

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

**ESTUDIOS DE LA DIFUSIÓN DE CATEQUINA Y EPICATEQUINA
EN PELÍCULAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO Y SU
CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA**

POR

FABIOLA MARÍA IÑIGUEZ FRANCO

TESIS APROBADA POR LA

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
VEGETAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

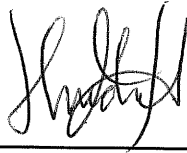
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

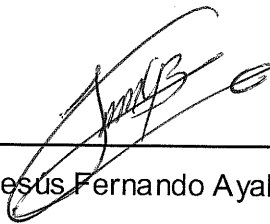
SEPTIEMBRE DE 2011

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Fabiola María Iñiguez Franco la han encontrado satisfactoria y recomienda que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Herlinda Soto Valdez



Dr. Jesus Fernando Ayala Zavala



Dra. Nohemí Gámez Meza

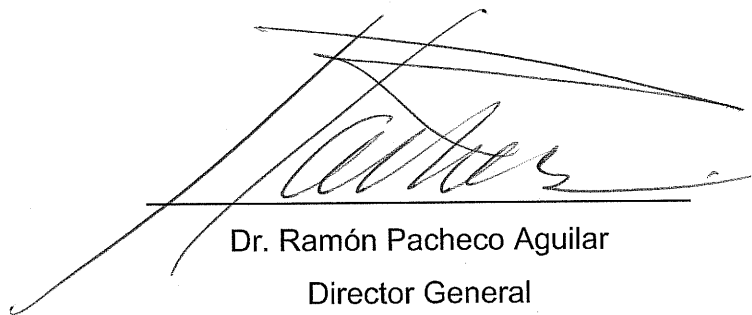


Dr. Tomás Madera Santana

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 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por permitirme formar parte de su programa de posgrado para realizar mis estudios de maestría.

A la Dra. Herlinda Soto Valdez, por su valiosa asesoría, conocimientos transmitidos y permitirme ser parte de su grupo de trabajo a lo largo de este tiempo.

A mi comité de tesis: Dr. Jesús Fernando Ayala, Dra. Nohemí Gámez y Dr. Tomás Madera, por sus asesorías, observaciones y sugerencias aportadas durante el desarrollo de esta tesis.

A todas mis amigas del laboratorio de envases: Ely por ser una excelente guía, consejera, además de jalarme las orejas cuando era necesario; a Panchita por ser buena amiga y pasar buenos momentos a la hora del trabajo; a Hayati por la oportunidad que me brindó para ser su amiga, por su amistad sincera en esta última etapa e introducir en mi diccionario palabras nuevas; a Citla y a Johana por ser unas excelentes amigas, consejeras en todo tipo de ámbito, por pasar aquellas tardes en el laboratorio hasta la madrugada, que sin ustedes mi estancia en Hermosillo no hubiera sido la misma, las quiero mucho.

Al personal del Departamento de Alimentos de Origen Vegetal por asistir a mis seminarios de avances de tesis, por sus preguntas y consejos.

A la Dra. Ana María Mendoza, al Dr. Humberto González Ríos y al Dr. Jaime Lizardi por sus excelentes asesorías y contribuciones.

A todos los maestros que impartieron las diferentes materias cursadas durante el programa de posgrado, por compartir sus conocimientos y experiencias.

Al personal de biblioteca y docencia por brindarme su ayuda.

A Martín Peralta por sacarme de apuros cuando el HPLC no quería trabajar.

A mis amigos y amigas de la maestría, por hacer que estos dos años fueran grandiosos. A Violeta por apoyarme durante este tiempo y a Cindy por su ayuda y la amistad incondicional que me brindó en las buenas y en las malas.

A Gabriel Fuente por estar a mi lado en esta etapa de mi vida, brindarme su apoyo y cariño, que sin él mi estancia en Hermosillo no hubiera sido la misma.

A mis roomies Olga y Nehiby por estar conmigo, pasar buenos momentos juntas, por su amistad, la oportunidad que me brindaron de conocerlas y aguantarme, además de que saber que puedo contar con ellas siempre.

A Erika, Natalie, Dámaris, Diana, Nalle, Perla, Andrea y Ceci por ser mis amigas de toda la vida, apoyarme siempre y darme la mano aunque fuera a distancia, las quiero muchísimo, gracias por ser como son.

DEDICATORIA

A mis padres por todo su amor, ejemplo, apoyo y enseñanzas que me han brindado a lo largo de mi vida, por siempre estar a mi lado, darme una familia excepcional y que gracias a ellos me he convertido en la persona que soy ahora.

A mis hermanos, Pau, Jous y Gil, por ser mis grandes amigos, saber que puedo contar con ellos toda mi vida, darme momentos inolvidables, por crecer a mi lado y así formar la familia que somos ahora.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
La Oxidación como Causa de Pérdida de Calidad en los Alimentos	3
Factores que Causan Oxidación	5
Tecnologías para Evitar la Oxidación	5
Residuos Industriales	6
Compuestos Fenólicos	7
Catequina y Epicatequina	9
Importancia en Tecnología de Alimentos	12
Desarrollo de Envases Activos con Antioxidantes	14
Matriz Polimérica	15
Ácido Poliláctico como Matriz Polimérica	18
Migración en Materiales Poliméricos	25
Migración de Antioxidantes en Materiales de Envase	30
HIPÓTESIS.....	33
OBJETIVOS	33
General.....	33
Específicos.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
Materiales.....	34
Elaboración de Pellets y Películas de PLA con Catequina y Epicatequina	34
Extracción de Catequina y Epicatequina de Pellets y Películas de PLA para su Cuantificación	37
Evaluación de Propiedades de las Películas	38
Propiedades Ópticas	38
Propiedades Térmicas.....	39

Diseño Experimental para Determinar el Efecto del Procesamiento y de los antioxidantes sobre la T _m y T _g del PLA.....	39
Ensayo de Difusión.....	40
Difusión de Catequina y Epicatequina en Películas de PLA.....	40
Determinación del Coeficiente de Difusión.....	42
Determinación de la Energía de Activación de la Difusión.....	43
Diseño Experimental para Determinar el Efecto de Migración a Diferentes Temperaturas.....	43
Efecto del Procesamiento y la Difusión sobre el Peso Promedio del Peso Molecular del PLA.....	44
Diseño Experimental para Determinar el Efecto del Procesamiento y la Difusión sobre el P _M del PLA.....	45
Efecto del Procesamiento y Difusión sobre la Actividad Antioxidante de Catequina y Epicatequina.....	46
DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidracil).....	47
Diseño Experimental para Determinar el Efecto del Procesamiento y Difusión sobre la Actividad Antioxidante de Catequina y Epicatequina.....	48
Ensayo de Estabilidad Oxidativa.....	49
Índice de Peróxidos (IP).....	49
Diseño Experimental para Determinar el Efecto en la Oxidación en Aceite de Soya.....	50
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	52
Cuantificación de Catequina y Epicatequina de Pellets y Películas.....	52
Evaluación de Propiedades de las Películas.....	54
Propiedades Ópticas.....	54
Propiedades Térmicas.....	60
Difusión de Catequina y Epicatequina en Películas de PLA.....	62
Etanol al 95 %.....	62
Etanol al 50 %.....	72

Aceite.....	75
Agua	78
Emulsión.....	79
Agua-Aceite.....	80
Efecto del Procesamiento y la Difusión en el Peso Promedio del Peso Molecular del PLA.....	81
Efecto del Procesamiento y Difusión en la Actividad Antioxidante de Catequina y Epicatequina.....	85
Ensayo de estabilidad oxidativa	90
CONCLUSIONES.....	94
RECOMENDACIONES.....	95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos aplicados para el ensayo de estabilidad oxidativa de aceite de soya.	51
Cuadro 2. Temperatura de transición vítrea (T_g) y temperatura de fusión (T_m) de la película de PLA testigo, con catequina y con epicatequina.	61
Cuadro 3. Coeficientes de partición ($K_{P,S}$) y valores de α de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 95 % a 20, 30, 40 y 50 °C. El espesor de las películas fue de 57-77 μm	65
Cuadro 4. Coeficientes de difusión (D) de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 95 % a 20, 30, 40 y 50 °C. El espesor de las películas fue de 57-77 μm	68
Cuadro 5. Coeficientes de partición ($K_{P,S}$) y difusión (D) de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 50 % a 40 °C. El espesor de las películas fue de 57-77 μm	74
Cuadro 6. Efecto de la molienda y procesamiento sobre el P_M del PLA.	82
Cuadro 7. Efecto del procesamiento sobre el P_M de los pellets y películas de PLA incorporando catequina y epicatequina.	82
Cuadro 8. Efecto de las condiciones de difusión en el P_M de las películas de PLA con catequina y PLA con epicatequina.	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la reacción de oxidación. R- Ácido graso insaturado, R [·] - Radical libre, ROO [·] - Radical peroxilo. Modificado de Badui, 2006.....	4
Figura 2. Estructura química de los principales flavonoides. Modificado de Peterson y Dwyer, 1998.	8
Figura 3. Estructura química de catequina y epicatequina. Anillos fenólicos A y B, anillo pirano C. Modificado de Yilmaz, 2006.....	10
Figura 4. Estructura del ácido poliláctico. Modificado de Lim <i>et al.</i> , 2008.....	19
Figura 5. Producción de ácido poliláctico. Modificado de Auras <i>et al.</i> , 2004.	21
Figura 6. Geometría típica de un husillo para un extrusor de un solo husillo. Modificado de Lim <i>et al.</i> , 2010.	21
Figura 7. Etapas del proceso de migración. Modificado de Catalá y Gavara, 2002.....	27
Figura 8. Diagrama del procesamiento de pellets y películas de PLA con catequina y epicatequina.	35
Figura 9. Apariencia visual de pellets (A,B,C) y películas (a,b,c) de PLA-Testigo (A,a), PLA-Cate (B,b) y PLA-Epi (C,c).	53
Figura 10. Barrido espectral en la región UV-visible de las películas de PLA-Testigo, PLA-Cate y PLA-Epi. Espesor: 57-77 μm	55
Figura 11. Espectro infrarrojo de la molécula de catequina.	57
Figura 12. Espectro infrarrojo de la molécula de epicatequina.	57

Figura 13. Espectro infrarrojo de las películas de PLA-Testigo, PLA-Cate y PLA-Epi.....	59
Figura 14. Difusión de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 95 % a 20, 30, 40 y 50 °C. Las gráficas muestran la concentración de catequina y epicatequina en etanol al 95 % (µg/mL) contra tiempo (días).....	63
Figura 15. Difusión de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 95 % a 20, 30, 40 y 50 °C de acuerdo a la segunda ley de Fick. El eje “y” muestra la masa difundida de catequina o epicatequina a cierto tiempo t , dividido por la masa de catequina o epicatequina difundida en el equilibrio (M_t/M_{eq}). El eje “x” muestra el tiempo en s. El espesor de las películas fue de 57-77 µm.	67
Figura 16. Energía de activación de la difusión de catequina de PLA-Cate ($y = -5767.3x + 8.7366$, $R^2: 0.7597$) y epicatequina de PLA-Epi ($y = -5165.6x + 6.8683$, $R^2: 0.7815$) en etanol al 95 %. La pendiente de cada línea es igual a $Ea/2.303R$, y Ea de la difusión de PLA-Cate y PLA-Epi fue 110.43 y 98.91 kJ/mol, respectivamente.	71
Figura 17. Difusión de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 50 % a 40 °C. Las gráficas muestran la concentración de catequina y epicatequina en etanol al 50 % (µg/mL) contra tiempo (días).....	73
Figura 18. Difusión de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 50 % a 40 °C de acuerdo a la segunda ley de Fick. El eje “y” muestra la masa difundida de catequina o epicatequina a cierto tiempo t , dividido por la masa de catequina o epicatequina difundida	

en el equilibrio (M_t/M_{eq}). El eje "x" muestra el tiempo en s. El espesor de las películas fue de 57-77 μm 76

Figura 19. Inhibición del radical DPPH (%) en presencia de catequina (46.42 $\mu\text{g/mL}$) y epicatequina (57.52 $\mu\text{g/mL}$) antes y después de ser incorporados en películas de PLA. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS. 86

Figura 20. Inhibición del radical DPPH (%) en presencia de catequina y epicatequina después de su difusión en etanol al 95 %. Las concentraciones sobre las barras corresponden a la concentración de antioxidante en etanol al 95 % cuando llegó el sistema al equilibrio. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS. 88

Figura 21. Índice de peróxidos en aceite de soya sin antioxidante (Testigo), adición directa de catequina (0.025 %), epicatequina (0.025 %) y BHT (0.025 %); aceite de soya en contacto con PLA-Testigo, PLA-Cate y PLA-Epi, almacenados a 30 °C. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS. 91

RESUMEN

El uso de envases activos adicionados con antioxidantes es una alternativa para reducir la oxidación lipídica de los alimentos. El ácido poliláctico (PLA) es un polímero obtenido de fuentes renovables que puede ser usado como matriz polimérica para el envase. En este trabajo se fabricaron películas de PLA testigo, PLA con catequina y PLA con epicatequina, utilizando el proceso de extrusión con un dado para película plana. Previamente se obtuvieron las formulaciones en forma de pellets con un porcentaje de retención para catequina y epicatequina de 53.86 y 78.30 %, respectivamente, para finalmente obtener películas de PLA sin antioxidante, PLA con 1.28 % de catequina y PLA con 1.50 % de epicatequina. Además, se determinó el efecto de los aditivos en algunas propiedades ópticas y térmicas. En ambas películas se observó una reducción a la transmisión de la luz UV a 280 nm, así como la presencia en los espectros infrarrojos de una banda característica de los grupos aromáticos cercana a 1620 cm^{-1} . Con lo que respecta a las propiedades térmicas, hubo una disminución en la T_m del PLA al incorporar catequina y epicatequina, pero en la T_g no hubo diferencia con la película testigo. Por otro lado, se evaluó la cinética de liberación de catequina y epicatequina de las películas de PLA hacia etanol al 95 % a 20, 30, 40 y 50 °C, etanol al 50 %, aceite, agua, emulsión y una mezcla aceite-agua a 40 °C. Las difusiones de estos antioxidantes en etanol al 95 % y 50 % tuvieron un comportamiento Fickiano, con coeficientes de difusión en un orden de magnitud de 10^{-12} a $10^{-10}\text{ cm}^2/\text{s}$. Por cuestiones de comparación los coeficientes de difusión fueron expresados en el orden de $10^{-11}\text{ cm}^2/\text{s}$. Estos antioxidantes no migraron hacia aceite, agua, emulsión y la mezcla aceite-agua por las posibles interacciones de catequina y epicatequina con el PLA. Las condiciones de procesamiento no afectaron el peso molecular (P_M) original del PLA, ni la actividad antioxidante de las moléculas. Sin embargo, al estar

expuestas a la difusión en agua 100 %, el P_M se vio disminuido, hidrolizándose las cadenas del polímero. También se evaluó el efecto de los antioxidantes en la estabilidad oxidativa (índice de peróxidos) de aceite de soya a 30 °C incorporados directamente y poniendo en contacto las película con el aceite. En estos tratamientos se cuantificó una menor cantidad de peróxidos a los 15 días comparado con el aceite testigo sin antioxidante. Estos resultados indicaron la necesidad de modificaciones en la matriz polimérica que promuevan la difusión de catequina y epicatequina hacia aceites para que de esta manera haya una mejor protección contra la oxidación lipídica de los alimentos para extender la vida de anaquel.

INTRODUCCIÓN

Una de las principales reacciones que merman la calidad de un alimento así como su vida de anaquel, es la oxidación de los lípidos, provocando su deterioración, rancidez y pérdida de aceptabilidad sensorial (Karpi ska *et al.*, 2001). La susceptibilidad del alimento a la oxidación se incrementa en condiciones de temperaturas altas, presencia de metales, luz y de oxígeno (Lee *et al.*, 2004). Esto trae como consecuencia la aparición de sabores y olores indeseables (Karpi ska *et al.*, 2001), provocando el rechazo del consumidor, por lo que se requiere utilizar medidas tecnológicas para disminuir el impacto de la reacción de oxidación.

Dentro de las alternativas emergentes para contrarrestar los procesos de oxidación se encuentra el uso de antioxidantes. Entre las fuentes naturales de antioxidantes, se tienen la cáscara y semillas de varios frutos ricos en flavonoides como catequina y epicatequina, que se caracterizan por su poder antioxidante y eliminación de radicales libres (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2010). A estos residuos de la industria normalmente poco utilizados y causantes de contaminación ambiental (Domínguez-Espinosa *et al.*, 2002), se les podría encontrar un uso práctico como extractos fenólicos con potencial antioxidante.

Existen diferentes métodos para prolongar la vida de anaquel de los alimentos, uno de ellos es la adición directa de aditivos naturales al producto. Una de las desventajas al utilizar esta técnica, podría ser que el compuesto disminuya su actividad antioxidante debido a su posible reacción con otros componentes como lípidos y proteínas. Por ello, una buena opción es el uso de envases activos que contengan antioxidantes, donde estos compuestos se liberen

gradualmente del envase (Mauriello *et al.*, 2005; Soto-Cantu *et al.*, 2008; Granda-Restrepo *et al.*, 2009b; Graciano-Verdugo *et al.*, 2010).

Los envases activos antioxidantes interactúan directamente con el producto, liberando de manera controlada compuestos antioxidantes incorporados en la matriz polimérica del envase (Granda-Restrepo *et al.*, 2009b). Dichas matrices se fabrican generalmente con materiales de fuentes no renovables, cuyo uso indiscriminado ha generado serios problemas ecológicos (Villada *et al.*, 2007). Por esta razón ha surgido la necesidad de remplazar estos materiales por envases elaborados de fuentes renovables, además de ser biodegradables. Un ejemplo es el uso de ácido poliláctico (PLA) que además de ser biodegradable en condiciones de composta, es útil por sus características físicas y mecánicas (Mascheroni *et al.*, 2010). Así, el presente trabajo evalúa el potencial antioxidante de catequina y epicatequina como aditivos en una película de PLA, para que migren hacia simulantes de alimentos y aceite de soya con el fin de retardar su oxidación.

ANTECEDENTES

La Oxidación como Causa de Pérdida de Calidad en los Alimentos

La oxidación es un grave problema que afecta la calidad de diferentes alimentos. Dentro de los más susceptibles al deterioro oxidativo están aquellos ricos en componentes lipídicos. Las vitaminas y los pigmentos en el alimento pueden llegar también a oxidarse, siendo las vitaminas oxidadas por los lipoperóxidos, mientras que los pigmentos son susceptibles debido a sus dobles enlaces conjugados (Min y Boff, 2002). La susceptibilidad del alimento hacia la oxidación lipídica se incrementa en condiciones de temperaturas altas, presencia de metales, luz ultravioleta y presencia de oxígeno, potenciando el efecto negativo que causa la oxidación sobre la calidad (Karpi ska *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2005).

Entre los principales alimentos de origen lipídico los más susceptibles a oxidarse son los que contienen ácidos grasos insaturados, los cuales poseen uno o más dobles enlaces en su cadena (Choe y Min, 2006). El mecanismo de oxidación ocurre en reacciones en cascada (Figura 1) (Decker, 1998). Las reacciones pueden ser desencadenadas por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Gutiérrez, 2002). En el proceso de oxidación un radical libre ataca a un grupo metileno de la cadena carbonada del ácido graso insaturado, extrayendo un átomo de hidrógeno y con ello forma un nuevo radical libre. Esta reacción se puede repetir varias veces, produciendo acumulación de radicales y con ello la producción de olores y sabores indeseables (Deaton y Marlin, 2003).

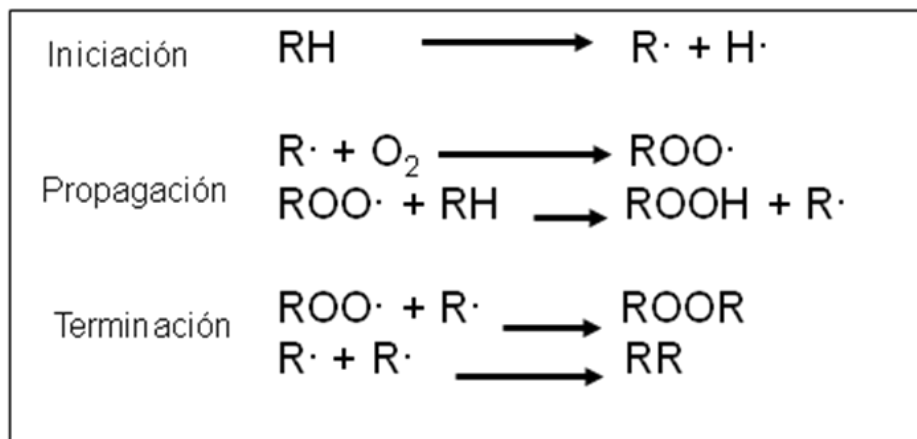


Figura 1. Etapas de la reacción de oxidación. R- Ácido graso insaturado, R·- Radical libre, ROO·- Radical peroxilo. Modificado de Badui, 2006.

