Solo se seleccionaron aquellas cáscaras con integridad física (sin fisuras ni residuos fecales), las cuales fueron lavadas con agua filtrada para eliminar restos de albúmina y posteriormente secadas a temperatura ambiente ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) en condiciones de sombra. Las muestras fueron almacenadas en envases plásticos limpios hasta su desinfección.

Las cáscaras fueron desinfectadas mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (50 ppm) durante 10 minutos, seguidas de un enjuague con agua destilada. Para eliminar lípidos residuales, se realizó un desgrasado con etanol al 70 % durante 5 minutos y nuevamente un enjuague con agua destilada. La separación de la membrana testácea se llevó a cabo en estado húmedo, facilitando su extracción manual. Luego, se secaron nuevamente a temperatura ambiente ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) antes de proceder a su hidrólisis enzimática (Yu, 2023).

Las semillas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) utilizadas fueron adquiridas en el establecimiento Agrosad (Cuenca, Ecuador) en presentaciones empacadas al vacío, con un 85 % de capacidad germinativa y 99,9 % de pureza.

Las semillas fueron sometidas a un protocolo doble de desinfección: primero con hipoclorito de sodio (50 ppm, durante 3 minutos), seguido de etanol al 70 % (2 minutos). Posteriormente, se hidrataron en agua destilada durante 6 horas. La germinación se realizó en bandejas plásticas cubiertas con papel film, bajo luz solar indirecta, rociando agua destilada cada 24 horas durante 3 días a temperatura ambiente ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) y con una humedad relativa entre el 80 y 90 % (Pérez-Balibrea, 2010).

Se siguió un protocolo adaptado de Yu. (2023) para la obtención del colágeno hidrolizado. Se utilizaron 1,0048 g de MTH deshidratada, la cual se sometió a hidrólisis con papaína (Centro de Investigación de Enzimología, EE. UU.) a una concentración de 7 % p/v en 30 ml de solución salina (NaCl al 0,9 % p/v). El proceso de hidrólisis de la MTH se realizó en una plancha calentadora (Fisher Scientific/11-100-49SH) manteniendo agitación magnética a 400 r.p.m y a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas a pH 6,5. La inactivación enzimática se efectuó mediante calentamiento a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. La gelificación y posterior enfriamiento permitieron la recuperación del colágeno, el cual fue almacenado a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Los germinados fueron triturados en una relación 1:0,5 (germinado:agua destilada) y mantenidos en oscuridad durante 2 horas a temperatura ambiente ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 5,61) para facilitar la hidrolización de glucosinolatos por acción de la mirosinasa y formación de sulforafano. La mezcla

fue filtrada y suspendida en etanol al 70 % (relación 1:0,5 v/v), centrifugada a 4000 rpm durante 20 minutos (Sigma/2-16P). El extracto obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su utilización.

Las formulaciones se elaboraron a partir de dos diferentes concentraciones 10 % y 20 % de colágeno extraído de la MTH, dos concentraciones para el EGB y también gelatina (5 %) y glicerina (10 %). Las PC se realizaron mediante la técnica de solución-vaciado en placa (casting).

Las soluciones filmogénicas ya formuladas se vaciaron en cajas Petri, 10 ml de solución formadora de película (SFP) por cada repetición de los tratamientos, hasta su gelificación, seguido de un secado con ventilación a 27 °C durante 24 horas en una estufa (BINDER MIDCIS). Finalmente, las películas comestibles fueron acondicionadas en un desecador con una solución saturada de cloruro de sodio (al 75 % de HR) durante 24 horas y a temperatura ambiente (23 °C $\pm$ 2 °C).

Cuantificación de proteína de la membrana testácea de huevo

La cuantificación de proteína total en el colágeno extraído de la MTH se realizó mediante el método colorimétrico de Biuret, el cual se basa en la formación de un complejo color púrpura entre los enlaces peptídicos de las proteínas y los iones cúpricos en medio alcalino (Noble & Bailey, 2009). Las absorbancias fueron registradas a una longitud de onda de 540 nm con un espectrofotómetro (JENWAY/6320D). Para ello, se utilizó una curva de calibración construida con colágeno hidrolizado comercial tipo I como estándar de referencia. Se preparó una solución madre a una concentración de 10 mg/ml disuelta en un rango de concentración de 0 a 1 mg/ml.

Caracterización de las películas

Propiedades fisicoquímicas de las soluciones formadoras de película

Las muestras fueron equilibradas a una temperatura de 32 °C antes de la medición para asegurar consistencia en las condiciones experimentales.

Viscosidad

La viscosidad de las soluciones formadoras de película (SFP) se determinó utilizando un viscosímetro rotacional NDJ-5S, de acuerdo a lo estipulado por la norma ISO 3219:1993. Se realizaron las mediciones a 32 °C, y los resultados se expresaron en mPa·s, unidad que representa la resistencia al flujo de las soluciones bajo condiciones definidas de corte. El rotor del equipo se introdujo en la SFP hasta la muesca, registrándose las lecturas emitidas. Aumentando la velocidad de rotación hasta obtener datos constantes para cada SFP por tratamiento. Esto permitió obtener una curva de viscosidad en función de la velocidad de 30 r.p.m.

pH

El pH se midió por triplicado en cada solución utilizando un pH-metro (Ac INFINITY/AC-PHM3) de alta precisión, garantizando así la exactitud en los valores obtenidos.

Propiedades ópticas

Color

El color de la PC se determinó empleando un colorímetro (Colikaminolfa/CR400). Se evaluaron las muestras con los parámetros de color empleando la escala del CIELab, Con la siguiente escala: L* = 0 (oscuro) a L* = 100 (claro); -a* = -100 (verde) a +a* = +100 (rojo), -b* = -100 (azul) a +b* = +100 (amarillo). Las mediciones se realizaron en 3 puntos de cada una de las muestras. La diferencia total de color (ΔE), se determinó tomando como referencia estándar la película control del T1 (solamente MTH) se calculó con la siguiente fórmula:

Opacidad

Se utilizó un espectrómetro (JENWAY/6320D) para obtener valores de espectroscopia UV-vis en el rango de 600 nm. Las películas se cortaron en tamaños pequeños 18 x 6 mm, colocándose en la celda del espectrofotómetro, utilizando la celda libre de cualquier sustancia como blanco de calibración. Se midieron tres muestras de cada tipo de película (Singh et al., 2020).

Propiedades físicas

Humedad

El contenido de humedad se determinó mediante la pérdida de peso que sufrió la PC con y sin EGB tras un secado de acuerdo al procedimiento explicado por Rubilar et al. (2012). Se equilibraron las películas comestibles durante tres días al 75 % de HR con NaCl. Posteriormente, las muestras fueron pesadas (P_o) en una balanza analítica modelo (Adam/PW254) con la humedad equilibrada, pasando por el proceso de secado en una estufa (Thermo/6524) de convección a 105 °C durante 24 horas y fueron nuevamente pesadas (P_f) previo enfriamiento de las muestras en una cabina al 0 % de HR para evitar su rehidratación por la humedad ambiental. Se realizaron tres repeticiones.

Solubilidad

Se determinó la solubilidad de las PC de acuerdo al método realizado por Rubilar et al. (2012) expresado como el contenido de materia seca solubilizada tras 24 horas en agitación con agua destilada. Se realizaron tres repeticiones. En primer lugar, se determinó el contenido inicial de materia secando las muestras a 105 °C en una estufa (Thermo/6524) hasta peso constante (M_i). A continuación, se pesaron las películas y se sumergieron en 25 ml de agua destilada. Finalmente, tras 24 horas en agitación se extrajo la muestra no disuelta y se volvió a secar a 105 °C hasta peso constante (M_f) para determinar el peso de la materia seca que no solubiliza en el agua.

Propiedades de barrera

El ensayo se llevó a cabo mediante un método gravimétrico, descrito por Osés Fernández. (2006) y basándose en las leyes de Fick y Henry. Se tomaron 6 mediciones del peso de cada célula preparada, incluyendo la medición inicial. Después de la primera medición, las células se colocarán dentro de la estufa (BRINDER MIDCIS), activando el ventilador a 150 m/min para asegurar la homogeneización de la HR. Se realizaron mediciones del peso de cada célula cada 2 horas, obteniendo así 5 datos por célula.

Propiedad antioxidante

La capacidad antioxidante de las PC proporcionadas con CMTH y varias concentraciones de EGB fue calculada por medio del ensayo del radical libre ABTS $\bullet^+$, conforme al procedimiento establecido por Re et al. (1999) y adecuado por Urrutia (2010). Basándose este método en reducir el radical catiónico ABTS $\bullet^+$, visto fácticamente por el surgimiento de zonas decoloradas (halos) alrededor de la PC con actividad antioxidante.

Para la preparación del radical, se disolvieron 0,384 g de ABTS (7 mM) y 0,0663 g de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) (2,45 mM) en 100 ml de agua destilada. La mezcla fue homogeneizada y almacenada en oscuridad a temperatura ambiente durante 12 a 16 horas, a fin de permitir la formación completa del radical.

Posteriormente, se elaboraron 400 ml de agar técnico al 1,5 % p/v (15 g/l), calentando la mezcla en un matraz Erlenmeyer sobre una placa calefactora (Fisher Scientific/11-100-49SH) con agitación

constante hasta ebullición. Una vez enfriada a 50 °C, se añadió el 20 % v/v de la solución de ABTS^{•+}. Se distribuyeron 8 ml de esta mezcla en placas Petri estériles, permitiendo su solidificación a temperatura ambiente.

Una vez solidificado el medio, se colocaron sobre la superficie discos de 17 mm de diámetro obtenidos con sacabocados a partir de películas activas formuladas con 0 %, 3 % y 5 % de EGB. Para cada tratamiento se realizaron tres réplicas.

El análisis consistió en medir el diámetro de los halos de decoloración formados en torno a los discos, en distintos intervalos de tiempo: 0, 10, 60, 120, 180, 240 y 1440 minutos (24 h). Estas mediciones permitieron cuantificar la velocidad y el grado de neutralización del radical ABTS^{•+} por los compuestos antioxidantes presentes en las películas. Durante todo el ensayo, las placas fueron mantenidas en oscuridad total para evitar la fotodegradación del radical.

La reacción de ABTS y el K₂S₂O₈ fue de 1:0.5 se conoció la concentración de ABTS y K₂S₂O₈; con los que se calcularon los moles de ABTS^{•+}. El ABTS^{•+} añadido en el agar técnico fue de un 20 % (v/v) y cada placa contenía 8 ml de mezcla, mediante el volumen de ABTS^{•+} añadido y el reducido (diámetros de halos) se calculó los µmoles de ABTS^{•+} reducido. Las placas de Petri de 100 mm contenían 39,2 µMoles de ABTS^{•+}.

Propiedad antimicrobiana

Método de difusión en agar

La actividad antimicrobiana de las PC se evaluó mediante el ensayo de difusión en agar, el cual permite medir la capacidad de los compuestos bioactivos presentes en las películas para inhibir el crecimiento microbiano. En este estudio, se utilizaron las cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, ambas reconocidas como indicadores de contaminación en alimentos (Puišo et al., 2024).

