



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE ENVASES ACTIVOS
ANTIOXIDANTES A BASE DE POLIETILENO Y
EXTRACTOS DE ASTAXANTINA**

por:

CITLALI COLÍN-CHÁVEZ

TESIS APROBADA POR LA COORDINACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN
VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

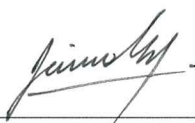
DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACION


Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Citlali Colín Chávez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dra. Herlinda Soto Valdez
Directora de Tesis



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Asesor



Dr. Renato René Balandrán Quintana
Asesor



Dr. Jaime López Cervantes
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Atentamente



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado. Muchas gracias a todo el pueblo de México porque con sus impuestos permitieron que CONACYT mes tras mes durante cuatro años me proporcionara mi beca.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C porque me abrió sus puertas, me acogió como huésped distinguido y durante 4 años se convirtió en mi hogar.

Al proyecto FONCICYT C0002-2008-95935 por financiar esta investigación.

A la Dra. Herlinda Soto Valdez por su dedicación, tiempo y valiosa asesoría para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del Comité de Tesis, Dr. Jaime Lizardi Mendoza, Dr. René Balandrán Quintana y Dr. Jaime López Cervantes por sus observaciones, sugerencias y apoyo en el desarrollo de esta investigación

A la M. en C. Elizabeth Peralta por todo su apoyo académico y moral. Gracias Ely Per por toda tu ayuda en el laboratorio. También, mil gracias por tu amistad y abrirme las puertas de tu familia.

A la M. en C. Armida Rodríguez Félix, mil gracias por siempre darme palabras de aliento y reconfortarme, sus abrazos siempre me hicieron sentir como en casa.

A todos los miembros de la Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal por enriquecer mi trabajo con sus observaciones en los seminarios, prestarme reactivos y ser mis amigos.

Al Dr. Ramón Pacheco Aguilar por motivarme a dar lo mejor de mí y recordarme que yo soy mi único límite

A mis amigas y amigos Magda, María Luisa, Idania, Johana, Faby, Hayati, Francisca, Ricardo, Ángel, Sergio, Salvador y Erick (gracias por tu confianza) por convertirse en mi familia y apoyo moral durante mi estancia en Hermosillo.

A mi familia Chávez-García y Colín-Cruz porque su cariño, palabras y oraciones siempre me motivaron a seguir adelante. Primate gracias por creer en mí y sentirte siempre orgulloso de mí.

AGRADECIMIENTOS A PERSONAL DE APOYO

Al personal de docencia: Dra. Gloria Yepiz Plascencia, Argelia Marín Pacheco, Lic. Laura Elizabeth García Cruz, Lic. Verónica Araiza Sánchez, M.D.R. Alejandra Moreno Córdova y Héctor Galindo Murrieta.

Al personal de cómputo por su apoyo técnico: Ing. Martín Peralta, Ing. Luis Leyva Durán, Ing. Adalberto Murrieta, Ing. José Luis Aguilar, Ing. Karla Robles Bernal y Lic. Marovi Cortés Guzmán.

Al personal de biblioteca: Gerardo Reyna Cañez, Luis Francisco Conde Ortiz y Q.B. Ferando Leyva Livshin.

Al personal de fotocopias: Hector Manuel Cota Aguayo

DEDICATORIA

A Hortensia y Amalia:

*Sus enseñanzas fueron
los cimientos de mi desempeño;
sus oraciones, mi fuerza;
su amor, mi apoyo;
su ausencia, mi crecimiento.*

CONTENIDO

	Página
Lista de figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xii
Introducción	1
Hipótesis	3
Objetivo general y específicos	4
Etapas del trabajo de investigación y su integración en el manuscrito de tesis	5
Antecedentes	8
Referencias bibliográficas	25
<i>Capítulo I. Fabricación y propiedades de películas antioxidantes a base de polietileno adicionadas con extracto de flor de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i>) y su aplicación en la estabilidad oxidativa de aceite de soya</i>	
<i>Capítulo II. Difusión de astaxantina natural desde películas activas de polietileno hacia un simulante de alimento graso</i>	
<i>Capítulo III. Difusión de carotenoides desde una película activa bicapa de polietileno hacia aceite de soya</i>	
<i>Capítulo IV. Películas activas antioxidantes a base de polietileno de alta densidad adicionadas con extracto de flor de cempasúchil (<i>Tagetes erecta</i> L.) y dióxido de titanio (TiO₂)</i>	
Discussion global	
Conclusiones	
Recomendaciones	

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Estructura química de la astaxantina	13
2	Mecanismos antioxidantes de carotenoides	15
3	Estructura y tipos de polietileno	18
4	Geometría típica de un extrusor	20
5	Etapas del proceso de migración	21

RESUMEN

La oxidación lipídica limita la vida de anaquel de los alimentos, pero se puede controlar aplicando antioxidantes como parte de la formulación del envase y aprovechar el fenómeno de difusión hacia el alimento. Diversos antioxidantes naturales como la astaxantina pueden incorporarse a películas como materiales de envase. El presente trabajo tuvo como objetivos desarrollar envases activos antioxidantes con astaxantina proveniente de extracto de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*), evaluar su efecto en la estabilidad oxidativa de aceite de soya y determinar la difusión de astaxantina y carotenoides totales hacia simulantes de alimentos y al mismo aceite. Se elaboraron películas mediante el proceso de extrusión-soplo de polietileno de baja densidad (PEBD, denominada MM), bicapa de polietileno de alta densidad coextruida con PEBD (PEAD/PEBD, denominada BM), y bicapa de PEAD adicionada con 2% de dióxido de titanio (TiO₂) coextruida con PEAD (PEAD-2%TiO₂/PEAD, denominada BDM) con 2.90, 3.60 y 2.19% de extracto de flor de cempasúchil en sus capas internas, respectivamente. Se elaboraron bolsas con las películas y se envasó aceite de soya para evaluar el efecto antioxidante del extracto sobre el aceite, encontrándose un efecto positivo en la estabilidad oxidativa. Se estudió la migración de astaxantina desde las películas MM y BM hacia etanol al 95% a temperaturas entre 10 y 40 °C. También, se estudió la migración de carotenoides totales desde las tres películas hacia aceite de soya en el mismo rango de temperaturas. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la temperatura en la difusión de astaxantina o carotenoides. Las cinéticas de difusión de astaxantina desde las películas MM y BM hacia etanol al 95% mostraron un comportamiento Fickiano con coeficientes de difusión entre 1.53 y 32.67x10⁻¹¹ cm²/s. El efecto de la temperatura en los coeficientes de difusión de astaxantina siguió un modelo tipo Arrhenius con energías de activación de 101.75 y 47.11 kJ/mol para las películas MM y BM, respectivamente. Las cinéticas de difusión de carotenoides desde las películas MM, BM y BDM hacia aceite de

soya también mostraron un comportamiento Fickiano con coeficientes de difusión entre <1.56 y 28.66×10^{-11} cm^2/s . El efecto de la temperatura en la difusión de carotenoides en las películas BDM siguió un modelo tipo Arrhenius, con una energía de activación de 53.66 kJ/mol . Estos resultados muestran el uso potencial de la astaxantina y el extracto de flor de cempasúchil como aditivo activo en el envasado de alimentos grasos, ya que la temperatura tuvo un efecto moderado en la difusión de astaxantina y carotenoides en un rango que representa condiciones de transporte, almacenamiento y comercialización de alimentos en regiones con clima frío, templado y caliente. En consecuencia, con estas películas es posible envasar alimentos que pueden ser manipulados en el rango considerado de temperaturas sin el riesgo de que se interrumpa la liberación de astaxantina/carotenoides.

Palabras clave: Astaxantina, carotenoides, polietileno, extrusión, envases activos antioxidantes.

ABSTRACT

Lipid oxidation is one of the main factors that affect the shelf life of foods. However, it can be controlled by active packaging. Some natural antioxidants like astaxanthin can be deliberately incorporated to food packaging materials and take advantage of diffusion phenomenon to food. The aims of the present work were to develop antioxidant polyethylene-based films containing marigold (*Tagetes erecta*) extract rich in astaxanthin, to evaluate its antioxidant effect on soybean oil stability and to study the diffusion of astaxanthin and carotenoids into a fatty food simulant and soybean oil. Three batches of films were fabricated by the blown-extrusion process, a monolayer film of low density polyethylene (LDPE, named MM), a bilayer film of HDPE coextruded with LDPE (PEAD/PEBD, named BM) and a bilayer film of HDPE added with 2% titanium dioxide coextruded with HDPE (PEAD-2%TiO₂/PEAD, named BDM). The films were added with 2.90, 3.60 and 2.19% of marigold extract in the inner layer, respectively. Bags were made with MM, BM and BDM films and filled with soybean oil to evaluate their antioxidant activity, finding positive effects. Astaxanthin migration was evaluated from MM and BM films into 95% ethanol at 10-40 °C. Carotenoids migration was evaluated from the three films into soybean oil at the same temperature range. The kinetics of astaxanthin diffusion from MM and BM films to 95% ethanol showed a Fickian behavior and diffusion coefficients between 1.53 and 32.67x10⁻¹¹ cm²/s were obtained. The effect of temperature on astaxanthin diffusion followed an Arrhenius-type model with activation energies of 101.75 and 47.11 kJ/mol for MM and BM films, respectively. Carotenoids diffusion from MM, BM and BDE films also showed a Fickian behavior with diffusion coefficients between <1.56 and 28.66 x10⁻¹¹ cm²/s. The effect of temperature on carotenoids diffusion from BDM films also followed an Arrhenius-type model with activation energy of 53.66 kJ/mol. These findings showed a potential application of astaxanthin and marigold extract as active compounds in fatty food packaging. Because

the temperature range under study represented conditions of transportation, storage and commercialization of food in regions with cold, warm and hot climate, it is possible to pack food with these films without the risk of interrupting the release of astaxanthin/carotenoids in the case of temperature fluctuations.

Keywords: Astaxanthin, carotenoids, polyethylene, extrusion, antioxidant active packaging.

INTRODUCCIÓN

Los envases cumplen diversas funciones en los alimentos, tales como contener, proteger preservar e informar (Marsh y Bugusu, 2007). Además, éstos también pueden extender la vida en anaquel al controlar las reacciones de deterioración que sufren los alimentos. La oxidación lipídica es una de estas reacciones. Los envases que controlan la oxidación lipídica se conocen como envases activos antioxidantes. A este tipo de envases de manera intencional se le adicionan antioxidantes, los cuales después se liberarán al alimento para que ejerzan su función y controlen la oxidación lipídica (Colín-Chávez et al., 2012).

La forma tradicional de incorporar antioxidantes en los alimentos es adicionándolos directamente durante su formulación, pero para lograr una vida de anaquel adecuada en ocasiones tienen que agregarse en altas concentraciones, lo cual puede afectar las propiedades organolépticas del alimento. Los envases activos antioxidantes presentan diversas ventajas en comparación con esta práctica, destacando la liberación continua en bajas concentraciones del antioxidante, evitando así la adición de altas concentraciones y logrando que el alimento esté protegido por mayor tiempo (Chen et al., 2012).

Los plásticos son los principales materiales empleados en la fabricación de envases activos. De este grupo, el polietileno $[-CH_2-CH_2-]_n$ es el más utilizado. Los principales tipos de polietileno son el polietileno de alta (PEAD) y de baja densidad (PEBD). Existen diferentes formas de procesar polímeros pero la más utilizada es la extrusión. La extrusión consiste en forzar continuamente con presión el flujo de un material termoplástico fundido a través de un barril. Son muy pocas las aplicaciones en las que el polietileno, PEAD o PEBD, por si solo brinda la protección que un alimento necesita. Para contrarrestar esta situación se recurre a la elaboración de películas de dos o más capas de polietileno, solo

o combinado con otros polímeros. Esta práctica se conoce como coextrusión y contribuye a que las limitantes de un polímero se complementen con las características de otro (Selke et al., 2004).

El desarrollo e investigación de envases activos se está enfocando en la utilización de antioxidantes naturales. En la actualidad, el consumidor busca en el mercado alimentos naturales con poca o nula presencia de aditivos sintéticos (Markarian, 2006). Antioxidantes sintéticos que se han utilizado de antaño/tradicionalmente en la conservación de alimentos como el 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (hidroxitolueno butilado, BHT), (1,1-dimetiletil)-4-metoxifenol (hidroxianisol butilado, BHA) y 2-(1,1-dimetiletil)-1,4-bencenodiol (hidroquinona ter-butílica, TBHQ) están siendo reemplazados por sus contrapartes naturales (Moure et al., 2001). Ante esto, se están buscando nuevos antioxidantes naturales, en forma pura o de extractos, que puedan actuar como aditivos activos en envases. Un antioxidante que podría utilizarse es la astaxantina. Este antioxidante es un carotenoide natural de carácter lipofílico. La capacidad antioxidante de esta molécula radica en su habilidad para desactivar al oxígeno singlete, desactivar estados excitados de fotosensibilizadores y neutralizar radicales libres (Britton, 2008; Choe y Min, 2009; Skibsted, 2012). Sin embargo, su principal aplicación no es como antioxidante sino como pigmento en dietas de especies marinas. Específicamente, en el área de envases alimenticios estos atributos no están siendo aprovechados.

El objetivo de este trabajo fue incorporar astaxantina proveniente de extracto de flor de cempasúchil a PEBD, solo o coextruido con PEAD, con el fin de elaborar un envase activo antioxidante. En esta tesis se presentan las etapas en las que el material de envase se diseñó, fabricó y caracterizó; se probó su actividad y se evaluó la difusión de astaxantina y carotenoides a diferentes medios; se reformuló varias veces hasta entender sus ventajas y desventajas y conocer el proceso de difusión, para finalmente obtener el envase activo antioxidante.

HIPÓTESIS

La difusión de astaxantina incorporada a PEBD y PEAD (envase activo) confiere mayor estabilidad oxidativa a aceites vegetales.

OBJETIVOS

Objetivo General

Diseñar, fabricar y caracterizar películas activas antioxidantes utilizando extractos con astaxantina como aditivo activo y evaluar su efecto en un aceite vegetal.

Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de la incorporación de extractos con astaxantina en las propiedades espectroscópicas, térmicas y mecánicas de una película monocapa de PEBD y otras dos bicapa de PEAD/PEBD y PEAD/PEAD.
2. Estudiar la migración de astaxantina desde películas activas hacia simulantes de alimentos grasos.
3. Determinar el efecto de la temperatura en la migración de astaxantina.
4. Calcular el efecto del envase activo antioxidante sobre la estabilidad oxidativa de aceite de soya.

ETAPAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN Y SU INTEGRACIÓN EN EL MANUSCRITO DE TESIS.

Para comprobar la hipótesis y los objetivos antes planteados, el desarrollo de esta investigación se dividió en cuatro etapas. A continuación se describe cada una de estas etapas. Se relata la forma en que la culminación y los resultados de una etapa fueron el preámbulo de la siguiente hasta que finalmente se integró todo en un trabajo de investigación.

En la **etapa 1** del proyecto se elaboraron películas monocapa de polietileno de baja densidad con diferentes concentraciones de extracto de flor de cempasúchil. Lo anterior para determinar qué concentración permitía el adecuado procesamiento del polímero y lograr la mayor concentración de astaxantina posible sin que existiera liberación del extracto hacia la superficie de las películas. Se elaboraron películas monocapa de PEBD y bicapa de PEAD/PEBD mediante el proceso de extrusión-soplo. En ambas películas el extracto se adicionó en la capa de PEBD. Posteriormente, se evaluaron el color y las propiedades espectroscópicas, térmicas y mecánicas de las películas para determinar cómo la adición del extracto modificaba dichas propiedades y si las películas (envases) podrían cumplir o no con su función conceptual. En esta etapa también se evaluó la vida de anaquel de las películas para lo que se sometieron a condiciones de almacenamiento comercial y como indicador se monitoreó el cambio de color través del tiempo. Se detectó que el color impartido por los carotenoides en las películas se degradó completamente por efecto de la luz. Finalmente, con las películas se elaboraron bolsas y se envasó aceite de soya para evaluar el efecto activo de las películas. Los resultados de esta etapa se presentan en el capítulo I, que se titula **“Fabricación y propiedades de películas antioxidantes a base de polietileno adicionadas con extracto de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) y su**

aplicación en la estabilidad oxidativa de aceite de soya". Estos resultados están publicados en forma de artículo científico y su referencia es la siguiente: Colín-Chávez, C.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Lizardi-Mendoza, J.; Balandrán-Quintana, R. R., Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. *Packaging Technology and Science* 2012, DOI: 10.1002/pts.1982

En la **etapa 2** del estudio se cuantificó la migración específica de astaxantina desde ambas películas hacia etanol al 95%, el cual es un simulante de alimentos grasos. El estudio se realizó a diferentes temperaturas en un rango de 10 a 40 °C; este rango representa temperaturas de almacenamiento, transporte y comercialización de los alimentos no perecederos. También, se evaluó el efecto de la temperatura en la migración de astaxantina. Se encontró que la presencia de la capa de PEAD modificó la migración retardando la liberación de astaxantina. Los resultados de esta etapa se presentan en el Capítulo II de este escrito que se titula **"Difusión de astaxantina natural desde películas activas de polietileno hacia un simulante de alimento graso"**. Este capítulo se presenta en forma de manuscrito y está aceptado para su publicación en la revista *Food Research International* con el título: Diffusion of Natural Astaxanthin from Polyethylene Active Packaging Films into a Fatty Food Simulant.

En la **etapa 3** del estudio se cuantificó la migración de los carotenoides totales presentes en ambas películas. En la etapa 1 se encontró que las películas tuvieron un efecto positivo en la estabilidad oxidativa de aceite de soya. Sin embargo, no se pudo determinar si dicho efecto era por la migración de astaxantina o por la migración de todos los carotenoides presentes en las películas. Con base a estos resultados, se decidió cuantificar la migración de los carotenoides totales desde ambas películas hacia aceite de soya. El estudio se realizó en un rango de temperaturas de 10 a 40 °C. También se evaluó el efecto de la temperatura en la migración de los carotenoides. Se encontró que la presencia de la capa de PEAD modificó el proceso de migración de los carotenoides en comparación con las películas monocapa. Los resultados de esta etapa se presentan en el capítulo III titulado **"Difusión de carotenoides desde una película activa monocapa y bicapa de polietileno hacia"**

aceite de soya”. Este capítulo se presenta en forma de manuscrito y está sometido a revisión para su publicación en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* con el título: Diffusion of Carotenoids from Bilayer Polyethylene Active Packaging Films into Soybean Oil.

En la **etapa 4** del estudio se elaboraron nuevamente películas bicapa. Se decidió eliminar la capa de PEBD y sustituirla por PEAD para promover una difusión más gradual. En la capa interna se adicionó el extracto de flor de cempasúchil. En la etapa 1 se encontró que el color impartido por los carotenoides en las películas monocapa y bicapa se degradó durante su almacenamiento por efecto de la luz. Ante esto, se decidió adicionar un compuesto en la capa externa que protegiera a los carotenoides de la luz y les permitiera cumplir con su función antioxidante. El compuesto elegido para este fin fue el dióxido de titanio, el cual se utiliza en la industria de los plásticos como pigmento pero también posee la capacidad de absorber y reflejar la luz. El diseño quedó de la siguiente manera: películas bicapa con una capa externa adicionada con dióxido de titanio y una capa interna adicionada con extracto de flor de cempasúchil. Para determinar si el dióxido de titanio estaba cumpliendo con el objetivo para el cual fue incorporado, las películas se sometieron a condiciones de almacenamiento comercial y se evaluó la pérdida de color y astaxantina en la capa interna. Después, se elaboraron bolsas con las películas, las cuales se utilizaron para envasar aceite de soya y evaluar así su efecto antioxidante. Finalmente se cuantificó la migración de carotenoides totales a aceite de soya. Los resultados de esta etapa se presentan en el capítulo IV de este escrito, titulado “**Películas activas antioxidantes a base de polietileno de alta densidad adicionadas con extracto de flor cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) y dióxido de titanio (TiO₂)**”. Este capítulo se presenta en forma de manuscrito para posteriormente adaptarse y enviarse a la revista *Innovative Food Science and Emerging Technologies* con el título: Antioxidant Active Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Titanium Dioxide.

ANTECEDENTES

Oxidación Lipídica

Los lípidos son fundamentales y en los alimentos los podemos encontrar en diversas formas como ácidos grasos, triglicéridos, esteroides, vitaminas, etc. Los lípidos pueden reaccionar con el oxígeno, por lo cual los alimentos que poseen lípidos aun en bajas concentraciones (<1%) son susceptibles a oxidarse (Valenzuela et al., 2003). El oxígeno en los alimentos puede estar presente en dos estados electrónicos diferentes, el triplete y el singlete. El oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$) es una molécula en estado fundamental, posee dos electrones en espines paralelos desapareados en orbitales y átomos diferentes, por lo cual se conoce como un dirradical. Para que el $^3\text{O}_2$ pueda reaccionar con un lípido, éste debe estar también en forma de radical (Min y Boff, 2002). Por otro lado, el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) es una molécula en estado electrónico excitado, posee dos electrones apareados en uno de sus orbitales, dejando un orbital vacío. Para llenar este orbital, el $^1\text{O}_2$ busca especies químicas ricas en electrones, en estado singlete y que no sean radicales (Min y Boff, 2002). La oxidación lipídica por el $^3\text{O}_2$ se llama autooxidación, mientras que la efectuada por el $^1\text{O}_2$ se denomina fotooxidación. Ambas reacciones se llevan a cabo por mecanismos diferentes e independientes, pero el producto es el mismo, la degradación de los lípidos y en consecuencia la pérdida de calidad de los alimentos.

La autooxidación es una reacción que se lleva a cabo en tres etapas, iniciación, propagación y terminación. Esta reacción comienza con un lípido o triglicérido en estado singlete (RH), pero en este estado el lípido no puede reaccionar con el $^3\text{O}_2$, necesita estar en forma de radical. El lípido se convierte en radical al perder un átomo de hidrógeno ($\text{H}\bullet$) de uno de sus grupos metilo, dicho átomo de hidrógeno es abstraído por otro radical. Cuando lo

anterior sucede se forma un radical lipídico alquilo ($R\bullet$), completándose la etapa de iniciación. Una vez formado el radical $R\bullet$, éste reacciona con el 3O_2 y se forman radicales lipídicos peroxilo ($ROO\bullet$). Posteriormente, el radical $ROO\bullet$ sustrae un átomo de hidrógeno de otro lípido y forma un hidroperóxido ($ROOH$) y un radical alquilo $R\bullet$, propagándose de esta manera la oxidación. Finalmente llega un momento en que los radicales formados ($R\bullet$ y $ROO\bullet$) reaccionan entre sí y forman especies no radicales, terminando aquí la oxidación (Hamilton, 1999).

La fotooxidación es una reacción que se lleva a cabo en una sola etapa. En contraste con la autooxidación, en la fotooxidación el estado singlete de los lípidos o triglicéridos es ideal y no es necesaria la formación de un lípido radical. El oxígeno singlete ataca directamente las dobles ligaduras ricas en electrones de los lípidos mediante reacciones “ene” (Hamilton, 1999).

Ambas rutas de oxidación desencadenan la formación de productos primarios y secundarios de oxidación. Tanto en la autooxidación como en la fotooxidación se forman hidroperóxidos y reciben el nombre de productos primarios de oxidación lipídica. Por ejemplo, la autooxidación de ácido 9,12-octadecadienoico (ácido linoleico) origina la formación del 9-hidroperóxido y 13-hidroperóxido, mientras que la fotooxidación resulta en la formación del 9-hidroperóxido, 10-hidroperóxido, 12-hidroperóxido y 13-hidroperóxido (Choe y Min, 2006). Los hidroperóxidos no imparten sabor u olor característico al alimento, pero en presencia de metales y temperaturas elevadas se descomponen en mezclas complejas de compuestos de bajo peso molecular. En contraste con los hidroperóxidos, estos compuestos sí imparten aromas y sabores distintivos a los alimentos y se conocen como productos de oxidación secundaria. Los productos de oxidación secundaria incluyen principalmente alcanos, alquenos, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, furanos, lactonas, compuestos epoxi, polímeros y ácidos. Por ejemplo, en la oxidación de aceite de linaza, cuyo principal componente es el ácido 9,12,15-octadecatrienoico (ácido linolénico), se detectó la presencia de 2-propenal, hexanal, 2-octenal, 1-octen-3-ol y 1-pente-3-ol, entre otros (Dlugogorski et al., 2012). La presencia

de productos primarios y secundarios de oxidación repercute en la calidad de los alimentos.

La degradación de los lípidos y la consecuente formación de productos primarios secundarios de oxidación conlleva un efecto negativo sobre la calidad sensorial y nutricional, funcionalidad y seguridad de los alimentos (Frankel, 2005). La pérdida de la calidad sensorial de los alimentos oxidados se debe a la formación de los compuestos secundarios de oxidación ya que al formarse compuestos que impartan colores, aromas y sabores desagradables, originan que los consumidores rechacen los alimentos oxidados. Así mismo, en el instante en que los lípidos y compuestos liposolubles como las vitaminas se destruyen, la calidad nutricional del alimento también se modifica (Choe y Min, 2009). Aunado a lo anterior, durante las distintas etapas de la oxidación se polimerizan lípidos y proteínas, dando lugar que estas moléculas pierdan su funcionalidad. Finalmente, la formación de compuestos tóxicos durante la oxidación como peróxidos, malonaldehído, 7-hidroxicolesterol, y 7-cetocolesterol hacen que el consumo de alimentos en este estado se convierta en un riesgo para la salud del consumidor (Jadhav et al., 1996). Ante esto, es indispensable controlar la oxidación lipídica en los alimentos.

La adición de antioxidantes a los alimentos es una alternativa en el control de la oxidación lipídica. De acuerdo al *Codex Alimentarius* un antioxidante es un aditivo alimentario que prolonga la vida en almacén de los alimentos, protegiéndolos del deterioro ocasionado por la oxidación (*Codex-Alimentarius*, 1989). Los antioxidantes pueden actuar en dos formas básicas, la primera es donando átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos formados en el transcurso de la oxidación, en este grupo se encuentran los tocoferoles, hidroxitolueno butilado y el hidroxianisol butilado, solo por mencionar algunos. La segunda forma es reduciendo y quelando metales (ácido cítrico y ácido fosfórico), secuestrando oxígeno y agentes reductores (ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, sulfitos) y desactivando al $^1\text{O}_2$ (carotenoides) (Shahidi y Zhong, 2010). Es importante señalar que ningún antioxidante evitará por completo la oxidación, solo ayudará a controlarla y retardarla. Los alimentos poseen una gama amplia de antioxidantes como parte de su composición natural. Desafortunadamente, la concentración en la cual están presentes no es suficiente

para proteger a los alimentos durante su procesamiento, distribución y almacenamiento. Ante esto es necesaria la adición extra de antioxidantes a los alimentos para su protección, proceso que se puede dar de dos formas, directamente o a través del material de envase (envases activos).

Envases Activos Antioxidantes

Las funciones principales de los envases alimentarios son proteger, preservar y contener al alimento en cuestión (Marsh y Bugusu, 2007). Si el envase además de cumplir con estas funciones es adicionado intencionalmente con un aditivo para que su funcionamiento mejore, el envase se convierte en un envase activo. Cuando el aditivo tiene propiedades antioxidantes, el envase se conoce como envase activo antioxidante, el cual tiene como objetivo fundamental el prolongar la estabilidad oxidativa del alimento y por ende extender su vida en anaquel (Robertson, 2012). El uso de envases activos permite que se dé una liberación de concentraciones bajas del antioxidante evitando la adición directa de altas concentraciones. Así mismo, hay una liberación continua del antioxidante permitiendo que el alimento esté protegido por un tiempo mayor debido a que siempre estará presente la concentración de antioxidante necesaria para controlar la oxidación lipídica. Además, el material de envase también protege al compuesto activo de reacciones de deterioración a las que estaría expuesto en la matriz alimenticia (Chen et al., 2012). Finalmente, se evitan diferentes etapas de proceso, como el mezclado, en las que frecuentemente se incorporan los antioxidantes (Cozzolino et al., 2013; Gemili et al., 2010; Mastromatteo et al., 2010).

La investigación y desarrollo de envases activos antioxidantes va a la par con las demandas del consumidor actual. El inicio del desarrollo de envases antioxidantes estuvo marcado por la utilización de compuestos sintéticos; en 1989 la industria de los cereales ya incorporaba hidroxitolueno butilado y hidroxianisol butilado a sus bolsas enceradas para la protección de sus productos (Labuza y Breene, 1989). Actualmente, las empresas Kellogg's y Kraft siguen incorporando hidroxitolueno butilado a las bolsas (*liners*) de

polietileno de alta densidad utilizadas en cereales y galletas, respectivamente. Posteriormente, el consumidor se preocupó por los efectos cancerígenos que la ingesta de antioxidantes sintéticos causaba (Shahidi y Zhong, 2010). En la actualidad el consumidor busca alimentos naturales y saludables con reducida o nula adición de aditivos sintéticos (Markarian, 2006). Como resultado de esto, el desarrollo de envases activos antioxidantes está concentrado en el uso de compuestos naturales. Esta tendencia tiene dos directrices, el uso de antioxidantes puros o el uso de extractos ricos en antioxidantes. A nivel investigación se están desarrollando diferentes materiales adicionados con extractos de cacao ricos en flavonoides; aceite de albahaca, orégano y romero, ricos en terpenoides y compuestos fenólicos, así como extractos de cáscara de cebada, ricos en compuestos fenólicos (Calatayud et al., 2013; Licciardello et al., 2012; Pereira de Abreu et al., 2010). Como resultado, la investigación para el uso de antioxidantes naturales está creciendo como alternativa válida en la protección de los alimentos. Entonces, esfuerzos recientes se han concentrado en la extracción, identificación y aplicación de antioxidantes naturales en forma de extractos, tal es el caso de los carotenoides.

Astaxantina

La astaxantina es un antioxidante natural y pertenece a la familia de los carotenoides. Este compuesto es el responsable del color rojo o rosa característico de los caparzones de los crustáceos, de la piel de los teleósteos, de los músculos de los salmones, ovarios de peces y bivalvos. El nombre sistemático de este carotenoide es el 3,3'-dihidroxi- β - β -caroteno-4,4'-diona (Figura 1), posee una fórmula molecular condensada de $C_{40}H_{52}O_4$ (596.9 g/mol). Este compuesto es uno de los pocos carotenoides que contiene en su estructura química cuatro átomos de oxígeno: dos son grupos hidroxilo (OH) y dos grupos ceto (C=O). Estas características químicas son las que le confieren sus propiedades antioxidantes a este carotenoide. La astaxantina se puede encontrar en forma pura o esterificada. La forma pura de astaxantina es de origen sintético (petroquímicas) y no ha sido aprobada para consumo humano por regulaciones internacionales, por lo tanto su uso se limita al de pigmento en la acuicultura (Fuji Chemical Industry Co., 2007-2009).

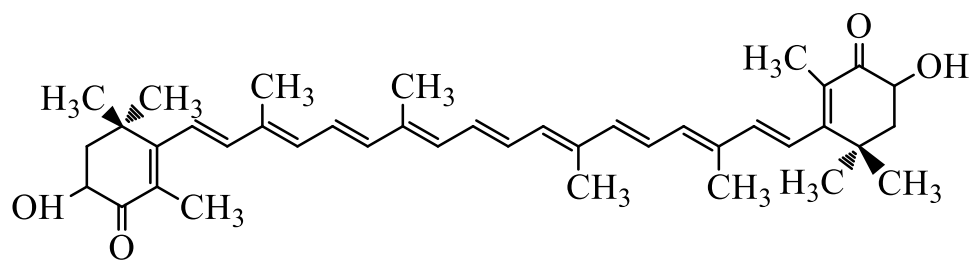
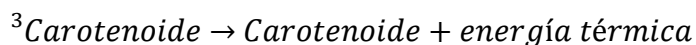
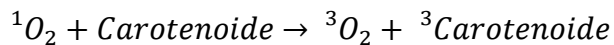


Figura 1. Estructura química de la astaxantina.

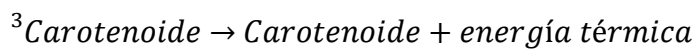
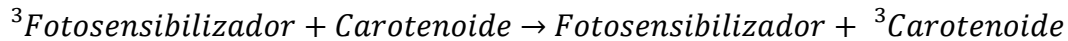
Mientras que los ésteres de astaxantina son sintetizados en un número ilimitado de organismos como levaduras (*Phaffia rhodozyma*), algas verdes (*Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiens* y *Clorococcum sp*), bacterias (*Agrobacterium aurantiacum*) y flores de algunos géneros (O'Callaghan, 1996).

Existen tres formas en las cuales la astaxantina al igual que el resto de los carotenoides ejercen su función antioxidante: desactivando al $^1\text{O}_2$, desactivando estados excitados de fotosensibilizadores y neutralizando radicales libres (Figura 2). El $^1\text{O}_2$ es la especie más reactiva de oxígeno y su estabilización se lleva a cabo por transferencia de energía de excitación hacia los carotenoides. De tal manera que la energía transferida permite que el carotenoide pase de su estado electrónico fundamental (S_0) a un estado excitado singlete (S_2). Posteriormente, el carotenoide disipa esta energía a través de interacciones vibracionales y rotacionales y regresa a su estado S_0 . Mientras que el $^1\text{O}_2$ pasa a su estado $^3\text{O}_2$, el cual es la forma más estable del oxígeno (Britton, 2008; Stahl y Sies, 1993). Existen moléculas en estado triplete como las clorofilas, las cuales pueden interactuar con otras moléculas y desencadenar la formación de radicales libres. Los carotenoides pueden desactivar estas moléculas mediante un proceso de transferencia de energía. Las moléculas que originalmente estaban en estado triplete transfieren su energía a los carotenoides y cambian a un estado energético menor como el singlete mientras que los carotenoides de su estado S_0 cambian a un estado S_2 . Posteriormente, los carotenoides disipan la energía en forma de calor y regresan a su estado S_0 (Choe y Min, 2009). Los carotenoides pueden neutralizar radicales libres (hidroxi, alcoxi o peroxi, entre otros) mediante tres mecanismos. El primero es cediendo protones y como resultado se forman carotenoides radicales aniónicos. El segundo es cediendo electrones y como resultado se forman carotenoides radicales catiónicos. El tercero es mediante adición con los radicales libres y como resultado se forman aductos. Teóricamente y en soluciones de solvente estos tres mecanismos son factibles, no obstante a nivel biológico no se han comprobado en su totalidad, pero se piensa que la opción más viable es la formación de aductos (Choe y Min, 2009).

Desactivación de oxígeno singlete

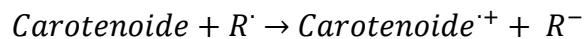


Desactivación de fotosensibilizadores



Neutralización de radicales libres

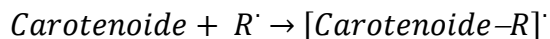
Transferencia de electrones



Transferencia de átomos de hidrógeno



Formación de aductos



R' : Radical libre

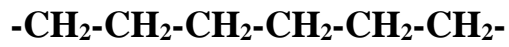
Figura 2. Mecanismos antioxidantes de carotenoides (Britton, 2008; Choe y Min, 2009; Skibsted, 2012).