Factores que Causan Oxidación

Las reacciones químicas y bioquímicas son función de la temperatura. Un método efectivo para disminuir la oxidación es el almacenamiento en frío (Sanchez-Moreno y Larrauri, 1998), ya que algunos radicales lipídicos son más estables a temperaturas bajas (Hansen *et al.*, 2004). Además, al congelar un producto su velocidad de reacción al deterioro se reduce notablemente, más no se detiene (Barreiro y Sandoval, 2002).

Otro factor involucrado en la oxidación de los lípidos es la luz, debido a la absorción por grupos cromóforos presentes en los lípidos (Pan *et al.*, 2005). También pueden afectarse los compuestos fotosintéticos como la clorofila y riboflavina, pasándolos a un estado excitado (Decker, 1998). Al pasar a este estado, pueden interactuar directamente con un sustrato oxidable para producir radicales libres (Min y Boff, 2002). Por ejemplo, cuando los productos lácteos son expuestos a la luz, éste acelera la formación de radicales libres en los primeros periodos de exposición, como es el caso específico de los quesos tipo Havarti (Kristensen *et al.*, 2000).

Tecnologías para Evitar la Oxidación

Existen diferentes tecnologías para contrarrestar la oxidación. Una de ellas es disminuyendo el oxígeno del envase que contiene el alimento por vacío o modificando la atmósfera del mismo (Gobantes *et al.*, 2001). Además, se puede hacer una incorporación de antioxidantes en el alimento, que no detendrán la formación de radicales, sino que reaccionarán con ellos y los estabilizarán produciendo radicales del antioxidante menos activos (Badui, 2006).

La efectividad de los antioxidantes depende de sus propiedades químicas y físicas. La presencia de enlaces de baja energía con el hidrógeno ayuda a que éste sea donado al radical libre con mayor rapidez (Decker, 1998; Lee *et al.*, 2004). Los radicales de los antioxidantes debido a su baja energía, tienen una deslocalización de su electrón desapareado, presentando resonancia, lo cual reduce la rapidez de reacción con el oxígeno (Decker, 1998). Cualquier compuesto que tiene un potencial de reducción menor al potencial de reducción de un radical libre es capaz de donar el hidrógeno y actuar como antioxidante (Lee *et al.*, 2004).

Residuos Industriales

Anualmente se generan y acumulan en forma de sólidos al medio ambiente, grandes cantidades de residuos vegetales, que ocasionan serios problemas de contaminación (Primas, 2002). Todo este desperdicio agrícola constituye una fuente renovable de materia prima en abundancia alta para la obtención de extractos con actividad antioxidante (Domínguez-Espinosa *et al.*, 2002) que podrían convertirse en aditivos para alimentos. La industria de cítricos produce más del 50 % del peso del fruto de residuos de cáscara y semillas (Bocco *et al.*, 1998). En el procesamiento de algunas frutas como el de la uva, se generan residuos de los que se pueden obtener dichos extractos, dándoles valor agregado y disminuyendo así los problemas de contaminación (Domínguez-Espinosa *et al.*, 2002).

Una planta procesadora de frutas y hortalizas puede producir volúmenes importantes de residuos sólidos, los cuales contienen antioxidantes que pueden ser utilizados para aumentar la vida de anaquel de los alimentos, retardando la

oxidación lipídica. Un ejemplo es el uso de éstos para aumentar la estabilidad oxidativa de los aceites vegetales que es importante para la práctica industrial, donde los antioxidantes tienen habilidad para retardar o inhibir la rancidez de los aceites (Moure *et al.*, 2001).

La búsqueda de fuentes baratas, renovables y abundantes de compuestos antioxidantes, está atrayendo el interés de la industria de alimentos. Por lo cual, se necesita de investigación para la selección de materias primas, donde los de origen residual son especialmente prometedores debido a su bajo costo (Moure *et al.*, 2001).

Compuestos Fenólicos

Existe una gran variedad de residuos industriales con componentes bioactivos, dentro de los cuales se puede encontrar a los compuestos fenólicos. En la uva se distribuyen en un 10 % en el jugo, 30 % en la piel y 60 % en las semillas (Leighton y Urquiaga, 2000). En las cáscaras de otros frutos se han encontrado cantidades mayores de compuestos fenólicos comparados con los de la pulpa. Por ejemplo, en las cáscaras de las manzanas, melocotones y peras se encontró que contenían el doble de compuestos fenólicos que en la pulpa (Gorinstein *et al.*, 2002). Entre estos compuestos el mayor grupo que representa más de la mitad de los ocho mil compuestos fenólicos naturales es el de los flavonoides (Balasundram *et al.*, 2006).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que constan de 15 átomos de carbono con una configuración de C6-C3-C6. Esencialmente, su estructura consta de dos anillos aromáticos A y B, unidos por un puente de tres carbonos, por lo general en forma de un anillo heterocíclico C (Figura 2)

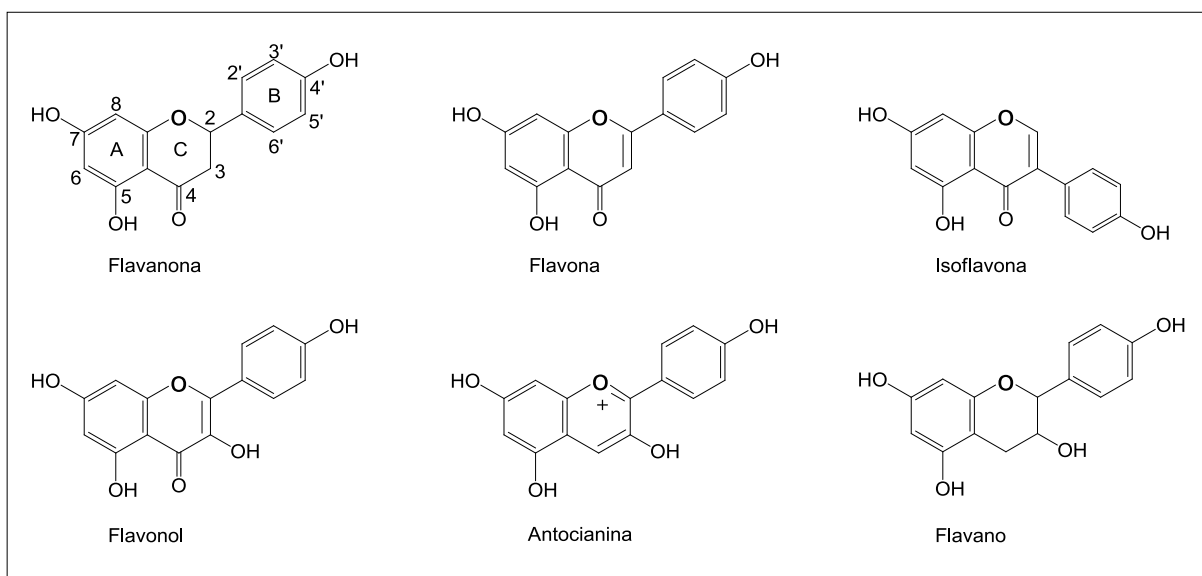


Figura 2. Estructura química de los principales flavonoides. Modificado de Peterson y Dwyer, 1998.

(Balasundram *et al.*, 2006). Los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen su capacidad antioxidante resultan de la combinación de sus propiedades. Entre ellas destacan las quelantes de metales de transición y secuestradoras de radicales libres, así como de la inhibición de oxidasas y acción sobre otras enzimas. Estos compuestos fenólicos presentan sustituyentes hidroxilos y este efecto 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 (Pérez, 2003). Debido a las características estructurales, estos compuestos pueden actuar como agentes antioxidantes (Escamilla *et al.*, 2009).

La clasificación de los flavonoides varía en función del nivel de oxidación en la estructura del anillo, sin embargo, los principales flavonoides en la dieta a menudo se clasifican en seis grupos (Figura 2) (Peterson y Dwyer, 1998). Uno de ellos es el grupo llamado flavanos o también conocidos como flavan-3-oles, los cuales rara vez son glicosilados, como es el caso de los flavonoles, pero pueden ser esterificados con ácido gálico y suelen ser parte de un biflavan o triflavan. Dentro de los flavanos de importancia se encuentran la catequina y la epicatequina (Yilmaz, 2006).

Catequina y Epicatequina

La catequina y epicatequina son compuestos que pertenecen al grupo de los flavonoides llamados flavan-3-oles. Debido a sus características secuestradoras de radicales libres son considerados antioxidantes naturales, los cuales pueden utilizarse para retardar la oxidación de lípidos (Yilmaz, 2006). Ambas moléculas poseen un grupo catecol en el anillo B y un grupo resorcinol en el anillo A (Figura 3). En el grupo catecol (C3' y C4') existe la formación de un enlace

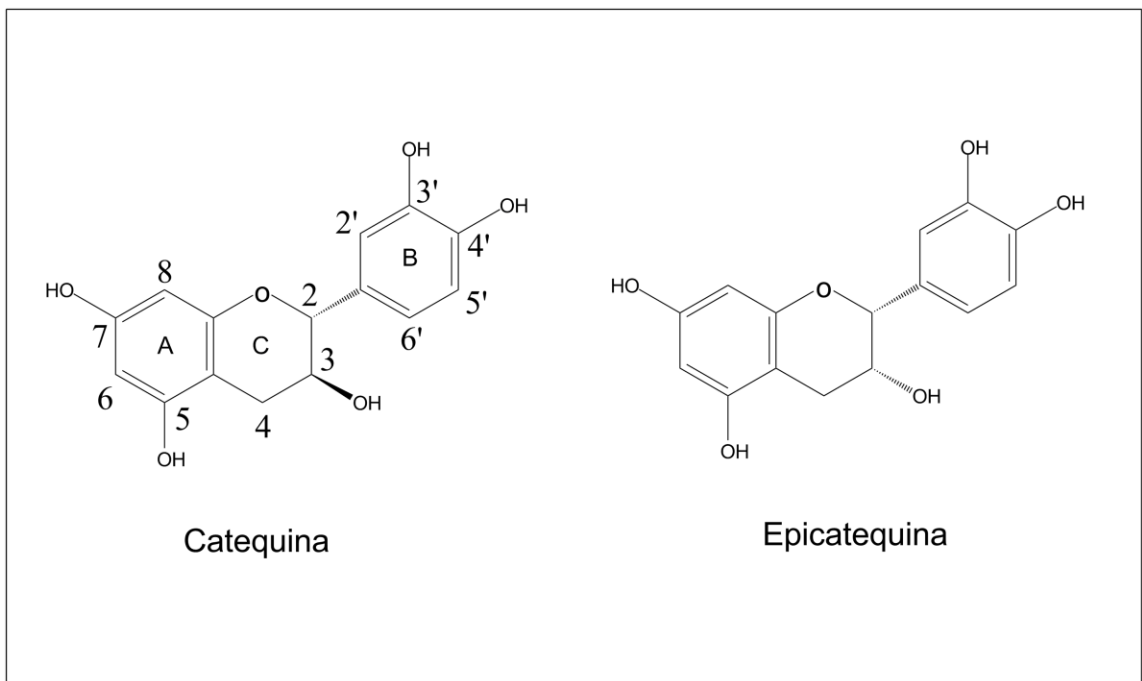


Figura 3. Estructura química de catequina y epicatequina. Anillos fenólicos A y B, anillo pirano C. Modificado de Yılmaz, 2006.

intramolecular entre los grupos hidroxilo, que permite la dispersión de la carga y la deslocalización de electrones por resonancia (Mendoza-Wilson, 2006). Debido a la carencia del doble enlace C2-C3, la molécula puede presentar isomerismo cis-trans, epimerizaciones y racemización. Estos antioxidantes existen en forma de aglicón, es decir, no se glicosilan, pero se pueden polimerizar de manera natural para formar taninos.

La catequina y epicatequina son flavanos monoméricos con actividades de secuestro y antioxidante similar debido a su estructura. En ambas moléculas el anillo A es donde hay preferencia por el ataque electrofílico y el anillo B por el nucleofílico (Mendoza-Wilson y Glossman-Mitnik, 2006). En estudios realizados por Mendoza (2006) se sugiere que los sitios probables para el ataque nucleofílico son C3' y C4'. C2 fue considerado un sitio posible, sin embargo, por ser el punto de unión entre dos anillos que no están en el mismo plano molecular, le resta posibilidad, por efectos estéricos. Además, debido a la ausencia del doble enlace entre C2 y C3 se dificulta la dispersión de la carga, lo que formaría intermediarios poco estables.

La actividad antioxidante es considerada como la habilidad para atrapar radicales libres por medio de la donación de átomos de hidrógeno fenólicos en los anillos A y B (Kondo *et al.*, 1999). Estudios realizados por Mendoza (2006) sugieren que el sitio para ataque al radical es C2' y también pueden ser sitios muy importantes los oxígenos 3' y 4' del grupo catecol. La carencia del grupo ceto y el doble enlace C2-C3, traslada la reactividad hacia los anillos A y B.

Debido a la similitud de las moléculas, implica que el producto intermediario de oxidación puede marcar la diferencia en sus actividades antioxidantes (Mendoza-Wilson y Glossman-Mitnik, 2006). Ambos compuestos fenólicos tienen la capacidad de secuestrar radicales hidroxil, peroxil y DPPH (1,1-difenil-

2-picrilhidrazil) (Yilmaz, 2006). Al tener un potencial redox bajo, han mostrado ser más efectivos en la quelación de Cu(II)/Cu(I) (Fernandez *et al.*, 2002). Debido a su poder antioxidante se ha mostrado que tienen actividad secuestradora diez veces más que el L-ascorbato y β -caroteno (Yilmaz, 2006), con un potencial antioxidante de 2.4 mM de equivalentes Trolox (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

Importancia en Tecnología de Alimentos

Se han hecho varios estudios de la actividad antioxidante de la catequina y epicatequina contenidos en el extracto de té verde, aplicados en alimentos. El té verde se caracteriza por su contenido alto de catequinas, donde los compuestos mayoritarios son (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina, (-)-galato de epicatequina, (-)-epigalocatequina y (-)-galato de epigalocatequina (Frankel *et al.*, 1997). La inhibición de la oxidación de los lípidos ha sido determinada en carne cruda y cocinada de res, donde se aplicó de manera directa extracto de té verde (200-400 ppm) (Mitsumoto *et al.*, 2005). El efecto de inhibición de las catequinas del té fue mayor que la vitamina C a las mismas concentraciones, donde se comprobó la capacidad antioxidante de estos compuestos.

La oxidación lipídica de las grasas de animales es probable que se produzca durante periodos prolongados de almacenamiento a temperaturas de refrigeración (Yilmaz, 2006). De esta manera se ha visto el efecto que tiene el té verde sobre carne roja cruda, músculo de aves y pescado almacenada en refrigeración durante 10 días a 4 °C, adicionando 300 mg/kg de té, así como 300 mg/kg de α -tocoferol. Los resultados obtenidos mostraron que el conjunto de las catequinas del té son antioxidantes naturales más poderosos comparados con α -tocoferol (Tang *et al.*, 2001).

Las catequinas de té verde tienen potencial para ser utilizados en alimentos para retardar la oxidación lipídica. Se ha visto su efecto en la inhibición de la oxidación en aceite de canola, manteca de cerdo y grasa de pollo (Chen *et al.*, 1998). En aceite de hígado de bacalao, el té verde tiene mayor protección contra la oxidación que la vitamina E y carvacol (O'Sullivan *et al.*, 2005). Además, estos antioxidantes han comprobado tener mejor efecto que aquellos antioxidantes sintéticos como el BHT en aceite de canola caliente (Su *et al.*, 2004), potenciando de esta manera el uso de antioxidantes naturales.

El extracto natural de la semilla de uva se ha aplicado en filetes de músculo de pescado debido a su contenido alto de compuestos fenólicos, como lo son las catequinas (Sánchez-Alonso *et al.*, 2007). El objetivo fue dar estabilidad a la oxidación durante su almacenamiento en frío a -20 °C, donde se inhibió la oxidación en los primeros 3 meses. Los autores argumentan que la razón de este efecto fue por la acción quelante de la fibra de algunos metales prooxidantes o la acción de los polifenoles asociadas con los residuos de la uva.

Se ha visto que la aplicación de extractos de la uva tienen buen efecto en carne cruda y cocida de puerco, donde se disminuyó la oxidación lipídica cuando se aplicaron de 50 a 1000 µg/g a 4 °C almacenadas en una atmósfera modificada (75% O₂ : 25% CO₂) (Carpenter *et al.*, 2007). Además, su actividad ha sido comparada con antioxidantes sintéticos en galletas donde se demostró que hay un efecto mayor utilizando extractos naturales que aplicando BHA (Reddy *et al.*, 2005). En la bibliografía se han encontrado aplicaciones de estos extractos con el fin de retardar la oxidación de alimentos lipídicos de manera directa. Por otro lado, no se ha estudiado a profundidad el efecto de cada uno de ellos por separado, pudiéndolos aplicar en nuevas tecnologías para evitar la oxidación de los alimentos, como su adición en el material de envase.

Desarrollo de Envases Activos con Antioxidantes

En la fabricación de envases de alimentos, los polímeros rara vez son procesados puros, ya que generalmente se incorporan a la matriz polimérica compuestos llamados aditivos (Selke *et al.*, 2004). Estos ayudan a mejorar propiedades mecánicas, así como ópticas y de superficie (Robertson, 2006). Además, se pueden incorporar antioxidantes como aditivos para dar estabilidad al envase de su degradación a causa de reacciones de oxidación (Block *et al.*, 2006).

Debido a las interacciones envase-alimento es posible que ocurra una migración de componentes de bajo peso molecular del envase, por lo que existen legislaciones relacionadas con este fenómeno. Estas normas garantizan la seguridad del material de envase para ser utilizados en contacto con alimentos, con el propósito de disminuir el riesgo para el consumidor de algún tipo de contaminación. Además, se establecen las condiciones y procedimientos de los estudios de migración utilizando simulantes de alimentos (Soto-Valdez, 2010). Estos simulantes son sustancias modelo que no presentan dificultad analítica ni de interpretación de resultados, a diferencia de los alimentos, donde en estos medios los análisis son complejos debido a su composición química y sensibilidad a los factores externos (Rojas-de-Gante, 2002). El fenómeno de migración puede ser utilizado de manera positiva, originando los sistemas envases activos antioxidantes con el propósito de mejorar la capacidad de protección al alimento (Graciano-Verdugo *et al.*, 2010).

Un envase activo es uno de los conceptos innovadores en el envasado de alimentos que ha sido introducido como respuesta de los continuos cambios en las demandas del consumidor y el mercado. Se puede definir como un tipo de envase que cambia las condiciones de envasado para extender la vida de

anaquel y mejorar la seguridad o las propiedades sensoriales mientras se mantiene la calidad del alimento (Vermeiren *et al.*, 1999). Las principales modalidades de envases activos son los que contienen absorbentes de oxígeno, etileno, humedad, dióxido de carbono, sabores/olores y aquellos que liberan dióxido de carbono, agentes antimicrobianos y antioxidantes (Vermeiren *et al.*, 1999). Este último implica su liberación del material de envase, definido como la matriz polimérica, al producto, ya que la oxidación lipídica del alimento comienza en su superficie siendo su promotor el oxígeno que se difunde desde el medio ambiente (Graciano-Verdugo *et al.*, 2010).

Matriz Polimérica

El sistema de envases activos está basado en la incorporación de antioxidantes en una matriz polimérica, que preserva dichos compuestos de reacciones de degradación y los mantiene activos mientras éstos migran al alimento (Mascheroni *et al.*, 2010). Esta matriz debe presentar ciertas propiedades que son importantes para su uso como envase de alimento, como lo son las propiedades ópticas y térmicas, que pueden ser alteradas con la incorporación de aditivos durante su procesamiento.

Dado que la estructura principal de un envase activo es la matriz polimérica, este polímero puede presentar propiedades ópticas importantes, que serán fundamentales para la aplicación de dicho envase. Algunas de estas propiedades son el color, transparencia, índice de refracción, capacidad para transmitir luz, entre otras (Gocalves *et al.*, 2010). Existen diferentes técnicas para la caracterizar dichas propiedades, las cuales son también utilizadas para detectar la presencia de aditivos en los plásticos, como por ejemplo la absorción y transmisión de la radiación UV-vis, y espectroscopía infrarroja.

