



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO, A.C.**

“DIFUSIÓN DE RUTINA Y SUS PRODUCTOS DE DESCOMPOSICIÓN EN
UNA PELÍCULA DE ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA) HACIA SIMULANTES DE
ALIMENTOS”

POR:
JOHANA MARILÚ CRUZ ZÚÑIGA

TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN VEGETAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA.

SEPTIEMBRE DE 2011.

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la IBQ. Johana Marilú Cruz Zúñiga la han encontrado satisfactoria y recomienda que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



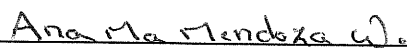
Dra. Herlinda Soto Valdez

Directora de Tesis



MG. Elizabeth Peralta

Asesora



Dra. Ana María Mendoza Wilson

Asesora



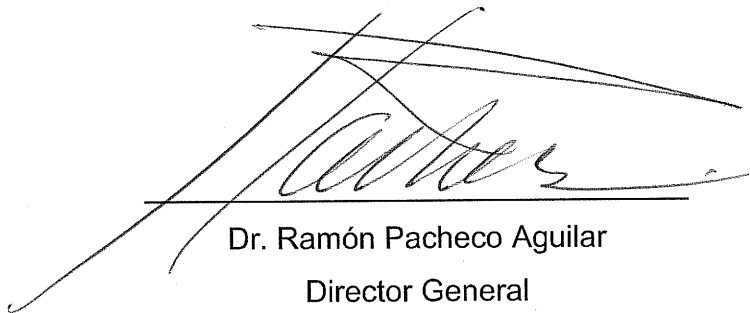
Dra. Nohemí Gámez Meza

Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, AC).

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



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.** (CIAD) por brindarme la oportunidad de continuar en mi formación académica y desarrollo profesional.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa en especial al **MC. Héctor Melesio Cuén Ojeda** por haberme brindado todo su apoyo para ausentarme de mis actividades académicas y al **Dr. Antonio Corrales Burgueño** por brindarme su apoyo durante la realización de mis estudios de maestría.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por el apoyo otorgado para realizar el proyecto 2008-CB-106224.

A la Dra. **Herlinda Soto Valdez** por confiar en mí para formar parte de su equipo de trabajo, por todas sus enseñanzas, por brindarme los recursos necesarios durante la realización de mi investigación y contribuir en mi formación académica. En el plano personal por las lecciones de fortaleza y por los momentos bonitos que compartimos. Gracias Dra.

A la MC. **Elizabeth Peralta** por tus enseñanzas, paciencia, amistad y cariño. Por todos esos pequeños detalles que hiciste que me sintiera en casa. Por tu generosidad, consejos tan acertados, por hacerme sentir siempre que no estaba sola, por los regaños cuando fueron necesarios y por las sonrisas que propiciaste. Muchas gracias Ely, gracias por estar ahí cuando más te necesité, siempre te llevaré en mi corazón.

A la **Dra. Ana María Mendoza Wilson** por su apoyo e interés en mi trabajo de investigación, así como por sus comentarios asertivos que ayudaron a enriquecer este estudio.

A la **Dra. Nohemí Gámez Meza** por su apoyo, interés y participación en mi investigación que contribuyeron al enriquecimiento de mi trabajo.

A la Dra. **Ana María Calderón de la Barca** por confiar en mí desde siempre, por su apoyo incondicional para la realización de mi maestría, por su amistad y palabras de aliento cuando fue necesario. Gracias a la abuela **Ma. Elena Cota** por compartirme un poquito de su vida. Siempre estarán en mi corazón y mis oraciones.

A mis amigas **Diana Granda, Citlali Colín, Fabiola Iñiguez, Hayati Samsudin y Francisca Manzanarez** por formar parte de mi vida y de mi familia CIAD. Por las sonrisas, lágrimas, disgustos, por las noches incansables de trabajo en nuestro laboratorio de envases. Por tantos momentos inolvidables que hemos vivido juntas, por aprender de ustedes día a día algo nuevo. Gracias por todo el cariño y confianza que inspiraron en mí; las llevaré por siempre en mi corazón. Estoy segura que las extrañaré mucho. Gracias hermanitas!!!.

A todo el personal de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) **Armida Rodríguez, Judith Fortiz, Jorge Mercado, Mónica Villegas, Brenda Silva, Javier Ojeda, Alberto Sánchez, María del Carmen Granados, Francisco Vázquez, Emmanuel Aispuro**. A los Doctores **Fernando Ayala, Alma Rosa Islas, Alberto González, Gustavo González, Tomás Madera, Carmen Contreras, María Islas, Rosalba Troncoso** y demás personal del área. A todos ustedes muchas gracias por hacerme más placentera mi estancia en CIAD, por apoyarme con material y reactivos cuando fue necesario, por sus explicaciones y paciencia. Por las sonrisas y saludos brindados cotidianamente. Muchas gracias!!

Muchas gracias la M.C. **María del Refugio Robles Burgueño** de Ciencias de los Alimentos por haberme apoyado en los estudios realizados de espectrometría de masas. Gracias por su tiempo, dedicación y explicaciones realizadas.

Al Dr. **Jaime Lizardi** por su apoyarme con equipo, material y reactivos cuando fue necesario y por su amistad.

Al Dr. **Humberto González Rios** por su apoyo incondicional en la parte estadística de este trabajo.

Al personal de computo: **Martín Peralta, José Luis Aguilar, Karla Robles** por el apoyo con técnico con el HPLC e instalación de programas.

A Don **Gerardo Reyna, Luis Conde y Fernando Leyva** por el eficiente apoyo para conseguir artículos, libros y en general para localizar información importante para este estudio.

A todo el equipo de docencia **Argelia Marín, Verónica Araiza, Laura García y Héctor Galindo**. Por todo el apoyo brindado y respuesta inmediata para la realización de tramites académicos.

A **mamá Chela** que me acogió como parte de su familia. Gracias por sus palabras de apoyo, cariño y enseñanzas. Por enseñarme que la vida se debe vivir al máximo hasta el último momento que la tengamos. La quiero muchísimo, siempre la llevaré en mi corazón.

Muchas gracias a **Ulises Zaldívar** un gran amigo, por sus palabras de apoyo y cariño incondicional. Por tener siempre las palabras precisas en el momento oportuno. Eres parte importante de este proyecto. Gracias por ser un ser humano maravilloso y sobre todo gracias por ser MI AMIGO.

Gracias a **Alfonso Carlos Ontiveros Salas** por tu apoyo total, por tus palabras enérgicas en momentos de debilidad, por estar siempre pendiente de mí desarrollo académico y personal. Gracias amigo!!

A mis amigas del alma **Fabiola Hernández, Carmen Hernández, Tanya Barajas, Mely Ovalle**, por estar siempre ahí y por apoyarme a cada paso que doy, por ser más que amigas para mí. Gracias por entender que cuando la amistad es sincera no existe tiempo ni distancia. Las quiero mucho.

Gracias a mis amigos que siempre han confiado en mí: **Leobardo, Hugo, Alfredo González, David Huerta, Moisés Barajas, Donato Pinto, Juan Antonio Cortés** y a mis compañeros laborales que siempre me han brindado su confianza.

Gracias a mi papás **Roberto y Marcelina** por sus enseñanzas a través de los años. Por el apoyo incondicional en mi formación académica hasta el día de hoy. Por el cariño que me han brindado siempre, por ser un ejemplo de vida, por ser los mejores papás, pero sobre todo por ser mis papás.

Gracias a mis hermanitos **Nereyda y Roberto**, son mis tesoros y parte fundamental en mi vida. A mi sobrinita **Ximena** por haberme robado el corazón desde el primer día que te conocí y a su hermanita que aunque aun no nace ya te amo pequeña. A mí cuñado **Gerardo** por haber formado parte de mi mayor tesoro, MI FAMILIA. Gracias a todos ustedes por ser mi motor en la vida, por amarme y hacerme sentir a su lado la hija, hermana, tía, cuñada más feliz del mundo. Los quiero muchísimo.

Gracias a **Jesús Rios Merlos** por formar parte de mi vida. Por estar a mi lado, por tus palabras de aliento y por tu amor. Gracias por ser tan lindo. Te quiero mucho.

A **Dios** que me dio la oportunidad de vivir y regalarme una familia maravillosa, por guiarme en cada paso que doy, por llenarme de bendiciones y permitirme realizar un proyecto más en mi vida.

A todos, muchas gracias porque de alguna manera han formado parte de éste proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su
amor, fortaleza y apoyo
incondicional.

Son mi soporte y motivación.
Gracias por esperar con cariño
mi regresar a casa.

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN	i
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	viii
ÍNDICE GENERAL.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	3
Oxidación Como Causa de Pérdida en la Calidad de los Alimentos	3
Compuestos Fenólicos de Residuos Industriales	6
Residuos Industriales	6
Actividad Antioxidante de los Flavonoides	8
Aplicación de Compuestos Fenólicos en Alimentos	16
Envases de Ácido Poliláctico (PLA) y su Importancia en la Industria Alimentaria.....	17
Composición Química del PLA.....	17
Producción	19
Propiedades	23
Aplicaciones	26
Procesamiento	28
Desarrollo de Envases Activos	30
Envases Activos	31
Migración	33
Etapas del proceso de migración	34

Migración de Antioxidantes del Material de Envase hacia el Alimento.....	36
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVOS.....	41
General.....	41
Específicos	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Materiales	42
Equipos.....	43
Etapa I	44
Elaboración de Películas de PLA con Rutina por Extrusión y Determinación del Efecto de la Temperatura en su Descomposición.	44
Elaboración de Pellets y Películas de PLA-Rutina	44
Identificación y Cuantificación de Rutina Remanente en Película de PLA y sus Productos de Descomposición	46
Límite Mínimo de Cuantificación y Porcentaje de Recuperación.....	47
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	48
Propiedades Ópticas	49
Propiedades Térmicas	49
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	50
Etapa II	51
Difusión de Rutina y sus Productos de Descomposición de la Película de PLA a Simulantes de Alimentos.	51
Difusión de Rutina y sus Productos de Descomposición a Simulantes de Alimentos a Base de Etanol	51
Determinación de Remanentes de Rutina y sus Productos de Descomposición Después de los Estudios de Difusión.....	53
Difusión de Rutina y sus Productos de Descomposición de PLA-Ru #2 a un Aceite Vegetal y mezcla aceite:agua.....	54

Determinación de Coeficientes de Difusión (D) de los Antioxidantes Migrados de la Película PLA-Ru a Simulantes de Alimentos.	54
Determinación de la Energía de Activación (E_a) de los Antioxidantes Presentes en la Película PLA-Ru #2.	56
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	57
Efecto del Procesamiento y Difusión en el Peso Molecular (M_w) del PLA.	58
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	58
Etapa III	59
Evaluación del Efecto de la Película con Rutina y sus Productos de Descomposición en la Estabilidad Oxidativa de Aceite de Soya.	59
Índice de Peróxidos.....	59
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	60
Determinación de la Capacidad Antioxidante de Rutina, Isoquercetina y Quercetina de Películas de PLA-Ru.....	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
Etapa I	62
Elaboración de Películas de PLA-Ru y Testigo.....	62
Identificación y Cuantificación de Rutina y sus Productos de descomposición.....	62
Límite Mínimo de Cuantificación y Porcentaje de Recuperación.....	73
Propiedades Ópticas	73
Propiedades Térmicas	79
Etapa II	83
Determinación de Difusión de Rutina y sus Productos de Descomposición de la Película de PLA a Simulantes de Alimentos	83
Determinación de la Difusión a Simulantes de Alimentos a Base de Etanol.	83
Quercetina.....	83

Isoquercetina.....	94
Rutina.....	95
Difusión de Rutina, Isoquercetina y Quercetina a Etanol al 10%	100
Determinación de la Difusión a un Aceite Vegetal y a una Mezcla Aceite-Agua.....	102
Difusión de Rutina, Isoquercetina y Quercetina a Aceite de Soya.	102
Difusión de rutina, isoquercetina y quercetina a una mezcla de aceite-agua	103
Efecto del Procesamiento en el M_w del PLA.....	104
ETAPA III.....	106
Evaluación del Efecto de la Película con Rutina y sus Productos de Descomposición en la Estabilidad Oxidativa de Aceite de Soya.	106
Índice de Peróxidos (IP)	106
Determinación de la Capacidad Antioxidante de Extractos de Películas PLA-Ru.....	109
CONCLUSIONES	114
RECOMENDACIONES.....	115
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
ANEXOS.....	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de peroxidación lipídica. R [·] - Radical libre, ROO [·] - Radical peroxilo, RO [·] - Radical alcoxilo, ROOH- Hidroperóxido orgánico, RH- Compuesto orgánico.	4
Figura 2. Estructuras químicas de los flavonoides quercetina, isoquercetina y rutina.	9
Figura 3. Estructura del ácido láctico y ácido poliláctico	18
Figura 4. Síntesis del ácido láctico para obtener ácido poliláctico.	22
Figura 5. Procesamiento por extrusión acoplado a dado plano.	29
Figura 6. Proceso de migración.	35
Figura 7. Sistema de migración ASTM D4754-98.....	52
Figura 8. Apariencia visual de pelles de PLA procesados con rutina en cada perfil de temperatura 130-140°C (A), 150-160°C (B), 155-165°C (C) y pellets testigo (D). Películas PLA-Ru #1 (a), PLA-Ru #2 (b) y PLA-Ru #3 (c) y PLA-testigo (d).	63
Figura 9. Espectro UV-visible de extracción de antioxidantes de película PLA-Ru.....	64
Figura 10. Espectros de fragmentación de rutina (A), isoquercetina (B) y quercetina (C) identificadas por HPLC acoplado a un detector de masas en ion negativo. Los espectros corresponden a extracciones de película PLA-Ru #2.....	66
Figura 11. Cromatograma de cuantificación de rutina, isoquercetina y quercetina de película PLA-Ru obtenido por HPLC-UV-DAD a 360 nm.	68
Figura 12. Apariencia visual de películas de PLA-Ru #2 y PLA-testigo.	75
Figura 13. Espectro UV-visible de películas de PLA-testigo (A) y PLA-Ru #2 (B) en un rango de 200 a 800 nm.	76

Figura 14. Espectros infrarrojos de películas PLA-testigo (A) y PLA-Ru (B) en un rango de longitud de onda de 4000-700 cm^{-1}	78
Figura 15. Termograma de PLA molido (A), película PLA-testigo (B) y película PLA-Ru #2 (C). Las muestras se corrieron de 25 a 180°C a una velocidad de 10°C/min.....	80
Figura 16. Difusión de quercetina de PLA-Ru #2 a etanol al 95% a 20°C (■), 30°C (Δ) y 40°C (●).	87
Figura 17. E_a de la difusión de quercetina de PLA a etanol 95% a 20, 30 y 40 °C.	90
Figura 18. Difusión de quercetina de PLA-Ru #2 a etanol al 50% a 30°C (●) y 40°C (○) de acuerdo a la ecuación 2.....	92
Figura 19. Difusión de quercetina (●), isoquercetina (○) y rutina (▲) de PLA-Ru #2 a etanol al 95% a 40°C.....	97
Figura 20. Gráfica de relación de tamaño molecular y coeficiente de difusión de quercetina (A), isoquercetina (B) y rutina (C) de PLA-Ru #2 a etanol al 95% a 40°C.	99
Figura 21. Sistema propuesto de puentes de hidrógeno del PLA con quercetina.	101
Figura 22. Índice de peróxidos en aceite de soya en contacto con quercetina, BHT, película PLA-testigo y PLA-Ru #2, almacenados a 30°C.....	107
Figura 23. Porcentaje de inhibición del radical DPPH por rutina, isoquercetina y quercetina extraídos de las películas PLA-Ru #1,2 y 3 y PLA-testigo..	110
Figura 24. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de los estándares de rutina, isoquercetina, quercetina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y mezcla de ellos (33.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno).....	112

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diferentes condiciones de procesamiento de pellets de PLA-Ru.	45
Cuadro 2. Cuantificación de rutina (Ru), isoquercetina (Isoq) y quercetina (Qe) remanente en PLA-Ru #1, 2 y 3 por HPLC UV-DAD.....	69
Cuadro 3. Efecto de la temperatura de procesamiento en la descomposición de rutina a quercetina.....	72
Cuadro 4. Tg y Tm de PLA molido y películas PLA-testigo y PLA-Ru #2.	82
Cuadro 5. Difusión (D) y coeficientes de partición (K_{pf}) de quercetina de película de PLA-Ru #2 a etanol al 95% a 20, 30 y 40°C. El espesor en la película fue de 43.18 μm	86
Cuadro 6. D y K_{pf} para quercetina de película de PLA-Ru #2 a etanol al 50% a 30 y 40°C (ecuación 2). Espesor de 43.18 μm	93
Cuadro 7. D y K_{pf} de quercetina, isoquercetina y rutina de película de PLA-rutina #2 a etanol al 95% a 40°C. El espesor de la película fue de 43.18 μm	96
Cuadro 8. Efecto de las temperaturas de procesamiento de los pellets de PLA control y con rutina en el peso molecular promedio (M_w) del polímero.	105

RESUMEN

Se elaboraron películas de ácido poliláctico (PLA) por extrusión con dado plano adicionadas con rutina a diferentes perfiles de temperatura: 130-140°C (PLA-Ru #1), 150-160°C (PLA-Ru #2) y 155-165°C (PLA-Ru #3). El efecto de la temperatura sobre el antioxidante se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a espectrometría de masas, encontrando que rutina, durante la fabricación de las películas se descompuso a isoquercetina y quercetina, presentando iones 609.4, 464.4 y 301.7 m/z correspondientes al peso molecular M_w o al $M_w -1$. Los flavonoides presentes en cada película fueron cuantificados por HPLC-UV-DAD obteniendo como resultado para PLA-Ru #1 15.53, 1.11 y 0.27 mg/g, PLA-Ru #2 5.67, 7.20 y 5.24 mg/g y PLA-Ru #3 2.28, 4.00 y 3.51 mg/g de rutina, isoquercetina y quercetina respectivamente. Para realizar los estudios de difusión de los antioxidantes de la película y estabilidad oxidativa de aceite de soya se seleccionó PLA-Ru #2. Esta película presentó un color amarillo claro ubicándose en las coordenadas cromáticas en $a^*=-6.84\pm 0.39$, $b^*=12.54\pm 1.48$ y $L^*=89.15\pm 1.13$, con una diferencia de color de $\Delta E=13.58$ y una absorción máxima de UV-vis a 280 y 360 nm. Los espectros infrarrojos (IR) de la película PLA-Ru #2, indicaron la presencia de los antioxidantes fenólicos debido a las bandas 1654, 1603, 1500 cm^{-1} . La incorporación de rutina y sus productos de descomposición en el PLA, así como la temperatura de procesamiento no produjeron efecto significativo en las propiedades térmicas del polímero ($p<0.05$). Al evaluar la difusión de los compuestos fenólicos a simulantes de alimentos se encontró que quercetina migró a 20, 30 y 40°C a etanol al 95%, alcanzando el equilibrio a las 126, 36 y 18 h respectivamente, con coeficientes de difusión (D) de 7.2, 12.9 y 95.8×10^{-11} cm^2/s y con una energía de activación (E_a) de 98.28 kJ/mol. En el estudio de

difusión a etanol 50% quercetina migró a 30 y 40°C, alcanzando el equilibrio a las 24 h para ambas temperaturas con D de 9.01 y 9.60×10^{-11} cm^2/s respectivamente. Los antioxidantes isoquercetina y rutina sólo migraron a etanol 95% a 40°C, alcanzando el equilibrio en la difusión a las 155 h para isoquercetina y 26 h para rutina. Los valores de D calculados fueron 14.91×10^{-11} y $<0.51 \times 10^{-11}$ cm^2/s . No se registró difusión a etanol 10%, aceite de soya y mezcla aceite:agua de ninguno de los antioxidantes evaluados. El procesamiento de la película tuvo efecto sobre el peso molecular (M_w) del PLA, sin embargo, la incorporación de la rutina y sus productos de descomposición no presentaron efecto en el M_w del polímero. Se estudió la estabilidad oxidativa (índice de peróxidos IP) de aceite de soya por 15 días a 30°C en contacto con la película PLA-Ru #2, película PLA-testigo, quercetina y BHT, empleando aceite como testigo. Estos tratamientos con películas de PLA y antioxidantes incorporados directamente proporcionaron una mayor estabilidad oxidativa con un valor máximo de 25 meq/kg, mientras que el aceite testigo presentó 35 meq/kg. Se evaluó la capacidad antioxidante de extractos metanólicos de las películas fabricadas con rutina como porcentaje de inhibición de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), encontrando un porcentaje de inhibición para PLA-Ru #1, 2 y 3 de 34.32, 59.92 y 53.53 respectivamente, siendo cercano al que presentan las soluciones de los estándares puros.

Se concluyó que la temperatura de procesamiento de las películas de PLA con rutina derivan en una fuente de quercetina e isoquercetina, las cuales migran a soluciones etanólicas. No se detectó migración de los compuestos a aceite y mezcla de aceite-agua que son más similares a alimentos, por lo que se recomienda modificar la polaridad del PLA para que se pueda lograr una migración de los antioxidantes presentes en la película.

INTRODUCCIÓN

Los residuos industriales de frutas como la uva, mango, té, café, nueces, etc, se caracterizan por presentar un contenido alto de compuestos fenólicos como son los flavonoides, los cuales se encuentran principalmente en semilla y cáscara de estos frutos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2010). Estos desechos industriales son subutilizados, por lo que podrían ser una fuente potencial de antioxidantes fenólicos y a su vez se les proporcionaría un valor agregado.

Los flavonoides se caracterizan por su potencial antioxidante alto, su mecanismo de acción se debe a sus propiedades quelantes de metales de transición y secuestradoras de radicales libres (Pérez, 2003). La rutina es un diglucósido que se caracteriza por potencial antioxidante, así como su monoglucósido isoquercetina y su aglicona quercetina. Estos flavonoides se encuentran en concentraciones altas en los residuos industriales de la uva. Estos compuestos pueden incorporarse a los alimentos de manera indirecta a través de la matriz polimérica del envase, para ser liberados de manera gradual durante su almacenamiento por difusión, disolución y procesos de equilibrio (Catalá y Gavara, 2002). López-de-Dicastillo *et al.*, (2010) y Koontz *et al.*, (2010) han reportado la difusión de quercetina en etilen-vinil-alcohol (EVOH) y en polietileno lineal de baja densidad (PELBD) en simulantes de alimentos grasos. Sin embargo, los plásticos convencionales como poliestireno (PS), polietileno de baja densidad (PEBD), polietileno de alta densidad (PEAD), tereftalato de polietileno (PET) entre otros, incrementan la contaminación ambiental, por lo que es necesario investigar materiales nuevos que no contaminen y presenten características biodegradables a corto plazo.

En este sentido, el PLA es un candidato ideal, ya que es un poliéster alifático sintetizado del monómero de ácido láctico. La materia prima es obtenida de fuentes naturales como: maíz, trigo, caña, etc. Además de obtenerse de fuentes renovables, tiene propiedades de biodegradabilidad bajo condiciones de composta (Auras *et al.*, 2004, Soto Valdez *et al.*, 2011). Otras características que presenta el PLA son sus propiedades termoplásticas y punto de fusión que permiten procesarlo por extrusión como envase para alimentos e incorporar los antioxidantes naturales durante su procesamiento. Este polímero ha sido aprobado por la FDA y reconocido como seguro (GRAS) para ser utilizado como envase para alimentos (Auras *et al.*, 2010).

La oxidación es una de las principales causas de deterioro en alimentos ricos en grasas poliinsaturadas, generando pérdida en la aceptabilidad sensorial por parte del consumidor debido a la presencia de lipoperóxidos y dobles enlaces conjugados. Este proceso oxidativo se incrementa en presencia de temperaturas altas, metales, luz ultravioleta y oxígeno (Karpiska *et al.*, 2001, Pan *et al.*, 2005). Por este motivo, es necesario implementar medidas tecnológicas como la incorporación de antioxidantes naturales a este grupo de alimentos para protegerlos de la oxidación durante su almacenamiento, conservando sus propiedades organolépticas a través del tiempo.

Debido a lo antes mencionado se propuso elaborar películas de PLA con el antioxidante rutina, estudiar el efecto del procesamiento en su descomposición, determinar su difusión y evaluar su efecto en la estabilidad oxidativa en un simulante de alimento.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Oxidación Como Causa de Pérdida en la Calidad de los Alimentos

La oxidación es una de las principales causas de pérdida nutricional y deterioro en alimentos con contenido lipídico alto, produciendo sabores y olores indeseables, generando la inaceptabilidad por parte del consumidor (Min y Boff, 2002). Este proceso se lleva a cabo en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Figura 1). En la iniciación, a partir de los ácidos grasos insaturados se forman los radicales libres. Éstos, atacan a un grupo metileno de la cadena del ácido graso insaturado, extrayendo un átomo de hidrógeno y formando un nuevo radical libre (Allen y Hamilton, 1999). En la propagación, los radicales libres se convierten en otros radicales a través de reacciones en cadena, por la reacción del oxígeno triplete o por la remoción de un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados, produciendo radicales hidroperóxidos. En la terminación, los radicales libres reaccionan entre sí formando polímeros (R-R o R-OO-R), indicando la terminación de la reacción (Deshpande *et al.*, 1995). Las reacciones de oxidación se favorecen por la reactividad alta de los grupos metileno adyacentes a los dobles enlaces, donde los radicales libres lipídicos tienden a estabilizarse por un reordenamiento interno, produciendo dienos conjugados (Navarro-García *et al.*, 2004).

Dentro de los productos de oxidación que se presentan están los hidroperóxidos, los cuales reaccionan de forma rápida para dar lugar a compuestos carbonílicos, hidrocarburos, furanos sustituidos y alcoholes.

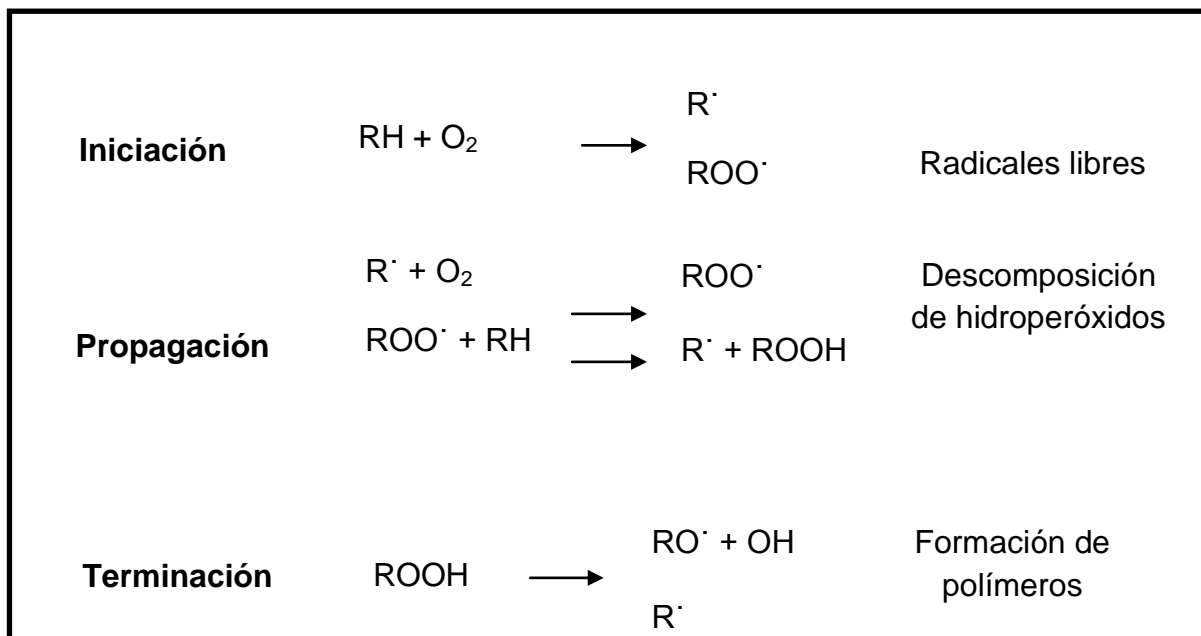


Figura 1. Mecanismos de peroxidación lipídica. R^\cdot - Radical libre, ROO^\cdot - Radical peroxilo, RO^\cdot - Radical alcoxilo, $ROOH$ - Hidroperóxido orgánico, RH - Compuesto orgánico. Modificado de Deshpande, *et al.*, 1995.

Los aldehídos son los compuestos responsables de la presencia de olor y sabor desagradable, dentro de los que se encuentran el hexanal, nonanal, heptanal, etc. Los aldehídos insaturados son fácilmente oxidables, produciéndose nuevos compuestos volátiles como el malonaldehído, cuya detección es utilizada como medida de la oxidación de los ácidos grasos (Frankel, 1983; Navarro-García *et al.*, 2004). La temperatura es uno de los principales factores que propicia la oxidación de este grupo de alimentos.

Se ha demostrado en diversos estudios el efecto de la temperatura sobre la oxidación de moléculas lipídicas, con respecto al tiempo. Granda-Restrepo *et al.*, (2009), demostraron que la velocidad de oxidación lipídica en leche entera en polvo fue mayor al exponerla a 40 °C, que a 20 °C. Así mismo Miranda *et al.*, (2010), estudió la cinética de oxidación lipídica del aceite crudo de quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*), a tres temperaturas de almacenamiento (20°, 30° y 40 °C) durante 6 meses. Encontró que a mayor tiempo y temperatura de almacenamiento fue significativo el aumento del deterioro oxidativo, medido como índice de peróxido. Por lo cual, la temperatura es un factor importante en la velocidad de oxidación de los alimentos.

La luz es otro factor involucrado en la oxidación de los lípidos en los alimentos, debido a su absorción por los grupos cromóforos. Ésta hace pasar de un estado excitado al oxígeno triplete a oxígeno singlete por absorción de energía electromagnética que invierte el giro de uno de los 2 electrones desapareados quedando con una orientación antiparalela (Choe y Min, 2006). El oxígeno singlete reacciona rápidamente con los enlaces dobles de las grasas insaturadas, debido a la energía de activación baja que necesita para reaccionar, formando radicales lipídicos e hidroperóxidos. Como se explicó anteriormente, estos compuestos formados son

degradados a aldehídos, cetonas, alcoholes, los cuales son los responsables del olor, sabor y cambios de color característicos de un alimento oxidado (Min y Boff, 2002; Pan *et al.*, 2005). Para evitar esto, se pueden incorporar compuestos antioxidantes que les proporcionen una vida de anaquel estable.

Una técnica convencional para evitar la oxidación de los alimentos es la quelación de metales e inactivación de enzimas generadoras de especies reactivas de oxígeno (Decker, 1998). La incorporación de antioxidantes sintéticos como donadores de hidrógenos como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroxiquinona (TBHQ), no detienen la formación de radicales, sino que reaccionan con ellos y los estabilizan produciendo radicales antioxidantes más estables (Badui, 2006). Sin embargo, estos antioxidantes sintéticos se han ido reemplazando por antioxidantes presentes en la naturaleza como el ácido ascórbico, tocoferoles, carotenoides y compuestos fenólicos, como una alternativa al deterioro oxidativo. Esto se debe a las tendencias del consumidor a adquirir alimentos aditivados con compuestos naturales, dejando de lado aquellos alimentos que contienen aditivos artificiales debido a que pueden ser tóxicos en altas concentraciones (Moure *et al.*, 2001). Por lo tanto, los compuestos fenólicos naturales presentan una alternativa potencial como compuestos con efectos antioxidantes.

Compuestos Fenólicos de Residuos Industriales

Residuos Industriales

Los residuos vegetales y agroindustriales son generados y acumulados anualmente en la naturaleza en forma sólida. Esto ocasiona serios

problemas de contaminación ambiental y pérdidas de fuentes potenciales de valor agregado alto (Primas, 2002). Este desperdicio agrícola constituye una fuente renovable en alta abundancia y de costo. La extracción de compuestos antioxidantes que utilicen estos materiales como principales insumos, podría ayudar a resolver algunos problemas socio-económicos generados en los campos agrícolas, así como en las agroindustrias (Domínguez–Espinosa *et al.*, 2002). Estos residuos incrementan el interés de la comunidad científica en encontrar tecnologías nuevas para su aprovechamiento.

En el proceso de vinificación los primeros residuos son el conjunto de cáscara, fibra y semilla de la uva, de los cuales se desechan 10 millones de toneladas anuales aproximadamente (Sandoval *et al.*, 2008, Xu, *et al.*, 2010). Estos residuos son importantes ya que los compuestos fenólicos de la uva se localizan en las partes sólidas que se desechan, conteniendo el 95% de estos en la uva (Gamez-Meza *et al.*, 1999; Leighton y Urquiaga, 2000). Las semillas constituyen una considerable porción de la pulpa, siendo del 38 al 52% de materia seca (Maier *et al.*, 2009).

Otro de los frutos que presenta importancia debido a su producción alta a nivel mundial es el mango (*Mangifera indica L., Anacardiaceae*), con una producción global superior a 26 millones de toneladas en 2004. De este fruto tropical, la pulpa comestible constituye el 33-85% de la fruta fresca, mientras que la cáscara y el hueso es de 25 % y 90-40% respectivamente. Los subproductos industriales generados del procesamiento del mango equivalen al 35-60% del peso total del fruto (Berardini *et al.*, 2005).