La aplicación de astaxantina como antioxidante de alimento está en sus inicios. Los mecanismos mediante los cuales esta molécula podría ejercer su función antioxidante, ya están visualizados teóricamente. No obstante hay una falta de información muy grande que evidencie la capacidad de esta molécula y extractos ricos en esta molécula para controlar la oxidación lipídica en alimentos. Por adición directa Rao et al., (2007) incorporaron 0.1% de extracto de *Haematococcus pluvialis* a aceite de arroz, jengibre y palma, entre otros, y encontraron que el índice de peróxidos disminuyó en un rango de 40 a 45%. Wang et al., (2012) incorporaron 0.2% de extracto de *Haematococcus pluvialis* a aceite de girasol. El aceite se almacenó a 60 °C durante 6 días y se reportó que el índice de peróxidos disminuyó a 42.45%. Finalmente, Gramza-Michalowska y Stachowiak (2010) agregaron 0.1% de extracto de *Phaffia rodoflyma* a aceite de girasol y lo almacenaron a 110 °C hasta su oxidación. Estos autores encontraron un aumento de 15.31 h en el periodo de inducción del aceite, periodo durante el cual prácticamente no observaron cambios químicos en el aceite, hasta que en forma repentina se aceleró la oxidación. Por adición indirecta no hay registros del uso de carotenoides. Los registros que existen son sobre la incorporación de dos carotenoides, β -caroteno y licopeno, a materiales de envases para evaluar sus propiedades como aditivos. López-Rubio y Lagaron (2010) adicionaron 2×10^{-4} g/ml de β -caroteno a ácido poliláctico. Estos autores encontraron que el β -caroteno podía actuar como plastificante e incrementar la estabilidad a la radiación UV del polímero. Por otro lado, Cerruti et al., (2009) adicionaron 0.2% de extracto de jitomate como fuente de licopeno a polipropileno. Ellos encontraron que el extracto de jitomate brindaba al polipropileno estabilidad térmica durante su procesamiento. El área de envases de alimentos se convierte en una alternativa para la utilización de astaxantina. La fusión de dos elementos, la actividad antioxidante de este carotenoide y su liberación gradual y prolongada desde un material de envase, tiene potencial para un desarrollo tecnológico útil en el control de la oxidación lipídica de los alimentos.

El Polietileno como Material de Envase

Los envases fabricados de materiales plásticos han sido los más utilizados para fabricar envases activos antioxidantes. Los plásticos consisten en formulaciones de polímeros y aditivos. Entre los plásticos más utilizados para envasar alimentos están los polietilenos. Este polímero está constituido solamente por átomos de carbono e hidrógeno ya que es producto de la polimerización del etileno ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$), lo cual le da un carácter no polar a la molécula. El carácter no polar del polietileno lo hace una matriz ideal para la incorporación de aditivos con la misma polaridad. Aunque el polietileno solo está constituido por dos átomos, el acomodo específico de éstos genera dos tipos principales de polietileno, el PEAD ($940\text{-}975 \text{ kg/m}^3$) y el PEBD ($910\text{-}940 \text{ kg/cm}^3$) (Figura 3). El PEAD es un polímero lineal con pocas y reducidas ramificaciones, mientras que el PEBD es no lineal con ramificaciones abundantes y de gran tamaño (Robertson, 2012). Durante la manufactura del polietileno algunos de sus átomos se ordenan o empaquetan y otros permanecen desordenados. La forma ordenada y con patrones de repetición tridimensional de los átomos recibe el nombre de cristalinidad. El polietileno es un polímero semicristalino, es decir posee regiones ordenadas o cristalinas y desordenadas o amorfas. La cristalinidad del PEAD es del 90% mientras que la del PEBD es de 55-70% (Robertson, 2012). El grado de cristalinidad influye rotundamente en las propiedades mecánicas de los polímeros como la resistencia a la tensión, resistencia al rasgado y porcentaje de elongación. La cristalinidad también delimita los procesos de transferencia de masa que se llevan a cabo en el interior del polímero, lo cual repercute en la capacidad del polímero para actuar como matriz de almacenamiento y liberación de aditivos activos en el envasado de alimentos (Selke et al., 2004).

Existen diferentes métodos para procesar al polietileno, pero uno de los más importantes es la extrusión. La extrusión se puede definir como el flujo forzado de un material termoplástico fundido a través de un tornillo sin fin. La viscosidad del polímero fundido

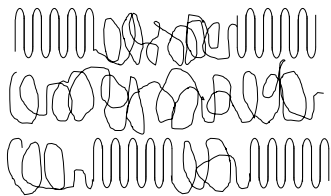


Polietileno

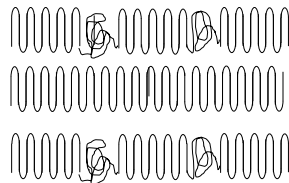
Región cristalina



Región amorfa



Polietileno de baja densidad



Polietileno de alta densidad

Figura 3. Estructura y tipos de polietileno.

es muy elevada por lo que es necesario aplicar presión para que la masa fundida pueda desplazarse (Robertson, 2012). El equipo en donde se lleva a cabo la extrusión recibe el nombre de extrusor (Figura 4). La extrusión se realiza de la siguiente manera: cuando el polímero (en forma de gránulos) se alimenta al extrusor, el husillo lo empuja hacia adelante a lo largo del barril. En el barril el polímero se calienta y se funde. Este fluido continúa y al final se pasa a través de un dado que proporciona el perfil o la forma final deseada. Una vez que sale del dado, el polímero debe ser enfriado rápidamente para mantener la forma que se obtiene en el dado (Ramos de Valle, 2000). Con este proceso es posible elaborar películas, hojas y tubos.

Son pocas las aplicaciones en las que de manera individual el PEAD o el PEBD brindan la protección total que un alimento necesita. Debido a esto se recurre a la elaboración de películas de dos, tres o más capas de polietileno solo combinado con otros polímeros. De tal manera que cada polímero brinda características específicas que en conjunto protegen adecuadamente al alimento (Butler y Morris, 2009). La adición de dos o más capas de polímeros se puede dar mediante un proceso de coextrusión, para lograrlo es necesario acoplar dos más extrusores a la cabeza principal del extrusor.

Migración

La migración es un proceso de transferencia de masa en el cual las moléculas de bajo peso molecular incluidas en el envase, se desplazan hacia el producto envasado (Castle, 2007). El proceso global se desarrolla en tres etapas (Figura 5), difusión del migrante en el material de envase, disolución en la interfase envase-alimento y dispersión en el alimento (Limm y Hollifield, 1995).

Primera etapa. En esta etapa la migración del aditivo se lleva a cabo en las regiones amorfas del polímero. En la mayoría de los casos esta etapa es controlada por el proceso de difusión. La difusión es la transferencia de masa de una región de mayor a menor concentración y se lleva a cabo a través del volumen libre del polímero. Este proceso obedece a la primera (Ecuación 1) y segunda (Ecuación 2) ley de Fick, según las cuales

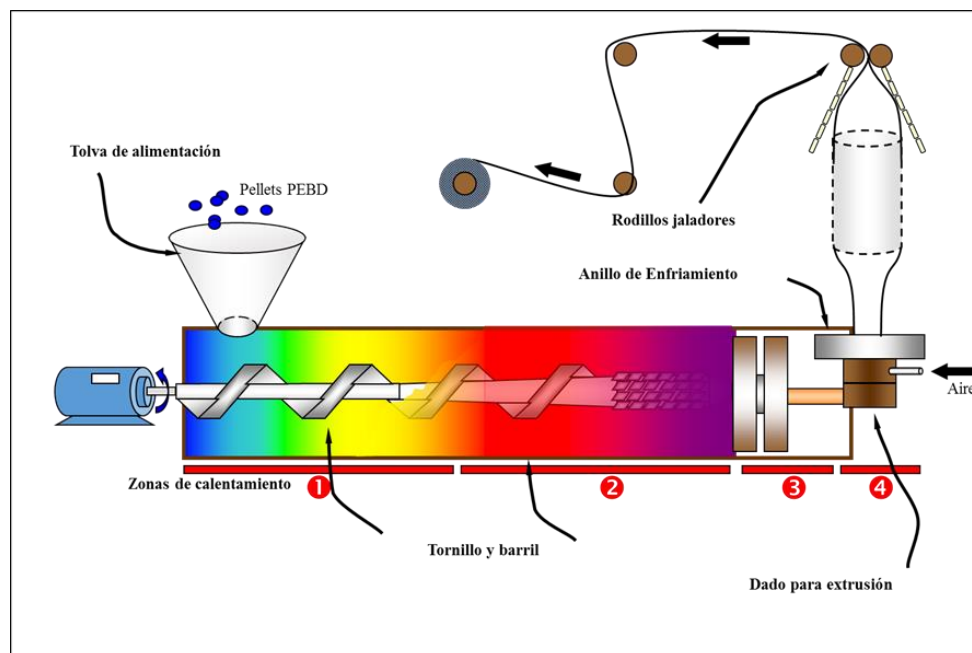
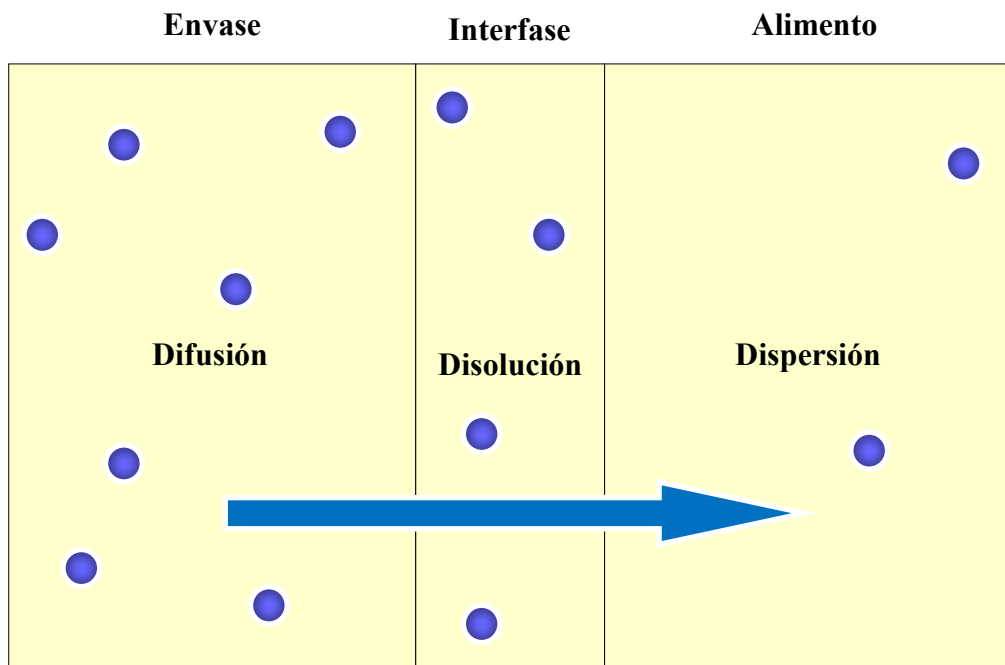


Figura 4. Geometría típica de un extrusor.



● **Antioxidante**

Figura 5. Etapas del proceso de migración (Catalá y Gavara, 2002).

se produce un flujo del aditivo en dirección contraria al gradiente de concentración a través del espesor del polímero.

$$J_i = -D \frac{\partial C_i}{\partial x} \quad (1)$$

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \right) \quad (2)$$

Donde “ J ” es el flujo de aditivo, “ C ” es la concentración del aditivo difundido, “ x ” es el espesor del polímero y “ D ” el coeficiente de difusión. Debido a que no todas las moléculas presentan la misma capacidad para difundirse en el polímero, se han propuesto tres modelos para describir la migración de los compuestos de bajo peso molecular:

Modelo I: “No migración”, en este modelo las moléculas tienen una reducida velocidad de difusión del interior del plástico hacia su superficie. Ante esto, únicamente se transfieren los aditivos ubicados en la superficie del polímero que están en contacto con el alimento mediante un mecanismo de disolución. Se obtienen D menores a $1 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Modelo II: “Migración independiente, no controlada por el alimento”. Este modelo se caracteriza por la transferencia de aditivos desde el interior del polímero hacia la superficie de contacto, aún en ausencia del producto. En este caso los D son mayores a $1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ y se consideran constantes e independientes del tiempo y del producto que está en contacto.

Modelo III: “Migración dependiente del alimento”. En este modelo es indispensable la presencia del alimento. El alimento interactúa con el polímero y provoca que la estructura física y la disposición molecular de la capa próxima al alimento se modifiquen. Lo anterior se manifiesta como un hinchamiento progresivo del polímero, originándose un sistema multifásico no homogéneo. El D no permanece constante, por el contrario, aumenta con el tiempo. Se obtienen D menores a $1 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ en ausencia del alimento y mayores a $1 \times 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ en presencia del alimento.

Segunda etapa. En esta etapa la migración se desarrolla en la interfase entre el alimento y el polímero, ocurriendo la solvatación o disolución de los aditivos en el alimento, en la búsqueda del equilibrio químico.

Tercera etapa. El migrante ya disuelto se dispersa en el alimento. Si el alimento es sólido, un líquido muy viscoso o no sufre manipulaciones que agiten el contenido, el aditivo se difunde en el alimento de acuerdo con las mismas leyes de Fick (Catalá y Gavara, 2002).

El proceso de migración está dado por la cinética de difusión de los antioxidantes en el polímero, el cual está expresado por D . Para el cálculo de D se utilizan soluciones analíticas de la segunda ley de Fick (Ecuación 2). Cuando la difusión es en una dimensión y el volumen de la solución es finito (Crank, 1975; Iñiguez-Franco et al., 2012; Manzanarez-López et al., 2011), la solución analítica es la siguiente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2 \alpha (1+\alpha)}{1+\alpha + \alpha^2 q_n^2} \exp\left\{-\frac{Dq_n^2 t}{l^2}\right\} \quad (3)$$

Donde M_t/M_∞ es la relación entre la concentración del antioxidante que se difunde en el tiempo “ t ” y la concentración del antioxidante difundido en el equilibrio; “ l ” es el espesor de la del polímero y q_n son las raíces positivas no cero de $\tan q_n = \alpha q_n$ y α es:

$$\alpha = \frac{V_s}{k_{p,s} V_p} \quad (4)$$

Donde V_s y V_p son los volúmenes molares del alimento y del polímero, y $K_{p,s}$ es el coeficiente de partición del antioxidante entre el polímero y el alimento, el cual a bajas concentraciones se puede asumir constante y es la relación de la concentración del antioxidante en el polímero ($C_{p,\infty}$) y el alimento ($C_{s,\infty}$) una vez logrado el equilibrio.

$$K_{p,s} = \frac{C_{p,\infty}}{C_{s,\infty}} \quad (5)$$

Si la cantidad del simulante es considerado infinito (i.e., $\alpha \gg 1$ además de que $V_s \gg V_p$ y/o $K_{p,s} < 1$), la solución analítica de la segunda ley de Fick es:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{(2m+1)^2} \exp\left\{-\frac{D(2m+1)^2\pi^2 t}{l^2}\right\} \quad (6)$$

Para el cálculo de D a partir de estas ecuaciones es necesario el uso de diversas herramientas como métodos numéricos y programas computacionales.

En base a los antecedentes antes descritos este trabajo tuvo como objetivo incorporar astaxantina proveniente de extracto de flor de cempasúchil a PEBD Y PEAD, solo o coextruido con polietileno de alta densidad, con el fin de elaborar un envase activo antioxidante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Britton, G. (2008). Functions of Intact Carotenoids. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids* (Vol. 4, pp. 189-212): Birkhäuser Basel.
- Butler, T. I., & Morris, B. A. (2009). PE based multilayer film structures. In J. R. Wagner (Ed.), *Multilayer Flexible Packaging* (pp. 205-230). Norwich, England: William Andrew Publishing.
- Calatayud, M., López-de-Dicastillo, C., López-Carballo, G., Vélez, D., Muñoz, P. H., & Gavara, R. (2013). Active Films Based on Cocoa Extract with Antioxidant, Antimicrobial and Biological Applications. *Food Chem.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.097>
- Castle, L. (2007). Chemical Migration into Food: an Overview. In K. A. Barnes, C. R. Sinclair & D. H. Watson (Eds.), *Chemical Migration and Food Contact Materials* (pp. 457). Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd.
- Catalá, R., & Gavara, R. (2002). Fundamentos y Mecanismos de la Migración. In R. Catalá & R. Gavara (Eds.), *Migración de Componentes y Residuos de Envases en Contacto con Alimentos* (pp. 1-18). Valencia, España: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. CSIC.
- Cerruti, P., Malinconico, M., Rychly, J., Matisova-Rychla, L., & Carfagna, C. (2009). Effect of natural antioxidants on the stability of polypropylene films. *Polymer Degradation and Stability*, 94(11), 2095-2100. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.07.023>
- Codex-Alimentarius*. (1989). Nombres Genéricos y Sistema Internacional de Numeración de Aditivos Alimentarios. CAC/GL 36-1989. from FAO-OMS www.codexalimentarius.org/input/download/standards/7/CXG_036s.pdf
- Colín-Chávez, C., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Lizardi-Mendoza, J., & Balandrán-Quintana, R. (2012). Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. *Packaging Technology and Science*. doi: 10.1002/pts.1982
- Cozzolino, C. A., Nilsson, F., Iotti, M., Sacchi, B., Piga, A., & Farris, S. (2013). Exploiting the nano-sized features of microfibrillated cellulose (MFC) for the development of controlled-release packaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110(0), 208-216. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.046>
- Crank, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion* (2nd ed.). Great Britain: Oxford University.
- Chen, X., Lee, D. S., Zhu, X., & Yam, K. L. (2012). Release Kinetics of Tocopherol and Quercetin from Binary Antioxidant Controlled-Release Packaging Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(13), 3492-3497. doi: 10.1021/jf2045813

- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186. doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x
- Choe, E., & Min, D. B. (2009). Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4), 345-358. doi: 10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x
- Długogorski, B. Z., Kennedy, E. M., & Mackie, J. C. (2012). Identification and Quantitation of Volatile Organic Compounds from Oxidation of Linseed Oil. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(16), 5645-5652. doi: 10.1021/ie202535d
- Frankel, E. N. (2005). *Lipid oxidation* (2nd ed.): Woodhead Publishing.
- Fuji Chemical Industry Co., L. (2007-2009). AstaREAL® The Astaxanthin of Choice. Retrieved August 22, from <http://www.astareal.com/>
- Gemili, S., Yemenicioğlu, A., & Altinkaya, S. A. (2010). Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. *Journal of Food Engineering*, 96(3), 325-332. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.020>
- Gramza-Michałowska, A., & Stachowiak, B. (2010). The Antioxidant Potential of Carotenoid Extract from *Phaffia rhodozyma*. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9(2), 171-188.
- Hamilton, R. J. (1999). The Chemistry of Rancidity in Foods. In J. C. Allen & R. J. Hamilton (Eds.), *Rancidity in Foods* (3th ed., pp. 1-21). Great Britain: Aspen Publication.
- Iñiguez-Franco, F., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Ayala-Zavala, J. F., Auras, R., & Gámez-Meza, N. (2012). Antioxidant Activity and Diffusion of Catechin and Epicatechin from Antioxidant Active Films Made of Poly(l-lactic acid). *J. Agr. Food Chem*, 60(26), 6515-6523. doi: 10.1021/jf300668u
- Jadhav, S. J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni, A. D., & Madhavi, D. L. (1996). Lipid Oxidation in Biological and Food Systems. In D. L. Madhavi, S. S. Deshpande & D. K. Salunkhe (Eds.), *Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives* (pp. 5-64). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Labuza, T., & Breene, W. (1989). Applications of "Active Packaging" for Improvement of Shelf-Life and Nutritional Quality of Fresh and Extended Shelf-Life Foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13(1), 1-69. doi: 10.1111/j.1745-4549.1989.tb00090.x
- Licciardello, F., Muratore, G., Mercea, P., Tosa, V., & Nerin, C. (2012). Diffusional Behaviour of Essential Oil Components in Active Packaging Polypropylene Films by Multiple Headspace Solid Phase Microextraction–Gas Chromatography. *Packag. Techol. Sci*, 26(3), 173-185. doi: 10.1002/pts.1969
- Limm, W., & Hollifield, H. C. (1995). Effects of Temperature and Mixing on Polymer Adjuvant Migration to Corn Oil and Water. *Food Addit. Contam A*, 12(4), 609-624. doi: 10.1080/02652039509374349
- López-Rubio, A., & Lagaron, J. M. (2010). Improvement of UV stability and mechanical properties of biopolyesters through the addition of β -carotene. *Polymer Degradation and Stability*, 95(11), 2162-2168. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polyimdegradstab.2010.03.002>

- Manzanarez-López, F., Soto-Valdez, H., Auras, R., & Peralta, E. (2011). Release of α -Tocopherol from Poly(Lactic Acid) Films, and its Effect on the Oxidative Stability of Soybean Oil. *J. Food Eng*, 104(4), 508-517. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.12.029
- Markarian, J. (2006). Consumer demands push growth in additives for active packaging. *Plastics, Additives and Compounding*, 8(5), 30-33. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1464-391X\(06\)70638-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1464-391X(06)70638-9)
- Marsh, K., & Bugusu, B. (2007). Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science*, 72(3), R39-R55. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x
- Mastromatteo, M., Mastromatteo, M., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2010). Advances in controlled release devices for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 591-598. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.010>
- Min, D. B., & Boff, J. M. (2002). Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(2), 58-72. doi: 10.1111/j.1541-4337.2002.tb00007.x
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., . . . Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00223-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00223-5)
- O'Callaghan, M. (1996). Biotechnology in Natural Food Colours: The Role of Bioprocessing. In G. Hendry & J. Houghton (Eds.), *Natural Food Colorants* (pp. 80-108). Great Britain: Blackie Academic and Professional.
- Pereira de Abreu, D. A., Paseiro Losada, P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2010). Evaluation of the Effectiveness of a New Active Packaging film Containing Natural Antioxidants (from Barley Husks) that Retard Lipid Damage in Frozen Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*). *Food Res. Int*, 43(5), 1277-1282. doi: 10.1016/j.foodres.2010.03.019
- Ramos de Valle, L. F. (2000). *Extrusión de Plásticos- Principios Básicos*. Ciudad de México, México: Editorial Limusa.
- Rao, A. R., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2007). Stabilization of Astaxanthin in Edible Oils and its Use as an Antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 957-965. doi: 10.1002/jsfa.2766
- Robertson, G. L. (2012). *Food Packaging: Principles and Practice* (3rd ed.). United States of America: CRC press.
- Selke, S. E., Culter, J. D., & Hernandez, R. J. (2004). *Plastics packaging: properties, processing, applications, and regulations* (2nd ed.). USA: Hanser Gardner Publications, Inc.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 930-940. doi: 10.1002/ejlt.201000044
- Skibsted, L. H. (2012). Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2409-2417. doi: 10.1021/jf2051416
- Stahl, W., & Sies, H. (1993). Physical Quenching of Singlet Oxygen and cis-trans Isomerization of Carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 691(1), 10-19. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb26153.x

- Valenzuela, A., Sanhueza, J., & Nieto, S. (2003). Natural Antioxidants in Functional Foods: from Food Safety to Health Benefits. *Grasas Aceites*, 54(3), 295-303. doi: 10.3989/gya.2003.v54.i3.245
- Wang, L., Yang, B., Yan, B., & Yao, X. (2012). Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 120-127. doi: 10.1016/j.ifset.2011.09.004

CAPÍTULO I

Fabricación y propiedades de películas antioxidantes a base de polietileno adicionadas con extracto de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) y su aplicación en la estabilidad oxidativa de aceite de soya

Por

Colín-Chávez, C.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Lizardi-Mendoza, J.; Balandrán-
Quintana, R. R.,

Trabajo publicado en *Packaging Technology and Science*

Objetivo 1. Evaluar el efecto de la incorporación de extractos con astaxantina en las propiedades espectroscópicas, térmicas y mecánicas de una película monocapa de PEBD y otra bicapa de PEAD/PEBD.

Objetivo 4. Calcular el efecto del envase activo antioxidante sobre la estabilidad oxidativa de aceite de soya.

PAPER PRESENTED AT IAPRI WORLD CONFERENCE 2012

Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability

By Citlali Colín-Chávez, Herlinda Soto-Valdez,* Elizabeth Peralta, Jaime Lizardi-Mendoza and René Renato Balandrán-Quintana

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apdo. Postal 1735 Hermosillo, Sonora 83304, Mexico

Four films were extruded in a pilot-plant scale blown extrusion machine: a monolayer low-density polyethylene (LDPE) film added with 2.90% of marigold (*Tagetes erecta*) extract, a two-layer high-density polyethylene/LDPE film added with 3.59% of the extract in the LDPE layer and the corresponding two control films without addition of the extract. More than 64% of astaxanthin contained in the extract was lost during the extrusion process. Spectroscopic, optical and mechanical properties of the films were affected by the addition of the marigold extract. The films showed to be light sensitive when exposed to commercial light at 25 °C; however, bags made of the films showed a positive effect on soybean oil stability when used as packaging. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Received 18 December 2011; Revised 8 May 2012; Accepted 17 May 2012

KEY WORDS: marigold extract; astaxanthin; polyethylene; properties; natural antioxidant; active packaging

INTRODUCTION

Active food packaging involves the deliberated incorporation of a chemical into the packaging material; when the chemical has antioxidants properties, the active packaging is known as antioxidant active packaging.^{1,2} Also, different natural antioxidants, such as α -tocopherol,^{3,4} carvacrol⁵ and carnolic acid,⁶ have been reported as additives for polyolefins. In addition, new films added with natural extracts rich in antioxidants from red grape seeds, white grape seeds, tomato extracts,⁷ barley husks,⁸ rosemary,⁹ oregano,¹⁰ cinnamon oil, clove oil and tea extract¹¹ have been developed. Thus, natural antioxidants are rising as a valid alternative to polymer and food protector, and recent efforts have been concentrated on the extraction, identification and application of these new natural antioxidants.

Azteca marigold (*Tagetes erecta*) flowers are a common source of natural antioxidants like xanthophylls. In the market, it is possible to find Azteca marigold extracts, which are used as pigments in animal feed for the poultry industry for pigmentation of skin and egg yolks, shrimp farming and commercial/ornamental fish culture. One of the main xanthophylls found in this extract is astaxanthin. Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione; Figure 1) is an orange xanthophyll with unique chemical properties based on its molecular structure. The number of conjugated double bonds and the presence of the hydroxyl (OH) and keto (C=O) moieties on each ionone ring explain its higher antioxidant activity.^{12,13}

* Correspondence to: Herlinda Soto-Valdez, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apdo. Postal 1735 Hermosillo, Sonora 83304, Mexico.
E-mail: hsoto@ciad.mx

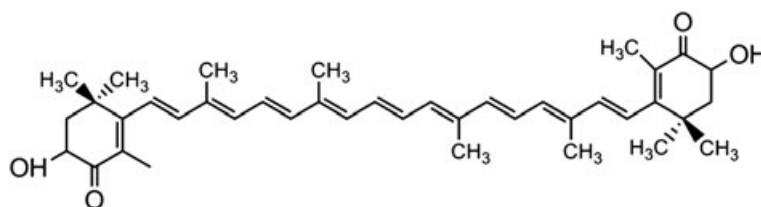


Figure 1. Chemical structure of astaxanthin.

The antioxidant activity of astaxanthin consists in its ability to scavenge free radicals like singlet oxygen and peroxy radicals. Miki¹⁴ and Fukuzawa *et al.*¹⁵ showed that the astaxanthin singlet oxygen quenching rate was faster than that of other antioxidants like lutein, β -carotene and α -tocopherol. Astaxanthin has also showed strong activity as an inhibitor of lipid peroxidation. It scavenges radicals better by electron transfer (electron accepting) than by hydrogen abstraction.¹⁶

Low-density polyethylene (LDPE) films have become the most popular flexible packaging material^{17,18} because of their combination of product performance (good mechanical and barrier to moisture properties) and low cost. In most food packaging applications, one layer of LDPE is not enough to protect the product and multilayer films from different polymers are needed. Multilayer films make it possible to combine specific properties (mechanical, thermal, optical, barrier, sealability, etc.) to obtain a performance that cannot be met by one polymer. For example, coextruded films made of 40% high-density polyethylene (HDPE) + 60% linear LDPE (LLDPE) are used for flexible milk packaging, 10% LLDPE + 80% high molecular weight HDPE + 10% LLDPE films are used as grocery bags and 15% metallocene-catalyzed linear LDPE + 70% LLDPE + 15% metallocene-catalyzed linear LDPE films are designed for frozen food packaging.¹⁹

The aim of this work was to develop and characterize monolayer and co-extruded films made of polyethylene containing marigold extract. The characterization included the evaluation of spectroscopic, optical, thermal, mechanical, light stability and antioxidant properties of films. Also, the effect of the thermal processing on the concentration of astaxanthin was evaluated. To assess the antioxidant properties of active films, soybean oil was packed and stored in bags made from the films, and peroxide value (PV) was evaluated as primary oxidation product.

MATERIALS AND METHODS

Materials

LDPE resin (LBA253) was obtained from Muehlstein (Wilton, CT, USA). HDPE resin (HD7960) was obtained from ExxonMobil Chemical (New York, NY, USA). Marigold extract was provided by Industrias Vepinsa S.A. de C.V. (Sinaloa, Mexico). Astaxanthin (>97%) high-performance liquid chromatography (HPLC) standard was obtained from Alexis[®] Biochemicals (Enzo Life Science, Inc., Farmingdale, NY, USA). Butylated hydroxytoluene (BHT, 99%) was from TCI America (Portland, OR, USA). All solvents used for the quantification of astaxanthin were HPLC grade (J.T Baker, Estado de México, Mexico).

Manufacture of the films added with the marigold extract

One batch of LDPE resin was manually mixed with 2.90% wt/wt of marigold extract (MM film) and blown-extruded with a pilot plant size monospindle extrusion machine (Beutelspacher, Mexico City, Mexico). A second batch of LDPE with no addition of the extract was extruded under the same conditions to be used as the control (MC film). A third batch of LDPE resin manually mixed with 3.59% wt/wt of marigold extract was coextruded with a HDPE layer (BM film) using a coextrusion die (Beutelspacher, Mexico City, Mexico). Finally, a fourth batch of LDPE with no marigold extract was coextruded with a HDPE layer as a control for the bilayer film (BC film). Extrusion temperatures for the feed, screw 1, screw 2 and die zones were 125 °C, 130 °C, 130 °C and 130 °C for LDPE and 135 °C, 145 °C, 150 °C and 150 °C for HDPE, respectively (the HDPE material flowed into the die

at 150 °C, but the temperature of die was 130 °C). Thickness was determined with a micrometer model DTT, E.J. Cady & Co. (Illinois, USA). In the case of the bilayer film a microscope (Olympus BX51, Center Valley, PA, USA) was used to measure the thickness of each layer. The MC and MM films were 53.0 ± 3.0 and 50.0 ± 3.0 μm , respectively. On the other hand, the BC and BM films were 74.8 ± 7.8 (25.6 ± 3.0 and 49.2 ± 7.5 μm for HDPE and LDPE layers) and 76.2 ± 9.5 μm (33.2 ± 7.4 and 43.0 ± 6.0 μm for HDPE and LDPE layers), respectively.

Quantification of astaxanthin

The marigold extract (14.1 mg) was dissolved in 10 ml of acetone, and proper dilutions were performed to quantify astaxanthin. Both films, MM and BM, were cut into 0.25-cm² pieces and stirred in acetone at 40 °C for 24 h in the darkness to extract astaxanthin from the films. To protect the antioxidant from degradation during the extraction period, 100 $\mu\text{g/ml}$ of BHT was added to the solution. The extraction was performed two times to ensure the complete extraction of the antioxidant. The quantification of astaxanthin in both marigold extract solution and films extractions was achieved using an HPLC (Varian model 9012, Mexico City, Mexico) equipped with a photodiode array detector (Varian ProStar model 335, 474 nm). A 20- μl loop and a 2.0×250 -mm YMCTM Carotenoid C30 column (3 μm) (Waters, Milford, MA, USA) were used. A 4×3 -mm Carbo Ca²⁺ cartridge was used as a guard column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). A gradient mobile phase consisting of (A) methanol, (B) methyl *tert*-butyl ether and (C) 5% aqueous formic acid was used: 0–6 min, 81% A, 15% B and 4% C; 6–14 min, 81%–36% A, 15%–60% B and 4% C; 14–24 min, 36% A, 60% B and 4% C; 24–26 min, 36%–81% A, 60%–15% B and 4% C; 26–30 min, 81% A, 15% B and 4% C. The flow rate was of 0.3 ml/min. Standard solutions of astaxanthin in acetone at concentrations from 0.25 to 12 $\mu\text{g/ml}$ were used to produce a calibration curve for the quantification of the analyte.

The retention time of astaxanthin was 7.75 min, and the limit of quantification was 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Analytical recoveries were determined by spiking a solution containing pieces of the MC and BC films with a known concentration of astaxanthin. The solutions were extracted according to the aforementioned method, including the second extraction period, and the results indicated that recoveries of 81% and 93% were obtained, respectively. All analytical data were corrected for recoveries.

Effect of marigold extract on the spectroscopic properties of the films

Diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (DRIFT-IR). Marigold extract and films were qualitative analyzed by infrared spectroscopy. A Fourier transform infrared spectrophotometer (Protege 460; Nicolet Analytical Instruments, Madison, WI, USA). A Gemini diffuse reflectance sampling head (Spectra Tech Inc., Oak Ridge, TN, USA) was used as a DRIFT accessory. Scans were collected from 4000 to 400 cm^{-1} . DRIFT spectra were obtained in the absorbance mode by co-adding 64 scans at a resolution of 4 cm^{-1} .

Light absorbance. The ultraviolet (UV)-visible light absorbance of the marigold extract and films was measured spectrophotometrically in the range of 200–800 nm at a scan speed of 600 nm/min with a spectrophotometer (Cary 50 Bio; Varian, Victoria, Australia).

Effect of marigold extract on the optical properties of films

Colour. The colour parameters of the uniform colour space CIELAB and the lightness (L), redness (a^*) and yellowness (b^*) of the films were measured using a Colorimeter (CR-300; Konica Minolta, Mexico City, Mexico). The total colour difference, ΔE^* , was calculated using the following equation:

$$\Delta E = \left[(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2 \right]^{0.5} \quad (1)$$

Three replicates were used. The bilayer films were measured with the incident light on the HDPE layer. a^* takes positive values for reddish colours and negative values for the greenish ones, whereas b^* takes positive values for yellowish colours and negative values for the bluish ones. L^* is an

approximate measurement of luminosity, which is the property according to which each colour can be considered as equivalent to a member of the gray scale, between black and white, taking values within the range 0–100. Hue and chrome were also measured directly. Chrome is the attribute that allows the determination of the degree of difference in comparison to a gray colour with the same lightness for each hue, so it is considered the quantitative attribute of colour. Hue is the attribute according to which colours have been traditionally defined as reddish, greenish, and so on. It is the attribute that allows a colour to be distinguished about a gray colour with the same lightness. This attribute is related to the differences in absorbance at different wavelengths and is considered the qualitative attribute of colour.²⁰

Effect of marigold extract on the melting temperature of films

A differential scanning calorimeter (Diamond DSC; PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) was used to determine the effect of the antioxidant on the melting temperature (T_m) of the materials. Samples of the films were subjected to a heat-cool cycle, and the temperature was varied from 25 °C to 160 °C at a heating rate of 10 °C/min. The results were analyzed with a Pyris-Instrument Managing Software (Version 3.5).

Effect of marigold extract on the mechanical properties of films

The mechanical measurements, including tensile strength, elongation at break and tear strength properties of the films, were performed using a tensile tester Ta-XT2 (Texture Technologies Co., Scardale, NY, USA) at room temperature (25 °C), following the procedures described in ASTM D882²¹ and ASTM D1938,²² respectively. The samples were tested in machine direction.

The seal strength of the films was calculated according to ASTM F88²³ using a tensile tester TA-XT2 (Texture Technologies Co., Scardale, NY, USA) at room temperature (25 °C).