Para el ensayo, se obtuvieron discos de 17 mm de diámetro a partir de cada formulación de PC utilizando un sacabocados estéril. Los discos fueron colocados en placas Petri con medio de cultivo sólido (Agar Salmonella Shigella y Agar Mac Conkey), previamente inoculado en una cámara de flujo laminar (BIOBASE/BBS-H1300-P) con suspensiones bacterianas a una concentración de 10⁸ UFC·ml⁻¹ de cada cepa.

Las placas se incubaron a una temperatura de 27 °C ± 3 °C durante 24 horas en condiciones asépticas en una incubadora (Mettler). Cada tratamiento se realizó por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición alrededor de cada disco, las cuales fueron 3 medidas a las 24, 48 y 72 horas.

Para una cuantificación más objetiva, las zonas de inhibición fueron expresadas como áreas (mm²), descontando el área del disco correspondiente a un disco de 17 mm de diámetro para reflejar únicamente el efecto inhibidor del material (Otero Tuárez, 2019).

Análisis estadístico

Los resultados de los análisis de las propiedades de las PC se realizaron por triplicado y se sometieron al análisis de varianza (ANOVA), mediante la comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer empleando un nivel de significancia $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat. Los resultados se presentaron como el valor promedio ± la desviación estándar. Las

formulaciones de las PC se evaluarán en función de las variaciones entre las concentraciones de EGB y de concentraciones del colágeno hidrolizado de la MTH. Como se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulaciones de las SFP elaboradas con EGB Y CHMTH.

T	%EGB	%CMTH	%Glicerina	%Gelatina
T ₁	0	10	10	5
T ₂	0	20	10	5
T ₃	3	10	10	5
T ₄	3	20	10	5
T ₅	5	10	10	5
T ₆	5	20	10	5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de proteína de la membrana testácea de huevo

Los resultados obtenidos mediante el método colorimétrico de Biuret se representan en la Fig.1. Se observó que la concentración de colágeno indicadas en las curvas de absorbancia a 540 nm mostró que el CHMTH presentó valores significativamente más altos ($p < 0,05$) en todas las concentraciones evaluadas, alcanzando un valor máximo de absorbancia de 0,2 a una concentración de 1 mg/ml de la solución proteica, mientras que el colágeno hidrolizado comercial (CHC) solo alcanzó un nivel máximo de absorbancia cercana a 0,16 bajo las mismas condiciones.

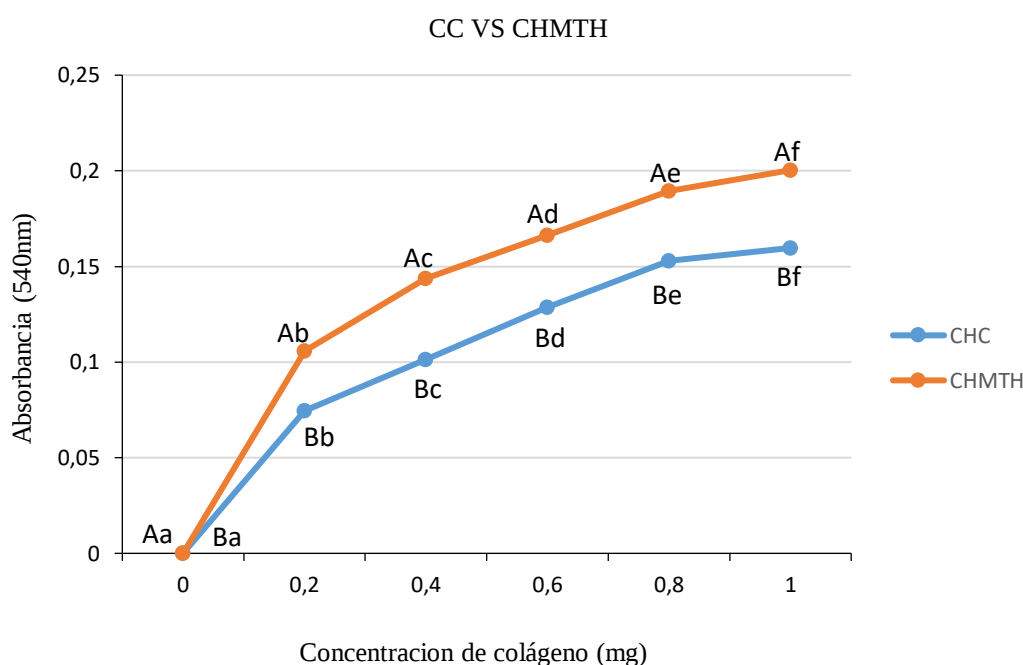


Figura 1. Curvas de cuantificación de proteína en CHC y CHMTH extraída por hidrólisis enzimática utilizando la enzima papaína.

La hidrólisis enzimática utilizada en la extracción de CMTH demostró ser claramente más eficaz que métodos químicos convencionales, revelando ventajas fundamentales en rendimiento, integridad proteica y especificidad funcional. Estudios recientes como el de Pasarín et al. (2023) utilizaron hidrólisis enzimática en MTH, obteniendo un grado de hidrólisis del 14 % incluyendo hidroxiprolina y aminoácidos esenciales, lo que garantiza alta pureza y funcionalidad del colágeno extraído. A su vez, Deng et al. (2022) comparó proteasas como pepsina, papaína y tripsina para hidrolizar MTH,

determinando que papaína logró una tasa de extracción de colágeno del 9,44 %, aproximadamente tres veces superior a tripsina.

En contraste con el método químico, como hidrólisis ácida y alcalina estos degradan aminoácidos sensibles y reduce la calidad del colágeno, afectando su comportamiento funcional y nutricional. Se reportó en la literatura (tabla 2) ventajas y desventajas de los métodos de hidrólisis.

Tabla 2. Métodos de hidrólisis habituales para la obtención de colágeno hidrolizado.

Métodos	Ventajas	Desventajas	Referencia
Hidrólisis ácida	Rendimiento alto, con máxima pureza.	Desnaturalización del colágeno, se requiere un ajuste delicado del pH para no reducir el % final.	Matinong et al., (2022); Cao et al., (2023)
Hidrólisis alcalina	Solubilidad constante del colágeno más rápida que con la hidrólisis ácida.	Necesidad de equilibrar precisamente el pH y tiempo de reacción para evitar la sobre hidrólisis y degradación.	Dhakal et al., (2018) ;Matinong et al., (2022)
Hidrólisis enzimática	Un rendimiento superior obteniendo una mejor selección de reacción, siendo menos agresiva en el colágeno.	Alto coste de enzima especializada.	Yan et al., (2015)

Estos resultados, también concuerdan con el estudio de Walaiporn Ponkham et al. (2011), quienes extrajeron colágeno de membrana testácea mediante ácidos orgánicos, logrando una recuperación proteica significativa pero no tan alta como en la hidrólisis enzimática de Deng et al. (2022). Dichos autores, obtuvieron un rendimiento proteico de colágeno de 9,44 % en hidrólisis enzimática en contraste con la hidrólisis ácida de 1,17 % de colágeno confirmando que esta biomasa es una fuente rica y viable de colágeno en extracción enzimática. Comparando el CHC, comúnmente empleado en la formulación de películas comestibles, estudios recientes como el de Han et al. (2023) reportaron concentraciones significativamente menores, con valores entre el 7,75 % y 8,15 % en comparación con el CHMTH de los autores anteriormente mencionados. Esta disminución se atribuye al mayor grado de hidrólisis del CHC, el cual fragmenta extensamente las cadenas polipeptídicas, reduciendo la disponibilidad de grupos peptídicos intactos que pueden reaccionar con el reactivo de Biuret. En cambio, el colágenos extraído mediante métodos enzimáticos más suaves, como el utilizado en la MTH, los cuales conservan una mayor proporción de enlaces peptídicos estructurales, lo que resulta en una mayor eficiencia de detección proteica mediante el método de Biuret. Esto podría explicar por qué el CHC, aunque procesado industrialmente, presenta una menor señal colorimétrica.

El método de Biuret mostró mayor efectividad con CHMTH que con CHC, lo cual se explica por varios factores: primero, CHMTH contiene una alta proporción de colágeno tipo I intacto y péptidos de mayor peso molecular, lo que incrementa el número de enlaces peptídicos disponibles para reaccionar con el cobre del reactivo de Biuret, resultando en una absorbancia más elevada (Surangna y Kumar, 2016). Por el contrario, el CHC, al estar industrialmente hidrolizado, contiene mayor cantidad de péptidos pequeños o aminoácidos libres, que reaccionan pobremente con Biuret debido a la menor densidad de enlaces peptídicos. Además, estudios de extracción enzimática señalan que no solo aumenta el rendimiento proteico sino también la calidad estructural del producto final, favoreciendo así lecturas colorimétricas más precisas y cuantificables (Nur et al., 2022; Liang et al., 2025). Los datos obtenidos respaldan que la membrana testácea de huevo, al ser debidamente hidrolizada, representa una

alternativa efectiva al colágeno comercial, ofreciendo mayores niveles de proteína útil para la formulación de películas comestibles, como también lo indican los autores mencionados.

Propiedades fisicoquímicas

Viscosidad

Los valores de la viscosidad se expresan en la Fig 2. Las SFP a base de CHMTH al 10% (260 mPa·s) y al 20% (264 mPa·s) y sin EGB presentaron las viscosidades más altas sin diferencia significativa entre ellas ($p > 0,05$) respecto al porcentaje de CHMTH, mientras que aquellas con adición de EGB con concentraciones del 3 % y 5 % mostraron una drástica reducción en viscosidad, siendo estas significativamente diferentes ($p < 0,05$) a los valores observados en el grupo control sin EGB. Estos resultados pueden explicarse por la capacidad estructurante del CHMTH y la gelatina, que al encontrarse en solución sin extractos vegetales, permite la formación de redes proteicas densas y viscosas. Según Sun et.al. (2016) la presencia de enzimas proteasas presentes en el EGB (16,9 U/g) interfieren con la conformación estructural del colágeno, disminuyendo su capacidad de formar redes viscosas al interrumpir puentes de hidrógeno, lo que genera un comportamiento más fluido dando una baja viscosidad.

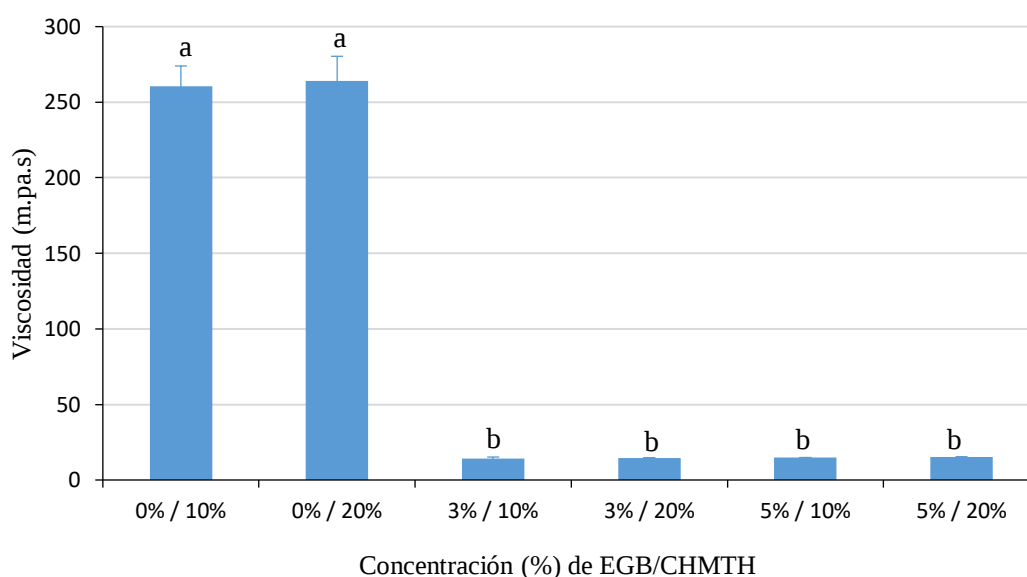


Figura 2. Viscosidad de las SFP a base de CHMTH sin y con EGB.