Actividad Antioxidante de los Flavonoides

La piel y semilla de subproductos industriales como son uva, mango, entre otros, son ricos en compuestos fenólicos antioxidantes con diferente grado de polimerización (Orak, 2007). Los flavonoides están constituidos por sustancias polifenólicas de peso molecular bajo derivados de la benzo- γ -pirona, los cuales presentan diversas estructuras químicas (Chiodo *et al.*, 2010). Estos compuestos contienen múltiples grupos hidroxilo, los cuales proporcionan mayor actividad antioxidante contra los grupos peroxilo, comparado con los ácidos fenólicos y vitaminas E y C (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Escamilla *et al.*, 2010). Así pues, la función antioxidante de éstos presentan efectos sinérgicos con la vitamina C, ya que combinados permiten mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo (Escamilla *et al.*, 2010).

El mecanismo antioxidante de los flavonoides es el resultado de la combinación de sus propiedades quelantes de metales de transición y secuestradoras de radicales libres, inhibición de oxidasas y acción sobre otras enzimas (Pérez, 2003). La estructura básica de todos los flavonoides está constituida por un núcleo flavano (2-fenil-benzo- γ -pirano), constituido por 2 anillos bencenos (A y B) unidos mediante un anillo pirano C. Sus sustituyentes hidroxilos y el efecto antioxidante es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4. Estos compuestos presentan un OH en la posición 5 del anillo A aumentando su actividad antioxidante por incremento de la deslocalización electrónica (Figura 2) (Pérez, 2003; Chiodo *et al.*, 2010). La parte activa de la molécula se localiza en las posiciones 3' y 4' del anillo B, donde los OH presentan una entalpía de

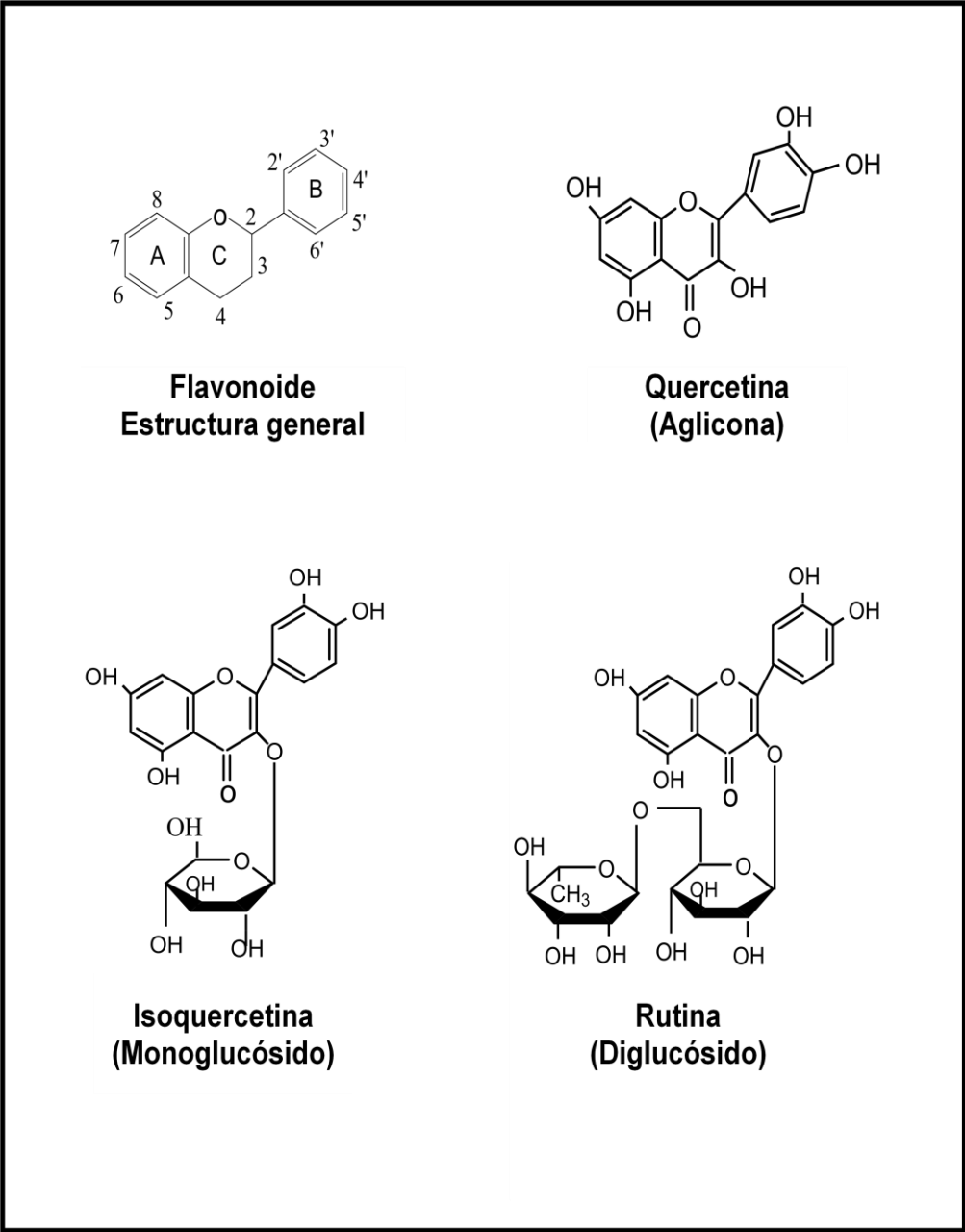


Figura 2. Estructuras químicas de los flavonoides quercetina, isoquercetina y rutina. Modificado de Martínez-Valverde, *et al.*, 2000; Li, *et al.*, 2006.

disociación baja O-H, liberando hidrógenos para estabilizar a los radicales libres (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Por lo cual, debido a las características estructurales de estos compuestos, pueden actuar como agentes con alto potencial antioxidante (Escamilla *et al.*, 2010).

La actividad antioxidante de un compuesto individual refleja la reactividad química en las condiciones específicas en las que se analizó. Las principales reacciones que se llevan a cabo en el análisis de la capacidad antioxidante se pueden dividir en dos categorías: 1) transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), el cual está basado en una cinética de reacción competitiva y su cuantificación es derivado de curvas de cinéticas. 2) una sola transferencia de electrones (ET), en el cual se involucra una reacción redox con el oxidante (como un control de la reacción), el cual es utilizado como un indicador del punto final de la reacción (Huang y Ronald, 2005).

Dentro de los estudios experimentales que se utilizan para determinar la actividad antioxidante de los flavonoides, basada en la inhibición de radicales libres ya formados, se efectúa a través de compuestos cuyas propiedades termoquímicas ya han sido establecidas, como lo es el 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Mendoza-Wilson *et al.*, 2010). Este método para atrapar radicales es el que generalmente se utiliza para evaluar la actividad antioxidante de compuestos extraídos de plantas (Frankel y Meyer, 2000).

El radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) es uno de los radicales sintéticos que se utilizan para evaluar el efecto estructural en la actividad de los antioxidantes fenólicos. La función del DPPH es ser un radical oxidante que va a ser reducido por el antioxidante (AH) generando la reacción: $DPPH^{\cdot} + AH \rightarrow DPPH-H + A^{\cdot}$. La desaparición del radical DPPH por la acción del

antioxidante es medida espectrofotométricamente a 515 nm en solución metanólica hasta que la absorbancia permanece constante. Éste método se utiliza para determinar la eficiencia antirradical de compuestos polifenólicos. La pendiente de disminución y el nivel de absorbancia alcanzado por el radical DPPH varían significativamente con el tipo y concentración de los antioxidantes. Este método evaluador de la actividad antioxidante determina la eficiencia anti-radical, basado en la cantidad de antioxidante necesario para un disminuir la concentración inicial de radical DPPH y el tiempo necesario para llegar a una concentración estable del radical (Frankel y Meyer, 2000).

Los flavonoides como rutina, isoquercetina y quercetina se caracterizan por su habilidad para estabilizar a los radicales libres mediante dos mecanismos: (1) transferencia de un átomo de hidrógeno. En este mecanismo el antioxidante (ArOH) reacciona con los radicales libres (\dot{R}) mediante la transferencia a un átomo de hidrógeno. Los productos de la reacción son compuestos estables RH y el radical aroxilo \dot{ArO} es menos reactivo con respecto al radical libre \dot{R} . (2) transferencia de electrones individuales sólo se establece la donación de un electrón al radical \dot{R} (Chiodo *et al.*, 2010). Otra característica importante que presentan estos flavonoides es la habilidad para quelar cationes de metales de transición, como el hierro, plomo y aluminio. Por lo tanto, estas características en conjunto otorgan a estos flavonoides una habilidad estabilizadora de radicales libres alta y con ello una capacidad antioxidante alta (Matsumoto *et al.*, 2002).

Rutina. La rutina es un glicósido del flavonol conocido como vitamina P (quercetina-3-ramnosil glucósido) (Figura 2). Este antioxidante está formado por una molécula de quercetina unida a una glicosilación en la posición 3 del

anillo pirano C, proporcionándole al compuesto mayor solubilidad en agua. La rutina presenta dos bandas de máxima absorción en el espectro UV en el rango de 200-500 nm, en el anillo de transición B-C (353 nm) y el anillo A-C (260 nm). La parte activa de la molécula como antioxidante se encuentra en el sitio 3',4'-dihidroxy en el anillo B. Esta parte exhibe la mayor capacidad para atrapar a los radicales hidroxilos libres y es el sitio electroactivo de la molécula (Guo y Wei, 2008). La rutina se caracteriza por inactivar a los radicales libres con una eficacia superior a la de la vitamina C, presentando un potencial antioxidante de 2.4 mM en equivalentes Trolox y un 67.6 de porcentaje de inhibición de la oxidación medidos por DPPH (Frankel y Meyer, 2000; Martínez-Valverde *et al.*, 2000). Este compuesto presenta efecto sinérgico con la vitamina C permitiendo su regeneración y con ello proporciona a los alimentos un periodo de protección antioxidante mayor (Guo y Wei, 2008). Se ha demostrado el efecto potencial alto de la dosis de respuesta de rutina en inhibición de la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como la elevada actividad antioxidante frente a las reacciones de Fenton (Caillet *et al.*, 2007).

Descomposición de rutina. Se han reportado diversos estudios de evaluación de la estabilidad del antioxidante rutina encontrando que es susceptible a la descomposición debido a efectos térmicos así como de pH (6.0-6.8) (Buchner *et al.*, 2006; Peng y Yan, 2009). Rohn *et al.*, (2007) reportan que los flavonoides glicosilados como la rutina sometidos a tratamientos térmicos de freído, rostizado, cocinado a 180°C pueden sufrir un impacto en su estructura generando una descomposición por efecto del calor. Durante el proceso de descomposición, debido al rompimiento del enlace entre azúcares, se obtiene el monoglucósido isoquercetina después de 1 minuto de calentamiento, para posteriormente después del minuto 8, dar lugar a la

presencia de la aglicona quercetina debido al rompimiento del segundo enlace entre la molécula de glucosa y la aglicona. Makris y Rossiter (2000), en un estudio realizado a rutina encontraron que bajo condiciones no oxidativas, este antioxidante permanece estable. Sin embargo, después de 240 min a 97 °C disminuye la concentración a 22 %, descomponiéndose a una velocidad de 6.3×10^{-5} mM/s. En condiciones de oxidación la concentración de rutina disminuye a 45 % a una velocidad de 10.3×10^{-5} mM/s. Por lo cual, la rutina es un antioxidante susceptible a descomposición sometido a condiciones de pH cercano al alcalino y temperaturas altas.

Isoquercetina. La isoquercetina es un monoglucósido de quercetina (Figura 2), el cual está formado por una molécula de quercetina unida a un glucósido en la posición 3 del anillo pirano C (Buchner *et al.*, 2006). Este flavonoide es precursor en la biosíntesis de rutina, el cual es formado por la 3-glicosilación de quercetina, se puede obtener como producto intermediario en la degradación de rutina sometida a altas temperaturas, debido a la ruptura de un enlace entre las moléculas de azúcar (Rohn *et al.*, 2007; Kalinova y Vrchotova, 2009). Estudios han reportado que la introducción de un grupo conjugado en la posición 3 del anillo B disminuye marcadamente la inhibición de la oxidación. Esto es debido a que la molécula de azúcar, al sustituir al grupo hidroxilo en el anillo C, produce cambios en la actividad de la molécula, generando una actividad menor para atrapar a los radicales peroxilos con respecto a su aglicona (Wijeratne *et al.*, 2006). Por lo tanto, este compuesto presenta una actividad antioxidante inferior a la que presenta su aglicona quercetina pero superior a la que presenta el diglucósido rutina en el orden quercetina > isoquercetina > rutina (Matsumoto *et al.*, 2002; Slimestad *et al.*, 2007).

La isoquercetina se caracteriza por compartir la estructura de la aglicona con rutina, así como por su potencial antioxidante alto debido a su capacidad para reaccionar con iones metálicos, atrapar radicales OH y anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ e inactivar a los radicales libres con una eficacia superior a la de la vitamina C. En el espectro ultra violeta, isoquercetina presenta una banda de máxima absorción a los 350 nm de longitud de onda (Buchner *et al.*, 2006; Biesaga *et al.*, 2007). Hasta este momento los estudios de investigaciones reportados de este flavonoide son pocos, ya que sólo se ha enfocado al estudio de su diglucósido rutina y su aglicona quercetina.

Quercetina. La quercetina es un flavonoide de gran importancia antioxidante (Figura 2). Su capacidad protectora frente a la oxidación medida como equivalentes trolox es de 4.7 mM. Presenta un potencial antioxidante 20 veces mayor que la vitaminas C y 5 veces mayor al de la vitamina E. Su solubilidad es similar a la de la vitamina E y posee un porcentaje de inhibición de la oxidación de 61.4 % medidas por DPPH (Frankel y Meyer, 2000; Martínez-Valverde *et al.*, 2000; Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Mendoza-Wilson *et al.*, 2010).

Este compuesto se caracteriza dentro de la familia de los flavonoides por presentar el potencial antioxidante mayor dentro de este grupo, debido a su capacidad para reaccionar con iones metálicos, redox, atrapar radicales OH y anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ (Lopez-de-Dicastillo *et al.*, 2010). El potencial antioxidante de quercetina radica en la presencia de cinco grupos OH que pueden representar un sitio de ataque para el proceso de radicalización realizado por el radical peróxido lipídico. El grupo 4'OH es considerado como el más reactivo, ya que desde su radicalización es estable debido al fenómeno de deslocalización y conjugación, así como por un enlace de H entre en O^{\cdot} y el OH adyacente. Los grupos hidroxilos presentes en

quercetina presentan un orden de reactividad de 4'OH > 3'OH > 3OH > 7OH > 5OH, basados en los valores de energías de disociación de enlaces de 76.41, 81.4, 77.28, 88.10, 89.41 kcal/mol, respectivamente (Mendoza-Wilson, 2007; Chiodo *et al.*, 2010). La mayor reactividad de los grupos 4'OH y 3'OH depende de la estabilidad generada por los enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los dos 2 grupos hidroxilos, los cuales se mantienen estables al pasar de la quercetina libre al estado de transición (Chiodo *et al.*, 2010). El grupo OH libre de la posición 3 del grupo C le da a este antioxidante propiedades lipofílicas. La conjugación total del anillo piránico con el resto de la molécula incrementa la estabilización de los radicales formados, produciendo un aumento en la actividad antioxidante (Pérez, 2003).

La descomposición oxidativa en quercetina se puede presentar en solución buffer de fosfato a pH 8.0. Bajo condiciones no oxidativas este flavonoide presenta una estabilidad alta. Sin embargo, después de 240 min a 97 °C su concentración disminuye un 16 % a una velocidad de degradación de 4.3×10^{-5} mM/s, modificando las condiciones de oxidación disminuye el 98 % a una velocidad de 18.7×10^{-5} mM/s (Makris y Rossiter, 2000). La quercetina es ligeramente soluble en soluciones acuosas (solubilidad <1 g/L) y muy sensible a la oxidación (Rawel *et al.*, 2005). Este antioxidante se encuentra en plantas y alimentos de origen vegetal, presenta una coloración amarillo-verdoso y biodisponibilidad alta (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

En el espectro ultra violeta quercetina presenta una banda de máxima absorción a los 370 nm de longitud de onda (Careri *et al.*, 2000). Los factores determinantes en el potencial antioxidante de la quercetina son una baja entalpía de disociación de enlaces O-H (BDE) facilitando la liberación del hidrógeno y un potencial de ionización alto (PI). Esto dificulta la

reducción del oxígeno por el antioxidante y una adecuada solubilidad. Sin embargo, la estabilidad de los radicales derivados de los antioxidantes se consideran inestables y pueden seguir reaccionando con otras moléculas (Justino y Vieira, 2010).

Aplicación de Compuestos Fenólicos en Alimentos

Se han realizado estudios de la actividad antioxidante del conjunto de polifenoles contenidos en subproductos industriales, aplicados en alimentos (Pazos *et al.*, 2005). La inhibición de oxidación de lípidos en pescados ha sido determinada en aceite, emulsión de aceite y agua, así como en especies grasas de pescado (Pazos *et al.*, 2005). Sánchez-Alonso *et al.*, (2007), utilizaron extractos de residuos de uva al 0, 2 y 4% de una concentración de 5.63 g/100g de masa seca de fenoles totales aplicados a músculo de pescado para evaluar la estabilidad oxidativa durante 6 meses de almacenamiento a -20 °C. En este estudio evaluaron la inhibición de la oxidación, alcanzando una máxima protección en los primeros 3 meses de almacenamiento. Esto se debió a la acción protectora de los polifenoles frente al deterioro oxidativo, así como su actividad quelante de metales de transición. Esto comprueba que el conjunto de polifenoles presentan un potencial antioxidante alto frente al deterioro oxidativo de los ácidos grasos insaturados.

Actualmente, no se han encontrado reportes de aplicación de los antioxidantes rutina, isoquercetina y quercetina a los alimentos de manera individual. En este sentido, es factible estudiar la actividad antioxidante de éstos flavonoides naturales, incorporándolos de manera indirecta a un alimento graso para que estos sean liberados de manera gradual durante su

almacenamiento. Esta incorporación se puede lograr por medio de una matriz polimérica, siendo el ácido poliláctico un candidato ideal para ser utilizado, debido a su origen de fuentes renovables, sus propiedades termoplásticas y biodegradables/compostables.

Envases de Ácido Poliláctico (PLA) y su Importancia en la Industria Alimentaria

Composición Química del PLA

El PLA es un polímero biodegradable bajo condiciones de composta derivado de fuentes renovables (principalmente almidón y azúcar) (Figura 3). Este polímero pertenece a la familia de los poliésteres alifáticos derivados de α -hidroxiácidos. Los bloques de PLA, ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanoico) pueden existir ópticamente como enantiómeros D- o L- y dependiendo de la proporción de estos enantiómeros pueden variar las propiedades de este material (Auras *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2008). El isómero L- constituye la principal fracción de PLA derivado de fuentes renovables de ácido láctico. Sin embargo, para su comercialización el PLA que se produce es un copolímero de poli(ácido L- láctico) y poliácido (D,L- láctico), el cual es producido del L-láctido y D,L-láctido, respectivamente. Por ello, el ratio de los enantiómeros L- y D,L- afecta las propiedades del PLA en cuanto a su temperatura de fusión y el grado de cristalinidad (Martin y Averous, 2001). Por lo tanto, la producción de polímeros con las características antes mencionadas, evita el aumento de la contaminación ambiental.

El PLA en su estructura molecular presenta unidades repetidas debido a que los poliláctidos no modificados son macromoléculas lineales que

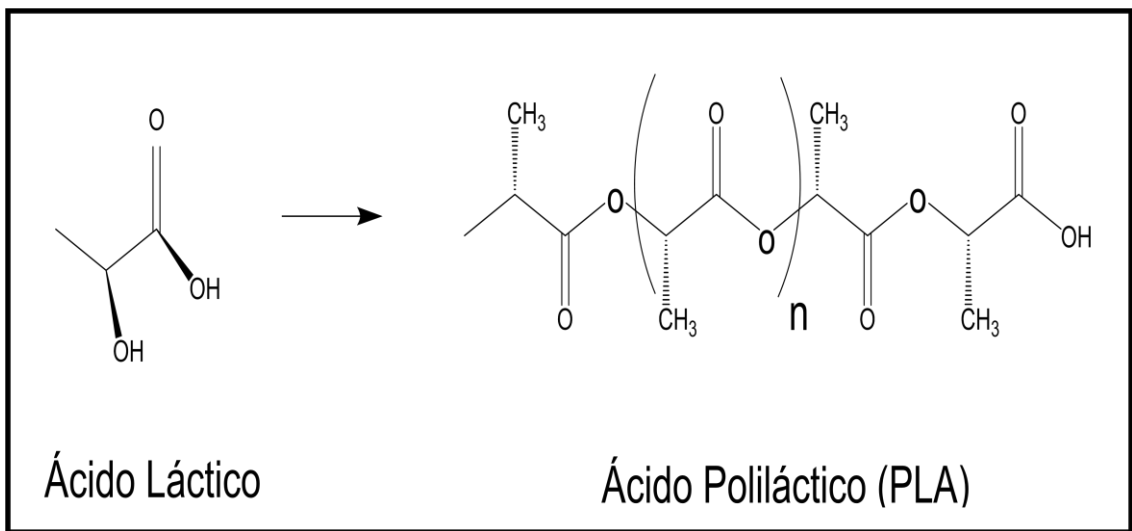


Figura 3. Estructura del ácido láctico y ácido poliláctico. Modificado de Auras, *et al.*, 2004.

presentan una arquitectura molecular determinada por su composición estereoquímica.

Estas unidades repetidas son añadidas como dímeros durante la apertura del anillo del láctido en la polimerización o son adicionadas en el polímero final como monómero del ácido láctico por medio de polimerización por condensación directa (Auras *et al.*, 2004). El peso molecular del PLA está determinado por la arquitectura del polímero (composición estereoquímica en la columna del PLA) y masa molecular, la cual es controlada por la incorporación de compuestos hidroxílicos. La habilidad para controlar la construcción estereoquímica de la molécula de PLA permite controlar la velocidad de cristalización, el grado de cristalinidad, propiedades mecánicas y temperaturas para procesar el material (Auras *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2008).

Producción

El ácido láctico puede ser producido por fermentación bacteriana de carbohidratos o síntesis química, basado en rutas de fermentación (Lim *et al.*, 2008). Los procesos de fermentación para obtener ácido láctico se pueden clasificar según el tipo de bacteria que se utiliza en: 1) método heterofermentativo por medio del cual se produce una cantidad inferior a 1.8 moles de ácido láctico por mol de hexosa, acompañado de niveles altos de metabolitos tales como ácido acético, etanol, glicerol, manitol y dióxido de carbono. 2) Método homofermentativo, por éste método se produce una cantidad de 1.8 moles de ácido láctico por mol de hexosa y una baja producción de metabolitos. El rendimiento estimado en la producción de ácido láctico para la producción de PLA por estos métodos es de 90 g de

ácido láctico por 100g de glucosa (Auras *et al.*, 2004). Por lo cual, el método homofermentativo es el más utilizado para la producción de ácido láctico por su rendimiento alto y generación de subproductos baja (metabolitos).

A nivel industrial, el método que generalmente se utiliza para producir ácido láctico es el homofermentativo. Este cual consiste en utilizar especies del género *Lactobacillus*, tales como *L. delbrueckii*, *L. amylophilus*, *L. bulgaricus*, y *L. leichmanii*, a pH de 5.4 a 6.4, un rango de temperatura de 38 a 42 °C, y una concentración de oxígeno baja. El uso de estas bacterias se debe a que para producir PLA se requiere utilizar ácido L- láctico puro (Jamshidian *et al.*, 2010). Por lo tanto, las fuentes de azúcares simples que se utilizan para este proceso son glucosa y maltosa las cuales pueden obtenerse del maíz o papa, sacarosa de la caña de azúcar o de remolacha y lactosa del suero de queso. Así mismo, el maíz proporciona otros nutrientes como la vitamina B, aminoácidos y nucleótidos (Yuzay *et al.*, 2010).

PLA tiene un peso molecular variable y sólo el polímero de peso molecular alto se utiliza en la industria de embalajes. Hay tres métodos que pueden utilizarse para producir PLA de peso molecular alto (Figura 4) con una masa de alrededor de 100 000 Daltons: 1) polimerización por condensación directa, 2) policondensación directa en una solución azeotrópica (un azeótropo es una mezcla de dos o más líquidos químicos en una proporción que su composición no se puede cambiar por destilación simple. Esto ocurre porque cuando un azeótropo se somete a ebullición, el vapor resultante tiene la misma proporción de componentes que la mezcla original) y 3) la polimerización a través de la formación de láctido (Auras *et al.*, 2004).

El método 1) se basa en la esterificación de monómeros con ayuda de disolventes y eliminando el agua exudada mediante vacío progresivo y

temperaturas altas. La obtención de poliésteres de peso molecular alto con propiedades mecánicas adecuadas a través de este método no es fácil (Auras *et al.*, 2004; Jamshidian *et al.*, 2010).

2) La producción del polímero PLA de peso molecular alto por policondensación directa en una solución azeotrópica y la aplicación de algunos catalizadores es más factible. La solución azeotrópica ayuda a disminuir las presiones de la destilación y facilita la separación del PLA del disolvente por la aplicación de tamices moleculares. La variedad y el contenido de los catalizadores, los porcentajes de volumen del disolvente y el tiempo de reacción en la preparación de PLA ha sido objeto de estudio, a fin de obtener un peso molecular de PLA de $6,6 \times 10^4$ (Li *et al.*, 2006).

3) La polimerización a través de la formación de láctido se realiza industrialmente para la producción de PLA de peso molecular alto. El láctido es un dímero cíclico formado por la eliminación del agua en condiciones suaves y sin disolventes. El L-láctido, meso (L, D) láctido y D-láctido son productos del ácido L-láctico y ácido D-láctico. La purificación de láctico se realiza por destilación al vacío a temperaturas altas, para posteriormente dar lugar la apertura del anillo, obteniendo un PLA con pureza óptica y peso molecular alto. Este proceso puede llevarse a cabo por fusión o solución, mediante mecanismos catiónicos, aniónicos y coordinación, dependiendo del iniciador utilizado. El iniciador que se considera más activo para la apertura del anillo L-láctido en la polimerización es el octato de estaño, el cual provoca un grado de racemización bajo a temperaturas altas, tiene una toxicidad baja y es aceptado por la FDA (Jamshidian *et al.*, 2010).

El PLA durante el proceso de polimerización adquiere propiedades termoplásticas que permiten su procesamiento como envase de alimentos.

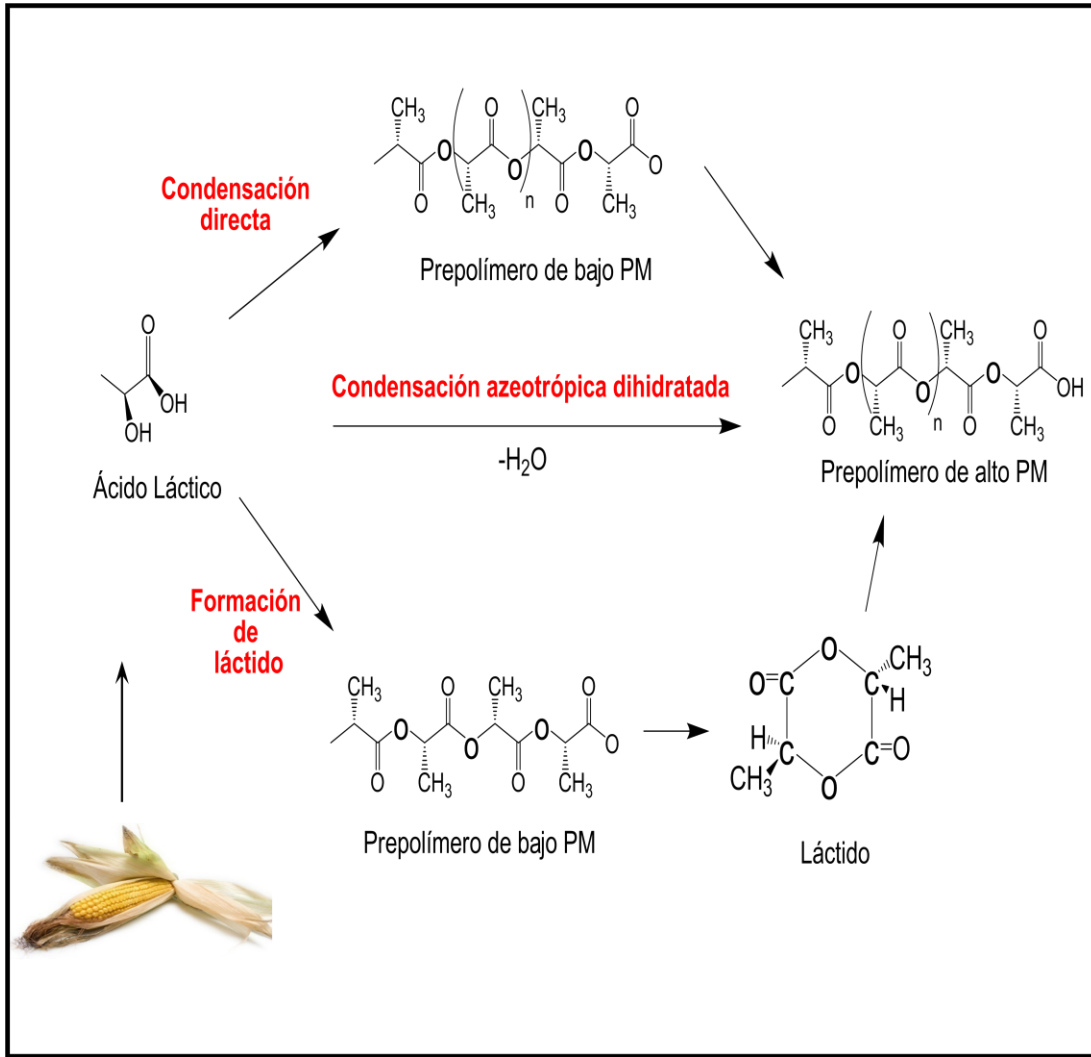


Figura 4. Síntesis del ácido láctico para obtener ácido poliláctico. Modificado de Auras, *et al.*, 2004.

Durante este proceso de producción es importante preservar su estabilidad térmica para prevenir su degradación, mantener sus propiedades y peso molecular (Garlotta, 2001). Existen diversos tipos de procesamiento al cual es factible someter al PLA debido a sus características termoplásticas como son extrusión por soplado, inyección por moldeo, película en forma de hoja, termoformado, casting, espumado y fibras, entre otros.

La producción de PLA presenta numerosas ventajas, ya que éste: 1) se puede obtener de fuentes agrícolas renovables, 2) su producción emite 0.3 kg de CO₂/kg de polímero de emisiones netas de gases de efecto invernadero (hasta el 2006), 3) proporciona un importante ahorro energético; 4) se puede reciclar de nuevo a ácido láctico por hidrólisis o alcoholisis, 5) es compostable, 6) puede ayudar a mejorar la economía agrícola, 7) se pueden manipular las propiedades físicas y mecánicas del polímero a través de la arquitectura del PLA, 8) se pueden producir híbridos de papel y envases plásticos; y 9) se disminuyen los polímeros en los vertederos de basura. Debido a estas ventajas su producción se ha incrementado a 140,000 toneladas por año, aumentando el interés en su investigación como envase de alimentos (Auras *et al.*, 2004; Jamshidian *et al.*, 2010).

Propiedades

El PLA presenta propiedades termoplásticas, físicas, mecánicas, de barrera y ópticas que dependen de la morfología del estado sólido, así como su cristalinización (Gattin *et al.*, 2002). Una cristalinidad baja tiende a someter al polímero a un envejecimiento rápido (en días) bajo condiciones ambientales. Su temperatura de transición vítrea (T_g) depende del peso molecular y la pureza óptica del polímero, así como de su historia térmica, la cual incrementa junto con el peso molecular (Lim *et al.*, 2008). El PLA presenta

una entalpía de fusión de 40-50 J/g, una Tg de 55 °C y una temperatura de fusión (Tm) de 180°C, siendo esta última la temperatura requerida para su procesamiento, por tecnologías basadas en el punto de fusión (Garlotta, 2001).

Una de las propiedades que juegan un papel importante en los polímeros es su índice de cristalinidad, la cual indica la proporción del polímero cristalino con respecto al contenido amorfo. Esta propiedad influye en propiedades como la dureza, el módulo de tensión, resistencia a la tracción, la rigidez, punto de pliegue y punto de fusión (Jamshidian *et al.*, 2010). Los cristales de PLA pueden crecer en 3 posiciones estructurales llamadas formas α , β y γ . Se caracterizan por diferentes conformaciones de hélice y las simetrías de las células que se desarrollan a diferentes tratamientos térmicos y mecánicos. La forma α crece sobre la cristalización en frío o fundido, la forma β se desarrolla en estiramiento mecánico, y la forma γ que se ha estudiado recientemente, se desarrollan en sustrato hexametilbenceno (Di Lorenzo, 2005; Auras *et al.*, 2010). La estructura α es muy estable y presenta una Tm de 185°C comparada con la estructura β que presenta una Tm de 175°C (Lim *et al.*, 2008; Auras *et al.*, 2010).