Carotenoids and degradation of colour on light-exposed marigold extract and films

Marigold extract was placed in clear glass vials and exposed to fluorescent light (lamps TCPHS23DL4MX Model EDXO-23; Aurora, OH, USA) with an intensity ranging between 697 and 1945 lx (luxometer SP-840020; Neurtek Instruments, Guipuzcoa, Spain) at 25 °C for 47 days. Samples were taken frequently for the determination of total carotenoids by extracting the pigments in acetone and by measuring the absorbance at 474 nm. The concentration of carotenoids (as astaxanthin) was calculated using a calibration curve from 0.75 to 4 µg/ml of astaxanthin in acetone.²⁴ Three replicates were conducted. MM and BM films were stored under the same conditions as marigold extract, and its colour degradation was studied. Both extract and films were frequently rotated to minimize the differences in light exposure. Hue and chrome were measured using a Colorimeter (CR-300; Konica Minolta). Because hue is a qualitative attribute of colour, it was used only to describe the tone of films, whereas chrome, the quantitative attribute of colour, was used to determine the kinetics of the colour degradation. For each film, at least five measurements were made at different positions. The average values of 3 film samples were reported.

Colour degradation kinetics has been reported to follow a first-order reaction kinetics;^{25–27} therefore, a first-order kinetics with an offset model was used in this study:²⁸

$$\ln(C - C_\infty) = -kt \quad (2)$$

where C is the chrome value of the films at any time, C_∞ is the chrome value of the films after no changes were observed (value of the control film plus degradation products of the marigold extract), k is the temperature-dependent rate constant (day^{-1}) and t is the exposure time (days).

Effect of the films on the stability of soybean oil

Deodorized soybean oil containing no artificial antioxidants, provided by Industrializadora Oleofinos S.A. de C.V. (Zapopan, Jalisco, Mexico), was used to perform the stability experiments. Bags were made with MC and MM films (4.5×10.5 cm) and BC and BM films (3.7×22 cm) using a Vacuum Sealer (V1085; FoodSaver, Boca Raton, FL, USA). The bags were filled with 50 ml (43.8 g) of soybean

oil. The liquid volume/area ratio was 0.53 ml/cm² for monolayer bags, whereas it was 0.31 ml/cm² for bilayer bags. After packing the oil, the bags were closed with clamps and exposed to fluorescent light (lamps Fle/HLX20/T3/SPX41; General Electric, Fairfield, CT, USA) with an intensity ranging between 876 and 1135 lx (luxometer SP-840020; Neurtek Instruments) at 30 °C. Samples of soybean oil were taken at 3, 5, 7, 10 and 15 days for the determination of the standard PV as primary oxidation product using the Cd 8b-90 AOCS method.²⁹ Three replicates were carried out for each sample. Results were expressed as milliequivalents of oxygen per kilogram of oil (mEq/kg).

To observe the behavior of the oxidation and the effect of the films added with the marigold extract at a lower temperature (25 °C) and under the light intensity used in the colour degradation experiment (697–1945 lx), an additional stability of soybean oil experiment was performed with oil in bags made of the monolayer films. PV was also monitored for 10 days with a more frequent sampling during the first 4 days of storage to be able to observe a more detailed effect on the oil.

RESULTS AND DISCUSSION

Quantification of astaxanthin after film processing

Figure 2 shows the chromatograms of the astaxanthin standard, marigold extract and films extraction. The chromatograms of marigold extract and films extractions show a peak at 7.75 min, which is in agreement with the retention time of the astaxanthin standard. The concentration of astaxanthin in the marigold extract was 18.15 ± 2.84 mg/g. Table 1 shows the effect of the extrusion process on the antioxidant concentration in the films. The concentration of astaxanthin in the MM film was 36.02% of the astaxanthin that was originally added. Then, the astaxanthin lost during processing was 63.98%. This is one of the highest losses reported on the antioxidant processing. High losses of other antioxidants are reported in polyolefin studies. Graciano-Verdugo *et al.*³⁰ reported losses of 24.6% of α -tocopherol during processing of LDPE films added with 4% of the antioxidant.

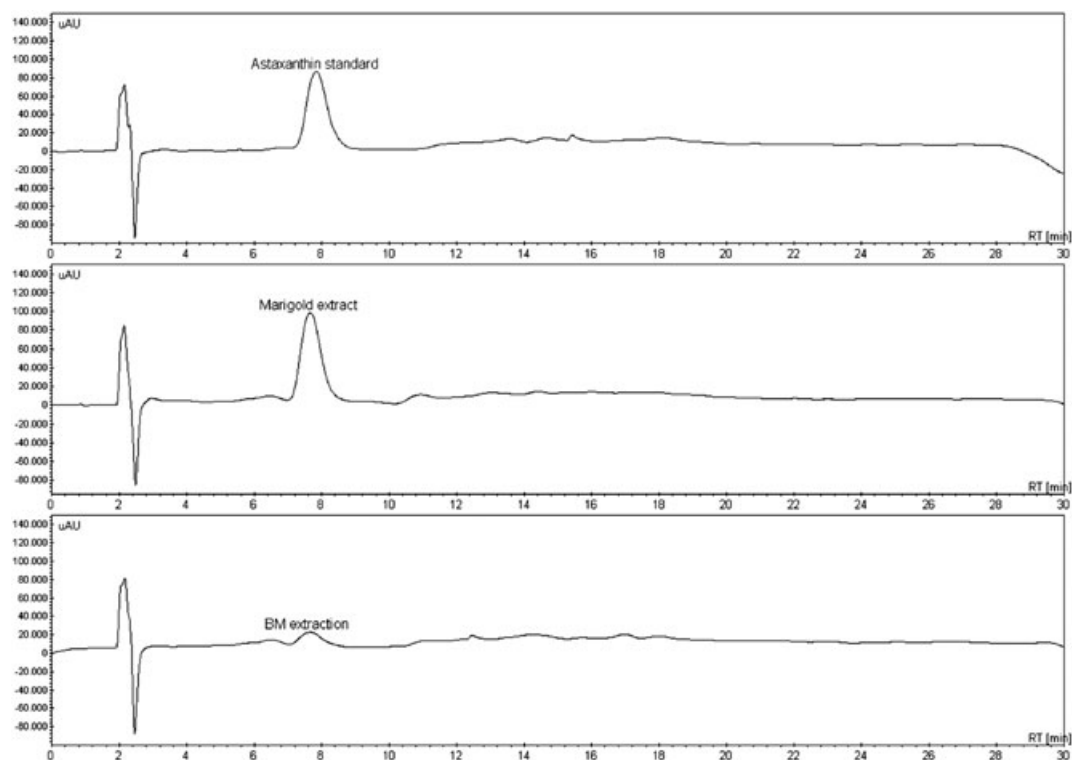


Figure 2. HPLC chromatogram of astaxanthin standard (6 µg/ml), marigold extract and BM film extraction.

Table 1. Effect of the extrusion process on the astaxanthin concentration in the films.

Film	Marigold extract added to LDPE (%)	Astaxanthin added to LDPE ($\mu\text{g/g}$)	Astaxanthin quantified in the film ($\mu\text{g/g}$) ^a	Astaxanthin estimated in the LDPE layer ^a	
				$\mu\text{g/g}$ ^b	% ^c
MC	0	0	0	0	0
MM	2.90	524.64	188.97 \pm 15.85	–	36.02
BC	0	0	0	0	0
BM	3.59	630.21	75.68 \pm 0.09	135.82 \pm 0.16	21.55

^aValues are presented as means \pm SD of three replicates.

^bAntioxidant remaining in the LDPE layer after processing the films.

^cAntioxidant percentage remaining in the LDPE layer after processing the films compared with that added.

Torres-Arreola *et al.*³¹ reported losses of 43.4% of BHT during processing of LDPE added with 4% of the antioxidant. Granda-Restrepo *et al.*³² reported losses of 40.7% of α -tocopherol from an LDPE layer added with 1.5% of the antioxidant during the processing of coextruded films. The concentration of astaxanthin in the BM film was 21.55% of astaxanthin that was originally added. Then, the astaxanthin lost was 78.45%. In general, the LDPE–marigold extract coextrusion process produced higher losses of astaxanthin because the influence of HDPE entering the die temperature was higher (150 °C) than that of the monoextrusion die (130 °C). The degradation of astaxanthin during the processing could also be used to stabilize the molten LDPE.

Extrusion temperatures induced astaxanthin thermal decomposition because its chemical bonds have a limited thermal stability. It has been reported that although marigold extract is heated at 50 °C, volatile compounds from the thermal degradation, such as toluene and *m*-xylene, were detected.³³ Therefore, higher temperatures increased the thermal degradation of marigold extract compounds. In fact, Rios *et al.*³³ found that when marigold extract was heated at 100 °C, compounds derived from fatty acids, volatiles of terpenoid origin and products derived from the thermal degradation of carotenoids were detected. At the same way, Rao *et al.*³⁴ determined that when astaxanthin algal extracts in palm and ginger oil solutions were heated to 150 °C for 2 h, 75% of the astaxanthin was degraded. The extrusion temperatures used to process HDPE in BM were higher (>15 °C) than those for LDPE. When both polymers get into the die, LDPE was in contact with the hotter polymer for few seconds. This contact time could increase the losses of astaxanthin.

Astaxanthin extract may have been consumed to prevent the LDPE degradation like other natural antioxidants. Extrusion conditions, such as melt temperature, shear forces, oxygen concentration and residence time strongly influence the LDPE degradation under processing.³⁵ One way to minimize the effect of these extrusion conditions is using stabilizers like antioxidants. Different natural antioxidants, such as α -tocopherol,³ carvacrol,⁴ carnosic acid,⁶ and synthetic, such as Irganox and BHT,³⁶ have been used as polyolefin's stabilizers. Cerruti *et al.*⁷ found that tomato extract, which contained more than 80 wt% lycopene, was a good thermal and processing stabilizer for polypropylene films when oxygen partial pressure was relatively low. At the same way that tomatoes extract, marigold extract may prevent the LDPE degradation. Nevertheless, this hypothesis has to be verified.

Effect of marigold extract on the spectroscopic properties of films

Diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. Figure 3 shows the IR spectra of marigold extract and films. The marigold extract spectrum shows the absorptions bands of the methylene stretches (2853–3006 cm^{-1}), methylene bending (1461 cm^{-1}), carbonyl bonds stretching in acylglycerols (1744 cm^{-1}) and C-CO stretching of aliphatic esters bending (1162 cm^{-1}). The IR spectra of control films show the three characteristics absorption bands of polyethylene. The methylene stretches at 2807–2958 and 2811–2930 cm^{-1} for MC and BC, respectively. The methylene bendings in MC are at 1429 and 700 cm^{-1} and in BC at 1469 and 732 cm^{-1} . The same graphs present the IR spectra of MM and BM films, showing the absorption bands for stretches and bendings of polyethylene. Because polyethylene do not have any carbonyl group in its structure, it was easy to detect the presence of marigold extract in both

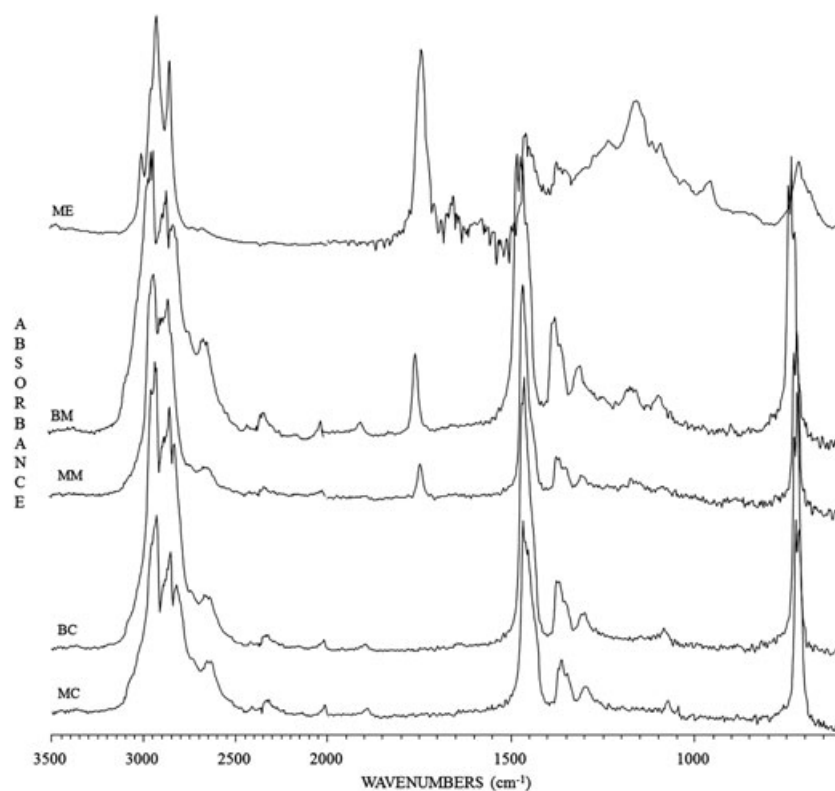


Figure 3. IR spectra of marigold extract (ME), bilayer marigold film (BM), monolayer marigold film (MM), bilayer control film (BC) and monolayer control film (MC).

MM and BM films at 1742.57 and 1736.61 cm^{-1} , respectively. This confirmed that marigold extract was present in the films.

UV-visible light absorbance. Figure 4A shows the UV-visible light absorbance spectrum of astaxanthin. The spectrum shows the maximum absorbance at 462 nm due to the presence of the long chain of conjugated double bonds in its structure. Figure 4B shows the light absorbance spectrum of marigold extract, which shows an increase in light absorbance from 400 to 500 nm , with the maximum at 461 nm . Also, absorbance increase gradually from approximately 350 nm covering the UV region. This behaviour is similar to that reported for other carotenoids like β -carotene and lutein, which were extracted from palm oil and spinach leaves, respectively. The maximum absorbances for these compounds were reported as 454 and 476 nm ,³⁷ respectively. Figures 4B and 4C show light absorbance spectra of the films. MM and BM films showed an increase in light absorbance at 464 and 462 nm compared with the spectra of MC and BC films. Therefore, the peak can be attributed to the presence of the extract in the films. The presence of marigold extract in the films could play a role as protective filter in the blue region especially for food components like riboflavin.^{38,39}

Light exposure may lead to some adverse effects on food, and packaging can offers direct protection. The deleterious effects of light on food may be summarized as the oxidation of fats oils, the formation of unpleasant off-flavours, the loss of vitamins and the discolouration of pigments.³⁸ Suitable packaging can offer direct protection by absorption or reflection of all or part of the incident light, depending on the light transmission characteristics of the materials. These materials are often characterized by a cutoff wavelength below which transmission of light becomes negligible.² Because the polyethylene's cutoff is $<180\text{ nm}$, food packed with this material is partially exposed to the UV-visible spectra. Therefore, packaging made of polyethylene added with marigold extract may protect food from UV-visible damage.

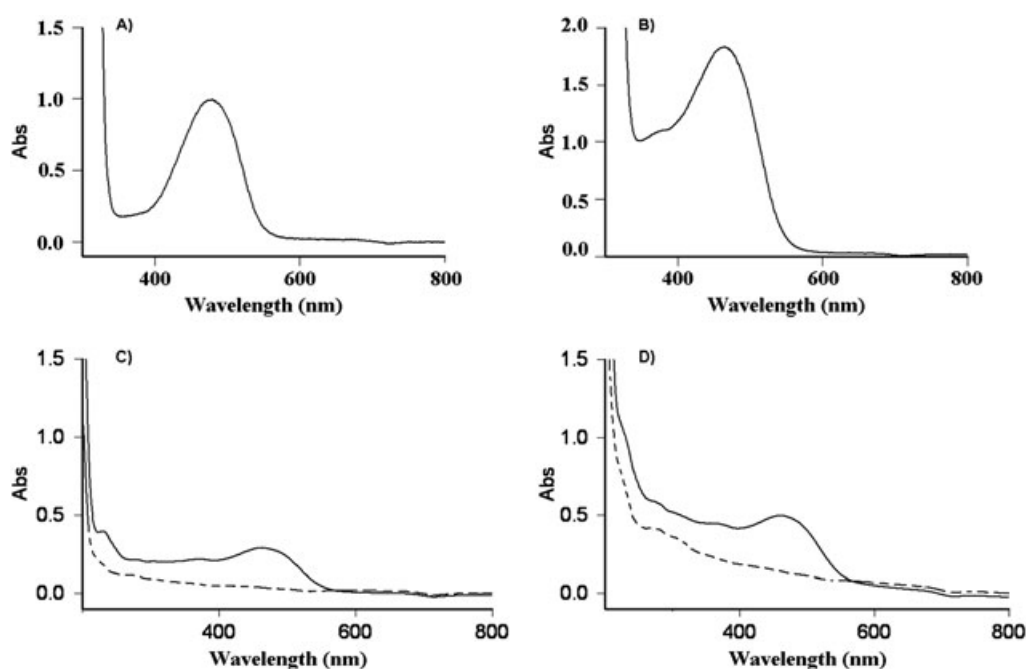


Figure 4. UV-visible spectra of (A) astaxanthin (6.0 $\mu\text{g/ml}$ in acetona), (B) marigold extract (300 $\mu\text{g/ml}$ in acetone), (C) MC (53.0 μm) and MM (50.0 μm) films and (D) BC (74.8 μm) and BM (76.2 μm) films. In panels C and D, dotted lines correspond to MC and BC films.

Effect of marigold extract on the optical properties of films

Colour. Figure 5 shows the colour of the films added with marigold extract (MM and BM). Carotenoids are natural pigments typically in the yellow to red range of the spectrum. Polyethylene films, on the other hand, are transparent and translucent. Consequently, they show an orange colour although part of the marigold extract was degraded during the process. Table 2 shows the colour parameters of the films. The value a^* changed from negative values for the plain films to the red direction (positive values). The value b^* dramatically rose in the yellow direction. In terms of hue, the qualitative attribute of colour, MC and BC showed a transparent and translucent yellow-green colour, respectively, whereas MM and BM showed an orange colour, which was expected for the marigold extract presence in the films. With

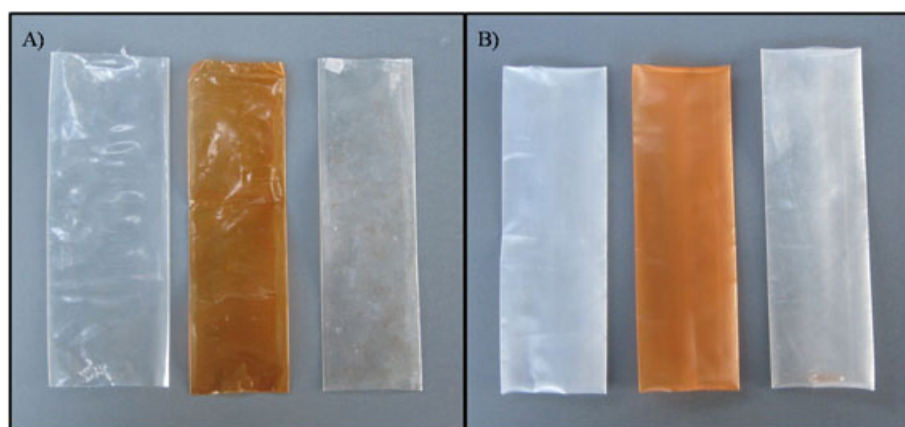


Figure 5. Photographs showing the (A) monolayer and (B) bilayer films. The film order in panels A and B is as follows: control film, film added with marigold extract and film with marigold extract after 47 days at 25 $^{\circ}\text{C}$ and under light (697–1945 lx).

Table 2. Colour parameters of the films and total colour change (ΔE).

Film	L^*	a^*	b^*	Chrome	Hue	ΔE^*
MC	89.9 ± 0.2	-3.4 ± 0.1	1.8 ± 0.1	3.9 ± 0.1	152.5 ± 1.0	-
MM	74.0 ± 1.2	14.7 ± 1.0	94.6 ± 1.8	96.1 ± 1.0	81.4 ± 0.4	95.8
BC	90.9 ± 0.5	-4.6 ± 0.2	5.0 ± 0.1	6.7 ± 0.3	132.3 ± 1.7	-
BM	79.4 ± 1.2	6.6 ± 1.1	67.2 ± 2.5	67.5 ± 3.3	84.5 ± 0.7	64.2

*MC and BC control films were used as references for each case.

Results are presented as mean ± SD of three replicates.

respect to chrome, the quantity attribute of colour, the yellow-green colour of MC and BC colour is dull, whereas the orange colour of MM and BM films is vivid. Finally, in relation to lightness, the addition of the marigold extract produced a decrease in the lightness (L^*) of the films due to the absorption of a portion of the incident light, but all the film colours were bright. The total differences in colour (ΔE) were 95.82 and 64.22 for MM and BM films, respectively. These differences in colour are much higher than those reported for LDPE films added with 0.34% α -tocopherol. In this case, ΔE was reported as up to 0.4⁴⁰ because the colour of α -tocopherol is lighter than the marigold extract used in the present work.

Effect of marigold extract on the melting temperature of films

The addition of marigold extract to LDPE in MM and BM films did not affect melting temperature ($p > 0.05$). The melting temperature levels of MC and MM were 110.2 °C ± 1.1 °C and 110.1 °C ± 0.0 °C, respectively. The melting temperature of BC and BM for LDPE was 109.9 °C ± 0.0 °C and 110.7 °C ± 0.8 °C, respectively, whereas for HDPE was 128.8 ± 0.0 and 129.8 °C ± 0.9 °C, respectively. Nevertheless, preliminary experiments showed that the addition of >3.59% of marigold extract to LDPE affected the flow index behaviour during processing. Therefore, percentages ≤3.59% were used in the present work. Because the proportion of marigold extract added was not able to strongly interact with LDPE, its melting temperature was not affected.

Effect of marigold extract on the mechanical properties of the films

Table 3 lists the mechanical properties of monolayer and bilayer films. LDPE is reported to be flexible, strong and tough.⁴¹ The addition of 2.90% of marigold extract to the monolayer LDPE film did not affect the mechanical properties ($p > 0.05$). This result is in contrast with the reported for other compounds, like α -tocopherol and starch, which in quantities like 0.034% and 5%, respectively, were able to change the mechanical properties of LDPE films,^{40,42} or 1% tomato oleoresin, which was able to change the mechanical properties of polypropylene films.⁴³ Thus, MM films can be applied under the same conditions of the LDPE plain films like grocery bags, sacks and merchandise bags.¹⁸ On the other hand, HDPE is reported to be stiff, strong and tough.⁴¹ As expected, the coextrusion of a layer of HDPE to the LDPE film produced an effect on the mechanical properties of the control films. Although the HDPE layer was added, tensile strength and tear resistance decreased. However, elongation and Young's modulus increased with respect to monolayer films. Coextruded films added with the marigold extract showed that tensile strength and tear resistance values were lower in BM than those in BC

Table 3. Mechanical properties of films.

Film	Thickness (μm)		Tensile strength (MPa)	Elongation (%)	Young's modulus (MPa)	Tear resistance (N)
	HDPE	LDPE				
MC		53.0 ± 3.0	78.2 ± 5.3	188.0 ± 32.9	342.5 ± 37.8	12.9 ± 0.9
MM		50.0 ± 3.0	80.0 ± 4.4	163.6 ± 14.1	386.4 ± 45.2	12.7 ± 1.0
BC	25.6 ± 3.0	49.2 ± 7.5	61.1 ± 2.0 ^a	475.4 ± 40.8 ^a	416.3 ± 48.4 ^a	6.7 ± 0.2 ^a
BM	33.2 ± 7.4	43.0 ± 6.0	52.9 ± 1.0 ^b	504.3 ± 51.1 ^a	443.8 ± 24.0 ^a	5.5 ± 0.4 ^b

Results are presented as mean ± SD of eight replicates.

Different superscript letters within the same columns indicate statistically significant different values ($p < 0.05$).

($p < 0.05$). No differences in elongation and Young's modulus were observed between BM and BC. Although tensile strength and tear strength in BM were affected by the addition of marigold extract, this film can be applied under similar conditions of grocery sacks.¹⁹ During the storage of the films, it was observed that the components of the marigold extract diffused from the LDPE to the HDPE layer. Although the diffusion rate was not determined, this could be the reason why the bilayer films decrease on the tensile strength and tear strength properties compared with the effect on the monolayer films. The fatty acids from the marigold extract could plasticize better the HDPE layer than the LDPE one.

The heat sealing is the process of joining two or more thermoplastic films or sheets by heating areas in contact with each other at a temperature at which fusion occurs. Sealing prevents food from contamination with dust and microorganisms and avoids free interchange of gases and moisture, including odors from the contained products.⁴⁴ LDPE is very useful in food packaging because of its good sealability.² The thermal properties of polymers influence its heat seal properties. The seal strength for MC and MM films was 0.70 ± 0.10 and 0.73 ± 0.05 N/mm, respectively, with no significant difference ($p > 0.05$). Thus, the force required to break the seal in MC and MM was similar. These results are in contrast with those reported by other authors for polyethylene. Mihindukulasuriya and Lim⁴⁵ reported that the presence of a vegetable oil between LLDPE and LLDPE films resulted in a weakening of the seal strength. In MM, the test strip broke just at the beginning of seal area. The seal strength for BC and BM was 1.70 ± 0.10 and 1.03 ± 0.14 N/mm, respectively. In this case, the value of BM was significantly lower than that of BC ($p < 0.05$). This can be attributed to the diffusion of marigold extract into HDPE before and during the sealing process, producing a weak boundary layer. In BM, 50% of the test strips broke just at the beginning of the seal area, and in the other 50%, strips the two sealed layers were separated. This different behaviour between monolayer and bilayer films was due to the effect of the HDPE layer, which increased the strength to the seal. Because the melting temperature for HDPE is higher than LDPE, the melting temperature used for sealing could not have been enough to melt completely the LDPE below the HDPE layer. Then, the sealing temperature could affect the forming of intact seals in the bilayer films.

Carotenoids and degradation of colour on light-exposed marigold extract and films

The carotenoid content in marigold extract did not present significant changes under light storage conditions. It started with 29.43 ± 0.00 mg/g at day 0 and finished with 28.10 ± 1.78 mg/g after 47 days. Figure 5 shows the MM and BM films before and after to be exposed to light. MM film initially presented a hue of 94.54 ± 1.82 , which correspond to a yellow tone. The tone change under storage conditions was yellow (0–13 days) and yellow-green (16–47 days). BM films showed initially a hue of 76.91 ± 0.20 , which corresponds to an orange tone. The tone change under storage conditions was orange (0–20 days), yellow (25–36 days) and yellow-green (36–47 days). Thus, the presence of HDPE layer changed the tone of the films and delayed the degradation of orange colour by 20 days. Figure 6 shows the chrome values

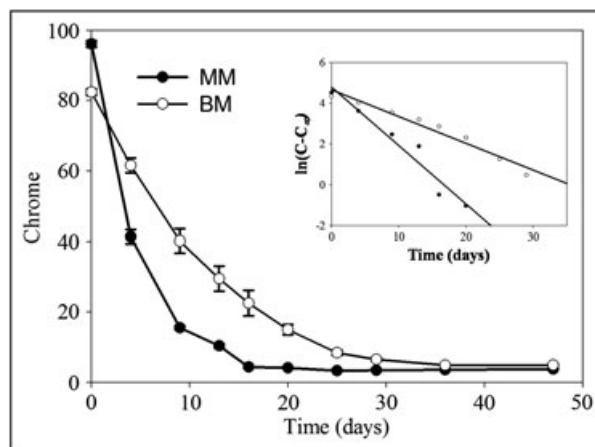


Figure 6. Chrome values for MM and BM films stored at 25 °C and under light (697–1945 lx).

for the films. At time zero, the MM presented a chrome of 96.08 ± 0.95 whereas in BM was of 82.35 ± 0.91 . The tone of MM was more vivid than that of BM. The tone was dull after 13 days for MM and after 20 days in BM. At this time, both films lost its chrome. The kinetics of films colour degradation followed a first-order reaction model. The reaction rate constants were 0.25 and 0.13 days⁻¹ for MM and BM, respectively. The coefficients of determination values (R^2) were greater than 0.94, whereas the standard error values were less than 0.57 for both films. This behaviour of films colour degradation is in accordance with carotenoids degradation in dried shrimp,⁴⁶ tomato peel,²⁷ dehydrated carrots⁴⁷ and mango puree.²⁶ The shelf life of MM and BM was 13 and 20 days, respectively. Before this time, both films could act as antioxidant active packaging. Then, this kind of films must be protected from light before used as packaging.

Effect of the films on the stability of soybean oil

Figure 7 shows the changes in PV in soybean oil packed in the bags made of the films and light stored at 30 °C. PV increased from 1.78 ± 0.29 to 49.97 ± 4.87 (MC film), 41.28 ± 1.64 (MM film), 46.97 ± 1.49 (BC film) and 39.96 ± 0.94 mEq/kg (BM film) during storage. The PV was significantly lower in oil packed with MM and BM films than that in oil packed with control films ($p < 0.05$). According to our results of light stability, some of the compounds, like astaxanthin, present in the film were degraded by light. Then, the remaining astaxanthin may have been participated in the oxidation control. The high linoleic acid composition of soybean oil is responsible of its low oxidation stability. The singlet oxygen oxidation rate of soybean oil is much greater than that of atmospheric triplet oxygen. The formation of singlet oxygen is enhanced by light, especially in the presence of photosensitizers. Moreover, unsaturated fatty acids can go through a slower oxidation by free radical chain reactions to form peroxides. Carotenoids may control the lipid oxidation by quenching singlet oxygen or inhibiting free radicals induced by lipid peroxidation.^{14,48–51} Among carotenoids, astaxanthin has one of the highest singlet oxygen quenching (by energy transfer) rates because of the 11 conjugated double bonds in its structure and the presence of two conjugated keto groups. In addition, carotenoids can give two electrons and then donate hydrogen to scavenge lipid peroxy radicals becoming a carotenoid radical cation, which is stable due to resonance.⁵² The Codex Alimentarius proposes that the PV for refined oils like soybean oil shall be up to 10 mEq/kg to be considered fresh.⁵³ In the first three days of analysis, the PV of the samples in contact with the MC and BC films was higher than this limit. Meanwhile, the PV values of the samples packed with MM and BM were just and less than 10 mEq/kg. This PV level was

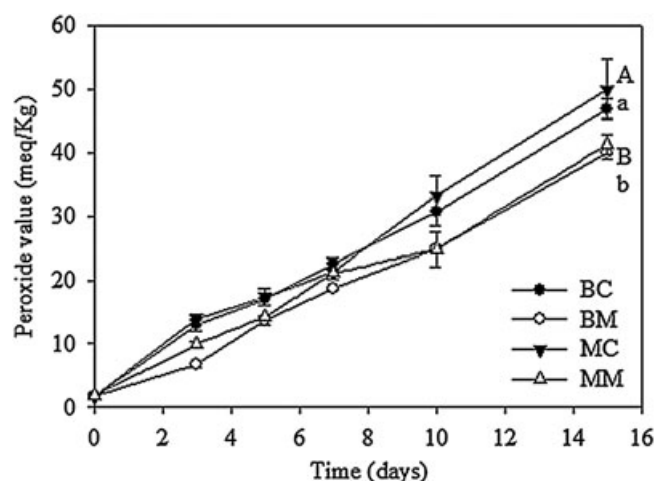


Figure 7. Changes in the peroxide values of soybean oil contained in bags made of MC, MM, BC and BM films stored at 30 °C and under light (876–1135 lx). Different lowercase letters indicate statistically different values ($p < 0.05$) for MC and MM films. Different capital letters indicate statistically different values ($p < 0.05$) for BC and BM films.

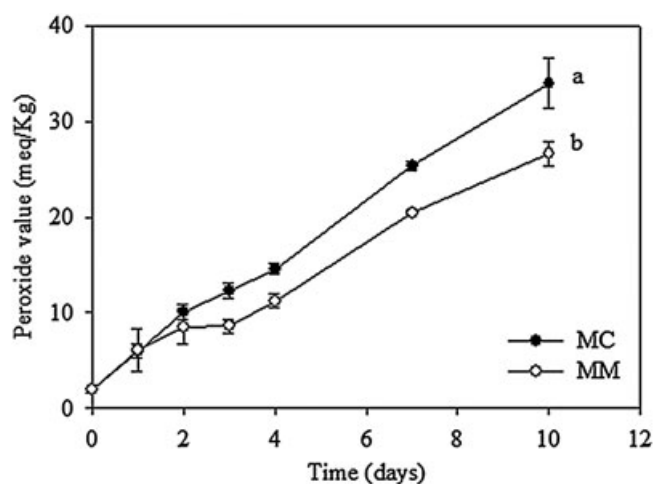


Figure 8. Changes in the peroxide values of soybean oil contained in bags made of MC and MM films stored at 25 °C and under light (697–1945 lx). Different letters indicate statistically different values ($p < 0.05$).

achieved around 3 days because the soybean oil used in this experiment did not contain any commercial antioxidant, and then only the antioxidant effect of astaxanthin was appreciated. The reduction in PV at this time was 30% and 48% for MM and BM, respectively. These results are consistent with those reported for edible oils enriched with 0.1% of *Haematococcus pluvialis* extract. PV values were found to be 40%–45% lower than those in control oils.³⁴ Others report that oxidation stability was increased by adding 0.03% of pure astaxanthin to refined olive oil⁵⁴ and 0.2%–1.0% of *H. pluvialis* extract to sunflower oil.⁵⁵

Figure 8 shows the changes in PV in soybean oil packed in bags made of the monolayer films at 25 °C. These conditions are more similar to those of commercialization of vegetable oils. The PV was significantly lower in oil packed with MM films than that in oil packed with the control film. At day 1, the same PV was obtained for oil in contact with both MC and BC films. Possibly, astaxanthin did not migrate yet, or it was degraded by light. At day 2, differences between PV for oil in contact with MC and MM started to appear. The PV for oil in contact with MM was the same at 2 and 3 days. After this time, the oxidation process followed its natural behaviour. Although the films colour (astaxanthin) was degraded by light, MM and BM had a positive effect in slowing down the primary oxidation process.

CONCLUSIONS

Monolayer and bilayer films made of polyethylene containing marigold extract were obtained with effect on spectroscopic and optical properties. Effect on mechanical properties was only observed in the bilayer films. More than 64% of astaxanthin was lost during the extrusion/coextrusion process. Both films showed to be light sensitive; however, bags made of the films showed a positive effect on soybean oil stability when used as packaging.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by funds from FONCICYT C0002-2008-95935. The authors acknowledge Industrias Vepinsa S.A. de C.V. for providing the marigold extract.