Fakhouri et.al. (2015) encontraron que soluciones filmógenas de proteínas como colágeno o gelatina presentan comportamiento pseudoplástico, y que la viscosidad puede reducirse notablemente cuando se incorporan otros compuestos que alteran su red molecular, debido a la presencia de enzimas u otros compuestos presentes en los extractos vegetales. Por tanto, los datos sugieren que la mayor viscosidad observada en los tratamientos de control puede deberse a la presencia de péptidos que conforman parte del colágeno de mayor peso molecular o mayor capacidad de interacción, mientras que el EGB debilita e hidroliza ligeramente el colágeno, reduciendo la viscosidad general de las SFP. Este comportamiento coincide con lo reportado por los autores anteriormente mencionados en sistemas colagénicos funcionales y apoya la conclusión de que las SFP con EGB tienen un comportamiento newtoniano de tipo pseudoplástico, característico de soluciones proteicas complejas utilizadas en PC.

pH

En la evaluación del pH las SFP a 32 °C (Fig.3), se observaron valores que oscilaron entre 5,98 y 6,35, dependiendo de la concentración de CHMTH y EGB. Las formulaciones que contenían únicamente 0



% de EGB en proporciones del 10 % (6,35) y 20 % (6,24) de CHMTH presentaron los valores de pH más altos y fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) del resto, mientras que aquellas que incluían 3 % y 5 % de EGB mostraron una ligera reducción de 6 en el pH. Esta disminución se atribuiría al pH natural del EGB siendo este 6,06 que, al ser incorporado a las SFP, acidificó levemente la mezcla. Sin embargo, el colágeno hidrolizado y la gelatina, compuesto por aminoácidos con grupos funcionales, contribuyó a estabilizar el pH, evitando descensos más marcados.

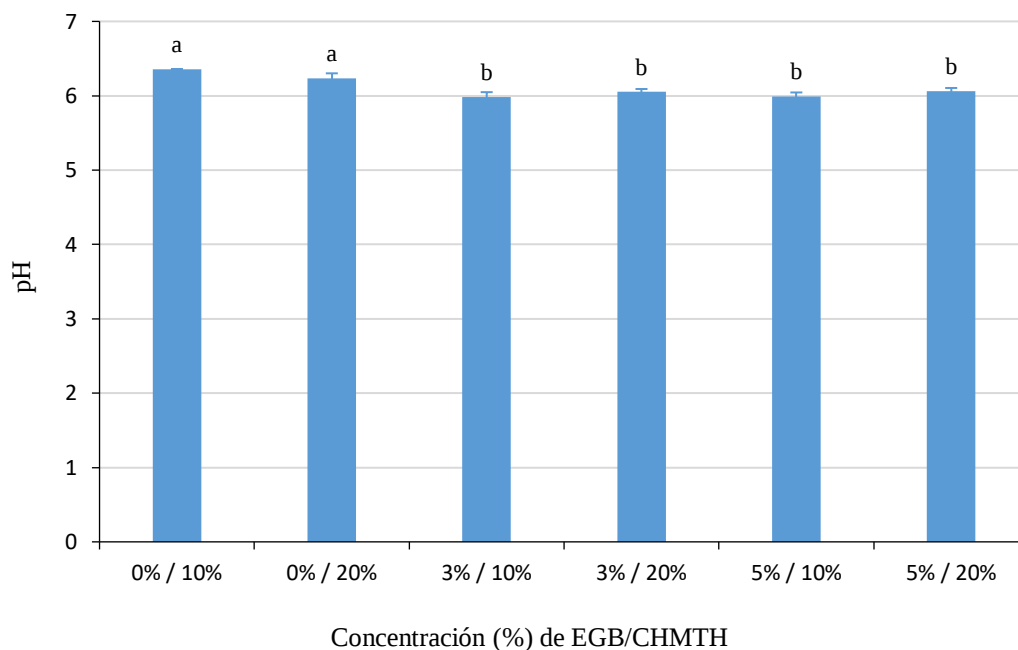


Figura 3. pH de la SFP a base de CHMTH sin y con EGB en función de las concentraciones de colágeno.

Este comportamiento es coherente con estudios recientes (Gioffre et.al, 2012; Okutan et.al, 2025) reportaron que las películas comestibles elaboradas con colágeno tienden a mantener un pH en el rango de 5,5 a 6,5, incluso tras la incorporación de extractos vegetales, gracias al efecto tamponante de las cadenas proteicas, lo que concuerda con la ligera variación observada en las SFP. Los resultados indican que, aunque la incorporación de EGB influye ligeramente en el pH, todas las formulaciones se mantienen dentro de un intervalo adecuado para la estabilidad de las PC, sin afectar negativamente su funcionalidad.

Espesor

Los resultados obtenidos muestran una clara influencia del contenido de EGB sobre las PC a base de CHMTH y gelatina (Fig. 4). Las formulaciones sin EGB con CHMTH presentaron los menores espesores al 10% (343 μm) y 20% (141 μm), sin diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$). Esto sugiere que la presencia de CHMTH y gelatina por sí sola no incrementa considerablemente el espesor, probablemente por la estructura proteica no suficientemente densa al no combinarse con los compuestos bioactivos del EGB. Pero al introducir EGB al 3 % junto con CHMTH (10 % y 20 %), el espesor paso a $\sim 450 \mu\text{m}$ aumentando significativamente ($p < 0,05$), con una diferencia marcada respecto a las formulaciones sin EGB, lo que sugiere la existencia de una sinergia entre los compuestos del EGB y las proteínas del CHMTH y gelatina, formando una matriz más gruesa. Finalmente, las formulaciones con 5 % de EGB alcanzan los mayores espesores ($\sim 470 \mu\text{m}$), con diferencias significativas ($p < 0,05$) según el contenido de CHMTH. La muestra con 5 % EGB y 20 % CHMTH, presenta la mayor densidad de componentes estructurales, mostrando el mayor espesor siendo diferentes a las demás, lo que demuestra una relación directa entre la concentración de EGB y CHMTH respecto al espesor final.

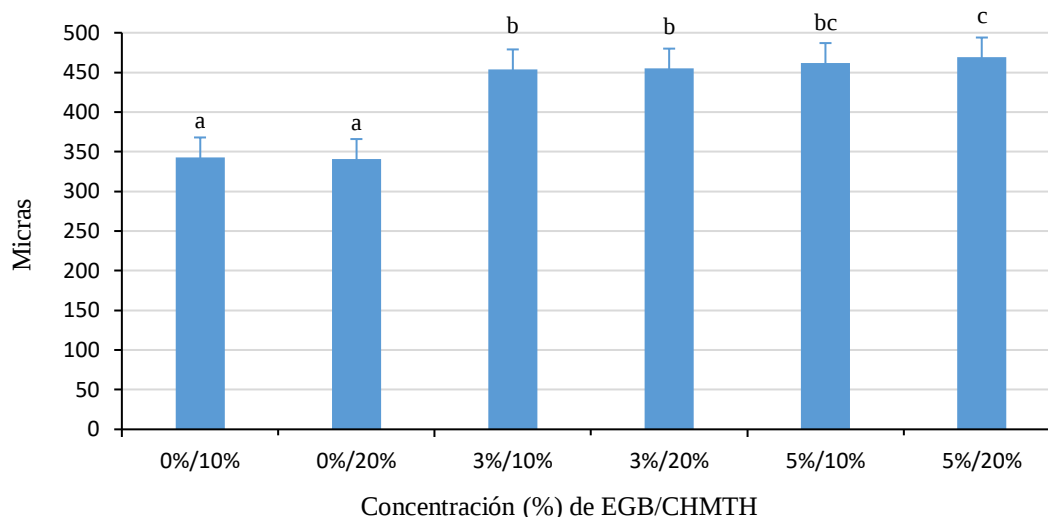


Figura 4. Espesor de las PC elaboradas con diferentes combinaciones de CHMTH y EGB.

Estos hallazgos son similares con estudios previos Okutan et al. (2025), señala que las películas basadas en proteínas animales como la gelatina (análoga al colágeno hidrolizado) presentan espesores que oscilan entre 200 y 450 μm , dependiendo de la concentración de polímero y plastificante, lo que coincide con las observaciones al incrementar el CHMTH. En relación al EGB, aunque pocos estudios analizan su aplicación directa en películas, la literatura sobre extractos de brócoli evidencia su riqueza en compuestos fenólicos, capaces de formar redes tridimensionales más compactas (Hamed et.al, 2023).

Propiedades ópticas

Color

El efecto de las distintas concentraciones de EGB y CHMTCH en las PC se presenta en la Tabla 3.

El análisis de los valores de color (L^* , a^* , b^* , ΔE) revela tendencias interesantes en función de las concentraciones de EGB y CHMTH. Para L^* , los valores disminuyen ligeramente al aumentar ambas concentraciones, pasando de $88,46 \pm 1,15$ (0 %/20 %) a $84,98 \pm 0,83$ (5 %/20 %). Este descenso sugiere una opacidad o tono más oscuro con mayor contenido funcional, estos valores fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$). Este comportamiento coincide con reportes en PC de Gómez et al. (2024) donde también se aprecia una disminución de L^* , atribuida a la interacción del polímero con compuestos fenólicos.

Tabla 3. Determinación de color (L^* , a^* , b^*) en los diferentes tratamientos.



Películas EGB/CHMTH	L	a	b	ΔE
0% / 10%	87,53±1,90 ^{bc}	1,27±0,13 ^{ab}	1,54±0,85 ^a	
0% / 20%	88,46±1,15 ^c	1,41±0,07 ^b	0,71±0,34 ^{ab}	2,44±1,97 ^a
3% / 10%	86,13±1,03 ^{abc}	1,25±0,08 ^{ab}	1,94±0,42 ^{bc}	2,16±0,80 ^a
3% / 20%	86,56±2,04 ^{abc}	1,21±0,07 ^a	2,1±0,35 ^{bc}	2,37±1,56 ^a
5% / 10%	85,75±1,39 ^{ab}	1,12±0,17 ^a	2,74±0,80 ^{bc}	3,31±2,06 ^a
5% / 20%	84,98±0,83 ^a	1,19±0,08 ^a	2,41±0,5 ^c	3,46±1,50 ^a

Con respecto a la coordenada de a^* , se observa un incremento en rojo con 0 %/20 % ($1,41 \pm 0,07$) frente a 5 %/10 % y 5 %/20 % ($1,12 \pm 0,17$; $1,19 \pm 0,08$), marcando también una diferencia significativa ($p < 0,05$). Esto refleja cómo distintas concentraciones alteran matices, probablemente debido a complejos entre pigmentos del EGB y CHMTCH.