La absorción y transmisión de la luz de los polímeros es importante en la industria de envases de alimentos, donde el alimento es sensible a la luz (Ho y Pometto, 1999; Oliveira *et al.*, 2004). La transmisión de la luz visible se encuentra en el rango de 400-700 nm y la radiación ultravioleta de 100-400 nm. Los materiales transparentes son materiales que permiten que una o más frecuencias de luz visible se transmitan a través de ellos, siendo la transparencia de los envases de alimentos alrededor del 95 % (Gocalves *et al.*, 2010). Por otro lado, la degradación fotoquímica de los plásticos es debida a la radiación conocida como UV-B (315-280 nm) (Auras *et al.*, 2004). En el mercado existen aditivos que absorben a ciertas longitudes de onda para su aplicación en plásticos con la finalidad de proteger al alimento de la oxidación por luz y al propio polímero.

Los plásticos están constituidos de polímeros y aditivos, por lo que el análisis vibracional a través de la espectroscopia infrarroja es una técnica apropiada para obtener información sobre parámetros estructurales del polímero, así como de aditivos (Madras y McCoy, 1997; Pastor *et al.*, 2003). La región infrarroja del espectro electromagnético más empleada es la del infrarrojo medio, situada entre 4000 y 500 cm^{-1} . Esta técnica se basa en la excitación de los modos de vibración de las moléculas por la absorción de la radiación infrarroja (IR). Durante la excitación es necesaria una variación en el momento dipolar de la molécula para que se produzca una absorción en el IR que pueda asociarse a vibraciones de tensión o de deformación (Madras y McCoy, 1997). Con la espectroscopía infrarroja se obtiene información de la composición molecular de polímeros, por lo que esta técnica permite en general obtener una huella dactilar de una molécula y así caracterizarla de manera selectiva (Derrick *et al.*, 1999).

Los polímeros presentan propiedades térmicas que pueden ser descritas por medio de su temperatura de transición vítrea (T_g) y temperatura de fusión (T_m). La T_g , es la temperatura a la cual una resina termoplástica cambia de estado vítreo a uno más suave, más elástico. Polímeros con una baja T_g generalmente son resistentes y flexibles a temperaturas bajas, mientras que los de una alta T_g son vítreos a temperaturas de refrigeración. Esta propiedad puede ser significativamente alterada por el uso de aditivos que pueden actuar como plastificantes, que extienden el rango de temperatura útil de muchos polímeros (Jenkins y Harrington, 1991).

T_m es la temperatura a la cual un polímero puede fundirse. Muchos polímeros no exhiben esta característica, los cuales son llamados amorfos. El grado de cristalinidad es afectado por aditivos llamados agentes nucleantes. El rango de cristalización es especialmente importante en las operaciones de procesamiento donde una rápida cristalización puede llevar a una rápida solidificación del polímero en el molde, provocando una reducción en el tiempo de operación de moldeo. Cuando la cristalinidad de un polímero aumenta, el polímero generalmente se vuelve más rígido a temperaturas elevadas, haciendo que este polímero sea más útil a temperaturas altas (Jenkins y Harrington, 1991).

Una manera para determinar las propiedades térmicas y conocer el efecto de los aditivos sobre los polímeros es por medio de la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Ésta es la técnica más común para determinar transiciones de fase. El método consiste en proporcionar un flujo de calor, a velocidad constante a la muestra y un material de referencia de composición conocida que no sufre cambios en el intervalo de temperaturas en que se hacen las determinaciones. Lo que se registra es la diferencia en el flujo de calor que hay que entre la muestra y la referencia para mantener la misma temperatura en

ambas. Esta técnica se utiliza para detectar cambios endotérmicos o exotérmicos que ocurren durante una medida dinámica en función de la temperatura. Las transiciones de primer orden (T_m) producen picos y las de segundo orden (T_g) saltos en el flujo de calor (Martínez *et al.*, 1998).

Ácido Poliláctico como Matriz Polimérica

Generalmente los envases se elaboran a partir de fuentes no renovables como el petróleo, pero esta materia prima eventualmente va a agotarse. Aunado a esto, su uso indiscriminado ha generado serios problemas ecológicos (Villada *et al.*, 2007). Una alternativa es la utilización de materiales derivados de fuentes renovables como la agricultura. Un caso de éxito es el ácido poliláctico (PLA), que también es biodegradable en condiciones de compostaje, para reducir los problemas de contaminación (Lim *et al.*, 2008).

Composición química. El PLA es un poliéster alifático derivado de α -hidroxiácidos (Figura 4) (Lim *et al.*, 2008). Su precursor es el ácido láctico, una molécula quiral, que se obtiene por la fermentación de azúcares del maíz, papa y caña de azúcar. El ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanoico) contiene un átomo de carbono asimétrico y es el hidroxiácido más sencillo que existe (Serna *et al.*, 2003). Además, se puede encontrar en dos configuraciones ópticamente activas, isómeros L(+) y D(-). Los sistemas mamíferos solamente producen el isómero L(+) el cual es asimilado fácilmente (Auras *et al.*, 2004). Las propiedades del PLA, como su estado amorfo y cristalino, pueden lograrse manipulando el peso molecular, las mezclas entre los isómeros D(-) y L(+) y la copolimerización (Serna *et al.*, 2003).

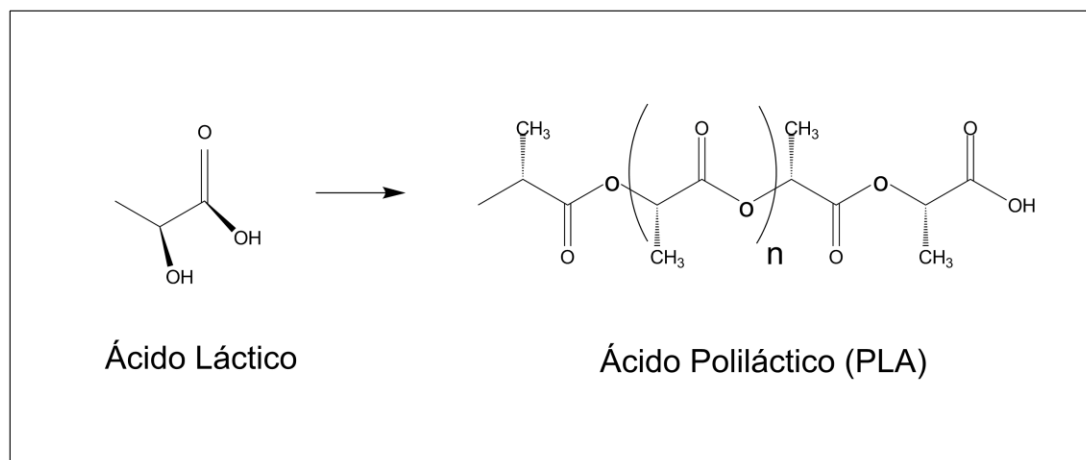


Figura 4. Estructura del ácido poliláctico. Modificado de Lim *et al.*, 2008.

Producción. En general, existen tres métodos que pueden ser utilizados para producir ácido poliláctico de peso molecular alto de alrededor de 100 000 Daltons (Figura 5). Uno consiste en la polimerización por condensación directa, donde el ácido láctico es polimerizado en cantidades grandes para producir moléculas de PLA de peso molecular bajo, de apariencia frágil. Otra ruta es por medio de la condensación azeotrópica dihidratada, donde el ácido láctico es polimerizado en presencia de disolventes para obtener polímeros de peso molecular alto. La tercera es la polimerización para formar el compuesto cíclico láctido, en la cual se da la purificación, apertura y polimerización del anillo. Actualmente en la industria el método más utilizado es la polimerización por condensación directa (Auras *et al.*, 2004).

Procesamiento y estabilidad térmica del PLA. Existen métodos por los cuales el PLA puede ser procesado, los cuales dependen de la temperatura de fusión del polímero, su cristalinidad y propiedades reológicas (Lim *et al.*, 2008). El procesamiento de fusión es el método más ampliamente adoptado para la conversión de resinas de PLA en varios productos finales. Este proceso se caracteriza por calentar el polímero por encima de su punto de fusión, pero lo suficientemente baja para minimizar la degradación térmica del material. Ya teniendo el polímero fundido, éste a continuación es enfriado para estabilizar sus dimensiones y llevarlo a la forma deseada (Lim *et al.*, 2010). Un ejemplo de este tipo de este tipo de procesamiento es el de extrusión.

La extrusión es la técnica más importante para la formación de PLA fundido y homogeneizado en muchos procesos de conversión. El PLA puede ser procesado usando husillos o tornillos convencionales para otros termoplásticos, los cuales consisten en tres secciones (Figura 6): (1) la zona de alimentación que actúa como la parte que recibe los pellets del polímero para llevarlo hacia el husillo; (2) la zona de transición, también conocida como la sección de

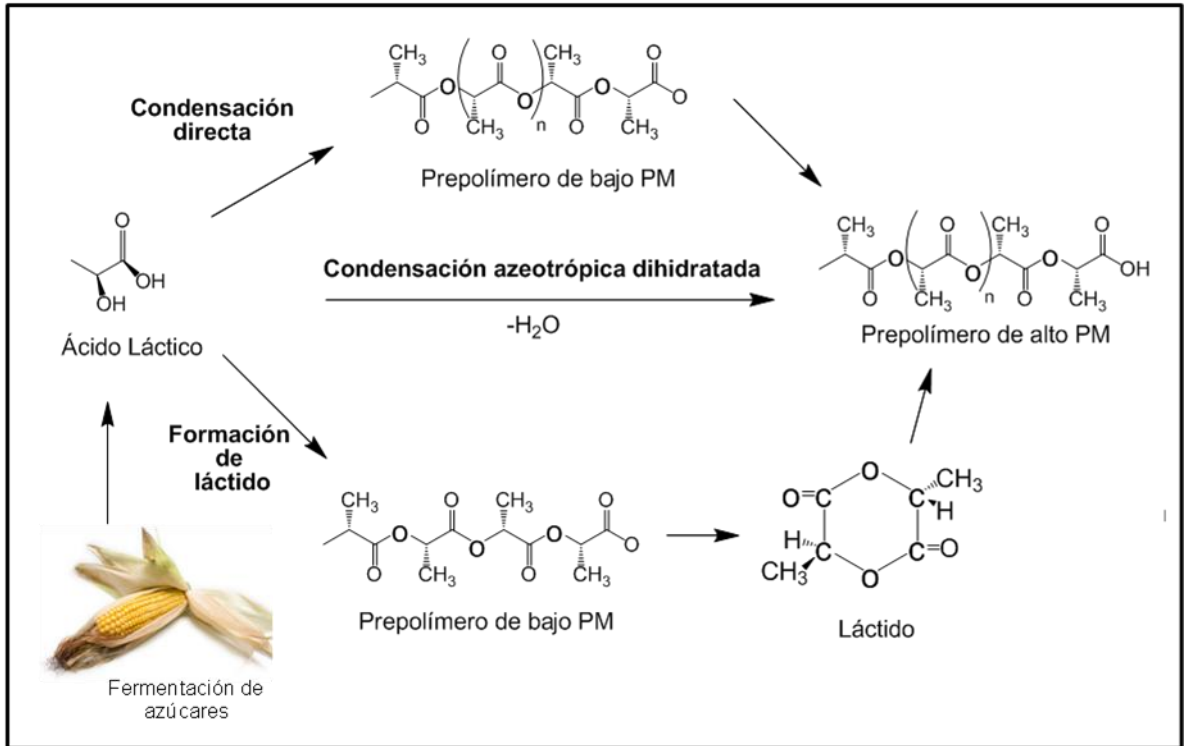


Figura 5. Producción de ácido poliláctico. Modificado de Auras *et al.*, 2004.

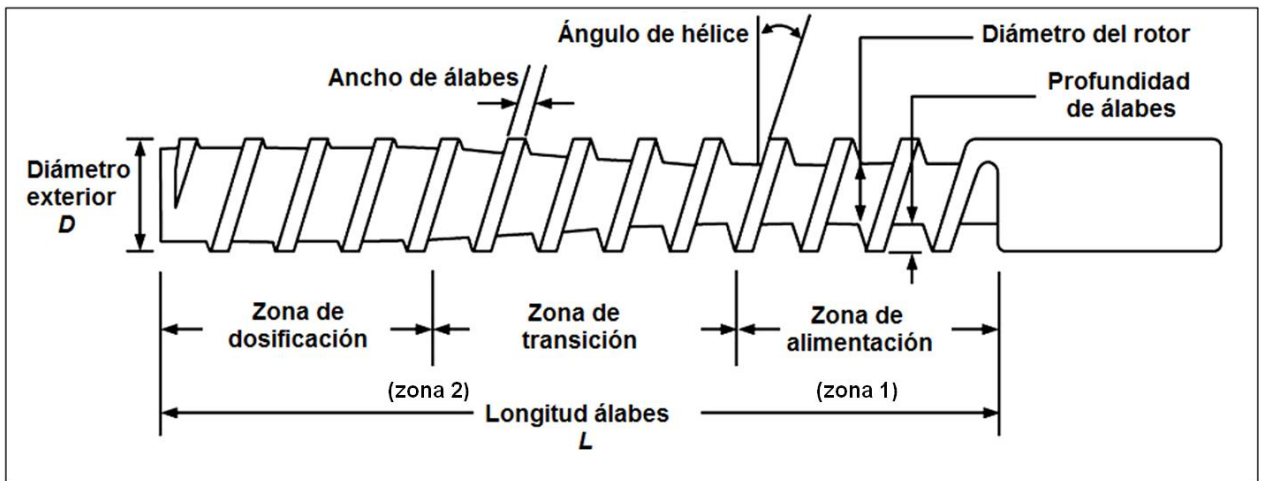


Figura 6. Geometría típica de un husillo para un extrusor de un solo husillo. Modificado de Lim *et al.*, 2010.

compresión y fusión, está diseñada con una profundidad de álabes que va disminuyendo gradualmente para comprimir los pellets y mejorar el contacto con el husillo; (3) la zona de dosificación que está caracterizada por su constante profundidad de los álabes, los cuales actúan como bomba para medir con precisión la cantidad necesaria de polímero fundido (Lim *et al.*, 2010).

Debido a que el PLA es térmicamente inestable, puede presentar una rápida pérdida en el peso molecular de 100 000 hasta 40 900 Da, como resultados de tratamientos térmicos a temperaturas de procesamiento (Auras *et al.*, 2004). Los enlaces éster del PLA tienden a degradarse durante el procesamiento térmico o bajo condiciones hidrolíticas, produciéndose principalmente por la ruptura al azar de la cadena principal. Durante el tratamiento térmico pueden ocurrir reacciones como hidrólisis, depolimerización, degradación oxidativa y reacciones intramoleculares de trans-esterificación a monómeros u oligómeros. Esta degradación se puede llevar a cabo a temperaturas por debajo de su T_m , incrementándose rápidamente por encima de la misma (Taubner y Shishoo, 2001; Jamshidian *et al.*, 2010).

Para la determinación del peso molecular del polímero, existen diferentes técnicas, siendo una de ellas la cromatografía por permeación en gel (GPC). Este método es un tipo de cromatografía sólido-líquido que separa el polímero en fracciones por tamizado mediante un gel de poliestireno con enlaces cruzados u otro de características semejantes. Generalmente, estos geles son copolímeros entrecruzados de estireno y divinil benceno. El gel de poliestireno, que sirve de fase estacionaria, se puede obtener comercialmente en una gran variedad de tamaños de poro (1 a 10^6 nm). Puesto que las moléculas pequeñas penetran más fácilmente en las partículas de gel, las fracciones de peso molecular más alto se separan antes. De esta manera, esta técnica separa las fracciones de acuerdo con su tamaño (Seymour y Carraher, 1995).

Propiedades y aplicaciones. El PLA es atractivo y de gran interés para el desarrollo de materiales con aplicaciones en envases de alimentos, no solo por la necesidad de reemplazar los polímeros derivados del petróleo, sino por sus propiedades físicas y mecánicas (Mascheroni *et al.*, 2010). Estas propiedades, al igual que otros polímeros dependerán de la composición química, de su peso molecular, cristalinidad, morfología y orientación de las cadenas (Naitove, 1998; Auras *et al.*, 2004).

Las propiedades térmicas del PLA, están relacionadas con la pureza de sus enantiómeros, dependiendo de su proporción, el PLA puede adoptar diferentes estructuras, propiedades térmicas y mecánicas (Lim *et al.*, 2010). Las resinas de este polímero con un porcentaje mayor al 93 % de L(+) son semicristalinos, mientras que entre 50 y 93 % de L(+), son amorfos. Para PLA amorfo, la temperatura de transición vítrea (Tg) es uno de los parámetros más importantes. Por otro lado, para PLA semicristalino, la Tg y la temperatura de fusión (Tm) son los parámetros físicos importantes para predecir el comportamiento de envases o artículos fabricados del PLA (Auras *et al.*, 2004). Por consiguiente, la estructura del PLA, influye en las propiedades y comportamiento del mismo.

Debido a que las resinas comerciales de PLA son copolímeros de L(+) y D(-), con isómeros L(+) constituyendo la mayor parte, además de semicristalinos, la Tg y la Tm son de gran importancia durante su procesamiento. La Tg del PLA dependerá del historial térmico del polímero, del peso molecular, presencia de plastificantes, arquitectura del polímero y grado de cristalinidad (Auras *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2010). Por encima de esta temperatura, el polímero presenta dramáticos cambios en la movilidad de sus cadenas, obteniendo una forma gomosa, y por debajo de su Tg es un material vítreo (Lim *et al.*, 2008). Por otra parte, la Tm será función de la pureza óptica del polímero. En aplicaciones

donde las propiedades mecánicas son importantes, como por ejemplo, material de empaque, la Tg es de 50-60 °C, mientras que la Tm es alrededor de 180 °C, con una entalpía de 40-60 J/g (Auras *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2008). Una de las limitantes del PLA es su baja Tg por lo que no puede aplicarse en todo tipo de envase, inclusive no puede almacenarse en lugares sin control de temperatura en ciudades como Hermosillo.

Las propiedades mecánicas del PLA se encuentran en el mismo rango de algunos polímeros petroquímicos, a excepción de una baja elongación. Sin embargo, esta propiedad puede ser afinada durante la polimerización o por modificaciones post polimerización. Puede ser tan duro como el acrílico o tan blando como el polietileno, rígido como el poliestireno o flexible como un elastómero (Naitove, 1998). La permeabilidad al CO₂, O₂ y agua son menores que el PS pero mayores que el teraftalato de polietileno (PET). Comercialmente las películas y envases disponibles proveen mejores propiedades mecánicas que el PS y tiene propiedades comparables con el PET (Auras *et al.*, 2004).

Cuando se habla de PLA, se hace referencia a la degradabilidad que presenta y a la ventaja que tiene sobre los polímeros derivados del petróleo. Durante su degradación los microorganismos colonizan la superficie del polímero y son capaces de segregar enzimas que rompen en pequeños fragmentos el polímero (Serna *et al.*, 2003). Los grupos hidrófilos de las enzimas (-COOH, -OH,-NH) atacan los grupos éster de las cadenas de polímeros mediante reacciones de hidrólisis seguida por reacciones de oxidación. De esta forma reducen el polímero a fragmentos de peso molecular inferiores a 500 g/mol, los cuales pueden ser digeridos por los microorganismos para producir CO₂ y agua (Siracusa *et al.*, 2008). Las condiciones necesarias para que se pueda producir el proceso de biodegradación son presencia de microorganismos, oxígeno,

humedad, nutrientes minerales, temperaturas entre 20 y 60 °C (dependiendo del microorganismo) y pH entre 5-8 (Serna *et al.*, 2003).

El PLA, tiene diversas aplicaciones en el área de alimentos. Actualmente, está siendo utilizado como polímero para envase de alimentos para productos de corta vida de anaquel. Entre sus aplicaciones están como contenedores termoformados que son usados en el mercado para contener frutas y verduras frescas. Además se presenta como vasos, recipientes para helados y ensaladas, así como películas para recubrimiento (Auras *et al.*, 2004).

Las interacciones envase-alimento son importantes en materia de salud del consumidor, ya que puede haber migración de compuestos de la matriz polimérica hacia el alimento. En el uso del PLA se encontró que la migración del ácido láctico, láctido y ácido lactoláctico estuvieron dentro de los límites permitidos (Soto-Valdez, 2010). Además, este polímero es considerado una sustancia GRAS (reconocida como segura) por lo que desde el punto de vista sanitario es seguro utilizarlo como envase de alimentos (Serna *et al.*, 2003).

Migración en Materiales Poliméricos

La tecnología de envases activos antioxidantes persigue reducir el proceso de oxidación en una amplia variedad de alimentos, por medio de la liberación controlada de antioxidantes que migran desde una matriz polimérica. La migración es un proceso de transferencia de masa en el cual las moléculas de bajo peso inicialmente incluidas en el envase, migran hacia el producto envasado (Granda-Restrepo *et al.*, 2009). El proceso global se desarrolla en tres etapas (Figura 7): difusión del migrante en la matriz polimérica, disolución

en la interfase alimento-envase y dispersión en el alimento (Catalá y Gavara, 2002).