REFERENCES

1. Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. *Journal of Food Science* 2003; **68**(2): 408–420. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb05687.x
2. Robertson G. *Food Packaging, Principles and Practice*, 2nd edn. Taylor and Francis: New York, 2006; 234.
3. Al-Malaika S. Learning from Mother Nature: Exploiting a Biological Antioxidant for the Melt Stabilisation of Polymers. *Macromolecular Symposia* 2001; **176**: 107–117. DOI: 10.1002/1521-3900(200112)
4. Peltzer M, Wagner JR, Jiménez A. Thermal characterization of UHMWPE stabilized with natural antioxidants. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2007; **87**(2): 493–497. DOI: 10.1007/s10973-006-7453-1
5. Peltzer M, Wagner J, Jiménez A. Migration study of carvacrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging. *Food Additives and Contaminants* 2009; **26**(6): 938–946. DOI: 10.1080/02652030802712681
6. Jipa S, Zaharescu T, Setnescu R *et al.* Kinetic Approach on Stabilization of LDPE in the Presence of Carnosic Acid and Related Compounds. I. Thermal Investigation. *Journal of Applied Polymer Science* 2005; **95**: 1571–1577. DOI: 10.1002/app.21372
7. Cerruti P, Malinconico M, Rychly J, Matisova-Rychla L, Carfagna C. Effect of natural antioxidants on the stability of polypropylene films. *Polymer Degradation and Stability* 2009; **94**(11): 2095–2100. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.07.023
8. Pereira de Abreu DA, Paseiro Losada P, Maroto J, Cruz JM. Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Food Research International* 2010; **43**(5): 1277–1282. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.03.019
9. Moore ME, Han IY, Acton JC *et al.* Effects of Antioxidants in Polyethylene Film on Fresh Beef Color. *Journal of Food Science* 2003; **68**(1): 99–104. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb14122.x
10. Camo J, Beltrán JA, Roncalés P. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. *Meat Science* 2008; **80**(4): 1086–1091. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.04.031
11. Phoopuritham P, Thongngam M, Yoksan R, Suppakul P. Antioxidant Properties of Selected Plant Extracts and Application in Packaging as Antioxidant Cellulose-Based Films for Vegetable Oil. *Packaging Technology and Science* 2012; **25**(3): 125–136. DOI: 10.1002/pts.963
12. Foote CS, Chang YC, Denny RW. Chemistry of Singlet Oxygen. X. Carotenoid Quenching Parallels Biological Protection. *Journal of the American Chemical Society* 1970; **92**(17): 5216–5218.
13. Di Mascio P, Raiser S, Sies H. Lycopene as the Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1989; **274**(2): 532–538. DOI: 10.1016/0003-9861(89)90467-0
14. Miki V. Biological Functions and Activities of Animal Carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 1991; **63**(1): 141–146. DOI: <http://dx.doi.org/10.1351/pac199163010147>
15. Fukuzawa K, Inokami Y, Tokumura A, Terao J, Suzuki A. Rate Constants for Quenching Singlet Oxygen and Activities for Inhibiting Lipid Peroxidation of Carotenoids and α -Tocopherol in Liposomes. *Lipids* 1998; **33**(8): 751–755. DOI: 10.1007/s11745-998-0266-y
16. Martínez A, Rodríguez -Girones MA, Barbosa A, Costas M. Donator Acceptor Map for Carotenoids, Melatonin and Vitamins. *Journal of Physical Chemistry A* 2008; **112**(38): 9037–9042. DOI: 10.1021/jp803218e
17. Huang CH, Wu JS, Huang CC, Lin LS. Morphological, Thermal, Barrier and Mechanical Properties of LDPE/EVOH Blends in Extruded Blown Films. *Journal of Polymer Research* 2004; **11**(1): 75–83. DOI: 10.1023/B:JPOL.0000021796.41800.e9
18. Krishnaswamy RK, Lamborn MJ. Tensile properties of linear low density polyethylene (LLDPE) blown films. *Polymer Engineering and Science* 2000; **40**(11): 2385–2396. DOI: 10.1002/pen.11370
19. Butler TI, Morris BA. PE based multilayer film structures. In *Multilayer Flexible Packaging*, Wagner JR (ed.). William Andrew Publishing: Norwich, England, 2009; 205–230.
20. Kuehni RG. *Color: An Introduction to Practice and Principles*, 2nd edn. John Wiley & Sons, Inc.: United States of America, 2004; 224.
21. ASTM-D882. *Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics*. ASTM International, 1995.
22. ASTM-D1938. *Standard Test Method for Tear-Propagation Resistance (Trousers Tear) of Plastic Film and Thin Sheeting by a Single-Tear Method*. ASTM International, 2008.
23. ASTM-F88. *Standard Test Method for Seal Strength of Flexible Barrier Materials*. ASTM International, 2009.
24. Núñez-Gastélum J, Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J *et al.* Evaluación físico-química de aceite pigmentado obtenido de la cabeza de camarón. *Grasas y Aceites* 2011; **62**(3): 321–327. DOI: 10.3989/gya.102710
25. Chutintrasri B, Noomhorm A. Color degradation kinetics of pineapple puree during thermal processing. *LWT- Food Science and Technology* 2007; **40**(2): 300–306. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.11.003
26. Ahmed J, Shivhare U, Kaur M. Thermal colour degradation kinetics of mango puree. *International Journal of Food Properties* 2002; **5**(2): 359–366. DOI: 10.1081/IJFP-120005791
27. Kaur D, Sogi D, Wani AA. Degradation kinetics of lycopene and visual color in tomato peel isolated from pomace. *International Journal of Food Properties* 2006; **9**(4): 781–789. DOI: 10.1080/10942910600596357
28. Suppakul P, Sonneveld K, Bigger SW, Miltz J. Loss of AM additives from antimicrobial films during storage. *Journal of Food Engineering* 2011; **105**(2): 270–276. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.02.031
29. AOCs. *Peroxide Value Acetic Acid-Isooctane Method. Method Cd 8b-90*. AOCs Press, 2009.
30. Graciano-Verdugo AZ, Soto-Valdez H, Peralta E *et al.* Migration of α -tocopherol from LDPE Films to Corn Oil and its Effect on the Oxidative Stability. *Food Research International* 2010; **34**(4): 1073–1078. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.01.019
31. Torres-Arreola W, Soto-Valdez H, Peralta E, Cárdenas-López JL, Ezquerro-Brauer JM. Effect of a Low-Density Polyethylene Film Containing Butylated Hydroxytoluene on Lipid Oxidation and Protein Quality of Sierra Fish (*Scomberomorus sierra*) Muscle during Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; **55**(15): 6140–6146. DOI: 10.1021/jf070418h

32. Granda-Restrepo DM, Soto-Valdez H, Peralta E *et al.* Migration of α -tocopherol from an Active Multilayer Film into Whole Milk Powder. *Food Research International* 2009; **42**(12): 1396–1402. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.07.007
33. Rios JJ, Fernández-García E, Mínguez-Mosquera MI, Pérez-Gálvez A. Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins. *Food Chemistry* 2008; **106**(3): 1145–1153. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.045
34. Rao AR, Sarada R, Ravishankar GA. Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2007; **87**(6): 957–965. DOI: 10.1002/jsfa.2766
35. Zweifel H. *Plastics Additives Handbook*, 5th edn. Hanser Gardner Publications, 2001; 1148.
36. Jipa S, Osawa Z, Otsuki H, Nishimoto M. Chemiluminescence assessment of the effectiveness of some phenolic antioxidants for heat stabilization of irradiated LDPE. *Polymer Degradation and Stability* 1997; **56**(1): 45–53. DOI: 10.1016/S0141-3910(96)00196-6
37. Meléndez-Martínez AJ, Britton G, Vicario IM, Heredia FJ. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry* 2007; **101**(3): 1145–1150. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.03.015
38. Bekbölet M. Light Effects on Food. *Journal of Food Protection* 1990; **53**(5): 430–440.
39. Wold JP, Veberg A, Nilsen A *et al.* The role of naturally occurring chlorophyll and porphyrins in light-induced oxidation of dairy products. A study based on fluorescence spectroscopy and sensory analysis. *International Dairy Journal* 2005; **15**: 343–353. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.08.009
40. Wessling C, Nielsen T, Leufvén A. The Influence of α -Tocopherol Concentration on the Stability of Linoleic Acid and the Properties of Low-Density Polyethylene. *Packaging Technology and Science* 2000; **13**(1): 19–28. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1522(200001/02)13:1<19::AID-PTS492>3.0.CO;2-B
41. Marsh K, Bugusu B. Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science* 2007; **72**(3): R39–R55. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x
42. Jagannath J, Nadasabapathi S, Bawa A. Effect of starch on thermal, mechanical, and barrier properties of low density polyethylene film. *Journal of Applied Polymer Science* 2006; **99**(6): 3355–3364. DOI: 10.1002/app.22358
43. Ambrogi V, Cerruti P, Carfagna C *et al.* Natural antioxidants for polypropylene stabilization. *Polymer Degradation and Stability* 2011. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2011.09.015
44. Hishinuma K. *Heat Sealing Technology and Engineering for Packaging*. Destech Publications, Inc.: Lancaster, PA, 2009; 247.
45. Mihindukulasuriya S, Lim LT. Effects of liquid contaminants on heat seal strength of low density polyethylene film. *Packaging Technology and Science* 2011. DOI: 10.1002/pts.978
46. Niamnuy C, Devahastin S, Soponronnarit S, Vijaya Raghavan G. Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage. *Journal of Food Engineering* 2008; **87**(4): 591–600.
47. Koca N, Burdurlu HS, Karadeniz F. Kinetics of colour changes in dehydrated carrots. *Journal of Food Engineering* 2007; **78**(2): 449–455. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.10.014
48. Palozza P, Krinsky NI. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1992; **297**(2): 291–295. DOI: 10.1016/0003-9861(92)90675-m
49. Goto S, Kogure K, Abe K *et al.* Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* 2001; **1512**(2): 251–258. DOI: 10.1016/s0005-2736(01)00326-1
50. McNulty HP, Byun J, Lockwood SF, Jacob RF, Mason RP. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* 2007; **1768**(1): 167–174. DOI: 10.1016/j.bbmem.2006.09.010
51. Naguib YMA. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; **48**(4): 1150–1154. DOI: 10.1021/jf991106k
52. Choe E, Min DB. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2009; **8**(4): 345–358. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x
53. Codex-Alimentarius. *Codex Standard for Named Vegetable Oils*. FAO-OMS, 1999; 1–13.
54. Zeb A, Murkovic M. Carotenoids and triacylglycerols interactions during thermal oxidation of refined olive oil. *Food Chemistry* 2011; **127**(4): 1584–1593. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.02.022
55. Wang L, Yang B, Yan B, Yao X. Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2012; **13**: 120–127. DOI: 10.1016/j.ifset.2011.09.004

CAPÍTULO II

Difusión de astaxantina natural desde películas activas de polietileno hacia un simulante de alimento graso

por

Colín-Chávez, C.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Lizardi-Mendoza, J.; Balandrán-Quintana, R. R.,

Trabajo publicado en *Food Research International*

Objetivo 1. Estudiar la migración de astaxantina desde películas activas hacia simulantes de alimentos grasos.

Objetivo 2. Determinar el efecto de la temperatura en la migración de astaxantina.

Diffusion of Natural Astaxanthin from Polyethylene Active Packaging Films into a Fatty Food Simulant

Citlali Colín-Chávez, Herlinda Soto-Valdez*, Elizabeth Peralta, Jaime Lizardi-Mendoza, René Balandrán-Quintana.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apdo. Postal 1735. Carret. a la Victoria km. 0.6. Hermosillo, Sonora 83304, México.

*Corresponding author Tel.: (52) 662 2892400 ext. 222 Fax: (52) 662 2800422. E-mail address: hsoto@ciad.mx (H. Soto-Valdez).

Abstract

The diffusion of natural astaxanthin from a monolayer low-density polyethylene film (MM) and a two-layer high-density polyethylene/low-density polyethylene film (BM) was evaluated by immersion in 95% ethanol; in addition, the effect of temperature on the diffusion rate was assessed. The astaxanthin diffusion kinetics exhibited a Fickian behavior. The diffusion coefficients were 3.54, 7.40, and $32.67 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ at 23, 30, and 40 °C, respectively, for the MM films. Meanwhile, the diffusion coefficients were 1.53, 4.12, and $5.59 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ at 10, 23, and 30 °C, respectively, for the BM films. The effects of temperature on the diffusion coefficients followed an Arrhenius-type model with activation energies of 101.75 and 47.11 kJ mol⁻¹ for the MM and BM films, respectively. These findings demonstrated that astaxanthin may be applied as an active compound in food packaging for products stored or commercialized in regions with a temperate to hot climate.

Keywords: astaxanthin, natural antioxidant, active packaging, polyethylene, diffusion, activation energy.

1. Introduction

Low-density polyethylene (LDPE) is the most widely used single polymer in food packaging. LDPE provides a good barrier against water but a low barrier toward oxygen (Robertson, 2012). Therefore, food products susceptible to oxidation will be exposed to oxygen when contained in LDPE packaging. Adding antioxidants to control the product of oxidative reactions indirectly compensates for the effects caused by oxygen entering a package. The packaging itself might be the source of antioxidants in active packaging. Antioxidant-active packaging may be able to prevent or slow the oxidation of easily oxidizable food components. This approach requires the deliberate incorporation of antioxidants into packaging materials and the further migration of antioxidants to the food. Therefore, the food shelf life is extended and safety is improved while quality is maintained (Robertson, 2012; Suppakul, Miltz, Sonneveld, & Bigger, 2003). Migration is the interaction between food and packaging, which consists of transferring components from the packaging materials to the food. It is a molecular diffusion process described by Fick's second law, and there are two basic parameters derived from diffusion. The first is the diffusion coefficient (D), which dictates how fast the migrant (antioxidant, in this case) is diffused. The second is the partition coefficient ($K_{p,s}$), which dictates how much antioxidant is diffused when migration reaches equilibrium between the packaging and food or simulant (Castle, 2007). Because food matrices are complex, food simulants are used during migration tests. Ethanol solutions (95 and 100%) are fatty food simulants for polymers, such as polyolefins, polyvinyl chloride, polystyrene and polyethylene terephthalate, recommended by the Food and Drug Administration of the United States (FDA, 2007). Many reports on antioxidant active packaging have focused on the migration of synthetic antioxidants, such as butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) (Huang & Weng, 1998; Soto-Cantú et al., 2008; Tawfik & Huyghebaert, 1999; Torres-Arreola, Soto-Valdez, Peralta, Cárdenas-López, & Ezquerra-Brauer, 2007; Wessling, Nielsen, & Giacini, 2001). Currently, research is focused on replacing the synthetic antioxidants with natural compounds. Therefore, antioxidant packaging films combined with natural antioxidants, such as α -tocopherol (Manzanarez-López, Soto-Valdez, Auras, & Peralta, 2011; Zhu, Lee, & Yam, 2012), carvacrol (Peltzer, Wagner, & Jiménez, 2009), thymol (Park et al., 2012), cinnamaldehyde (Hu, Chen, &

Wang, 2012) and sesamol (Zhu, Schaich, Chen, & Yam, 2012), or natural extracts rich in antioxidants from citronella essential oil (Licciardello, Muratore, Mercea, Tosa, & Nerin, 2012) or barley husks (Pereira de Abreu, Paseiro Losada, Maroto, & Cruz, 2010) have been developed. Consequently, natural antioxidants are becoming a valid alternative for food protection, and recent efforts have focused on the extraction, identification and application of these natural antioxidants.

Astaxanthin (Asta) is a natural antioxidant that may be used in active food packaging. This antioxidant is a carotenoid and may be obtained from natural sources, such as algae, yeast, crustacean byproducts and flowers. It is possible to find commercial Azteca Marigold (*Tagetes erecta*) extracts, and one of the main carotenoids found in this product is Asta. The antioxidant activity of Asta (3, 3'-dihydroxy- β , β' -carotene-4, 4'-dione; Figure 1) depends upon its ability to quench singlet oxygen and scavenge free radicals. The singlet oxygen quenching activity of Asta ($9.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) is higher than the quenching activity for other antioxidants, such as β -carotene ($4.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and α -tocopherol ($2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Min & Boff, 2002). Asta scavenges radicals using an electron transfer mechanism (electron accepting), and it also strongly inhibits lipid peroxidation (Martínez, Rodríguez-Girones, Barbosa, & Costas, 2008; Skibsted, 2012). There are many publications describing the antioxidant properties of Asta and its benefits for human health (Fassett & Coombes, 2011; Higuera-Ciapara, Félix-Valenzuela, & Goycolea, 2006; Hussein, Sankawa, Goto, Matsumoto, & Watanabe, 2006; Yuan, Peng, Yin, & Wang, 2011). However, few studies report applying Asta as food additive or packaging component. The direct application of extracts from *Haematococcus pluvialis*, *Phaffia rhodozyma*, and *Litopenaeus setiferus* rich in Asta has improved the oxidative stability of different vegetable oils (Gramza-Michałowska & Stachowiak, 2010; Pu, Bechtel, & Sathivel, 2010; Rao, Sarada, & Ravishankar, 2007; Wang, Yang, Yan, & Yao, 2012). Indirectly applying marigold extract containing 1.81% Asta in polyethylene films protected soybean oil from oxidation (Colín-Chávez, Soto-Valdez, Peralta, Lizardi-Mendoza, & Balandrán-Quintana, 2012). The antioxidant effect of Asta in vegetable oils reveals that it may be used as a natural antioxidant for food either by direct or indirect addition from the packaging.

Polyethylene is currently the most widely used plastic in food packaging. Polyethylene has the simplest possible structure based on $-\text{CH}_2-$ units (Robertson, 2012). There are several types of polyethylene, including LDPE and high-density polyethylene (HDPE). Both materials have different crystallinities. LDPE has a structure with many branched chains that interrupt the regular arrangement of the atoms, generating a low degree of crystallinity (50-70%) and introducing amorphous zones. These zones have free spaces where small molecules (e.g., additives) may be integrated into the material for a later release. However, HDPE has a linear, ordered structure with few short-chain branches, favoring a parallel chain configuration, a higher degree of crystallinity (90%) and fewer amorphous zones. This structure is less likely to release small molecules and lowers the speed of their diffusion relative to LDPE. The crystallinity also influences the mechanical properties of both polyethylenes (Crompton, 2007; Mohammadi, Yousefi, & Ehsani, 2012). Therefore, combining diverse layers of polyethylenes may provide defined properties for specialized food packaging applications.

To the best of our knowledge, there are no literature reports describing how Asta migrates from any packaging material to food or food simulants. The present work aims to study the migration of Asta from monolayer and coextruded films, including polyethylenes with different densities, to 95% ethanol at different temperatures and to evaluate the effects of temperature on the migration of Asta.

2. Materials and methods

2.1 Materials and films fabrication

2.1.1 Materials

LDPE resin (LBA253) was obtained from Muehlstein (Connecticut, USA), and HDPE resin (HD7960) was acquired from ExxonMobil Chemical (New York, USA). Marigold extract was provided by Industrias Vepinsa S.A. de C.V. (Sinaloa, México). The Asta (>97%) HPLC standard was obtained from Alexis[®] Biochemicals (Enzo Life Science, Inc. New York, USA). BHT (99%) was purchased from TCI America (Oregon, USA). Ethanol (99.9%) was obtained from Fermont (Productos Químicos Monterrey, S.A de C.V, Nuevo

León, México). All solvents used to quantify Asta were HPLC grade (J.T Baker, Edomex, México).

2.1.2 Films fabrication

The films used in this study were produced using the blown extrusion process as follows: one batch of LDPE resin was manually mixed with 2.90% of marigold extract (MM film) and blown-extruded with a pilot plant-sized monospindle extrusion machine (Beutelspacher, México City, México). A second batch of LDPE without any additives was extruded under the same conditions to be used as the control (MC film). A third batch of LDPE resin was manually mixed with 3.59% marigold extract and coextruded with a HDPE layer (BM film) using a coextrusion die (Beutelspacher, México City, México). Finally, a fourth batch of LDPE without marigold extract was coextruded with a HDPE layer as a bilayer control film (BC film). The extrusion temperatures for the feed, screw 1, screw 2, and die zones were 125, 130, 130, and 130 °C for LDPE and 135, 145, 150, and 150 °C for HDPE, respectively (Colín-Chávez et al., 2012). Table 1 lists some characteristics of these films.

2.1.3 Food simulant

One fatty food simulant was used: 95% ethanol. This simulant is recommended by the FDA for use with polyolefins, such as polyethylene (FDA, 2007).

2.2 Quantification of Asta in the films

The MM and BM films were cut into 0.25 cm² pieces and stirred in 40 °C acetone for 24 h in the dark to extract Asta. To protect the antioxidant from degrading during the extraction period, BHT was added to the solution (100 mg mL⁻¹). This process was performed twice to ensure that Asta was completely extracted. Asta was quantified using an HPLC (Varian model 9012, México City, México) equipped with a photodiode array detector (Varian ProStar model 335, 474 nm) and a 2.0 x 250 mm YMC™ Carotenoid C30 column (3 mm) (Waters, Milford, MA, USA) protected with a guard column. A gradient mobile phase (at 0.3 mL min⁻¹) consisting of (A) methanol, (B) methyl tert-butyl ether, and (C) 5 % aqueous formic acid was used: 0–6 min, 81 % A, 15 % B, and 4 % C; 6–14 min, 81 %–36 % A, 15 %–60 % B, and 4 % C; 14–24 min, 36 % A, 60 % B, and 4 % C; 24–26 min, 36 %–81 % A, 60 %–15 % B, and 4 % C; and 26–30 min, 81 % A, 15

% B, and 4 % C. Standard solutions of Asta in acetone at concentrations between 0.25 and 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were used to produce a calibration curve. The retention time of Asta was 7.75 min, the limit of quantification (LOQ) was 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and the analytical recoveries were 81 % and 93 % for the MM and BM films, respectively. All analytical data were corrected using the recoveries (Colín-Chávez et al., 2012).

2.3 Diffusion of Asta from MM and BM films into the food simulant

The migration cell consisted of a 30 mL amber glass vial. The release of Asta was achieved by completely immersing the films into the food simulant. MM film samples measuring 4.4 x 6.0 cm were immersed in the simulant. However, to perform both experiments using immersion, two 3.6 x 8.4 cm rectangles of the bilayer films were cut and the HDPE sides were adhered together such that the LDPE layers were exposed on both sides; the rectangles were immersed in the simulant using the same protocol as for the MM films. The LDPE layer was considered to be twice as thick when determining the diffusion constants for the BM films. The liquid volume/area ratios were 1.14 and 0.50 mL cm^{-2} for the MM and BM films, respectively. These ratios complied with the ASTM D4754-98, which establishes a ratio between 155 and 0.31 mL cm^{-2} (ASTM Standard D4754, 2011). The diffusion experiments were performed under darkness at temperatures of 10, 23, 30, and 40 °C. At 10 °C, very low diffusion was expected; subsequently, the area of the films was duplicated to avoid working near the LOQ of the analytical procedure. Two replicates were performed for each experiment. Food simulant samples were collected at different times to quantify the Asta until the concentration was constant. The food simulant removed during sampling was replaced with 95% ethanol.

2.3.1 Quantification of Asta in the food simulant

Asta was quantified in the food simulant using the same equipment and column as described above. An isocratic mobile phase composed of 80% methanol, 16% methyl tert-butyl ether, and 4% aqueous formic acid (5%) was used. Standard solutions of Asta in 95% ethanol (from 0.25 to 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were used to produce a calibration curve.

2.4 Asta release model

The migration process is described by the diffusion kinetics of the migrant in the film and expressed by D . To determine D for 95% ethanol, an analytical solution of Fick's second

law equation was used. When the diffusion is in one dimension for a limited volume of film in a finite volume of simulant (Crank, 1975; Iñiguez-Franco et al., 2012), the analytical solution is as follows:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(1+\alpha)}{1+\alpha+\alpha^2q_n^2} \exp\left(-\frac{Dq_n^2t}{l^2}\right) \quad (1)$$

where M_t/M_∞ is the concentration of the antioxidant diffused at time t divided by the concentration of the antioxidant diffused at equilibrium; l is the thickness of the film; the q_n values are the nonzero positive roots of $\tan q_n = \alpha q_n$; and α is

$$\alpha = \frac{V_s}{K_{p,s}V_p} \quad (2)$$

where V_s and V_p are the volumes of the simulant and the polymer, respectively; $K_{p,s}$ is the partition coefficient of the antioxidant between the LDPE and the simulant, which is assumed to be constant at low concentrations and is calculated from the ratio of the concentration of Asta in LDPE ($C_{p,\infty}$) and the simulant ($C_{s,\infty}$) at equilibrium:

$$K_{p,s} = \frac{C_{p,\infty}}{C_{s,\infty}} \quad (3)$$

To fit the data to Eq. (1), M_t/M_∞ was plotted versus time t . D ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) was calculated for each concentration at the different experimental temperatures. To determine the fit of the experimental data to Eq. (1), a non-linear regression (nlin-fit) function in MATLAB R2010b (MathWorks, Natick, MA, US) was applied to the data (Manzanarez-López et al., 2011).

2.5 Activation energy for the diffusion (E_a) of Asta.

To determine the effects of temperature on the diffusion of Asta from the films into the simulant, E_a was calculated using the Arrhenius equation for diffusion:

$$D = D_o e^{\left[-\frac{E_a}{RT}\right]} \quad (4)$$

where D is the diffusion coefficient, D_0 is the pre-exponential factor of diffusion, E_a is the activation energy of diffusion, R is the ideal gas constant ($8.3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), and T is the temperature in K (absolute scale). E_a was obtained from the slope of a plot of the reciprocal of temperature (T^{-1}) vs the logarithm of D ($E_a = -\text{slope} \times 2.303R$) (Iñiguez-Franco et al., 2012).

2.6 Statistical analysis

For the diffusion of Asta, descriptive statistics and simple linear regression analyses were used at each temperature.

3.0 RESULTS

3.1 Quantification of Asta in the films

Table 1 lists the concentrations of Asta found in the films: 188.97 ± 15.85 and 135.82 ± 0.16 $\mu\text{g g}^{-1}$ for MM and BM, respectively (Colín-Chávez et al., 2012).

3.2 Diffusion of Asta from MM and BM films into 95% ethanol

3.2.1 Asta release

Figure 2 presents the migration of Asta into 95% ethanol in the MM films. At 23, 30, and 40 °C, equilibrium was obtained at 190.5 h (7.94 d), 50.38 h (2.10 d), and 12 h (0.50 d) with a release of 59.62, 93.81, and 97.95% of the antioxidant, respectively. Shen (2012) reported that the release of α -tocopherol from LDPE into 95% ethanol at 30 and 40 °C reached equilibrium after 10 and 15 h, respectively. Galotto, Torres, Guarda, Moraga and Romero (2011) reported that Irganox 1076 released from LDPE into 95% ethanol reached equilibrium after 30 h and 24 h at 30 and 40 °C, respectively. Therefore, the release of Asta was slower at 30 °C, although it was faster at 40 °C, when compared to the diffusion of other antioxidants. In the present work, the experiment was conducted for 532.0 h (30.15 d) at 10 °C. During the first 27.5 h, the quantity of Asta in the simulant was constant. Apparently, no diffusion had occurred; only the dissolution of the Asta located on the surface of the films was detected. Afterwards, a decrease in the Asta concentration was observed. There might not have been sufficient energy to open the LDPE chains and

allow Asta movement. A similar behavior was reported during the diffusion of α -tocopherol from polylactic acid films into coconut oil at 20 °C (Manzanarez-López et al., 2011). Figure 3 shows the release of Asta into 95% ethanol from the BM films. Equilibrium was obtained at 1156.5 h (48.19 d), 384.0 h (16.0 d), 123.5 h (5.5 d), and 44 h (1.83 d), with a release of 33.42, 82.63, 73.22, and 69.91%, at 10, 23, 30, and 40 °C, respectively. BM required more than 1.5 times longer to reach equilibrium relative to the MM films. Another difference was that the quantity of Asta released was similar at 23-40 °C for the bilayer films. Microscopic observation of the BM films (not shown) revealed that after processing the bilayer films but before the diffusion experiments, the marigold extract molecules diffused into the HDPE. Therefore, the Asta molecules were within both HDPE and LDPE layers. Consequently, some of the Asta molecules in the bilayer films had to diffuse across a longer distance to reach the 95% ethanol. Additionally, the distance was not through a homogenous material because both polymers have varying degrees of crystallinity. The HDPE was crystalline, and these regions slowed the diffusion of Asta, forcing it to find a path (amorphous regions) to the LDPE layer. However, LDPE was less crystalline and contained more amorphous regions, allowing less restricted diffusion of Asta at a higher speed. In addition, the time needed to reach equilibrium for Asta was longer on the BM films than on the MM films. The molecules that did not release might have been in the HDPE layer or at the interface of both polymers. Consequently, coextruding a HDPE layer with LDPE slowed the release of Asta, which might be convenient for some food systems.

3.2.2 Asta partition coefficients

The $K_{p,s}$ for the diffusion of Asta in every system was > 1 (Table 2). A $K_{p,s} > 1$ indicates that a higher concentration of migrant remained in the polymer/packaging relative to the food/simulant after reaching equilibrium. The polarity of the migrant, packaging and food (food simulant), as well as the solubility of the migrant in the food simulant, determine the $K_{p,s}$ for a diffusion process (Tehrany & Desobry, 2004). Molecules with similar polarities tend to be attracted to each other, while molecules with dissimilar polarities exhibit a much weaker attraction. In our systems, LDPE is a non-polar polymer and 95% ethanol is a polar solvent. Asta is a polar carotenoid containing two ketones and two hydroxyl groups, allowing its partial solubility in ethanol (Blasko et al., 2008). The

solubilities of lutein and β -carotene in ethanol are 300 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively (Craft & Soares, 1992). Therefore, because Asta is more polar than lutein, Asta should exhibit a higher solubility in ethanol. The $K_{p,s}$ obtained for the MM films were inversely proportional to the temperature. The lowest $K_{p,s}$ values were obtained at 30 and 40 °C with a release of 93.81 and 97.95% of the antioxidant, respectively. At 23 °C, the $K_{p,s}$ was higher because there was less Asta released. In general, the BM film systems displayed higher $K_{p,s}$ values than MM films with no relationship to temperature, most likely because the Asta was retained in the HDPE layer. Therefore, as explained in the previous section, more Asta was released from MM films than from the BM films. Because marigold extract molecules diffused into the HDPE layer, some Asta might have been retained in the HDPE layer, affecting the diffusion process. Consequently, the coextrusion of the HDPE and LDPE layers promoted a more gradual release of Asta to the simulant. Coextrusion may be helpful to modify the release of the antioxidant from the active packaging. However, more studies related to the diffusion of the marigold extract from BM are needed to understand the behavior. For example, the design of packaging pouches and bag-in-box bags for edible oils may utilize an inner or intermediate layer of LDPE as the antioxidant source coextruded with an outer layer of HDPE.

3.2.3 Diffusion coefficients

The diffusion of Asta exhibited Fickian behavior, except from the MM film at 10 °C (Figure 4). The D values were 3.54 ± 1.40 , 7.40 ± 0.00 , and $32.67 \pm 3.19 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ at 23, 30, and 40 °C, respectively, for the diffusion in the MM films. However, the D values were 1.53 ± 0.44 , 4.12 ± 0.04 , and 5.59 ± 0.07 and produced at 10, 23, and 30 °C, respectively, for diffusion in the BM films (Table 2). It was not possible to calculate the D value at 40 °C for the BM films because Asta underwent a kind of double diffusion. This behavior might be a consequence of the earlier diffusion of Asta into the HDPE layer. As expected, the D values increased as the temperature increased for both systems. In general, the magnitude of the reported D values falls in the acceptable range of published data for other compounds, such as α -tocopherol ($1.30 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, 5 °C), carvacrol ($2.08 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, 25 °C), Irganox 1076 ($1.10 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, 30 °C) and Irgafos 168

($1.20 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, 40°C) (Graciano-Verdugo et al., 2010; Linssen, Reitsma, & Cozijnsen, 1998; Peltzer et al., 2009), that were incorporated into polyolefins and diffused into fatty food simulants. Diffusion is controlled by the properties of the migrant, packaging, food and environmental factors. Migrant size is one of these factors. Considering the molecular weight of Asta ($596.84 \text{ g mol}^{-1}$), this molecule is larger than α -tocopherol ($430.71 \text{ g mol}^{-1}$) and Irganox 1076 ($530.50 \text{ g mol}^{-1}$) molecules. D values of 4.6×10^{-10} and $1.1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ were reported for α -tocopherol and Irganox 1076 in LDPE with 95% and 100% ethanol, respectively, at 40°C (Helmroth, Bekhuis, Linssen, & Dekker, 2002; Zhu, Lee, et al., 2012). The values obtained for the diffusion of Asta from the MM and BM films into ethanol at 40°C are lower than the reported values, confirming that the larger migrants have lower diffusion coefficients.

3.3 Activation energy for the diffusion (E_a) of Asta

Figure 5 shows the dependence of D on temperature according to the Arrhenius equation. The E_a obtained for the diffusion of Asta from MM films was $101.75 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($R^2=0.99$) within a temperature range of 23 and 40°C . However, the E_a for the BM films was $47.11 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($R^2=0.99$) in a temperature range of 10 and 30°C . In general, the E_a value is influenced by the range of temperatures tested and when the purpose is to predict D values, it is applicable only in that range. Subsequently, the wider the range tested, the better the calculation of the energy required to open the LDPE chains and allow Asta to diffuse (Limm & Hollifield, 1995). In this case, the lack of one D data point for each film makes comparing both E_a values difficult. The diffusion of Asta in the MM films was more affected by temperature than that in the BM films because the D values in the second case were very similar within the tested range. The E_a values reported in this study are similar to those reported for other antioxidants incorporated in polyethylene films. For example, $126.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ was the E_a reported for the diffusion of α -tocopherol in LDPE to corn oil at $5\text{-}30^\circ\text{C}$ (Graciano-Verdugo et al., 2010) with a positive effect from the oxidative stability of the corn oil. Because the MM and BM films were also able to delay oxidation reactions in soybean oil at 25°C (Colín-Chávez et al., 2012), it is possible to store fatty food (or oils) contained in packaging made of MM or BM films without the risk interrupting the release of Asta in the case of fluctuation of temperatures. The

temperatures tested in this work represent the transport, storage and commercialization conditions for food in regions with a temperate to hot climate.

4.0 CONCLUSIONS

The diffusion of natural Asta from LDPE films into 95% ethanol exhibited typical Fick's behavior for monolayer LDPE films, except at 10 °C. Adding a HDPE layer as a coextruded film modified the release of Asta, decreasing the effect of temperature and assuring its release during transport, storage and commercialization conditions in regions with a temperate to hot climate. These findings revealed that natural extracts containing Asta have potential applications not only as active compounds in food packaging but also in other areas, such as release from membranes or capsules.

5.0 ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by funds from FONCICYT C0002-2008-95935. The authors acknowledge Industrias Vepinsa S.A. de C.V. for providing the marigold extract and thank Gerardo Reyna-Cañez for his academic assistance.