El parámetro b^* presenta mayor complejidad: desde $0,71 \pm 0,34$ (0 %/20 %) hasta $2,74 \pm 0,80$ (5 %/10 %), con diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). Esta elevada variabilidad puede atribuirse a la liberación de clorofila y compuestos amarillentos del germinado.

Curiosamente el ΔE , no muestra diferencias significativas estadísticamente entre tratamientos ($p > 0,05$), con valores moderados entre $2,16 \pm 0,80$ y $3,46 \pm 1,50$. Esto indicaría que, a pesar de tener datos heterogéneos en L^* , a^* y b^* , el cambio general del color en las PC se podría considerar y estimar como perceptible al ojo humano pero no tan significativo, alineado con evidencias de PC a base de gelatina donde la ΔE no demostró tener cambios bruscos tras la adición de extractos vegetales (Revutskaya et al., 2024a).

Las PC presentan cambio de matices o tonalidades pero estadísticamente notables en los parámetros L^* , a^* y b^* , particularmente cuando el CHMTCH y EGB son superiores. Sin embargo, el ΔE general permanece estable, lo que concuerda con estudios actuales que proponen que la funcionalización con compuestos de extractos vegetales pueden cambiar las características ópticas sin involucrar la apariencia visual global.

Transparencia

Los resultados muestran que la transparencia de las PC en los tratamientos con EGB y CHMTH están ligadas a la concentración de los componentes y de su comportamiento a nivel molecular (Fig. 5). El EGB suministra clorofila, el cual es un pigmento natural de las plantas y también fitonutrientes como sulforafano y fenoles que mejoran la dispersión y disminuyen la turbidez, lo que concuerda con estudios previos basados en la aplicación en emulsiones. La adición de CHMTH aporta péptidos que tienden a mejorar la solubilidad y ayudan a mantener la claridad a concentraciones moderadas (León-López et al., 2019a). Sin embargo, al elevar la concentración de colágeno al 20 %, es posible que se formen agregados proteicos que incrementan ligeramente la absorbancia. Esto se observa al comparar los tratamientos 3 %/10 % y 3 %/20 %, donde la transparencia es máxima y ligeramente diferente que el control (0 %/10 %), pero la diferencia entre 10 % y 20 % es mínima. En situaciones con mayores niveles de extracto (5 %), el efecto clarificante tiende a disminuir. Pero entre todos los tratamientos no muestra diferencias significativas estadísticamente ($p > 0,05$), lo que sugiere que el extracto juega un rol principal y el colágeno un efecto modulador.

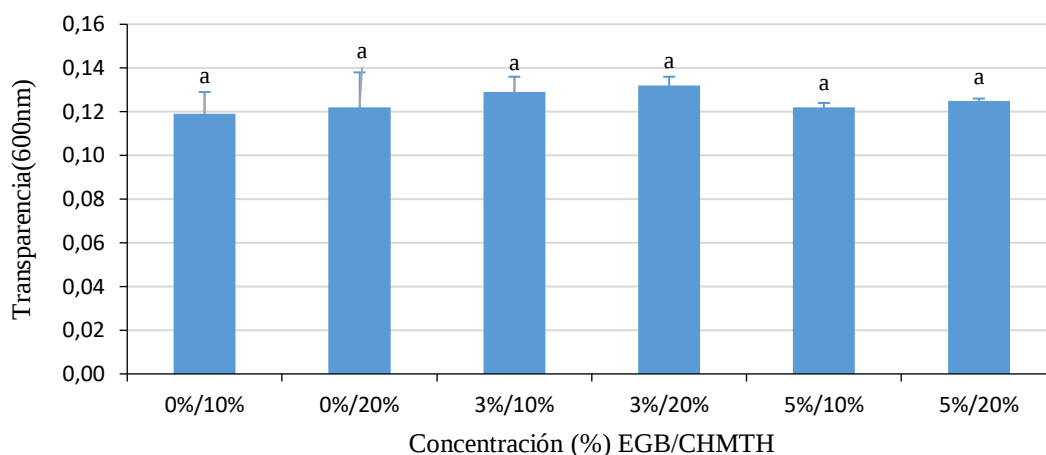


Figura 5. Valores de transparencia de las PC según la proporción de EGB y CHMTH.

Estudios sobre colágeno demuestran que su eficacia depende del origen y el grado de hidrólisis, lo cual coincide con la mejora de solubilidad reportada, siempre que no se formen agregados (León-López et al., 2019a). Además, trabajos con hidrolizados de membrana de huevo muestran limitaciones en solubilidad en donde analizan la estructura de la membrana encontrando numerosos puentes disulfuro que dificultan su disolución, reforzando que la claridad de las soluciones dependerá en gran medida del manejo del EGB (Han et al. 2023). La combinación óptima observada fue (3 % extracto + 20 % colágeno) maximiza mecanismos de dispersión y solubilidad sin inducir opacidad, proporcionando una formulación con transparencia superior y estable en comparación con los demás tratamientos.

Ciurzyńska et al. (2024) reportaron que las PC elaboradas con proteína de colágeno de origen bovino fueron muy transparentes, concordando con este trabajo, en donde se observó que la combinación de 3 % de EGB y del 10–20 % de CHMTH fueron más transparentes en relación a los otros tratamientos (0-5 % EGB). Esto sugiere que, a diferencia del colágeno que dispersan la luz, el extracto vegetal actuó como estabilizador óptico. Además, el colágeno hidrolizado mostró buena compatibilidad sin generar agregados visibles que disminuyan la claridad. Por tanto, la formulación evaluada demuestra ser más efectiva para conservar la transparencia.

Propiedades físicas

Humedad

Bajo condiciones del 75 % de HR, se observa que el contenido de humedad de las PC a base de CHMTH y gelatina varía con la presencia de las diferentes concentraciones de EGB y de CHMTH (Fig. 6). En las formulaciones sin la presencia de EGB al 0 %/10 % y 0 %/20 %, el porcentaje de humedad se estabilizó entre 55,40-53,67 %, respectivamente. Sin embargo, al incorporar el 3 % y 5 % de EGB junto con 10 % y 20 % CHMTH, el porcentaje de humedad se elevó a aproximadamente 67–70 % en los demás tratamientos, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los tratamientos sin EGB. Esta tendencia puede deberse por la presencia de grupos funcionales como hidroxilos y aminoácidos derivados del CHMTH que se interrelacionan con los compuestos polifenólicos presentes del EGB, fomentando una elevada capacidad de retención de agua. En biopelículas basadas en polisacáridos o proteínas, es ampliamente conocido que la adición de agentes hidrofílicos incrementa la capacidad de retención de humedad (Hamed et.al, 2023), donde la incorporación de extracto de brotes de brócoli en películas de carboximetilcelulosa-ALV/PVA aumentó la humedad de las PC.

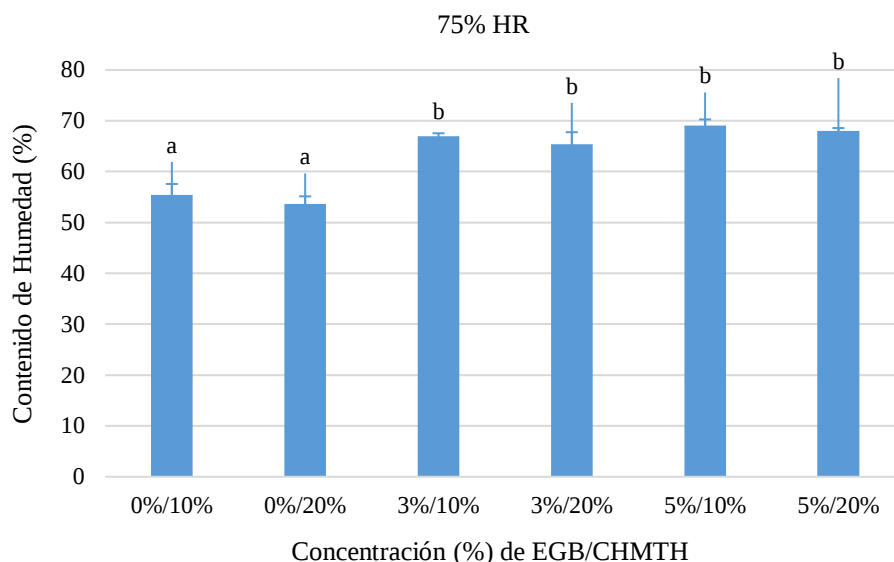


Figura 6. Contenido de humedad de las PC a base de EGB Y CHMTH bajo condiciones controladas de humedad relativa (75 % HR).

Asimismo, (Sayanjali et.al, 2024) reportaron que los procesados con mayor contenido de componentes como celulosa o CMC derivados de brócoli demostraron tener humedad más altas debido al incremento de grupos carboximetilo y fenólicos, lo que refuerza que los compuestos vegetales derivados del brócoli aumentan la afinidad al agua.

El CHMTH aporta una matriz proteica capaz de retener agua a través de enlaces de hidrógeno, mientras que el EGB complementa con compuestos hidrofílicos y bioactivos. Estas características explican el aumento en el contenido de humedad observado. Además, la incorporación de extractos vegetales tiende a modular la microestructura de la película y favorecer una mayor retención de humedad, lo que coincide con los resultados de Sayanjali et al. (2024) sobre la variación de propiedades físicas y morfología de películas con extracto de brócoli.

Solubilidad de las películas comestibles en agua

Los resultados obtenidos en la figura 7 en donde se evaluó la solubilidad de las películas comestibles en agua elaboradas con diferentes proporciones de CHMTH y EGB, mostraron valores comprendidos entre 46,72 % y 51,63 %, pero estas no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$). Sin embargo, se observó una tendencia que las películas con EGB fueron más solubles en agua. Las formulaciones sin EGB (0 %) y las que contenían 3 % de EGB mantuvieron una solubilidad en agua superior al 50 %, siendo esta no significativamente diferente a los demás tratamientos ($p > 0,05$). Aquellas con 5 % de EGB, en combinación con 10 % y 20 % de CHMTH, presentaron una ligera disminución no significativa entre ellas ($p > 0,05$). Esta estabilidad en la solubilidad sugiere que, aunque los compuestos bioactivos presentes en el EGB podrían favorecer interacciones hidrofóbicas o reticulaciones leves, su efecto no es lo suficientemente intenso como para alterar drásticamente la capacidad de solubilización de la película. La naturaleza hidrofílica del colágeno hidrolizado, con predominancia de grupos polares en su estructura, favorece la interacción con el agua y, por ende, una solubilidad moderada.