- *Primera etapa.* En esta etapa la difusión del migrante tiene lugar en las áreas amorfas de la matriz polimérica. La migración está controlada por el proceso de difusión, que consiste en la transferencia de masa a través de los espacios libres originados por los movimientos moleculares de los fragmentos de las cadenas del polímero. Las propiedades de barrera de un material dado varían cuando está expuesto a un alimento, debido a que no todas las moléculas presentan la misma capacidad para difundirse en el entramado polimérico. La forma de transporte en esta etapa obedece a la primera (Ecuación 1) y segunda (Ecuación 2) ley de Fick, según las cuales se produce un flujo del migrante en dirección contraria a la diferencia de concentración a través del espesor del polímero.

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

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

Donde J es el flujo de sustancia que es proporcional y opuesto al gradiente de concentración en el medio, siendo c la concentración de la sustancia difundida, x el espesor y D el coeficiente de difusión que es considerado dependiente de la temperatura para un sistema dado.

Debido a que no todas las moléculas presentan capacidad para difundirse en el entramado polimérico, se han propuesto tres modelos para describir la migración de los compuestos de bajo peso molecular:

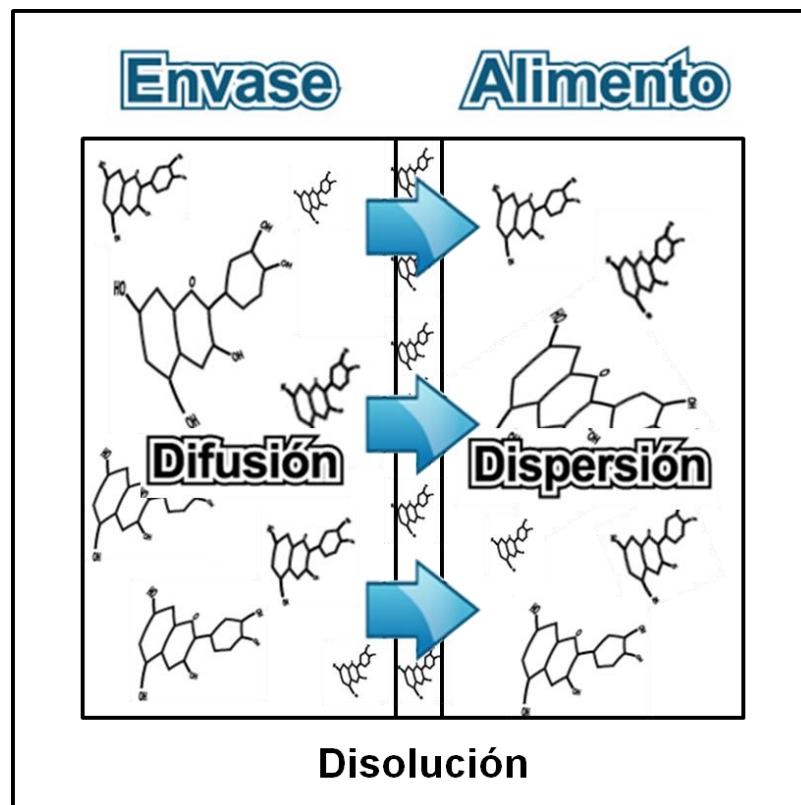


Figura 7. Etapas del proceso de migración. Modificado de Catalá y Gavara, 2002.

Modelo I: “No migración” es cuando las moléculas tienen una reducida velocidad de difusión del interior del plástico hacia su superficie ($D < 10^{-12}$ cm²/s), únicamente se transfieren los componentes situados en la superficie de contacto con el producto mediante un mecanismo de disolución.

Modelo II: “Migración independiente, no controlada por el alimento”, se caracteriza por la transferencia de materia desde el interior de la matriz polimérica hacia la superficie de contacto, aún en ausencia del producto. En este caso $D > 10^{-9}$ cm²/s, es un valor constante e independiente del tiempo y del producto que está en contacto.

Modelo III: “Migración dependiente del alimento”, se requiere la presencia del alimento, que interacciona con el material plástico modificando la estructura física y la disposición molecular de la capa próxima al producto, que se manifiesta en un hinchamiento progresivo del plástico, originándose un sistema multifásico no homogéneo. El coeficiente de difusión no permanece constante, sino que aumenta con el tiempo. Por lo que puede presentar coeficientes de difusión $<10^{-12}$ cm²/s en ausencia del alimento y al estar en contacto con ellos puede presentar valores $>10^{-9}$ cm²/s.

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

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

Modelos matemáticos. El proceso de migración está dado por la cinética de difusión de los antioxidantes en la matriz polimérica, el cual está expresado por D . Para el cálculo de este coeficiente se utilizan soluciones analíticas de la Ecuación de la segunda ley de Fick (Ecuación 2). Cuando la difusión es en una dimensión y el volumen de la solución es finito (Crank, 1975; Mascheroni *et al.*, 2010), la solución analítica es la siguiente:

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

Donde M_t/M_∞ es la concentración que se difunde del antioxidante a tiempo t , dividido por la concentración del antioxidante difundido en el equilibrio; l es el espesor de la de la matriz polimérica y q_n son las raíces positivas no cero de $\tan q_n = \alpha q_n$ y α es:

$$\alpha = \frac{V_S}{K_{P,S}V_P} \quad (4)$$

Donde V_S y V_P son los volúmenes molares del simulante y del polímero, y $K_{P,S}$ es el coeficiente de partición del antioxidante entre la matriz polimérica y el simulante, el cual a bajas concentraciones se puede asumir constante y es calculado de la relación de la concentración del antioxidante en el polímero ($C_{P,\infty}$) y el simulante ($C_{S,\infty}$) en el equilibrio:

$$K_{P,S} = \frac{C_{P,\infty}}{C_{S,\infty}} \quad (5)$$

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

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

Temperatura como factor que influye en la migración. Existen diferentes factores que influyen en la migración como las condiciones del medio, factores mecánicos, así como también la temperatura (Catalá y Gavara, 2002). La difusión depende de la temperatura, descrita por la energía de activación (E_a). La E_a es definida como la energía requerida para hacer que las cadenas del polímero se abran lo suficiente para permitir que la molécula del aditivo se mueva (Limm y Hollifield, 1996). Esta energía es proporcionada por la temperatura que tiene un efecto en el migrante, en la matriz polimérica y en el medio de contacto (Graciano-Verdugo et al., 2010). Se puede calcular utilizando la Ecuación de Arrhenius, expresada a continuación:

$$D = D_0 e^{\left[-\frac{E_a}{RT}\right]} \quad (7)$$

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 ($8.3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y T es la temperatura en grados Kelvin.

Migración de Antioxidantes en Materiales de Envase

El uso de envases activos ha sido estudiado en contacto con alimentos como alternativa para incorporar antioxidantes y así mantener una concentración constante del aditivo en el alimento mediante su migración. Los trabajos se han realizado de manera general con alimentos de origen lipídico por la

susceptibilidad a formar compuestos que confieren sabores y olores desagradables, así como también con simulantes de alimentos grasos.

Existe diversidad de ejemplos donde se ha visto el efecto de migración. Se ha llevado a cabo la incorporación de BHT (butil hidroxitolueno) a películas de PEBD (polietileno de baja densidad) y poliamida 6/66. Este antioxidante se difundió a queso tipo asadero ($D=6.24 \times 10^{-12}$ cm²/s) durante los primeros 20 días de almacenamiento a 5 °C, donde se evaluó durante los primeros 100 días de almacenamiento la oxidación del queso (Soto-Cantu *et al.*, 2008).

La cinética de migración de α -tocoferol ha sido estudiada en envases activos. Éste se ha incorporado en películas poliméricas, donde migra hacia simulantes de alimentos grasos (Vermeiren *et al.*, 1999). Además, se ha reportado su acción antioxidante en leche entera en polvo a 20, 30 y 40 °C, donde fue incorporado en una película multicapa de PEAD (polietileno de alta densidad), EVOH (alcohol etilén vinílico) y PEBD. En dicho estudio el sistema de migración fue más efectivo a las temperaturas de 30 y 40 °C que a 20 °C, teniendo una E_a de 11.3 kJ/mol (Granda-Restrepo *et al.*, 2009b). Esta misma película fue diseñada con BHT y BHA, donde se encontró que estos antioxidantes migran a mayor velocidad desde la matriz polimérica hacia la leche entera en polvo, comparado con α -tocoferol (Granda-Restrepo *et al.*, 2009a).

Otra aplicación que se le ha dado al α -tocoferol, fue su incorporación a películas de PEBD en dos concentraciones 20 y 40 mg/g. En este trabajo se evaluó el efecto de migración del antioxidante en la estabilidad oxidativa de aceite de maíz, monitoreando el contenido de hexanal. Este análisis en el aceite mostró que α -tocoferol es adecuado para retardar la oxidación en las primeras 16 semanas a 30 °C. Se obtuvo que para cada una de las concentraciones que se utilizaron, la energía necesaria para abrir las cadenas del polímero y el α -

tocoferol se moviera entre las cadenas (Ea) fue de 126.5 y 105.9 kJ/mol, respectivamente (Graciano-Verdugo *et al.*, 2010).

Actualmente, se ha reportado la inclusión del antioxidante natural catequina, así como de quercetina en películas de EVOH. La migración de estos antioxidantes se evaluó hacia simulantes de alimentos, donde las películas con catequina presentaron mejores características para el propósito de elaboración de un envase activo que las películas con quercetina (López-de-Dicastillo *et al.*, 2010). Con estos resultados se realiza la aplicación de estos antioxidantes para su aplicación en envases para mejorar la estabilidad de los alimentos de la oxidación lipídica.

En la actualidad, estudios realizados por Soto-Valdez (2011) y Manzanarez-López (2011) han propuesto la utilización de antioxidantes naturales como resveratrol y α -tocoferol en matrices fabricadas de PLA. Estas matrices fueron expuestas a simulantes de alimentos grasos, donde se observó la liberación de éstos. Por estos motivos, se han llevado nuevas investigaciones hacia la utilización de materiales de fuentes naturales como PLA incorporando antioxidantes naturales como resveratrol, α -tocoferol, entre otros.

HIPÓTESIS

Catequina y epicatequina, al ser incorporadas en películas de ácido poliláctico, migran desde esta matriz polimérica hacia aceite de soya retardando su oxidación.

OBJETIVOS

General

Evaluar la migración de catequina y epicatequina, cada uno incorporado en películas a base de una matriz polimérica de ácido poliláctico, evaluando sus efectos en la oxidación de aceite de soya.

Específicos

1. Establecer las condiciones de fabricación para incorporar catequina y epicatequina a películas diferentes de PLA por medio del proceso de extrusión con un dado para película plana.
2. Determinar propiedades ópticas y térmicas de las películas obtenidas.
3. Determinar la difusión de catequina y epicatequina de cada uno de los sistemas desde películas de PLA hacia simulantes de alimentos y aceite de soya.
4. Evaluar el efecto de la difusión en la estabilidad oxidativa de aceite de soya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El PLA 4042D (94 % L-ácido láctico) fue obtenido de NatureWorks (Minnetonka, MN, USA), los polvos de catequina hidratada, epicatequina (90% pureza), Tween 65 y THF de Sigma (St. Louis, MO, USA). El BHT fue suministrado por TCI (Japón). Metanol ACS y etanol de Fermont (Monterrey, N.L., México), ácido fórmico (98-100 % pureza) de Merck (Darmstadt, Alemania). Agua y metanol grado HPLC fue obtenido por JT Baker (Edo. de México, México). El aceite de soya fue suministrado por Industrializadora Oleofinos S.A. de C.V. (Zapopan, Jalisco, México).

Elaboración de Pellets y Películas de PLA con Catequina y Epicatequina

Se elaboraron pellets de PLA con antioxidantes, catequina y epicatequina (Figura 8). Experimentos preliminares mostraron que la mezcla de catequina o epicatequina (polvo) con los pellets comerciales de PLA previos al procesamiento, provocaban la obtención de una película con distribución irregular de los compuestos fenólicos. Para evitar este problema, se disminuyó el tamaño de partícula de la resina de PLA utilizando un molino Thomas-Wiley, Laboratory Mill, modelo 4, con un tamaño de malla de 1 mm (Philadelphia, EUA). Posteriormente, se mezclaron manualmente los polvos de catequina y epicatequina por separado con pellets molidos, cada uno a una concentración de 25 mg/g (2.5 %).

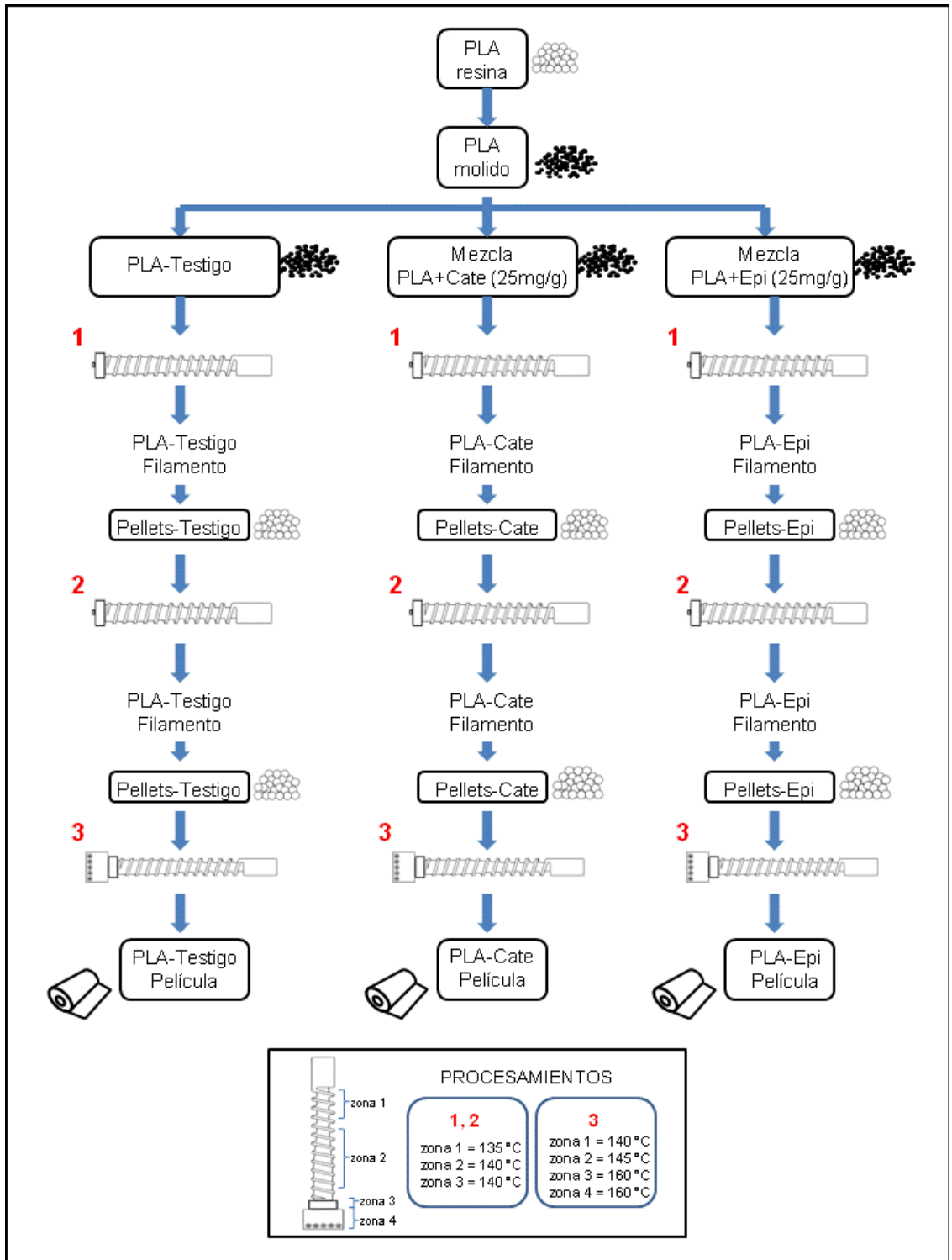


Figura 8. Diagrama del procesamiento de pellets y películas de PLA con catequina y epicatequina.

Para la obtención de los pellets de PLA incorporados con los antioxidantes, así como pellets testigo (sin antioxidante), se elaboraron filamentos con las mezclas antes mencionadas. Se utilizó una máquina extrusora mono husillo a nivel planta piloto con una capacidad para procesar 2.5 kg/h de material con un dado para filamentos (Beutelspacher, México, D.F). Las temperaturas de procesamiento para la zona 1, 2 (Figura 6) y 3 (temperatura del dado) fueron 135 y 140 °C para las últimas dos, respectivamente, con una velocidad de tornillo de 16 rpm y tiempo de residencia de 2.55 min. Una vez obtenidos los filamentos, se pasaron por un cortador (Beutelspacher, México, DF) de 2 amperes, para la obtención de los pellets control, pellets de PLA con catequina y pellets de PLA con epicatequina. Para tener una homogenización mejor de los antioxidantes en los pellets ya fabricados, se volvió a repetir el procesamiento de los pellets, utilizando las condiciones antes mencionadas.

Los dos tipos de películas de PLA con catequina (PLA-Cate) y epicatequina (PLA-Epi), así como la película testigo (PLA-Testigo), fueron elaboradas a partir de los pellets doblemente procesados (Figura 8), utilizando una máquina extrusora mono husillo a nivel planta piloto con un dado para película plana (Beutelspacher, México, D.F, México). La temperatura de procesamiento para la zona 1 fue de 140 °C, para la zona 2 de 145 °C, y finalmente para la zona 3 y 4 de 160 °C, donde la zona 4 está localizada en el dado, con una velocidad de tornillo de 29 rpm y tiempo de residencia de 5.33 min. El espesor de las películas fue determinada con un micrómetro modelo model DTT, E.J. Cady & Co. (Wheeling, IL, USA), con un espesor resultante de aproximadamente 57-77 μm . Una vez elaboradas las películas, se almacenaron a -20 °C, protegiéndolas de la luz y de la humedad.

Extracción de Catequina y Epicatequina de Pellets y Películas de PLA para su Cuantificación

Es importante conocer la concentración final de los antioxidantes tanto en los pellets como en las películas, para ver si durante el procesamiento hubo pérdidas, además de conocer las concentraciones de las cuales se va a partir para cada uno de los estudios a realizar. Por estos motivos se realizaron extracciones utilizando 20 mL de metanol ACS con 0.002 g de BHT y 0.1 g de pellets o película. Cada muestra se mantuvo bajo agitación constante y en la oscuridad por periodos de 24 h después de los cuales se separó el solvente para análisis y se reemplazó por nuevo. Las extracciones se hicieron cada 24 h hasta que los antioxidantes fueran extraídos por completo, con 3 réplicas.

La cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fase reversa, en un equipo Varian modelo 9012, acoplado a un detector de fluorescencia con longitudes de onda de 280 nm de excitación y 310 nm de emisión. Se utilizó una columna Microsorb C₁₈ 100 x 4.6 mm (Varian, México) con una precolumna C₁₈. El volumen de inyección en el HPLC fue de 5 µL. La fase móvil fue 10 % metanol y 90 % agua grado HPLC acidificada al 5 % con ácido fórmico con un flujo isocrático de 1 mL/min. Las concentraciones de estos antioxidantes fueron expresadas como mg/g de pellets o película.

Se elaboró una curva de calibración para catequina y otra para epicatequina en metanol, teniendo concentraciones en el rango de 0.5 a 32 µg/mL, donde el límite mínimo de cuantificación (LOQ) fue de 0.5 µg/mL. Cada una de las muestras fue elaborada a temperatura ambiente protegidas de la luz. La Ecuación de la curva se obtuvo por un análisis de regresión lineal, graficando la

concentración de antioxidante contra el área bajo la curva obtenida en el cromatograma.

El porcentaje de recuperación se calculó adicionando en 20 mL de metanol con una concentración conocida de catequina y epicatequina, trozos de película testigo, colocándose bajo una temperatura de 40 °C durante 24 h, las determinaciones fueron llevadas a cabo por triplicado. Los porcentajes de recuperación para catequina y epicatequina fueron de 88.30 ± 2.56 y 95.28 ± 3.03 %, respectivamente. Todos los datos fueron corregidos por las recuperaciones.