Las propiedades físicas de un polímero como el PLA pueden sufrir cambios en la Tg y Tm durante su procesamiento. Dentro de las técnicas de análisis térmico que se pueden utilizar para determinar cambios en la Tg y Tm del PLA se encuentra la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Con esta técnica se mide la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la referencia, mientras la temperatura de la muestra cambia a un ritmo constante. Este método calorimétrico se basa principalmente en la medición de diferencias de energía, donde un incremento en el flujo de calor evidencia

un proceso exotérmico y una disminución indica un proceso endotérmico (Skoog *et al.*, 2008; Auras *et al.*, 2010).

La pureza óptica del PLA tiene efectos en las propiedades estructurales, térmicas, mecánicas y de barrera del polímero. El PLA con un contenido mayor al 90% de L-, tiende a ser cristalino, mientras que con una pureza óptica menor son amorfos. Sin embargo, la T_m , T_g y cristalinidad disminuyen con el aumento del contenido del isómero L. Por el contrario, las resinas de PLA de contenido alto de D-isómero (4-8 %) son más adecuados para el termoextruido y moldeado por soplado, ya que este polímero es más fácil de procesar cuando la cristalinidad es baja (Lim *et al.*, 2008).

Otra propiedad óptica importante en el PLA es la transmisión de luz ultravioleta, ya que ésta es importante en el diseño adecuado de un envase cuya principal finalidad es conservar y proteger al alimento hasta llegar al consumidor. El PLA presenta una máxima transmisión de luz UV en un rango inferior de longitud de onda de 190-220 nm (Auras *et al.*, 2010).

Una herramienta importante para la caracterización química y física de los polímeros como el PLA, es la espectroscopía infrarroja (IR). La cual es una herramienta analítica no destructiva que se utiliza para identificar compuestos orgánicos (Auras *et al.*, 2010). Los IR son el resultado de distintos cambios energéticos producidos por las transiciones de las moléculas de unos estados energéticos vibracionales y rotacionales a otros. La espectroscopía IR presenta una sensibilidad alta a los cambios en los momentos dipolar que se producen en los grupos vibracionales, ya que para absorber radiación IR, una molécula sufre un cambio neto en el momento dipolar cuando vibra o gira. Sólo en estas circunstancias, el campo eléctrico alternante de la radiación puede interaccionar con la molécula y modificar la

amplitud de alguno de sus movimientos. Con lo cual se generan bandas por la estereoregularidad y regularidad conformacional de las cadenas poliméricas y cristalinidad del polímero. La regularidad conformacional depende de las interacciones intermoleculares entre grupos químicos vecinos de la misma cadena y la cristalinidad depende de las fuerzas intermoleculares entre cadenas adyacentes (Skoog *et al.*, 2008; Auras *et al.*, 2010).

La espectroscopía IR es utilizada para identificar las pequeñas diferencias en la estructura y constitución de la molécula del PLA. La presencia de compuestos polares como el antioxidante rutina y sus productos de descomposición pueden ser detectados por IR, así como cambios en la distribución de los máximos de absorción (Skoog *et al.*, 2008).

Aplicaciones

El PLA ha tenido una amplia aplicación en medicina, debido a su biodisponibilidad y compatibilidad con el cuerpo humano. Dentro de sus aplicaciones medicas se utiliza como material de sutura, implantes en cirugías reconstructivas, en capsulas de liberación controlada de medicamentos (Auras *et al.*, 2004).

Actualmente el PLA tiene aplicaciones en el campo de los alimentos como envases termoformados para productos con una vida de anaquel corta, como son frutas, verduras y ensaladas. Sin embargo, su utilización como envase contenedor de alimentos es limitada debido a su Tg baja, lo cual limita su aplicación como envase de alimentos que necesitan ser expuestos a temperaturas superiores a su Tg (Lim *et al.*, 2008; Auras *et al.*, 2010).

En el área de los envases para alimentos, existen dos tipos de envases que han tomado importancia en cuanto a aplicaciones, los cuales son: películas poliméricas de valor alto y envases rígidos-termoformados. Estos se pueden obtener debido a las características ópticas y mecánicas del PLA, incluyendo rigidez, claridad, baja temperatura de sellado, así como propiedades de barrera que protegen el sabor y aroma del alimento contenido (Jamshidian *et al.*, 2010).

En cuanto al desarrollo de películas poliméricas de valor alto, recientemente se han realizado investigaciones donde se han fabricado películas de PLA por extrusión, a las cuales se han incorporado compuestos antioxidantes como BHT (Ortiz-Vázquez *et al.*, 2011), α -tocoferol (Manzanarez-López *et al.*, 2011), resveratrol (Soto-Valdez *et al.*, 2011), β -carotenos (López-Rubio y Lagaron, 2010), con la finalidad de estudiar la difusión de los compuestos antioxidantes del PLA hacia simulantes de alimentos, así como sus propiedades ópticas, térmicas y mecánicas. Por lo cual, es factible la fabricación de películas de PLA por extrusión con incorporación de compuestos antioxidantes que se encuentren presentes en productos vegetales o residuos industriales para generar una película con capacidad antioxidante procedente de fuentes renovables.

Estudios han mostrado que una vez que el PLA entra en contacto con el alimento, el nivel de ácido láctico que migra procedente del envase es 700 veces menor que el promedio de ácido láctico ingerido diario por un infante (Jamshidian *et al.*, 2010; Soto-Valdez, 2010). El PLA ha sido reconocido por la FDA como seguro (GRAS) para ser utilizado en contacto con alimentos (Auras, *et al.*, 2010). Por lo cual, este polímero biodegradable está incrementando su importancia día con día en la industria alimentaria como una alternativa "verde" de envases de alimentos, debido a la necesidad de

sustituir a los polímeros procedentes del petróleo, por polímeros procedentes de fuentes renovables como es el PLA.

Procesamiento

Las tecnologías de procesamiento que se utilizan para transformar el PLA en envases se basan principalmente en su punto de fusión y sus propiedades termoplásticas, ya que el PLA es fundido para posteriormente ser moldeado y solidificado. Dentro de los diferentes tipos de procesamiento que se pueden aplicar al PLA se encuentran: extrusión, inyección por moldeo, laminado, termoformado, espumado, entre otros.

La extrusión es un tipo de procesamiento común para polímeros termoplásticos como el PLA, donde la resina se funde para posteriormente formarse como película, la cual puede ser soplada, aplanada, entre otros procesos poliméricos. El proceso de extrusión se compone de un barril de metal calentado eléctricamente, una tolva para la alimentación de la resina, un motor para hacer girar un tornillo y un dado para dar forma al polímero fundido. La combinación de la energía térmica (generada por un calentador y calor por fricción debido al roce entre el plástico), el tornillo y el barril, proporcionan calor suficiente para fundir los pellets (Figura 5) (Lim *et al.*, 2008; Jamshidian *et al.*, 2010). La relación entre la duración de vuelta del tornillo y su diámetro (L/D), determina el corte y el tiempo de permanencia de la masa fundida. Los tornillos con una L/D alta proporcionan un mayor calentamiento por cizalladura, una mejor mezcla y un mayor tiempo de residencia para fundirse en el extrusor. Otro parámetro importante es la relación de compresión del tornillo, que es la relación de la profundidad de vuelo en la sección de alimentación, cuanto mayor sea la relación de

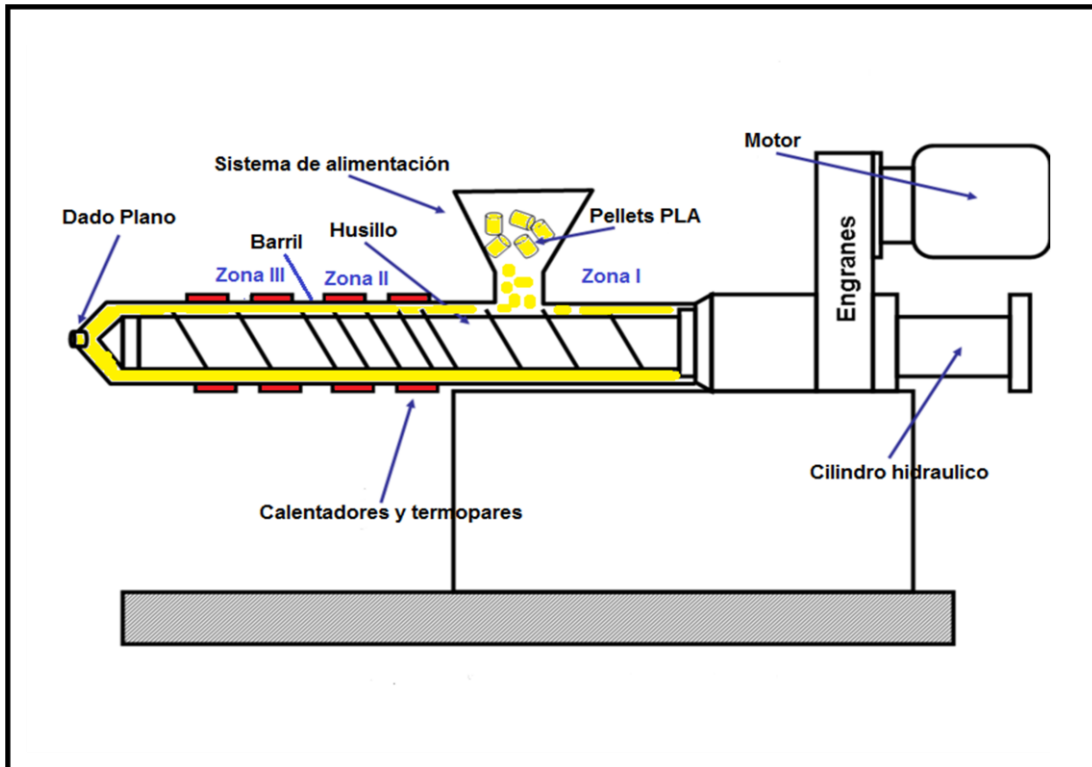


Figura 5. Procesamiento por extrusión acoplado a dado plano (Jamshidian, et al., 2010).

compresión que tiene un tornillo, mayor es el calentamiento por cizalladura que se tiene (Jamshidian *et al.*, 2010).

Dentro de las ventajas que presenta el PLA para ser utilizado como envase de alimentos se encuentra su naturaleza biodegradable. Lo cual permite degradar al polímero en un periodo de tiempo inferior al que requieren los polímeros convencionales, contribuyendo a la disminución la contaminación ambiental que a diario se genera por residuos plásticos. Otra ventaja que presenta el PLA es su origen procedente de fuentes renovables, permitiendo sustituir a este tipo de envases por aquellos procedentes de fuentes no renovables como es el petróleo. Así mismo, este tipo de envases termoplásticos pueden ser utilizados como vehículo de transporte de los compuestos antioxidantes rutina, isoquercetina y quercetina hacia alimentos con contenido lipídico, con la finalidad de protegerlos del deterioro oxidativo y con ello incrementar su vida de anaquel. Estos antioxidantes pueden ser extraídos de fuentes naturales como son los subproductos industriales, conservando así la naturaleza del polímero aunado a la tendencia por parte del consumidor por adquirir alimentos con antioxidantes naturales.

Por medio del proceso de extrusión del PLA se pueden incorporar a la matriz polimérica los antioxidantes rutina, isoquercetina y quercetina sin afectar su actividad antioxidante. Lo cual se debe a que la temperatura de degradación de los compuestos naturales es superior al punto de fusión del PLA, generando así un envase activo aplicable a alimentos (Soto Valdez *et al.*, 2011).

Desarrollo de Envases Activos

La incorporación de agentes antioxidantes naturales o sintéticos a los alimentos evita la oxidación de estos y con ello la producción de olor y sabor

a rancidez durante su almacenamiento (Rodríguez-Aguilera y Oliveira, 2009). Este proceso de adición se puede realizar de manera directa o indirecta. Al adicionar estos agentes protectores de manera directa a los alimentos, se puede generar la prooxidación de los antioxidantes. Este efecto se puede observar en compuestos naturales como son los flavonoides una vez que se encuentran presentes en cantidades elevadas (Escamilla *et al.*, 2010). Una alternativa para evitar esta problemática es la incorporación de los aditivos en alimentos a través de la matriz polimérica del envase con liberación gradual durante su almacenamiento, proporcionándoles una vida de anaquel estable.

Envases Activos

Dentro de los envases activos, se encuentran aquellos en los que sus constituyentes incluidos en el material de envase o dentro del envase son liberados, con la finalidad de proteger a los alimentos (Robertson, 2006). Estos envases interactúan con su contenido, conservando sus propiedades sensoriales y nutricionales, con lo cual proporcionan un alimento seguro y de calidad (Suppakul *et al.*, 2003; Rodríguez-Aguilera y Oliveira, 2009). Dentro de las características que presenta este tipo de envase se encuentra remover o adicionar algún componente, prolongar la vida de anaquel de su contenido, así como retardar su deterioro por agentes externos o actividad bioquímica de sus componentes (Yam *et al.*, 2005). Se han desarrollado diferentes tipos de envases activos con incorporación de compuestos antioxidantes, cuya finalidad es proteger a los alimentos de la oxidación durante su almacenamiento (Rooney, 1995, Suppakul *et al.*, 2003).

Envases Activos con Poder Antioxidante.- Los sistemas de envases activos con antioxidantes se pueden dividir de acuerdo a su mecanismo de acción por a) inclusión en la matriz polimérica, y liberación al alimento por migración; b) Inmovilización en la superficie del envase; c) Envase con actividad antioxidante inherente. Por lo cual, el mecanismo de liberación del antioxidante dependerá del tipo de envase activo utilizado (Rooney, 1995; Vermeiren *et al.*, 1999).

Los envases antioxidantes proporcionan a los alimentos una vida de anaquel mayor que un envase convencional, ya que la oxidación de lípidos se inicia en la superficie de los alimentos, donde el oxígeno es el principal promotor de la oxidación, la cual es promovida y difundida a través del alimento (Graciano-Verdugo *et al.*, 2010). Por lo tanto, los compuestos antioxidantes actúan removiendo las especies reactivas de oxígeno, evitando reacciones de oxidación y protegiendo al alimento envasado (Nerín, *et al.*, 2008). Así, la concentración de antioxidantes incrustados en la matriz polimérica disminuye durante su almacenamiento por difusión a través del polímero, estabilizando al alimento y retrasando el proceso de oxidación (Rooney, 1995). La difusión del antioxidante del polímero al exterior del envase puede ser controlada utilizando una capa polimérica de baja permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno en la parte externa del envase antioxidante y con ello garantizar la difusión del antioxidante a la matriz del alimento (Vermeiren *et al.*, 1999; Granda-Restrepo *et al.*, 2009). En este sentido, este tipo de envases activos representa una alternativa de protección del producto frente al deterioro oxidativo.

Aplicaciones.- El desarrollo de envases activos en los últimos años ha tomado importancia en la industria alimentaria. Ya que su finalidad es brindar protección a los alimentos frente al deterioro oxidativo producido durante su

almacenamiento, salvaguardando sus propiedades nutricionales, bioquímicas y sensoriales. Graciano-Verdugo *et al.*, (2010), desarrollaron una película de PEBD con α -tocoferol a una concentración de 20 y 40 mg/g. Este envase activo se puso en contacto con aceite de maíz a 5, 20 y 30°C, encontrando que el contenido de hexanal en el aceite fue bajo, lo cual demostró que ambas películas proporcionaron una estabilidad oxidativa del aceite por 16 semanas a 30°C, comparado con la película testigo que se mantuvo 12 semanas.

Granda-Restrepo *et al.*, (2009), desarrolló una película multicapa con PEAD, EVOH y PEBD, adicionando a esta capa 40 mg/g de α -tocoferol. Una vez obtenida la película envasó leche entera en polvo y con la finalidad de evaluar la estabilidad oxidativa y se almacenó a 30 y 40°C. La película con antioxidante produjo un retraso en la oxidación de la leche a 40°C a partir de los 50 días de almacenamiento, y a 30°C a los 20 días de almacenamiento. Con este tipo de tecnología, se puede incrementar el tiempo de almacenamiento del alimento, proteger su calidad y propiedades sensoriales, controlando los procesos de oxidación, por medio de la migración de los compuestos antioxidantes al alimento.

Migración

La migración es un proceso de transferencia de masa donde las sustancias de peso molecular bajo son liberadas del envase hacia el alimento. Este proceso se lleva a cabo por difusión, disolución y procesos de equilibrio de compuestos incorporados en la matriz polimérica (Vermeiren *et al.*, 1999; Graciano-Verdugo *et al.*, 2010). En materiales poliméricos los mecanismos de transferencia de masa como componentes, aditivos y residuos de

polimerización se incorporan a través del polímero al producto envasado (Catalá y Gavara, 2002). Dentro de las sustancias que pueden migrar hacia los alimentos se encuentran aditivos, como los antioxidantes, cuya finalidad es encontrarse presente en el producto acabado. Este proceso de transferencia de masa depende de factores como composición del material de envase y temperatura a la que se encuentre el sistema, para que se lleve a cabo en mayor o menor medida (Vaclavik, 2007).

Etapas del proceso de migración

El sistema de migración de la matriz polimérica en contacto con el alimento comprende 3 fases: medio ambiente, alimento envasado y envase, que comprende a su vez, el recipiente y el espacio de cabeza o atmósfera interna. Cada una está constituida por diversos componentes de movilidad alta, como oxígeno, compuestos volátiles, monómeros, etc., mientras que los componentes como el polímero se consideran estáticos. Los componentes móviles son transferidos desde el envase a las otras fases hasta que alcancen el equilibrio (concentración) y el potencial químico sea igual. Este proceso se desarrolla en 3 etapas, difusión del migrante del polímero, disolución en la interface alimento-envase y dispersión en el alimento (Figura 6) (Catalá y Gavara, 2002).

La etapa I tiene lugar en áreas amorfas de la matriz polimérica, donde está controlada por el proceso de difusión del migrante. Esta transferencia de masa se lleva a cabo a través de espacios libres transitorios originados por los movimientos moleculares naturales aleatorios de fragmentos del polímero. Obedece a las leyes de Fick de difusión, produciendo un flujo de migrante en dirección contraria a la diferencia de concentración a lo largo del

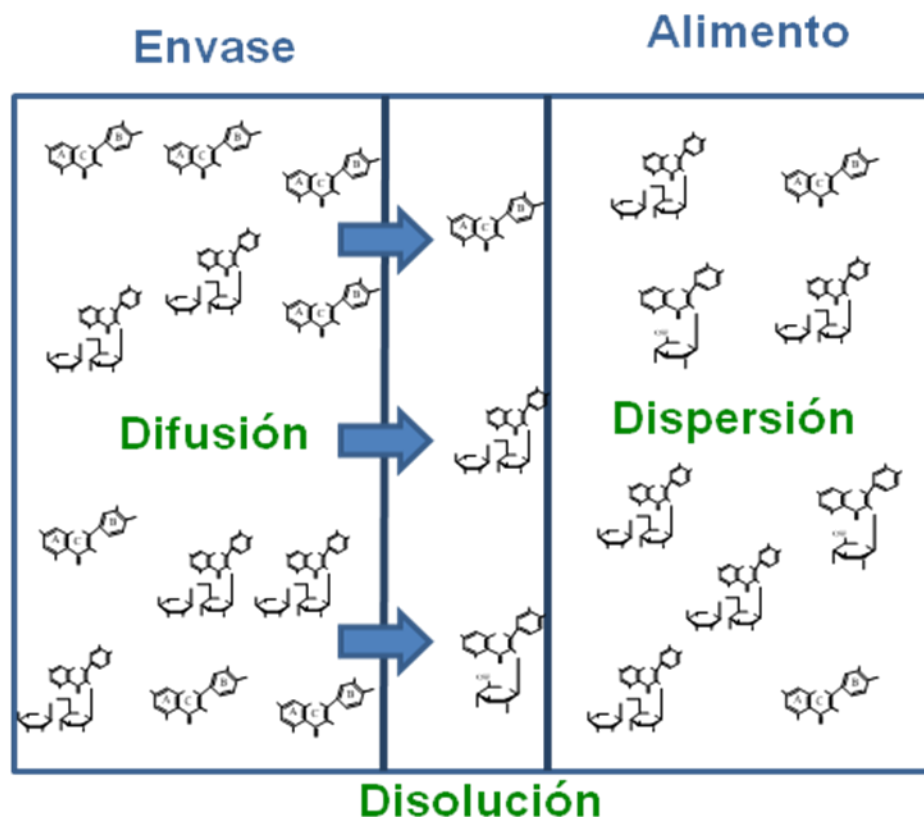


Figura 6. Proceso de migración. Tomado de (Catalá y Gavara, 2002).

espesor del polímero. Catalá y Gavara (2002), describen 3 modelos de migración de compuestos de bajo peso molecular: no migración, migración no controlada (independiente) y migración dependiente del alimento.

La etapa II se desarrolla en la interface entre el alimento y el polímero, ocurriendo disolución de los migrantes en el alimento y produciéndose un equilibrio químico. Termodinámicamente, el equilibrio entre fases se establece cuando el potencial químico de las sustancias presentes en el polímero y el alimento se igualan.

En la etapa III se lleva a cabo la dispersión del migrante al alimento. El migrante llega a aquí ya solvatado por el alimento. Si el producto es sólido, un líquido muy viscoso o el producto envasado no sufre manipulaciones que agiten el contenido, el migrante se difunde en el alimento de acuerdo con las mismas leyes de la etapa I. Dado que los coeficientes de difusión (D) en los polímeros son mayores que en los alimentos, esta etapa no interviene en la práctica ni en el equilibrio del sistema ni en su cinética. Cuando el alimento es líquido y existe agitación constante, no se considera esta etapa y se supone que el migrante está homogéneamente disuelto en el alimento. La migración involucra las sustancias transferibles, matriz polimérica, alimento, composición química del polímero y estructura del polímero (Catalá y Gavara, 2002).

Migración de Antioxidantes del Material de Envase hacia el Alimento

El fenómeno de migración puede ser de gran beneficio para la industria alimentaria si se utiliza una matriz polimérica impregnada con antioxidantes procedentes de subproductos agrícolas. Dentro de los antioxidantes de peso molecular bajo que se pueden encontrar en estos subproductos agrícolas, se

encuentra rutina y sus productos de descomposición isoquercetina y quercetina. Los cuales previenen y retardan el proceso de oxidación y los efectos causados por tal deterioro, como cambios de color y sabor (Hirota *et al.*, 1998; Chiodo *et al.*, 2010; Mascheroni *et al.*, 2010).

Se han realizado investigaciones en las que se ha utilizado al PLA como matriz polimérica a la que se le han incorporado antioxidantes que se encuentran presentes en la naturaleza así como sintéticos. A estas películas se les ha determinado la migración de los compuestos incorporados en el plástico hacia el simulante de alimento. Ortiz-Vázquez *et al.*, (2011) desarrolló una película de PLA a la cual le incorporó durante su procesamiento 1.5 % de BHT. Para determinar la velocidad de difusión del antioxidante utilizó como simulantes de alimentos agua, etanol al 95% y aceite fraccionado de coco a 23, 31 y 43°C. Los D que obtuvieron en etanol 95% fueron en el orden de 10^{-11} a 10^{-9} cm^2/s . En el estudio de difusión de BHT a agua por 100 días no se detectó la presencia de este antioxidante. Sin embargo, en la película PLA-BHT en contacto con aceite fraccionado de coco se cuantificó una migración de 1.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 90 días de contacto y 3.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 100 días de contacto a 23 y 43°C de almacenamiento, respectivamente. Esta migración fue más lenta hacia aceite fraccionado de coco que a etanol 95%, no habiendo migración hacia agua a ninguna temperatura.

Dentro de los estudios de migración de antioxidantes naturales utilizando como matriz polimérica el PLA, Manzanarez-López *et al.*, (2011), elaboró una película de PLA con α -tocoferol al 2.58%, el cual puso en contacto directo por inmersión en aceite fraccionado de coco en ausencia de luz por 30, 45 y 190 días para 20, 30 y 40°C de almacenamiento, respectivamente. La migración reportada de α -tocoferol para este estudio fue 8, 10 y 16.20

$\mu\text{g/mL}$ para cada temperatura, respectivamente. La migración baja se atribuyó a la formación de puentes de hidrógeno del PLA con el α -tocoferol, permitiendo sólo la migración del antioxidante presente en la superficie de la película. Los autores argumentan que la migración a 40°C ($16.20 \mu\text{g/mL}$) se generó debido al movimiento molecular, ya que la temperatura de tratamiento estuvo muy próxima a la T_g del polímero. En este sentido la temperatura presentó un efecto positivo en la migración del antioxidante, incrementándose conforme aumentó la temperatura.

Soto-Valdez *et al.*, (2011), desarrolló una película de PLA con 1 y 3% (PR1 y PR3) de resveratrol. Ésta película se puso en contacto con etanol a 9, 23, 33 y 43°C . La cinética de difusión del resveratrol siguió las leyes de Fick, presentando D de 3.47 y 3.49×10^{-13} para 9°C , 2.30 y 3.06×10^{-11} para 23°C , 2.26 y 4.17×10^{-10} para 33°C y 8.51 y 8.26×10^{-10} para 43°C cm^2/s para las películas PR1 y PR3 respectivamente. Los autores reportan que la temperatura tiene una función importante en la velocidad de difusión de los antioxidantes hacia los simulantes de alimentos, ya que conforme la temperatura del sistema aumenta la velocidad de difusión del compuesto incrementa. Por lo cual, por medio de la temperatura se puede controlar la velocidad de difusión de los aditivos incorporados en la matriz polimérica.

Los polifenoles presentan una baja difusividad en la matriz de PLA. Con la finalidad de incrementar la velocidad de migración desde la matriz polimérica hacia el simulante de alimento Mascheroni *et al.*, (2010), incorporó el 13% de propóleos a una matriz de PLA modificada con polietilenglicol al 15% y bentonita de calcio al 10%. Utilizó como simulantes de alimentos agua y etanol a 25°C , obteniendo un coeficiente de difusión de los propóleos en el orden de $10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$.

Actualmente, no se han encontrado reportes de películas de PLA aditivadas con flavonoides tales como rutina, quercetina o isoquercetina. López-de-Di-castillo *et al.*, (2010) elaboró una película de EVOH con quercetina al 1 y 5%, a la cual le evaluó la difusión del antioxidante a etanol 95%, etanol 10% y agua. El D que determinaron para etanol 95% fue de $7 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, esto se debió a la solubilidad alta del antioxidante en etanol. Para etanol 10% y agua calcularon un D muy bajo, en el orden de $10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$. Así mismo, Koontz *et al.*, (2010) elaboró una película de PELBD con quercetina para evaluar la difusión del antioxidante a aceite de coco, encontrando que quercetina no migró a niveles detectables. El proceso de difusión no sólo depende del antioxidante, polímero, simulante de alimento, polaridad de los mismos, temperatura del sistema, etc., sino de todos estos factores en conjunto, así como de las fuerzas de atracción electrostáticas que se generen entre el antioxidante y el polímero y con el simulante de alimento.

Con la finalidad de evaluar la cinética de difusión de los compuestos fenólicos desde la matriz polimérica hacia simulantes de alimentos, en el presente trabajo se estudió la fabricación de una película de PLA, a la cual se le incorporaron flavonoides. Dentro de los compuestos fenólicos que se pueden incorporar al PLA se encuentra el flavonoide rutina, el cual de acuerdo a estudios reportados por Rohn *et al.*, (2007), al ser sometido a temperaturas altas puede sufrir una descomposición térmica dando como resultado isoquercetina y quercetina, los cuales son antioxidantes de alta capacidad estabilizadora de radicales libres (Escamilla *et al.*, 2010; Chiodo *et al.*, 2010). Estos antioxidantes una vez presentes en la matriz polimérica pueden migrar gradualmente de la película de PLA al alimento, con diferente velocidad de difusión de acuerdo a su tamaño de molécula.

HIPÓTESIS

La difusión de rutina y sus productos de descomposición se lleva a cabo de manera gradual de una película de PLA a simulantes de alimentos durante el almacenamiento, produciendo un efecto positivo en la estabilidad oxidativa de los mismos.

OBJETIVOS

General

Elaborar una película de PLA con rutina y determinar la migración de este compuesto y sus productos de descomposición a simulantes de alimentos, así como el efecto en la estabilidad oxidativa de aceite de soya.

Específicos

Elaborar películas de PLA incorporando rutina y verificar después de la fabricación por extrusión con dado plano, la concentración de este antioxidante y la de sus productos de descomposición.

Determinar la difusión de rutina y sus productos de descomposición a simulantes de alimentos a base de etanol.

Determinar la difusión de rutina y sus productos de descomposición de la película de PLA hacia un aceite vegetal.

Evaluar el efecto de las películas en la estabilidad oxidativa del aceite vegetal durante el almacenamiento a 30°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se desarrolló en 3 etapas:

Etapa I.- Elaboración de películas por extrusión de PLA con rutina y determinación del efecto de la temperatura en su descomposición.

Etapa II.- Estudio de difusión de rutina y sus productos de descomposición de la película de PLA a simulantes de alimentos.

Etapa III.- Evaluación del efecto de la película con rutina y sus productos de descomposición en la estabilidad oxidativa de aceite de soya.

Materiales

Para la fabricación de las películas se empleó PLA 4042D, marca NatureWorks (Blair, EUA). Los antioxidantes utilizados fueron rutina al 95%, isoquercetina al 90% y quercetina al 98%, marca Sigma (St. Louis, EUA), así como butilhidroxitolueno (BHT) (TCI, Japón). Se utilizó metanol grado reactivo y grado HPLC, agua HPLC, marca J. T. Baker (Xalostoc, México) como solvente de extracción y fase móvil, así como ácido fórmico 98-100% grado reactivo, marca Merck (Darmstadi, Alemania). Para la determinación de IP se utilizó ácido acético glacial, así como almidón marca, J. T. Baker (Xalostoc, México), Iso-octano grado reactivo, marca Honeywell (Muskegon, EUA), Yoduro de potasio, marca ACS Fermont (Monterrey, México), tiosulfato de sodio 0.1 N, marca Golden bell (D.F., México) y lauril sulfato de sodio, marca Faga Lab (Guamúchil, México). Para la determinación del % de

inhibición se utilizó 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), marca Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Para el estudio de estabilidad oxidativa se utilizó aceite de soya sin antioxidantes proporcionado por Industrializadora Oleofinos S.A. de C.V. (Guadalajara, México).

Equipos

Los equipos utilizados en el experimento fueron: molino Thomas Wiley Laboratory Mill, modelo 4 (Philadelphia, EUA). Estufa convencional VWR, modelo 1321F (Cornoelius, EUA). Para la fabricación de las películas se utilizó extrusor de 2.5 kg/h de capacidad, cortador y dado plano Beultelspacher (D.F., México). Balanza analítica Adventure-Pro, Ohaus (Pine Brook, EUA). Para medir el espesor de las películas se utilizó micrómetro digital EJ: Cady y Co, modelo DTT (Wheeling, EUA). Para la identificación de los antioxidantes presentes en la película se utilizó HPLC Agilent, acoplado a un espectrómetro de masas serie 1100 Trap con detector VL y trampa de iones (Walnut Creek, EUA). La cuantificación de los antioxidantes extraídos de las películas se realizó por HPLC Varian star, modelo 9012, con inyector Rheodyne, modelo 7125 (Walnut Creek, EUA), acoplado a un detector UV con arreglo de diodos (HPLC-UV-DAD), modelo Varian Prostar 335 (Victoria, Australia) y una estación de trabajo Galaxy, así como un horno Eppendorf, modelo CH-500 (New York, EUA) para controlar la temperatura de la columna. Para determinar las propiedades ópticas de las películas se utilizó colorímetro Konica Minolta CR-300 (NJ, EUA), espectrofotómetro Uv-visible Varian, Cary 50 Bio (NJ, EUA), calorímetro diferencial de barrido DSC, modelo Diamond marca Perkin Elmer y su programa PIRYS versión 3.5

(Waltham, EUA), así como un espectrofotómetro IR de transformadas de Fourier (FTIR), Protegé 460 Nicolet Analytical Instruments (Madison, EUA). Para la determinación del peso molecular del polímero se utilizó un cromatógrafo de permeación en gel (GPC) Waters 1515, (Milford, EUA) con un detector de índice de refracción, Waters 2414 (Milford, EUA).

Etapa I

Elaboración de Películas de PLA con Rutina por Extrusión y Determinación del Efecto de la Temperatura en su Descomposición.