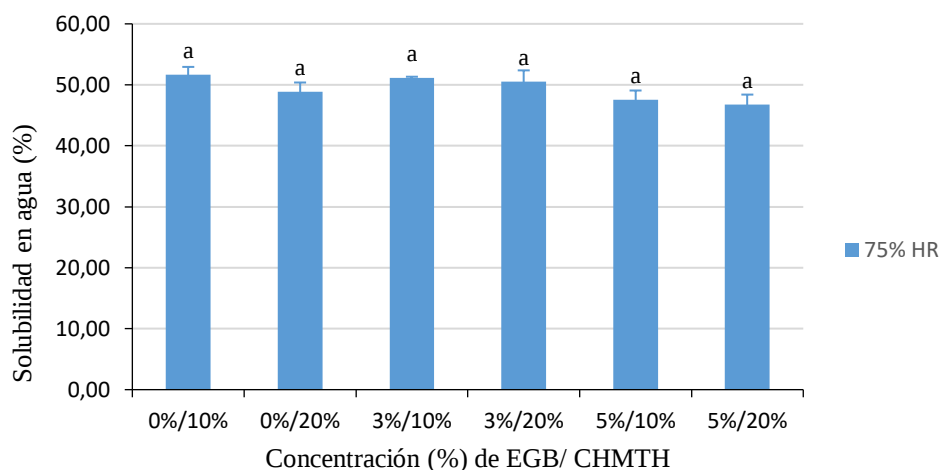


Figura 7. Solubilidad de las PC en agua destilada tras 24 horas de inmersión, según tratamiento con EGB y CHMTH.

Las observaciones son consistentes con lo reportado por Mokrejš et al. (2021), quienes formularon películas comestibles a base de gelatina, una proteína derivada del colágeno con diferentes plastificantes e incorporando extracto de té verde. En este estudio, las películas con extractos vegetales y glicerol como plastificante presentaron solubilidades entre 42,71 % y 52,69 %, respectivamente; dependiendo del tipo y concentración de plastificante utilizado. Al igual que en las PC con EGB y CHMTH, observaron que la adición de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante podría influir en la solubilidad, pero no siempre de forma significativa, ya que el grado de interacción proteína-extracto depende del tipo de proteína, su conformación y el medio de dispersión.

La comparación refuerza que el rango de solubilidad obtenido en la investigación es adecuado y funcional, especialmente en contextos donde se busca una liberación controlada de compuestos bioactivos como en este caso. Además, estos resultados sugieren que la incorporación de extractos vegetales como el EGB no compromete significativamente la solubilidad de las PC, lo que representa una ventaja tecnológica en el diseño de películas comestibles con propiedades bioactivas.

Propiedades de barrera

En el estudio, se observó que las PC con solo CHMTH provocaron una disminución de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) al aumentar la concentración de proteína del 10 % al 20 % (0,13-0,09 g·mm/kPa·h·m²) no siendo significativamente diferentes ($p > 0,05$), lo que sugiere que una matriz proteica más densa dificulta el paso del vapor. Esto concuerda con estudios previos, que muestran cómo redes proteicas compactas reducen la porosidad y mejoran la barrera al agua en películas comestibles (Mohamed et al., 2020). Al incorporar 3 % de EBG, se obtiene una WVP elevada de 0,20 g·mm/kPa·h·m² en combinación con 10 % CHMTH, indicando que el EBG interfiere con la formación de la red proteica, generando una estructura más abierta y permeable, siendo esta significativamente diferente a los demás tratamientos ($p < 0,05$). Este comportamiento coincide con estudios sobre proteínas y polifenoles que muestran que, a baja concentración o sin la cantidad adecuada de agente entrecruzante, pueden ocurrir perturbaciones estructurales que incrementan la permeabilidad (Chen et al., 2022).

Sorprendentemente, las formulaciones con 3 % y 5 % de EBG con 20 % de CHMTH mostraron una WVP casi nula, lo que indica que no tienen diferencias significativas entre estos tratamientos ($p < 0,05$) creando una barrera al vapor de agua eficiente. La combinación e interacción de elevadas concentraciones de proteína en este caso el colágeno y extracto vegetal posiblemente fomente las

reacciones de entrecruzamiento covalente y no covalente entre el EBG y CHMTH, creando una red reticulada tridimensional densa. Coincidiendo con estudios recientes que reportan una mejora significativa de las PC creadas con proteínas en las propiedades de barrera cuando se mezclan polifenoles y extractos vegetales (Zhao et al., 2022).

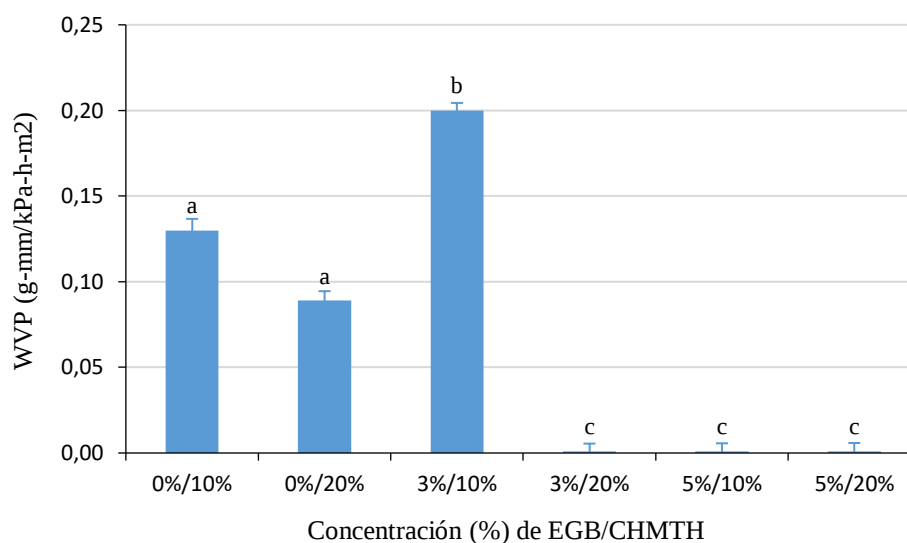


Figura 8. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de PC a base de CHMTH y EGB.

(Sobral et al., 2001) informan que películas proteicas con WVP entre 0,1 y 0,3 g·mm/kPa·h·m² pueden mejorar drásticamente al reforzar la matriz o añadir compuestos antioxidantes. Los resultados en las formulaciones con 0 %/10 %, 0 %/20 % y 3 %/10 % se ubican dentro de ese rango, pero las formulaciones con EBG ≥ 3 % y CHMTH al 20 % superan ampliamente estos valores, alcanzando prácticamente un efecto barrera total. Estudios sobre películas fitoactiva-proteicas muestran que la interacción proteína-polifenol puede reducir significativamente la WVP, mejorar la resistencia mecánica y la estabilidad térmica gracias a entrecruzamientos de polifenoles orto-dihidroxilados, que estabilizan la red tridimensional (Yang et al., 2025).

Queda evidenciado que los resultados manifiestan que el EBG no solo tiene la capacidad de aportar capacidad antioxidante, sino que, en sinergia con CHMTH, actúa como un agente entrecruzante natural mejorando la barrera al vapor de agua. Esta mejoría está apoyada por literaturas recientes en films realizados con proteínas y plantas, donde los extractos vegetales con polifenoles interactúan con la matriz proteica reduciendo así la permeabilidad al vapor de agua reforzando su estructura (Liu et al., 2023).

Capacidad antioxidante de las películas comestibles

En la Fig 9 se presentan las áreas de reducción de ABTS representados por los halos transparentes formados como resultado de la migración y acción reductora de dichos de los compuestos presentes en los EGB. La evaluación de la capacidad antioxidante (CA) se llevó a cabo mediante un ensayo basado en la reducción del radical catiónico ABTS•+, el cual se encontraba inmovilizado en una solución gelificante. La interacción de los compuestos antioxidantes liberados desde las películas activas con el radical generó un cambio cromático visible, pasando de un tono azul a incoloro. Este cambio permitió cuantificar la actividad antioxidante en función del área de transparencia generada.

Una mayor superficie transparente fue indicativa de una alta difusión de compuestos antioxidantes desde las PC, lo que refleja un potente efecto antioxidante.

Dado que la difusión de los antioxidantes de las PC ocurre de forma lenta, las mediciones se realizaron delimitando únicamente la zona en la cual el ABTS•+ fue completamente reducido, es decir, el área completamente decolorada. Los intervalos de evaluación fueron establecidos cada 60 minutos hasta cumplir 4 horas y después fueron medidos a las 24 horas, con base en la cinética de liberación de los agentes antioxidantes presentes en las películas. Durante el periodo de 4 horas no se observaron variaciones muy marcadas en el diámetro de los halos, atribuibles a la liberación lenta y progresiva de compuestos bioactivos del EGB, siendo no significativamente diferente entre estos tiempos ($p > 0,05$) pero las mediciones más visibles fueron las de 24 horas teniendo una mayor reducción, estas siendo significativamente diferente ($p < 0,05$) a los demás tiempos medidos y a las concentraciones con y sin EGB estipuladas. Según Fahey et al. (1997), los brotes de 3 días de brócoli presentan niveles elevados de glucorafanina, precursor del sulforafano, esta concentración de compuestos en el EGB pudo tener un efecto lento en función de su acción. La superficie calculada para cada intervalo corresponde exclusivamente al área reducida, excluyendo la superficie ocupada por el disco de muestra.

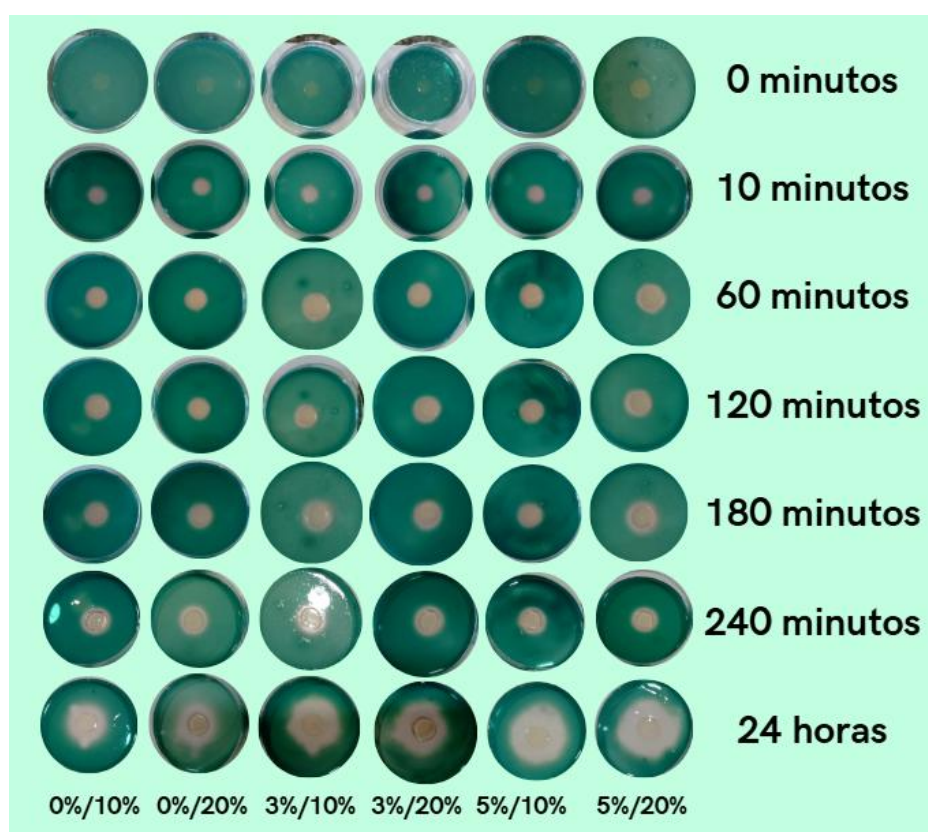


Figura 9. Actividad antioxidante de las PC activas basadas en colágeno hidrolizado de membrana testácea de huevo (CHMTH): 10 % y 20 %.