Evaluación de Propiedades de las Películas

Propiedades Ópticas

Para evaluar algunas propiedades ópticas y confirmar la presencia de catequina y epicatequina en las películas de PLA, se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible marca Varian, modelo Cary 50 Bio (EUA). Se hizo un barrido del % transmitancia de la película control, así como de la película con catequina y con epicatequina de 200-800 nm a una velocidad media de 600 nm/s. Las medidas de las películas fueron de 1 x 5 cm con un espesor de 57-77 μm y fueron colocadas directamente en el lugar de la celda del espectrofotómetro. Posteriormente, se analizaron las películas utilizando un espectrofotómetro infrarrojo de transformadas de Fourier (FTIR) Protegé 460 Nicolet Analytical Instruments (Madison, WI), calibrando el equipo con un blanco (aire). Para los infrarrojos de los estándares de los antioxidantes se elaboraron pastillas, utilizando como blanco KBr. La técnica utilizada fue de transmisión, 32 scans y

una resolución de 4 cm^{-1} . Las bandas características del material polimérico y de los antioxidantes fueron identificadas en el modo de % transmitancia.

Propiedades Térmicas

Para conocer la T_g y la T_m de la película control, y ver el efecto que causa la presencia de catequina y epicatequina en estos parámetros, se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (DSC) modelo Diamond marca Perkin Elmer (Shelton, CT, EUA). Para el control y establecimiento de las condiciones se utilizó el programa PIRYS de Perkin Elmer versión 3.5. El rango de temperatura de las corridas fueron de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $180 \text{ }^\circ\text{C}$, empleando una velocidad de calentamiento y de enfriamiento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, la cual fue la misma para las tres películas. Se utilizó una atmósfera de aire. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Diseño Experimental para Determinar el Efecto del Procesamiento y de los antioxidantes sobre la T_m y T_g del PLA

Para determinar el efecto del procesamiento y de los antioxidantes sobre la T_m y T_g del PLA, se aplicó un diseño completamente al azar. Las variables de respuesta fueron T_m y T_g de Peli-Testigo, Peli-Cate y Peli-Epi. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un 95% de confianza. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer, mediante el programa estadístico NCSS (NCSS, 2007). El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Donde:

Y = T_m y T_g

μ = Efecto de la media general

T = Efecto de los tratamientos

ε = Error experimental

Ensayo de Difusión

Difusión de Catequina y Epicatequina en Películas de PLA

Se determinó la difusión de catequina y epicatequina de películas de PLA hacia etanol al 95 %, etanol al 50 %, aceite de soya, agua, emulsión y mezcla aceite-agua. La difusión de estos antioxidantes hacia los simulantes de alimentos se llevó a cabo de acuerdo con la ASTM D4754-98 (ASTM, 2006). Para los sistemas etanol al 95 %, etanol al 50 %, aceite de soya y agua, se cortaron discos de cada película de PLA de 2 cm de diámetro (25.13 cm² para los sistemas de etanol, 75.40 cm² para agua y 100.53 cm² para aceite de soya). Estos discos fueron colocados en soportes de acero inoxidable y separados con perlas de vidrio dentro de viales protegidos de la luz agregando 0.002 g de BHT. Cada uno de estos sistemas se describe a continuación:

Etanol al 95 %. Según la FDA (FDA, 2007) etanol al 95 % es un simulante de alimento graso para poliolefinas. Además, se eligió dicho simulante para asegurar la liberación de catequina y epicatequina. Los viales fueron llenados con 38 mL de etanol al 95 % con una relación volumen/área de 1.51 mL/cm², cumpliendo con la ASTM D4754-98, la cual establece una relación entre 155 y 0.31 mL/cm² (ASTM, 2006). Para este estudio se utilizaron cuatro temperaturas: 20, 30, 40 y 50 °C, en los cuales los viales estuvieron en agitación constante. Se tomaron muestras periódicamente, donde el contenido de cada antioxidante en etanol al 95 % se cuantificó por el método antes descrito, mediante HPLC,

utilizando las curvas de calibración en metanol anteriormente descritas. Se hicieron las determinaciones por triplicado. Para determinar cuando el sistema llegó al equilibrio, se graficó tiempo contra concentración (mg/mL) en cada muestreo, hasta que la pendiente de la curva llegó a cero.

Etanol al 50 %. Este simulante de alimento según lo establecido por la FDA (FDA, 2007) es para bebidas con arriba del 8 % de alcohol, y de acuerdo con el Diario Oficial de la Unión Europea, es para alimentos con un grado de alcohol mayor al 20 % (97/48/CEE, 1997). Los viales utilizados para este estudio fueron llenados con 38 mL de etanol al 50 % (relación volumen/área de 1.51 mL/cm²) y almacenados a 40 °C con agitación constante. Se tomaron muestras periódicamente, donde el contenido de cada antioxidante en etanol al 50 % se cuantificó por el método antes descrito, mediante HPLC, utilizando las curvas de calibración anteriormente descritas en metanol. Se hicieron las determinaciones por triplicado. Para determinar cuando el sistema llegó al equilibrio, se graficó tiempo contra concentración (mg/mL) en cada muestreo, hasta que la pendiente de la curva llegó a cero.

Aceite de soya. Se realizó el estudio con aceite de soya refinado y deodorizado, sin antioxidantes ni ácido cítrico para evitar alguna interferencia y facilitar las mediciones. Los viales fueron llenados con 38 mL de aceite de soya con una relación volumen/área de 0.378 mL/cm². Se almacenaron por triplicado a 40 °C cada una de las películas de estudio. Se tomaron muestras periódicamente para cuantificar la concentración de catequina y epicatequina utilizando HPLC con el método antes mencionado.

Agua. El agua se utiliza como simulante de alimento acuoso según el Diario Oficial de la Unión Europea (97/48/CEE, 1997). Los viales fueron llenados con 38 mL de agua grado HPLC con una relación volumen/área de 0.504 mL/cm².

Se almacenaron a 40 °C con agitación constante, donde se tomaron muestras periódicamente para cuantificar por HPLC en las condiciones previamente establecidas.

Emulsión. La emulsión agua-aceite (50:50) se preparó con Tween 65 (Polioxietilen sorbitan triestearato) al 5 %, utilizando agua grado HPLC y aceite de soya. Se colocó película en viales protegidos de la luz, en una relación área/volumen de 0.398 mL/cm². Este estudio se llevó a cabo a una temperatura de 40 °C, donde se tomaron muestras con cierto lapso de tiempo, para ser cuantificado usando HPLC por medio del método antes establecido.

Aceite-Agua. Se preparó una mezcla aceite-agua (50:50), utilizando agua grado HPLC y aceite de soya, la cual fue colocada en viales. Dentro de los viales, se colocaron las películas en estudio para cumplir una relación volumen/área de 0.398 mL/cm². Se muestreó periódicamente para cuantificar en HPLC, usando las condiciones previamente descritas.

Determinación del Coeficiente de Difusión

Para la determinación de D en etanol al 95 y 50 % se utilizaron las soluciones analíticas de la segunda ley de Fick, Ecuaciones 3 y 6, descritas en la sección de antecedentes y justificación. Para aplicar cada una de las ecuaciones se tuvo que completar la difusión de los migrantes para calcular α y $K_{P,S}$ de acuerdo a las Ecuaciones 4 y 5. La Ecuación 3 se utilizó si el sistema fue finito, es decir si $K_{P,S} > 1$ y $\alpha \ll 1$, de lo contrario, fue necesario aplicar la Ecuación 6 para sistemas infinitos ($K_{P,S} < 1$ y $\alpha \gg 1$).

Para ajustar los datos a las ecuaciones 3 ó 6, se graficó M_t/M_∞ contra tiempo t . D (cm^2/s) fue calculado para cada antioxidante a las diferentes temperaturas de estudio. Para determinar el ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 3 ó 6, se utilizó la función de regresión no lineal en MATLAB R2008a (MathWorks, Natick, MA, US).

Determinación de la Energía de Activación de la Difusión

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la difusión de catequina y epicatequina de las películas de PLA hacia los simulantes de alimentos, se calculó la energía de activación (E_a), utilizando la Ecuación de Arrhenius aplicada a la difusión (Ecuación 7).

La E_a fue obtenida de la pendiente de graficar el recíproco de la temperatura ($1/T$) contra el logaritmo de D y la energía de activación se calculó de acuerdo a las siguiente fórmula: $E_a = -\text{pendiente} \times 2.303R$ (Limm y Hollifield, 1996).

Diseño Experimental para Determinar el Efecto de Migración a Diferentes Temperaturas

Para determinar el efecto de la migración de catequina y epicatequina desde las películas de PLA hacia los simulantes de alimentos de los diferentes antioxidantes, se aplicó un diseño completamente al azar. Las variables de respuesta fueron D y $K_{P,S}$ de catequina y/o epicatequina. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un 95% de confianza. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer, mediante el programa estadístico NCSS (NCSS, 2007). El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Donde:

$Y = D$ o $K_{P,S}$

μ = Efecto de la media general

T = Efecto de los tratamientos

ε = Error experimental

Efecto del Procesamiento y la Difusión sobre el Peso Promedio del Peso Molecular del PLA

El peso promedio del peso molecular (P_M) de la resina, de los pellets y películas con y sin antioxidantes fueron analizados antes y después del estudio de difusión en etanol para determinar si hubo hidrólisis en la estructura del PLA y se redujeron las cadenas del polímero. Las muestras de PLA fueron secadas a vacío; 20 – 30 mg de PLA fueron disueltos en 10 mL de tetrahidrofurano (THF) estabilizado con BHT, y P_M fue determinado por cromatografía de permeación en gel (GPC) (Waters 1515, Water, Milford MA, USA) equipado con un detector de índice de refracción (Waters 2414). Una serie de columnas (cada una de 7.8 x 300 mm, Waters Styragel) organizadas desde el inyector al detector, las cuales fueron conectadas en serie de la siguiente manera: HR4, HR3 y HR2. Se utilizó una elución isocrática de THF a 1 mL/min a 25 °C. La temperatura del detector fue de 35 °C. Como referencia, se empleó una curva de calibración de P_M de un estándar de poliestireno STD KIT SM 105 (estándar Shodex, Waters, Milford MA, USA) de 1,310 a 3'640,000 Da. Se utilizó la constante de Mark Houwink para PLA en THF a 30 °C ($K=0.000174L/g$ y $\alpha = 0.736$). Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Diseño Experimental para Determinar el Efecto del Procesamiento y la Difusión sobre el P_M del PLA

Para determinar el efecto de la molienda y el procesamiento para la obtención de los pellets testigo sobre el P_M, se aplicó un diseño completamente al azar, donde la variable de respuesta fue P_M de los pellets. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un 95% de confianza. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer, mediante el programa estadístico NCSS (NCSS, 2007). El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Donde:

$$Y = P_M$$

μ = Efecto de la media general

T = Efecto de los tratamientos

ε = Error experimental

El efecto del procesamiento de los pellets y posteriormente de las películas sobre el P_M del PLA, se determinó utilizando un diseño completamente al azar con arreglo factorial (2 x 3). Los factores del arreglo fueron los materiales (pellets y películas) y los tratamientos (testigo, PLA-Cate y PLA-Epi). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un 95% de confianza. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer, mediante el programa estadístico NCSS (NCSS, 2007). El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y = \mu + A + B + AB + \varepsilon$$

Donde:

$$Y = P_M$$

μ = Efecto de la media general

A = Efecto de los materiales

B = Efecto de los tratamientos

AB = Efecto de la interacción de los materiales y temperatura

ε = Error experimental

El efecto de la difusión sobre el P_M de las películas de PLA con cada uno de los antioxidantes, se determinó utilizando un diseño completamente al azar. La variable de respuesta fue P_M de las películas con catequina y epicatequina. Los tratamientos fueron las diferentes condiciones a las que estuvieron expuestas las películas de PLA para la difusión de los antioxidantes. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un 95% de confianza. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer, mediante el programa estadístico NCSS (NCSS, 2007). El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Donde:

Y = P_M

μ = Efecto de la media general

T = Efecto de los tratamientos

ε = Error experimental

Efecto del Procesamiento y Difusión sobre la Actividad Antioxidante de Catequina y Epicatequina

Para conocer el efecto del procesamiento de las películas PLA-Cate y PLA-Epi sobre la actividad antioxidante de catequina y epicatequina, se midió su

actividad indirectamente en una extracción de los antioxidantes. Se realizaron extracciones de las películas, PLA-Testigo, PLA-Cate y PLA-Epi con metanol durante 24 h a 40 °C, donde las concentraciones obtenidas para catequina y epicatequina fueron 46.42 ± 0.35 y 57.52 ± 2.83 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En seguida, se prepararon soluciones en metanol de catequina y epicatequina puras a una concentración de 46.42 y 57.52 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, por ser las obtenidas después de la extracción de las películas. Posteriormente, se llevaron a cabo las mediciones de la actividad antioxidante por el método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidracil). No se utilizó BHT para la protección en este experimento. Las mediciones se hicieron por triplicado.

El efecto de la difusión a 20, 30, 40 y 50 °C de catequina y epicatequina hacia etanol al 95 % sobre la actividad antioxidante, también fueron medidas indirectamente, tomando muestras del simulante cuando el sistema llegó al equilibrio. No se utilizó BHT para la protección en este experimento. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidracil)

La capacidad de catequina y epicatequina para inactivar al radical estable DPPH fue calculada de acuerdo al método propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones. La reducción del radical se determinó a 515 nm en un espectrofotómetro UV-Visible marca Varian, modelo Cary 50 Bio (EUA). La actividad se expresó como % de inhibición del radical DPPH, el cual es proporcional a las concentraciones de antioxidante que causa la disminución inicial de DPPH.

Diseño Experimental para Determinar el Efecto del Procesamiento y Difusión sobre la Actividad Antioxidante de Catequina y Epicatequina

Para determinar el efecto del procesamiento sobre la actividad antioxidante de catequina y epicatequina, se aplicó un diseño completamente al azar, donde la variable de respuesta fue % inhibición. Los tratamientos para el primer modelo fueron el antioxidante puro disuelto en metanol y los extractos de las películas PLA-Cate y PLA-Epi. En el segundo modelo los tratamientos fueron las temperaturas de migración: 20, 30, 40 y 50 °C. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un 95% de confianza. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer, mediante el programa estadístico NCSS (NCSS, 2007). El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Donde:

Y = % inhibición

μ = Efecto de la media general

T = Efecto de los tratamientos

ε = Error experimental

Para medir la relación lineal entre la concentración de antioxidante cuando el sistema llegó al equilibrio en etanol al 95 % y el % inhibición, se realizó una correlación mediante el programa estadístico NCSS (NCSS, 2007).

Ensayo de Estabilidad Oxidativa

Para evaluar el efecto de catequina y epicatequina sobre la estabilidad oxidativa de aceite de soya, se adicionaron de manera directa a una concentración del 0.025 %, teniendo también aceite testigo (sin antioxidantes). Además, se adicionó BHT a la misma concentración con la finalidad de comparar el efecto de un antioxidante sintético ya conocido con los flavonoides utilizados en este trabajo. Por otro lado, se colocaron película de PLA-Testigo, PLA-Cate y PLA-Epi en aceite de soya teniendo una relación área/volumen de 1 cm²/mL (Cuadro 1). Cada tratamiento fue almacenado en botellas de vidrio con tapa de PEBD a 30 °C expuestas a la luz en un rango de intensidad de 876-1135 Lux, medido con un luxómetro Sper Scientific (modelo 840020Q019066, Taiwan). Para evaluar el comportamiento de la oxidación del aceite, se determinó periódicamente el índice de peróxidos durante 15 días. Se analizaron 3 repeticiones por tratamiento.

Índice de Peróxidos (IP)

El grado de oxidación del aceite vegetal se determinó por IP de acuerdo al método Cd 8b-90 de la AOCS (AOCS, 2009). El resultado se expresó como miliequivalentes de peróxido por kg de aceite (meq/kg) y se graficaron con respecto al tiempo de almacenamiento.

Diseño Experimental para Determinar el Efecto en la Oxidación en Aceite de Soya

Para evaluar el efecto en la oxidación en aceite de soya de cada antioxidante adicionado de manera directa, así como también del efecto de cada una de las películas, se utilizó un diseño completamente al azar en bloques. El factor de bloqueo fue el tiempo de almacenamiento, así como la variable de respuesta el IP. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un 95% de confianza. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer mediante el programa estadístico NCSS (NCSS, 2007). El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y = Contenido de índice de peróxidos

μ = Efecto de la media general

T = Efecto de los tratamientos

B = Efecto del bloque

ε = Error experimental

Cuadro 1. Tratamientos aplicados para el ensayo de estabilidad oxidativa de aceite de soya.

Tratamiento	Proporción
Aceite Testigo	Sin antioxidante
Aceite + Catequina	0.025 %
Aceite + Epicatequina	0.025 %
Aceite + BHT	0.025 %
Aceite + PLA-Testigo	1 cm ² /mL
Aceite + PLA-Cate	1 cm ² /mL
Aceite + PLA-Epi	1 cm ² /mL

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se obtuvieron pellets y películas de PLA testigo, PLA con catequina (PLA-Cate) y con epicatequina (PLA-Epi) (Figura 9). Las películas mostraron una apariencia incolora, con un espesor resultante de aproximadamente 57-77 μm .

Cuantificación de Catequina y Epicatequina de Pellets y Películas

Después de haberse llevado el procesamiento para la obtención de los pellets y películas, se hizo una extracción y cuantificación de cada uno de los lotes de PLA con catequina y PLA con epicatequina. Se obtuvo un porcentaje de retención en los pellets de 53.86 ± 10.78 y 78.30 ± 3.30 % para catequina y epicatequina, respectivamente. Posteriormente, en la extracción de las películas se cuantificó que hubo un porcentaje de retención entre los pellets y el procesamiento de las películas para catequina y epicatequina de 115.46 ± 4.12 y 89.79 ± 2.90 %, respectivamente. Finalmente, después de haberse llevado el doble procesamiento en pellets y el proceso de elaboración de películas, la retención fue del 62.19 ± 2.22 % para catequina y de 70.32 ± 2.27 % para epicatequina. Como resultado de las mezclas de PLA con 25 mg/g de los antioxidantes se obtuvieron películas de PLA con catequina y PLA con epicatequina al 12.76 ± 0.45 mg/g (1.28 %) y 15.03 ± 0.48 mg/g (1.50 %), respectivamente, donde la epicatequina tuvo mayor tendencia a permanecer en el PLA. Sin embargo, la baja concentración final de catequina con respecto a epicatequina en las películas, puede atribuirse a problemas en el equipo durante su procesamiento, donde el material permaneció dentro del barril aproximadamente 2 min más comparando con la obtención de las películas de PLA con epicatequina.

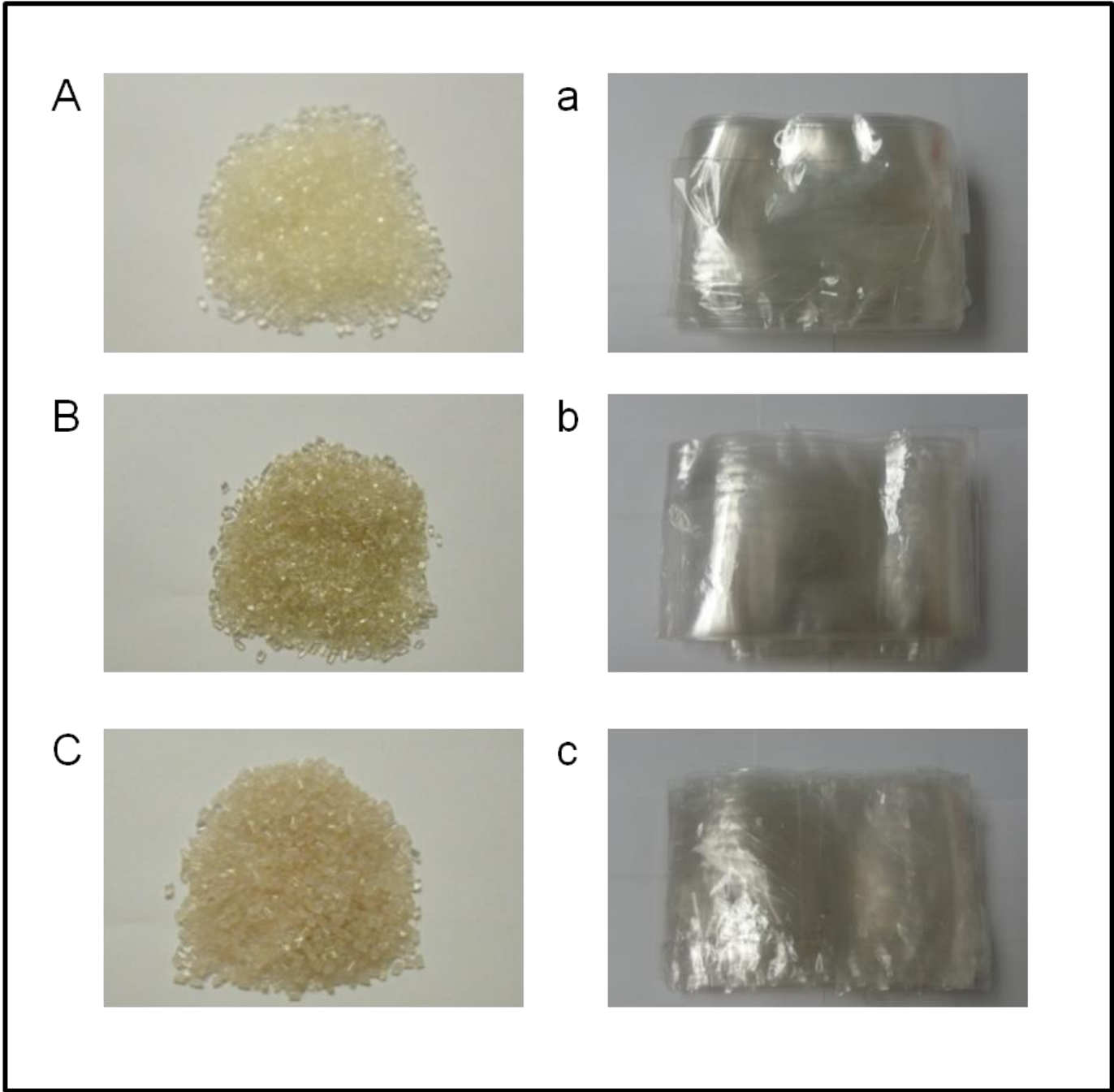


Figura 9. Apariencia visual de pellets (A,B,C) y películas (a,b,c) de PLA-Testigo (A,a), PLA-Cate (B,b) y PLA-Epi (C,c).