6.0 REFERENCES

- ASTM Standard D4754. (2011). Standard Test Method for Two-Sided Liquid Extraction of Plastic Materials Using FDA Migration Cell. West Conshohocken, PA, United States: ASTM International.
- Blasko, A., Belagyi, J., Dergez, T., Deli, J., Papp, G., Papp, T., . . . Pesti, M. (2008). Effect of polar and non-polar carotenoids on *Xanthophylomyces dendrorhous* membranes by EPR. *European Biophysics Journal*, 37(7), 1097-1104. doi: 10.1007/s00249-008-0289-9
- Castle, L. (2007). Chemical Migration into Food: an Overview. In K. A. Barnes, C. R. Sinclair & D. H. Watson (Eds.), *Chemical Migration and Food Contact Materials* (pp. 457). Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltd.
- Colín-Chávez, C., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Lizardi-Mendoza, J., & Balandrán-Quintana, R. R. (2012). Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. *Packaging Technology and Science*, n/a-n/a. doi: 10.1002/pts.1982

- Craft, N. E., & Soares, J. H. (1992). Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and beta-carotene in organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(3), 431-434. doi: 10.1021/jf00015a013
- Crank, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion* (2nd ed.). Great Britain: Oxford University.
- Crompton, T. R. (2007). *Additive Migration from Plastics Into Foods: A Guide for Analytical Chemists*: Smithers Rapra Publishing.
- FDA. (2007). Guidance for Industry: Preparation of Premarket Submissions for Food Contact Substances: Chemistry Recommendations. from Department of Health and Human Services. United States of America <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm081818.htm#iib>
- Galotto, M. J., Torres, A., Guarda, A., Moraga, N., & Romero, J. (2011). Experimental and theoretical study of LDPE: Evaluation of different food simulants and temperatures. *Food Research International*, 44(9), 3072-3078. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.028>
- Graciano-Verdugo, A. Z., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Cruz-Zárate, P., Islas-Rubio, A. R., Sánchez-Valdes, S., . . . González-Ríos, H. (2010). Migration of α -tocopherol from LDPE Films to Corn Oil and its Effect on the Oxidative Stability. *Food Research International*, 34(4), 1073-1078. doi: 10.1016/j.foodres.2010.01.019
- Gramza-Michałowska, A., & Stachowiak, B. (2010). The Antioxidant Potential of Carotenoid Extract from *Phaffia rhodozyma*. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9(2), 171-188.
- Helmroth, I. E., Bekhuis, H. A. M., Linssen, J. P. H., & Dekker, M. (2002). Direct measurement of additive migration from low-density polyethylene as a function of space and time. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(12), 3185-3190. doi: 10.1002/app.11324
- Hu, C.-Y., Chen, M., & Wang, Z.-W. (2012). Release of Thymol, Cinnamaldehyde and Vanillin from Soy Protein Isolate Films into Olive Oil. *Packaging Technology and Science*, 25(2), 97-106. doi: 10.1002/pts.964
- Huang, C.-H., & Weng, Y.-M. (1998). Inhibition of Lipid Oxidation in Fish Muscle by Antioxidant Incorporated Polyethylene Film *Journal of Food Processing and Preservation*, 22(3), 199-209. doi: 10.1111/j.1745-4549.1998.tb00345.x
- Iñiguez-Franco, F., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Ayala-Zavala, J. F., Auras, R., & Gámez-Meza, N. (2012). Antioxidant Activity and Diffusion of Catechin and Epicatechin from Antioxidant Active Films Made of Poly (l-lactic acid). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(26), 6515-6523. doi: 10.1021/jf300668u
- Licciardello, F., Muratore, G., Mercea, P., Tosa, V., & Nerin, C. (2012). Diffusional Behaviour of Essential Oil Components in Active Packaging Polypropylene Films by Multiple Headspace Solid Phase Microextraction–Gas Chromatography. *Packaging Technology and Science*, 26(3), 173-185. doi: 10.1002/pts.1969
- Limm, W., & Hollifield, H. C. (1995). Effects of temperature and mixing on polymer adjuvant migration to corn oil and water. *Food Additives & Contaminants*, 12(4), 609-624. doi: 10.1080/02652039509374349
- Linssen, J., Reitsma, J., & Cozijnsen, J. (1998). Research note-migration of antioxidants from polyolefins into ethanolic simulants. *Packaging Technology and Science*,

- 11(5), 241-245. doi: 10.1002/(SICI)1099-1522(1998090)11:5<241::AID-PTS436>3.0.CO;2-C
- Manzanarez-López, F., Soto-Valdez, H., Auras, R., & Peralta, E. (2011). Release of α -Tocopherol from Poly(Lactic Acid) Films, and its Effect on the Oxidative Stability of Soybean Oil. *Journal of Food Engineering*, 104(4), 508-517. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.12.029
- Martínez, A., Rodríguez-Girones, M. A., Barbosa, A., & Costas, M. (2008). Donator Acceptor Map for Carotenoids, Melatonin and Vitamins. *Journal of Physical Chemistry A*, 112(38), 9037-9042. doi: 10.1021/jp803218e
- Min, D. B., & Boff, J. M. (2002). Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(2), 58-72. doi: 10.1111/j.1541-4337.2002.tb00007.x
- Mohammadi, M., Yousefi, A. A., & Ehsani, M. (2012). Study of the thermal and mechanical properties of blown films of high- and low-density polyethylene blends. *Journal of Applied Polymer Science*, 125(1), 755-767. doi: 10.1002/app.36246
- Park, H.-Y., Kim, S.-J., Kim, K. M., You, Y.-S., Kim, S. Y., & Han, J. (2012). Development of Antioxidant Packaging Material by Applying Corn-Zein to LLDPE Film in Combination with Phenolic Compounds. *Journal of Food Science*. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02906.x
- Peltzer, M., Wagner, J., & Jiménez, A. (2009). Migration study of carvacrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging. *Food Additives and Contaminants*, 26(6), 938-946. doi: 10.1080/02652030802712681
- Pereira de Abreu, D. A., Paseiro Losada, P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*, 43(5), 1277-1282. doi: 10.1016/j.foodres.2010.03.019
- Pu, J., Bechtel, P. J., & Sathivel, S. (2010). Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates. *Biosystems Engineering*, 107(4), 364-371. doi: 10.1016/j.biosystemseng.2010.10.001
- Rao, A. R., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2007). Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 957-965. doi: 10.1002/jsfa.2766
- Robertson, G. L. (2012). *Food packaging: principles and practice* (3rd ed.). USA: CRC press.
- Shen, L. (2012). *Effect of Controlled Release of Tocopherol on Lipid Oxidation*. (Master of Science), The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey.
- Skibsted, L. H. (2012). Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2409-2417. doi: 10.1021/jf2051416
- Soto-Cantú, C. D., Graciano Verdugo, A. Z., Peralta, E., Islas-Rubio, A. R., González-Córdova, A., González-León, A., & Soto-Valdez, H. (2008). Release of Butylated Hydroxytoluene from an Active Film Packaging to Asadero Cheese and Its Effect on Oxidation and Odor Stability. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 11-19. doi: 10.3168/jds.2007-0464

- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S. W. (2003). Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. *Journal of Food Science*, 68(2), 408-420. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb05687.x
- Tawfik, M. S., & Huyghebaert, A. (1999). Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. *Food Chemistry*, 64(4), 451-459. doi: 10.1016/s0308-8146(97)00202-1
- Tehrany, E. A., & Desobry, S. (2004). Partition coefficients in food/packaging systems: a review. *Food Additives & Contaminants*, 21(12), 1186-1202. doi: 10.1080/02652030400019380
- Torres-Arreola, W., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Cárdenas-López, J. L., & Ezquerra-Brauer, J. M. (2007). Effect of a Low-Density Polyethylene Film Containing Butylated Hydroxytoluene on Lipid Oxidation and Protein Quality of Sierra Fish (*Scomberomorus sierra*) Muscle during Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6140-6146. doi: 10.1021/jf070418h
- Wang, L., Yang, B., Yan, B., & Yao, X. (2012). Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 120-127. doi: 10.1016/j.ifset.2011.09.004
- Wessling, C., Nielsen, T., & Giacini, J. R. (2001). Antioxidant ability of BHT- and α -tocopherol-impregnated LDPE film in packaging of oatmeal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2), 194-201. doi: 10.1002/1097-0010(20010115)81:2<194::aid-jsfa801>3.0.co;2-r
- Zhu, X., Lee, D. S., & Yam, K. L. (2012). Release property and antioxidant effectiveness of tocopherol-incorporated LDPE/PP blend films. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(3), 461-468. doi: 10.1080/19440049.2011.643826
- Zhu, X., Schaich, K., Chen, X., & Yam, K. (2012). Antioxidant Effects of Sesamol Released from Polymeric Films on Lipid Oxidation in Linoleic Acid and Oat Cereal. *Packaging Technology and Science*. doi: 10.1002/pts.1964

Table 1. Characteristics and concentrations of Asta in the films

Film	Polymer	Thickness, μm		Asta present in the LDPE layer
		HDPE	LDPE	$\mu\text{g/g}$
MC= Monolayer Control	LDPE		53.0 \pm 3.0	0
MM= Monolayer + Marigold Extract	LDPE		50.0 \pm 3.0	188.97 \pm 15.85
BC= Bilayer Control	HDPE/LDPE	25.6 \pm 3.0	49.2 \pm 7.5	0
BM=Bilayer + Marigold Extract	HDPE/LDPE	33.2 \pm 7.4	43.00 \pm 6.0	135.82 \pm 0.16

Adapted from Colín-Chávez et al. (2012)

Table 2. Values for the α , partition ($K_{p,s}$) and diffusion (D) coefficients for the diffusion of Asta from MM and BM films into 95% ethanol at different temperatures

Temperatur e °C	$K_{p,s}$		α		$D \times 10^{-11} \text{ (cm}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}^a$	
	MM	BM	MM	BM	MM	BM
10	---	72.78±0.85	---	0.78±0.0	---	1.53±0.44 ^a
23	55.54±5.62 ^a A	18.12±1.26 ^a B	4.54±0.57 ^{a,A}	5.43±0.17 ^{a,A}	3.54±1.40 ^a A	4.12±0.04 ^b A
30	11.95±1.10 ^b A	27.32±0.61 ^b B	18.91±1.87 ^{ab} A	3.64±0.04 ^{b,B}	7.40±0.00 ^a B	5.59±0.07 ^c B
40	9.04±2.27 ^{b,A}	27.14±6.42 ^b B	24.34±6.12 ^b A	3.90±1.02 ^{ab} B	32.67±3.19 b	---

^aValues are expressed as the best fit values for two replicates \pm standard deviations. Different superscript lower case letters within the same columns indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Different superscript capital letters between columns (MM and BM) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Diffusion values were determined according to Eq. (1).

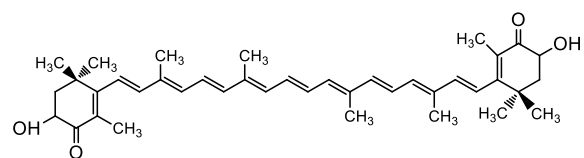


Figure 1. Chemical structure of Asta.

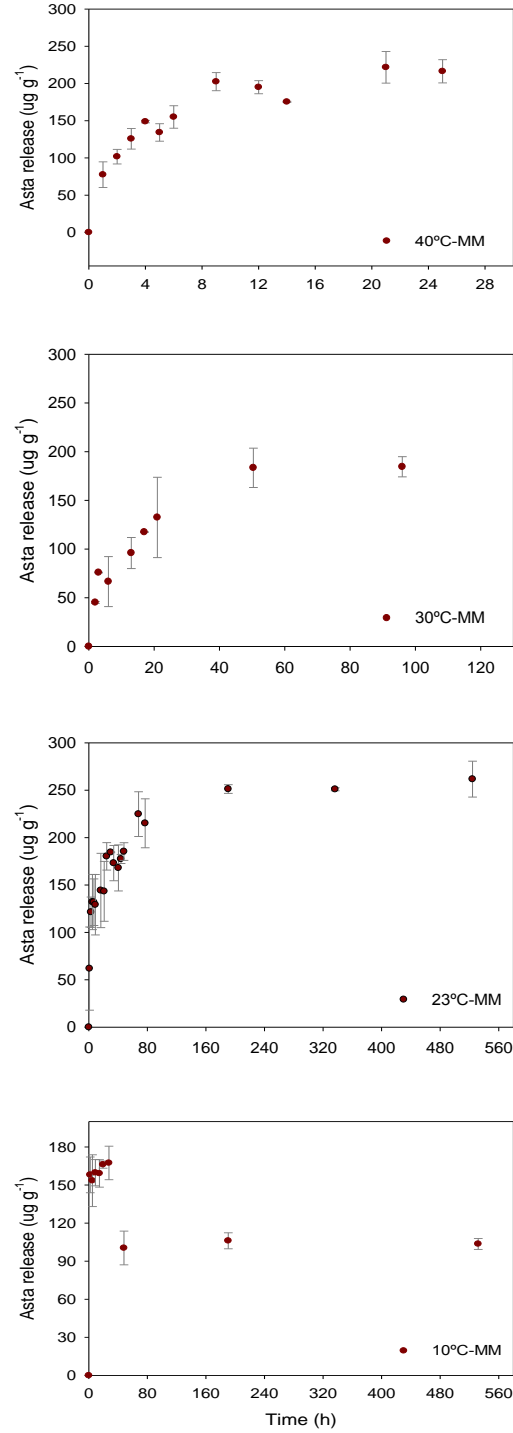


Figure 2. Asta released from MM films. The graphs display the concentration of Asta released by weight of the LDPE layer on the MM films ($\mu\text{g g}^{-1}$) vs time (h).

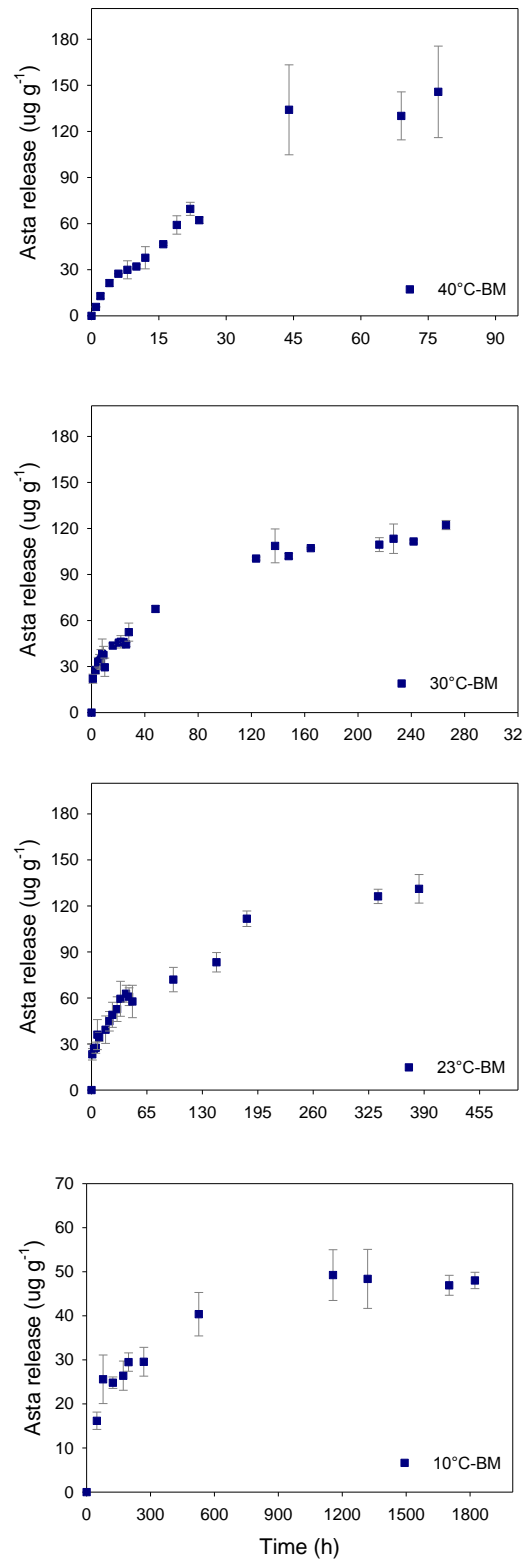
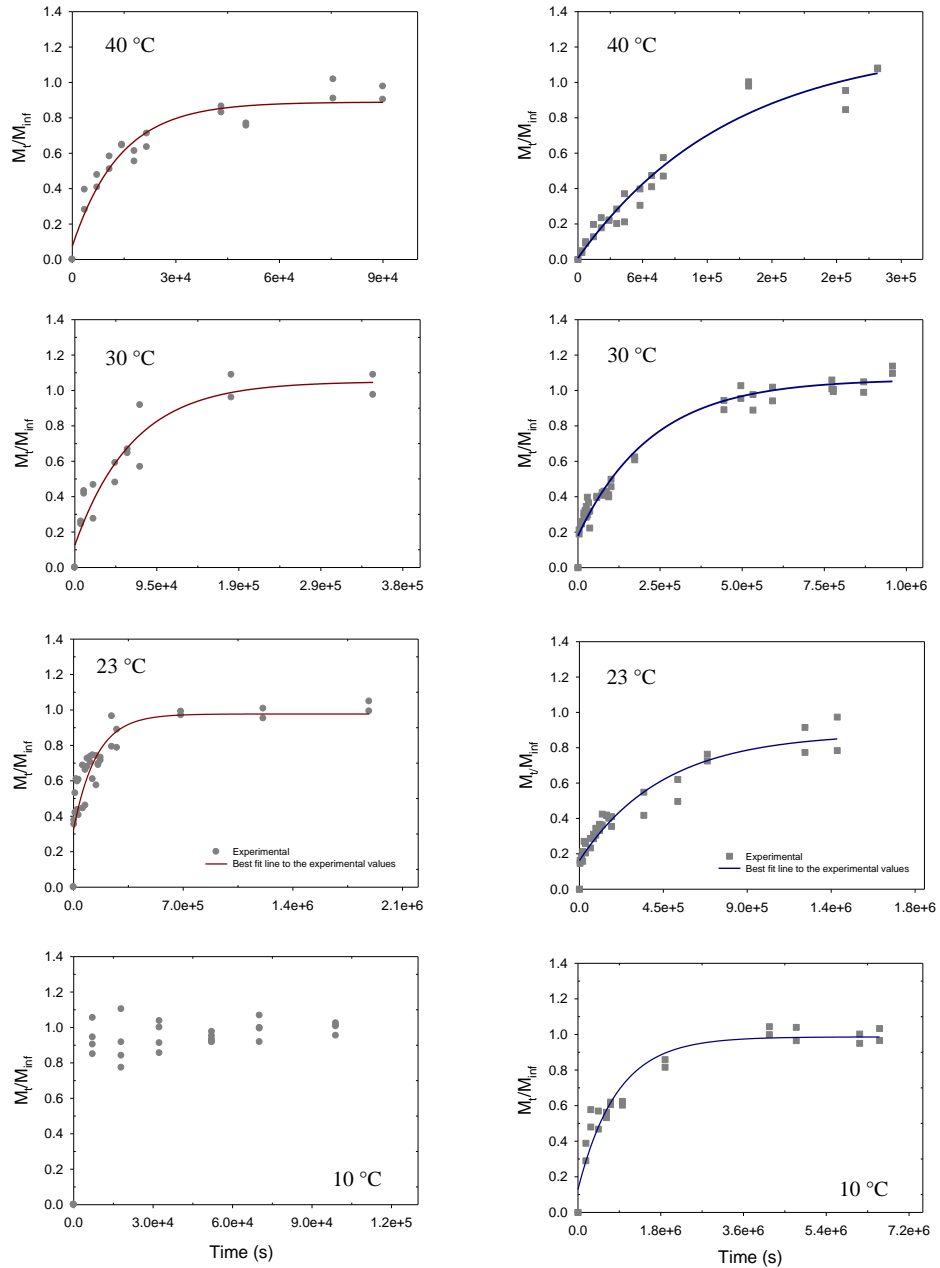


Figure 3. Asta released from BM films. The graphs display the concentration of Asta released by weight of the LDPE layer on the BM films ($\mu\text{g g}^{-1}$) vs time (h).



4. Diffusion of Asta from MM (circles) and BM (squares) films into 95% ethanol at different temperatures according to the Fick's second law. The y axis represents the mass of Asta diffused at time t divided by the mass of Asta diffused at equilibrium. The x axis describes t as time in s .

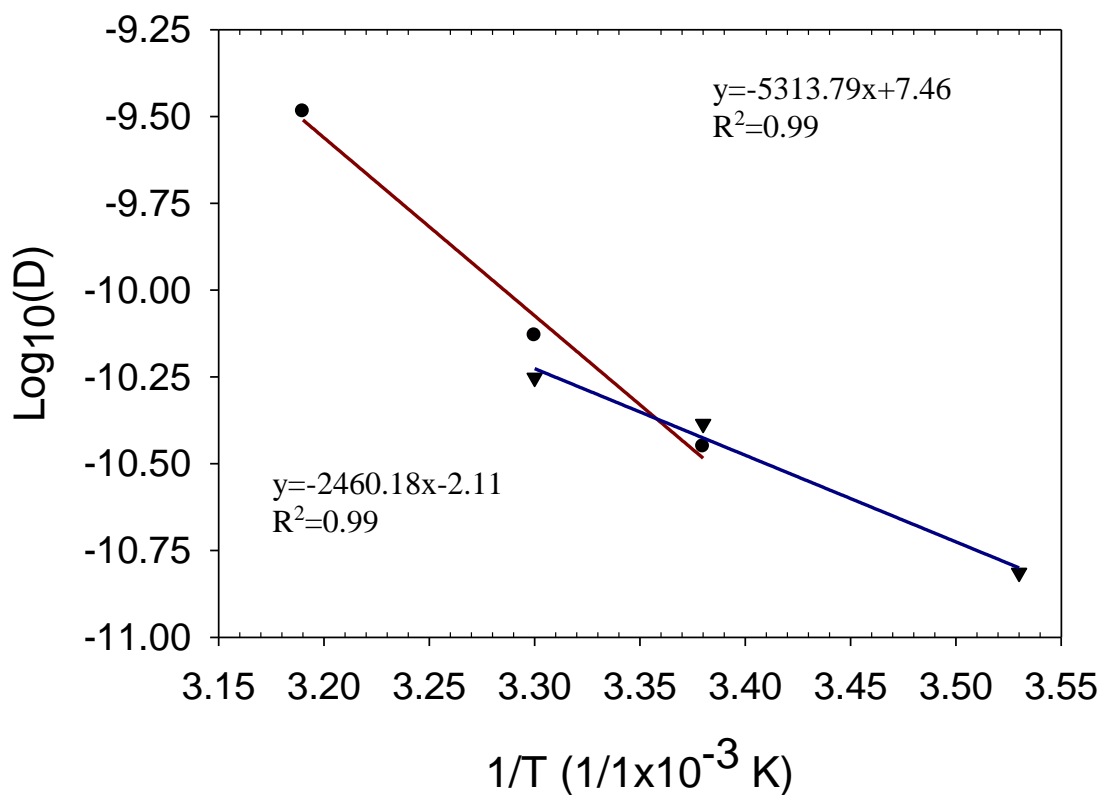


Figure 5. Activation energy (E_a) for the diffusion of Asta from MM and BM films into 95% ethanol. The MM films values are represented by circles, while the BM films values are represented by triangles. The temperature ranged from 23 to 40 °C for the MM films and from 10 to 30 °C for the BM films.

CAPÍTULO III

Difusión de carotenoides desde una película activa monocapa y bicapa de polietileno hacia aceite de soya

por

Colín-Chávez, C.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E

Trabajo enviado a *Journal of Agricultural and Food Research*

Objetivo 2. Estudiar la migración de astaxantina desde películas activas hacia simulantes de alimentos grasos.

Objetivo 3. Determinar el efecto de la temperatura en la migración de astaxantina.

Diffusion of Carotenoids from Mono and Bilayer Polyethylene Active Packaging into Soybean Oil

Citlali Colín-Chávez, Herlinda Soto-Valdez*, Elizabeth Peralta.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. CTAOV, Carret. a la Victoria
km. 0.6, Apdo. Postal 1735, Hermosillo, Sonora 83304, México

*Corresponding author (Phone: +52 (662) 289 2400. ext. 222, Fax: +52 (662) 280 0057,
email: hsoto@ciad.mx)

ABSTRACT

The diffusion of carotenoids from a monolayer low-density polyethylene film (MM) and a two-layer high-density polyethylene/low-density polyethylene film (BM) was evaluated by immersion in soybean oil; in addition, the effect of temperature on the diffusion rate was assessed. The diffusion coefficients were 8.81-28.66 and 3.99-21.30 $\times 10^{-11}$ cm^2/s for the MM films at 30 and 40 °C. Meanwhile, the diffusion coefficients were <1.56, 1.56 \pm 0.43, 6.75 \pm 0.45, and 17.70 \pm 6.66 $\times 10^{-11}$ cm^2/s at 10, 25, 30, and 40 °C, respectively, for the BM films. The effect of temperature on the diffusion coefficients followed an Arrhenius-type model with activation energies of 118.97 kJ/mol for the BM films. These findings demonstrated that carotenoids may be applied as active compounds in multilayer packaging for fatty food stored or commercialized in regions with a temperate to hot climate.

KEYWORDS: carotenoids, antioxidants, active packaging, polyethylene, diffusion, activation energy.

INTRODUCTION

Antioxidant active packaging may be able to prevent or slow the oxidation of easily oxidizable food components. This approach requires the deliberate incorporation of antioxidants into packaging materials and the further migration of antioxidants to the food. Therefore, the food shelf life is extended and safety is improved while quality is maintained.^{1, 2} There are different interactions between food and packaging. Migration is one of them and consists of transferring components from the packaging material to the food. It is a molecular diffusion process explained by the Fick's second law, and there are two basic parameters derived from this process. The first is the diffusion coefficient (D), which dictates how fast the antioxidant is diffused. The second is the partition coefficient ($K_{p,s}$), which dictates how much migrant is diffused when diffusion reaches the equilibrium between the packaging and food.³

Vegetable oils are composed principally of triglycerides of fatty acids with some degree of unsaturation. They can be used for cooking, as ingredient of foods and directly as food. The unsaturated fatty acids present in oils are susceptible to oxidation that causes quality deterioration. Thus, oils must be adequately protected and one alternative is by the use of antioxidant active packaging.⁴ Many reports on antioxidant active packaging have focused on the migration of synthetic antioxidants, such as butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA).⁵⁻⁹ Currently, research is focused on the use of natural antioxidants. This trend has two branches, the use of pure antioxidants or the use of natural extracts rich in antioxidants. Different antioxidant packaging combined with flavonoid-cocoa extract,¹⁰ astaxanthin-marigold extract,¹¹ rosemary extract,¹² oregano extract,¹³ citronella essential oil,¹³ and barley husks¹⁴ have been developed. As a result, natural antioxidants are becoming a valid alternative for food protection and recent efforts have

focused on the extraction, identification and application of natural antioxidants in the form of extracts.

Carotenoids constitute a family of pigmented lipophilic compounds which are widely distributed in green plants, fruits, and vegetables. The backbone of the carotenoid molecule consists in a polyene chain that may be terminated by cyclic end groups that contain oxygen-bearing substitutes. The polyene chain is responsible for antioxidant activities of carotenoids that depend upon its ability to quench singlet oxygen and scavenge free radicals. This family is composed by more than 700 members, but no more than 10 have been applied commercially in food and feed industry as pigments.¹⁵ In the food packaging industry there are few publications about the use of carotenoids as polymer stabilizers or active compounds. Azteca marigold (*Tagetes erecta*) flowers are a common source of carotenoids. It is possible to find commercial Azteca marigold extracts which are used as pigments in poultry feed (for pigmentation of skin and egg yolks), shrimp farming, and commercial/ornamental fish culture. Also, indirectly applying marigold extract containing 1.81% of astaxanthin in polyethylene films protected soybean oil from oxidation.¹¹

Polyethylene is the most widely used single polymer in food packaging. Polyethylene has the simplest possible structure based on $-\text{CH}_2-$ units.² There several types of polyethylene, including low-density polyethylene (LDPE) and high-density polyethylene (HDPE). Both materials have different crystallinities. LDPE has a structure with many branched chains that interrupt the regular arrangement of the atoms, generating a low degree of crystallinity (50-70%) and introducing amorphous zones. HDPE has a linear, ordered structure with few short-chain branches, favoring a parallel chain configuration,

a higher degree of crystallinity (90%) and fewer amorphous zones. Thus, combining diverse layers of polyethylenes may provide defined properties for specialized food packaging applications.¹¹

The present work aims to study the migration of carotenoids from monolayer and coextruded films, including polyethylenes with different densities to soybean oil at different temperatures and to evaluate the effects of temperature on the diffusion of carotenoids.

MATERIALS AND METHODS

Chemical and Reagents

LDPE resin (LBA253) was obtained from Muehlstein (Wilton, CT) and HDPE resin (HD7960) was acquired from ExxonMobil Chemical (New York, NY). Marigold extract was provided by Industrias Vepinsa S.A. de C.V. (Los Mochis, Sin, México). The astaxanthin (>97%) HPLC standard was obtained from Alexis[®] Biochemicals (Enzo Life Science, Inc. New York, NY). BHT (99%) was purchased from TCI America (Portland, OR). Deodorized soybean oil was obtained from Industrializadora Oleofinos S.A. de C.V. (Zapopan, Jal, México). All solvents to quantify total carotenoids were HPLC grade (J.T Baker, Toluca, Edomex, México).

Film fabrication

The films used in this study were produced using the blown extrusion process and details about fabrication were reported in a previous work.¹¹ Two films were fabricated, a monolayer film of LDPE added with 2.90% of marigold extract (MM film) and a bilayer

film of HDPE/LDPE added with 3.59% of marigold extract in the LDPE layer (BM films). Two more films with the same structure but without addition of marigold extract were fabricated and used as controls. Table 1 lists some characteristics of these films.

Quantification of total carotenoids in the marigold extract and films

A spectrophotometric method for total carotenoids quantification was established using astaxanthin as standard. Standard solutions of astaxanthin in acetone at concentrations between 0.50 and 6.0 $\mu\text{g/mL}$ were used to produce a calibration curve. Carotenoids were quantified using a spectrophotometer Cary 50 Bio (Varian, Victoria, Australia). Absorbance was measured at 474 nm in 4.5-cm cuvettes.¹⁶ Acetone was used as a blank and a linear plot ($R^2=0.99$) was obtained. The limit of quantification (LOQ) of the method was established when a standard solution of astaxanthin gave an absorbance < 0.0047 which corresponded to 0.033 $\mu\text{g/mL}$ of carotenoids.

The marigold extract (25.40 mg) was dissolved in 25 mL of acetone and proper dilutions were performed to quantify total carotenoids. The MM and BM films were cut into 0.25 cm^2 pieces and stirred in acetone at 40 °C for 24 h in the dark to extract carotenoids, proper dilutions were performed when it was necessary. To protect carotenoids from degrading during the extraction period, BHT was added to the solution (100 $\mu\text{g/mL}$). Total carotenoid content was expressed in μg astaxanthin per mL of acetone. Three replicates were performed for each sample.

Diffusion of total carotenoids from MM and BM films into the soybean oil

Refined and deodorized soybean oil without addition of commercial antioxidants was used as the liquid phase of the system. The oil was kept at -20 °C since its production to avoid

oxidation. To protect the oil and carotenoids from degradation during the diffusion period BHT (5%) was added to soybean oil.

The migration cell consisted of a 40 mL amber glass vial containing 35 mL of soybean oil. MM films samples measuring 4.5 x 24 cm were immersed in the soybean oil. To perform both experiments using immersion, two 3.6 x 15 cm rectangles of the BM films were adhered together such that the LDPE layers were exposed on both sides; the rectangles were immersed in the soybean oil using the same protocol as for the MM films. The LDPE layer was considered to be twice as thick when determining the diffusion constants for the BM films. The liquid volume/area ratios were 0.32 and 0.65 mL/cm² for the MM and BM films, respectively. These ratios complied with the ASTM D4754-98, which establishes a ratio between 155 and 0.31 mL/cm² for diffusion experiments.¹⁷ The diffusion experiments were performed under darkness at temperatures of 10, 25, 30, and 40 °C. Four replicates were performed for each experiment. Soy bean oil samples were collected at different times to quantify the total carotenoids until the concentration was constant. The soybean oil removed during sampling was replaced with soybean oil.

Quantification of total carotenoids in the soybean oil

Carotenoids were quantified using the spectrophotometer described above by measuring absorbance at 463 nm in 4.5-cm cuvettes.¹⁶ Wavelength was determined by performing a wavelength scan from 200 to 800 nm in samples obtained from the migration experiments. Standard solutions of astaxanthin in soybean oil at concentrations between 0.12 and 80 µg/mL were used to produce a calibration curve. Soybean oil was used as a blank and a linear plot ($R^2=0.99$) was obtained. The LOQ of the method was established when a

standard of astaxanthin in oil gave an absorbance < 0.0055 which corresponded to $0.12 \mu\text{g/mL}$ of carotenoids.

Carotenoids release models

The migration process is described by the diffusion kinetics of the migrant in the film, and it is expressed by D . To determine D , an analytical solution of Fick's second law equation was used. When the diffusion is in one dimension for a limited volume of film in a finite volume of liquid,^{18, 19} the analytical solution is as follows

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2 \alpha (1+\alpha)}{1+\alpha + \alpha^2 q_n^2} \exp\left\{-\frac{Dq_n^2 t}{l^2}\right\} \quad (1)$$

where M_t/M_∞ is the concentration of the carotenoids diffused at time t , divided by the concentration of the carotenoids diffused at equilibrium; l is the thickness of the film, and the q_n values are the nonzero positive roots of $\tan q_n = \alpha q_n$ and α is

$$\alpha = \frac{V_s}{K_{p,s} V_p} \quad (2)$$

where V_s and V_p are the volume of the soybean oil and the polymer, respectively; $K_{p,s}$ is the partition coefficient of the carotenoids between the LDPE and the soybean oil, which is assumed to be constant at low concentrations and was calculated from the ratio of the concentration of carotenoids in LDPE ($C_{p,\infty}$) and the soybean oil ($C_{s,\infty}$) at equilibrium.

$$K_{p,s} = \frac{C_{p,\infty}}{C_{s,\infty}} \quad (3)$$

To fit the data to Eq. (1), M_t/M_∞ was plotted versus time t . D (cm^2/s) was calculated for each film at the different experimental temperatures. To determine the fit of the

experimental data to Eq. (1), a non-linear regression (nlin-fit) function in MATLAB R2010b (MathWorks, Natick, MA, US) was applied to the data.^{19, 20}

Activation energy for the diffusion (E_a) of total carotenoids.

To determine the effects of temperature on the diffusion of carotenoids from the films into the soybean oil, the E_a was calculated using the Arrhenius equation for diffusion:

$$D = D_o \cdot e^{\left[\frac{E_a}{RT}\right]} \quad (4)$$

where D is the diffusion coefficient, D_o is the pre-exponential factor of diffusion, E_a is the activation energy of diffusion, R is the ideal gas constant (8.3145 J/K mol), and T is the temperature in K. E_a was obtained from the slope of a plot of the reciprocal of temperature ($1/T$) vs the logarithm of D ($E_a = -\text{slope} \times 2.303R$).¹⁹

Statistical analysis

For the diffusion of carotenoids, descriptive statistics and simple linear regression analyses were used at each temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

MM and BM were previously developed by our research group and details were published by Colín-Chávez, et al.¹¹ The concentration of carotenoids quantified in the marigold extract was 37.32 ± 0.56 mg/g (Table 1). Meanwhile, the concentration of carotenoids in the films was 647.59 ± 41.29 and 426.22 ± 20.30 $\mu\text{g/g}$ in the LDPE layer for MM and BM, respectively. About 30% of the carotenoids quantified in the films was astaxanthin (188.97 ± 15.85 and 135.82 ± 0.16 $\mu\text{g/g}$ for MM and BM films, respectively).¹¹ More than 60% of carotenoids contained in the extract were lost during the extrusion process. These

values are lower than the concentration of astaxanthin lost by the extrusion process for the BM films (78.45%)¹¹ because other carotenoids present in the extract could have been more resistant to the processing temperatures.²¹ There are only three publications about the incorporation of carotenoids to polymers. Two papers reported the incorporation of β -carotene²² and lycopene²³ in poly(lactic acid) and polypropylene, respectively, as polymer stabilizers. The third report is our previous paper, which describes the effect of the marigold extract on the properties of the films studied in the present work.¹¹ This report also showed a positive effect of the films on the soybean oil oxidative stability as a consequence of the migration of carotenoids, astaxanthin among them.