En la figura 10 se observa que el EGB contenido en las películas reducía el ABTS•+ a medida que aumentaba la concentración, pero esta reducción fue muy lenta en todos los tratamientos. Los tratamientos sin EGB (0 %/10 % y 0 %/20 %) no presentaron ninguna capacidad antioxidante inicial (0 mm²), confirmando que el CHMTH no actuó de forma inmediata para reducir ABTS•+. En cambio, las formulaciones con 3 % y 5 % de EGB ya muestran actividad incipiente a los 10 minutos (1 mm²; 0,01 μMoles de ABTS•+ reducido), lo que indica una rápida liberación del compuesto hidrosolubles presentes en el extracto.



Se observó un incremento sostenido en el área reducida, especialmente en los tratamientos con 3 % y 5 % de EGB. Las formulaciones con 5 % de EGB alcanzan los valores más altos en menor tiempo, lo cual se explica por su mayor carga de compuesto bioactivo (sulforafano), cuya alta solubilidad en medio acuoso permite una difusión rápida a través del gel. A partir de los 180 minutos, la mayoría de los tratamientos entran en una fase de estabilización, sin aumentos significativos en la reducción del ABTS^{•+}. Esto sugiere que los compuestos antioxidantes de liberación rápida ya han difundido y reaccionado, y la matriz polimérica entra en una etapa de retardo, donde la liberación se ve limitada por la estructura de la película.

A las 24 horas, los resultados muestran una clara diferenciación entre tratamientos; sin EGB (0 %): solo alcanzan (5 mm²; 0,03 μMoles de ABTS^{•+} reducido), indicando una actividad atribuible posiblemente a la presencia de péptidos con propiedades antioxidantes que fueron liberados en el proceso de hidrólisis de la MTH; con 3 % EGB: casi duplican los valores de los controles (9 mm²; 0,06 μMoles de ABTS^{•+} reducido), evidenciando una mejora clara pero moderada; 5 % EGB: duplican la capacidad antioxidante respecto al 3 %, alcanzando (19,3 mm²; 0,14 μMoles de ABTS^{•+} reducido), mostrando una liberación prolongada y sostenida, ideal para aplicaciones en envases activos.

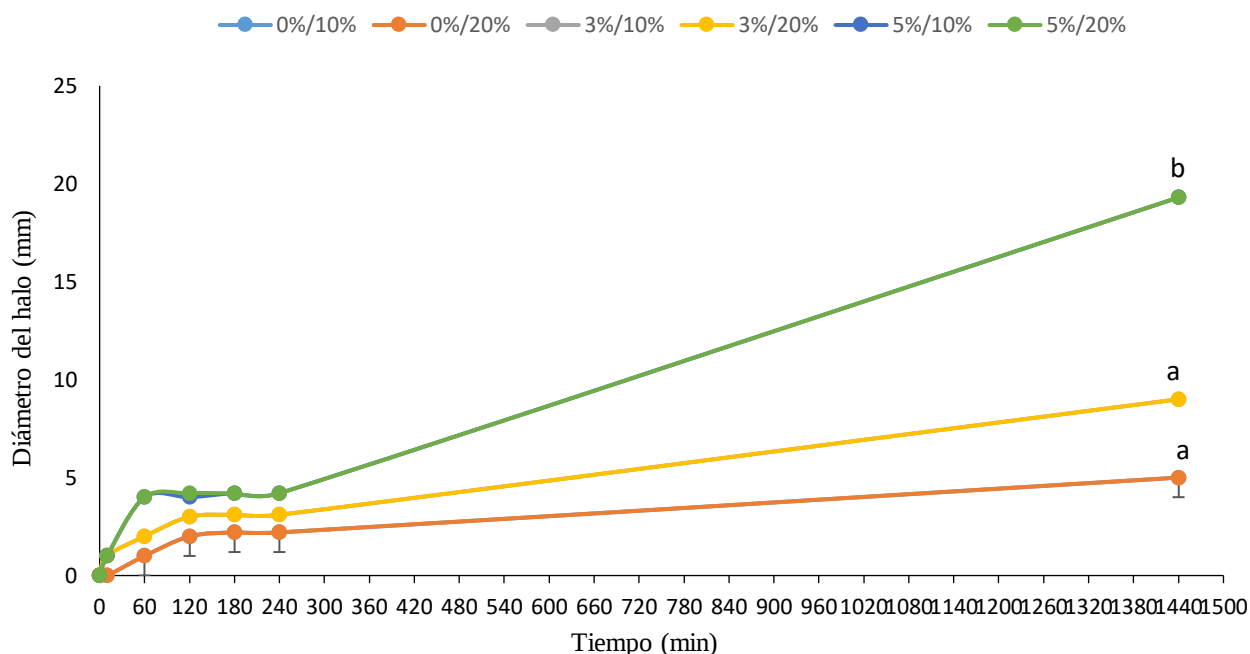


Figura 10. Actividad antioxidante de las PC por tratamientos basadas en EGB Y CHMTH.

En las PC, la matriz de colágeno y gelatina permitieron encapsular y liberar estos compuestos de forma progresiva. A mayor concentración de EGB, mayor gradiente de difusión y mayor área de reducción visible. A las 24 horas de incubación en el medio gelificado con ABTS^{•+}, se observaron los valores más elevados de capacidad antioxidante en todas las formulaciones que contenían EGB. Este comportamiento puede atribuirse a un fenómeno de sobrehidratación progresiva de las PC en contacto con el medio gelificado del radical, el cual favoreció la disolución parcial y el reblandecimiento de la matriz, incrementando así la difusión de los compuestos bioactivos hacia el medio, dando la capacidad de donar electrones o hidrógeno para neutralizar radicales libres como ABTS^{•+}.

La hidratación prolongada en el gel radical provocó una pérdida estructural parcial de la matriz de CHMTH y gelatina, materiales altamente hidrofílicos. Esta pérdida de integridad estructural facilitó la liberación acelerada de compuestos fenólicos (sulforafano), lo que explica la mayor zona de decoloración observada a las 24 horas. Este comportamiento está respaldado por estudios como los de (Revutskaya et al., 2024b), quienes demostraron que matrices proteicas funcionalizadas con extractos vegetales pueden experimentar hinchamiento y aumento en la movilidad de sus compuestos bioactivos al estar expuestas a ambientes húmedos, incrementando su capacidad antioxidante efectiva.

Adicionalmente, León-López et al. (2019b) señalan que los péptidos derivados del colágeno poseen elevada afinidad por el agua debido a la presencia de grupos polares y aminoácidos hidroxilados, lo cual contribuye a una alta capacidad de absorción y retención de humedad. En consecuencia, la sobrehidratación produce una expansión de la red polimérica y la ruptura de algunas interacciones intermoleculares débiles, lo que facilita la migración de compuestos antioxidantes a través del gradiente de concentración generado entre la película y el gel de ABTS^{•+}.

Este efecto ha sido también descrito por Mokrejš et al. (2021) en películas a base de colágeno y extractos antioxidantes, donde se evidenció que el tiempo de exposición en medios húmedos impacta directamente en la tasa de liberación, siendo más significativa en etapas posteriores (≥ 12 h).

Sin embargo, su actividad directa frente al radical ABTS^{•+} ha sido considerada moderada, tal como lo reporta el estudio de Farag & Motaal, (2010). En dicho trabajo se evaluó la actividad de SFN purificado frente a ABTS^{•+} y DPPH[•], encontrándose que su poder de neutralización era dosis-dependiente pero inferior al de otros antioxidantes como el ácido ascórbico o los extractos vegetales completos. Esto indica que la acción del SFN como eliminador directo de radicales libres es limitada y que su potencia antioxidante reside más bien en su capacidad para activar rutas celulares endógenas, como la vía Nrf2/ARE, induciendo enzimas antioxidantes como HO-1, GST y NQO1. Estas limitaciones técnicas han llevado a que la literatura científica se enfoque principalmente en el EGB para aplicaciones médicas hacia las células.

Estudios recientes han confirmado que el colágeno hidrolizado proveniente de la membrana de huevo contiene péptidos de bajo peso molecular con alta capacidad de disminución de radicales libres, quelación de metales y poder reductor. Cai et al (2025) demostraron que la hidrólisis subcrítica de la membrana de huevo incrementa significativamente el contenido de aminoácidos libres y péptidos antioxidantes, correlacionándose con una mayor capacidad de neutralización de radicales como ABTS^{•+} y DPPH[•]. Estos péptidos actúan como donadores de electrones o átomos de hidrógeno, interrumpiendo la propagación de radicales libres a través de mecanismos de transferencia electrónica.

Complementariamente, Qian-Cheng et al. (2019) observaron que los hidrolizados de membrana de huevo pueden formar complejos funcionales con compuestos fenólicos como el ácido tánico, los cuales no solo mejoran la estabilidad del sistema, sino que, potencian la actividad antioxidante en aplicaciones como emulsiones alimentarias, a través del secuestro de radicales y iones metálicos prooxidantes como Fe²⁺. Además, han logrado aislar péptidos antioxidantes específicos del CHMTH, identificando secuencias enriquecidas en aminoácidos aromáticos, glicina e histidina, que son responsables de su capacidad reductora y quelante de metales de transición.

Propiedad antimicrobiana

La evaluación de la capacidad antimicrobiana de las PC formuladas con diferentes concentraciones de EGB y CHMTH evidenció un incremento significativo en el área de inhibición (mm²) con el aumento de la concentración de EGB y el tiempo de exposición (Fig. 11). Las películas elaboradas con CHMTH

únicamente (0 % EGB/10 % y 0 % EGB/20 %) no mostraron efecto antimicrobiano, indicando que el CHMTH por sí solo no posee una acción antimicrobiana bajo las condiciones del ensayo.

A partir de la inclusión de EGB, se observó una tendencia creciente en la actividad antimicrobiana. Las formulaciones 3% de EGB presentaron zonas de inhibición moderadas, mientras que las películas con 5% de EGB alcanzaron áreas significativamente mayores, siendo esta última la que presentó el valor más alto (4,18 mm²), con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Esta relación dosis-respuesta evidencia que la eficacia antimicrobiana está directamente asociada al contenido de EGB en la matriz polimérica.