Elaboración de Pellets y Películas de PLA-Rutina

Los pellets y las películas con antioxidante rutina se fabricaron en el laboratorio de envases del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), unidad Hermosillo, Sonora. Primeramente, la resina de PLA se molió para reducir el tamaño de partícula. Posteriormente se sometió a secado a 40°C por 24 horas en estufa convencional. Para fabricar los pellets de PLA con antioxidante rutina, así como los testigos, se mezcló manualmente la resina molida con rutina (PLA-Ru), sometiéndose al proceso de extrusión con un extrusor de 2.5 Kg/h de capacidad, utilizando un tornillo simple con dado con salida de filamento a diferentes perfiles de temperatura (cuadro 1). Las condiciones de procesamiento de los pellets en cada perfil de temperatura se muestran en el cuadro 1.

Para la obtención de los pellets de forma cilíndrica los filamentos obtenidos de PLA-Ru y testigo de cada perfil de temperatura, se pasaron por un cortador Beutelspacher de 2 amperes. Las películas de PLA-Ru y testigos se

Cuadro 1. Diferentes condiciones de procesamiento de pellets de PLA-Ru.

Pellets PLA-Ru	Temperatura de procesamiento °C			Velocidad de tornillo RPM	Rutina incorporada (mg/g)	Porcentaje de rutina incorporada
	^a Zona I	^b Zona II	^c Zona III			
1	130	135	140	40	17.72	1.77
2	150	155	160	32	39.59	3.96
3	155	160	165	40	39.12	3.91

Cada tratamiento tiene su testigo.

^aZona I zona de alimentación. ^bZona II transición ó sección de compresión y fusión. ^cZona III final del husillo.

obtuvieron al procesar los pellets previamente elaborados, utilizando un extrusor mono husillo de 2.5 Kg/h de capacidad provisto de cuatro zonas de calentamiento y con un dado de salida plana. El perfil de temperatura utilizado para la fabricación de las 6 películas fue 160, 150, 145 y 140°C para las zonas I, II, III y IV, respectivamente, con una velocidad de tornillo de 60 rpm. Las películas presentaron un espesor final de 43.18 μm determinado mediante un micrómetro digital. Las películas elaboradas se almacenaron a -20°C con protección de luz para su posterior análisis. Adicionalmente se elaboró una película de PLA sin antioxidantes, la cual se utilizó como testigo para cada antioxidante evaluado. La fabricación tanto de pellets como de las películas se realizó en ausencia de luz.

Identificación y Cuantificación de Rutina Remanente en Película de PLA y sus Productos de Descomposición

Para cuantificar los remanentes de rutina y sus productos de descomposición en los pellets y películas PLA-Ru #1, 2 y 3 se realizaron extracciones utilizando 0.10 g de pellets y 0.20 g película (0.2 x 0.2 cm) en 38 mL de metanol grado reactivo. Se agregó 0.001 g de BHT para los pellets y película PLA-Ru #1 y 0.003 g de BHT para pellets y película PLA-Ru # 2 y 3. Las extracciones se realizaron en ausencia de luz y agitación constante a 40°C, por 24 horas. El procedimiento se repitió hasta que no se detectaron los antioxidantes en pellets y películas. Las extracciones se realizaron por triplicado.

La identificación de los compuestos extraídos de los pellets y películas, se realizó en un HPLC fase reversa equipado con una columna Waters C₁₈ 3.0x150 mm 3.5 μm con detector UV, acoplado a un espectrómetro de

masas con detector VL y trampa de iones. Las condiciones utilizadas fueron polaridad negativa (ESI), temperatura de secado de 350°C, nebulizador de 60 psi, gas de secado de 12 L/min y un voltaje capilar de 3700 V. Los compuestos se identificaron en base a su masa molecular.

Una vez identificados los compuestos fenólicos extraídos de las películas, se procedió a su cuantificación por HPLC en fase reversa en un equipo Varian, acoplado a un detector UV con arreglo de diodos y una estación de trabajo Galaxy, a una longitud de onda de 360 nm. Se utilizó una columna Discovery HS PEG 15 cm x 4.6 mm protegida con una precolumna C₁₈. La temperatura de la columna se controló a 35°C. El volumen de muestra del inyector fue de 20 µL. La fase móvil empleada fue metanol:agua acidificada al 5% con ácido fórmico, con gradiente de 35:65 durante 5 minutos, 55:45 durante 3 minutos, 70:30 durante 2 minutos y 40:60 durante 10 minutos. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min.

La cuantificación se realizó mediante una curva estándar con rutina, isoquercetina y quercetina disueltas en metanol. El rango de concentración que se utilizó fue de 0.315 a 40.000 µg/mL. La ecuación de la curva de cada antioxidante se obtuvo por análisis de regresión lineal graficando la concentración del antioxidante contra el área bajo la curva obtenida en el cromatograma. Las concentraciones de los antioxidantes se reportaron en mg de compuesto/g de PLA. Las soluciones se prepararon a temperatura ambiente protegidas de la luz.

Límite Mínimo de Cuantificación y Porcentaje de Recuperación

El límite mínimo de cuantificación del equipo se determinó inyectando una

mezcla de los estándares rutina, isoquercetina y quercetina. Se inició con una concentración de 1 µg/mL, la cual se fue disminuyendo hasta obtener una concentración próxima superior a la que ya no pudo ser cuantificada por el equipo. El análisis se realizó por triplicado.

El porcentaje de recuperación del método se determinó adicionando una concentración 5 µg/mL de la mezcla de rutina, isoquercetina y quercetina a la solución de extracción de la película testigo. Las muestras se sometieron a las mismas condiciones de extracción y cuantificación descritas anteriormente.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para determinar el efecto de las temperaturas de procesamiento sobre la descomposición de rutina, se utilizó un diseño completamente al azar. La variable de respuesta fue Y_{ij} (concentración de rutina descompuesta). El modelo estadístico aplicado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Concentración de rutina descompuesta a quercetina

μ = Efecto de media general

T_{ij} = Efecto de la temperatura de procesamiento (130-140°C, 150-160°C y 155-165°C).

ϵ_{ij} = Error experimental

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Al encontrar diferencias significativas se realizó una comparación de medias por Tukey-Kramer utilizando el paquete estadístico Number Cruncher Statistical System (NCSS, 2007).

Propiedades Ópticas

Determinación de color. Para evaluar el color se utilizó PLA-Ru #2 y su testigo utilizando un colorímetro. Los resultados se expresaron en valores CIE L*, a* y b*, donde L* indica luminosidad, a* y b* son las coordenadas de cromaticidad (indican direcciones de colores). La coordenada +a* es la dirección del rojo, -a* es la dirección del verde, +b* es la dirección del amarillo y -b* es la dirección del azul. El diferencial de color (ΔE) se calculó con la formula $\Delta E = ((\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L)^2)^{0.5}$. Las mediciones se realizaron por triplicado a cada película.

Espectrometría UV-visible. Para determinar las propiedades ópticas de las películas se midió la absorbancia de la luz UV-visible en películas PLA-Ru y testigo con medida de 1 x 4 cm, colocándose directamente en el portamuestras del espectrofotómetro UV-visible. Se realizó un barrido de 200 a 800 nm con una velocidad de 9600 nm/min.

Espectrometría infrarrojo. Las muestras descritas en la sección anterior fueron analizadas en un espectrofotómetro IR de transformadas de Fourier (FTIR). El espectrofotómetro se calibró utilizando aire. Los espectros se obtuvieron midiendo el porcentaje de transmitancia de las películas, utilizando una resolución de 8 cm^{-1} con 64 escaneos por muestra. Se utilizó un rango de longitud de onda de barrido de $4000 \text{ a } 700 \text{ cm}^{-1}$.

Propiedades Térmicas

Calorimetría diferencial de barrido (DSC). Para conocer el efecto del antioxidante rutina y sus productos de descomposición en la Tg y Tm de las películas se utilizó un DSC. Para el control y establecimiento de las

condiciones se utilizó el programa PIRYS versión 3.5. Las temperaturas utilizadas en las corridas fueron de 25 a 180°C. La velocidad de calentamiento y enfriamiento fueron las mismas para todas las películas con un valor de 10°C/min utilizando atmósfera de aire. Las muestras analizadas fueron PLA sin procesar, películas PLA-Ru #1, 2 y 3 y sus testigos. El análisis se realizó por triplicado.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para determinar el efecto del antioxidante rutina y sus productos de descomposición en la Tg y Tm del PLA, se utilizó un diseño completamente al azar. La variable de respuesta fue Y_{ij} (Tg y Tm). El modelo estadístico aplicado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Tg y Tm

μ = Efecto de media general

T_{ij} = Efecto de la presencia de rutina y sus productos de descomposición

ϵ_{ij} = Error experimental

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Al encontrar diferencias significativas se realizó una comparación de medias por Tukey-Kramer utilizando el paquete estadístico Number Cruncher Statistical System (NCSS, 2007).

Etapa II

Difusión de Rutina y sus Productos de Descomposición de la Película de PLA a Simulantes de Alimentos.

Difusión de Rutina y sus Productos de Descomposición a Simulantes de Alimentos a Base de Etanol

Para determinar la velocidad de difusión de los antioxidantes rutina y sus productos de descomposición de la matriz polimérica hacia etanol al 95%, 50% y 10%, se utilizó la película PLA-Ru #2. El estudio de difusión de los compuestos fenólicos hacia los simulantes de alimentos se realizó de acuerdo a la norma de la ASTM D4754-98 (ASTM, 2006).

Para la evaluación de la difusión de los antioxidantes a etanol al 95% y 50%, se cortaron 4 discos de la película con un sacabocado 2 cm de diámetro (25.25 cm^2) y un espesor de $43.18 \text{ }\mu\text{m}$. Los discos fueron colocados en soportes de acero inoxidable y separados por perlas de cristal para evitar el contacto entre ellos. Los soportes fueron colocados dentro de viales protegidos de la luz y en agitación constante (Figura7).

Etanol al 95% y 50%. A cada vial se le agregó 38 mL de etanol al 95% y 50%, así como 0.002g de BHT. La relación volumen/área obtenida fue de 1.50 mL/cm^2 , valor dentro del rango establecido por la ASTM D4754-98, la cual establece una relación entre 155 y 0.31 mL/cm^2 (ASTM, 2006). Los viales se mantuvieron a 20, 30 y 40°C en agitación constante hasta alcanzar el equilibrio en la difusión. Se realizaron muestreos constantes tomando $250 \text{ }\mu\text{L}$, cuantificando el antioxidante migrado con respecto al tiempo, por la técnica previamente descrita en la etapa I. El contenido de rutina,

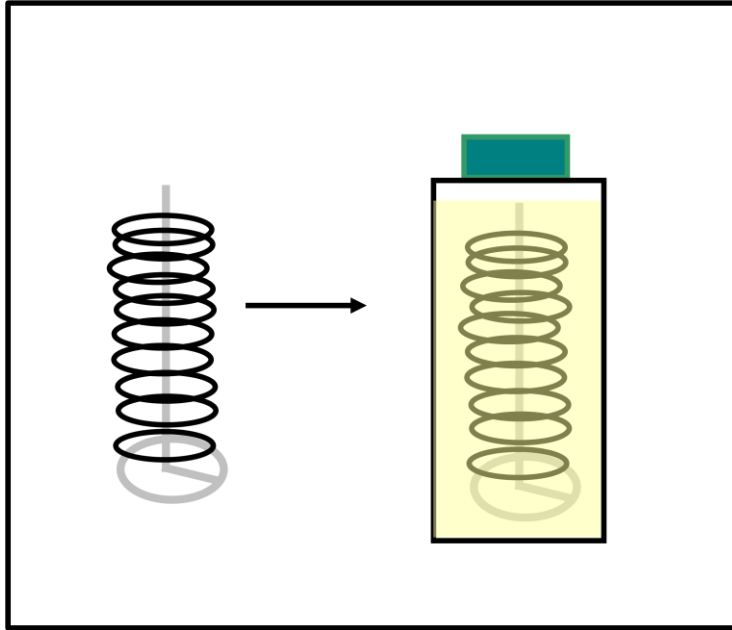


Figura 7. Sistema de migración ASTM D4754-98 (ASTM, 2006).

isoquercetina y quercetina migrado se graficó como difusión (mg/g) con respecto al tiempo de almacenamiento. El estudio se realizó por triplicado para cada temperatura. La cuantificación de cada antioxidante migrado se analizó por separado.

Etanol 10%. Para determinar la velocidad de difusión de los antioxidantes rutina y sus productos de descomposición de la matriz polimérica hacia etanol al 10% se cortaron 8 discos de la película (50.50 cm^2) y un espesor de $43.18 \text{ }\mu\text{m}$. A los viales se les agregó 38 mL de etanol al 10% y 0.004 g de BHT. La relación volumen/área obtenida fue de 0.75 mL/cm^2 . Los viales se mantuvieron a 40°C . Se realizaron muestreos constantes tomando $250 \text{ }\mu\text{L}$, cuantificando el antioxidante migrado con respecto al tiempo de almacenamiento, por la técnica descrita previamente en la etapa I.

Determinación de Remanentes de Rutina y sus Productos de Descomposición Después de los Estudios de Difusión

Para determinar el antioxidante remanente en la película PLA-Ru #2 utilizada en el estudio de difusión, se separaron los discos de PLA-Ru del simulante de alimentos, se evaporó el solvente a temperatura ambiente y ausencia de luz. Posteriormente, se extrajeron los antioxidantes remanentes con 20 mL de metanol, ausencia de luz, agitación constante y 0.002g de BHT por 48 horas, verificando la extracción total de los antioxidantes en las películas. Los antioxidantes extraídos se cuantificaron por la técnica descrita previamente en la etapa I.

Difusión de Rutina y sus Productos de Descomposición de PLA-Ru #2 a un Aceite Vegetal y mezcla aceite:agua.

Para realizar el estudio de difusión de los antioxidantes hacia aceite de soya y mezcla de aceite-agua se utilizaron 8 discos de 2 cm de diámetro (50.50 cm²) de PLA-Ru #2 y un espesor de 43.18 μm. Los discos fueron colocados en soportes de acero inoxidable y separados por perlas de cristal para evitar el contacto entre ellos. Los soportes fueron colocados dentro de viales protegidos de la luz, en agitación constante.

A cada vial se le incorporó 38 mL de aceite de soya y una mezcla de aceite-agua (50:50), así como 0.004g de BHT para evitar que los antioxidantes al migrar al aceite efectuaran su actividad antioxidante. La relación volumen/área que se tuvo fue de 0.75 mL/cm². Los viales se mantuvieron a 40°C por 60 días en agitación. Se realizaron muestreos constantes, tomando 250 μL para cuantificar el antioxidante migrado con respecto al tiempo, por la técnica descrita previamente en la etapa I.

Determinación de Coeficientes de Difusión (*D*) de los Antioxidantes Migrados de la Película PLA-Ru a Simulantes de Alimentos.

La velocidad de difusión de los antioxidantes de la película PLA-Ru #2 hacia el simulante de alimento, se expresa por medio de una solución a la segunda ley de Fick cuando la concentración varía con el tiempo, para un estado no estacionario de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

Para determinar el D de cada uno de los compuestos es necesario conocer el coeficiente de partición ($K_{p,f}$) entre el polímero y la solución, así como el valor de α . El $K_{p,f}$ expresa la solubilidad relativa del migrante entre la matriz polimérica y el simulante de alimentos en el equilibrio y α es el flujo del migrante en el simulante de alimentos. Un $K_{p,f} > 1$ indica una concentración alta del migrante en el polímero, comparado con la concentración del migrante en el líquido. Cuando el $K_{p,f}$ se presenta a concentraciones bajas se puede tomar como un valor constante, el cual se calcula por:

$$K_{p,f} = \frac{C_p}{C_f}$$

Donde la C_p es la concentración del antioxidante en la película en el equilibrio, C_f es la concentración del antioxidante en el simulante de alimentos en el equilibrio.

$$\alpha = \frac{V_S}{K_{P,F} V_P}$$

Donde V_S y V_P son el volumen molar del simulante de alimentos utilizado y del polímero respectivamente.

Para obtener los valores de D se utilizaron las ecuaciones matemáticas 1 y 2 (Catalá y Gavara, 2002; Mascheroni, *et al.*, 2010).

Cuando el volumen de la solución es infinito (todo el migrante se difunde) y $\alpha \gg 1$, $V_S \gg V_P$ y $K_{P,F} < 1$, se utiliza la siguiente solución matemática de la segunda ley de Fick:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{(2n+1)^2}{L^2} \pi^2 Dt\right) \text{ Ecuación 1}$$

Donde M_{t} es la cantidad de antioxidante que se difundió al simulante de alimentos después de un tiempo t ; M_{∞} es la cantidad de antioxidante que se difundió al simulante de alimentos en el equilibrio; t es el tiempo de contacto; D es el coeficiente de difusión y L es el espesor de la película.

Cuando el volumen de la solución es finito o cuando parte del migrante queda en la película al alcanzar el equilibrio se utiliza la ecuación 2:

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

Ecuación 2

Donde M_t es la cantidad de antioxidante que se difundió al simulante de alimentos después de un tiempo t ; M_{∞} es la cantidad de antioxidante que se difundió al simulante de alimentos en estado estacionario; t es el tiempo de contacto; D es el coeficiente de difusión; L es el espesor de la película y q_n son las raíces positivas distintas de cero de $\tan q_n = \alpha q_n$.

El valor de D (cm²/s) se determinó minimizando la suma del cuadrado de los errores (SSE) de los datos experimentales y los valores estimados. Para determinar el ajuste de los datos de la ecuación 1 y 2, se utilizó la función de regresión no lineal en MATLAB R2020b (MathWorks, Natick, MA, US).

Determinación de la Energía de Activación (E_a) de los Antioxidantes Presentes en la Película PLA-Ru #2.

Para determinar el efecto de la temperatura en la difusión del antioxidante rutina y sus productos de descomposición de las películas de PLA hacia los simulantes de alimentos, se calculó la energía de activación (E_a) de la difusión, utilizando la ecuación de Arrhenius:

$$D = D_0 e^{\left[\frac{-E_a}{RT} \right]}$$

Donde D es el coeficiente de difusión; D_0 es el factor pre-exponencial de difusión; E_a es la energía de activación de la difusión; R es la constante de los gases ideales (8.3145 J/mol.K) y T la temperatura en Kelvin. La E_a se obtuvo con la ecuación de la pendiente al graficar el recíproco de la temperatura ($1/T$) vs logaritmo de D ($E_a = -\text{pendiente} \times 2.302R$).

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para determinar si había diferencias por efecto de la temperatura en la difusión de rutina y sus productos de descomposición, se realizó un diseño completamente al azar. El modelo estadístico aplicado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$$Y_i = D$$

μ = Efecto de media general

T_{ij} = Efecto de la temperatura de difusión (20, 30 y 40°C)

ε_{ij} = Error experimental.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Al encontrar diferencias significativas se realizó una comparación de medias por Tukey-Kramer utilizando el paquete estadístico Number Cruncher Statistical System (NCSS, 2007).

Efecto del Procesamiento y Difusión en el Peso Molecular (M_w) del PLA.

Se determinó el M_w , del PLA molido y pellets PLA-Ru #1, 2 y 3 con antioxidantes y testigos. El estudio se realizó con la finalidad de determinar si hubo hidrólisis en la estructura del PLA por efecto del procesamiento, que se manifiestan con una disminución en el tamaño de las cadenas poliméricas que pudieran afectar la difusión de los antioxidantes.

Las muestras de PLA fueron secadas al vacío; 20 mg de PLA se disolvieron en 10 mL de tetrahidrofurano (THF). El M_w se determinó en un cromatógrafo de permeación en gel (GPC), equipado con un detector de índice de refracción. Se utilizaron columnas de 7.8 x 300 mm, desde el inyector al detector conectadas en serie: HR4, HR3 y HR2. Se utilizó elución isocrática de THF a 1 mL/min a 25°C. La temperatura del detector fue de 35°C. Como referencia se utilizó una curva de calibración de M_w de un estándar de poliestireno STD KIT SM 105 como referencia, de 1310 a 3640 Da. Se utilizó la constante de Mark Houwink para PLA en THF a 30°C ($K=0.000174$ L/g y $\alpha=0.736$). Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para determinar el efecto de la temperatura de procesamiento sobre el M_w del PLA, se utilizó un diseño completamente al azar. El modelo estadístico aplicado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$$Y_i = M_w$$

μ = Efecto de media general

T_{ij} = Efecto de la temperatura de procesamiento

ϵ_{ij} =Error experimental.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Al encontrar diferencias significativas se realizó una comparación de medias por Tukey-Kramer utilizando el paquete estadístico Number Cruncher Statistical System (NCS, 2007).

Etapa III

Evaluación del Efecto de la Película con Rutina y sus Productos de Descomposición en la Estabilidad Oxidativa de Aceite de Soya.

Índice de Peróxidos

La estabilidad oxidativa del aceite de soya se evaluó mediante la formación de peróxidos durante el tiempo de almacenamiento (AOCS Cd 8b-90) (AOCS, 2009). Cada tratamiento consistió en 100 mL de aceite de soya, a los cuales se les incorporó 13.5 mg de quercetina, 13.5 mg de BHT, 155.7 cm² de PLA-Ru #2, 155.7 cm² de PLA testigo y una muestra de aceite como testigo. Las muestras se colocaron en botellas de vidrio transparente y se almacenaron a 30°C en presencia de luz con una intensidad de 1135-1845 luxes. Se realizaron muestreos a los 0, 3, 5, 7, 10 y 15 días de almacenamiento. Los resultados se expresaron en mili equivalentes de peróxidos (mEq)/1000 g de muestra. El estudio se realizó por triplicado.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para evaluar el efecto de las películas y antioxidantes quercetina y BHT en la estabilidad oxidativa del aceite de soya, se realizó un diseño en bloques completamente al azar.

El modelo estadístico aplicado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_{ij} + B_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = IP

μ = Efecto de media general

T_{ij} = Quercetina, BHT, PLA-Ru, PLA-testigo y blanco

B_{ij} = Tiempo de muestreo

ϵ_{ij} = Error experimental

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Al encontrar diferencias significativas se realizó una comparación de medias por Tukey-Kramer utilizando el paquete estadístico Number Cruncher Statistical System (NCSS, 2007).

Determinación de la Capacidad Antioxidante de Rutina, Isoquercetina y Quercetina de Películas de PLA-Ru.

Se determinó la capacidad para capturar radicales libres de los antioxidantes presentes en las películas PLA-Ru #1, 2 y 3 utilizando como referencia el radical DPPH. EL DPPH se caracteriza por ser un radical libre, ya que posee

un electrón desapareado, estabilizado por resonancia. Por esta razón, se utiliza como material de referencia para determinar el poder antioxidante de una sustancia para capturar a estos radicales libres.

Para determinar el porcentaje de inhibición del radical DPPH con los compuestos rutina, isoquercetina y quercetina extraídos de la película PLA-Ru #2, extracciones de PLA testigo y estándares de los flavonoides presentes en PLA-Ru a una concentración de 100 µg/mL, se utilizó el método reportado por Dodunné *et al.*, (2009). La solución de DPPH se preparó el día del análisis en metanol a una concentración de 6×10^{-5} M. Se mezclaron 3.9 mL de solución de DPPH con 100 µL de muestra, se dejaron reposar por 30 min en ausencia de luz a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se midió la absorbancia (A_M) en un espectrofotómetro UV-visible a 515 nm. La muestra blanco se preparó mezclando 3.9 mL de DPPH con 100 µL de metanol (Wijeratne, *et al.*, 2006). El porcentaje de inhibición de los compuestos se determinó por la disminución de la absorbancia del radical DPPH en presencia de compuestos antioxidantes. El experimento se realizó por triplicado. El porcentaje de inhibición de los antioxidantes se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{A_B - A_M}{A_B} \times 100$$

Donde A_B representa la absorbancia del blanco y A_M la absorbancia de la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I

Elaboración de Películas de PLA-Ru y Testigo.

Se obtuvieron pellets y películas de PLA con rutina y sus productos de descomposición en los 3 perfiles de temperatura 130-140°C (PLA-Ru #1), 150-160°C (PLA-Ru #2) y 155-165°C (PLA-Ru #3), así como sus películas testigo. Las películas presentaron el color amarillo característico de los antioxidantes rutina y quercetina, con un espesor de 43.18 μm (Figura 8).

Identificación y Cuantificación de Rutina y sus Productos de descomposición

Para verificar la presencia del antioxidante rutina, a las películas PLA-Ru se les realizó un barrido en el espectrofotómetro UV-visible encontrando un máximo de absorción entre los 360 y 370 nm (Figura 8), correspondiendo a la absorción máxima de rutina a los 360 nm (Guo y Wei, 2008), con lo cual se confirmó su presencia en la película (Figura 9).

Para identificar la presencia de los productos de descomposición de rutina, se realizaron extracciones de estos compuestos e inyectaron a un HPLC acoplado a masas en ion negativo, encontrando señales correspondientes a fracciones másicas de 301.7, 464.4 y 609.4 m/z, las cuales corresponden a las masas moleculares de quercetina, isoquercetina y rutina, respectivamente.

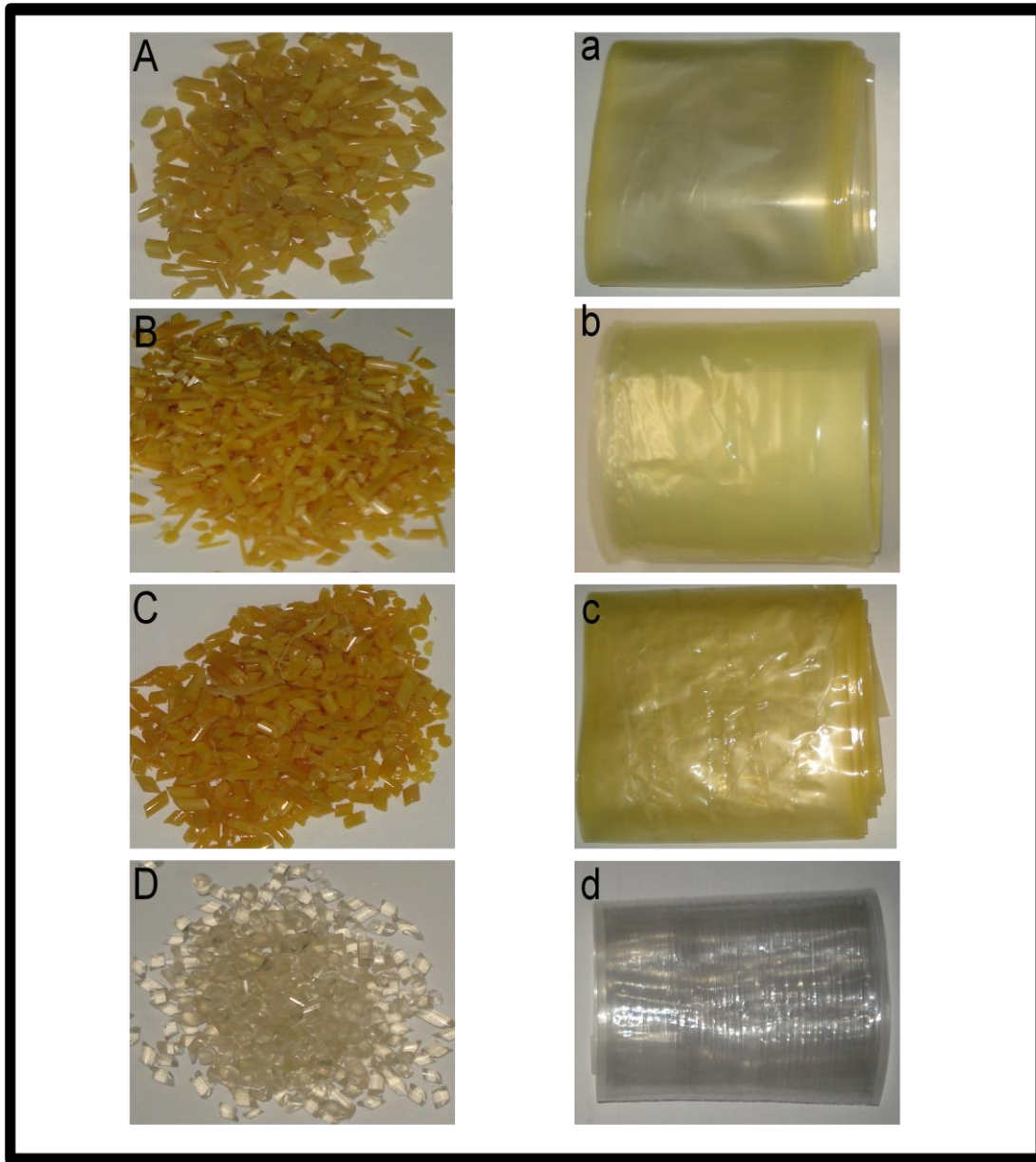


Figura 8. Apariencia visual de pelles de PLA procesados con rutina en cada perfil de temperatura 130-140°C (A), 150-160°C (B), 155-165°C (C) y pellets testigo (D). Películas PLA-Ru #1 (a), PLA-Ru #2 (b) y PLA-Ru #3 (c) y PLA-testigo (d).

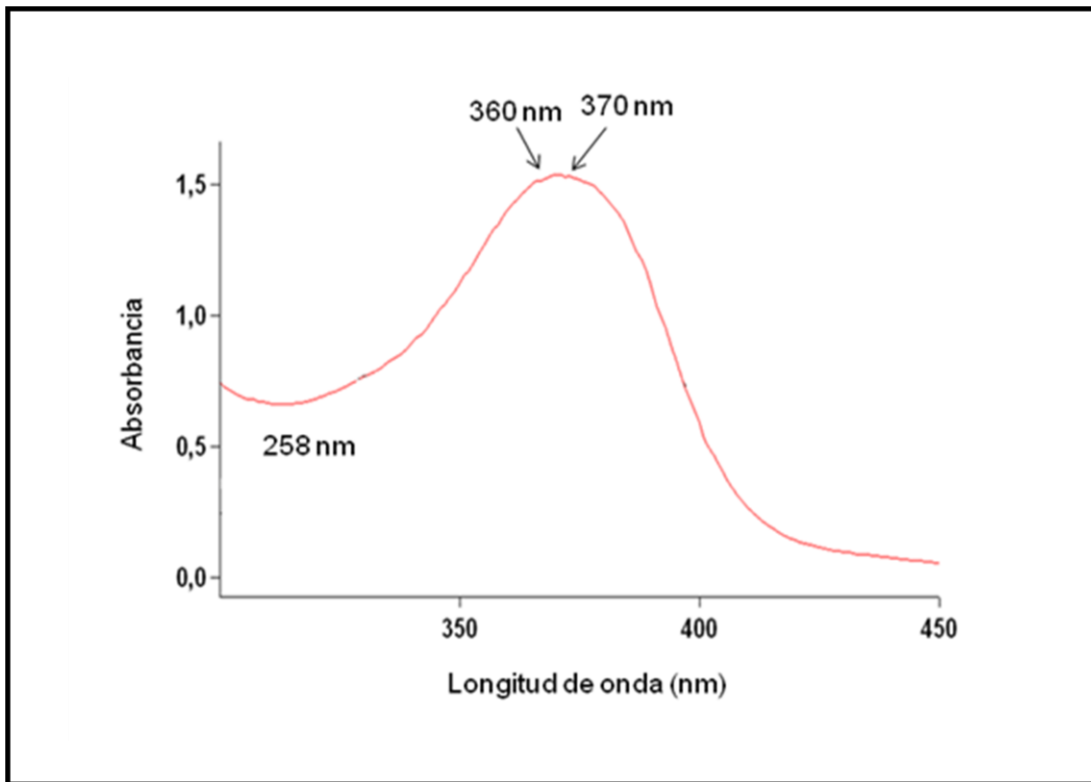


Figura 9. Espectro UV-visible de extracción de antioxidantes de película PLA-Ru.

En la figura 10-A se muestra el espectro de masas constituido por la fracción másica de 300.8 m/z, masa molecular de la aglicona y la masa molecular de rutina (609.4 m/z). En la figura 10-B se presentan fracciones másicas de 300.8 m/z y 162 m/z correspondiente a la molécula de quercetina y una molécula de glucosa, respectivamente, las cuales conforman el antioxidante isoquercetina. En la figura 10-C se presenta la fracción másica de 300.8 m/z que pertenece a quercetina. Esta última fracción másica se presentó en los 3 espectros como molécula base debido a que es la aglicona de estos antioxidantes y presenta una alta estabilidad. Los iones que se presentan en este último espectro corresponden a fragmentos de quercetina.

La fragmentación de las moléculas para su detección e identificación realizó mediante la formación de iones a partir de las moléculas presentes en las extracciones. Las moléculas en forma de rocío al ser bombardeadas con un haz de electrones generan la pérdida de un electrón y se forma un ion molecular, este ion molecular es un radical presentando la misma masa molecular que la molécula original. El choque producido entre los electrones energéticos y las moléculas de las muestras (extracciones) proporcionan la suficiente energía para dejarlas en estado excitado clasificándose de acuerdo a su relación masa-carga. Una vez que se relajan las moléculas se lleva a cabo la ruptura de los enlaces entre las glucosas y la aglicona, generando iones fragmentados con una relación masa-carga menor que la del ion molecular (Skoog, *et al.*, 2008).