La retención final de los antioxidantes se vio influenciada por las condiciones de procesamiento. Estudios realizados por López-de-Dicastillo *et al.* (2010), reportaron un 66.8 % de retención de catequina en películas de EVOH, mayor al 62.19 % de catequina en películas de PLA. Esta diferencia se puede deber a la temperatura, velocidad del tornillo y al sistema de doble tornillo utilizado en el procesamiento, donde las películas de EVOH fue de 200 °C pero con una velocidad en el tornillo de 200 rpm, mayor a la utilizada para las películas de PLA de 30 rpm pero 40 °C menos. Sin embargo, aunque las temperaturas de procesamiento para el PLA fue menor, cabe mencionar que se realizaron 3 procesamientos, es decir, los antioxidantes estuvieron expuestos 3 veces a temperaturas por arriba de los 135 °C. Por consiguiente, la manera de incorporación, condiciones de procesamiento, entre otros factores, pueden repercutir en la retención final del compuesto.

Evaluación de Propiedades de las Películas

Propiedades Ópticas

La transmisión de la luz visible (400-700 nm) y ultravioleta (100-400 nm) son parámetros importantes para evaluar si se ha logrado cumplir con el diseño del envase antioxidante que tenga potencial para preservar y proteger los alimentos hasta que lleguen al consumidor (Auras *et al.*, 2004). La Figura 10 muestra el barrido espectral en el UV visible de 200 a 800 nm en la película testigo, así como las diferentes películas de PLA con catequina y epicatequina. La película testigo no mostró transmisión de la luz UV en el rango de 200 a 230 nm, esto se puede deber a la presencia de los enlaces éster del PLA, los cuales absorben a 211 nm (Walton y Reyes, 2005). Sin embargo, a 230 nm el porcentaje de transmitancia aumenta significativamente. A 300 nm el porcentaje de

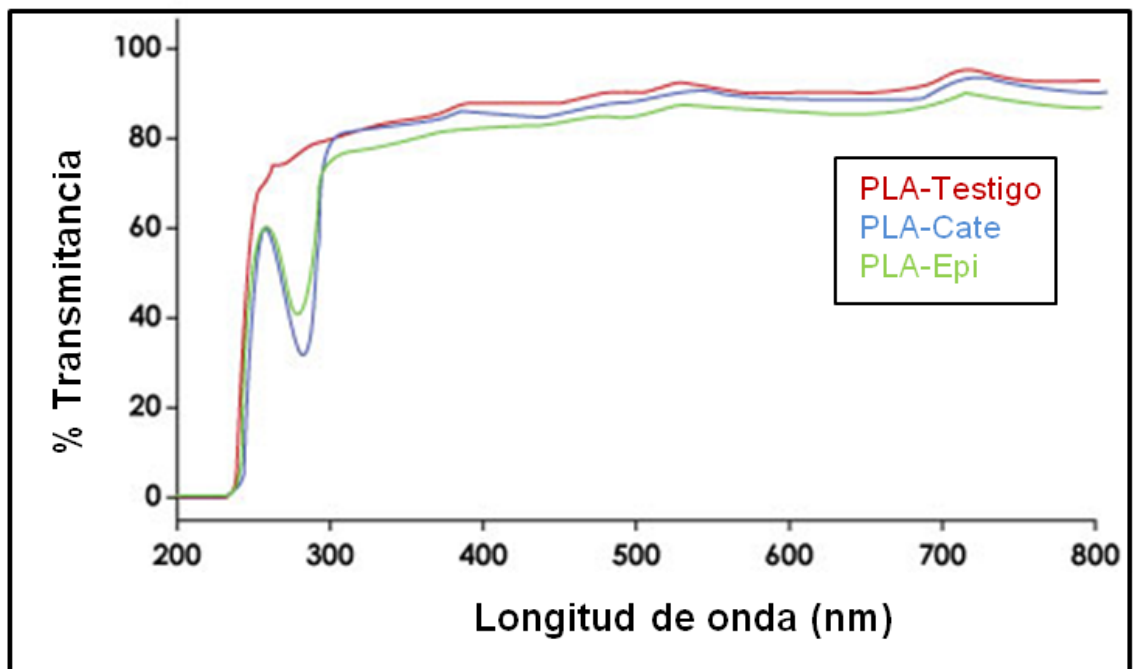


Figura 10. Barrido espectral en la región UV-visible de las películas de PLA-Testigo, PLA-Cate y PLA-Epi. Espesor: 57-77 μm .

transmisión de la luz alcanza el 80 %, mientras que a 500 nm es del 90 %. La absorción de radiación ultravioleta o visible proviene de la excitación de los electrones de valencia a niveles superiores de energía (Skoog y Leary, 1994).

La incorporación de catequina y epicatequina en las películas de PLA, mostraron una disminución en los porcentajes de transmitancia de hasta 30 y 40 %, respectivamente, alrededor de los 250-300 nm. Ambas películas mostraron una longitud máxima de absorción a 280 nm. Esto se debe a la estructura química de estos antioxidantes, es decir, a la presencia de dos anillos fenólicos y uno pirano. Un anillo de benceno tiene una absorbancia máxima a los 256 nm, pero cuando éste presenta grupos sustituyentes (auxocromos), se altera la longitud de onda máxima de absorción. Este es el caso del anillo fenólico, el cual presenta como grupo auxocromo el OH, presentes en la molécula de catequina y epicatequina. En este caso, los pares de electrones no enlazados del oxígeno están disponibles para interactuar con la nube de electrones del anillo del benceno, lo que hace que esa interacción aumente la longitud máxima, disminuyendo su energía (Skoog y Leary, 1994; Yurkanis, 2008).

Debido a que el PLA permite la transmisión de luz UV a ciertas longitudes de onda, se requiere de la incorporación de aditivos o estabilizadores para prevenir el daño causado por luz en los alimentos envasados. Por lo que los resultados obtenidos al incorporar catequina y epicatequina a películas de PLA reducen la transmisión de la luz UV a 280 nm, pudiendo proteger al alimento así como también al mismo polímero.

Las Figuras 11 y 12 muestran el espectro infrarrojo de las moléculas de catequina y epicatequina antes de ser incorporadas al PLA. La presencia del estiramiento del grupo OH de ambas moléculas se encuentran en la región

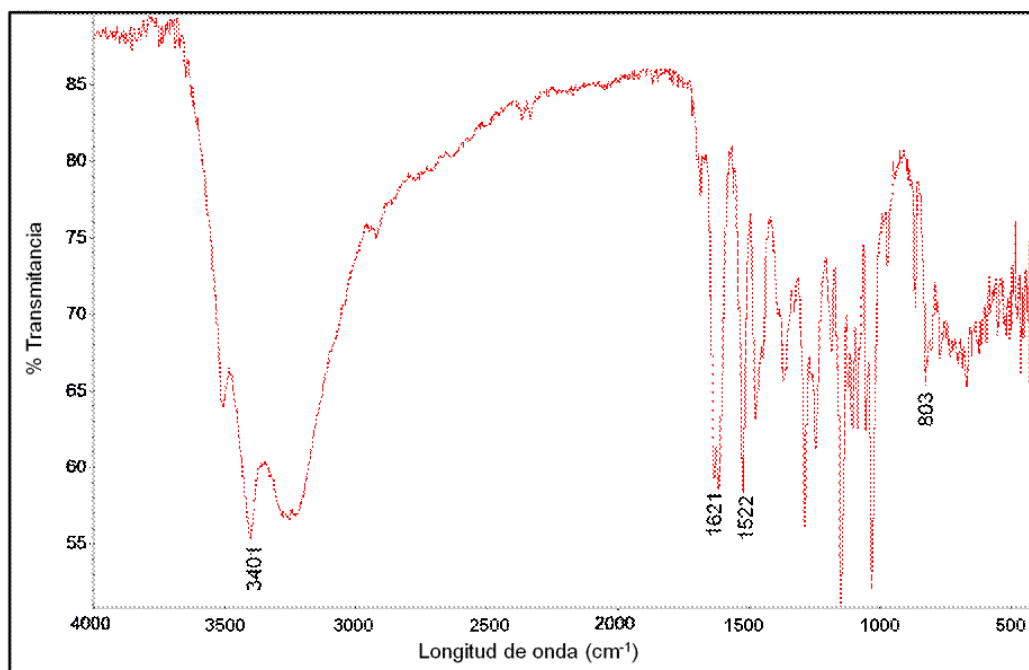


Figura 11. Espectro infrarrojo de la molécula de catequina.

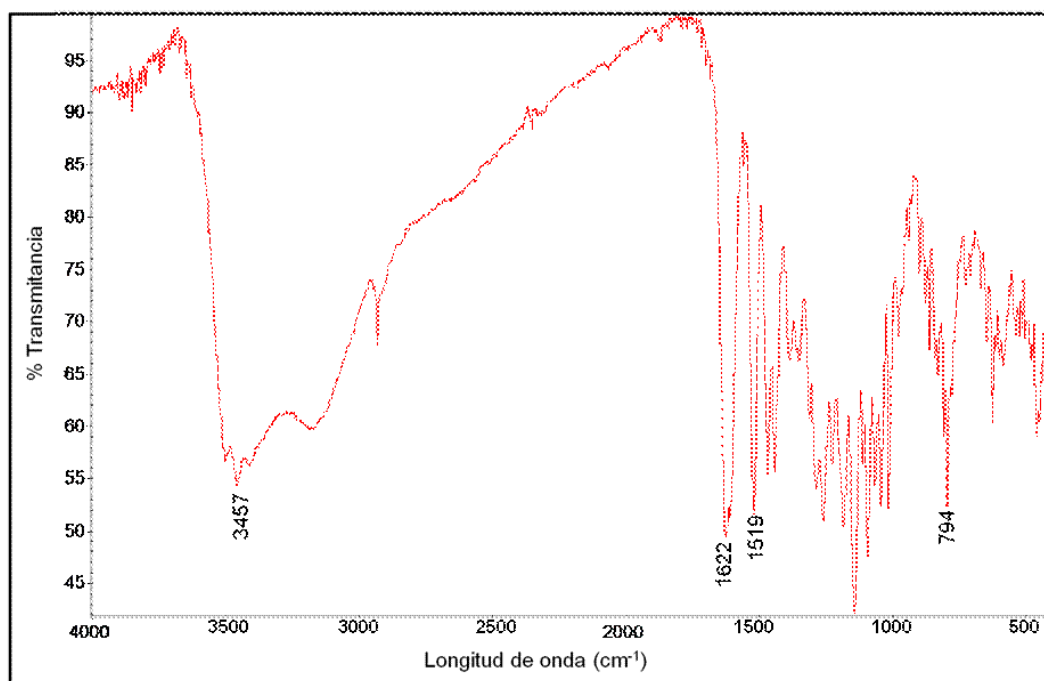


Figura 12. Espectro infrarrojo de la molécula de epicatequina.

entre 3570-3200 cm^{-1} . Las bandas entre la región de 3130-3070 cm^{-1} son características de la flexión de C-H de los anillos aromáticos dentro del plano, y la región entre 900-670 cm^{-1} de la flexión fuera del plano. En ambos espectros en las regiones entre 1615-1580 cm^{-1} se muestran las bandas características de los estiramientos de los anillos aromáticos (Coates, 2000). Basado en estudios realizados por Mendoza-Wilson y Glossman-Mitnik (2006) la molécula de catequina (Figura 11) presenta una banda en 1621 cm^{-1} indicando la deformación del anillo A y en 1522 cm^{-1} la del anillo B. De igual manera, para la epicatequina (Figura 12) en 1622 cm^{-1} se observa una banda característica de la deformación del anillo A, y en 1519 cm^{-1} otra banda que representa la deformación del anillo A y B.

Mendoza-Wilson y Glossman-Mitnik (2006), muestran que una de las diferencias entre las moléculas de catequina y epicatequina, además de la estereoquímica del grupo hidroxilo del anillo C, es la torsión del anillo B con referencia al anillo C, siendo mayor en epicatequina. En los espectros infrarrojos de ambos antioxidantes (Figura 11 y 12) existe una banda más intensa para epicatequina a 794 cm^{-1} , representativa de los estiramientos C-H fuera del plano. Estos estiramientos concuerdan con la presencia de un ángulo de torsión mayor en epicatequina que en catequina.

La Figura 13 muestra los espectros infrarrojos de la película PLA-Testigo, PLA-Cate y PLA-Epi. En la película testigo se observan las bandas características de este polímero. La banda en 3503 cm^{-1} indica el estiramiento de los grupos OH. El estiramiento del grupo C=O se observa con una banda larga aproximadamente a 1750 cm^{-1} , así como la flexión de los grupos CH₃ en la región de 1460 cm^{-1} . La región entre 3000 y 2800 cm^{-1} es la asignada para los estiramientos de los grupos CH de la cadena del polímero. Los espectros infrarrojos de las películas de PLA con catequina y con epicatequina muestran

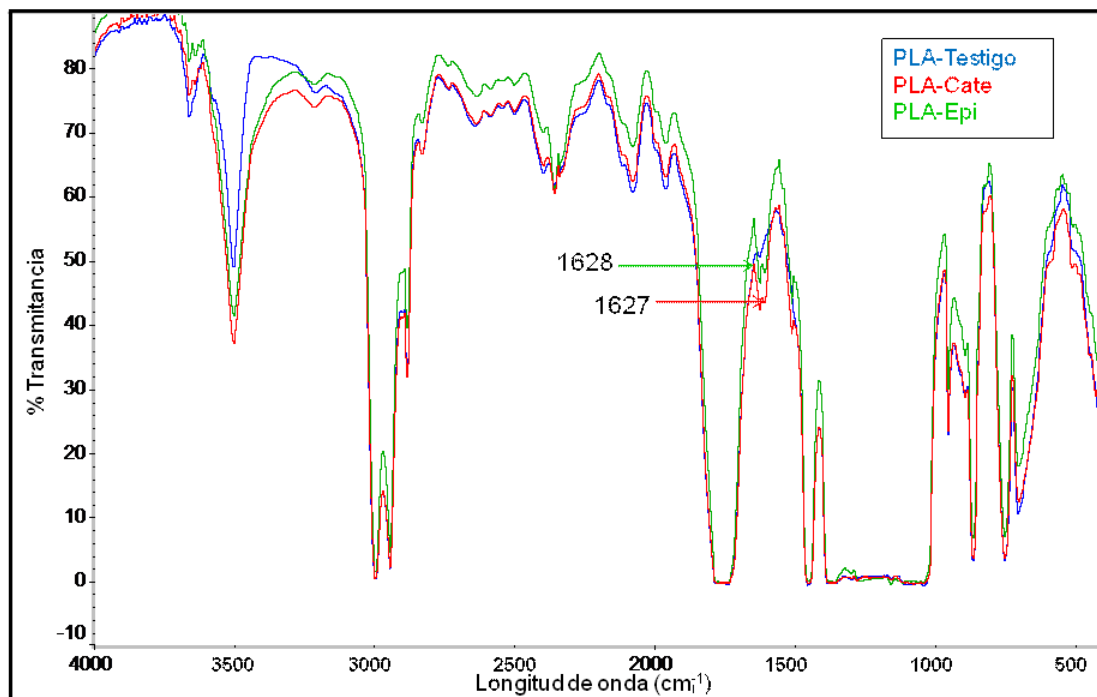


Figura 13. Espectro infrarrojo de las películas de PLA-Testigo, PLA-Cate y PLA-Epi.

una banda que la película testigo no presenta a 1627 y 1628 cm^{-1} , respectivamente, indicando el estiramiento de los anillos aromáticos. Estas bandas coinciden con la banda a 1621 cm^{-1} presente en el compuesto puro de catequina (Figura 11) y 1622 cm^{-1} (Figura 12) en epicatequina, las cuales indican la deformación de uno de sus anillos aromáticos. El incremento en 6 cm^{-1} en cada espectro muestra que las películas no son simples mezclas de PLA con cada antioxidante, sino que hay cierta interacción que provoca que la absorción de energía se mueva a frecuencias más alta. El estudio de los espectros infrarrojos de cada una de las películas, comprueba la presencia de los antioxidantes después de haber llevado a cabo el procesamiento para finalmente obtener las películas.

Propiedades Térmicas

El Cuadro 2 muestra los resultados de la temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (T_m) de las películas de PLA testigo, con catequina y con epicatequina. La incorporación de los antioxidantes no tuvo efecto ($p > 0.05$) en la T_g del PLA, esto puede deberse a que la concentración de los compuestos en el PLA no fue lo suficientemente alta, sin embargo, la T_g tiende a disminuir. Por otro lado, la T_m tuvo una disminución ($p < 0.05$) en 1.0-0.5 $^{\circ}\text{C}$ al agregar estos flavonoides con respecto a la película testigo. López-de-Dicastillo *et al.* (2010) encontraron que al incorporar catequina en películas de EVOH al 0.5 y 2.0 %, tampoco tuvo un efecto sobre la T_g sin importar la concentración, sin embargo, la T_m si tuvo una disminución en 2 $^{\circ}\text{C}$ con respecto a la película testigo.

Estudios han mostrado que al incorporar antioxidantes en películas de PLA como α -tocoferol al 2.5 % (Manzanarez-López *et al.*, 2011), tienen un efecto

Cuadro 2. Temperatura de transición vítrea (Tg) y temperatura de fusión (Tm) de la película de PLA testigo, con catequina y con epicatequina.

Películas PLA	Tg (°C)	Tm (°C)
PLA-Testigo	57.01±0.89 ^a	151.79±0.37 ^b
PLA-Cate	56.74±0.73 ^a	150.93±0.27 ^a
PLA-Epi	56.82±1.05 ^a	151.23±0.04 ^a

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$), $n = 3$.

sobre la Tg y Tm, con una disminución en 1 °C con respecto a la película testigo. Este mismo comportamiento se encontró en películas de PLA con 1 y 3 % de resveratrol (Soto-Valdez *et al.*, 2011). Estos antioxidantes pudieron mostrar un efecto plastificante en la estructura del PLA, colocándose entre las cadenas del polímero, espaciándolas y de esta manera descendiendo de forma significativa la Tg, caso que no sucedió al utilizar catequina y epicatequina.

Difusión de Catequina y Epicatequina en Películas de PLA

Etanol al 95 %

La Figura 14 muestra el comportamiento de la difusión de catequina y epicatequina de las películas de PLA en etanol al 95 % a 4 diferentes temperaturas. A 20, 30, 40 y 50 °C el sistema llegó al equilibrio a los 7.04 d (169 h), 5 d (120 h), 0.54 d (13 h) y 0.42 d (10 h), respectivamente. La cantidad liberada de catequina fue de 18.96, 75.45, 98.99 y 99.28 % y para epicatequina de 17.18, 69.04, 98.30 y 99.11 % a 20, 30, 40 y 50 °C, respectivamente. La concentración liberada fue mayor conforme la temperatura aumentaba y menor el tiempo en el que el sistema llegaba al equilibrio, debido a la dependencia de la difusión en esta variable.