Carotenoids release

Figure 1 presents the migration of carotenoids toward soybean oil in the MM films. At 40 °C the equilibrium was obtained at 8 h (0.33 d) with a release of 58.75% of carotenoids. At 30 °C the equilibrium was obtained at 9 h (0.38 d) with a release of 33.93% of carotenoids. In both scenarios the release was gradual; however, at 25 and 10 °C apparently, no diffusion had occurred; only the dissolution of the carotenoids located on the surface of the films were detected. In these cases the levels of carotenoids kept constant or decreased in the soybean oil during the contact with the MM films. A similar behavior was observed during the diffusion of α -tocopherol from poly(lactic acid) films in coconut oil at 20, 30, and 40 °C.²⁰ In the present work, the release at 10, 25, and 40 °C showed that there was a decrease in carotenoids concentration, which was evident after the diffusion reached the equilibrium. It was not possible to observe this behavior at 30 °C because the experiment was stopped when the maximum carotenoid concentration was achieved. Even soybean oil was added with enough BHT to avoid oxidation, carotenoids suffered

degradation at these temperatures. Commonly, carotenoids degradation is associated with high temperatures ($>70\text{ }^{\circ}\text{C}$). However, some authors have observed that this phenomenon occurred at temperatures as low as $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Franco-Zavaleta, et al.²⁴ reported that carotenoids concentration in shrimp wastes extract incorporated to sunflower oil suffered degradation at 4 and $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and there was effect of time. Additionally, Anarjan and Tan²⁵ found that after 8, 6, and 1 week of storage at 5 , 10 , and 25°C , about 37, 37, and 46%, of the astaxanthin present in a nanodispersion of polysorbate 20 (29%), sodium caseinate (65%) and gum Arabic (6%) decayed, respectively. Figure 2 presents the migration of carotenoids into soybean oil from the BM films. At $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ the equilibrium was obtained at 22 h (0.92 d) with a release of 46.75% of the carotenoids. At $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ the equilibrium was achieved at 191 h (7.99 d) with a release of 66.22%. At $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ the equilibrium was obtained at 357.5 h (14.90 d) with a release of 41.20%. Finally, at $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ the equilibrium was obtained at 936 h (39 d) with a release of 18.9% of the carotenoids. According to these results carotenoids release increased with temperature in a range of $10\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Surprisingly, the percentage of carotenoids released was lower at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ than at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, probably due to degradation of these compounds at such high temperature. Yuan, et al.²⁶ reported that at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ astaxanthin reached a degradation percentage of 68.50% in 120 h, whereas at 25 and $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, the pigment was degraded totally in 80 and 32 h, respectively. Degradation of carotenoids could have occurred in all the migration experiments. However, it was not possible to determine the extent at which it occurred. Then, it is important to figure out that diffusion coefficients could be influenced by this process.

The release of carotenoids from BM films took 2.75 and 21.22 times to reach the equilibrium at 30 and $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ relative to the monolayer films, respectively. Then, the

presence of the HDPE layer in BM films allowed a more gradual release of carotenoids and extended the time to reach the equilibrium. Microscopic observations of the BM films (not shown) revealed that after processing the bilayer films and before the diffusion experiments, marigold extract molecules (composed by oil and carotenoids) diffused into the HDPE layer. Then, the gradual release of carotenoids in the BM films could be the result of two facts, the first is the diffusion of marigold molecules into the HDPE layer and the second is the penetration of soybean oil molecules in the LDPE layer. Schwoppe, et al.²⁷ reported that LDPE was penetrated by oily components of the food, which promoted the migration of antioxidants such as BHT. In the second case, if the soybean oil molecules penetrated the LDPE layer, some carotenoids molecules could have been dissolved and easily diffused towards the liquid. Probably these carotenoids were the first to arrive to the soybean oil. Meanwhile, other molecules of soybean oil penetrating the LDPE layer could have arrived to the interphase HDPE/LDPE finding a barrier, which slowed down the mobility. This barrier is the crystallinity of HDPE. Then, soybean oil molecules could swell and plasticize the crystalline phase of interphase HDPE/LDPE helping the release of the carotenoids molecules in a later stage.

Carotenoids partition coefficients

The $K_{p,s}$ for the diffusion of carotenoids in every system was > 1 (Table 2). A $K_{p,s} > 1$ indicates that a higher concentration of migrant remained in the packaging relative to the food (soybean oil in this case) after reaching the equilibrium. The polarity of the migrant, packaging and food as well as the solubility of the migrants in the food determine the $K_{p,s}$ for a diffusion process.²⁸ Molecules with similar polarities tend to be attracted to each other, while molecules with dissimilar polarities exhibit a much weaker attraction. Even

when the three elements of our systems, carotenoids, LDPE and soybean oil are relatively non polar compounds, the $K_{p,s}$ showed that carotenoids interaction with LDPE was not easily broken by the soybean oil. Then, in these systems, solubility and polarity did not determine the $K_{p,s}$ values. Because marigold extract molecules diffused into the HDPE layer, some carotenoids molecules might have been retained in the HDPE layer, affecting the process of diffusion as explained before. Consequently, the coextrusion of the HDPE and LDPE layers promoted a more gradual release of carotenoids to the soybean oil. On the other hand, the results did not show a clear relationship to temperature. This might be attributed to thermal degradation of carotenoids. Then, not only polarity and solubility but also the coextrusion of a HDPE layer to the LDPE and thermal degradation of carotenoids could influence the magnitude of the $K_{p,s}$.

Diffusion coefficients

The diffusion of carotenoids exhibited a Fickian behavior, except for MM film at 10 and 25 °C (Figure 3). The D values were 8.81-28.66 and 3.99-21.30 x 10⁻¹¹ cm²/s at 30 and 40 °C, respectively, for the diffusion in the MM films. There was a high variation within the D values at these temperatures; therefore, the values are presented as ranges. The variation can be attributed to a combination of the thermal degradation that carotenoids experimented and the oil penetration into the LDPE films. However, the D values were <1.56, 1.56±0.43, 6.75±0.45, and 17.70±6.66 x 10⁻¹¹ cm²/s at 10, 25, 30, and 40 °C, respectively, for diffusion in the BM films (Table 2). It is important to figure out that in a previous publication, a delayed of lipid oxidation of soybean oil packaged in the BM films was tested at 25 °C.¹¹ As expected, the D values increased as the temperature increased. In general, the magnitude of the reported D values falls in the acceptable range of

published data for other compounds, such as α -tocopherol ($1.3 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, $10 \text{ }^\circ\text{C}$; $9.6 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$; $51.10 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$),²⁹ carvacrol ($23.70 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$),³⁰ and Irganox 1010 ($2.00 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, $49 \text{ }^\circ\text{C}$),²⁷ that were incorporated in polyethylene films and diffused into vegetable oils. Then, in MM films thermal degradation of carotenoids and oil penetration influenced the diffusion behavior, while in BM films the coextrusion of a HDPE layer to the LDPE promoted a gradual release of carotenoids maintaining the Fickian behavior of the diffusion.

Activation energy for the diffusion (E_a) of carotenoids

Figure 4 shows the dependence of D on temperature according to the Arrhenius equation. The E_a obtained for the diffusion of total carotenoids from BM films was 118.97 kJ/mol ($R^2=0.92$) in a temperature range of 25 and $40 \text{ }^\circ\text{C}$. According to Limm and Hollifield³¹ this can be interpreted as the energy required to open the LDPE chains and allow the diffusion of carotenoids into oil. This value is similar to the reported for the diffusion of α -tocopherol from two films made of LDPE into corn oil at $5 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$: 105.90 and 126.5 kJ/mol , with positive effects on the oxidative stability of the corn oil.²⁹ Also, an E_a of 11.3 kJ/mol was reported for diffusion of α -tocopherol from LDPE into whole milk powder at $20 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$.³² It is important to figure out that the E_a is influenced by the range of temperatures tested, and when the purpose is to predict D values it is applicable only in that range. Consequently, the wider the range tested, the better the calculation of the E_a .³¹ In the present work, temperature has moderate effect on carotenoids diffusion to soybean oil from 25 to $40 \text{ }^\circ\text{C}$ which represents the transport, storage and commercialization conditions for food such as vegetable oils in regions with a temperate to hot climate.

In conclusion the diffusion of natural carotenoids from MM films into soybean oil exhibited typical Fick's behavior at 30 and 40 °C; however, diffusion of carotenoids from BM films exhibited Fick's behavior at 10 - 40 °C. Adding a HDPE layer as a coextruded film delayed the release of carotenoids and the time to reach the equilibrium. Consequently, when designing multilayer films for active packaging it has to be considered that additional layers can modify the release properties of other layers. The behavior obtained from the bilayer system assured the release of carotenoids from BM films into vegetable oils during the stages of commercialization without the risk of interruption for fluctuations in temperature. These findings revealed that carotenoids have potential applications as active compounds in release devices like active packaging, membranes and capsules.

AKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by funds from FONCICYT C0002-2008-95935. The authors acknowledge Industrias Vepinsa S.A. de C.V. for providing the marigold extract.

REFERENCES

- (1) Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K.; Bigger, S. W., Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 408-420.
- (2) Robertson, G. L., *Food Packaging: Principles and Practice*. 3rd ed.; CRC press: United States of America, 2012; p 703.
- (3) Castle, L., Chemical Migration into Food: an Overview. In *Chemical Migration and Food Contact Materials*, Barnes, K. A.; Sinclair, C. R.; Watson, D. H., Eds. Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, England, 2007; p 457.
- (4) Piergiovanni, L.; Limbo, S., Packaging and the Shelf Life of Vegetable Oils. In *Food Packaging and Shelf Life*, Robertson, G. L., Ed. CRC Press Taylor and Francis Group: United States of America, 2010; p 388.

- (5) Soto-Cantú, C. D.; Graciano Verdugo, A. Z.; Peralta, E.; Islas-Rubio, A. R.; González-Córdova, A.; González-León, A.; Soto-Valdez, H., Release of Butylated Hydroxytoluene from an Active Film Packaging to Asadero Cheese and its Effect on Oxidation and Odor Stability. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 11-19.
- (6) Wessling, C.; Nielsen, T.; Giacín, J. R., Antioxidant Ability of BHT- and α -Tocopherol-Impregnated LDPE Film in Packaging of Oatmeal. *J. Sci. Food Agr.* **2001**, *81*, 194-201.
- (7) Tawfik, M. S.; Huyghebaert, A., Interaction of Packaging Materials and Vegetable Oils: Oil Stability. *Food Chem.* **1999**, *64*, 451-459.
- (8) Huang, C.-H.; Weng, Y.-M., Inhibition of Lipid Oxidation in Fish Muscle by Antioxidant Incorporated Polyethylene Film *J. Food Process. Pres.* **1998**, *22*, 199-209.
- (9) Torres-Arreola, W.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Cárdenas-López, J. L.; Ezquerra-Brauer, J. M., Effect of a Low-Density Polyethylene Film Containing Butylated Hydroxytoluene on Lipid Oxidation and Protein Quality of Sierra Fish (*Scomberomorus sierra*) Muscle during Frozen Storage. *J. Agr. Food Chem.* **2007**, *55*, 6140-6146.
- (10) Calatayud, M.; López-de-Dicastillo, C.; López-Carballo, G.; Vélez, D.; Muñoz, P. H.; Gavara, R., Active Films Based on Cocoa Extract with Antioxidant, Antimicrobial and Biological Applications. *Food Chem.* **2013**.
- (11) Colín-Chávez, C.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Lizardi-Mendoza, J.; Balandrán-Quintana, R. R., Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. *Packag. Technol. Sci.* **2012**, DOI:10.1002/pts.1982.
- (12) Camo, J.; Beltrán, J. A.; Roncalés, P., Extension of the Display Life of Lamb with an Antioxidant Active Packaging. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 1086-1091.
- (13) Licciardello, F.; Muratore, G.; Mercea, P.; Tosa, V.; Nerin, C., Diffusional Behaviour of Essential Oil Components in Active Packaging Polypropylene Films by Multiple Headspace Solid Phase Microextraction–Gas Chromatography. *Packag. Technol. Sci.* **2012**, *26*, 173-185.
- (14) Pereira de Abreu, D. A.; Paseiro Losada, P.; Maroto, J.; Cruz, J. M., Evaluation of the Effectiveness of a New Active Packaging film Containing Natural Antioxidants (from Barley Husks) that Retard Lipid Damage in Frozen Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*). *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1277-1282.
- (15) Christaki, E.; Bonos, E.; Giannenas, I.; Florou-Paneri, P., Functional Properties of Carotenoids Originating from Algae. *J. Sci. Food Agr.* **2013**, *93*, 5-11.
- (16) Sanches-Silva, A.; Ribeiro, T.; Albuquerque, T. G.; Paseiro, P.; Sendón, R.; de Quirós, A. B.; López-Cervantes, J.; Sánchez-Machado, D. I.; Soto Valdez, H.; Angulo, I.; Aurrekoetxea, G. P.; Costa, H. S., Ultra-High Pressure LC for Astaxanthin Determination in Shrimp by-Products and Active Food Packaging. *Biomed. Chromatogr.* **2013**, *27*, 757-764.
- (17) ASTM Standard D4754, Standard Test Method for Two-Sided Liquid Extraction of Plastic Materials Using FDA Migration Cell. ASTM International: West Conshohocken, PA, United States of America, 2011.
- (18) Crank, J., *The Mathematics of Diffusion*. 2nd ed.; Oxford University: Great Britain, 1975; p 414.
- (19) Iñiguez-Franco, F.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Ayala-Zavala, J. F.; Auras, R.; Gámez-Meza, N., Antioxidant Activity and Diffusion of Catechin and Epicatechin from

Antioxidant Active Films Made of Poly(L-lactic acid). *J. Agr. Food Chem.* **2012**, *60*, 6515-6523.

(20) Manzanarez-López, F.; Soto-Valdez, H.; Auras, R.; Peralta, E., Release of α -Tocopherol from Poly(Lactic Acid) Films, and its Effect on the Oxidative Stability of Soybean Oil. *J. Food Eng.* **2011**, *104*, 508-517.

(21) Boon, C. S.; McClements, D. J.; Weiss, J.; Decker, E. A., Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 515-532.

(22) López-Rubio, A.; Lagaron, J. M., Improvement of UV Stability and Mechanical Properties of Biopolyesters through the Addition of β -Carotene. *Polym. Degrad. Stabil.* **2010**, *95*, 2162-2168.

(23) Cerruti, P.; Malinconico, M.; Rychly, J.; Matisova-Rychla, L.; Carfagna, C., Effect of Natural Antioxidants on the Stability of Polypropylene Films. *Polym. Degrad. Stabil.* **2009**, *94*, 2095-2100.

(24) Franco-Zavaleta, M. E.; Jiménez-Pichardo, R.; Tomasini-Campocoso, A.; Guerrero-Legarreta, I., Astaxanthin Extraction from Shrimp Wastes and its Stability in 2 Model Systems. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, C394-C399.

(25) Anarjan, N.; Tan, C., Effects of Storage Temperature, Atmosphere and Light on Chemical Stability of Astaxanthin Nanodispersions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2013**, 1-5.

(26) Yuan, C.; Jin, Z.; Xu, X.; Zhuang, H.; Shen, W., Preparation and Stability of the Inclusion Complex of Astaxanthin with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *Food Chem.* **2008**, *109*, 264-268.

(27) Schwoppe, A. D.; Till, D. E.; Ehntholt, D. J.; Sidman, K. R.; Whelan, R. H.; Schwartz, P. S.; Reid, R. C., Migration of BHT and Irganox 1010 from Low-Density Polyethylene (LDPE) to Foods and Food-Simulating Liquids. *Food Chem. Toxicol.* **1987**, *25*, 317-326.

(28) Tehrany, E. A.; Desobry, S., Partition Coefficients in Food/Packaging Systems: a Review. *Food Addit. Contam A.* **2004**, *21*, 1186-1202.

(29) Graciano-Verdugo, A. Z.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Cruz-Zárate, P.; Islas-Rubio, A. R.; Sánchez-Valdes, S.; Sánchez-Escalante, A.; González-Méndez, N.; González-Ríos, H., Migration of α -Tocopherol from LDPE Films to Corn Oil and its Effect on the Oxidative Stability. *Food Res. Int.* **2010**, *34*, 1073-1078.

(30) Peltzer, M.; Wagner, J.; Jiménez, A., Migration Study of Carvacrol as a Natural Antioxidant in High-Density Polyethylene for Active Packaging. *Food Addit. Contam A.* **2009**, *26*, 938-946.

(31) Limm, W.; Hollifield, H. C., Effects of Temperature and Mixing on Polymer Adjuvant Migration to Corn Oil and Water. *Food Addit. Contam A.* **1995**, *12*, 609-624.

(32) Granda-Restrepo, D. M.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Troncoso-Rojas, R.; Vallejo-Córdoba, B.; Gámez-Meza, N.; Graciano-Verdugo, A. Z., Migration of α -Tocopherol from an Active Multilayer Film into Whole Milk Powder. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1396-1402.

Table 1. Effect of processing on the concentration of carotenoids and astaxanthin in the films added with the marigold extract.

Film	Polymer	Carotenoids added initially in the LDPE layer	Carotenoids quantified after extrusion in the LDPE layer	Astaxanthin quantified after extrusion in the LDPE layer
		mg/g	µg/g	µg/g
MC=Monolayer Control	LDPE	0	0	0
MM=Monolayer + Marigold Extract	LDPE	1.08	647.59±41.29	188.97±15.85
BC= Bilayer Control	HDPE/LDPE	0	0	0
BM=Bilayer + Marigold Extract	HDPE/LDPE	1.34	426.22±20.30	135.82±0.16

The percentage of marigold extract incorporated to MM and BM films was 2.90 and 3.59%, respectively.¹¹ The concentration of carotenoids and astaxanthin in the marigold extract was 37.32±0.56 and 18.15±2.84 mg/g, respectively.

Table 2. Values for the alpha (α), partition ($K_{p,s}$) and diffusion (D) coefficients for the diffusion of carotenoids from MM and BM films into soybean oil at different temperatures.

T, °C	$K_{p,s}$		α		$D \times 10^{-11}$ (cm ² /s) ^a	
	MM	BM	MM	BM	MM	BM
10	179.61±13.38 ^{a,A}	293.03±16.80 ^{a,B}	0.41±0.04 ^{a,A}	0.23±0.02 ^{a,B}	—	<1.56
25	95.85±12.76 ^{b,A}	92.97±12.45 ^{b,A}	0.71±0.07 ^{a,A}	0.70±0.10 ^{b,A}	—	1.56±0.43 ^a
30	165.58±20.68 ^{a,A}	30.78±1.01 ^{c,B}	0.52±0.05 ^{a,A}	1.96±0.12 ^{c,B}	8.81-28.66	6.75±0.45 ^a
40	53.33±15.86 ^{c,A}	62.98±2.83 ^{d,B}	1.53±0.65 ^{b,A}	0.89±0.15 ^{b,A}	3.99-21.30	17.70±6.66 ^b

^aValues are expressed as the best fit values for four replicates ± standard deviations. Different superscript lower case letters within the same columns indicate statistically significant differences (p<0.05). Different superscript capital letters between columns (MM and BM) indicate statistically significant differences (p<0.05).

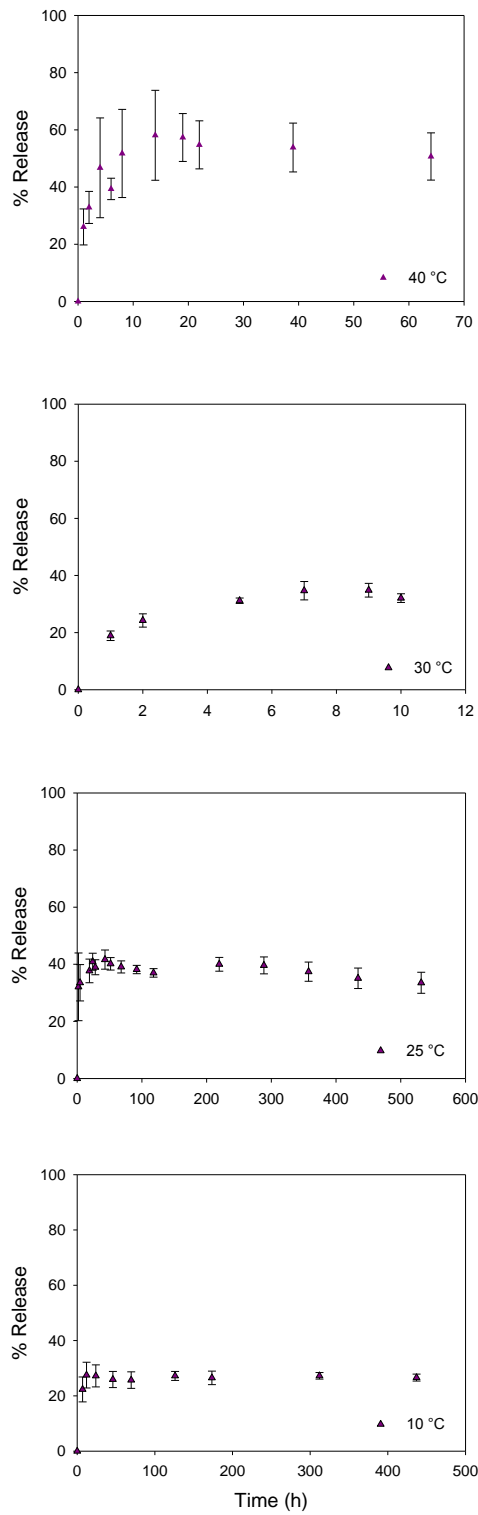


Figure 1. Carotenoids released from MM films. The graphs display the percentage of carotenoids released by weight of the LDPE in the MM films (%) vs time (h).

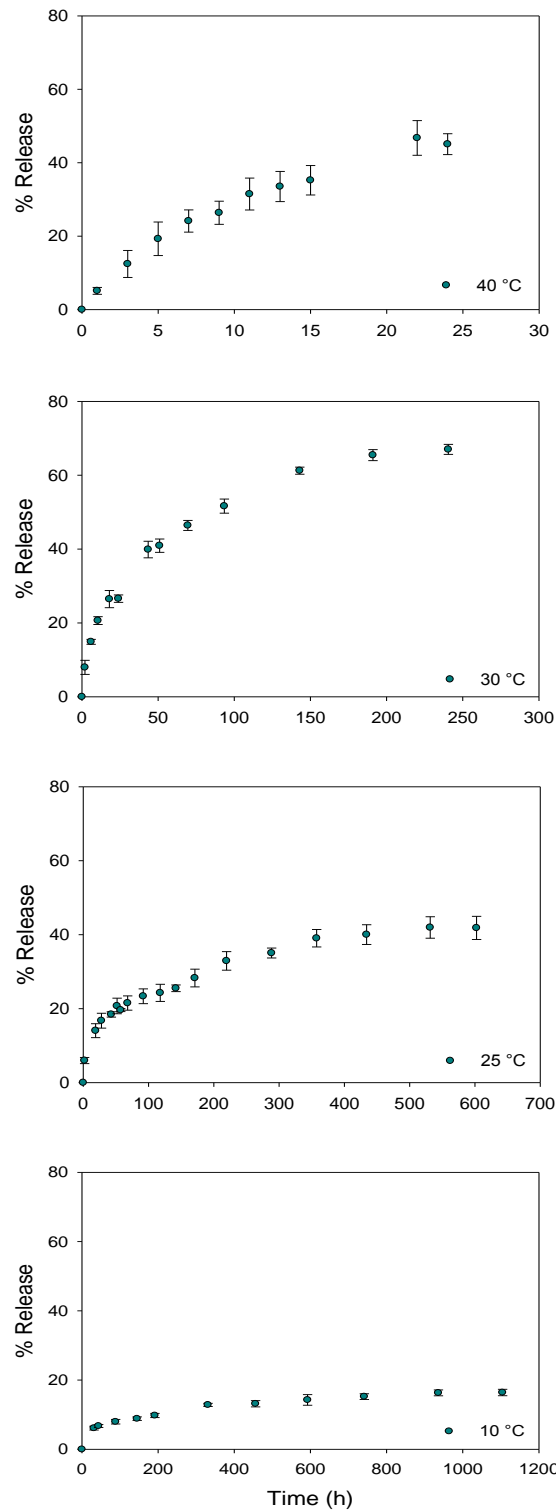


Figure 2. Carotenoids released from BM films. The graphs reveal the percentage of Carotenoids released by weight of the LDPE layer in the BM films (%) vs time (h).

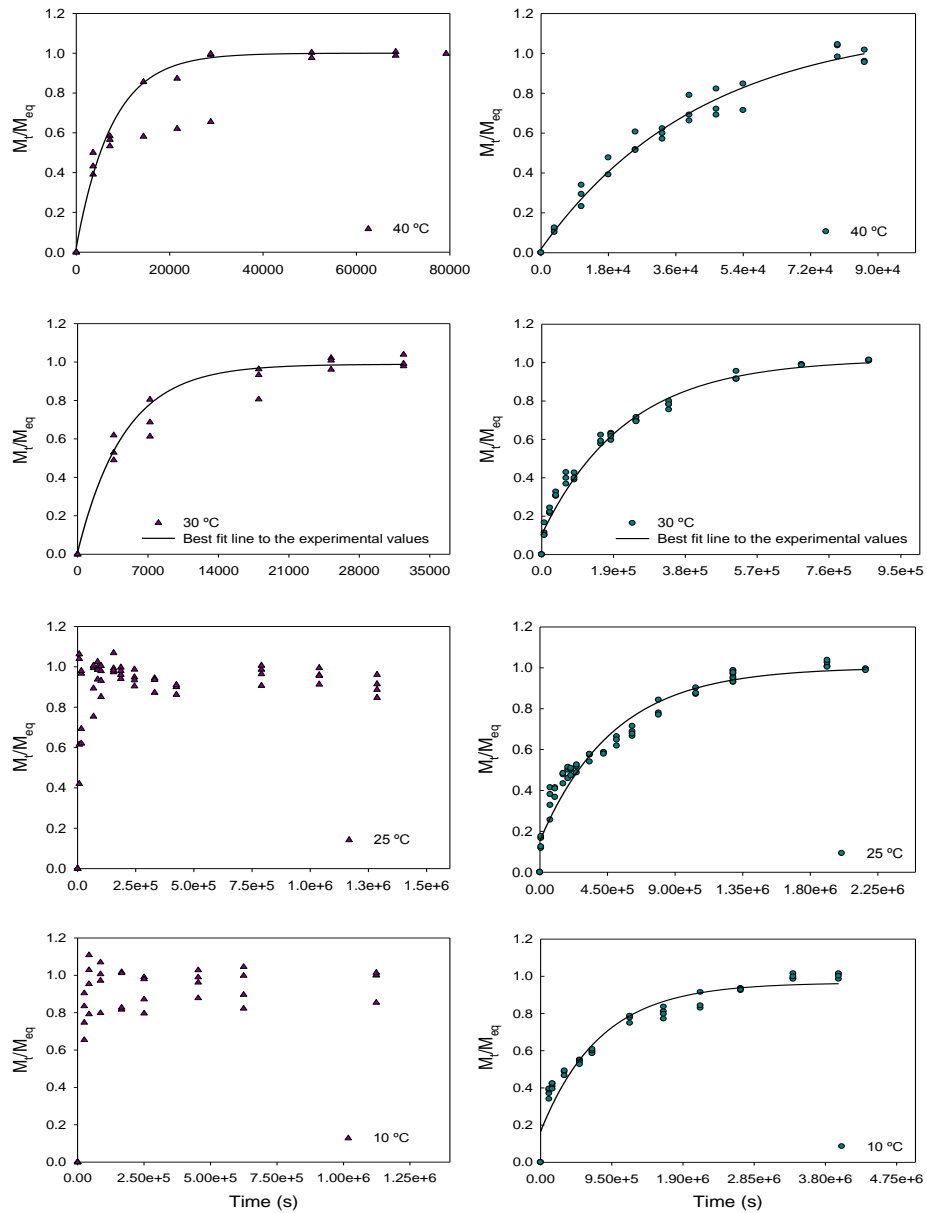


Figure 3. Diffusion of carotenoids from MM (triangles) and BM (circles) films into soybean oil at different temperatures in accordance to the second Fick's law. The y axis represents the mass of carotenoids diffused at time t divided by the mass of carotenoids diffused at equilibrium. The x axis describes t as time in s.

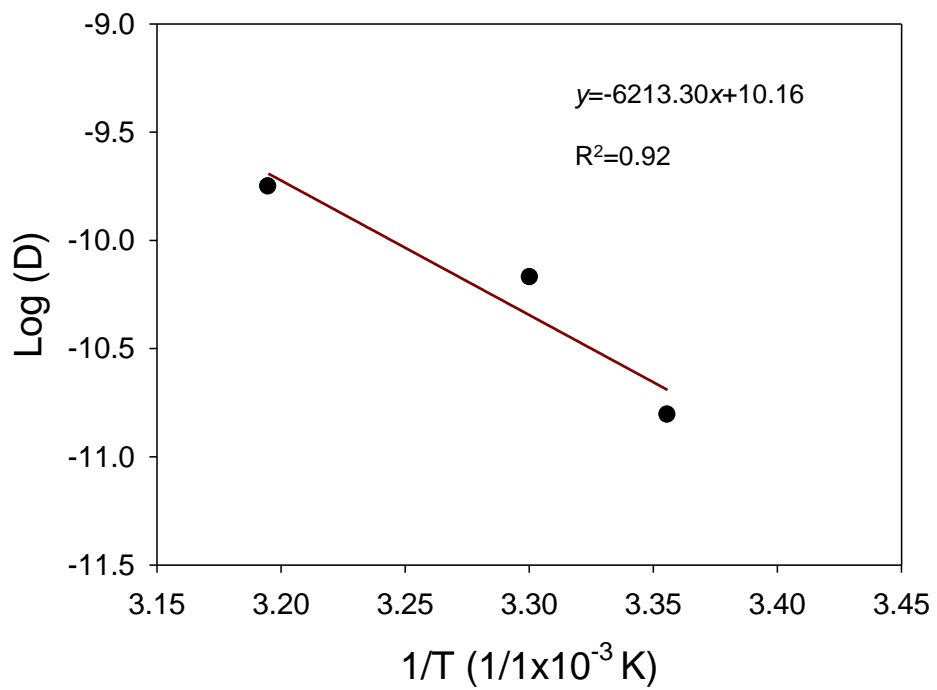


Figure 4. Activation energy (E_a) for the diffusion of carotenoids from BM films into soybean oil. The temperature ranged from 25 to 40 °C for the BM films.

CAPÍTULO IV

Películas activas antioxidantes a base de polietileno de alta densidad adicionadas con extracto de flor cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) y dióxido de titanio (TiO₂)

por

Colín-Chávez, C.; Vicente-Ramírez, E B.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E

Trabajo por enviar a *Innovative Food Science & Emerging Technologies*

Películas activas antioxidantes a base de polietileno de alta densidad adicionadas con extracto de flor cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) y dióxido de titanio (TiO₂).

Revista: Innovative Food Science & Emerging Technologies

Citlali Colín-Chávez, Erick Benjamín Vicente-Ramírez, Elizabeth Peralta, Herlinda Soto-Valdez*.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apdo. Postal 1735. Carret. a la Victoria km. 0.6. Hermosillo, Sonora 83304, México.

RESUMEN

Se elaboraron películas bicapa de polietileno de alta densidad/polietileno de alta densidad. La capa externa se adicionó con 2% de TiO₂ y la interna con 2.19% de extracto de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) como fuente natural de astaxantina. La adición de TiO₂ tuvo un efecto positivo en el control de la fotodegradación de astaxantina y el color de las películas. La cinética de degradación fue de primer orden tanto para los carotenoides como para el color. Las constantes de velocidad obtenidas fueron de -0.035 días⁻¹ (R²= 0.93) y -0.056 días⁻¹ (R²=0.84) para la degradación de astaxantina y color, respectivamente. La migración de astaxantina y de todos los carotenoides presentes en las películas tuvo un efecto positivo en el control de la oxidación lipídica de aceite de soya. Se obtuvieron coeficientes de difusión de 2.10±0.33, 2.54±0.14 y 19.26±0.80x10⁻¹¹ cm²/s a 10, 25 y 40 °C. El efecto de la temperatura en la difusión de carotenoides siguió un modelo tipo Arrhenius con una energía de activación 53.66 kJ/mol. Estos resultados muestran el potencial de extractos naturales ricos en carotenoides como ingredientes activos en el envasado de alimentos lipídicos.

Palabras clave: astaxantina, carotenoides, dióxido de titanio, polietileno, envases activos.

INTRODUCCION

Los envases activos antioxidantes son una alternativa en el control de la oxidación lipídica de los alimentos. Las funciones principales de los envases alimenticios son contener, proteger, preservar e informar.¹ Cuando además de cumplir con estas funciones el envase se le adicionan antioxidantes, los cuales se liberan al alimento o al espacio de cabeza para mejorar su funcionamiento, se convierte en un envase activo.² Si el aditivo tiene propiedades antioxidantes, el envase se conoce como envase activo antioxidante, el cual tiene como objetivo fundamental prolongar la estabilidad oxidativa del alimento y por ende prolongar su vida en anaquel.³ La investigación y desarrollo de envases activos antioxidantes va a la par con las demandas del consumidor. En la actualidad el consumidor demanda cada vez más la presencia en el mercado de alimentos naturales y saludables con reducida o nula adición de aditivos sintéticos.⁴ Ante esto, el desarrollo de envases activos antioxidantes está concentrado en el uso de antioxidantes naturales. Esta tendencia tiene dos directrices, el uso de antioxidantes puros o el uso de extractos ricos en antioxidantes. A nivel investigación se están desarrollando diferentes películas adicionadas con extractos de cacao ricos en flavonoides, aceite de albahaca, orégano y romero, ricos en terpenoides y compuestos fenólicos, así como extractos de cáscara de cebada, ricos en compuestos fenólicos.⁵⁻⁷ El uso de antioxidantes naturales está creciendo como alternativa válida en la protección de los alimentos. Esfuerzos recientes se han concentrado en la extracción, identificación y aplicación de antioxidantes naturales en forma de extractos, tal es el caso de los carotenoides como la astaxantina (Asta, Figura 1).

La Asta es un antioxidante natural y pertenece a la familia de los carotenoides. Este compuesto es el responsable del color rojo o rosa característico de los caparazones de los crustáceos, de la piel de los teleósteos, de los músculos de los salmones, ovarios de peces y bivalvos. El nombre sistemático de este carotenoide es el 3,3'-dihidroxi- β - β -caroteno-4,4'-diona, su fórmula molecular condensada es $C_{40}H_{52}O_4$ (596.9 g/mol). Existen tres formas en las cuales la Asta al igual que el resto de los carotenoides ejercen su función antioxidante: desactivando al oxígeno singlete (1O_2) desactivando estados excitados de fotosensibilizadores y neutralizando radicales libres (ceder protones, ceder electrones,

adición con radicales libres).⁸⁻¹¹ La aplicación de Asta en la conservación de alimentos comienza a diversificarse y ahora es posible utilizarla como un aditivo antioxidante en los envases activos.³ No obstante, esta molécula es susceptible a degradarse por efecto de la luz y generalmente su cinética de degradación es de primer orden.^{12, 13} Por lo tanto, a medida que se encuentren diferentes alternativas para proteger a la molécula de la luz se ampliarán sus aplicaciones.

El polietileno es el plástico más utilizado en el envasado de alimentos. Este polímero tiene una estructura simple basada en unidades $-\text{CH}_2-$. El polietileno de alta densidad (PEAD) es un polímero semicristalino, es decir, algunos de sus átomos están ordenados (regiones cristalinas) mientras que otros están desordenados (regiones amorfas). La cristalinidad del PEAD es del 90%.² Esta característica influye directamente en sus propiedades mecánicas y de transporte de masa, las cuales le proporcionan aplicaciones específicas.¹⁴ El PEAD no posee barrera a la luz, entonces los aditivos activos incorporados en su interior y los alimentos contenidos en envases de este polímero que son susceptibles a la fotodegradación prácticamente están sin protección.³ Colín-Chávez, et al.³ adicionaron extracto de flor de cempasúchil como fuente de Asta a polietileno de baja densidad (PEBD) en una película monocapa de PEBD y otra bicapa de PEAD/PEBD. Estos autores reportaron un efecto positivo de estas películas en la estabilidad oxidativa de aceite de soya. Sin embargo, el atributo antioxidante de esta molécula está limitado por su susceptibilidad a ser degradada por efecto de la luz al igual que el resto de los carotenoides.¹⁵ Ante esto es necesario buscar alternativas que eviten la fotodegradación de la Asta y le permitan ejercer su capacidad antioxidante.