Brolis *et al.*, (1998), reportan fracciones másicas correspondientes a las encontradas en el presente estudio, donde identificaron quercetina, así como sus glicósidos isoquercetina y rutina a 355 nm de un extracto de *Hypericum perforatum*. Reportando una fracción másica en iones positivos de 303 m/z para quercetina, 611 m/z correspondiente a rutina y 465 m/z para

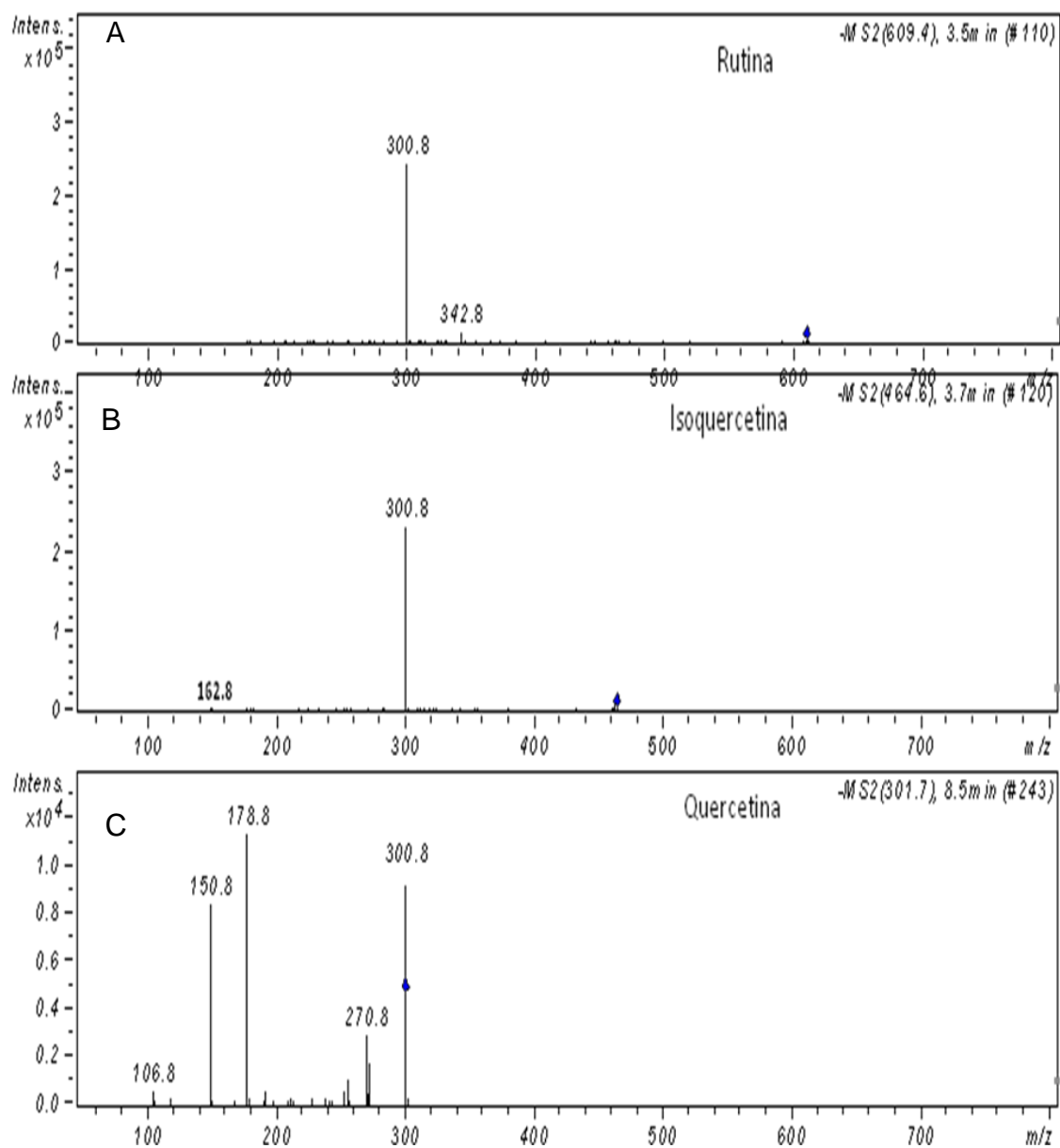


Figura 10. Espectros de fragmentación de rutina (A), isoquercetina (B) y quercetina (C) identificadas por HPLC acoplado a un detector de masas en ion negativo. Los espectros corresponden a extracciones de película PLA-Ru #2.

isoquercetina. Kim *et al.*, (1991), evaluaron la descomposición de rutina a isoquercetina y quercetina por pirólisis, identificando los compuestos que se produjeron de la descomposición mediante espectrometría de masas en modo negativo reportando picos de fragmentos de iones a 609.4 m/z, 463.4 m/z y 301.0 m/z para rutina, isoquercetina y quercetina, respectivamente.

Una vez identificados los antioxidantes presentes en las películas, se cuantificaron los remanentes por HPLC-UV-DAD, encontrando que el antioxidante rutina, diglucósido de quercetina sufrió una descomposición térmica durante el procesamiento de las películas. Esto se debió al efecto de las temperaturas aplicadas durante la fabricación de pellets y película, produciéndose una ruptura entre el enlace azúcar-azúcar para dar lugar al antioxidante isoquercetina (monoglucósido de quercetina) y posteriormente se dio la ruptura entre la molécula de azúcar-aglicona generando el antioxidante quercetina (Figura 11) (Kalinova y Vrchotova, 2009).

Rohn *et al.*, (2007), evaluaron la estabilidad térmica a 180°C de rutina presente en cebolla, encontrando que después del minuto 1 inició la descomposición de rutina a isoquercetina y después del minuto 8, éste antioxidante se descompuso a quercetina. Sin embargo, este último compuesto permaneció estable durante todo el periodo de calentamiento. En la elaboración de las películas PLA-Ru #1, 2 y 3, el tiempo total de pelletización y tiempo de residencia durante la extrusión en cada perfil de temperatura fue de 7 min aproximadamente, tiempo en el cual se llevó a cabo la descomposición térmica de rutina a isoquercetina y a quercetina.

En el cuadro 2 se presentan los antioxidantes remanentes cuantificados en cada película de PLA-Ru, encontrando que la descomposición térmica de

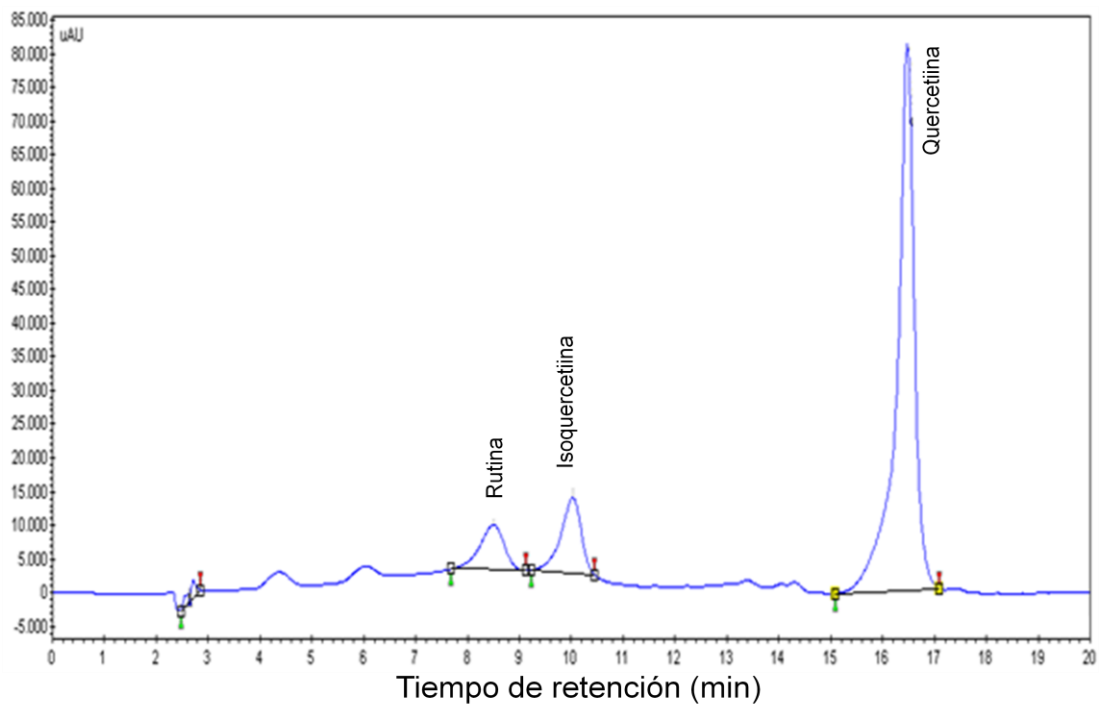


Figura 11. Cromatograma de cuantificación de rutina, isoquercetina y quercetina de película PLA-Ru obtenido por HPLC-UV-DAD a 360 nm.

Cuadro 2. Cuantificación de rutina (Ru), isoquercetina (Isoq) y quercetina (Qe) remanente en PLA-Ru #1, 2 y 3 por HPLC-UV-DAD.

Película PLA-Rutina	Ru incorporada en película (mg/g)	Ru, Isoq, Qe remanente PLA-Ru (mg/g)	Ru convertida a Isoq y Qe (mg/g)	Ru+isoq ^a + Qe ^b (mg/g)	Porcentaje total recuperado
	Rutina	17.72	15.53±0.78		
1	Isoquercetina		1.11±0.10	1.46±0.13	17.53
	Quercetina		0.27±0.01	0.54±0.01	98.92
	Rutina	39.59	5.67±0.19		
2	Isoquercetina		7.20±0.18	9.40±0.24	25.66
	Quercetina		5.24±0.19	10.59±0.39	64.81
	Rutina	39.12	2.28±0.26		
3	Isoquercetina		4.00±0.27	10.24±0.70	19.61
	Quercetina		3.51±0.07	7.09±0.01	50.12

^a Isoquercetina convertida a equivalentes molares de rutina. ^b Quercetina convertida en equivalentes molares de rutina.

rutina en las película fue diferente, aumentando ésta con el incremento de temperatura y generando con ello una película con presencia de rutina, isoquercetina y quercetina. Isoquercetina y quercetina, se caracterizan por presentar una actividad antioxidante superior a la que presenta el antioxidante rutina, por lo cual, una película con presencia de isoquercetina y quercetina debe presentar un potencial antioxidante superior al presentado por un película con sólo de rutina.

Con respecto a la cuantificación de los tres compuestos en las 3 películas fabricadas, en la película PLA-Ru #1, procesada en el perfil de temperatura más bajo, se conservó el 98.92% de los 17.72 mg/g de rutina incorporada inicialmente, de los cuales el 87.64% corresponde a rutina, mientras que el 8.23 y 3.05% restantes corresponden a isoquercetina y quercetina, respectivamente y sólo el 1.08% de antioxidante se descompuso a otros compuestos no identificados. Por lo cual, el efecto de la temperatura sobre el antioxidante fue mínimo. En la película PLA-Ru #2 procesada en el perfil de temperatura de 150 a 160°C, se produjo una descomposición térmica de rutina a isoquercetina y quercetina del 50.49% correspondiendo a 23.74% (9.49 mg/g) y 26.75% (10.59 mg/g), respectivamente. Se conservó un 14.32% (5.67 mg/g) de rutina como tal, mientras el 35.19% de rutina no cuantificada pudo haberse descompuesto en otros productos que no fueron identificados.

Al analizar la película PLA-Ru #3 se encontró que, de 39.12 mg/g de rutina que se incorporaron inicialmente, se conservó el 5.28% como rutina (1.95 mg/g), descomponiéndose a isoquercetina y quercetina el 44.30%, de los cuales 26.18% (10.24 mg/g) y 18.12% (7.09 mg/g) corresponden a isoquercetina y quercetina, respectivamente. El 49.88% no cuantificado se descompuso a otros productos. Esta última película fue la que presentó una

cantidad menor de flavonoides rutina, isoquercetina y quercetina, ya que en su proceso de fabricación fue la que se sometió a temperaturas más altas (155 a 165°C), generando una descomposición mayor de todos los compuestos. Lopez-De-Dicastillo *et al.*, (2010) elaboraron una película de EVOH con quercetina al 1% y 5% por extrusión plana a 200°C, en la que cuantificaron el 75.6 y 80.1% de antioxidante remanente en la película, presentando durante el proceso de extrusión una pérdida del 24.4 y 19.9%, respectivamente. Koontz *et al.*, (2010), desarrollaron una película de PELBD utilizando un mezclador de doble tornillo para homogeneizar la resina con 1950 mg/kg de quercetina. Se fabricaron discos en un molde que posteriormente fueron comprimidos a 190°C para obtener la película por compresión. De esta película extrajeron el 91% de la quercetina agregada, siendo un valor cercano al cuantificado en la película PLA-Ru #1. En el presente trabajo, también se intentó fabricar una película de PLA con 3.9% de rutina en un rango de temperatura de 170-180°C, temperatura inferior a la utilizada por los autores que anteriormente se mencionan, sin embargo, no fue posible su procesamiento. Esto se puede deber al efecto de la temperatura sobre las moléculas de glucosa que contiene rutina, generando la formación grumos en el PLA fundido durante el proceso de pelletización, lo cual no permitió la fabricación de la película.

La temperatura de procesamiento presentó un efecto significativo ($p < 0.05$) en la descomposición de rutina a quercetina, que es el compuesto con el potencial antioxidante más alto y el que presenta una molécula más pequeña. La quercetina resultante de la descomposición de rutina fue estadísticamente diferente para cada perfil de temperatura, presentándose en una concentración mayor en la película PLA-Ru #2, procesada en un rango de temperatura de 150 a 160°C (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de la temperatura de procesamiento en la descomposición de rutina a quercetina.

Temperaturas de procesamiento	Tiempo de procesamiento (min)	Quercetina degradada de rutina (mg/g)	Porcentaje de quercetina degradada de rutina
130-140°C (PLA-Ru #1)	7	0.27±0.01 ^a	3.05
150-160°C (PLA-Ru #2)	7	5.24±0.19 ^b	26.75
155-165°C (PLA-Ru#3)	7	3.51±0.07 ^c	18.12

Valores con literales diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0.05$). Cada valor es promedio de 3 réplicas.

Límite Mínimo de Cuantificación y Porcentaje de Recuperación

El límite mínimo de cuantificación en el equipo HPLC-UV-DAD en las condiciones establecidas para los antioxidantes rutina e isoquercetina fue 0.25 µg/mL y para quercetina 0.06 µg/mL.

El porcentaje de recuperación de rutina al extraerla de la película de PLA fue de 100.04±0.09%, para PLA con isoquercetina se recuperó un 99.89±0.20% y en PLA con quercetina fue de 100.18±0.13%. Por lo cual no se presentaron pérdidas de los antioxidantes durante el proceso de extracción en las condiciones establecidas. Estos resultados obtenidos son superiores a los reportados por Manzanarez-López., (2009) en donde reporta un porcentaje de recuperación de α-tocoferol en películas de PLA del 82.39%. Soto-Valdez *et al.*, (2011) utilizó una técnica de extracción similar a la utilizada en el presente trabajo, controlando condiciones de luz y temperatura, reportando un porcentaje de recuperación de resveratrol en PLA de 99.5%. Este valor es aproximado al cuantificado para rutina, isoquercetina y quercetina, lo cual indica que la técnica de extracción fue eficiente y que las condiciones de temperatura, tiempo y solvente de extracción no generó la descomposición en los antioxidantes estudiados.

Propiedades Ópticas

La película de PLA-Ru #2 y su testigo presentaron un espesor de 43.18±5.08 µm y una coloración amarillo claro ubicada en las coordenadas cromáticas $a^*=-6.84\pm 0.39$ y $b^*=12.54\pm 1.48$, con una luminosidad de $L^*=89.15\pm 1.13$ (Konica Minolta, 2003). La diferencia de color entre las películas PLA-Ru #2

y PLA-testigo fue de $\Delta E=13.58$, indicando el cambio de color del PLA al adicionar el antioxidante (Figura 12). En la figura 13 se presenta un espectro de las películas de PLA-Ru #2 y PLA-testigo en el rango UV-visible de 200 a 800 nm presentando máximas absorciones a los 258 y 360 nm, correspondiendo a las bandas de absorción características de rutina, a 258 nm que corresponden a la máxima absorción del anillo A y 360 nm que corresponde a la máxima absorción del anillo de transición B-C (Figura 2) (Guo y Wei, 2008). Con respecto a isoquercetina, ésta presenta una banda máxima de absorción a los 350 nm (Buchner *et al.*, 2006) y la absorción máxima que presenta quercetina es a los 360 nm (Careri *et al.*, 2000). La banda correspondiente a isoquercetina, quercetina y rutina se traslapan en el rango de los 350 a 360 nm, por lo cual no se pudo separar cada una de ellas.

Espectrofotometría Infrarroja. En la figura 14 A se muestra el IR de la película de PLA testigo. En la región de 4000 a 1400 cm^{-1} se presentan las bandas de los principales grupos funcionales del PLA. La región dactiloscópica de la molécula, se localiza en el rango de 1400-600 cm^{-1} y es característico de cada compuesto. El IR de la película PLA testigo mostró los principales grupos funcionales que constituyen al PLA, siendo grupos hidroxilos con bandas de intensidad baja, alcanos con bandas de intensidad fuerte y una banda correspondiente al grupo carbonilo con intensidad fuerte. En la región dactiloscópica se presentaron principalmente grupos alcanos, alcoholes y esterres alifáticos con bandas de intensidad alta. Estudios presentados por Auras *et al.*, (2010), reportan que la banda cristalina del PLA se encuentra alrededor de los 871 cm^{-1} y la banda amorfa a los 756 cm^{-1} correspondientes a los grupos alcanos, los cuales se encuentran presentes en el espectro de la película PLA- testigo.

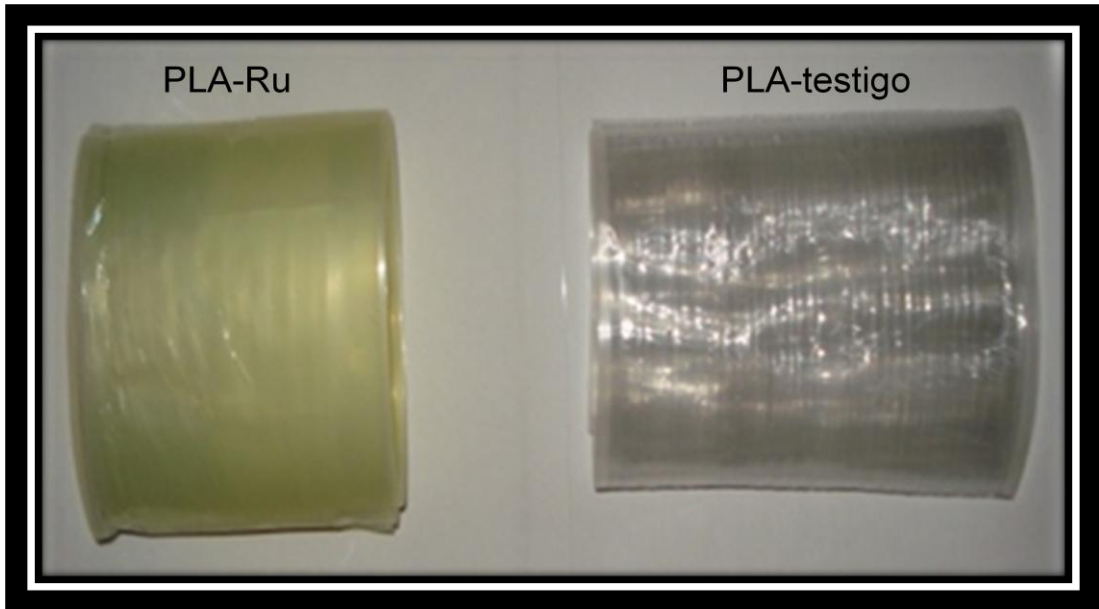


Figura 12. Apariencia visual de películas de PLA-Ru #2 y PLA-testigo.

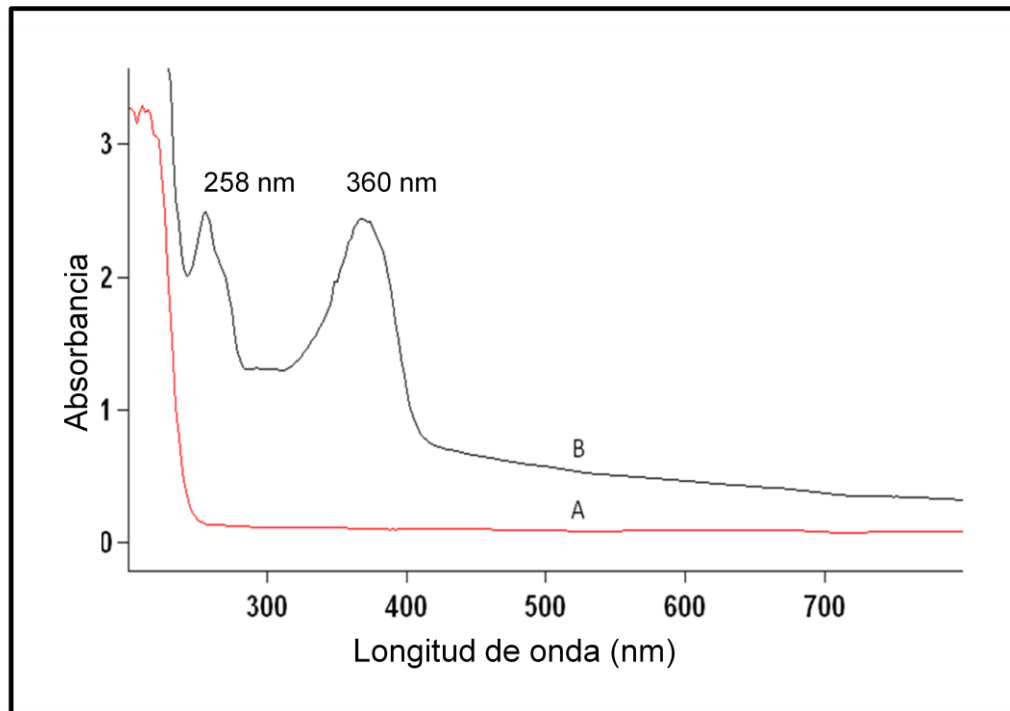


Figura 13. Espectro UV-visible de películas de PLA-testigo (A) y PLA-Ru #2 (B) en un rango de 200 a 800 nm.

Al analizar la película PLA-Ru #2 por IR se identificaron los principales grupos funcionales (Figura 14 B). Los números de ondas de las bandas que se encontraron en la región de los grupos funcionales fueron iguales a las encontradas en la película testigo, sólo se presentaron diferencias entre las intensidades de las bandas. Las bandas de los grupos hidroxilos en la película de PLA-Ru #2 presentaron una intensidad mayor que la película testigo, lo cual se debe a la cantidad alta de grupos OH que contienen los antioxidantes rutina, isoquercetina y quercetina. La banda de los alcanos se encontró con la misma intensidad que la de la película testigo. La banda correspondiente al grupo carbonilo en PLA-Ru #2 presentó un desplazamiento de 14 unidades en el número de onda. Este efecto se puede deber a que el átomo de oxígeno del grupo carbonilo del PLA esté formando puentes de hidrógeno con los grupos OH de los antioxidantes y requiere más energía para estirarse. Los anillos aromáticos A y B del esqueleto de los flavonoides incorporados y obtenidos por degradación en la película durante su procesamiento se presentaron en rango de $1650-1500\text{ cm}^{-1}$.

En la región dactiloscópica del IR de PLA-Ru #2 se identificó la presencia de grupos $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}$ con igual número de onda e intensidad que PLA testigo, grupos $-\text{OH}$ y $\text{C}=\text{O}$ con bandas anchas e intensidad fuerte debido a la mayor presencia de estos grupos y bandas de intensidad media para los grupos $-\text{CH}$ presentes en el rango de $900\text{ a }700\text{ cm}^{-1}$. Las bandas intensas y anchas de los grupos OH se deben a la polaridad de la molécula, así como a los puentes de hidrógeno que forman. Mientras más polar es el enlace, la absorción es más intensa (Bruice, 2008). La intensidad fuerte que presentan las bandas (con transmitancia cercana al 0%), indica que la energía radiada se absorbe por los estiramientos y torsiones que causan en la molécula una gran cantidad de enlaces presentes de esos grupos funcionales, así como

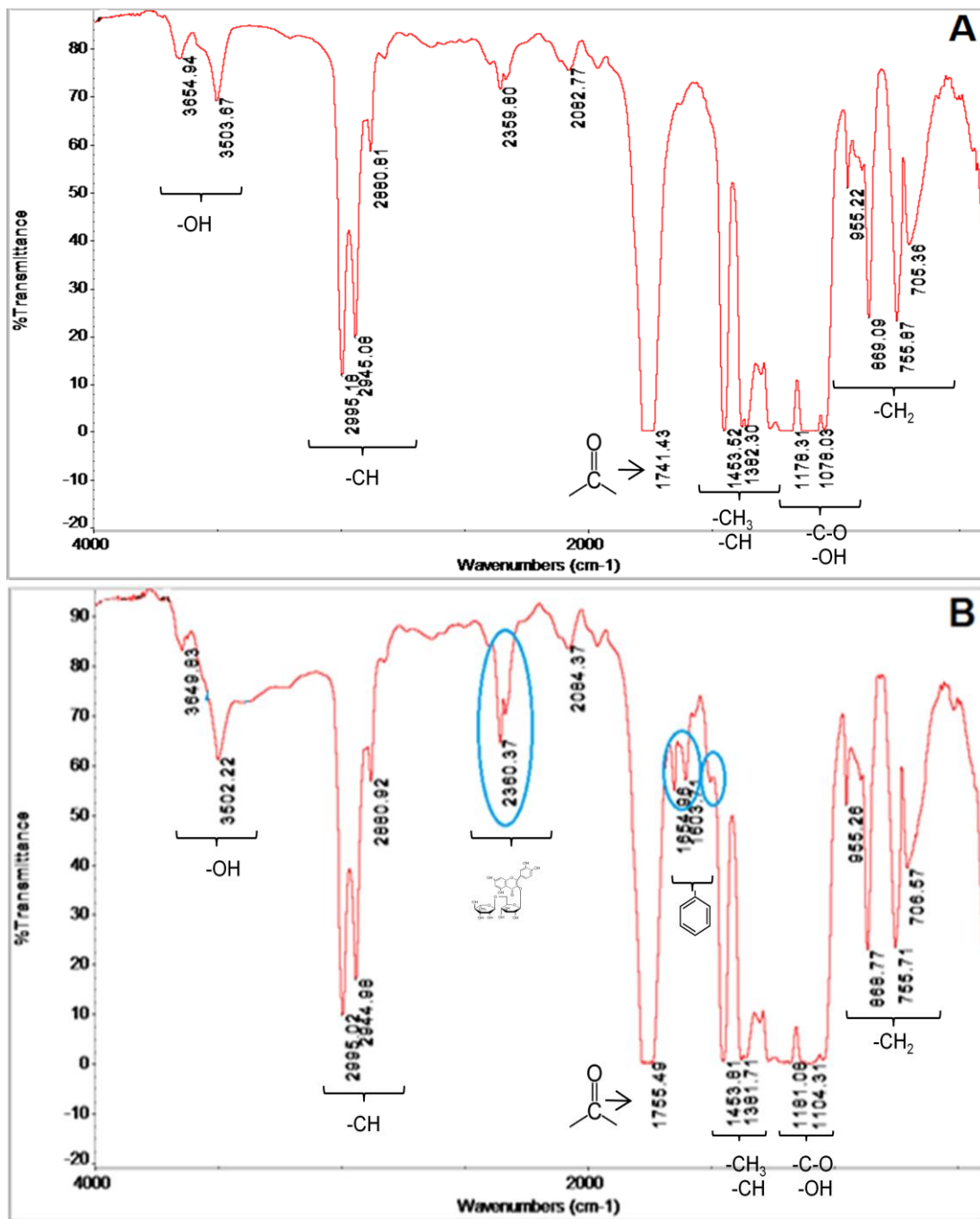


Figura 14. Espectros infrarrojos de películas PLA-testigo (A) y PLA-Ru (B) en un rango de longitud de onda de 4000-700 cm^{-1} .

una concentración alta de moléculas en la muestra (Skoog *et al.*, 2008). Márquez *et al.*, (1999) reportan un IR con la presencia de rutina, donde se localiza una banda a los 2360 cm^{-1} correspondiendo a las glicosilaciones que presenta este antioxidante. Estas glicosilaciones se presentan en las bandas correspondientes a los grupos alquílicos. Sin embargo, esta banda también corresponde al PLA con una menor intensidad. Niu *et al.*, 2009 reportan que de $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ se encuentran los grupos de las moléculas de glucosa de isoquercetina y rutina.

Propiedades Térmicas

Calorimetría diferencial de barrido (DSC). En la figura 15 se presentan los termogramas de la primer corrida de PLA molido sin procesar (B), película PLA-testigo (A) y película PLA-Ru (C). Durante el calentamiento de las muestras de PLA molido sin procesar se encontró una Tg de 60.86 ± 1.66 , mientras que en las muestras de las películas de PLA-testigo y PLA-Ru #2 se obtuvo una Tg de $55.96\pm 0.68^{\circ}\text{C}$ y $57.39\pm 0.68^{\circ}\text{C}$ respectivamente, encontrando una Tg más baja en las películas que sufrieron el procesamiento térmico. Lim *et al.*, (2008) reportan una Tg para el PLA de 56°C , siendo similar al determinado para las películas PLA-Ru #2 y PLA-testigo. Manzanarez-López *et al.*, (2011) reportan una Tg de 59.42 y 60.50°C para las películas de PLA testigo y PLA- α -tocoferol, respectivamente, siendo más altas que la Tg determinada en nuestras películas. Esto se debe a que el PLA utilizado para ambos estudios fue de lotes diferentes y el análisis de DSD se realizó en equipos diferentes.

En cuanto a temperatura de fusión del PLA, se encontró que la Tm más baja se presentó en la película con rutina (149.04 ± 1.72), seguida de 150.85 ± 2.19

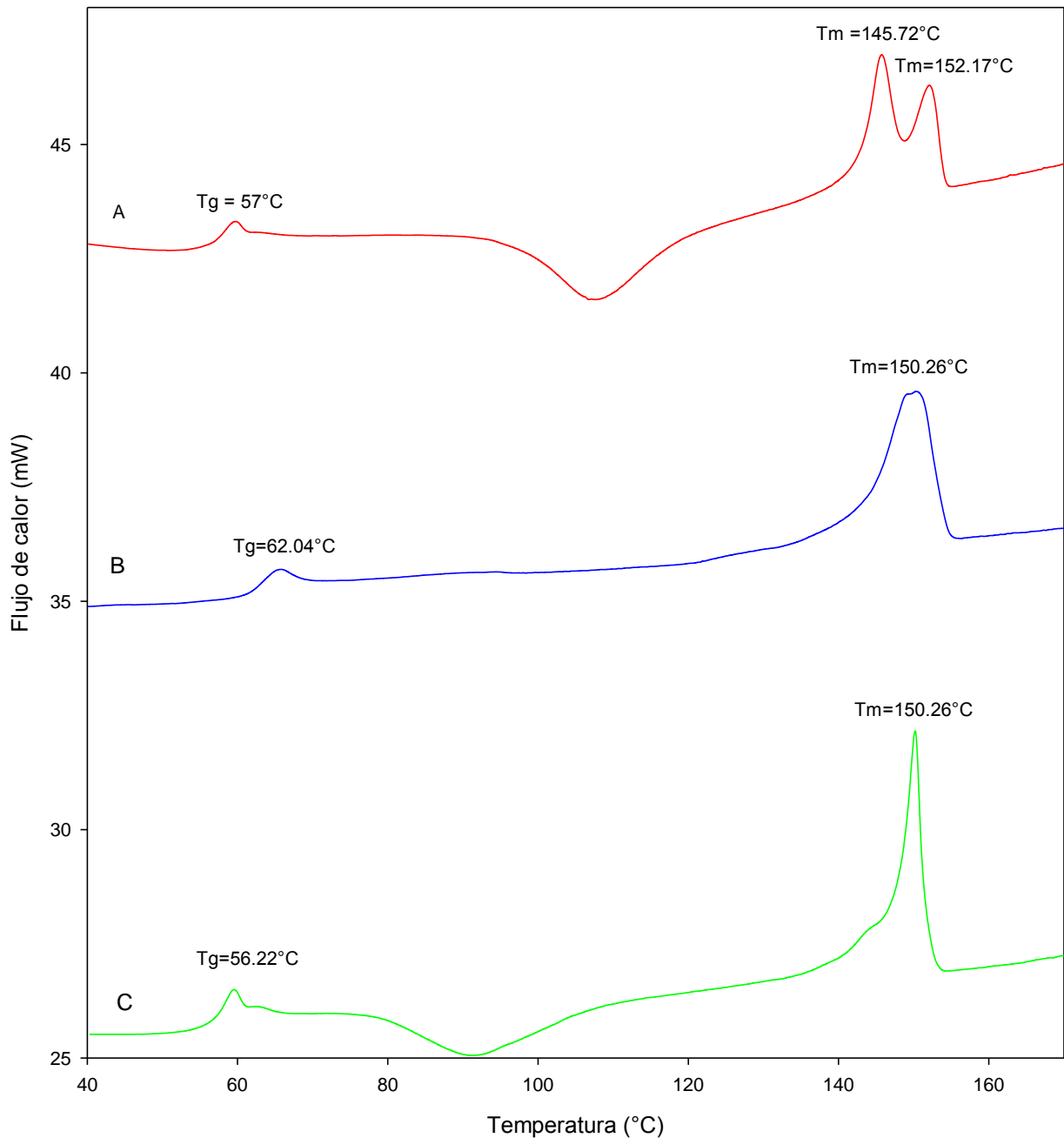


Figura 15. Termograma de PLA molido (A), película PLA-testigo (B) y película PLA-Ru #2 (C). Las muestras se corrieron de 25 a 180°C a una velocidad de 10°C/min.

para la película de PLA-testigo y 151.05 ± 1.12 para el PLA molido. Lim *et al.*, (2008) reportan una T_m de 150°C para el PLA, siendo similar a la encontrada en las muestras de las películas y del PLA sin procesar. Sin embargo, son mayores un 2% (3°C) a los valores reportados por Manzanarez-López *et al.*, (2011) y Soto-Valdez *et al.*, (2011) en las películas de PLA con α -tocoferol y resveratrol, respectivamente. Entre la T_g y T_m de todas las muestras analizadas, se presentó una endoterma en un rango de 90 a 110°C la cual varió entre las películas evaluadas. Esto se debe a la cristalización de cadenas poliméricas generado por la velocidad de enfriamiento durante el procesado de las películas y a la pureza del polímero (Lim, *et al.*, 2008). Esta cristalización se presentó debido al enfriamiento forzado que se aplicó una vez que la película salía del dado plano, no fue homogéneo en toda la película generando una cristalización no uniforme en los diferentes tratamientos.