La difusión de catequina y epicatequina mostraron una curva típica de Fick a 40 y 50 °C. A 20 y 30 °C el comportamiento fue diferente, donde se observa un equilibrio aparente para ambos antioxidantes a 1 d (24 h) y a 1.5 d (36 h), respectivamente. Sin embargo, a partir de ese tiempo la concentración de estos flavonoides empezó a incrementar nuevamente hasta llegar al equilibrio, donde este comportamiento se hace más notorio a 30 °C. Manzanarez-López *et al.*

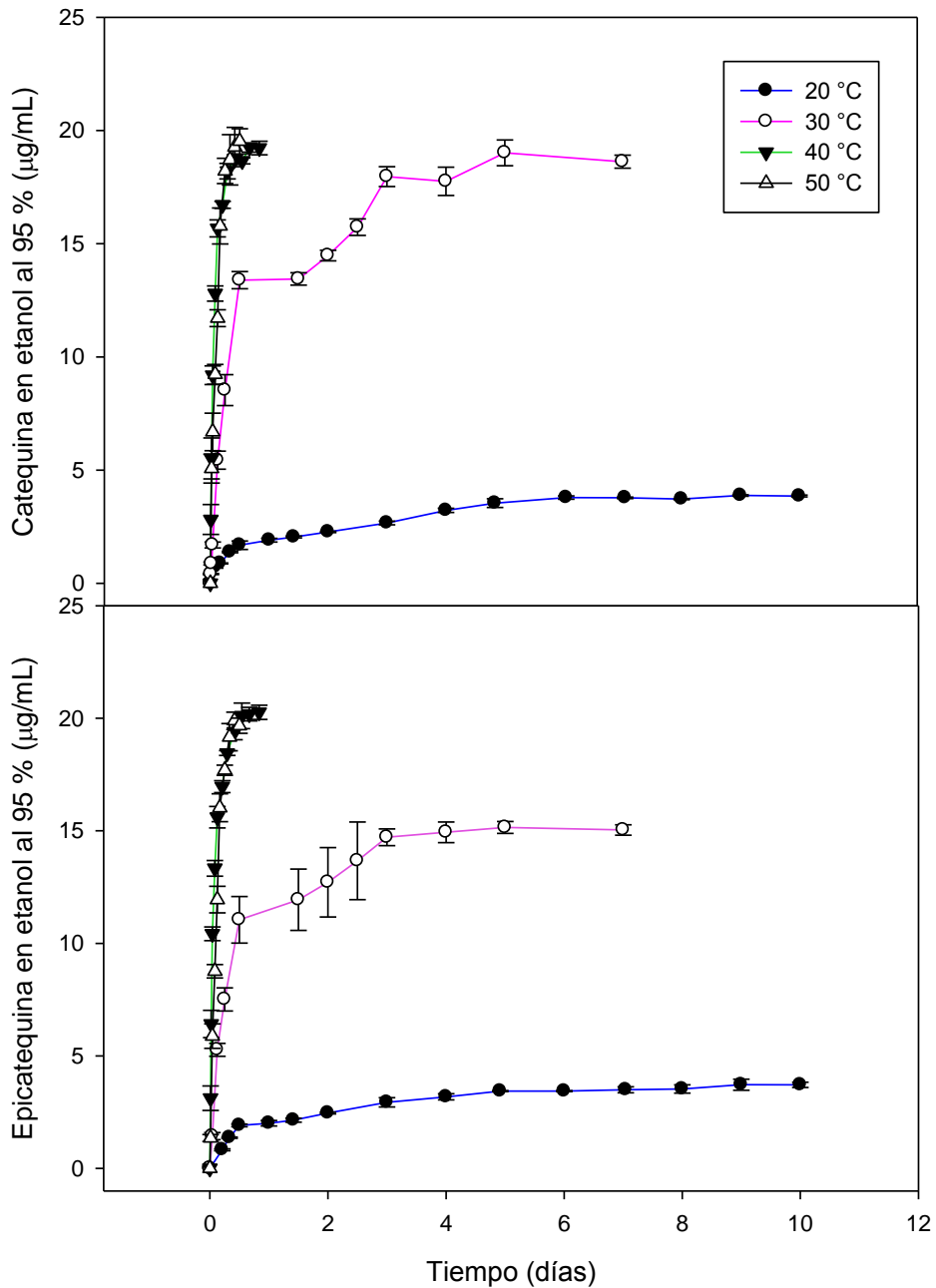


Figura 14. Difusión de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 95 % a 20, 30, 40 y 50 °C. Las gráficas muestran la concentración de catequina y epicatequina en etanol al 95 % (µg/mL) contra tiempo (días).

(2011) encontraron este mismo comportamiento en la difusión a 20 y 30 °C de α -tocoferol en películas de PLA hacia etanol. Se especula que esto podría deberse a la combinación de temperatura y un largo tiempo en el cual los discos de PLA fueron penetrados por el etanol incrementando la liberación. Por otro lado, Mascheroni *et al.* (2010) mencionan la posible absorción del etanol en la matriz del PLA actuando como plastificante, produciendo espacios vacíos entre las cadenas del polímero favoreciendo la migración.

El valor de $K_{P,S}$ expresa la distribución relativa del migrante entre el plástico y el simulante en el equilibrio. $K_{P,S} > 1$ indica una concentración alta del migrante en el polímero comparado con aquella que está en el simulante. Los valores de $K_{P,S}$ calculados en este estudio se muestran en el Cuadro 3. Los valores altos de $K_{P,S}$ a 20 °C para catequina y epicatequina coinciden con la migración baja de las películas de PLA, indicando que al llegar los sistemas al equilibrio a los 7.04 d (169 h), quedó mayor concentración en la película que en etanol al 95 %. A 30 °C la concentración de los antioxidantes sigue siendo mayor en la película a los 5 d (120 h). Por otro lado, a 40 y 50 °C los valores de $K_{P,S}$ disminuyen significativamente ($p < 0.05$), lo que concuerda con la liberación de más del 98 % para estos flavonoides.

La cantidad de antioxidante remanente varía de acuerdo a la temperatura de difusión, aumentando $K_{P,S}$ conforme disminuye la temperatura de difusión. Comportamientos similares se encontraron en la difusión de componentes del propóleo, α -tocoferol, BHT y resveratrol en películas de PLA hacia simulantes de alimentos (Mascheroni *et al.*, 2010; Manzanarez-López *et al.*, 2011; Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011; Soto-Valdez *et al.*, 2011). En el presente estudio se observó que los valores de $K_{P,S}$ para catequina fueron mayores en cada temperatura ($p < 0.05$), permaneciendo mayor cantidad de epicatequina en el PLA. Estos resultados coinciden con los porcentajes de liberación y se podrían

Cuadro 3. Coeficientes de partición ($K_{P,S}$) y valores de α de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 95 % a 20, 30, 40 y 50 °C. El espesor de las películas fue de 57-77 μm .

Temperatura (°C)	$K_{P,S}$		α	
	Catequina	Epicatequina	Catequina	Epicatequina
20	1453.79±14.95 ^{c,A}	1569.79±9.69 ^{c,B}	0.362±0.004 ^{a,A}	0.320±0.002 ^{a,B}
30	74.43±8.06 ^{b,A}	115.80±10.74 ^{b,B}	5.33±0.59 ^{a,A}	3.68±0.34 ^{a,B}
40	3.06±0.11 ^{a,A}	4.88±0.70 ^{a,B}	158.09±5.98 ^{b,A}	94.08±12.71 ^{b,B}
50	2.02±0.03 ^{a,A}	2.75±0.18 ^{a,B}	220.96±3.38 ^{c,A}	179.06±12.27 ^{b,B}

Medias con diferente literal en minúscula en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$). Literales en mayúscula en la misma fila de $K_{P,S}$ y α indican diferencias ($p < 0.05$) entre las medias, $n=3$.

relacionar con las concentraciones de los antioxidantes después del procesamiento, donde epicatequina tuvo un 8 % más de retención que catequina en las películas. Por lo tanto, la epicatequina tuvo una mayor tendencia a permanecer en las películas de PLA.

La Figura 15 muestra las gráficas de difusión para catequina y epicatequina de acuerdo a la segunda ley de Fick a 20, 30, 40 y 50 °C en etanol al 95 %. Los valores de D a 20 y 30 °C fueron calculados por medio de la Ecuación 3, debido a que los valores de $K_{P,S}$ altos obtenidos a estas temperaturas (Cuadro 4) mostraron que el sistema fue finito (solo parte de los antioxidantes se difundieron al simulante). Para calcular D a 40 y 50 °C se utilizó la Ecuación 6 ya que los valores obtenidos para $K_{P,S}$ fueron bajos pero > 1 y α fue grande. En estos casos el sistema se consideró infinito porque los antioxidantes fueron liberados casi en su totalidad al simulante (aproximadamente 99 %). Además, la Ecuación 6 proveyó el mejor ajuste de D que con la Ecuación 3.

Los valores de D fueron diferentes conforme la temperatura de difusión iba incrementando ($p < 0.05$). A 20 y 30 °C los valores de D para catequina fueron de 0.49×10^{-11} y 13.1×10^{-11} cm^2/s , y para epicatequina de 0.88×10^{-11} y 13.7×10^{-11} cm^2/s , respectivamente. Cuando la temperatura de difusión aumentó a 40 y 50 °C para ambos antioxidantes los valores de D aumentaron en un orden de magnitud, siendo para catequina 47.9×10^{-11} y 31.5×10^{-11} cm^2/s , y para epicatequina 51.2×10^{-11} y 34.9×10^{-11} cm^2/s , respectivamente. Conforme la temperatura de difusión aumenta, los valores de D también ($p < 0.05$), sin embargo, a 50 °C para ambos antioxidantes, este comportamiento no fue así, debido a que D disminuyó ($p < 0.05$) comparado con el valor a 40 °C. Esto pudo deberse a que al estar el PLA cerca de su T_g , pudo haber un cambio en su estructura haciendo que disminuyera la difusión de los antioxidante, sin embargo, la cantidad liberada fue mayor.

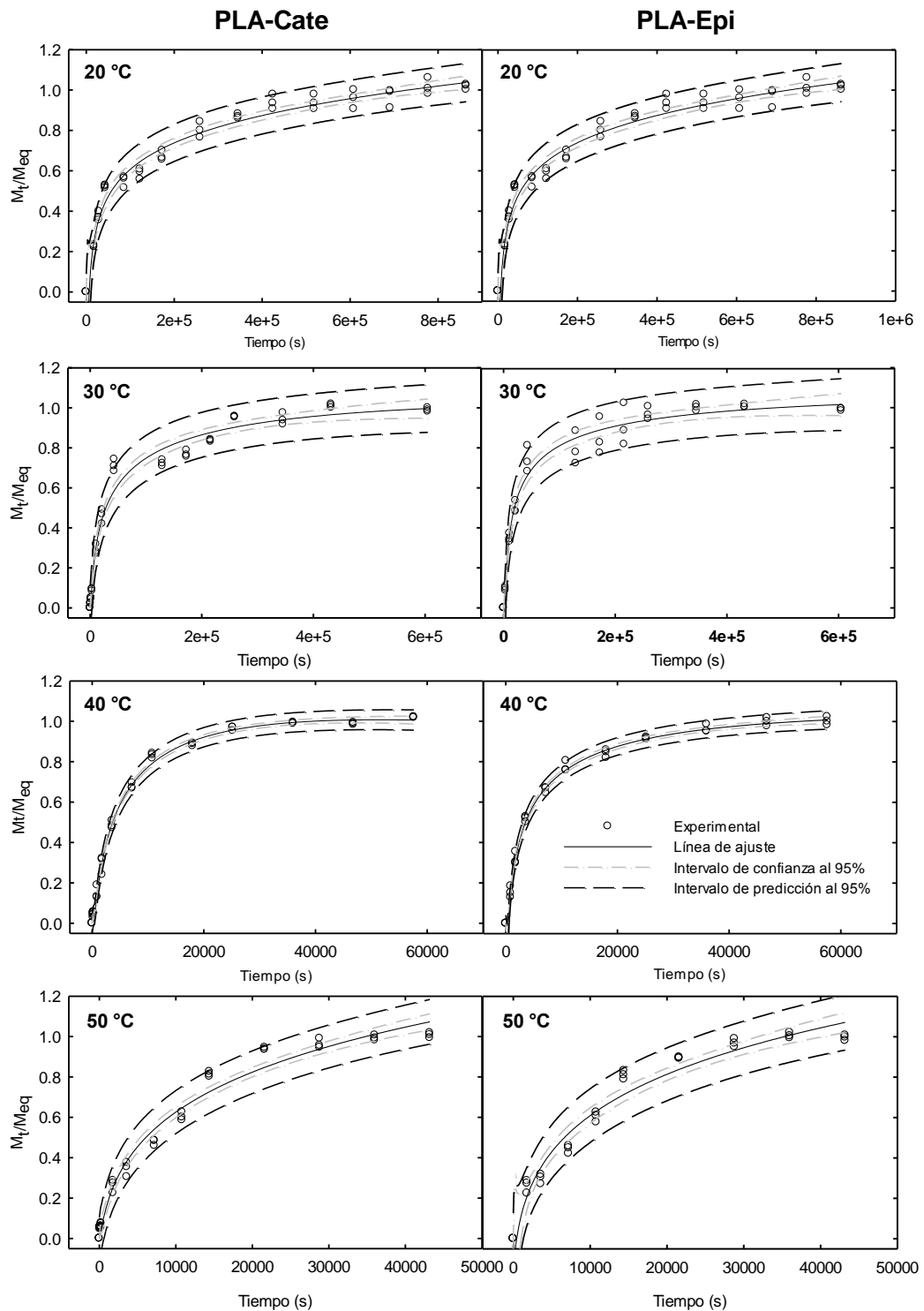


Figura 15. Difusión de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 95 % a 20, 30, 40 y 50 °C de acuerdo a la segunda ley de Fick. El eje “y” muestra la masa difundida de catequina o epicatequina a cierto tiempo t , dividido por la masa de catequina o epicatequina difundida en el equilibrio (M_t/M_{eq}). El eje “x” muestra el tiempo en s. El espesor de las películas fue de 57-77 μm .

Cuadro 4. Coeficientes de difusión (D) de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 95 % a 20, 30, 40 y 50 °C. El espesor de las películas fue de 57-77 μm .

Temperatura (°C)	$D \times 10^{-11}$ (cm ² /s)	
	Catequina	Epicatequina
20	0.49±0.1 ^{a, A}	0.88±0.2 ^{a, B}
30	13.1±4.3 ^{b, A}	13.7±3.5 ^{b, A}
40	47.9±1.8 ^{d, A}	51.2±1.9 ^{d, A}
50	31.5±1.4 ^{c, A}	34.9±2.0 ^{c, B}

Medias con diferente literal en minúscula en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$). Literales en mayúscula en la misma fila para $K_{P,S}$ indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias, $n = 3$.

La velocidad en que catequina y epicatequina se difundieron en etanol al 95 % variaron a ciertas condiciones. A 20 y 50 °C la epicatequina se difundió más rápido que la catequina ($p < 0.05$). No obstante, a 30 y 40 °C el comportamiento para ambos compuestos fue el mismo ($p > 0.05$). Estos comportamientos se podrían deber a las similitudes que estos antioxidantes tienen en su estructura, para que su difusión fuera igual a ciertas temperaturas.

Ortiz-Vazquez *et al.* (2011) reportan valores de D para BHT de películas de PLA en etanol al 95 % de 2.95×10^{-11} , 8.95×10^{-11} y 190.4×10^{-11} cm^2/s a 23, 31 y 43 °C, respectivamente. Estos valores indican que el BHT se difundió con mayor velocidad que catequina y epicatequina, sobre todo a 40 °C, pudiéndose deber a las diferencias de estructuras químicas. El BHT solo presenta un grupo OH, a diferencia de catequina y epicatequina que presentan cinco grupos OH, pudiendo tener más interacciones con el PLA, haciendo que se difundieran con menor velocidad. Por otro lado, al incorporar un antioxidante natural y liposoluble en películas de PLA (Manzanarez-López *et al.*, 2011), se obtuvieron valores de D en etanol puro en el mismo orden de magnitud que los calculados en este estudio.

Soto-Valdez *et al.* (2011) incorporaron resveratrol, el cual es un compuesto fenólico que consta de tres grupos OH en su estructura, donde obtuvieron un valor de D a 40 °C de 85.1×10^{-11} cm^2/s . En este caso el resveratrol se difundió con mayor velocidad que los flavan-3-oles a la misma temperatura, pudiéndose deber a que tuvo menos interacciones con el PLA por el número de grupos OH, además que la difusión se hizo en etanol puro y 3 °C más.

Estudios previos han reportado la incorporación de catequina en matrices como el EVOH. López-de-Dicastillo *et al.* (2010) obtuvieron valores de 7×10^{-11} cm^2/s en etanol al 95 % a 37 °C, mismo valor que el obtenido al incorporar extractos

de té verde en películas de EVOH, donde cuantificaron catequina en etanol al 95 %, llevándose a cabo la difusión a 40 °C (López-de-Dicastillo *et al.*, 2011). Estos valores son inferiores a los reportados para catequina en PLA, donde se difundió con mayor velocidad. Esto podría indicar que el antioxidante puede interaccionar aun más con otro tipo de polímeros como el EVOH. Concluyendo, la estructura, tanto de la matriz polimérica como el del compuesto migrante y la interacción entre ambas, son de gran importancia para la difusión de los compuestos hacia un alimento.

En ausencia de anomalías tales como temperatura de fusión o transición vítrea, la difusión de aditivos a través de la matriz polimérica se describe adecuadamente por la Ecuación de Arrhenius (Ecuación 7). E_a es la energía requerida para que las cadenas del polímero se abran lo suficiente para que las moléculas de los aditivos se muevan a través de ellas (Limm y Hollifield, 1996). La Figura 16 muestra las gráficas de Arrhenius de la difusión de catequina y epicatequina de películas de PLA a 20, 30, 40 y 50 °C. Las gráficas de Arrhenius no fueron perfectamente lineales debido a que los valores de D a 50 °C fueron menores que a 40 °C para ambos antioxidantes. Sin embargo, fue posible determinar la dependencia de la temperatura para la difusión de los antioxidantes. De esta manera, se obtuvieron E_a para catequina y epicatequina de 110.43 y 98.91 kJ/mol, respectivamente.

La E_a para catequina y epicatequina son comparables con estudios realizados con antioxidantes incorporados en películas de PLA. Manzanarez-López *et al.* (2011) reportaron una E_a de 96.2 kJ/mol para la difusión de α -tocoferol. De la misma manera, al incorporar resveratrol en el PLA, éste tuvo una E_a de 176 kJ/mol (Soto-Valdez *et al.*, 2011) y la molécula de BHT de 164.7 kJ/mol (Ortiz-Vazquez *et al.*, 2011). Se requirió de mayor energía para que moléculas como resveratrol y BHT se difundieran a través de las cadenas de PLA que catequina

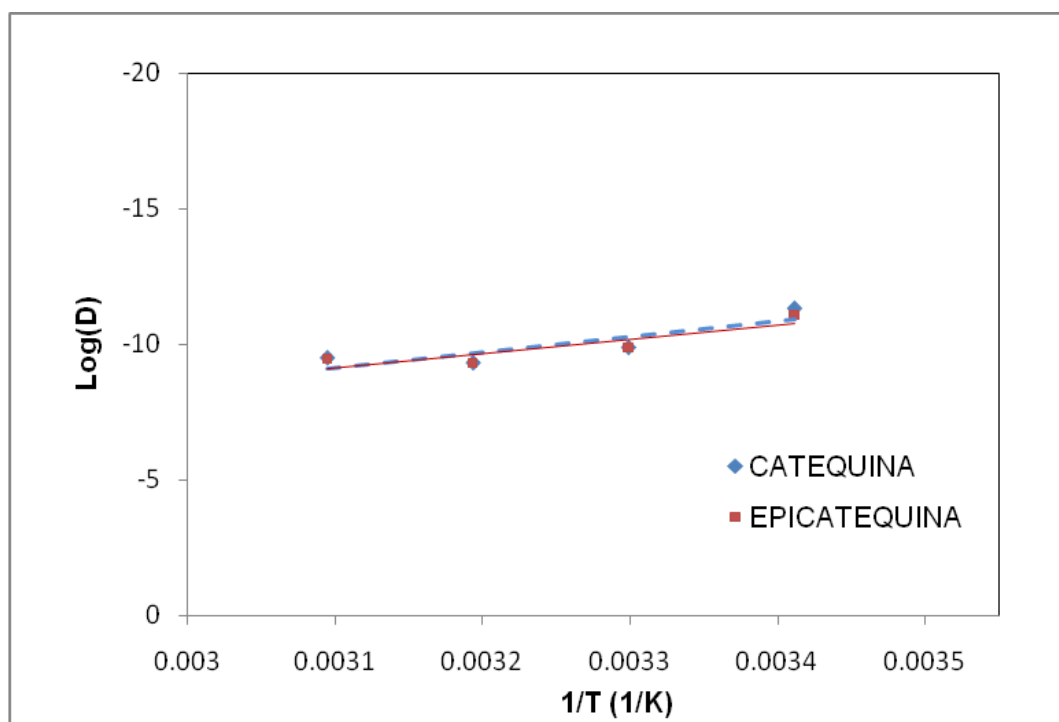


Figura 16. Energía de activación de la difusión de catequina de PLA-Cate ($y = -5767.3x + 8.7366$, $R^2: 0.7597$) y epicatequina de PLA-Epi ($y = -5165.6x + 6.8683$, $R^2: 0.7815$) en etanol al 95 %. La pendiente de cada línea es igual a $Ea/2.303R$, y Ea de la difusión de PLA-Cate y PLA-Epi fue 110.43 y 98.91 kJ/mol, respectivamente.

y epicatequina, siendo similar la E_a para la difusión de α -tocoferol. Por consiguiente, la energía proveniente de la temperatura tiene un efecto en el migrante, la matriz polimérica y en el medio con el que se está en contacto.