El dióxido de titanio (TiO_2) es el pigmento blanco más utilizado en la industria de los plásticos. Este compuesto presenta un elevado índice de refracción en comparación con otros pigmentos blancos y además posee buena estabilidad química.¹⁶ El TiO_2 está aprobado por la FDA para usarse como aditivo alimentario. Este pigmento se ha utilizado en una amplia gama de alimentos como gomas de mascar, chocolates y repostería.¹⁷ El actuar como pigmento no es la única función que desempeña esta molécula, debido a su capacidad para absorber y reflejar la luz UV se utiliza como absorbedor o estabilizador de

luz UV en plásticos. El TiO_2 absorbe radiación a longitudes de onda $\leq 387 \text{ nm}$,¹⁸ éstas corresponden a la región ultravioleta. Esta propiedad se puede utilizar no solo para proteger al polímero sino también a todos los compuestos que intencionalmente fueron adicionados al plástico y que son susceptibles a degradarse por efecto de la luz como es el caso de los carotenoides.

El objetivo del presente trabajo fue elaborar películas bicapa activas antioxidantes a base de PEAD adicionadas con extracto de flor de cempasúchil y TiO_2 . El extracto de flor de cempasúchil se utilizó como fuente natural de Asta y el TiO_2 como agente fotoprotector del antioxidante. También se evaluó el efecto antioxidante de las películas sobre la estabilidad oxidativa de aceite de soya. Finalmente, se estudió la migración de los carotenoides presentes en las películas hacia aceite de soya.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Resina de PEAD (HD7960) obtenida de ExxonMobil Chemical (New York, USA). Extracto de flor de cempasúchil (37.33 mg/g de carotenoides y 18.15 mg/g de Asta) proporcionada por Industrias Vepinsa S.A. de C.V. (Sinaloa, México). Dióxido de titanio procedente de Dupont (Delaware, USA). Estándar de Asta (99.5% de pureza) obtenida de Alexis[®] Biochemicals (Enzo Life Science, Inc. New York, USA). Butil hidroxitolueno (BHT, 99% de pureza) de TCI América (Oregon, USA). Aceite de soya deodorizado y sin adición de antioxidantes, proporcionado por Industrializadora Oleofinos S.A. de C.V. (Zapopan, Jal, México). Acetona (Fermont, México). Todos los reactivos utilizados para la cuantificación de Asta fueron grado HPLC.

Elaboración de películas

Se elaboraron cuatro rollos de películas coextruidas bicapa de PEAD utilizando un extrusor Beutelspacher (Ciudad de México, México). Las películas se denominaron BC: PEAD/PEAD; BCD: 98% PEAD-2% TiO_2 /PEAD; BE: PEAD/97.81% PEAD-2.19% de extracto de flor cempasúchil (*Tagetes erecta* L) y BDE: 98% PEAD -2% TiO_2 /97.81%

PEAD-2.19% de extracto de flor cempasúchil (*Tagetes erecta* L.). Para el procesamiento de la capa externa las temperaturas de las zonas de la alimentación, tornillo 1, tornillo 2 y dado fueron: 120, 130, 130 y 130°C respectivamente. Para la capa interna las temperaturas de alimentación, tornillo 1, tornillo 2 y dado fueron 125, 125, 130 y 130 °C.

Extracción de Asta

La extracción de Asta y carotenoides totales en las películas se realizó colocando 0.3 g de las películas BE y BDE trituradas en 20 ml de acetona. Las muestras se mantuvieron en agitación a 40 °C por 24 h. Este proceso se repitió tres veces para lograr extraer toda la Asta y carotenoides presentes. En la segunda y tercera extracción el volumen de acetona se redujo a 5 ml. Debido a que la cantidad de Asta extraída y cuantificada era baja con respecto a lo que se había incorporado inicialmente se decidió implementar un nuevo método de extracción utilizando ultrasonido.

Para establecer las condiciones de extracción de Asta y carotenoides totales se realizaron diversos estudios preliminares. Estos estudios consistieron en realizar extracciones de 0.3 g de película BE y BDE en 10 ml de acetona. Las películas se sometieron a extracción en un baño ultrasónico (Branson Ultrasonic Cleaner, Danbury, Connecticut, USA) a 100W y 42KHz durante 105 y 75 minutos a 5 y 25 °C, respectivamente. Cada 15 min se tomaron 0.7 ml de las extracciones y se cuantificó el contenido de carotenoides totales en un espectrofotómetro (Cary 50 Bio; Varian, Victoria, Australia) a una longitud de onda de 474 nm. Debido a que la cantidad de carotenoides totales extraídos presentó un comportamiento similar en ambas temperaturas se seleccionó la temperatura de 25 °C como temperatura de extracción. A esta temperatura se repitió el experimento pero en lugar de cuantificar carotenoides totales se cuantificó el contenido de Asta por HPLC. Se realizó un experimento de recuperación para determinar si el antioxidante sufría algún tipo de degradación durante las extracciones y se encontró que se recuperaba completamente. En base a estos estudios se establecieron las siguientes condiciones de extracción: 0.3 g de película en 1.5 ml, 25 °C durante 45 minutos bajo ultrasonido (42 KHz, 100W). Las extracciones se realizaron por triplicado.

Cuantificación de Asta

La cuantificación de Asta se realizó mediante HPLC en los extractos obtenidos con ayuda de ultrasonido. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes: cromatógrafo de líquidos Varian modelo 9012 (Ciudad de México, México), detector de arreglo de diodos Varian ProStart modelo 335 (474 nm), loop de 20 μ L y columna: 2.0 x 250 mm YMCTm Carotenoid C30 (3 μ m). Fase móvil: para las películas BE se utilizó un flujo isocrático (0.30 ml/min) de 80% metanol, 16% tert-butil metil éter y 4% agua acidificada (5% ácido fórmico). En cambio para las películas BDE se utilizó un flujo isocrático compuesto de 95% de metanol y 5% de tert-butil metil éter. Se elaboraron curvas de calibración de Asta para cada fase móvil en un rango de concentraciones de 0.5 a 4 μ g /ml. El límite de cuantificación fue de 0.12 μ g/ml.

Estudio de vida de anaquel de películas activas

Rectángulos de película sencilla de BE y BDE de 10 x 6.5 cm se expusieron a una intensidad de luz (lámparas TCPHS23DL4MX, modelo EDXO-23. Aurora OH, USA) entre 594-1896 lx (luxómetro SP-840020, Neurtek Instruments, Guipuzcoa, España) a 25 °C por 52 días. Cada 4 días se muestrearon trozos de cada película para evaluar color y el contenido de Asta. Cada análisis se realizó por triplicado.

Degradación de color

En cada muestreo se evaluaron las coordenadas cromáticas (L, a*, b*) y cromaticidad (croma) de las películas utilizando un colorímetro (CR-300, Konica Minolta, México). Las mediciones se realizaron en la parte interna de ambas películas debido a que el extracto de flor de cempasúchil se adicionó en esta capa. Todas las mediciones se hicieron sobre una hoja blanca.

Degradación de Asta

En cada muestreo las películas se extrajeron con acetona y la Asta se cuantificó mediante HPLC de acuerdo a la metodología antes mencionada.

Cinética de degradación

Modelos de primer orden se han utilizado para la degradación de color y carotenoides.^{3, 19-21} Una cinética de degradación de primer orden se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\ln(C - C_{\infty}) = -kt \quad (1)$$

Tanto para la degradación de color como para la degradación de Asta se determinó la constante de velocidad (k). Para la degradación de color C es el valor de croma en las películas en cualquier tiempo, C_{∞} es el valor de croma en las películas después de que no se observan cambios en este valor (valor de croma para la película control más productos de degradación del extracto de flor de cempasúchil), k es la constante de velocidad (tiempo^{-1}) y t el tiempo. Para la degradación de Asta C es la concentración de Asta en las películas en cualquier tiempo y, considerando que al final de la exposición se degrada completamente, C_{∞} es cero.

Efecto activo de las películas antioxidantes

Para determinar el efecto activo de las películas se realizó un estudio de estabilidad oxidativa. Como sustrato oxidable se utilizó aceite de soya libre de cualquier antioxidante comercial. Se elaboraron bolsas de aproximadamente 98 cm² con las películas BC (dos pliegos de 7.0 x 7.0 cm), BDC (dos pliegos de 6.5 x 7.5 cm), BE (dos pliegos de 5.8 x 8.4 cm) y BDE (dos pliegos 6.0 x 8.2 cm). Se envasaron 40 ml (36.4 g) de aceite de soya. Las bolsas se almacenaron a 25 °C bajo una intensidad de luz en un rango entre 594-1896 lx durante 16 días. Las bolsas se rotaron y voltearon periódicamente para homologar el efecto de la iluminación. De manera periódica se tomaron muestras de aceite y se les evaluó el índice de peróxidos (IP) de acuerdo al método Cd 8b-90 AOCS.²² El *Codex Alimentarius* establece que un aceite apto para el consumo humano debe presentar un IP menor a 10 meq/kg.²³ Se calculó el % de reducción del IP expresándose como la relación entre el IP envasado con las diferentes películas (BE, BDC y BDE) y el IP del aceite envasado con las películas BC cuando este índice alcanzó los 10 meq/kg. El tiempo que tardó el aceite

envasado con las diferentes películas en llegar al valor de referencia establecido por el *Codex Alimentarius* se utilizó también para determinar el % de sinergismo entre el TiO₂ y el extracto de flor de cempasúchil mediante la siguiente relación:²⁴

$$\% \text{ Sinergismo} = \frac{(t_{BDE} - t_{BC}) - (t_{BE} - t_{BC}) - (t_{BDC} - t_{BC})}{(t_{BDE} - t_{BC})} \times 100 \quad (2)$$

En donde t es el tiempo en el cual el IP del aceite envasado en las películas BC, BE, BCD y BDE alcanzó el nivel de 10 meq/kg.

Migración de carotenoides totales desde películas activas (BDE) hacia aceite de soya

Se utilizó aceite de soya (refinado, deodorizado y libre de cualquier antioxidante comercial), el cual se mantuvo a -20 °C desde su producción para prevenir su oxidación. Para proteger al aceite y los carotenoides de degradación durante el estudio de migración se adicionó BHT (5%). Se cortaron rectángulos de película de 10.0 x 5.6 cm, después dos rectángulos se unieron mediante sellado, de tal manera que la capa interna quedó expuesta. Los rectángulos se sumergieron en 35 ml de aceite de soya en viales ámbar de 40 ml. La relación volumen área fue de 0.65 ml/cm². Esta relación está dentro del rango de 155 a 0.31 ml/cm² establecido por la ASTM D4754-9 para estudios de migración.²⁵ Los experimentos se realizaron a tres temperaturas (10, 25 y 40 °C) y con cuatro réplicas cada uno. Periódicamente se tomaron muestras del aceite (3 ml) para cuantificar carotenoides totales hasta que la concentración permaneció constante. El aceite extraído durante cada muestreo fue reemplazado por aceite puro.

Cuantificación de carotenoides totales en aceite de soya

Se utilizó un espectrofotómetro (Cary 50 Bio; Varian, Victoria, Australia) y las absorbancias de las muestras se midieron en una celda de poliestireno desechables de 4.5 cm. La longitud de onda se estableció como 463 nm.²⁶ Como blanco se utilizó aceite de soya y el contenido de carotenoides totales se expresó en equivalentes de Asta (µg/ml) usando una curva estándar preparada en aceite de soya (0.12-8.0 µg/ml de Asta).

Modelos de liberación de carotenoides

El proceso de liberación se explica por la cinética de difusión de los carotenoides en las películas y se expresa como coeficiente de difusión (D). Para determinar el D se dio seguimiento a la concentración de carotenoides en el aceite de soya y se aplicó un modelo obtenido a partir de la segunda Ley de Fick desarrollado para sistemas en los que la difusión se lleva a cabo en una sola dirección y existe un volumen limitado de película y un volumen limitado del alimento,^{27, 28}

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2 \alpha (1+\alpha)}{1+\alpha + \alpha^2 q_n^2} \exp \left\{ -\frac{D q_n^2 t}{l^2} \right\} \quad (3)$$

Donde M_t/M_∞ es la concentración de carotenoides liberados en el tiempo t dividida por la concentración de carotenoides liberados en el equilibrio, l es el espesor de la capa de PEAD que contenía el extracto y q_n corresponde a las raíces positivas no cero de $\tan q_n = \alpha q_n$ y α es

$$\alpha = \frac{V_s}{K_{p,s} V_p} \quad (4)$$

V_s y V_p son los volúmenes del aceite de soya y la capa de PEAD que contenía el extracto, respectivamente. $K_{p,s}$ es el coeficiente de partición entre la capa de PEAD y el aceite de soya, el cual a bajas concentraciones se puede asumir como constante y es calculado a partir de la relación entre la concentración de carotenoides en la capa de PEAD ($C_{p,\infty}$) y en el aceite de soya ($C_{s,\infty}$) cuando la difusión ha llegado al equilibrio.

$$K_{p,s} = \frac{C_{p,\infty}}{C_{s,\infty}} \quad (5)$$

Para ajustar los datos a la ecuación (3), se graficó M_t/M_∞ contra tiempo t . D (cm^2/s) fue calculado para cada temperaturas de estudio. Para determinar el ajuste de los datos experimentales a la Ecuación (3) se utilizó la función de regresión no lineal en MATLAB R2010b (MathWorks, Natick, MA, US).²⁹

Energía de activación (E_a) para la difusión de carotenoides totales

Para determinar el efecto de la temperatura en la difusión de carotenoides desde las películas hacia el aceite de soya se calculó la E_a usando la ecuación de Arrhenius para la difusión.

$$D = D_o \cdot e^{\left[-\frac{E_a}{RT}\right]} \quad (6)$$

En donde D es el coeficiente de difusión, D_o es el factor pre exponencial de la difusión, E_a es la energía de activación, R es la constante de los gases ideales (8.3145 J/Kmol) y T es la temperatura absoluta en Kelvin. La energía de activación se calculó a partir de la pendiente obtenida al graficar el recíproco de la temperatura vs el logaritmo de D ($E_a = -\text{pendiente} \times 2.303 \times R$).

Análisis Estadístico

Para determinar el efecto activo antioxidante de las películas sobre el aceite de soya se aplicó un diseño completamente al azar en bloques siendo el tiempo el factor de bloqueo. Por otro lado, para determinar el efecto de la temperatura sobre el $K_{p,s}$, α , y D se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA). En ambos casos se hicieron comparaciones de medias. El nivel de significancia de las pruebas fue del 0.05. El paquete estadístico utilizado fue el NCSS, año 2007.

RESULTADOS Y DISCUSION

Extracción y cuantificación de Asta en las películas

La concentración de Asta en las películas BE y BDE fue de 35.28 y 64.75 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Inicialmente a las películas se les agregó 2.19% de extracto de flor de cempasúchil en la capa interna de PEAD. Este porcentaje de extracto equivale a Asta a 396.39 $\mu\text{g/g}$ de película de Asta. Después del procesamiento se conservó el 8.90 y 16.33% de Asta, perdiéndose más del 83.67%. En general el contenido de Asta es bajo y las pérdidas coinciden con lo reportado por Colín-Chávez, et al.³ quienes reportaron una degradación de más del 64% de Asta durante la extrusión de extracto de flor de cempasúchil con PEBD. En el presente estudio se perdió más Asta que lo reportado por estos autores ya que ellos reportaron que el tiempo de procesamiento de sus películas fue de 12 min mientras que el del presente estudio fue de 15 min. Este incremento en el tiempo de procesamiento puede ser el causante del incremento en la pérdida de Asta. Sin duda las temperaturas y el tiempo de procesamiento utilizadas en la extrusión son críticas para la estabilidad de la molécula de Asta.

La exposición de la molécula de Asta a factores como el calor provoca su degradación.¹⁵
³⁰ Aunque no existe un mecanismo propuesto para la degradación térmica de Asta se piensa que al igual que otros carotenoides su exposición a un tratamiento térmico en presencia del oxígeno resulta en la formación de compuestos volátiles y no volátiles. Marty and Berset³¹ estudiaron la degradación térmica del β -caroteno en un proceso de extrusión de alimentos. Ellos encontraron que la temperatura en combinación con el mezclado mecánico provocó grandes pérdidas de antioxidante. Estos autores sugieren que la degradación se lleva a cabo por el ataque del oxígeno a las dobles ligaduras de la cadena de polieno del β -caroteno con la subsecuente formación de isómeros, derivados diepóxidos, apocarotenales y cetonas. Se ha reportado incluso que el calentamiento de extracto de flor de cempasúchil a 50 °C provoca su degradación térmica y la formación de compuestos volátiles como el tolueno y m-xileno.³² Así mismo, Rao, et al.³³ determinaron que el calentamiento de soluciones en aceite (palma y jengibre) con extracto de alga rico en Asta provoca la degradación del 75% del antioxidante después de 2 h a 150 °C. Como es posible observar, la susceptibilidad térmica de la Asta es un factor limitante para su

utilización como agente activo en tecnologías que impliquen el uso de elevadas temperaturas.

Estudio de vida de anaquel de películas activas

Color en películas

En la Figura 2 se observa una fotografía de las películas elaboradas. En el Cuadro 2 encontramos las coordenadas cromáticas, Cromo y Hue de las películas. Es importante señalar que la descripción de las películas BDE corresponden a la capa interna, capa adicionada con el extracto de flor de cempasúchil. La adición del extracto de flor de cempasúchil al PEAD provocó que la luminosidad decreciera de 91.67 ± 0.02 a 77.98 ± 0.71 en las películas BE mientras que de 94.41 ± 0.03 a 74.00 ± 0.60 en las películas BDE. La coordenada cromática a^* aumentó de 1.67 ± 0.01 a 13.00 ± 0.37 en BE y de 0.42 ± 0.01 a 26.38 ± 1.29 en BDE, en ambas películas el cambio fue en dirección de los rojos. En cuanto a la coordenada cromática b^* , se mostró un incremento de -3.76 ± 0.01 a 35.11 ± 0.49 y de -0.34 ± 0.04 a 58.68 ± 1.94 para las películas BE y BDE, respectivamente. Los cambios en la coordenada cromática b^* fueron en dirección de los amarillos. De acuerdo al ángulo Hue ambas películas presentaron un tono anaranjado para BE y BDE, siendo el tono de BDE más intenso que el de BE. Los Hue reportados para estas películas coinciden con los Hues característicos de los carotenoides, rojos, naranjas y amarillos.

Degradación de color

En la Figura 3 se muestra la cinética de degradación de croma para las películas BE y BDE. Se observó un valor inicial de croma de 37.82 ± 0.28 y 64.66 ± 2.00 para BE y BDE, respectivamente. De acuerdo a estos valores de croma, las dos películas tienen un tono naranja, pero en las películas BE el color es más apagado que en las películas BDE. Después de 20 días de almacenamiento, las películas BE perdieron el 80% de su croma y su color se volvió rojo apagado. Por otro lado, las películas BDE después de 48 días de almacenamiento perdieron el mismo porcentaje de croma y su color se volvió naranja apagado. De acuerdo a la cinética de degradación de primer orden, la degradación de croma en las películas BE presentó una k de 0.12 días^{-1} ($R^2=0.98$) mientras que en las películas BDE fue de 0.035 días^{-1} ($R^2=0.93$). La presencia del TiO_2 en la capa externa de

las películas atenuó la velocidad de degradación del color impartido por el extracto de flor de cempasúchil. Colín-Chávez, et al.³ adicionaron extracto de flor de cempasúchil a la capa de PEBD en una monocapa y otra bicapa de PEAD/PEBD. Estos autores encontraron que después de someter las películas a 697-1945 lx a 25 °C, la degradación de color obedeció una cinética de degradación de primer orden con una k de 0.25 y 0.13 días⁻¹ respectivamente. La k reportada en esta investigación para las películas BE es muy similar a la reportada por estos autores para las películas de PEAD/PEBD, mostrando que el PEAD afecta el paso de la radiación que degrada los carotenoides cuando se compara con la monocapa de PEBD. Sin embargo, fue el TiO₂ el responsable de una considerable disminución de la velocidad de degradación. En general este comportamiento en la degradación de croma concuerda con lo reportado para la pérdida de color en chabacanos deshidratados,³⁴ azafrán³⁵ y β -caroteno encapsulado en almidón.³⁶

Degradación de Asta

La Figura 4 muestra la degradación de Asta en las películas BE y BDE por efecto de la luz. Los materiales de envase protegen a los alimentos de la de fotooxidación bloqueando o reduciendo la transmisión de la luz a ciertas longitudes de onda. En la mayoría de los materiales de plástico existe una longitud de onda (*cutoff*) específica por debajo de la cuál éstos impiden completamente el paso de la luz hacia a un alimento.² En el caso del polietileno esta longitud de onda corresponde a los 180 nm. De tal manera que la Asta incorporada al PEAD quedó expuesta a longitudes de onda superiores a los 180 nm. Estas longitudes de onda pueden tener efectos adversos en la estabilidad de la molécula de este carotenoide. Las películas BE presentaron inicialmente una concentración de Asta de 35.28 ± 1.96 $\mu\text{g/g}$ de capa interna de PEAD. Después de 16 días de exposición a la luz el contenido de Asta disminuyó en un 90.93%. La cinética de degradación mostró una k de 0.16 días⁻¹ ($R^2=0.97$). Los carotenoides tienen la propiedad de absorber luz en una región visible (400 a 500 nm) del espectro electromagnético, el resto la reflejan o transmiten. Esta propiedad se atribuye a transiciones electrónicas permitidas en el sistema doble conjugado de la cadena de polieno.¹² Christophersen, et al.¹² propusieron un mecanismo para la fotodegradación de Asta en tres etapas. Primero el carotenoide absorbe la luz visible y pasa de un estado basal (S_0) a un estado excitado (S_2). Después se da un

alargamiento de los dobles enlaces del centro de la cadena de polieno del carotenoide, brindando en esta posición un carácter parcial de dirradical a la molécula. Finalmente, el dirradical reacciona con el oxígeno triplete (autooxidación). Es en esta etapa cuando la molécula del carotenoide comienza a degradarse debido a que la cadena de polieno se rompe. A la par se lleva cabo una competencia entre esta reacción y la transición electrónica del carotenoide del estado S_2 hacia un estado energético menor, S_1 o S_0 . La exposición de la molécula de Asta a la luz deriva en su degradación, lo cual limita la disponibilidad del carotenoide para su migración al alimento. La degradación de la Asta origina la formación de compuestos de peso molecular más bajo como las apoastaxantinonas (9-apoastaxantinona y 13-apoastaxantinona) y apoastaxantinales (11-apoastaxantinal), los cuales si fuesen solubles en el aceite de soya también podrían migrar hacia éste.³⁷ En la película BDE el contenido inicial de Asta fue de 64.75 ± 8.51 , el cual después de 16 días de exposición a la luz disminuyó en un 13.34%. Tuvieron que pasar 32 días para que se degradara el 82% de la Asta presente inicialmente en las películas BDE. La cinética de degradación para las películas BDE también fue de primer orden con una k de 0.056 días^{-1} ($R^2=0.84$). Como se puede observar la adición del TiO_2 no evitó la fotodegradación de los carotenoides, entre ellos la Asta. Sin embargo, retardó el tiempo en que se llevó cabo este proceso ya sea reflejando/refractando o absorbiendo la luz.^{38, 39} Entonces, la adición de TiO_2 al PEAD tuvo un efecto positivo al retardar la fotodegradación de los carotenoides, lo cual repercute directamente en el efecto antioxidante que puedan brindar estas películas.

Efecto activo de las películas antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite de soya

En la Figura 5 se observa el comportamiento del IP del aceite de soya envasado en las películas desarrolladas. El IP mostró un incremento de 1.84 ± 0.22 a 58.76 ± 1.63 , 50.58 ± 1.99 , 32.62 ± 0.78 y 19.78 ± 0.61 meq/Kg para el aceite envasado en las películas BC, BE, BDC y BDE, respectivamente, durante 16 días de almacenamiento a 25°C y 594-1896 lx. Inesperadamente, el comportamiento del IP en el aceite envasado en las películas BE y BDC fue similar en una fase inicial de 0 a 4 días, sin embargo, después de este tiempo la oxidación en cada muestra tomó una velocidad diferente. De acuerdo al *Codex*

Alimentarius, un aceite se considera apto para el consumo humano cuando su IP es menor a 10 meq/kg.²³ En los primeros 2.5 días el IP del aceite envasado con las películas BC estaba por debajo de este límite. Este tiempo de vida de anaquel es muy reducido pero se debe tener presente que el aceite estaba libre de cualquier antioxidante comercial. Entonces, el aceite estaba protegido solo por el PEAD. Este polímero no tiene buena barrera al oxígeno ni al paso de la luz (≥ 180 nm).² De tal manera que la presencia de oxígeno y la incidencia de la luz en el aceite aceleran su oxidación. Con la adición del extracto de flor de cempasúchil a las películas, el aceite tardó 3.5 días en llegar a 10 meq/kg con una disminución del IP de 26.85%. Entonces, la presencia del extracto en el PEAD brindó un día más de protección al aceite con respecto a las películas BC. Se puede asumir que al incidir la luz en las películas, una parte de la luz fue absorbida por los carotenoides presentes en las películas y como consecuencia éstos se degradaron. De los carotenoides que no se degradaron una proporción pudo haber migrado hacia el aceite de soya y otra permaneció en las películas. La luz que no fue absorbida por los carotenoides incidió en el aceite de soya y contribuyó en su oxidación. En las películas en la cuales se encontraba presente el TiO₂ (BDC) y ausente el extracto de flor de cempasúchil, el aceite tardó 4 días en llegar al IP limitante con una disminución del 37.13% del IP. Ante esto, el TiO₂ brindó un día y medio más de protección al aceite respecto a las películas BC. Entonces las películas adicionadas solamente con TiO₂ protegieron más al aceite de soya que aquellas adicionadas solamente con extracto de flor de cempasúchil. EL TiO₂ filtró el paso de la luz a longitudes de onda ≤ 387 nm, la luz que pasó a través de estas películas contribuyó a la oxidación lipídica del aceite de soya. Finalmente, en las películas adicionadas con TiO₂ y extracto de flor de cempasúchil, el aceite tardó 8 días en llegar al IP limitante con una disminución del 66.21 % del IP. Por lo tanto la combinación del TiO₂ y el extracto de flor de cempasúchil, brindó cinco días y medio de protección al aceite. Aplicando la ecuación 2 se presentó un 54.55% de sinergia entre el TiO₂ y el extracto de flor de cempasúchil. De tal manera que el TiO₂ filtró el paso de la luz protegiendo tanto a los carotenoides como al aceite. Una parte de la luz que no fue filtrada fue absorbida por los carotenoides presentes la capa interna, otra parte incidió en el aceite y contribuyó en la oxidación lipídica. Los carotenoides que no se degradaron permanecieron en las películas y pudieron migrar al aceite de soya para ejercer su función antioxidante. En

conclusión, se observó un efecto significativo de las películas BE, BDE y BDE sobre la estabilidad oxidativa de aceite de soya. Si el aceite se envasa con películas que contengan solamente extracto de flor de cempasúchil o TiO_2 se logra un incremento en la estabilidad oxidativa. Sin embargo, si el aceite se envasa con películas que contengan a estos dos elementos, el efecto en la estabilidad oxidativa es aditivo.

Migración de Carotenoides totales desde películas activas (BDE) hacia aceite de soya

Liberación de carotenoides

La Figura 6 muestra la liberación de carotenoides desde las películas BDE hacia aceite de soya a diferentes temperaturas. A 40 °C el equilibrio se logró a 25 h (1.04 d) con una liberación del 44.60% de los carotenoides. A 25 °C la liberación llegó al equilibrio después de 602.5 h (25.10 d) y se liberaron 42.17% de los carotenoides. Finalmente, a 10 °C el equilibrio se consiguió a las 1104.5 h (46.02 d), liberándose sólo el 13.42% de los carotenoides. A medida que aumenta la temperatura el tiempo en lograr el equilibrio se redujo. Colín-Chávez, et al.²⁶ reportaron que la liberación de carotenoides desde el PEBD de una película bicapa de PEAD/PEBD alcanzó el equilibrio a las 22, 191, 357 y 936 h. El tiempo en llegar al equilibrio en esta investigación se incrementó 13.00, 68.53 y 17.95% a 40, 25 y 10 °C, respectivamente. Lo anterior se debe a que el PEAD posee una cristalinidad del 90%, mientras que el PEBD de 55 a 70%.² La región cristalina del PEAD tiene un arreglo ordenado debido a que las cadenas moleculares del polietileno estas acomodadas de forma paralela y muy cercanas unas de otras. Los carotenoides no recorrieron un camino tan libre como en el PEBD para poder llegar al aceite. Aquellas moléculas que migraron recorrieron un camino tortuoso parecido a un laberinto y las que no migraron se quedaron retenidas entre las cadenas lineales que forman los cristales, sin que hubiera ramificaciones que le diera espacio libre. El porcentaje de liberación de carotenoides solo se incrementó de 10 a 25 °C. A 40 °C la liberación fue muy similar a la obtenida a 25 °C debido probablemente a la degradación de los carotenoides a estas temperaturas. Yuan, et al.⁴⁰ reportaron que a 4 °C la Asta se degradaba en un 68% en 120 h mientras que a 25 y 50 °C se degradó totalmente en 80 y 32 h, respectivamente. La degradación de los carotenoides pudo haber ocurrido en todos los experimentos de

migración. Sin embargo, no fue posible determinar el momento preciso en que esto ocurrió. En consecuencia, es necesario considerar que los coeficientes de difusión pueden estar influenciados por este fenómeno.

El porcentaje de liberación máximo de carotenoides no fue superior al 50%. Sin embargo, las diferentes concentraciones de carotenoides liberados impartieron una ligera coloración naranja en el aceite de soya. Esta coloración contrasta con la coloración amarilla de un aceite comercial de maíz. No se sabe con exactitud cuál podría ser la respuesta del consumidor ante esto. Warner y Frankel ⁴¹ indican la adición del β -caroteno a aceites y grasas procesadas para impartir una coloración amarilla en alimentos como margarinas y aceites para freír, para ensaladas y para hacer palomitas de maíz. De tal manera que el color característico del aceite de soya producto de la liberación de carotenoides podría considerarse una característica positiva para ciertos alimentos.

Coefficientes de partición

Los coeficientes de partición obtenidos en este estudio son mayores que 1 (Cuadro 3). Los coeficientes de partición son un parámetro fisicoquímico que describe la distribución de los migrantes, en este caso los carotenoides, entre dos fases en contacto en el equilibrio, PEAD/aceite de soya. $K_{p,s}$ mayores que la unidad nos indican mayor concentración de carotenoides retenidos en el PEAD con respecto a los que migraron al aceite de soya. El $K_{p,s}$ más grande se obtuvo a 10 °C y coincide con que a esta temperatura se obtuvo también el porcentaje menor de liberación. A 25 y 40 °C los $K_{p,s}$ no presentaron diferencia significativa siendo sus porcentajes de liberación muy similares. Los $K_{p,s}$ de esta investigación muestran una tendencia a decrecer con el incremento de la temperatura en un rango de 10 a 25 °C.

Coefficientes de difusión

La difusión de carotenoides mostró un comportamiento Fickiano en todas las temperaturas de estudio (Figura 7). Se obtuvieron valores de 2.10 ± 0.33 , 2.54 ± 0.14 , y $19.26 \pm 0.80 \times 10^{-11}$ cm²/s a 10, 25 y 40 °C (Cuadro 3). De acuerdo a modelos propuestos por Piringer, Dole y

Limm y Hollifield el proceso de difusión está influenciado por el tipo de polímero, peso molecular de la molécula que se difunde y la temperatura.⁴² Es bien sabido que la difusión se lleva a cabo a través de las regiones amorfas y no cristalinas de un polímero. El PEAD es un polímero con una cristalinidad de alrededor del 90%, entonces la difusión de carotenoides se llevó a cabo en las pocas regiones amorfas que presenta el PEAD. Las regiones cristalinas del polímero se convierten en barreras para la difusión de los carotenoides, los cuales para poder llegar hasta el aceite de soya tuvieron que rodear estas regiones en busca de las amorfas. Con base en esto se esperaban valores de D más bajos que los reportados para polímeros con menos cristalinidad como el PEBD. Colín-Chávez, et al.²⁶ publicaron coeficientes de difusión de $<1.56, 1.56, 6.75$ y 17.70×10^{-11} cm^2/s para la difusión de carotenoides desde la capa interna de PEBD de una película bicapa (PEAD/PEBD) hacia aceite de soya a 10, 25, 30 y 40 °C. Sin embargo, los D reportados en este trabajo fueron muy similares a los publicados por estos autores. Este comportamiento se puede atribuir a que los $K_{p,s}$ y α en ambas investigaciones fueron muy similares. En general, el orden de magnitud de los D reportados en este estudio se encontró en el orden de magnitud reportado para otros antioxidantes. Por ejemplo, Peltzer et al.,⁴³ reportaron un D de 2.08×10^{-11} cm^2/s para la difusión de carvacrol (155.22 g/mol) desde PEAD hacia aceite de oliva a 25 °C. Till, et al.⁴⁴ publicaron un D de 3.7×10^{-11} cm^2/s para la difusión de BHT (220.35 g/mol) desde PEAD hacia aceite de maíz a 40 °C. Finalmente, Lim y Hollifield⁴⁵ encontraron un D de 2.0×10^{-11} cm^2/s para Irganox-1076 (530.50 g/mol) desde PEAD hacia aceite de maíz a 50 °C. La temperatura es un factor fundamental en la difusión, teóricamente a medida que se incrementa la temperatura es mayor la velocidad de liberación de los compuestos incorporados en un polímero. De acuerdo a lo anterior se esperaba un incremento en los D a medida que la temperatura aumentaba. Sin embargo, los D obtenidos presentaron diferencias significativas solo entre 25 y 40 °C, a 25 y 10 °C no hubo diferencia significativa. Este comportamiento se ve reflejado en la E_a .

Energía de activación (E_a) para la difusión de carotenoides totales

La Figura 8 muestra la dependencia de D con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius. Con base en esta ecuación se tuvo una E_a de 53.66 kJ/mol con una R^2 de 0.79. Esta E_a nos indica que la difusión de carotenoides desde PEAD hacia aceite de soya es

poco sensible a los cambios de temperatura debido a que los coeficientes de difusión a 10 y 25 °C fueron muy similares. La E_a depende siempre del rango de temperatura evaluado y si el objetivo de obtener un valor de E_a es predecir valores de D entonces solo es aplicable en este rango de temperaturas. Granda-Restrepo, et al. ⁴⁶ obtuvieron una E_a de 11.3 kJ/mol para la difusión de α -tocoferol desde PEBD hacia leche en polvo en un rango de temperatura de 20 a 40 °C, encontrando poco efecto de la temperatura en la difusión. Por otro lado, Graciano-Verdugo, et al. ⁴⁷ reportaron valores de E_a de 126.5 y 105.9 kJ/mol para la difusión también de α -tocoferol desde PEBD hacia aceite de soya en un rango de temperaturas de 5 a 30 °C. En el presente trabajo, la temperatura tiene un efecto moderado en la difusión de carotenoides en un rango que representa condiciones de transporte, almacenamiento y comercialización de alimentos en regiones con clima frío, templado y caliente. En consecuencia, con estas películas es posible envasar alimentos que pueden ser almacenados en el rango considerado de temperaturas sin el riesgo de que se interrumpa la liberación de carotenoides.

CONCLUSIONES

La adición de TiO_2 al PEAD contribuyó a disminuir la velocidad de fotodegradación de la Asta y color (impartido por los carotenoides) de las películas bajo condiciones de almacenamiento comercial. Además, el TiO_2 mostró sinergia con los carotenoides, entre ellos la Asta, presentes en las películas incrementando considerablemente la estabilidad oxidativa del aceite de soya. La difusión de carotenoides desde PEAD hacia aceite de soya presentó un comportamiento de acuerdo a la 2ª ley de Fick en un rango de temperatura de 10-40 °C. La difusión de carotenoides mostró una dependencia moderada en la temperatura. Estos resultados muestran el potencial de extractos naturales ricos en carotenoides como ingredientes activos en el envasado de alimentos lipídicos y puede ser extrapolado a otras áreas como la industria farmacéutica y cosmética.