Hua-Zhang et al. (2012) evidenciaron el efecto del sulforafano (SFN) siendo este atribuible a la presencia de compuestos al EGB, principalmente SFN, el cual ha demostrado ser efectivo frente a bacterias Gram negativas como la *Escherichia coli*. Este compuesto SFN (natural del brócoli) ejerce su actividad antimicrobiana a través de mecanismos como la alteración de la integridad de la membrana celular bacteriana, aumento de la permeabilidad, pérdida de potencial de membrana, inhibición de enzimas clave y ruptura de la síntesis de la pared celular el metabolismo material y energético e inhibir la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. También Abukhabta et al. (2021) reportaron que el SF ha demostrado inducir estrés oxidativo intracelular y alterar rutas metabólicas esenciales para la viabilidad bacteriana, lo que conlleva a la muerte celular.

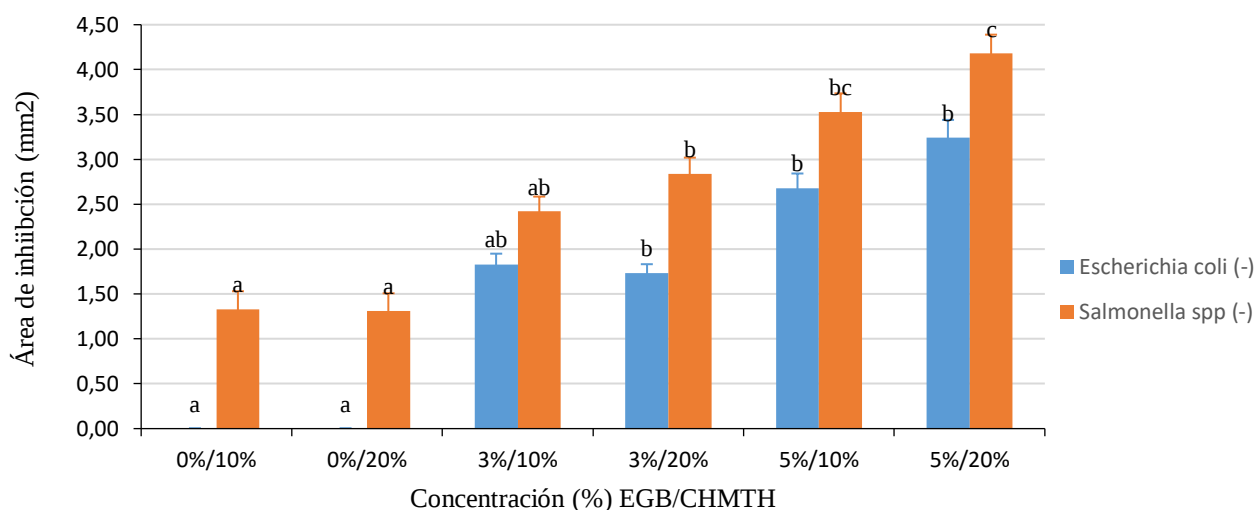


Figura 11. Actividad antibacteriana de las PC a base de CHMTH con EGB frente a *Escherichia coli* y *Salmonella spp*.

El incremento en la actividad antimicrobiana (Fig.12) a las 48 horas respecto a las 24 horas puede explicarse por el mecanismo de liberación controlada de los compuestos activos desde la matriz de CHMTH y gelatina. La estructura polimérica actúa como una barrera semipermeable que permite la difusión progresiva de los compuestos del EGB, por lo que se requiere un mayor tiempo de contacto para alcanzar una concentración efectiva en el entorno microbiano, además la forma en que actúa el SFN sobre las bacterias influye en el tiempo de efecto del compuesto. Noelle et al. (2008) evidenciaron que 23 de 28 microorganismos patógenos diferentes fueron sensibles frente al SFN. Así mismo, hubo un crecimiento del halo de inhibición a las 72 horas, pero no tan fuerte como las medidas del halo de las 24 horas. Esto se deduce que el SFN aun siguió teniendo efecto de inhibición.

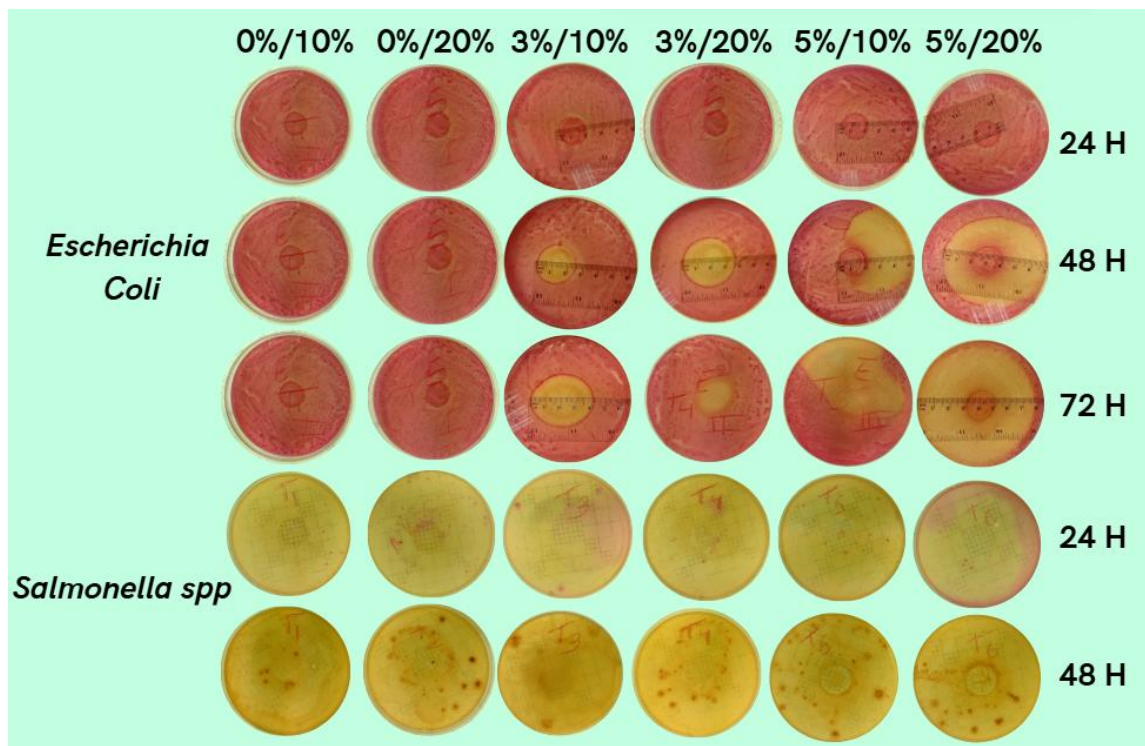


Figura 12. Actividad antioxidante de las películas comestibles (PC) activas basadas en colágeno hidrolizado de membrana testácea de huevo (CHMTH): 10 % y 20 %.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la adición de EGB tiende a dar capacidad antimicrobiana a las PC, siendo más evidente a mayores concentraciones y tiempos de exposición. Esta propiedad es particularmente relevante para el desarrollo de recubrimientos activos con potencial en la conservación de alimentos, al generar una barrera funcional capaz de limitar el crecimiento microbiano mediante mecanismos naturales y sostenibles.

Una conducta particular se evidencio en las PC con formulaciones de EGB frente a *Salmonella spp.*, ya que, a pesar de la aparición inicial de un halo de inhibición en las primeras 24–48 horas, en varias repeticiones hubo una recontaminación de *Salmonella spp.* en el área previamente inhibida. Este resultado demuestra que el efecto antimicrobiano producido por los compuestos activos del EGB no fue lo suficiente fuerte para esta bacteria ya que fue transitorio, otorgando una posible recuperación de las bacterias sobrevivientes cuando el poder del EGB disminuyó, oxidó o degeneró.

Este tipo de comportamiento ha sido reportado por Pang et al. (2023), quienes demostraron que la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales, aunque efectiva inicialmente, no logra mantener una concentración inhibitoria prolongada en el tiempo debido a la volatilización, oxidación o inactivación de los compuestos fenólicos, como en este caso, del SF. Además, la *Salmonella spp.* posee mecanismos de resistencia adaptativa como la formación de biofilms, expresión de bombas de eflujo y reparación de membranas, que pueden ser inducidos tras una exposición a compuestos antimicrobianos naturales. Esta adaptación podría explicar su capacidad para recolonizar el halo una vez que el agente activo dejó de estar presente en concentraciones efectivas.

En este contexto, la reaparición de *Salmonella spp.* dentro del halo también sugiere que el sistema de liberación de compuestos activos desde la película no fue suficiente en concentración, lo cual limitó su efectividad prolongada. Por tanto, aunque el EGB demostró efecto inhibitorio inicial, la formulación

debe ser optimizada para mantener concentraciones antimicrobianas estables y evitar la recolonización microbiana.

CONCLUSIÓN

La investigación demostró que la combinación de colágeno hidrolizado de la membrana testácea de huevo y extracto de germinado de brócoli permite desarrollar películas comestibles con propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y antimicrobianas mejoradas, prometedora para la aplicación en alimentos mínimamente procesados. La extracción enzimática con papaína ofreció un colágeno con capacidad filmógena, como matriz estructural proteica, y los compuestos bioactivos del extracto de brócoli, especialmente sulforafano, permitieron mejorar significativamente la capacidad antioxidante y antimicrobiana de las películas. Asimismo, la sinergia entre estos dos componentes de las películas comestibles mejoró la barrera a la humedad y la opacidad sin comprometer la solubilidad. Las formulaciones con mayor concentración de extracto de germinado de brócoli (5 %) mostraron una eficiencia destacable frente a patógenos alimentarios como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, lo que valida su funcionalidad como sistemas de liberación controlada. Estos hallazgos sugieren un gran potencial de estas películas comestibles formuladas con el fin de ser usadas como recubrimientos para alimentos frescos, contribuyendo a la valorización de residuos agroindustriales con un enfoque hacia la sostenibilidad, la economía circular y a la innovación.