Al analizar los termogramas de las películas de PLA-testigo se encontró un doble pico en la T_m , debido a las condiciones de procesamiento y enfriamiento de la película, generando conformaciones estructurales α y β del polímero. Los cristales formados con la conformación α son por efecto del enfriamiento de la película, mientras que la cristalización con la conformación β se desarrolla debido al estiramiento mecánico durante el procesamiento y jalado de la película (Di Lorenzo, 2005; Auras, *et al.*, 2010).

Como se observa en el cuadro 4, la resina de PLA molido sin procesar presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) en la T_g con respecto al PLA procesado, debido a las temperaturas a las que fueron sometidos estos últimos durante el procesamiento. Este efecto generó una disminución de la T_g de las películas de 5-9% ($3-5^\circ\text{C}$). La adición de rutina al PLA durante la fabricación de las películas no presentó efecto en la T_g del polímero

Cuadro 4. Tg y Tm de PLA molido, películas PLA-testigo y película PLA-Ru #2.

Muestra	Tg (°C)	Tm (°C)
PLA molido	60.86±1.66 ^a	151.05±1.12 ^a
Película PLA-testigo	55.97±0.47 ^b	150.85±2.19 ^a
Película PLA-Ru #2	57.39±0.67 ^b	149.04±1.72 ^a

Valores con literales diferentes entre renglones presentan diferencias significativas (p<0.05).

($p < 0.05$) con respecto a la película testigo. En la T_m no se encontraron diferencias significativas entre el PLA sin procesar y el PLA procesado ($p < 0.05$). El procesamiento del polímero y la presencia de antioxidantes no modificaron estadísticamente la T_m del PLA.

Etapa II

Determinación de Difusión de Rutina y sus Productos de Descomposición de la Película de PLA a Simulantes de Alimentos

Para realizar el estudio de difusión a las películas de PLA incorporadas con rutina, se seleccionó la película PLA-Ru #2, debido a que esta película contenía 31.30, 39.75 y 28.95% de los antioxidantes rutina, isoquercetina y quercetina, respectivamente, representando proporciones similares para los 3 compuestos fenólicos estudiados. Los resultados del estudio de difusión se presentan en el orden en el cual migraron de la matriz polimérica al simulante de alimentos. El orden de difusión coincide con el tamaño molecular y número de grupos OH presentes en el antioxidante, donde quercetina es la molécula más pequeña y rutina la más grande.

Determinación de la Difusión a Simulantes de Alimentos a Base de Etanol.

Quercetina

Difusión a etanol al 95%. De acuerdo a la FDA, el etanol al 95% es un simulante de alimento graso para poliolefinas (FDA, 2007). Sin embargo, en años recientes se ha utilizado como simulante de alimento graso para

estudios de difusión del PLA, ya que actualmente no existen especificaciones en las legislaciones para este polímero.

En este estudio se determinó un $K_{p,f}$ para cada uno de los experimentos de difusión a las temperaturas que fueron sometidos los sistemas (Cuadro 5). El $K_{p,f}$ expresa la solubilidad relativa del migrante entre la matriz polimérica y el etanol al 95% en el equilibrio. Un $K_{p,f} > 1$ indica una concentración alta del migrante en el polímero, comparado con la concentración del migrante en el líquido. Los valores cuantificados del $K_{p,f}$ fueron 1347.31, 14.19 y 6.29 para 20, 30 y 40°C respectivamente. A 20°C se obtuvo un $K_{p,f}$ alto, lo cual coincide con la difusión lenta de quercetina de la película de PLA-Ru #2, ya que la concentración del antioxidante fue más alta en la película comparado con lo encontrado en etanol al 95%. A 30°C la concentración de quercetina en la película a las 36h de contacto fue más alto que en el solvente. A 40°C el $K_{p,f}$ que se encontró fue bajo comparado con las otras temperaturas, ya que la mayor parte de quercetina había migrado hacia etanol al 95%. La disminución del valor de $K_{p,f}$ a 40°C, se debe a que con el aumento de la temperatura en el sistema, se incrementa la energía requerida para romper las atracciones entre los grupos polares de quercetina y el PLA, liberando con mayor facilidad el antioxidante. Así también, se incrementa la capacidad de absorción del etanol entre la matriz del PLA y la solubilidad de quercetina en etanol.

Los coeficientes de difusión (D) fueron calculados para cada uno de los sistemas de acuerdo al valor del $K_{p,f}$ y α que presentó cada uno de ellos. A 20°C el valor del D se estimó con la ecuación 2, debido al valor alto del $K_{p,f}$ obtenido a esta temperatura (1347.31). A 30 y 40°C, D se estimó mediante la ecuación 1, aun y con valores de $K_{p,f} > 1$. Esta ecuación proporcionó el mejor

ajuste de D para estas temperaturas con una predicción del 95% de confianza (Cuadro 5).

La difusión de quercetina de PLA-Ru #2 a etanol 95% a 20, 30, y 40°C se presenta en la figura 16, así mismo en los anexos, la figura 1A representa las graficas con las que se determinó el D para estos sistemas. La difusión del antioxidante mostró la tendencia de las curvas típicas de las leyes de Fick. El equilibrio se alcanzó a las 18, 36 y 126 h para 40, 30 y 20°C, respectivamente. Estos resultados mostraron que el tiempo de equilibrio disminuyó con el incremento de la temperatura, debido a la dependencia de la difusión de los antioxidantes con esta variable. El valor calculado de D a 40°C fue de 95.8×10^{-11} cm²/s, mientras que para 30 y 20°C disminuyeron a 12.9×10^{-11} y 7.2×10^{-11} cm²/s, respectivamente, con diferencias significativas ($p < 0.05$), observando que al incrementar la temperatura del sistema, se produjo una mayor difusión del antioxidante al simulante de alimentos.

La migración de quercetina a etanol al 95% se puede deber a factores como la temperatura del sistema y afinidad del aditivo con el polímero y simulante de alimentos, ya que a 40°C es una temperatura cercana a la Tg del PLA se llevó a cabo una mayor difusión. A esta temperatura se genera un mayor movimiento de las cadenas del polímero, disminuyendo esta movilidad al disminuir la temperatura. Este movimiento permite el paso al etanol entre las cadenas del polímero. El etanol una vez que penetra al PLA, ejerce una atracción electrostática sobre los grupos hidroxilos de quercetina, generando la ruptura de los puentes de hidrógeno existentes entre los grupos OH del antioxidante con los grupos carboxílicos del PLA, permitiendo la liberación de quercetina a etanol al 95%. Mascheronni *et al.*, (2010), reporta que el etanol se absorbe entre las cadenas de la matriz polimérica del PLA generando un efecto plastificante en la matriz del PLA y espacios vacíos

Cuadro 5. Coeficientes de difusión (D) y coeficientes de partición ($K_{p,f}$) de quercetina de película de PLA-Ru #2 a etanol al 95% a 20, 30 y 40°C. El espesor en la película fue de 43.18 μm .

Temperatura (°C)	$K_{p,f}$	α	$D \times 10^{-11}$ (cm ² /s) ¹	RCME ²
20	1347.31±79.58	0.41	7.2±0.38 ^{3, a}	7.07E-11
30	14.19±0.77	40.59	12.9±0.33 ^{4, b}	1.32E-7
40	6.29±0.44	98.75	95.8±9.92 ^{4, c}	6.50E-7

¹ Los valores expresados son el promedio de tres réplicas ajustadas \pm error estándar con un intervalo de confianza asintótico del 95%.

² RCME: Raíz del cuadrado medio del error.

³ Los valores de difusión a 20°C fueron calculados de acuerdo a la ecuación 2.

⁴ Los valores de difusión a 30 y 40°C fueron calculados de acuerdo a la ecuación 1.

^{a,b,c} Presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

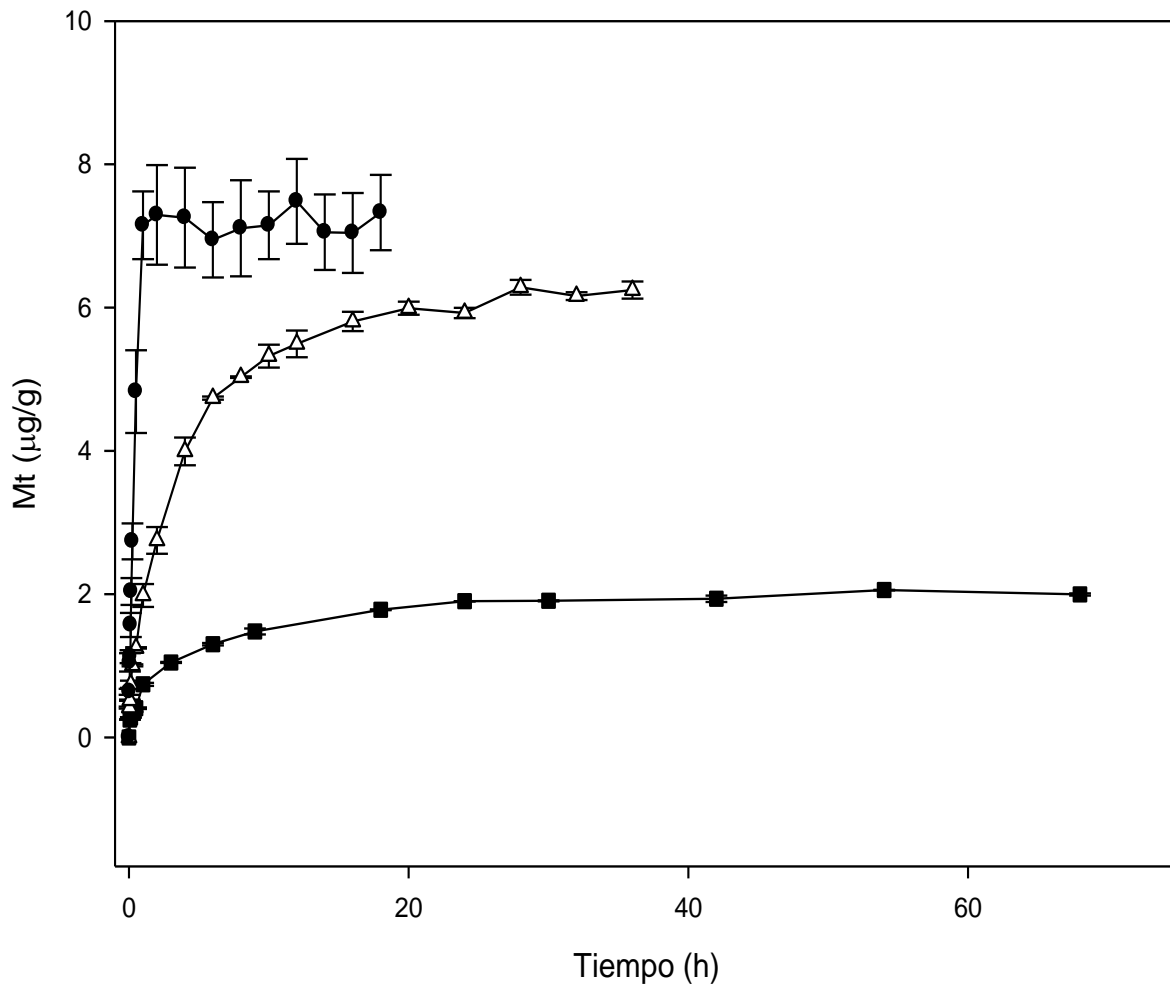


Figura 16. Difusión de quercetina de PLA-Ru #2 a etanol al 95% a 20°C (■), 30°C (Δ) y 40°C (●).

entre ellas. Esto genera la apertura de la estructura del PLA favoreciendo la migración de los compuestos fenólicos como quercetina, que presenta naturaleza polar y una solubilidad alta en etanol (Lopez-de-Dicastillo *et al.*, 2010).

Mascheroni *et al.*, (2010), evaluaron la difusión de los compuestos fenólicos crisina, pinobanksina-5-metil-eter, pinobanksina y ácido p-cumárico del propóleo, migrados de una matriz de PLA con polietilenglicol a etanol a 25°C. Estos compuestos presentan polaridades diferentes, $K_{p,f}$ variados, con valores de D en el rango de $0.74-1.03 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$. Estos valores reportados por los autores son inferiores a los cuantificados en el presente trabajo para quercetina a etanol al 95% a 20°C ($7.2 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$). Sin embargo, se encuentran en el mismo orden de magnitud lo cual también se puede deber a la presencia del agente plastificante que incorporaron los autores para promover la difusión de los compuestos del propóleo. La diferencia en los valores de D entre los compuestos fenólicos que reportan los autores y quercetina pueden estar relacionados a la afinidad de los fenoles con la matriz del PLA.

Soto-Valdez *et al.*, (2011), desarrollaron una película de PLA con resveratrol, en su estudio de difusión a etanol (100%) realizado a 23, 33 y 43°C reportando valores de D de 2.3, 22.6 y $85.1 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$, siendo valores relativamente similares a los cuantificados en el presente estudio para quercetina.

López-de-Dicastillo *et al.*, (2010), realizaron un estudio de difusión a 37°C de quercetina incorporada a una matriz polimérica de EVOH, utilizando etanol al 95% como simulante de alimento. Los D que determinaron en este estudio alcanzaron valores de $7 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$, igual al calculado en el presente estudio

a 20°C ($7.2 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$). Estos autores consideran que la concentración inicial de los antioxidantes en la película y la afinidad del migrante con el simulante de alimentos utilizado, son factores importantes en la difusión de compuestos desde la matriz polimérica. Koontz *et al.*, (2010), realizaron un estudio de difusión de quercetina incorporada en una película de PELBD a etanol al 95%, encontrando una migración mínima, permaneciendo el flavonoide en la película casi en su totalidad. Por lo que además de la temperatura del sistema, es importante la afinidad del aditivo con la matriz polimérica y con el simulante de alimentos.

Energía de activación. Para determinar el efecto de la temperatura en la difusión de quercetina de las películas de PLA hacia etanol al 95%, se evaluó la energía de activación (E_a) mediante la ecuación de Arrhenius. Esta es la energía requerida por el sistema para producir la suficiente apertura de las cadenas poliméricas para que las moléculas de los aditivos se puedan mover a través de ellas (Manzanarez-López *et al.*, 2011). En la figura 17 se muestra la gráfica de $\log(D)$ vs $1/T$ para quercetina, generando una línea ($R^2=0.8977$) con una E_a de 98.28 kJ/mol. Esta energía de activación es más baja a la reportada para la difusión de resveratrol de una película de PLA a etanol (176 kJ/mol) (Soto Valdez *et al.*, 2011). Por lo tanto, quercetina requiere menos energía para migrar a través del PLA a etanol al 95% que resveratrol para migrar del PLA a etanol 100%. Sin embargo, se debe considerar que el rango de temperatura del estudio del resveratrol fue más amplio que el utilizado para quercetina.

La E_a del sistema es un parámetro importante, ya que por medio de ésta podemos conocer el efecto de la temperatura sobre difusión del antioxidante, así como la tendencia del D en el rango de temperatura bajo estudio. Ya que

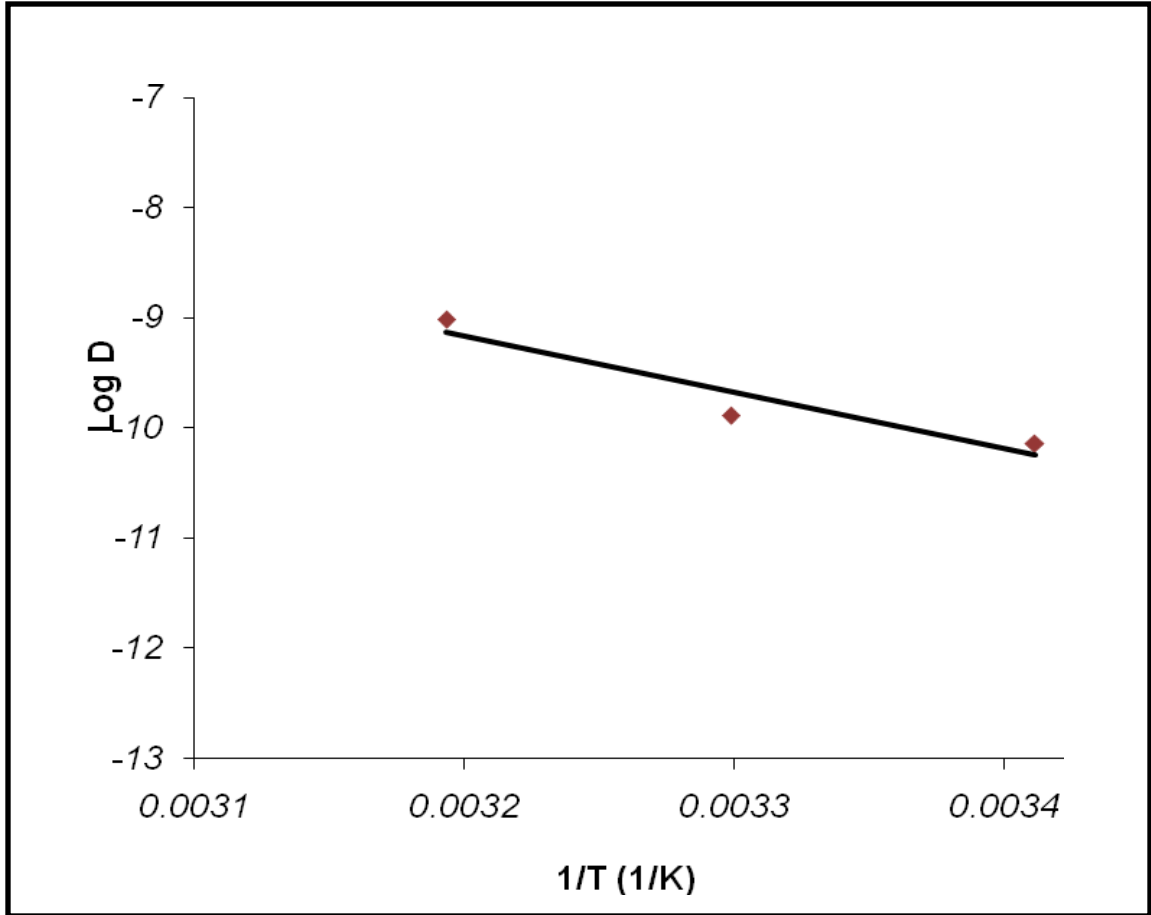


Figura 17. E_a de la difusión de quercetina de PLA a etanol 95% a 20, 30 y 40 °C.

la energía proveniente de la temperatura tiene un efecto en el antioxidante a migrar, la matriz polimérica y el medio con el que se está en contacto.

Difusión a etanol al 50%. De acuerdo a la FDA el etanol al 50% es un simulante para alimentos con nivel alto y bajo de alcohol aplicado para envases fabricados de tereftalato de polietileno (PET) y poliestireno (FDA, 2007). En la figura 2A de la sección de anexos se presentan las gráficas utilizadas para calcular D . En la figura 18 se muestra la difusión de quercetina de la matriz polimérica de PLA a etanol al 50% a 30 y 40°C. A 20°C se presentó una difusión baja e irregular. El equilibrio se alcanzó a las 24 h de contacto de la película con el simulante de alimento para ambas temperaturas. La difusión de quercetina a 40°C fue baja, ya que solo migró $3.72 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$, con un $K_{p,f}$ de 288.73 ± 35.40 , indicando que una cantidad alta de quercetina permaneció en el polímero ($1076.16 \pm 168.02 \mu\text{g/g}$). A 30°C se cuantificó un $K_{p,f}$ de 4865.71 ± 570.62 y sólo migró $0.91 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$ de quercetina, permaneciendo $4406.91 \pm 110.17 \mu\text{g/g}$ de este compuesto en la matriz polimérica.

La temperatura tiene una influencia importante en el proceso de migración de los aditivos incorporados a la matriz del polímero, influyendo significativamente en la velocidad de difusión de quercetina a 30 y 40°C. Los D cuantificados para quercetina a etanol al 50% fueron de $15.02 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ para 40°C y para 30°C se estimó un valor $< 0.51 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Cuadro 6). Este D de quercetina calculado a 40°C fue cercano al D calculado a etanol al 95% a 30°C. El valor de D estimado para quercetina a etanol al 50% a 30°C fue $< 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$, cuantificando una concentración de quercetina de $0.91 \mu\text{g/mL}$ en el simulante de alimento. De acuerdo a la clasificación de la migración de compuestos de peso molecular bajo se considera no migración de (Briston y

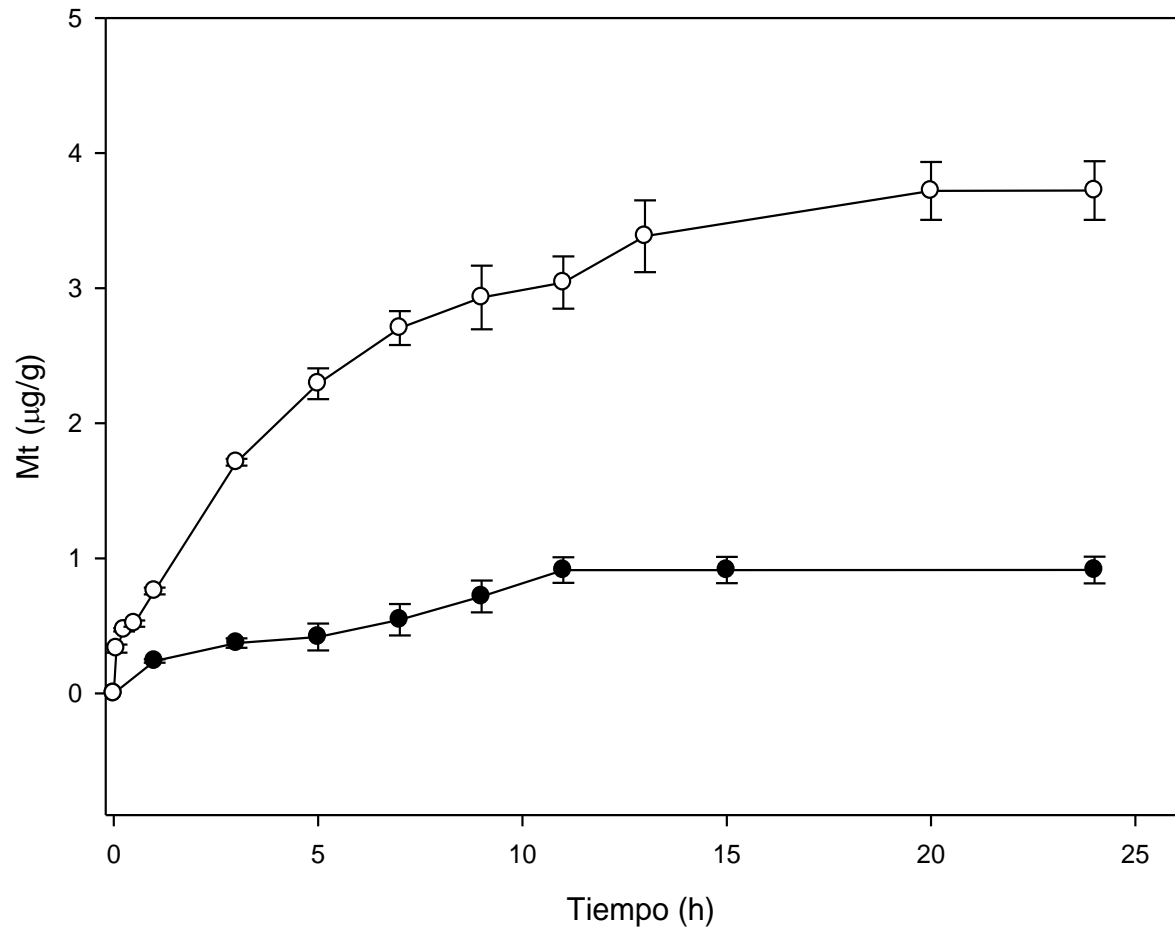


Figura 18. Difusión de quercetina de PLA-Ru #2 a etanol al 50% a 30°C (●) y 40°C (○) de acuerdo a la ecuación 2.

Cuadro 6. D y K_{pf} para quercetina de película de PLA-Ru #2 a etanol al 50% a 30 y 40°C (ecuación 2). Espesor de 43.18 μm .

Temperatura (°C)	$K_{p,f}$	α	$D \times 10^{-11}$ (cm ² /s) ¹	RCME ²
30	4865.71±570.62	0.13	<0.51±0.81	3.10E-7
40	288.73±35.40	2.19	15.02±6.9	4.40E-7

¹ Los valores expresados son el promedio de tres replicas ajustadas \pm error estándar con un intervalo de confianza asintótico del 95%.

² RCME: Raíz del cuadrado medio del error.

Katan, 1974). Los datos cuantificados de difusión fueron tan bajos que el programa utilizado para el cálculo de D no tuvo capacidad para determinarlo con exactitud.

El etanol es un solvente agresivo para el PLA, ya que ejerce un efecto plastificante para este polímero, pero mezclado con agua al 50% disminuye su proporción y por lo tanto este efecto. Los D de quercetina a etanol al 50% ($15.02 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$) y etanol al 95% ($95.8 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$) a 40°C muestran una relación directa entre el porcentaje de etanol y D . El etanol al 95% presenta mayor capacidad de penetración entre las cadenas del polímero, generando la difusión y disolución de quercetina. Sin embargo, al disminuir el % de etanol, disminuye la capacidad para difundirse entre el PLA y por tanto el D . Estudios realizados por Mascheroni *et al.*, (2010) reportan un D para crisina de $3 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, migrado desde una matriz de PLA plastificada con 15% de polietilenglicol a etanol al 100% a 25°C . Este compuesto fenólico presenta una estructura química similar a la que presenta quercetina, sin embargo, el D que reporta el autor es inferior al cuantificado para quercetina a 40°C por efecto de la temperatura. En el presente trabajo, la difusión de quercetina a etanol al 50% a 20°C fue baja e irregular.

Isoquercetina

Difusión a etanol al 95%. La cinética de difusión de isoquercetina de PLA-Ru #2 a etanol al 95% se realizó a 20, 30 y 40°C . A 20 y 30°C no fue posible detectar la presencia del antioxidante, debido a que la concentración migrada se encontró a niveles inferiores al límite de cuantificación del método ($0.25 \text{ }\mu\text{g/mL}$). Esto se debe a que la temperatura del sistema no proporcionó suficiente energía para romper las atracciones electrostáticas

entre las moléculas de isoquercetina y el PLA. Así como también a que este compuesto por su tamaño molecular requería espacios mayores para difundirse entre las cadenas del PLA hacia el simulante de alimento.

A 40°C isoquercetina alcanzó el equilibrio a las 155 h de contacto de la película con etanol al 95%. El valor del $K_{p,f}$ calculado para isoquercetina fue de 23.29, indicando que la mayor proporción del compuesto fenólico migró a etanol al 95% (Cuadro 7). La figura 19 muestra la gráfica de difusión de isoquercetina a etanol al 95% a 40°C. Para determinar D se utilizó la gráfica presentada en la figura 3A de la sección de anexos, calculado por medio de la ecuación 2, con un valor de $14.91 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$ (Cuadro 7). El valor calculado es menor que el obtenido para quercetina a estas mismas condiciones ($95 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$). Sin embargo, se encuentran en el mismo orden de magnitud. La diferencia en las cinéticas de difusión de isoquercetina y quercetina se debe a que quercetina presenta un tamaño molecular menor, permitiendo una mayor movilidad entre las cadenas del PLA, mientras que isoquercetina necesita una mayor energía para moverse entre las cadenas poliméricas.

Rutina

Difusión a etanol al 95%. La difusión de rutina de PLA-Ru #2 a etanol al 95% se realizó a 20, 30 y 40°C. No se detectó presencia de este antioxidante a 20 y 30°C debido a que la energía proporcionada no fue lo suficientemente fuerte para romper los puentes de hidrógeno entre las moléculas de rutina y el PLA. Así mismo, este compuesto requería espacios más grandes entre las cadenas del polímero para difundirse a través de él.

Cuadro 7. D y $K_{p,f}$ de quercetina, isoquercetina y rutina de película de PLA-rutina #2 a etanol al 95% a 40°C. El espesor de la película fue de 43.18 μm .

Antioxidante	$K_{p,f}$	α	$D \times 10^{-11} (\text{cm}^2/\text{s})^1$	RCME²
Quercetina	6.29±0.44	98.75	95.8±9.92 ^a	6.50E-7
Isoquercetina	23.29±3.53	23.19	14.91±1.4 ^b	5.25E-07
Rutina	2713.18±841.89	0.25	<0.51±0.70 ^c	3.10E-7

Para determinar D de quercetina se utilizó la ecuación 1. Para los D de isoquercetina y rutina la ecuación 2.

^{a,b,c} Presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

¹ Los valores expresados son el promedio de tres réplicas ajustadas \pm error estándar con un intervalo de confianza asintótico del 95%.

² RCME: Raíz del cuadrado medio del error.

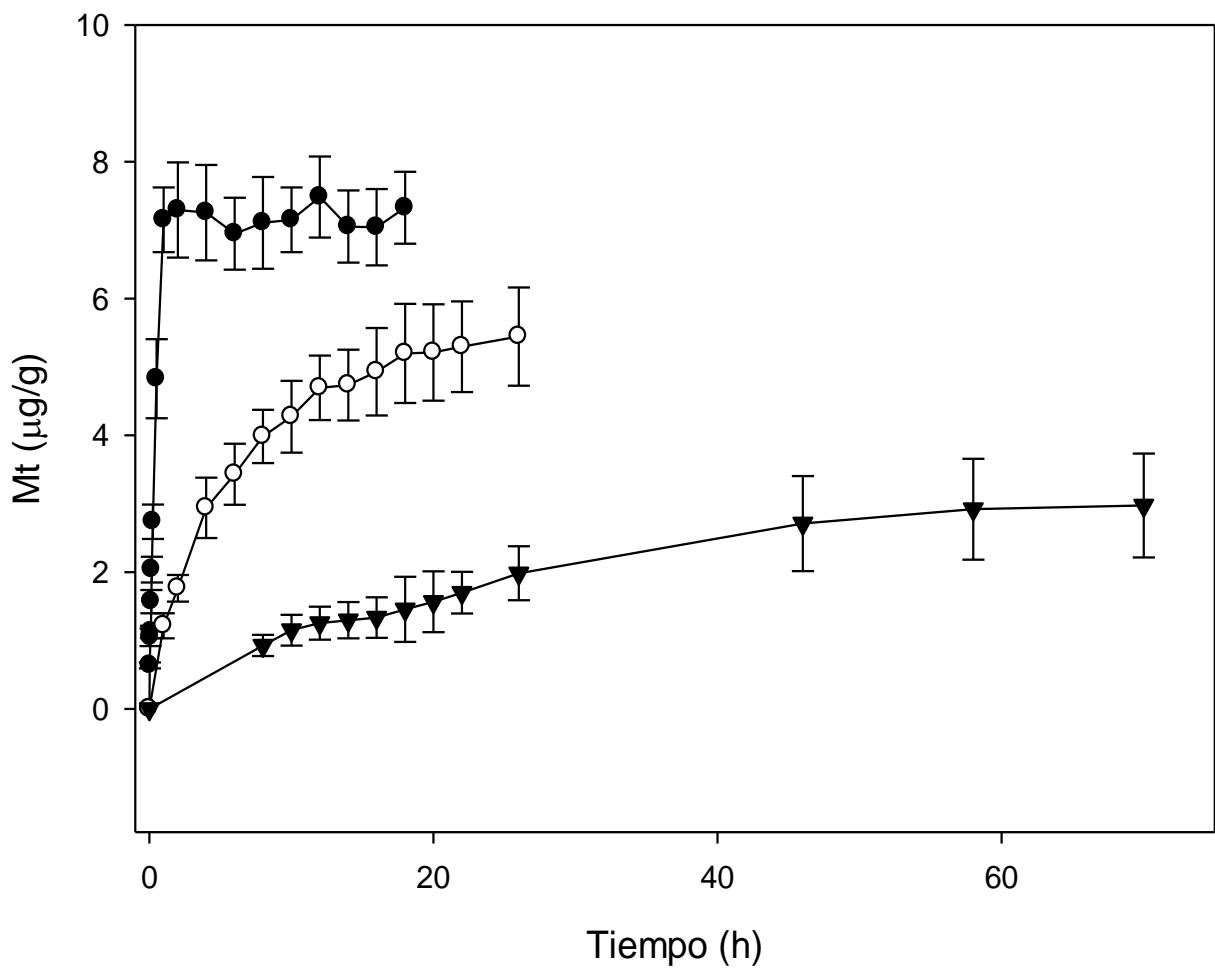


Figura 19. Difusión de quercetina (●), isoquercetina (○) y rutina (▲) de PLA-Ru #2 a etanol al 95% a 40°C

A 40°C rutina alcanzó el equilibrio en la difusión a las 26 h de contacto, con un $K_{p,f}$ de 2713.18 (Cuadro 7). Este alto valor indica que la mayor parte de rutina permaneció en el polímero, lo cual se puede deber al tamaño que presenta la molécula. La figura 19 muestra la gráfica de difusión de rutina a etanol 95% a 40°C, con un D estimado $<0.51 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Cuadro 7). Este valor se determinó utilizando la gráfica del anexo, (Figura 4A), de acuerdo a la ecuación 2. Este valor indica que la difusión de rutina hacia el simulante de alimentos fue lenta respecto a la difusión de isoquercetina y quercetina migrando a bajas concentraciones (1.46 $\mu\text{g/mL}$). De acuerdo a la clasificación de la migración de compuestos de peso molecular bajo se considera no migración de (Briston y Katan, 1974). Los datos cuantificados de difusión fueron tan bajos que el programa utilizado para el cálculo de D no tuvo capacidad para determinarlo con exactitud.