REFERENCIAS

- (1) Marsh, K.; Bugusu, B., Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science*. **2007**, *72*, R39-R55.
- (2) Robertson, G. L., *Food Packaging: Principles and Practice*. 3rd ed.; CRC press: United States of America, 2012; p 703.
- (3) Colín-Chávez, C.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Lizardi-Mendoza, J.; Balandrán-Quintana, R. R., Fabrication and Properties of Antioxidant Polyethylene-based Films Containing Marigold (*Tagetes erecta*) Extract and Application on Soybean Oil Stability. *Packag. Technol. Sci.* **2012**, DOI:10.1002/pts.1982.
- (4) Markarian, J., Consumer Demands Push Growth in Additives for Active Packaging. *Plastics Additives and Compounding*. **2006**, *8*, 30-33.
- (5) Calatayud, M.; López-de-Dicastillo, C.; López-Carballo, G.; Vélez, D.; Muñoz, P. H.; Gavara, R., Active Films Based on Cocoa Extract with Antioxidant, Antimicrobial and Biological Applications. *Food Chem.* **2013**.
- (6) Pereira de Abreu, D. A.; Paseiro Losada, P.; Maroto, J.; Cruz, J. M., Evaluation of the Effectiveness of a New Active Packaging film Containing Natural Antioxidants (from Barley Husks) that Retard Lipid Damage in Frozen Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*). *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1277-1282.
- (7) Licciardello, F.; Muratore, G.; Mercea, P.; Tosa, V.; Nerin, C., Diffusional Behaviour of Essential Oil Components in Active Packaging Polypropylene Films by Multiple Headspace Solid Phase Microextraction–Gas Chromatography. *Packaging Technology and Science*. **2012**.
- (8) Choe, E.; Min, D. B., Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2009**, *8*, 345-358.
- (9) Britton, G., Functions of Intact Carotenoids. In *Carotenoids*, Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., Eds. Birkhäuser Basel: 2008; Vol. 4, pp 189-212.
- (10) Stahl, W.; Sies, H., Physical Quenching of Singlet Oxygen and cis-trans Isomerization of Carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1993**, *691*, 10-19.
- (11) Skibsted, L. H., Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, *60*, 2409-2417.
- (12) Christophersen, A.; Jun, H.; Jørgensen, K.; Skibsted, L., Photobleaching of astaxanthin and canthaxanthin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. **1991**, *192*, 433-439.
- (13) Niamnuy, C.; Devahastin, S.; Soponronnarit, S.; Vijaya Raghavan, G. S., Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage. *Journal of Food Engineering*. **2008**, *87*, 591-600.
- (14) Hernandez, R. J.; Selke, S. E.; Culter, J. D., *Plastics packaging: properties, processing, applications, and regulations*. Hanser Munich, Germany: 2000.
- (15) Boon, C. S.; McClements, D. J.; Weiss, J.; Decker, E. A., Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 515-532.
- (16) Man, C.; Zhang, C.; Liu, Y.; Wang, W.; Ren, W.; Jiang, L.; Reisdorffer, F.; Nguyen, T. P.; Dan, Y., Poly (lactic acid)/titanium dioxide composites: Preparation and performance under ultraviolet irradiation. *Polymer Degradation and Stability*. **2012**, *97*, 856-862.

- (17) Weir, A.; Westerhoff, P.; Fabricius, L.; Hristovski, K.; von Goetz, N., Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environmental Science & Technology*. **2012**, *46*, 2242-2250.
- (18) Hong, X.; Wang, Z.; Cai, W.; Lu, F.; Zhang, J.; Yang, Y.; Ma, N.; Liu, Y., Visible-Light-Activated Nanoparticle Photocatalyst of Iodine-Doped Titanium Dioxide. *Chem Mater*. **2005**, *17*, 1548-1552.
- (19) Chutintrasri, B.; Noomhorm, A., Color degradation kinetics of pineapple puree during thermal processing. *LWT - Food Science and Technology*. **2007**, *40*, 300-306.
- (20) Villalobos-Castillejos, F.; Cerezal-Mezquita, P.; Hernández-De Jesús, M. L.; Barragán-Huerta, B. E., Production and stability of water-dispersible astaxanthin oleoresin from *Phaffia rhodozyma*. *International Journal of Food Science & Technology*. **2013**, *48*, 1243-1251.
- (21) Saxena, A.; Maity, T.; Raju, P. S.; Bawa, A. S., Degradation Kinetics of Colour and Total Carotenoids in Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Bulb Slices During Hot Air Drying. *Food and Bioprocess Technology*. **2012**, *5*, 672-679.
- (22) AOCS, Peroxide Value Acetic Acid-Isooctane Method. Method Cd 8b-90. AOCS Press. **2009**.
- (23) Alimentarius, C., Codex standard for named vegetable oils. *Codex Stan*. **1999**, *210*, 1999.
- (24) Hraš, A. R.; Hadolin, M.; Knez, Ž.; Bauman, D., Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*. **2000**, *71*, 229-233.
- (25) ASTM Standard D4754, Standard Test Method for Two-Sided Liquid Extraction of Plastic Materials Using FDA Migration Cell. ASTM International: West Conshohocken, PA, United States of America, 2011.
- (26) Colín-Chávez, C.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E., Diffusion of Carotenoids from Bilayer Polyethylene Active Packaging Films into Soybean Oil. *J Agr Food Chem*. **2013**.
- (27) Crank, J., *The Mathematics of Diffusion*. 2nd ed.; Oxford University: Great Britain, 1975; p 414.
- (28) Iñiguez-Franco, F.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Ayala-Zavala, J. F.; Auras, R.; Gámez-Meza, N., Antioxidant Activity and Diffusion of Catechin and Epicatechin from Antioxidant Active Films Made of Poly(l-lactic acid). *J. Agr. Food Chem*. **2012**, *60*, 6515-6523.
- (29) Manzanarez-López, F.; Soto-Valdez, H.; Auras, R.; Peralta, E., Release of α -Tocopherol from Poly(Lactic Acid) Films, and its Effect on the Oxidative Stability of Soybean Oil. *J. Food Eng*. **2011**, *104*, 508-517.
- (30) Tachaprutinun, A.; Udomsup, T.; Luadthong, C.; Wanichwecharungruang, S., Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. **2009**, *374*, 119-124.
- (31) Marty, C.; Berset, C., Factors affecting the thermal degradation of all-trans- β -carotene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1990**, *38*, 1063-1067.
- (32) Rios, J. J.; Fernández-García, E.; Mínguez-Mosquera, M. I.; Pérez-Gálvez, A., Description of volatile compounds generated by the degradation of carotenoids in paprika, tomato and marigold oleoresins. *Food Chemistry*. **2008**, *106*, 1145-1153.
- (33) Rao, A. R.; Sarada, R.; Ravishankar, G. A., Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2007**, *87*, 957-965.

- (34) Fratianni, A.; Albanese, D.; Mignogna, R.; Cinquanta, L.; Panfili, G.; Matteo, M., Degradation of Carotenoids in Apricot (*Prunus armeniaca* L.) During Drying Process. *Plant Foods for Human Nutrition*. **2013**, 1-6.
- (35) Selim, K.; Tsimidou, M.; Biliaderis, C. G., Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. *Food Chemistry*. **2000**, *71*, 199-206.
- (36) Spada, J. C.; Noreña, C. P. Z.; Marczak, L. D. F.; Tessaro, I. C., Study on the stability of β -carotene microencapsulated with pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch. *Carbohydrate Polymers*. **2012**, *89*, 1166-1173.
- (37) Etoh, H.; Suhara, M.; Tokuyama, S.; Kato, H.; Nakahigashi, R.; Maejima, Y.; Ishikura, M.; Terada, Y.; Maoka, T., Auto-Oxidation Products of Astaxanthin. *Journal of Oleo Science*. **2012**, *61*, 17-21.
- (38) Lahtinen, K.; Maydannik, P.; Seppänen, T.; Cameron, D. C.; Johansson, P.; Kotkamo, S.; Kuusipalo, J., Protecting BOPP film from UV degradation with an atomic layer deposited titanium oxide surface coating. *Applied Surface Science*.
- (39) Yang, H.; Zhu, S.; Pan, N., Studying the mechanisms of titanium dioxide as ultraviolet-blocking additive for films and fabrics by an improved scheme. *Journal of Applied Polymer Science*. **2004**, *92*, 3201-3210.
- (40) Yuan, C.; Jin, Z.; Xu, X.; Zhuang, H.; Shen, W., Preparation and Stability of the Inclusion Complex of Astaxanthin with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *Food Chem*. **2008**, *109*, 264-268.
- (41) Warner, K.; Frankel, E. N., Effects of β -Carotene on Light Stability of Soybean Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1987**, *64*, 213-218.
- (42) Pinte, J.; Joly, C.; Dole, P.; Feigenbaum, A., Diffusion of homologous model migrants in rubbery polystyrene: molar mass dependence and activation energy of diffusion. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2010**, *27*, 557-566.
- (43) Peltzer, M.; Wagner, J.; Jiménez, A., Migration Study of Carvacrol as a Natural Antioxidant in High-Density Polyethylene for Active Packaging. *Food Addit. Contam A*. **2009**, *26*, 938-946.
- (44) Till, D. E.; Ehntholt, D. J.; Reid, R. C.; Schwartz, P. S.; Sidman, K. R.; Schwope, A. D.; Whelan, R. H., Migration of BHT antioxidant from high density polyethylene to foods and food simulants. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*. **1982**, *21*, 106-113.
- (45) Limm, W.; Hollifield, H. C., Effects of Temperature and Mixing on Polymer Adjuvant Migration to Corn Oil and Water. *Food Addit. Contam A*. **1995**, *12*, 609-624.
- (46) Granda-Restrepo, D. M.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Troncoso-Rojas, R.; Vallejo-Córdoba, B.; Gámez-Meza, N.; Graciano-Verdugo, A. Z., Migration of α -Tocopherol from an Active Multilayer Film into Whole Milk Powder. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1396-1402.
- (47) Graciano-Verdugo, A. Z.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Cruz-Zárate, P.; Islas-Rubio, A. R.; Sánchez-Valdes, S.; Sánchez-Escalante, A.; González-Méndez, N.; González-Ríos, H., Migration of α -Tocopherol from LDPE Films to Corn Oil and its Effect on the Oxidative Stability. *Food Research International*. **2010**, *34*, 1073-1078.

Cuadro 1. Coordenadas cromáticas, Croma y Hue de películas

Película	L	a*	b*	Croma (C)	Hue (h)
BC	91.67 ± 0.02	1.67±0.01	-3.76±0.01	4.16 ± 0.01	294.05 ± 0.21
BCD	94.41 ± 0.03	0.42±0.01	-0.34±0.04	0.64 ± 0.04	315.95 ± 1.63
BE	77.98 ± 0.71	13.00±0.37	35.11±0.49	37.82 ± 0.28	69.70 ± 0.85
BDE	74.00 ± 0.60	26.38±1.29	58.68±1.94	64.66 ± 2.00	65.80 ± 0.28

Media ± desviación estándar de tres repeticiones.

Cuadro 2. Coeficientes de partición ($K_{p,s}$), alfa (α) y coeficientes de difusión (D) de carotenoides en películas de BDE y aceite de soya.

T, °C	$K_{p,s}$	α	$D \times 10^{-11}, \text{cm}^2/\text{s}$
10	342.72±4.31 ^a	0.18±0.01 ^a	2.10±0.33 ^a
25	71.82±7.27 ^b	0.73±0.04 ^b	2.54±0.14 ^a
40	78.20±13.05 ^b	0.81±0.12 ^b	19.26±0.80 ^b

Media ± desviación estándar de dos repeticiones.

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$).

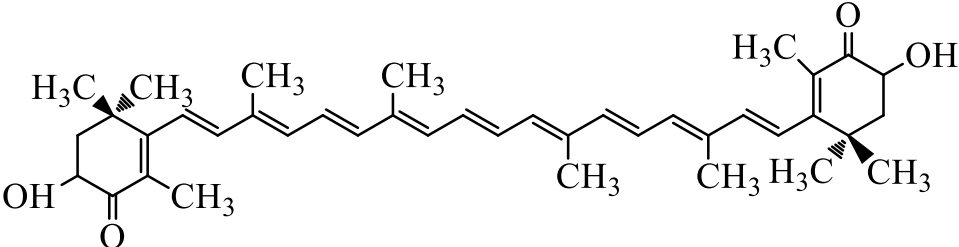


Figura 1. Estructura de astaxantina.

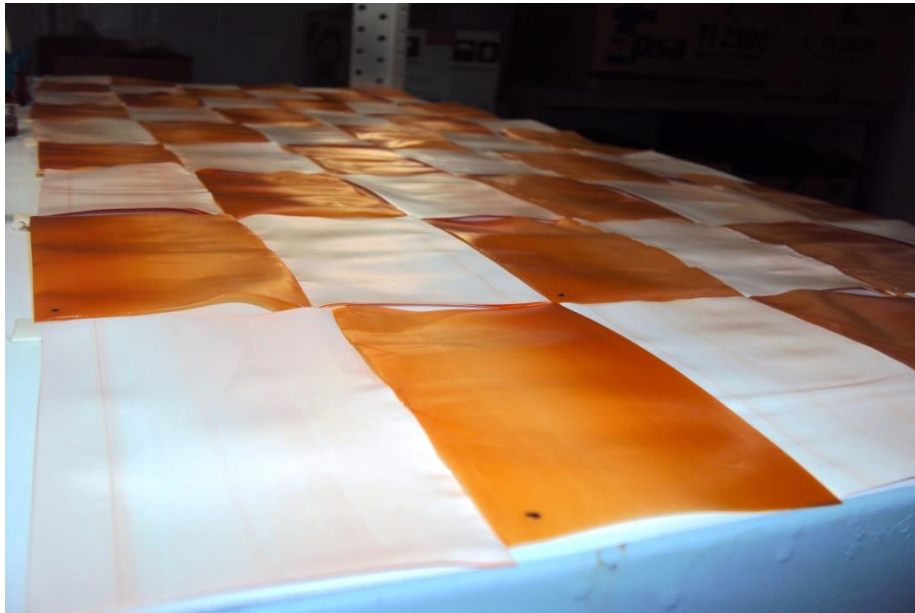


Figura 2. Películas BE y BDE expuestas a 594-1896 lx y 25°C, día 0. Tomando como referencia la primera fila de las películas, las películas BE son el segundo pliego (naranja) de película y el primero corresponde a las películas BDE (blancas).

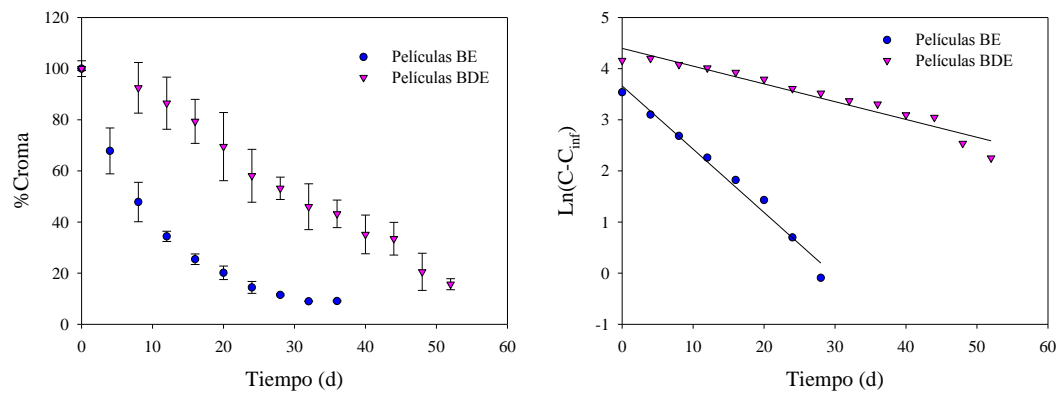


Figura 3. Cinética de degradación de color en películas BE y BDE almacenadas a 25 °C y expuestas a 594-1896 lx.

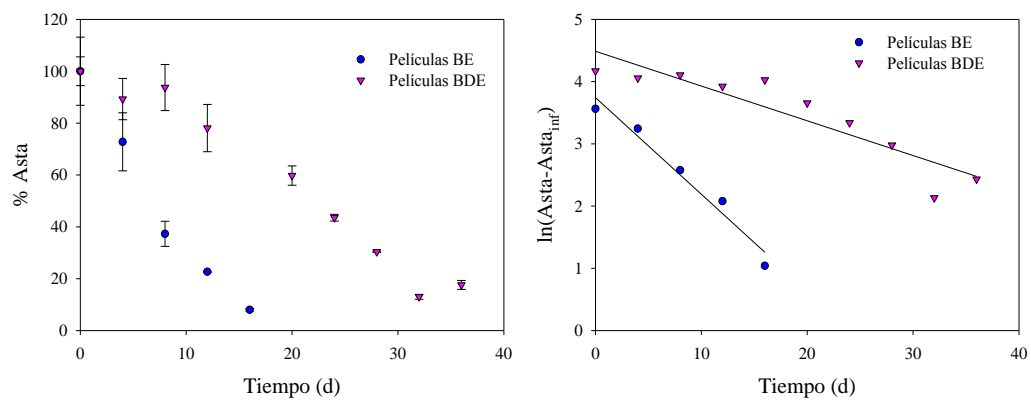


Figura 4. Cinética de degradación de Asta en películas BE y BDE almacenados a 25 °C y expuestas a 594-1896 lx.

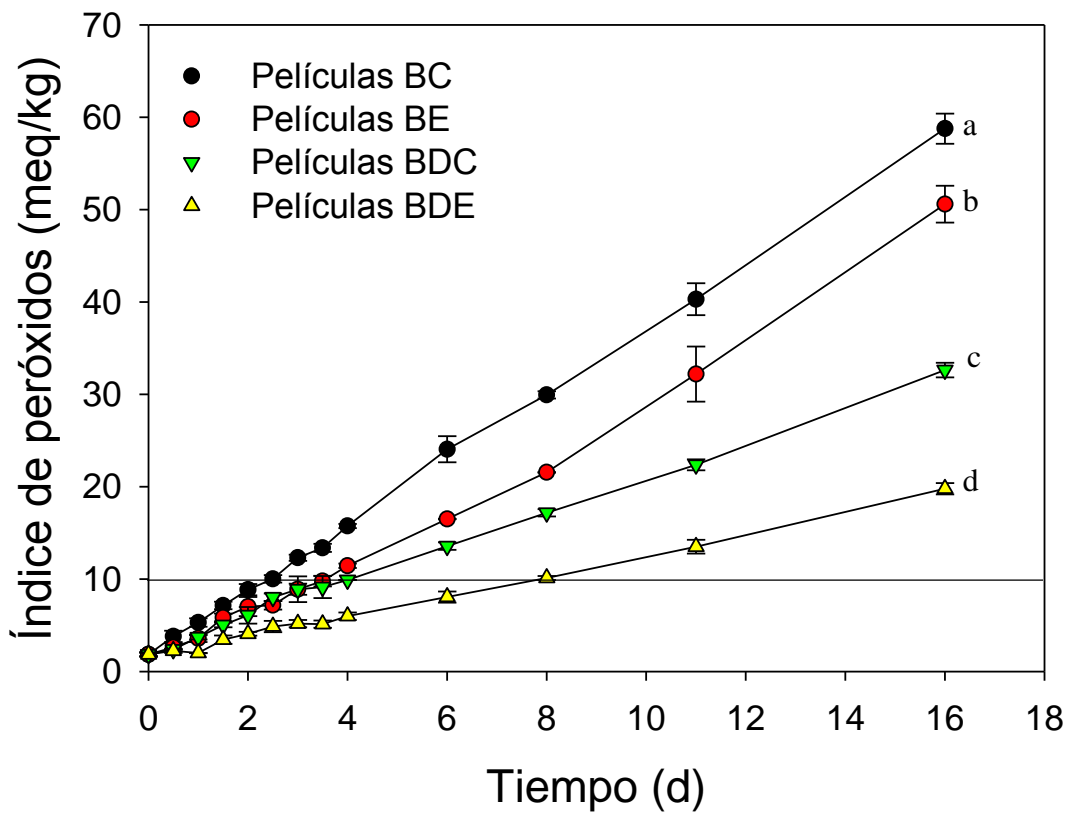


Figura 5. Cambios en el índice de peróxidos de aceite de soya envasado en las películas BC, BE, BDC y BDE. El aceite se almacenó a 25 °C con 594-1896 lx de iluminación. Diferente literal indica diferencias ($p < 0.05$).

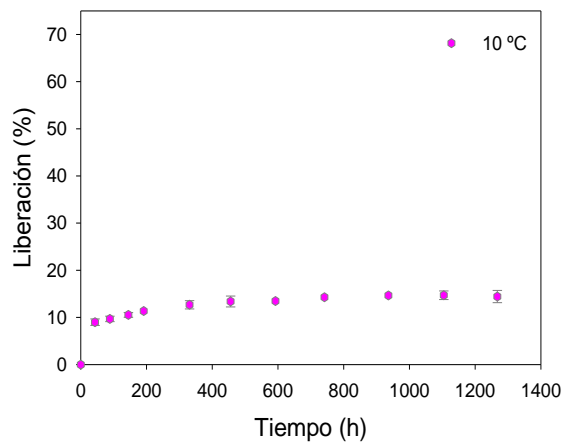
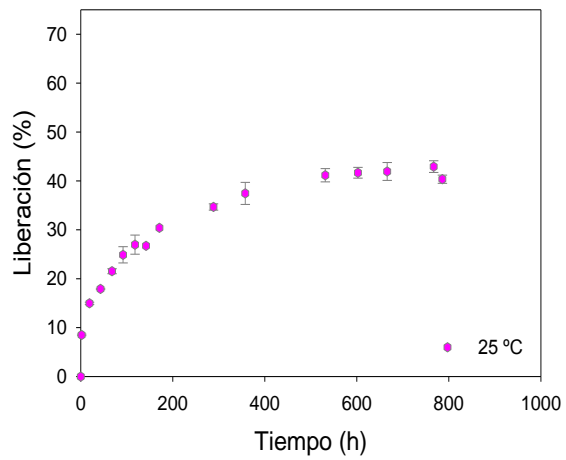
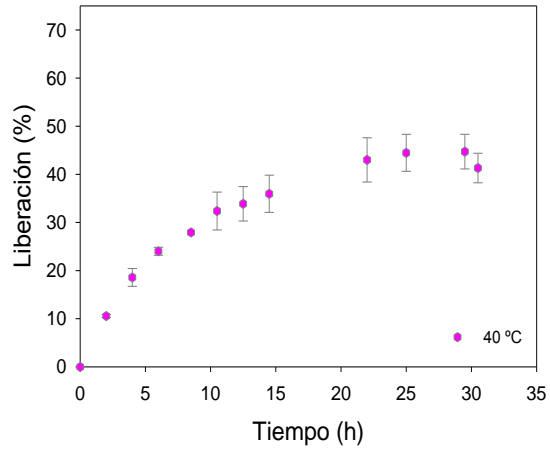


Figura 6. Liberación de carotenoides desde las películas BDE. Las gráficas muestran el porcentaje de carotenoides liberados por peso de capa interna de PEAD en las películas BDE (%) vs tiempo (h).

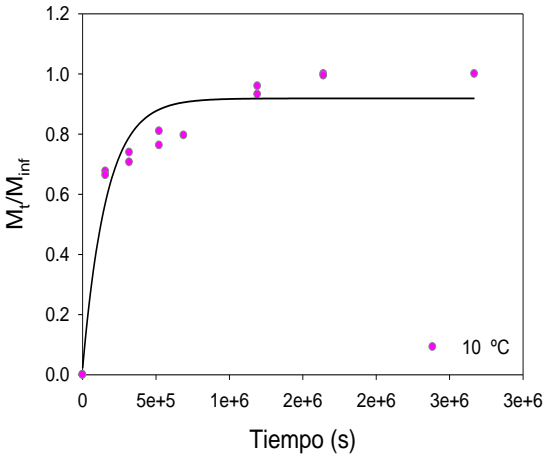
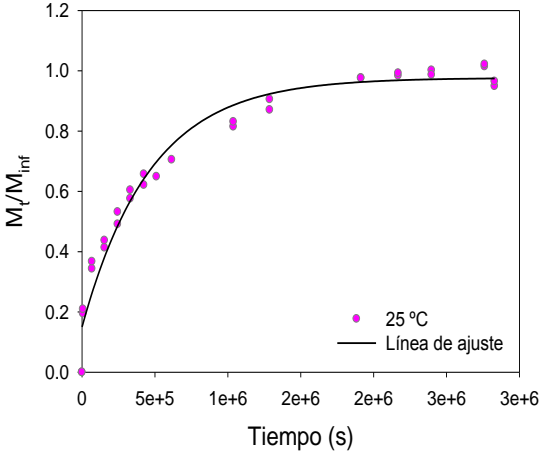
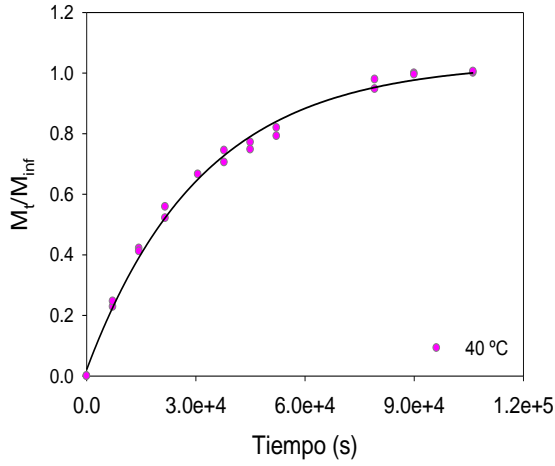


Figura 7. Difusión de carotenoides desde las películas BDE hacia aceite de soya a diferentes temperaturas de acuerdo a la segunda ley de Fick. El eje de las y muestra la masa de carotenoides difundida en el tiempo t dividida por la masa de carotenoides difundida al equilibrio. El eje de las x muestra el tiempo t en segundos (s).

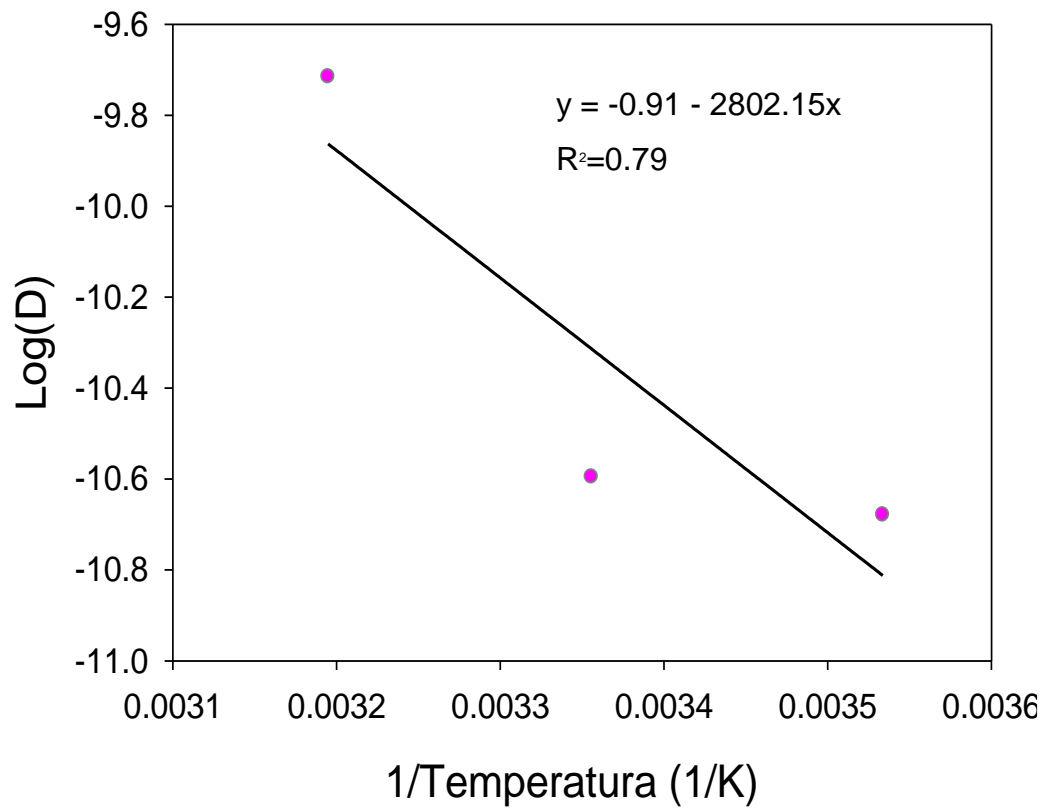


Figura 8. Energía de activación (E_a) para la difusión de carotenoides desde las películas BDE hacia aceite de soya en un rango de temperatura de 10 a 40 °C. La pendiente de la recta es igual a $-E_a/2.303R$

DISCUSIÓN GLOBAL

Durante el procesamiento de las películas monocapa de PEBD y bicapa coextruidas con PEAD con 2.90 y 3.59% de extracto de flor de cempasúchil se degradó más del 64% de la astaxantina incorporada inicialmente en las películas. Lo anterior evidenció la susceptibilidad del carotenoide a ser degradado por efecto de la temperatura utilizada durante la extrusión. Por otro lado, las propiedades espectroscópicas y ópticas fueron las más afectadas por la presencia del extracto de flor de cempasúchil presentando un color amarillo-naranja característico de los carotenoides. Durante el estudio de vida de anaquel de las películas en condiciones de almacenamiento comercial (25 °C y bajo iluminación), estas presentaron susceptibilidad a ser degradadas por efecto de la luz y perdieron su color a los 13 (monocapa) y 20 días (bicapa) de almacenamiento. Esta característica resultó ser una limitante para su aplicación como material de envase. Aun así, las películas presentaron un efecto positivo sobre el control de la oxidación lipídica de aceite de soya almacenado bajo iluminación. El efecto activo de las películas puso de manifiesto la migración de los componentes del extracto de flor de cempasúchil desde las películas hacia el aceite de soya, entre los que se encontraba presente la astaxantina. Sin embargo, ésta no se encontraba sola sino acompañada de más carotenoides que, en conjunto, al migrar al aceite de soya ejercieron su función antioxidante y protegieron al aceite.

Para confirmar la liberación de compuestos activos de las películas, se realizaron estudios de migración de astaxantina hacia etanol al 95% y de carotenoides hacia aceite de soya. Se obtuvieron coeficientes de difusión con un orden de magnitud en el rango reportado para otros antioxidantes incorporados a polietileno, presentando ambos una cinética de difusión de acuerdo a la segunda ley de Fick. Se esperaba que la cinética de difusión y los parámetros derivados de ésta fuesen muy similares entre ambas películas. No obstante, se

observó que la coextrusión de la capa de PEAD modificó la liberación de los compuestos, limitando la cantidad de astaxantina o carotenoides disponibles para migrar y volvió más gradual la liberación.

Con base en los resultados anteriores, se decidió rediseñar los envases elaborando una nueva película en la cual el extracto de flor de cempasúchil estuviera protegido de la luz. Además, se deseaba que el extracto se liberara de forma más gradual hacia el aceite de soya para así brindar protección por más tiempo. De acuerdo a esto se elaboró una película bicapa a base de polietileno de alta densidad (PEAD/PEAD). En la capa externa se adicionó TiO_2 como barrera al paso de la luz y en la capa interna se incorporó el extracto de flor de cempasúchil. La presencia del TiO_2 cumplió su objetivo porque retardó la velocidad de degradación del color en las películas. Sin embargo, es necesario buscar diferentes alternativas para el almacenamiento de las películas a fin de evitar la degradación de su color. El cambio de polímero base logró una liberación más gradual del extracto de flor de cempasúchil, que, en sinergia con el TiO_2 , brindó mayor estabilidad oxidativa al aceite de soya.

Con respecto al efecto de la temperatura en la migración de astaxantina y carotenoides, los estudios de migración de esta investigación se realizaron a temperaturas que representan condiciones reales de distribución almacenamiento y comercialización de alimentos en regiones con climas fríos, templados y calientes. Así, por medio del cálculo de las energías de activación de la difusión se descubrió que la temperatura presentaba un efecto moderado sobre este proceso. Estos resultados implican que al envasar alimentos en envases fabricados con las películas bicapa desarrollados y sometidos a fluctuaciones de temperaturas típicas para climas de templados a cálidos, no existe el riesgo de que la difusión de astaxantina y carotenoides se interrumpa y el alimento quede sin protección.

CONCLUSIONES

Se logró fabricar mediante el proceso de extrusión soplo películas monocapa de PEBD y bicapa de PEAD/PEBD adicionadas con extracto de flor de cempasúchil como fuente natural de carotenoides y en especial de astaxantina. La resistencia a la tensión y al rasgado fueron las propiedades mecánicas que se afectaron negativamente por la presencia del extracto en las películas bicapa. La adición del extracto en las películas afectó también las propiedades ópticas y espectroscópicas con una coloración amarillo-naranja y absorbiendo luz de 400 a 550 nm, lo cual protege alimentos susceptibles a degradarse por efecto de la luz. El extracto incorporado a ambas películas resultó ser susceptible a la degradación por efecto de la luz. No obstante, ambas películas impartieron estabilidad oxidativa a aceite de soya en condiciones de comercialización.

Las películas mono y bicapa liberaron astaxantina hacia etanol al 95% y carotenoides totales hacia aceite de soya. La migración de astaxantina y carotenoides se llevó a cabo por un proceso de difusión molecular acorde a la segunda ley de Fick en rangos específicos de temperatura. La temperatura tuvo un efecto moderado en la difusión de astaxantina y carotenoides en las películas elaboradas siguiendo un modelo tipo Arrhenius.

La fabricación de películas coextruidas con dos capas de polietileno permitió la liberación de astaxantina y carotenoides totales en un rango más amplio de temperatura que las películas monocapa revelando la importancia de considerar las propiedades de cada capa en el diseño de películas multicapa destinadas para envases activos.

La adición de TiO_2 a PEAD provocó una disminución en la velocidad de degradación de la astaxantina y en la pérdida de color de las películas. Aunado a lo anterior, la sinergia

desarrollada con el extracto de flor de cempasúchil brindó mayor estabilidad oxidativa al aceite de soya.

Debido a que la temperatura tuvo un efecto moderado en la difusión de astaxantina y carotenoides en un rango que representa condiciones de transporte, almacenamiento y comercialización de alimentos en regiones con clima frío, templado y caliente, existe un potencial del extracto de flor de cempasúchil como compuesto activo en envases activos antioxidantes para alimentos grasos. En consecuencia, con estas películas es posible fabricar envases para alimentos que pueden ser manejados sin el riesgo de que fluctuaciones en temperatura interrumpan la liberación de astaxantina/carotenoides.

RECOMENDACIONES

Buscar diferentes alternativas que disminuyan la degradación térmica de los carotenoides y la astaxantina durante los procesos de extrusión/coextrusión.

Implementar otros aditivos o tecnologías que disminuyan la fotodegradación durante el almacenamiento comercial de las películas.

Hacer una caracterización profunda del extracto de flor de cempasúchil que incluya la composición química y la identificación de otros carotenoides.

Rediseñar las películas variando la relación de los espesores tanto del PEAD como del PEBD y evaluar el efecto en el proceso de migración.

Realizar más estudios de difusión en películas bicapa que ayuden a explicar cómo la presencia de un polímero de la misma naturaleza puede influir en la liberación de carotenoides.

Diseñar los materiales con extractos ricos en carotenoides utilizando otros polímeros, incluyendo aquellos utilizados en envases rígidos.

Incluir en la formulación de las películas aditivos que ayuden a incrementar el porcentaje de liberación de carotenoides en las películas bicapa.