REFERENCIAS

- Abukhabta, S., Khalil Ghawi, S., Karatzas, K. A., Charalampopoulos, D., McDougall, G., Allwood, J. W., Verrall, S., Lavery, S., Latimer, C., Pourshahidi, L. K., Lawther, R., O'Connor, G., Rowland, I., & Gill, C. I. R. (2021). Sulforaphane-enriched extracts from glucoraphanin-rich broccoli exert antimicrobial activity against gut pathogens in vitro and innovative cooking methods increase in vivo intestinal delivery of sulforaphane. *European Journal of Nutrition*, 60(3), 1263-1276. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02322-0>
- Azizah et al. (2023). Propiedades físicas mejoradas, actividad antioxidante y antibacteriana de películas biocompuestas de carboximetilcelulosa y alcohol polivinílico con extracto de semilla de brote de brócoli para el envasado de mantequilla. https://www.researchgate.net/publication/375807781_Enhanced_physical_properties_antioxidant_and_antibacterial_activity_of_biocomposite_films_composed_from_carboxymethyl_cellulose_and_polyvinyl_alcohol_incorporated_with_broccoli_sprout_seed_extract_fo
- Borges, A., Abreu, A. C., Ferreira, C., Saavedra, M. J., Simões, L. C., & Simões, M. (2015). Antibacterial activity and mode of action of selected glucosinolate hydrolysis products against bacterial pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4737-4748. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1533-1>
- Cao et al. (2023). Efectos de los métodos de extracción sobre las características, propiedades fisicoquímicas y calidad sensorial del colágeno de huesos de gallinas descuidadas. <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/1/202>
- Chen, W., Shi, X., Xu, W., McClements, D. J., Liu, X., & Liu, F. (2022). Effects of different polyphenols on the structure and properties of sodium caseinate films mediated by tyrosinase. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100395. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100395>
- Deng et al. (2022). Estudio crítico sobre la extracción de colágeno de la membrana de la cáscara de huevo mediante hidrólisis enzimática. https://www.researchgate.net/publication/366203672_Critical_study_on_the_extraction_of_collagen_from_eggshell_membrane_by_enzymatic_hydrolysis_reaction
- Dhakal, D., Koomsap, P., Lamichhane, A., Sadiq, M. B., & Anal, A. K. (2018). Optimization of collagen extraction from chicken feet by papain hydrolysis and synthesis of chicken feet collagen based biopolymeric fibres. *Food Bioscience*, 23, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.03.003>
- Farag, M. A., & Motaal, A. A. A. (2010). Sulforaphane composition, cytotoxic and antioxidant activity of crucifer vegetables. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.005>
- Gómez, E. A. H., Santana, T. M., Owen, P. Q., Vázquez, E. O., Sierra, J. R., & Vargas, M. de L. V. y. (2024). Propiedades fisicoquímicas y bioactivas de películas comestibles basadas en alginato y miel melipona: películas comestibles basadas en alginato y miel melipona. *Biotecnia*, 26, e2028-e2028. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v26.2028>



- Gupta, D., Lall, A., Kumar, S., Patil, T. D., & Gaikwad, K. K. (2024). Plant-based edible films and coatings for food-packaging applications: Recent advances, applications, and trends. ScienceDirect. <https://doi.org/10.1039/D4FB00110A>
- Hamed et.al. (2023). Propiedades físicas mejoradas, actividad antioxidante y antibacteriana de películas biocompuestas de carboximetilcelulosa y alcohol polivinílico con extracto de semilla de brote de brócoli para el envasado de mantequilla.
- https://www.researchgate.net/publication/375807781_Enhanced_physical_properties_antioxidant_and_antibacterial_activity_of_biocomposite_films_composed_from_carboxymethyl_cellulose_and_polyvinyl_alcohol_incorporated_with_broccoli_sprout_seed_extract_for
- Han, C., Chen, Y., Shi, L., Chen, H., Li, L., Ning, Z., Zeng, D., & Wang, D. (2023). Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies. Frontiers in Veterinary Science, 10, 1116126. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1116126>
- Han et.al. (2023). Frontiers | Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies. <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2023.1116126/full>
- Hinds, K., D, W., E, S., P, E., M, G., & Dk, R. (2017). Evaluating the Antibacterial Properties of Polyacetylene and Glucosinolate Compounds with Further Identification of Their Presence within Various Carrot (*Daucus carota*) and Broccoli (*Brassica oleracea*) Cultivars Using HighPerformance Liquid Chromatography with a Diode Array Detector and Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analyses. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28805380/>
- Hua-Zhang, W., Hj, F., Yl, Z., Xj, L., Yj, H., & Sw, W. (2012). [Antibacterial mechanism of sulforaphane on *Escherichia coli*]. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22812243/>
- León-López, A, M.-P., Vm, M.-J., A, V.-T., Di, Z., & G, A.-Á. (2019a). Hydrolyzed Collagen-Sources and Applications. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31703345/>
- León-López, L.-L., A, M.-P., Vm, M.-J., A, V.-T., Di, Z., & G, A.-Á. (2019b). Hydrolyzed CollagenSources and Applications. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31703345/>
- Liang, L., H, C., G, J., & H, H. (2025). Enhancing Physicochemical and Piezoelectric Properties of Eggshell Membrane Proteins by Ultrasonic-Assisted Enzymes for Food and Sensor Applications. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40076842/>
- Liu, J., Wang, Y., Lv, J., Wu, Y., Guo, Y., Sun, C., & Li, X. (2023). Biodegradable composite films based on egg white protein and tea polyphenol: Physicochemical, structural and antibacterial properties. Food Packaging and Shelf Life, 38, 101098. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101098>
- Matinong et al. (2022). Extracción de colágeno de piel animal. <https://www.mdpi.com/20797737/11/6/905>
- Miteluț, A. C., Popa, E. E., Drăghici, M. C., Popescu, P. A., Popa, V. I., Bujor, O.-C., Ion, V. A., & Popa, M. E. (2021). Latest Developments in Edible Coatings on Minimally Processed Fruits and Vegetables: A Review. Foods, 10(11), 2821. <https://doi.org/10.3390/foods10112821>
- Mohamed, S. A. A., El-Sakhawy, M., & El-Sakhawy, M. A.-M. (2020). Polysaccharides, Protein and Lipid - Based Natural Edible Films in Food Packaging: A Review. Carbohydrate Polymers, 238, 116178. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178>



Mokrejš et.al. (2021). Estudio de la solubilidad de películas biodegradables preparadas a partir de hidrolizado de colágeno.

https://www.researchgate.net/publication/287694508_Studying_solubility_of_biodegradable_films_prepared_from_collagen_hydrolysate

Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). Chapter 8 Quantitation of Protein. En *Methods in Enzymology* (Vol. 463, pp. 73-95). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)

Noelle L., J., Cs, P., & Jw, C. (2008). Growth inhibition of a spectrum of bacterial and fungal pathogens by sulforaphane, an isothiocyanate product found in broccoli and other cruciferous vegetables. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18484523/>

Nur et al. (2022). Efecto de la hidrólisis enzimática sobre la solubilidad estructural y proteica de la membrana de la cáscara de huevo.

https://www.researchgate.net/publication/364629441_Effect_of_enzymatic_hydrolysis_on_the_structural_and_protein_solubility_of_eggshell_membrane

Okutan et.al. (2025). Películas comestibles a base de proteínas de origen vegetal y animal: Comparación de algunas características mecánicas y fisicoquímicas—PubMed.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40104210/>

Okutan, G., Koç, G., Cansu, Ü., & Boran, G. (2025). Edible Films Based on Plant and Animal Origin

Proteins: Comparison of Some Mechanical and Physicochemical Characteristics. *Food Science & Nutrition*, 13(3), e4712. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4712>

Otero Tuárez, V. O. (2019). Desarrollo y caracterización de recubrimientos comestibles antimicrobianos para la conservación de productos derivados de la pesca [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad Pública de Navarra]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=244990>

Pang, X., Hu, X., Du, X., Lv, C., & Yuk, H.-G. (2023). Biofilm formation in food processing plants and novel control strategies to combat resistant biofilms: The case of Salmonella spp. *Food*

Science and Biotechnology, 32(12), Article 12. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01349-3>

Pasarin et al. (2023). Hidrólisis alcalina y enzimática combinada de membranas de cáscara de huevo para la obtención de ingredientes para aplicaciones alimentarias y cosméticas. <https://www.mdpi.com/2673-4583/13/1/20>

Qian-Cheng et.al. (2019). Separation and Identification of Highly Efficient Antioxidant Peptides from Eggshell Membrane. <https://www.mdpi.com/2076-3921/8/10/495>

Revutskaya, N., Polishchuk, E., Kozyrev, I., Fedulova, L., Krylova, V., Pchelkina, V., Gustova, T., Vasilevskaya, E., Karabanov, S., Kibitkina, A., Kupaeva, N., & Kotenkova, E. (2024a).

Application of Natural Functional Additives for Improving Bioactivity and Structure of Biopolymer-Based Films for Food Packaging: A Review. *Polymers*, 16(14), 1976. <https://doi.org/10.3390/polym16141976>

Revutskaya, N., Polishchuk, E., Kozyrev, I., Fedulova, L., Krylova, V., Pchelkina, V., Gustova, T., Vasilevskaya, E., Karabanov, S., Kibitkina, A., Kupaeva, N., & Kotenkova, E. (2024b). Application of Natural Functional Additives for Improving Bioactivity and Structure of Biopolymer-Based Films for Food Packaging: A Review. *Polymers*, 16(14), Article 14.



<https://doi.org/10.3390/polym16141976>

- Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Silva, H. D., Vicente, A. A., Khmelinskii, I., & Vieira, M. M. C. (2012). Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. <https://sapiencia.ualg.pt/entities/publication/34b2968e-b0f2-4d94-8cda-0962a9c67b0b>
- Sayanjali et.al. (2024). Extracción y caracterización de celulosa de tallos de brócoli como nueva fuente de biopolímeros para la producción de películas de carboximetilcelulosa—PMC. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11052598>
- Shi, Y., Zhou, K., Li, D., Guyonnet, V., Hincke, M. T., & Mine, Y. (2021). Avian Eggshell Membrane as a Novel Biomaterial: A Review. *Foods*, 10(9), 2178. <https://doi.org/10.3390/foods10092178>
- Singh, A., Gu, Y., Castellarin, S. D., Kitts, D. D., & Pratap-Singh, A. (2020). Development and Characterization of the Edible Packaging Films Incorporated with Blueberry Pomace. *Foods*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/foods9111599>
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 423432. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00061-3)
- Sun et.al. (2016). Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources—PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27451238/>
- Sun, Y., Wu, S., Jiao, Z., Liu, D., Li, X., Shang, T., & Tian, Z. (2025). Preparation and characterization of active packaging film containing chitosan/gelatin/brassica crude extract. *Scientific Reports*, 15(1), 6729. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90638-4>
- Surangna y Kumar. (2016). Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis—ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643816300573>
- Yan et al. (2015). Study on the self-assembly property of type I collagen prepared from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin by different extraction methods | International Journal of Food Science and Technology | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/ijfst/article/50/9/2088/7865937>
- Yang, F., Yu, M., Wei, Z., Chen, K., Wang, J., Chen, X., Xue, W., Yuan, Y., Wu, H., & Zhu, J. (2025). Película activa robusta, resistente al agua y biodegradable de proteínas miofibrilares de carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*): Integración de la reticulación de polifenoles oxidados con nanocompuestos de nanocristales de celulosa. *Food Hydrocolloids*, 164, 111175. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111175>
- Yu, M. S. (2023). Hydrolyzation from eggshell membrane under the influence of papain enzyme and determination of total protein amount. *Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 12(2), Article 2. <https://ajpbr.org/index.php/ajpbr/article/view/213>
- Zhao, C., Zhu, J., Zhang, C., Wang, W., Qu, W., Wang, W., Li, W., & Wu, H. (2022). Preparation of mechanically strong and active composite films based on fish myofibrillar proteins: The dual effects of oxidized polyphenol crosslinking and layered double hydroxide reinforcement. *Food Hydrocolloids*, 129, 107616. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107616>



Uleam
UNIVERSIDAD LAICA
ELOY ALFARO DE MANABÍ

Facultad de Ciencias de la Vida
y Tecnológicas

Carrera de Ingeniería Agroindustrial



Uleam
UNIVERSIDAD LAICA
ELOY ALFARO DE MANABÍ

Facultad de Ciencias de la Vida
y Tecnológicas

Carrera de Ingeniería Agroindustrial