Al comparar la velocidad de difusión de quercetina, isoquercetina y rutina a etanol al 95% a 40°C (Figura 19) se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) (Cuadro 7). En este sentido, el orden de difusión de estos flavonoides fué quercetina>isoquercetina>rutina, presentándose una relación lineal ($R^2 = 0.8810$) entre en tamaño de la molécula y los D calculados para cada uno de los compuestos (Figura 20). Quercetina (aglicona) presenta un tamaño molecular menor seguido por isoquercetina y finalmente rutina, lo cual le impidió el movimiento a través de la matriz polimérica, dando valores más bajos para D .

Otro factor importante en la difusión de los flavonoides bajo estudio, es la presencia de grupos hidroxilos en la estructura de estos compuestos. Cada grupo OH que constituye la molécula posee un sitio potencial para formar un puente de hidrógeno con el grupo carboxilo de la estructura del PLA y dependiendo de la alineación de los grupos al momento de formar el puente

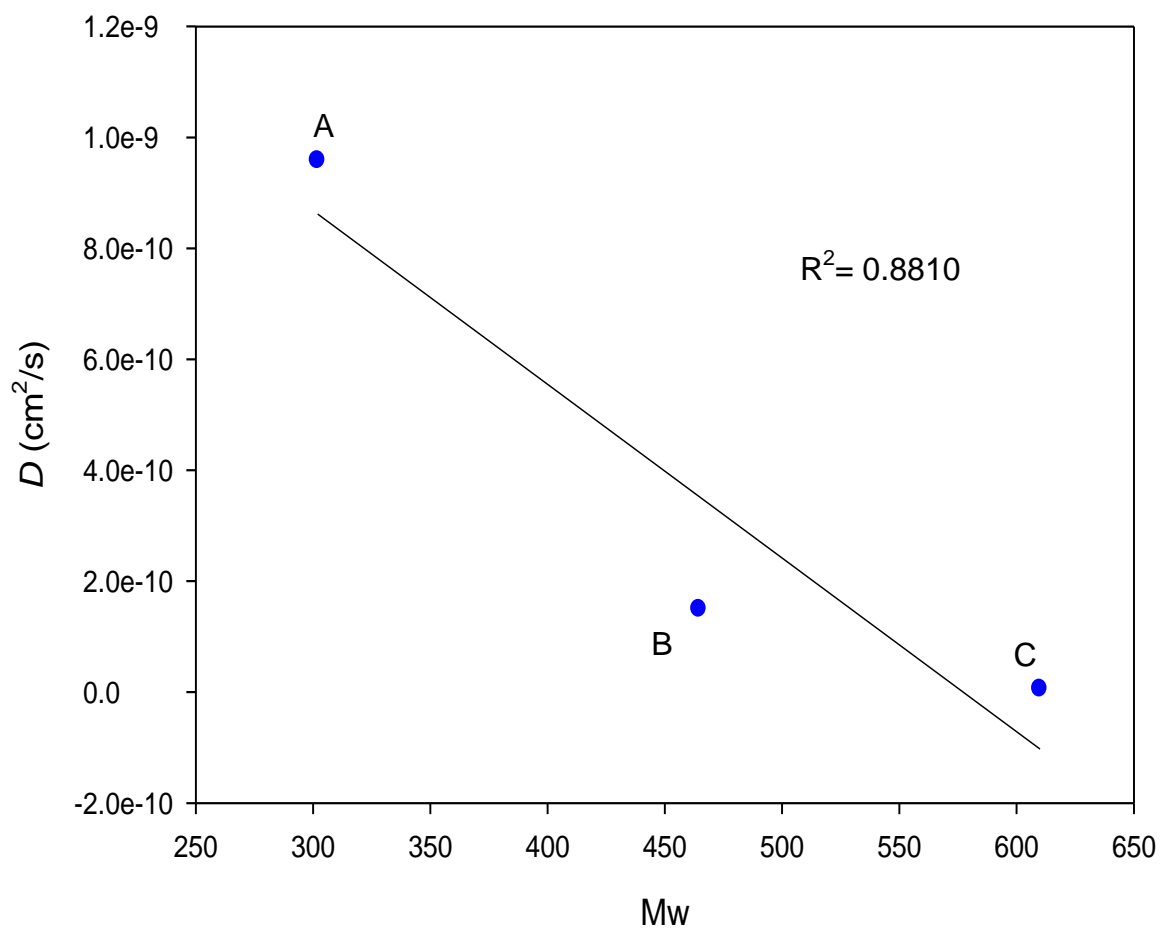


Figura 20. Gráfica de relación de tamaño molecular y coeficiente de difusión de quercetina (A), isoquercetina (B) y rutina (C) de PLA-Ru #2 a etanol al 95% a 40°C.

de hidrógeno es la fuerza que presentará la atracción electrostática (Figura 21). En el estudio de difusión realizado a 40°C, la energía proporcionada por el sistema generó la ruptura de los puentes de hidrógeno de los grupos OH de los antioxidantes con el PLA, llevándose a cabo la difusión y disolución de los compuestos a etanol al 95%. Sin embargo, debido a las 2 moléculas de glucosa que contiene rutina presenta un número mayor de grupos OH en su estructura, formando una mayor cantidad de puentes de hidrógeno con la matriz polimérica, comparado con isoquercetina y quercetina. Esto dio como resultado una difusión más lenta para rutina que para isoquercetina y quercetina.

Difusión de Rutina, Isoquercetina y Quercetina a Etanol al 10%

El experimento de difusión de rutina, isoquercetina y quercetina de la matriz polimérica de PLA a etanol al 10% se llevó a cabo a 40°C por 60 días, tiempo en el cual no se detectaron los compuestos en el simulante. De acuerdo a las legislaciones de la Unión Europea el etanol al 10% (medio acuoso), es un simulante para alimentos como jarabes, frutos de cáscara en forma de pasta, hortalizas en conserva en un medio oleoso, carnes y pescados frescos o refrigerados, productos cárnicos transformados, etc., según el Diario oficial de la Unión Europea (97/48/ CEE, 1997).

El etanol al 10% es un solvente polar prótico, presenta polaridad alta, constante dieléctrica alta y capacidad para formar puentes de hidrógeno. Sin embargo, no logró romper las atracciones entre el PLA y los compuestos fenólicos de la película PLA-Ru #2. Este comportamiento confirma que la difusión se produce principalmente por efecto del solvente y en menor efecto por la polaridad del medio.

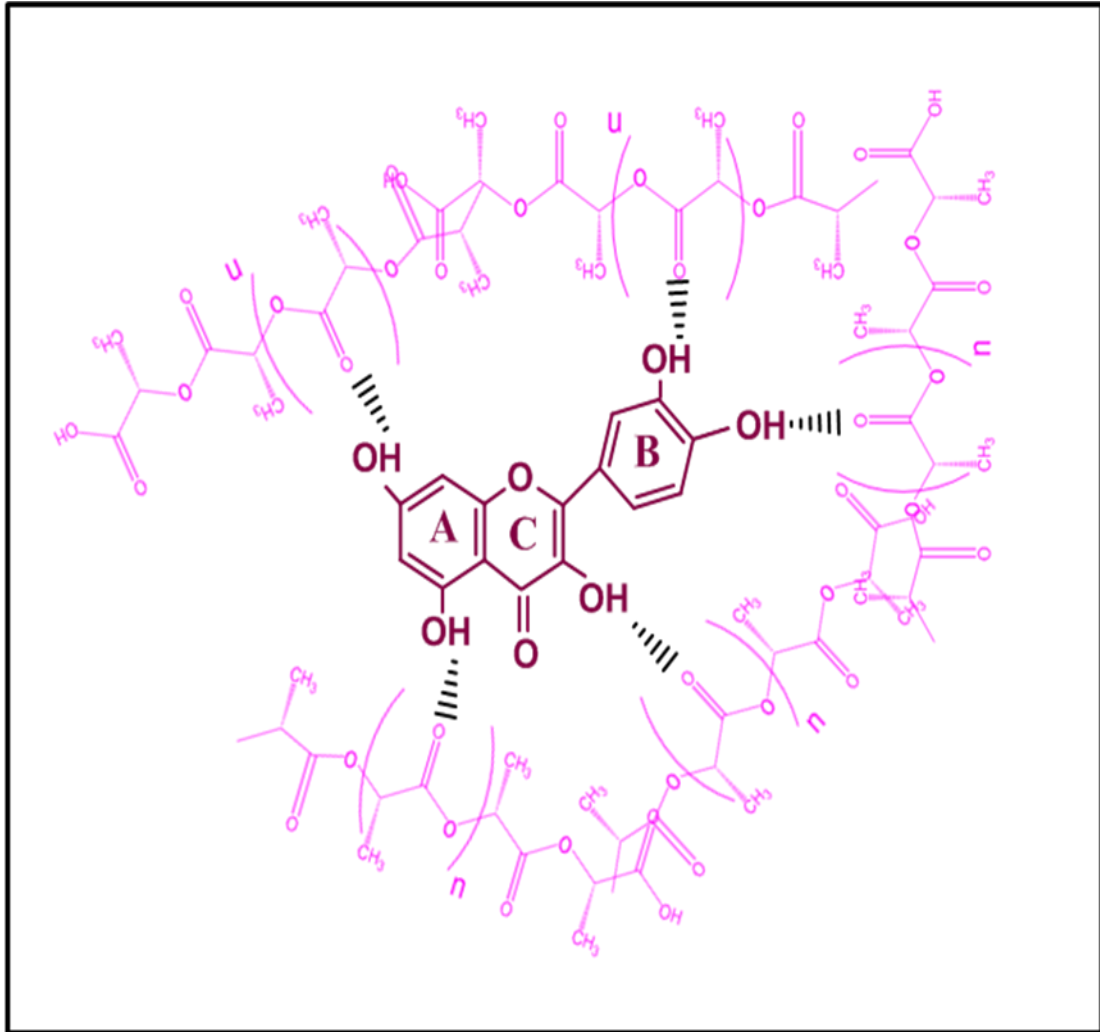


Figura 21. Sistema propuesto de puentes de hidrógeno del PLA con quercetina.

Determinación de la Difusión a un Aceite Vegetal y a una Mezcla Aceite-Agua.

Difusión de Rutina, Isoquercetina y Quercetina a Aceite de Soya.

La película de PLA-Ru #2 se puso en contacto directo con aceite de soya por un periodo de 60 días de almacenamiento a 40°C. Al cuantificar rutina, isoquercetina y quercetina por HPLC-UV-DAD no se encontró presencia de los antioxidantes, indicando que no hubo migración o los compuestos migraron a un nivel inferior a la concentración mínima detectable por el método de cuantificación establecido.

El PLA es un poliéster que presenta grupos carboxilos esterificados. Estos grupos pueden interactuar electrostáticamente con los grupos hidroxilo que se encuentran distribuidos alrededor de las moléculas de los antioxidantes, formando puentes de hidrógeno con el oxígeno de los grupos ésteres de las cadenas del PLA. Las moléculas de rutina, isoquercetina y quercetina quedan atrapadas por estos enlaces dipolo entre las redes del polímero. Estos enlaces formados pueden ser fuertes si el acomodo entre el hidrógeno del grupo OH presente en el antioxidante y el oxígeno del grupo éster se da de manera lineal, es decir, quedando el átomo electronegativo y el hidrógeno en línea recta (Bruice, 2008).

Otro factor importante en la migración es la solubilidad del simulante de alimentos. El aceite de soya requiere un soluto de su misma naturaleza para poder disolverlo. Rutina, isoquercetina y quercetina presentan una polaridad alta y por ende no son solubles en éste sin la ayuda de agentes emulsificantes (Bruice, 2008). Manzanarez-López et al., (2011) realizaron un estudio de difusión de α -tocoferol en una película de PLA hacia aceite fraccionado de coco a 20, 30 y 40°C, encontrando una difusión lenta y una

cantidad de α -tocoferol difundida baja, inferior a la esperada por los autores. Sólo migró el antioxidante presente en la superficie de la película, debido a que el α -tocoferol es una molécula no polar, por lo tanto soluble en el aceite fraccionado de coco. Por lo cual, la promoción de la difusión del antioxidante tiene dependencia con la interacción entre la matriz polimérica, el antioxidante y el alimento que esté en contacto con la película activa.

Difusión de rutina, isoquercetina y quercetina a una mezcla de aceite-agua

El estudio de difusión de la película de PLA-Ru #2 en contacto con una mezcla aceite-agua (50:50) se realizó a una temperatura de 40°C con un tiempo de contacto de 60 días. No se encontró migración de los antioxidantes rutina, isoquercetina y quercetina. La no migración es debida a las atracciones electrostáticas entre el polímero y los antioxidantes, así como la polaridad alta de los compuestos. Quercetina, isoquercetina y rutina presentan 5, 8 y 10 sitios potenciales, respectivamente para formar puentes de hidrógeno con el PLA, quedando la estructura atrapada entre las cadenas del polímero. Por lo tanto, se requiere una cantidad de energía superior a 4.7 Kcal/mol para romper cada puente de hidrógeno entre el antioxidante y el PLA (Badui, 2006). La fase oleosa de la mezcla aceite-agua no puede romper los puentes de hidrógeno debido a que carece de atracción electrostática. Sin embargo, el agua que es una molécula polar, también presentó una fuerza de atracción electrostática inferior a la requerida para romper los puentes de hidrógeno entre el antioxidante y el PLA. Esto confirma que la molécula de etanol, que aunque tiene menor polaridad que el agua, con su capacidad penetrante entre las cadenas del PLA, fomenta la migración de los antioxidantes.

Efecto del Procesamiento en el M_w del PLA.

La temperatura a la cual se sometió el PLA durante su procesamiento, puede afectar el M_w de este polímero. En el cuadro 8 se presenta el efecto producido por las condiciones de procesamiento utilizadas en la pelletización del PLA-Ru y pellets testigos, tomando de referencia resina molida sin procesar. El PLA molido presentó un M_w de 115 kDa. Una vez que el PLA fue sometido al proceso de pelletización a diferentes perfiles de temperatura, se produjeron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al molido. Los pellets PLA-testigo #1 presentaron un M_w de 114 kDa, siendo diferentes de los pellets testigo #2 y 3, con un M_w 106 kDa para ambos. La temperatura de procesamiento presentó efecto sobre el PLA, al incrementar la temperatura 20°C durante la fabricación de los pellets testigo ($p < 0.05$). El tiempo de residencia del polímero en el extrusor fue igual para todos los tratamientos.

Los pellets de PLA-Ru #1, 2 y 3, presentaron un M_w 111, 103 y 100 kDa, respectivamente, con disminución del M_w conforme se incrementó la temperatura de fabricación de pellets de PLA. Esta disminución pudo ser originada por la presencia de rutina y temperatura de procesamiento. Los pellets testigo # 2 y 3 fueron estadísticamente iguales. Sin embargo, los pellets procesados con rutina a estas mismas temperaturas, presentaron M_w más bajos ($p < 0.05$).

Esto debe confirmarse con experimentos adicionales para encontrar una explicación congruente. Soto-Valdez *et al.*, (2011) evaluó el peso molecular de los pellets de PLA antes y después del procesamiento con resveratrol, encontrando una disminución significativa en el M_w . Por lo cual, el proceso de pelletización del PLA, puede producir un efecto en la degradación del polímero.

Cuadro 8. Efecto de las temperaturas de procesamiento de los pellets de PLA control y con rutina en el peso molecular promedio (M_w) del polímero.

Muestra	M_w (kDa)
PLA sin procesar molidos	115 ^a
Pellets PLA-testigo #1 (130-140 °C)	114 ^{ab}
Pellets PLA-testigo #2 (150-160 °C)	106 ^{cd}
Pellets PLA-testigo #3 (155-165 °C)	106 ^c
Pellets PLA-Ru #1 (130-140 °C)	111 ^{ab}
Pellets PLA-Ru #2 (150-160°C)	103 ^{cde}
Pellets PLA-Ru #3 (155-165 °C)	100 ^e

Valores con literales diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

ETAPA III

Evaluación del Efecto de la Película con Rutina y sus Productos de Descomposición en la Estabilidad Oxidativa de Aceite de Soya.

Índice de Peróxidos (IP)

La figura 22, muestra el resultado de IP en aceite de soya almacenado en presencia de luz a 30°C por 15 días, en contacto con quercetina, BHT, PLA-testigo y PLA-Ru #2. Los valores de IP cuantificados presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la muestra del aceite testigo y las muestras de aceite a las que se les aplicó tratamiento. El valor de IP que se cuantificó en el aceite de soya el día 0 fue de 1.38 meq/Kg. El aceite de soya adicionado con BHT, quercetina, PLA-Ru #2 y PLA-testigo, presentaron un IP de 25 meq/Kg para el día 15 de almacenamiento, mientras que el testigo presentó 35.14 meq/Kg para este mismo tiempo de monitoreo. En este estudio se observó la tendencia típica de la oxidación, con estado de inducción y propagación, no alcanzándose a observar la fase de terminación.

En aceites vegetales, como el de soya, el periodo de inducción se considera a partir de los 20 meq/Kg (Allen y Hamilton, 1999). En este estudio se presentó a los 12 días de almacenamiento, para los tratamientos con quercetina, PLA-Ru #2 y PLA-testigo con IP de 20.45, 20.46 y 20.48 meq/Kg, respectivamente, a los 11 días para las muestras con BHT (20.40 meq/Kg), mientras que el aceite testigo lo presentó a los 8 días (20.40 meq/Kg). Los tratamientos aplicados retrasaron la inducción de la oxidación al aceite de soya de 3 a 4 días. El antioxidante sintético liposoluble BHT tuvo el mismo valor de IP, protegiendo de igual manera que quercetina. Por lo tanto, el uso

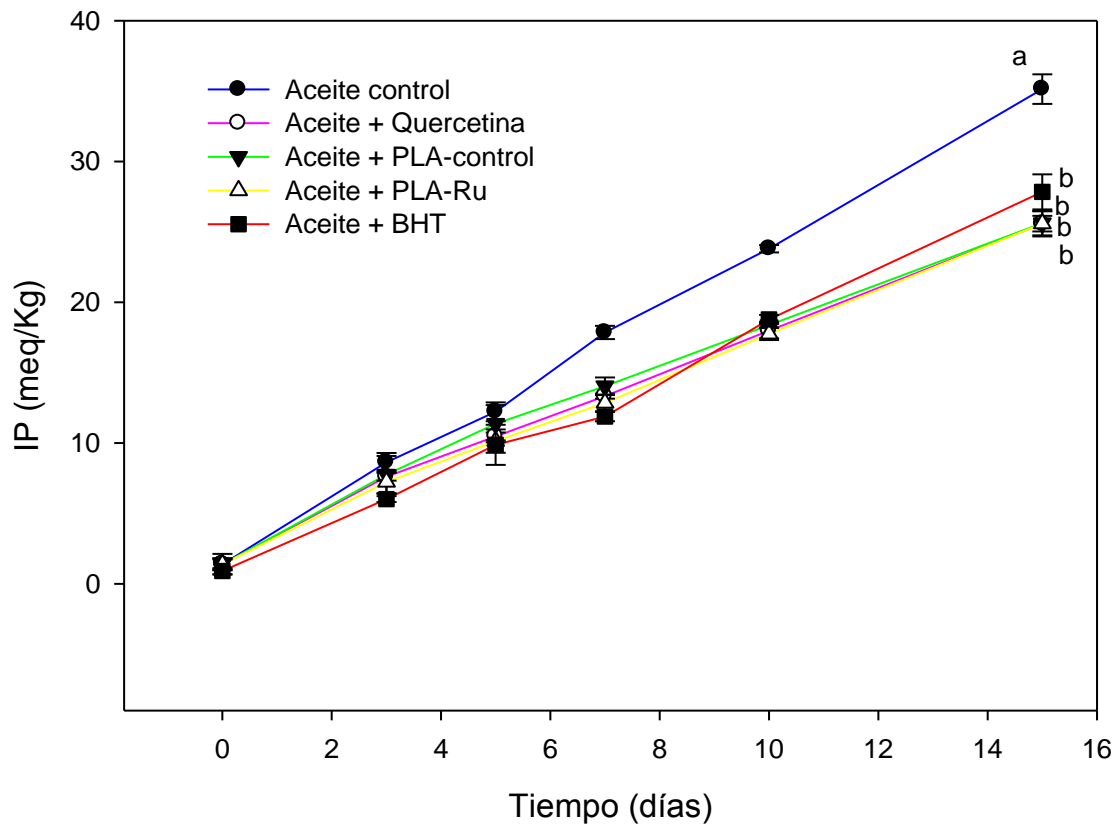


Figura 22. Índice de peróxidos en aceite de soya en contacto con quercetina, BHT, película PLA-testigo y PLA-Ru #2, almacenados a 30°C. Los valores graficados son promedio de 3 repeticiones \pm DS. Literales diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

de antioxidantes naturales, podría remplazar a aquellos sintéticos para proporcionar estabilidad oxidativa a los alimentos con contenido graso.

Un resultado inesperado en este trabajo fue que PLA-testigo proporcionó estabilidad oxidativa al aceite de soya. Esto se puede deber a que la resina de PLA presentó actividad antioxidante *per se* o contiene antioxidantes para protegerlo de la oxidación polimérica, ya que los polímeros comerciales no se encuentran puros (Lim *et al.*, 2010). La presencia de los aditivos contenidos en el PLA, pudieron haber migrado y proporcionado estabilidad oxidativa a las muestras de aceite de soya en contacto con la película testigo, ya que esta protegió al aceite igual que PLA-Ru #2 y quercetina.

De acuerdo a lo establecido en el Codex Alimentarius, el límite para la vida útil de un aceite vegetal es de 10 meq/Kg de IP. Este valor se alcanzó a los 5 días de almacenamiento para las muestras con quercetina, BHT, PLA-Ru #2 y PLA-testigo, mientras que el aceite testigo lo presentó a los 4 días. Las muestras de aceite de soya a las que se les aplicó tratamiento no presentaron diferencias significativas en los IP generados durante el periodo de almacenamiento ($p < 0.05$).

Roedig-Penman y Gordon, (1998), evaluaron la estabilidad oxidativa de aceite girasol a 60°C en presencia de 1×10^{-4} a 5×10^{-4} M (30.20 a 151 µg/mL) de quercetina incorporada de manera directa. En este estudio reportan que quercetina presentó un efecto significativo en la oxidación al día 1, con un valor de IP de 30 meq/Kg para la muestra con quercetina, mientras que para su testigo 140 meq/Kg. Por lo cual, quercetina proporcionó una marcada estabilidad oxidativa al aceite de girasol. La concentración de quercetina incorporada de manera directa al aceite de soya fue de 135 µg/mL, dato que queda dentro del rango aplicado en el estudio de Roeding-Penman y Gordon

(1998). En este estudio, quercetina proporcionó estabilidad oxidativa al aceite de soya durante el periodo de almacenamiento, disminuyendo la generación de IP e incrementando su vida de anaquel 4 días. Sin embargo, no se observó efecto de PLA-Ru #2, debido a que rutina, isoquercetina y quercetina no migraron al aceite de soya, quedando atrapadas entre las cadenas del PLA.

Determinación de la Capacidad Antioxidante de Extractos de Películas PLA-Ru

En la figura 23 se presenta la capacidad antioxidante de rutina, isoquercetina y quercetina extraídos de las películas de PLA-Ru #1, 2 y 3, expresada como % de inhibición para DPPH, siendo de 34.32, 59.92 y 53.53 % para cada película, respectivamente. La concentración extraída de estos compuestos fue de 177 µg/mL para PLA-Ru #1, 260 µg/mL para PLA-Ru #2 y 200 µg/mL para PLA-Ru #3.

La actividad de antioxidante de los extractos, fue proporcional a la concentración de rutina, isoquercetina y quercetina contenida en las películas. PLA-Ru #1 presentó el % de inhibición más bajo, debido a que la concentración de compuestos fenólicos en esta película fue más baja comparada con las otras películas, con la presencia de rutina en mayor proporción. PLA-Ru #2 presentó el porcentaje de inhibición más alto, debido a que esta película contiene la mayor concentración de flavonoides, con un porcentaje mayor de quercetina. PLA-Ru #3 presentó un porcentaje de inhibición cercano al de PLA-Ru #2. Los porcentajes de inhibición presentados por PLA-Ru #1, 2 y 3 presentaron diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$).

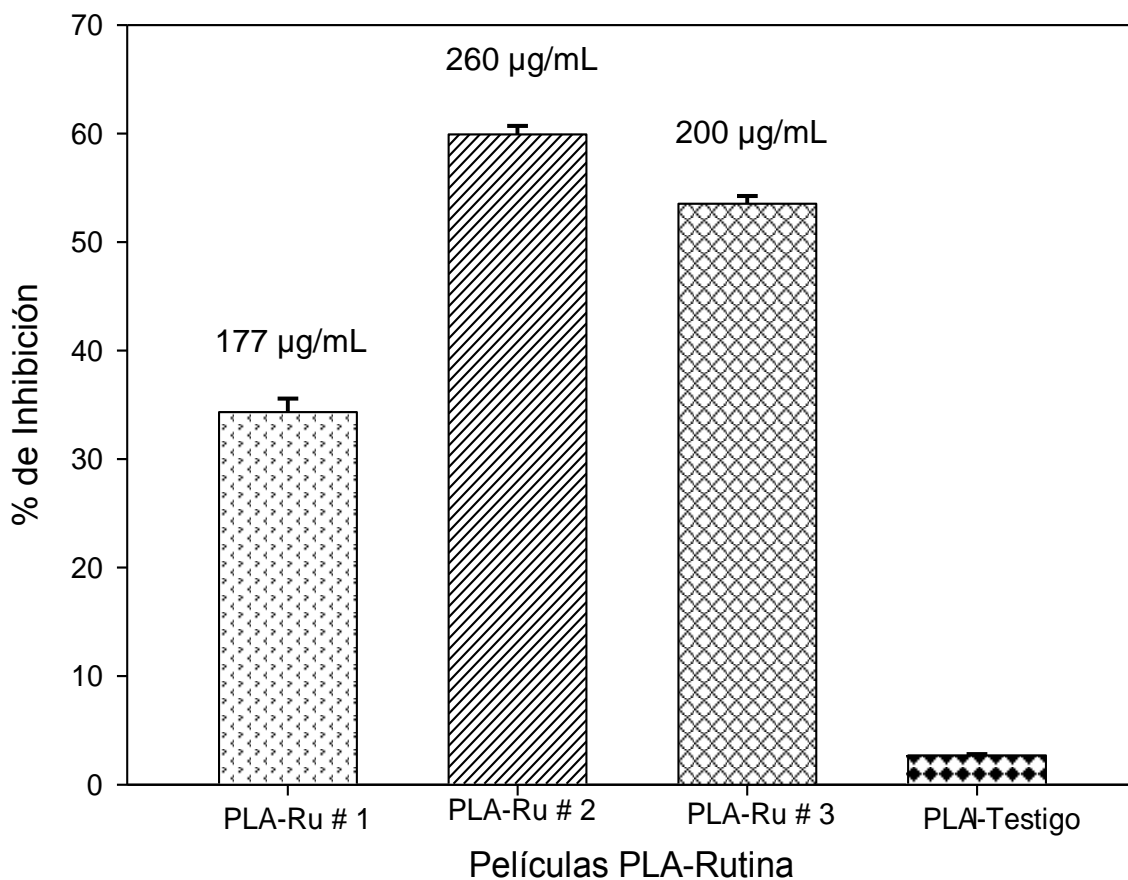


Figura 23. Porcentaje de inhibición del radical DPPH por rutina, isoquercetina y quercetina extraídos de las películas PLA-Ru #1,2 y 3 y PLA-testigo. Las concentraciones sobre las barras corresponden a la concentración de los antioxidantes extraídos de cada película. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS.

López-de-Dicastillo *et al.*, (2010) evaluaron el porcentaje de inhibición de quercetina extraída con etanol de una película de EVOH, encontrando 71.5 y 79.5% para películas con el 1% y 5% de antioxidante, respectivamente. Estos porcentajes de inhibición son superiores a los determinados a los compuestos extraídos de PLA-Ru #1, 2 y 3. Esto se debe a que la concentración de antioxidante presente en las películas de EVOH es mayor a la contenida en las películas PLA-Ru. Este análisis indica que los antioxidantes incorporados a las películas tanto de EVOH como de PLA, conservaron su actividad antioxidante de acuerdo a los flavonoides remanentes en las películas después del procesamiento térmico al que fueron sometidos.

En la figura 24 se presenta el porcentaje de inhibición del radical DPPH en presencia de los estándares rutina, isoquercetina y quercetina a una concentración de 100 µg/mL. Quercetina presentó el mayor porcentaje de inhibición con 67.62%, seguido de 58.92 y 40.04% para isoquercetina y rutina, respectivamente. Los porcentajes de inhibición presentados para los 3 antioxidantes, fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) entre ellos. Burda *et al.*, (2001) analizaron el porcentaje de inhibición del radical DPPH en presencia de quercetina y rutina a una concentración de 3.3×10^{-5} M (10 µg/mL). El porcentaje de inhibición que reportan para quercetina es de 90.9% y 91.8% para rutina, siendo valores superiores a los cuantificados en el presente estudio, a pesar que la concentración utilizada por los autores fue un 90% más baja que la utilizada en nuestros estándares. Para isoquercetina no se han encontrado reportes de la actividad antioxidante, por lo cual sólo se tiene el determinado en nuestro laboratorio.

Así mismo, se evaluó la actividad antioxidante de la mezcla de los 3 compuestos, con una concentración de 33 µg/mL cada uno, presentando un

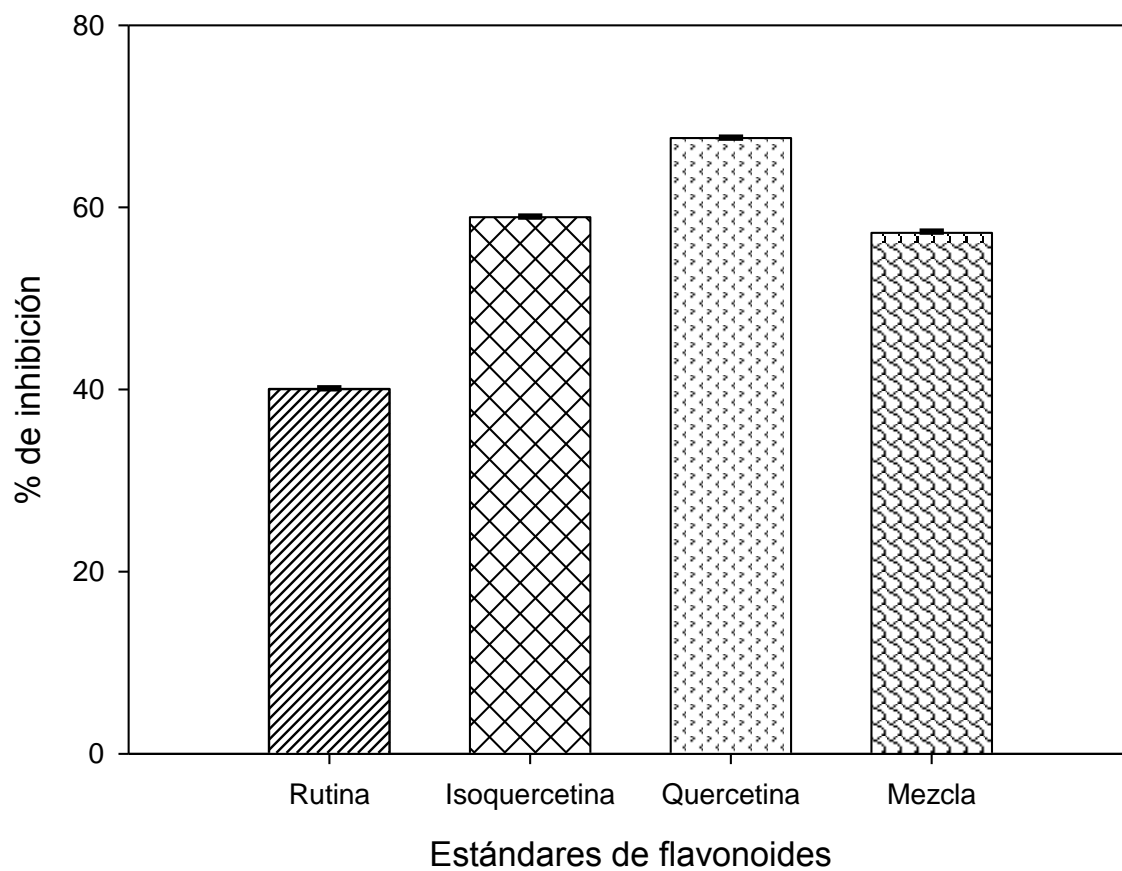


Figura 24. Porcentaje de inhibición del radical DPPH de los estándares de rutina, isoquercetina, quercetina a una concentración de 100 μ g/mL y mezcla de ellos (33.33 μ g/mL de cada uno). Las concentraciones sobre las barras corresponden a la concentración de los antioxidantes extraídos de cada película. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS.

57.20% de inhibición. Esta actividad antioxidante indica que no se presentó sinergia entre los 3 antioxidantes, ya que la actividad antirradical de la mezcla de los compuestos se presentó dentro del rango del porcentaje de inhibición que presentan estos tres flavonoides de manera individual. Iacopini *et al.*, (2008), evaluaron el efecto sinérgico entre mezclas de antioxidantes fenólicos, reportando que entre rutina y quercetina no se presenta este efecto.

Cuando se evaluó el porcentaje de inhibición de DPPH a extractos de las películas PLA testigo, se encontró un 3.40, 2.70 y 2.50% para las películas PLA-testigo #1, 2 y 3, respectivamente. Con estos resultados se puede confirmar que, la resina del PLA tiene una ligera actividad antioxidante o contiene antioxidantes que migraron al aceite de soya, proporcionándole estabilidad oxidativa como se mostró en la sección anterior.

A pesar que los extractos presentaron actividad antioxidante, la película PLA-Ru #2 no tuvo efecto en el aceite de soya, debido a que rutina, isoquercetina y quercetina no migraron.

CONCLUSIONES

Se estableció el proceso de fabricación de películas de PLA con rutina por extrusión.

La adición de rutina tuvo efecto en las propiedades ópticas e integridad de las cadenas del PLA, incrementando su coloración y disminuyendo el M_w del polímero.

Durante el procesamiento de las películas, rutina se descompuso a isoquercetina y quercetina por efecto térmico.

La migración de rutina, isoquercetina y quercetina se vió influenciada por la proporción de etanol contenida en los simulantes de alimentos.

El etanol al 95% no es un simulante adecuado para alimento graso en sistemas donde se utilice PLA como envase.

Aunque la película PLA-Ru #2 presentó efecto en la estabilidad oxidativa del aceite de soya, no se le puede atribuir a la migración de rutina y a sus productos de descomposición, ya que estos no migraron al aceite de soya y la película testigo presentó el mismo efecto.

Los antioxidantes rutina, isoquercetina y quercetina extraídos de la película PLA presentaron actividad antioxidante similar al presentado por soluciones equivalentes de sus respectivos estándares.

El PLA presentó una baja actividad antioxidante.

RECOMENDACIONES

Incorporar otros polímeros o aditivos de origen natural a la película de PLA que cambien su polaridad y permitan la liberación gradual de los antioxidantes incorporados en ella.

Identificar otros compuestos antioxidantes producidos por la descomposición de rutina.

Estudiar la difusión de rutina y sus productos de descomposición a otras matrices de alimentos como vinagretas, leche, salsas con contenido graso, etc.

Identificar los aditivos presentes en la resina comercial de PLA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

97/48/EEC. (1997). Normas de bases necesarias para la verificación de la migración de los componentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. *Official Journal of the European Community*. No. L 222. 12 de Agosto de 1997.

Allen, J. C. y Hamilton, R. J. (1999). Rancidity in foods. Great Britain. Aspen publishers. 270 p.

AOCS. (2009). Official Methods and Recommended Practices of American Oil Chemists' Society. Peroxide Value Acetic Acid-Isocetane Method. Cd 8b-90. American Oil Chemists' Society. Vol. 1. 6a. ed. Champaign, IL: AOCS, Press.

ASTM. (2006). Annual book of ASTM standards. Conshohocken. PA. USA. pp 630-634.

Auras, R., Harte, B. y Selke, S. (2004). An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 4:835-864.

Auras, R., Lim, L. T., Selke, S. y Tsuji H. (2010). Poly(Lactic Acid). EUA. John Wiley and Sons. Wiley. 487 p.

Badui, S. (2006). Química de los alimentos. México Pearson. Addison Wesley. 4ª. Ed. 716 p.

Berardini, N., Knodler, M., Schieber, A. y Carle, R. (2005). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 6:442-452.

Biesaga, M., Stafiej, A. y Pyrzynska, K. (2007). Extraction and hydrolysis parameters for determination of quercetin in *Hypericum perforatum*. *Chromatographia*. 65:701-706.

Briston, J. H. y Katan, L. L. (1974). Plastic in contact with food. Londres. Black Academic & Professional. 466p.

Brolis, M., Gabetta, B., Fuzzati, N., Pace, N., Panzeri, F. y Peterlongo, F. (1998). Identification by high performance liquid chromatography diode array detection mass spectrometry and quantification by high performance liquid chromatography uv absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *Journal of Chromatography A*. 825:9–16.

Bruice, P. Y. (2008). Química Orgánica. México. Pearson 5ª Ed.1440 p.

Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S. y Kroh, L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 20:3229-3235.

Burda, S. y Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49(6):2774-2779.

Caillet, S., Yu, H., Lessard, S., Lamoureux G., Ajdukovic D. y Lacroix, M. (2007). Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chemistry*. 100: 542-552.

Careri, M., Elviri, L., Mangia, A. y Musci M. (2000). Spectrophotometric and coulometric detection in the high performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in range juice. *Journal of Chromatography A*. 881:449–460.

- Catalá, R.** y Gavara, R. (2002) Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos. España. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 346 p.
- Chiodo, S. G.,** Leopoldini, M., Russo, N. y Toscano, M. (2010). The inactivation of lipid peroxide radical by quercetin. A Theoretical Insight. *Physical Chemistry*. 12:7662-7670.
- Choe, E.** y Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5:169-186.
- Decker, E.** (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science and Technology*. 9:241-248.
- Deshpande, S.,** Salunkhe, D. y Madhavi, D. (1995). Food antioxidants: technological, toxicological and health perspective. EUA. Marcel Dekker. 469 p.
- Di Lorenzo, M. L.** (2005). Crystallization behavior of Poly (L-Lactic Acid). *European Polymer Journal*. 41:569-575.
- Domínguez–Espinosa, R. M.,** Wang, R. y Pacho–Carrillo, J. D. (2002). Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. *Tecnología y Ciencia*. México. 77–83.
- Dudonne, S.,** Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M. y Merillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:1768-1774.

Escamilla, J. C. I., Cuevas, M. E. y Guevara, F. J. (2010). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina*. México. 52:1726-1742.

FDA. (2007). Guidance for industry: Preparation of premarket submissions for food contact substances: chemistry recommendations. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/ucm081818.htm#iid1c>. Julio, 2011.

Frankel, E. (1983). Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*. 22:1.

Frankel, E. N. y Meyer, A. S. (2000). The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:1925-1941.

Gámez-Meza, N., Noriega-Rodríguez, J.A., Medina-Juárez, L. A., Ortega-García, J., Cázarez-Casanova, R. y Angulo-Guerrero, O. (1999). Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76:1445-1447.

Garlotta, D. (2001). A literature review of poly (Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*. 9:63-84.

Gattin, R., Copinet, A., Bertrand, C. y Couturier, Y. (2002). Biodegradation study of a starch and poly (Lactic Acid) co-extruded material in liquid, composting and inert mineral media. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 50:25-31.

Graciano-Verdugo, A. Z., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Cruz-Zárata, P., Islas-Rubio, A. R., Sánchez-Valdez, S., Sánchez-Escalante, A., González-Méndez, N. y González-Rios, H. (2010). Migration of α -Tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability. *Food Research International*. 43:1073-1078.

Granda-Restrepo, D. M., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Troncoso-Rojas, R., Vallejo-Córdoba, B., Gámez-Meza, N. y Graciano-Verdugo, A.Z. (2009). Migration of α -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. *Food Research International*. 42:1396-1402.

Guo, R. y Wei, P. (2008). Studies on the antioxidant effect of rutin in the microenvironment of cationic micelles. *Microchimica Acta*. 161:233-239.

Hirota, S., Shimoda, T. y Takahama, U. (1998). Tissue and spatial distribution of flavonol and peroxidase in onion bulbs and stability of flavonol glucosides during boiling of the scales. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:3497-3502.

Huang, D., Ou, B. y Ronald, L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:1841-1856.

Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P. y Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21:589-598.

Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Jacquot, M. y Desobry, S. (2010). Poly lactic acid: Production, applications, nanocomposites, and

release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9:552-571.

Justino, G. C. y Vieira, A. J. (2010). Antioxidant mechanisms of quercetin and myricetin in the gas phase and in solution a comparison and validation of semi empirical methods. *Journal of Molecular Modeling*. 16:863-876.

Kalinova, J. y Vrchotova, N. (2009). Level of catechin, myricetin, quercetin and isoquercitrin in buckwheat (*Fagopyrum esculentum moench*), changes of their levels during vegetation and their effect on the growth of selected weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:2719-2725.

Karpiska, M., Borowski, J. y Danowska-Oziewicz, M. (2001). The use of natural antioxidants in ready to serve food. *Food Chemistry*. 72:5-9.

Kim, Y. C., Higuchi, R., Kitamura, Y. y Komori, T. (1991). Thermal degradation of glycosides, degradation of flavonoid glycosides. *Liebigs Annalen Der Chemie*. 12:1285-1289.

Konica Minolta. (2003). Manual color Konica Minolta Sensing, ING. http://pdf.directindustry.com/pdf/konica-minolta-sensing-americas/color-measurement-tutorial/18425-6642-_21.html. Agosto 2011.

Koontz, J., Moffitt, D., Marcya, J. E., O'Keefe, S. F., Duncana, S. E. y Longd, T. E. (2010). Controlled release of α -tocopherol, quercetin and their cyclodextrin inclusion complexes from linear low-density polyethylene (LLDEP) films into a coconut oil model food system. *Food Additives and Contaminants: Part A*. 27:1598-1607.

Leighton, F. y Urquiaga, I. (2000). Polifenoles del vino y salud humana. *Antioxidantes y Calidad de Vida*. 7:5-13.

Li, L., Tang, S., Wang, Q., Pan, Y. y Wang, T. (2006). Preparation of poly (lactic acid) by direct polycondensation in azeotropic solution. *Journal-East China. University of Science and Technology*. 32:672.

Lim, L. T., Auras, R. y Rubino, M. (2008). Processing technologies for poly (lactic acid). *Progress in Polymer Science*. 33:820-852.

Lopez-de-Dicastillo, C., Alonso, J. M., Catala, R., Gavara, R. y Hernández-Muñoz, P. (2010). Improving the antioxidant protection of packaged food by incorporating natural flavonoids into ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:10958-10964.

Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D. R. y Carle, R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 112:551-559.

Makris, D. P. y Rossiter, J. T. (2000). Heat-Induced, metal catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:3830-3838.

Manzanarez-López, F. (2009). Migración de α -tocoferol de una película de ácido poliláctico y su efecto en la estabilidad oxidativa de aceite vegetal. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.

Manzanarez-López, F., Soto-Valdez, H., Auras, R. y 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*. 104:508-517.

Márquez, H., Cuellar, C. A., Martínez, P. J., Alemán, S. A., Lora, G. J. y Vélez, C. H. (1999). Estudio fitoquímico de la especie *Hibiscus elatus* sw. *Revista Cubana de Farmacia*. 33:127-131.

Martin, O. y Averous, L. (2001). Poly (Lactic Acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. *Polymer*. 42:6209-6219.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. España. 17:271-278.

Martínez-Valverde, I., Periago, M. J. y Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50:5-18.

Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L. y Piergiovanni, L. (2010). Diffusivity of propolis compounds in polylactic acid polymer for the development of antimicrobial packaging films. *Journal of Food Engineering*. 98:294-301.

Matsumoto, H., Nakamura, Y., Hirayama, M., Yoshiki, Y. y Okubo, K. (2002). Antioxidant activity of black currant anthocyanin aglycons and their glycosides measured by chemiluminescence in a neutral pH region and in human plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:5034-5037.

Mendoza-Wilson, A. M., Sotelo-Mundo, R. R., Balandrán-Quintana, R. R., Glossman-Mitnik, D., Sántiz-Gómez, M.A. y García-Orozco, K. D. (2010). Exploration of the kinetic and thermochemical abilities for the free radical scavenging of two quercetin conformers. *Journal of Molecular Structure*. 981:187-193.

Mendoza-Wilson, A. M., Lardizabal-Gutiérrez, D., Torres-Moye, E., Fuentes-Cobas, L., Balandrán-Quintana, R., Camacho-Dávila, E., Quintero-Ramos, A. y Glossman-Mitnik, D. (2007). Optimized structure and thermochemical properties of flavonoids determined by the CHIH (medium)-DFT model chemistry versus experimental techniques. *Journal of Molecular Structure*. 871:114-130.

Min, D. y Boff, J. (2002). Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 1:58-72.

Miranda, M., Vega-Gálvez, A., López, J., Parada, G., Sanders, M., Aranda, M., Uribe, E. y Di-Scala, K. (2010). Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa willd*). *Industrial Crops and Products*. 32:258-263.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., José Núñez, M. y Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72:145-171.

Navarro-García, G., Bringas-Alvarado, L. y Pacheco-Aguilar, R. (2004). Nueva herramienta para el estudio de la oxidación de los ácidos grasos, una de las causas fundamentales de la pérdida de calidad de los alimentos para la acuicultura. *Memoria del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. Hermosillo, Sonora, México. 16–19.

Number Cruncher Statistical System. (2007). Programa Estadístico para Windows. Hintze J.L. EUA.

Nerín, C., Tovar, L. y Salafranca, J. (2008). Behaviour of a new antioxidant active film versus oxidizable model compounds. *Journal of Food Engineering*. 84:313-320.

Niu, S. Y., Wu, M. L., Hu, L. Z., Mei, Z. H. y Liu, S. F. (2009). Nucleic acid biosensor for DNA hybridization detection using rutin-Cu as an electrochemical indicator. *Electrochimica Acta*. 54:1564-1569.

Orak, H. (2007). Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Scientia Horticulturae*. 111:235-241.

Ortiz-Vazquez, H., Shin, J., Soto-Valdez, H., Auras, R. (2011). Release of butylated hydroxytoluene (BHT) from poly(lactic acid) films. *Polymer Testing*. 30:463–471.

Pan, X., Ushio, H. y Ohshima, T. (2005). Effects of molecular configurations of food colorants on their efficacies as photosensitizers in lipid oxidation. *Food Chemistry*. 92:37-44.

Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J. L. y Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*. 92:547-557.

Peng, B. y Yan, W. (2009). Solubility of luteolin in ethanol + water mixed solvents at different temperatures. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 55:583-585.

Pérez T. G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 22:48-57.

- Primas, U.** (2002). Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. México. 3:295-301.
- Rawel, H. M.,** Meidtner, K. y Kroll, J. (2005). Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:4228-4235.
- Robertson, G. L.** (2006). Food packaging. Principles and practice. EUA. Taylor & Francis. 2a. Ed. 550 p.
- Rodriguez-Aguilera, R.** y Oliveira, J. C. (2009). Review of design engineering methods and applications of active and modified atmosphere packaging systems. *Food Engineering Reviews*. 1:66-83.
- Roedig-Penman, A.** y Gordon, M. H. (1998). Antioxidant properties of myricetin and quercetin in oil and emulsions. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 75:169-180.
- Rohn, S.,** Buchner, N., Driemel, G., Rauser, M. y Kroh, L. W. (2007). Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:1568-1573.
- Rooney, M.** (1995). Active food packaging. Londres, Inglaterra. Blackie Academic & Professional. 260 p.
- Sánchez-Alonso, I.,** Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F. y Borderías, A. (2007). Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies. *Food Chemistry*. 101:372-378.

Sandoval, M., Lazarte, K. y Arnao, I. (2008). Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinifera L.* (Uva). *Anales de la Facultad de Medicina*. 69:250-259.

Skoog, D. A., Holler, F. J. y Crouch, S. R. (2008). Principios de análisis instrumental. México. CENGAGE Learning. 6ª ed. 1038 p.

Slimestad, R., Fossen, T. y Vågen, I. M. (2007). Onions: A source of unique dietary flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:10067-10080.

Soto-Valdez, H. (2010). Migration. Auras, R., Lim, L. T., Selke, S., and Tsuji, H. In Poly (lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing and applications. John Wiley & Sons. EUA. 181-188. p.

Soto Valdez, H., Auras, R. y Peralta, E. (2011). Fabrication of poly (lactic acid) films with resveratrol and the diffusion of resveratrol into ethanol. *Journal of Applied Polymer Science*. 121:2.970-778.

Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. y Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*. 68:408-420.

Vaclavik, V. A. y Christian, E. W. (2007). Essential of food science. Packaging of food products. EUA. *Food Science*. 3a ed. 660 p.

Vermeiren, L., Devlieghere, F., Van Beest, M., De Kruijf, N. y Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology*. 10:77-86.

Wijeratne, S. K., Abou-Zaid, M. y Shahidi, F. (2006). Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:312-318.

Xu, C., Zhang, Y., Cao, L. y Lu, J. (2010). Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in china. *Food Chemistry*. 119:1557-1565.

Yam, K. L., Takhistov, P. T. y Miltz, J. (2005). Intelligent packaging: concepts and applications. *Journal of Food Science*. 70:1-10.

Yuzay, I. E., Auras, R. y Selke, S. (2010). Poly (lactic acid) and zeolite composites prepared by melt processing: Morphological and physical mechanical properties. *Journal of Applied Polymer Science*. 115:2262-2270.

ANEXOS

En los siguientes anexos se presentan las gráficas utilizadas para determinar los coeficientes de difusión. Los puntos azules representan las medidas experimentales de las muestras por triplicado. Las líneas sólidas de color rojo representan la mejor curva teórica predictora de cada sistema, las líneas azul punteadas representan un intervalo con 95% de confianza del mejor ajuste y las líneas sólidas azul representan la predicción de los valores experimentales con un intervalo de 95% de confianza.

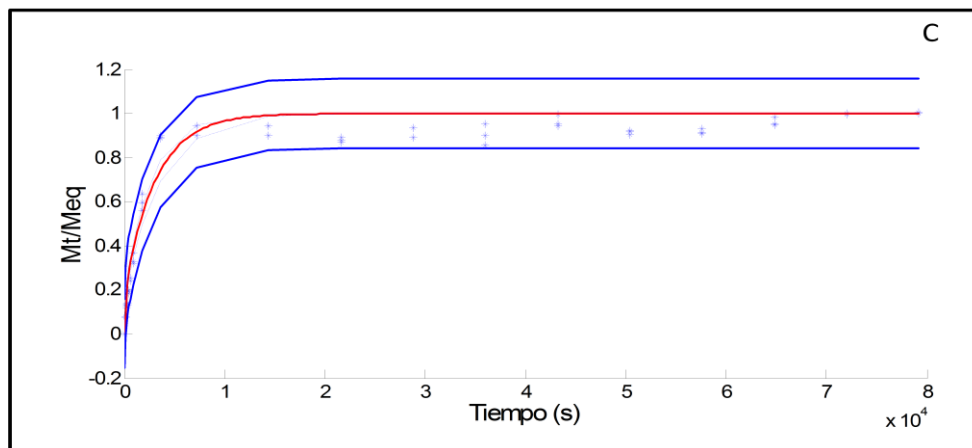
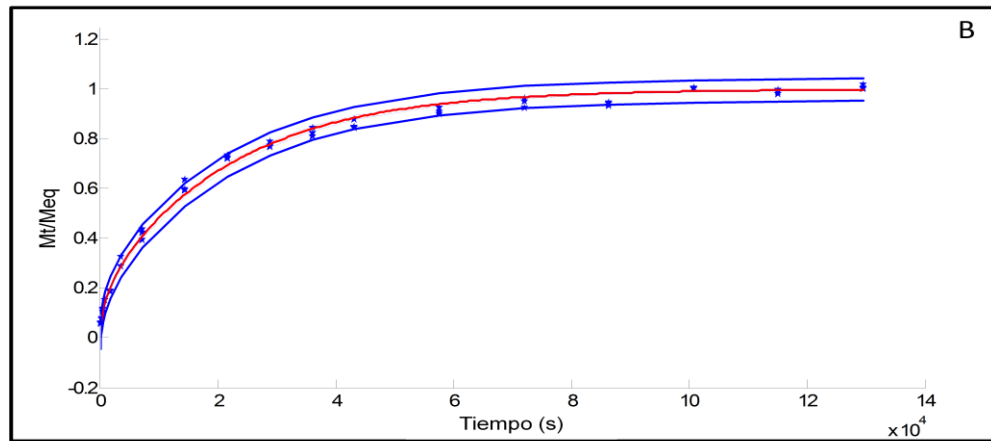
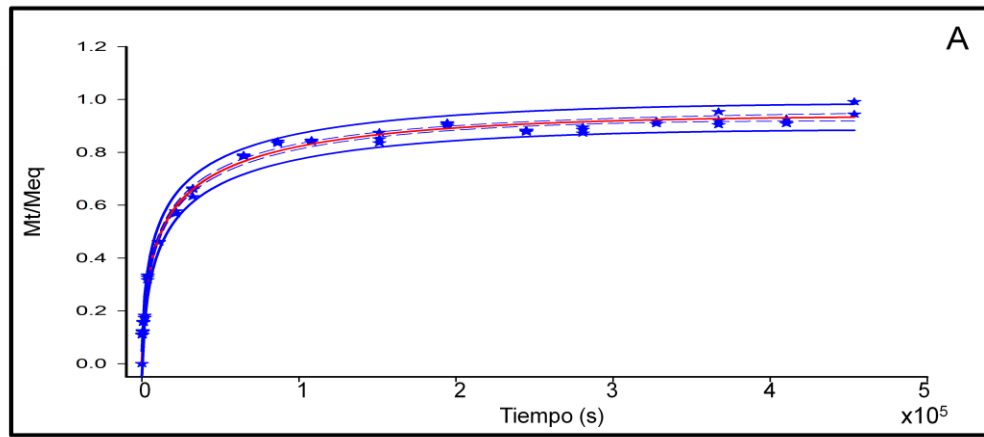


Figura 1A. Gráficas de difusión de quercetina a etanol al 95% a 20°C (A), 30°C (B) y 40°C (C).

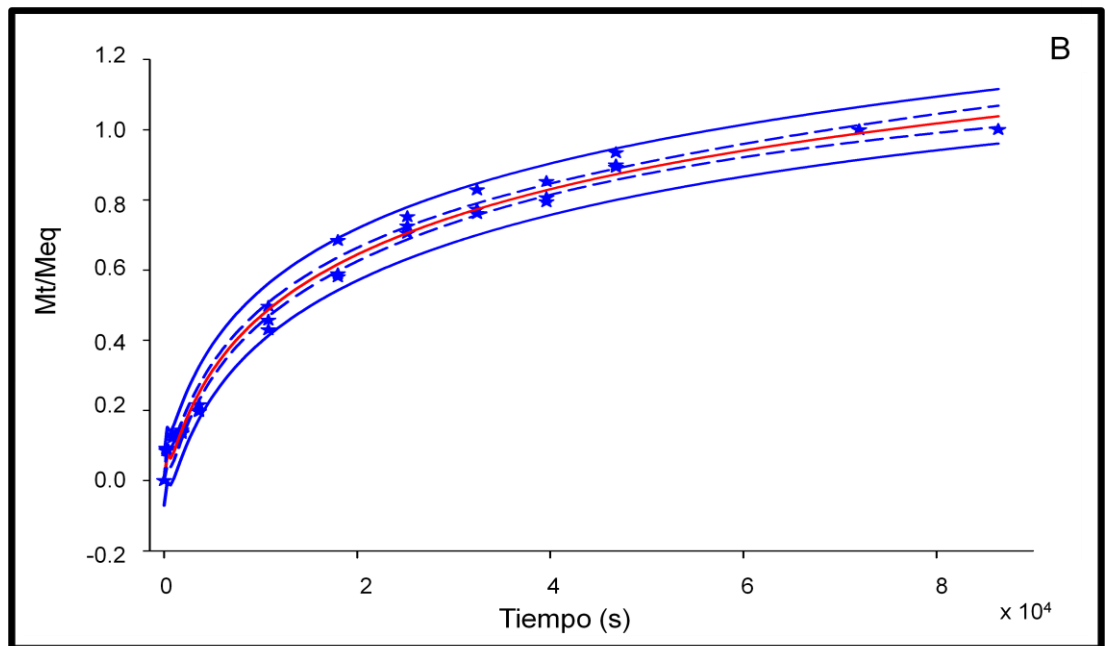
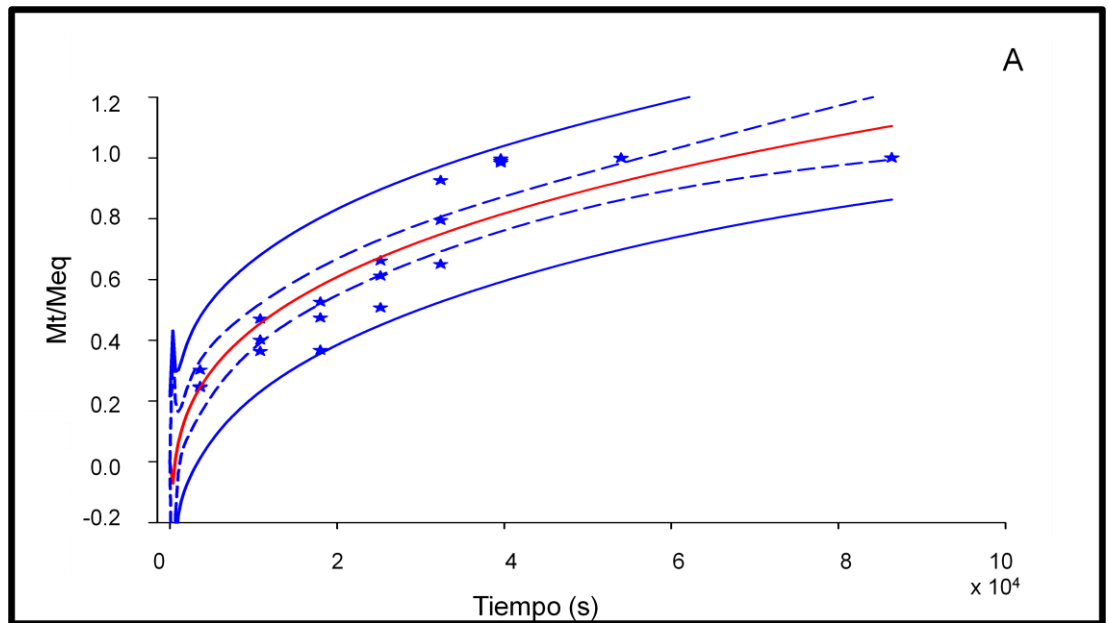


Figura 2A. Gráficas de difusión de quercetina a etanol al 50% a 30°C (A) y 40°C (B) de acuerdo a la ecuación 2.

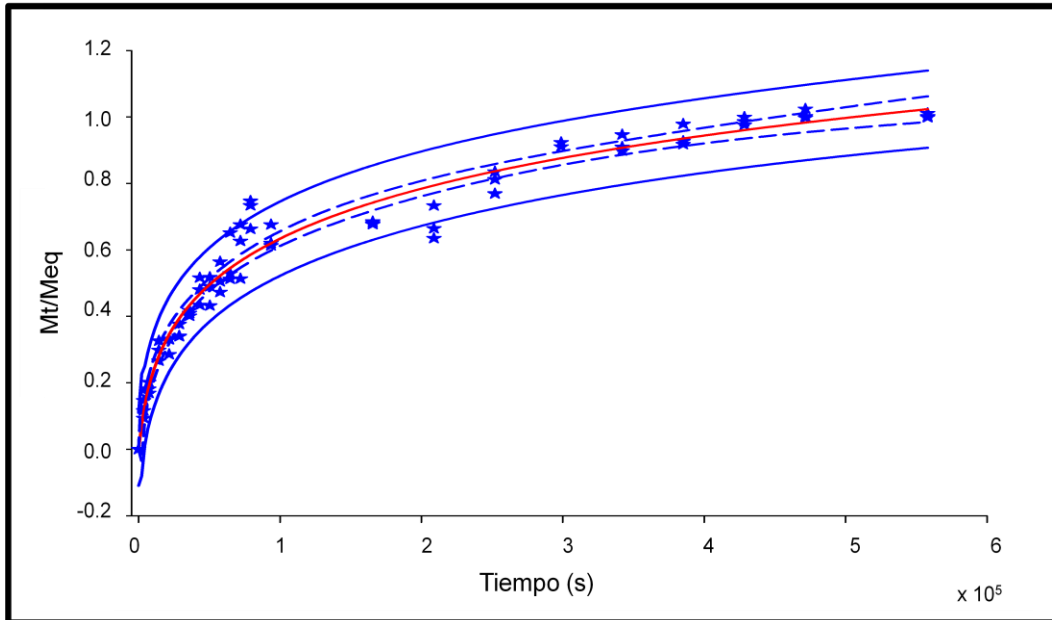


Figura 3A. Gráfica de difusión de isoquercetina a etanol al 95% a 40°C.

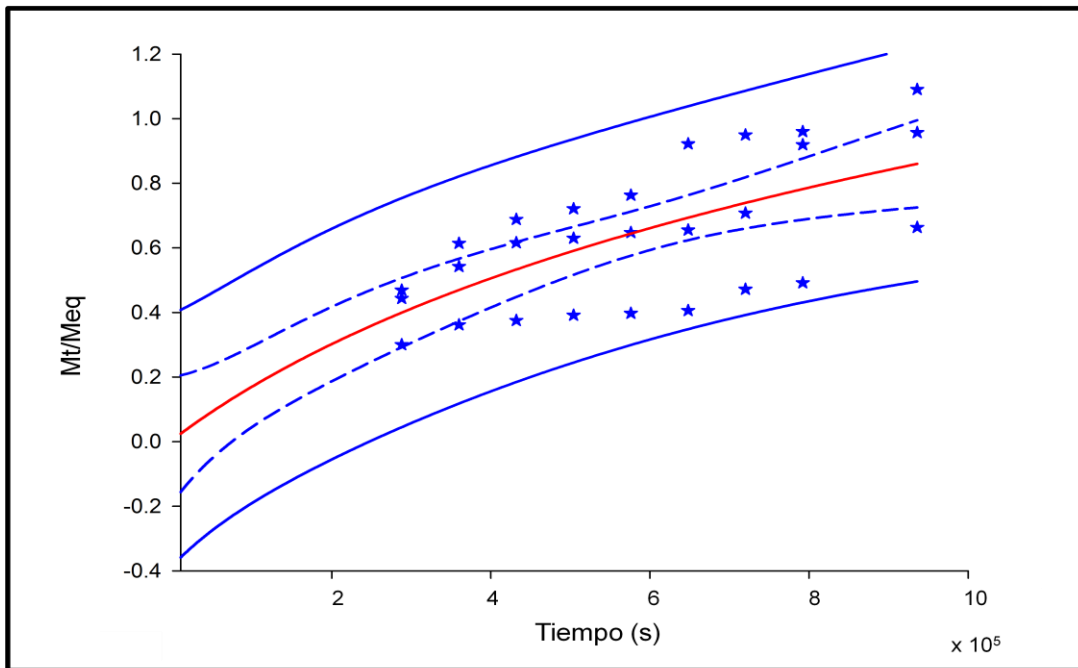


Figura 4A. Gráfica de difusión de rutina a etanol al 95% a 40°C.