Etanol al 50 %

La Figura 17 muestra el comportamiento de la difusión de catequina y epicatequina de las películas de PLA en etanol al 50 % a 40 °C. El sistema llegó al equilibrio a los 2.50 d (60 h) para ambos antioxidantes, siendo 1.96 d (47 h) más que en etanol al 95 % a la misma temperatura. Ambas gráficas muestran una curva típica de Fick.

Los sistemas al llegar al equilibrio, mostraron ciertos porcentajes de liberación de catequina y epicatequina hacia el simulante, así como valores de $K_{P,S}$. La cantidad liberada fue de 73.92 y 61.94 %, y los valores de $K_{P,S}$ fueron de 120.22 y 221.46 (Cuadro 5) para catequina y epicatequina, respectivamente. Debido a que los valores de $K_{P,S}$ fueron $\gg 1$, esto indicó que al llegar al equilibrio el sistema y permanecer así por un tiempo, quedó una concentración alta de los migrantes en el polímero comparado con aquella en el simulante. El valor de $K_{P,S}$ de epicatequina, refleja una mayor concentración que permaneció en la película que catequina ($p < 0.05$), mostrando la misma tendencia que en el sistema anterior. Los valores tanto como porcentaje de liberación de los antioxidantes altos, como los valores cercanos a 1 en los $K_{P,S}$ obtenidos en etanol al 95 %, indican que hubo menor cantidad de antioxidante que migró hacia etanol al 50 %.

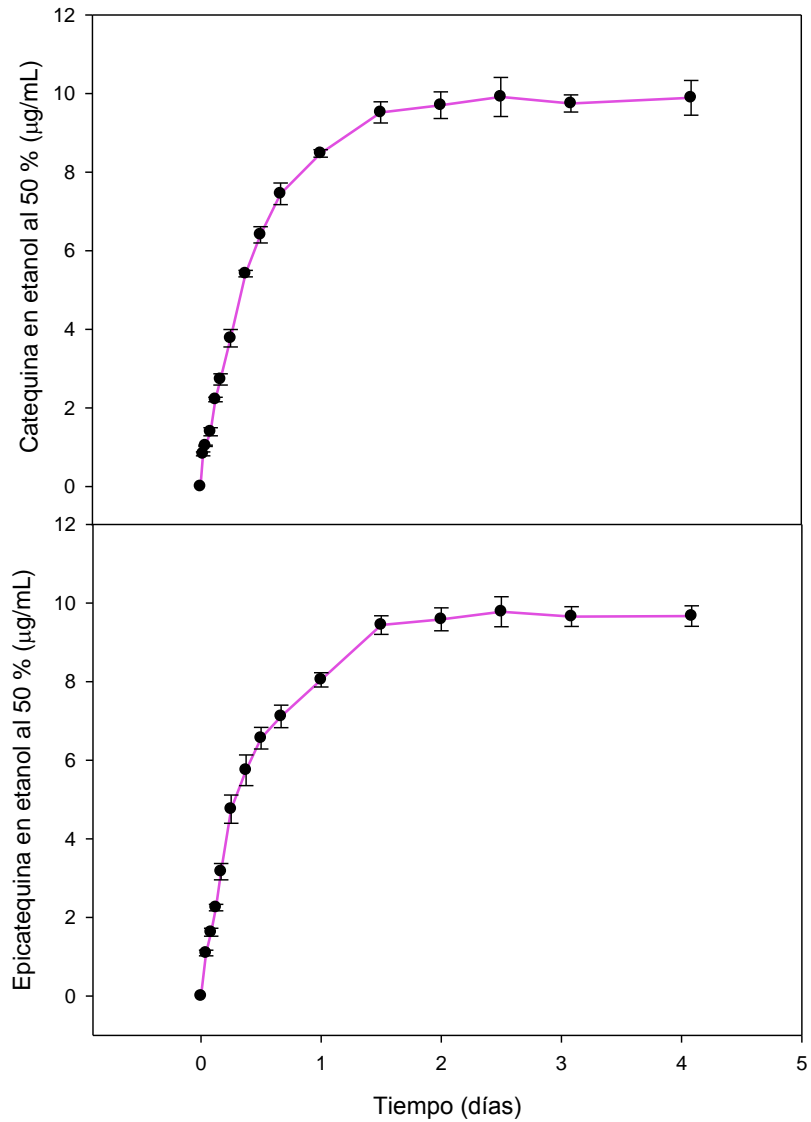


Figura 17. Difusión de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 50 % a 40 °C. Las gráficas muestran la concentración de catequina y epicatequina en etanol al 50 % (µg/mL) contra tiempo (días).

Cuadro 5. Coeficientes de partición ($K_{P,S}$) y difusión (D) de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 50 % a 40 °C. El espesor de las películas fue de 57-77 μm .

Antioxidante	$K_{P,S}$	α	$D \times 10^{-11}$ (cm^2/s)
Catequina	120.22±10.44 ^a	3.97±0.33 ^b	11.18±0.03 ^b
Epicatequina	221.46±10.43 ^b	2.23±0.10 ^a	9.41±0.03 ^a

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$), $n=3$.

Las gráficas de difusión para catequina y epicatequina de acuerdo a la segunda ley de Fick a 40 °C en etanol al 50 %, se muestran en la Figura 18. Los valores de D fueron estimados de acuerdo a la Ecuación 3, debido a los valores altos de $K_{P,S}$ y valores bajos de α (Cuadro 5), mostrando que el sistema fue infinito, es decir, solo parte de los antioxidantes se difundieron al simulante. La velocidad de difusión de catequina entre las cadenas del PLA fue mayor que epicatequina ($p < 0.05$). Por otro lado, la difusión se llevó a cabo a menor velocidad que en etanol al 95 % a 40 °C, debido a que D disminuyó en un orden de magnitud en etanol al 50 % para los dos antioxidantes. Esta disminución en los valores D como la concentración baja de los antioxidantes en etanol al 50 % que en 95 %, se ve influenciada por la composición del simulante. Entre mayor sea la proporción de etanol en el simulante, mayor será la cantidad de antioxidante que migre y mayor la velocidad de difusión. Además, el etanol con su capacidad penetrante y extractiva es lo que pudo haber influido en la migración.

Aceite

Las películas de PLA con catequina y con epicatequina fueron expuestas en aceite de soya a 40 °C durante 60 días, donde ambos flavonoides no se detectaron a un LOQ de 0.5 µg/mL, es decir, no hubo migración.

Para que haya migración, existen factores importantes que la controlan, siendo uno de ellos la compatibilidad del antioxidante incorporado en la matriz polimérica y de su solubilidad en el medio migrante. Si el antioxidante es no compatible con el material de envase entonces éste se moverá entre los espacios de las cadenas del polímero hacia la superficie. Una vez que éste haya llegado a la superficie, la naturaleza del medio que está en contacto con el

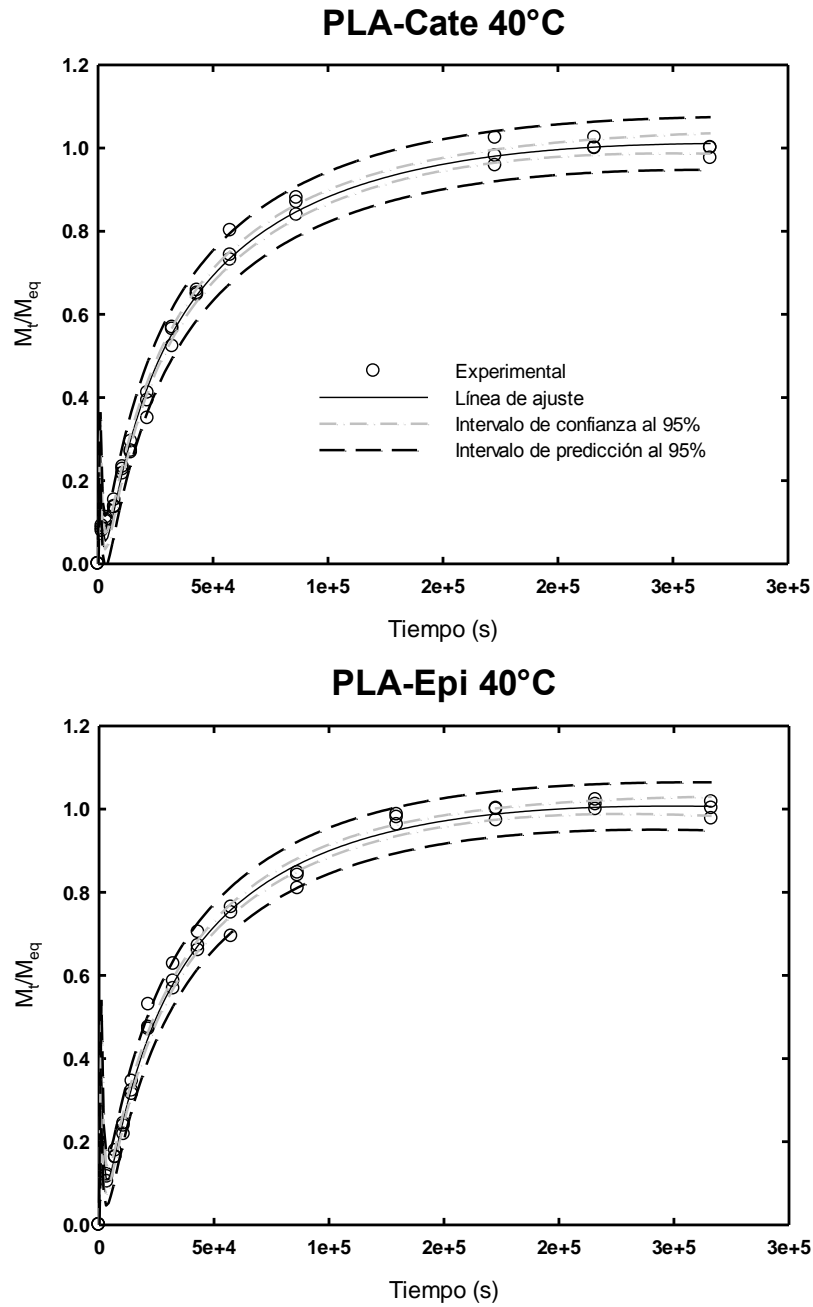


Figura 18. Difusión de catequina y epicatequina de películas de PLA en etanol al 50 % a 40 °C de acuerdo a la segunda ley de Fick. El eje “y” muestra la masa difundida de catequina o epicatequina a cierto tiempo t , dividido por la masa de catequina o epicatequina difundida en el equilibrio (M_t/M_{eq}). El eje “x” muestra el tiempo en s. El espesor de las películas fue de 57-77 μm .

polímero, determinará la solubilidad del compuesto incorporado en la matriz polimérica. Para una migración en un medio graso, la naturaleza del compuesto más propenso a migrar sería no polar o lipofílico (Castle, 2007). En este caso, la catequina y epicatequina son compuestos polares, por lo que al estar la película en contacto con un medio graso, que es el aceite de soya, éstos pudieron haberse difundido, pero al no existir la solubilidad ni afinidad requerida en el aceite, no fue posible cuantificarlas.

Manzanarez-López, *et al.* (2011) realizaron un estudio de difusión con películas de PLA y α -tocoferol en aceite fraccionado de coco, donde se observó la difusión a 43, 33 y 23 °C. Al ser α -tocoferol un antioxidante lipofílico y no polar, su solubilidad en el aceite promovió su difusión. Por eso, la compatibilidad entre los antioxidantes incorporados en la matriz polimérica y el medio en contacto, es un factor importante para la difusión de los mismos.

El aceite de soya está constituido por un contenido alto de ácidos grasos insaturados (84 %), principalmente ácido linoléico (Güner *et al.*, 2006), el cual es una molécula de 18 carbonos. Debido al tamaño de las moléculas que constituyen al aceite de soya, éste pudo no haber penetrado entre los espacios de las cadenas del PLA. Estudios donde el PLA ha estado en contacto con aceite de oliva, han demostrado la escasa difusión que tiene éste en el polímero (Plackett *et al.*, 2006), dificultando el acceso del aceite. Por consiguiente, el uso de aceite como medio simulante haría ideal a este sistema por no cambiar las propiedades del propio envase provocando por ejemplo un hinchamiento.

Legislaciones establecidas por la FDA, indican que etanol al 95 % es un simulante de alimento graso (FDA, 2007) para matrices poliméricas de poliolefinas. Utilizar etanol al 95 % para estudios de migración de antioxidantes en una matriz polimérica de PLA se obtienen coeficientes de difusión a

diferentes temperaturas. Sin embargo, emplear aceite de soya como un sistema totalmente lipídico en contacto con películas de PLA, los antioxidantes no se difunden. Por lo tanto, etanol al 95 % no es un buen simulante de alimento graso utilizando como matriz polimérica PLA.

Agua

Las películas de PLA con catequina y con epicatequina fueron expuestas para su migración a 40 °C, los cuales no presentaron migración durante 20 días. La capacidad que tiene catequina para formar interacciones con poliésteres, le ha dado aplicación como en la elaboración de polímeros biodegradables. En estos sistemas, las moléculas de catequina son capaces de formar dos tipos de asociación con el PLA. Una de ellas es la asociación a través de la interacción de los puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo. La segunda interacción es la asociación intermolecular a través de los puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la catequina con los grupos carbonilos del poliéster (Zhu *et al.*, 2004). Al estar en contacto las películas con el agua, las interacciones formadas entre el PLA y los flavan-3-oles en estudio fueron más fuertes y la polaridad del agua no pudo solvatar dichos antioxidantes.

Los flavonoides se caracterizan por ser anfipáticos, caracterizándose por tener una parte polar y no polar en su molécula, permitiendo interaccionar con la fase acuosa y también en la interfase orgánica de las membranas (Mendoza-Wilson, 2006). Catequina y epicatequina al estar formadas estructuralmente por anillos bencénicos, que son hidrocarburos aromáticos constituidos por carbono e hidrógeno y tener electronegatividades parecidas, es lo que le da a las moléculas su carácter no polar. Sin embargo, al tener OH como grupos sustituyentes, le da el carácter polar, debido a la diferencia de electronegatividades del oxígeno e hidrógeno (Brown *et al.*, 2004). Los

flavonoides tienden a ser parcialmente solubles en agua (altamente polar) y más solubles en solventes orgánicos (menos polares), donde estudios de extracciones de compuestos fenólicos en frutas, como la catequina y epicatequina, tienen una mejor extracción en metanol y etanol que en agua (van der Sluis *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2011).

López-de-Dicastillo *et al.* (2011) elaboraron películas de EVOH con extractos de té verde, donde observaron que catequina no migró en agua, pero sí en etanol al 95 %. Este comportamiento, al igual que catequina y epicatequina en películas diferentes de PLA, se puede deber a que ambas moléculas son ligeramente solubles en agua y altamente solubles en etanol y por las interacciones antioxidante-polímero. Además, la compatibilidad baja con el agua redujo la liberación de los antioxidantes. La liberación de estos antioxidantes fue más evidente en etanol al 95 % debido a su polaridad y solubilidad mayor en este disolvente. Posiblemente, estos compuestos fueron inmovilizados en la matriz del PLA con ayuda de las interacciones formadas, no dejándolos disponibles para el proceso de difusión.

Emulsión

Los antioxidantes no presentaron difusión durante 30 días a 40 °C en emulsión. El emulsionante utilizado fue Tween 65, el cual es no iónico, esto es que se adsorbe en la superficie de las gotas de aceite con la parte más polar orientada hacia la fase acuosa, formándose una capa hidratada alrededor que ayuda a la estabilización de las gotas (Velasco *et al.*, 2002). La presencia de la interfase puede actuar como una barrera a la penetración o difusión de especies moleculares (Velasco *et al.*, 2002). Las distintas moléculas presentes en una emulsión se distribuyen de acuerdo a su polaridad y actividad tensioactiva entre

las fases oleosa, acuosa y región interfacial que rodea a las gotas (Frankel *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1997; Velasco *et al.*, 2002). Estudios han probado que la molécula de catequina en emulsiones, es capaz de acumularse en la interfase agua-aire, disminuyendo la tensión superficial cuando aumenta su concentración (Mattia *et al.*, 2010). Al realizar los estudios de migración de catequina y epicatequina se esperaba que estuvieran presentes en la interfase agua-aire, sin embargo no hubo difusión de ellas.

El emulsionante no promovió la difusión en el PLA, pudiendo formar una interacción como puentes de hidrógeno con el oxígeno de la cadena de polioxietileno, con los grupos hidroxil de los antioxidantes.

Agua-Aceite

Las películas de PLA con los antioxidantes fueron expuestas a 40 °C, los cuales no presentaron migración durante 30 días. Huang *et al.* (1997) estudiaron mezclas aceite-agua donde se agregaron antioxidantes, siendo uno de ellos la catequina, donde se observó su distribución en la fase acuosa. Durante el proceso de migración, la catequina y epicatequina pudieron haberse distribuido en la fase acuosa, pero como se explicó anteriormente en los dos sistemas estudiados por separado, estas pudieron ser las causas por las cuales no se pudieron difundir entre las cadenas del PLA.

En general, al ser compatibles catequina y epicatequina con el PLA, hay interacciones presente y una resistencia intrínseca a la transferencia de masa. Por lo tanto, para que haya difusión se requiere cambiar la estructura o polaridad de la matriz polimérica para que haya menos interacciones con los antioxidantes.

Efecto del Procesamiento y la Difusión en el Peso Promedio del Peso Molecular del PLA

El P_M del PLA se puede ver afectado debido a las temperaturas altas que se manejan durante su procesamiento. El P_M de la resina de PLA después de haber pasado por la molienda y el doble procesamiento para la obtención de los pellets testigo no se vio afectado ($p>0.05$), siendo para la resina 109.6 ± 3.03 kDa, 115.0 ± 0.90 kDa para el PLA molido y 110.0 ± 1.12 kDa para los pellets testigo (Cuadro 6). El doble procesamiento de los pellets de PLA no afectó al P_M del polímero.

El efecto del procesamiento en el P_M de los pellets para la obtención de las películas de PLA se muestra en el Cuadro 7. El P_M de la película testigo fue más bajo que la de los pellets testigo ($p<0.05$), esto es que al darle un tercer procesamiento al PLA los enlaces éster se degradaron. Por otro lado, al incorporar epicatequina a los pellets de PLA y exponer el material a un tercer tratamiento térmico, el P_M no se vio afectado ($p>0.05$). Estudios realizados por Ortiz-Vazquez *et al.* (2011), obtuvieron que al incorporar BHT en películas de PLA, el P_M tampoco mostró una disminución. El comportamiento de la epicatequina se puede deber a que protegió las cadenas del polímero de su degradación. Sin embargo, al obtener las películas de PLA con catequina, este flavonoide no tuvo ese mismo efecto, ya que el PLA tuvo una pérdida en su P_M de 106.8 a 96.9 kDa ($p<0.05$). Esto se le puede atribuir al procesamiento, ya que el material permaneció dentro del barril aprox. 2 min más por problemas en el equipo, lo que hizo que el PLA estuviera expuesto por más tiempo a temperaturas elevadas. Por lo tanto, el P_M no se vio afectado durante el proceso de pelletización con y sin antioxidantes.

Cuadro 6. Efecto de la molienda y procesamiento sobre el P_M del PLA.

Pellets	P_M (kDa)
Resina	109.6±3.03 ^a
Molido	115.0±0.90 ^a
Testigo	110.0±1.12 ^a

Medias con diferente literal indican diferencias ($p < 0.05$), $n=3$.

Cuadro 7. Efecto del procesamiento sobre el P_M de los pellets y películas de PLA incorporando catequina y epicatequina.

Material	P_M (kDa)		
	PLA-Testigo	PLA-Cate	PLA-Epi
Pellets	110.0±1.12 ^c	106.8±3.77 ^{bc}	110.1±0.83 ^c
Película	103.4±0.83 ^b	96.9±0.72 ^a	105.8±0.58 ^{bc}

Medias con diferente literal dentro de hileras o columnas indican diferencia ($p < 0.05$), $n=3$.

El Cuadro 8 muestra el efecto de las condiciones de difusión para cada una de las películas de PLA con catequina y epicatequina sobre el P_M del PLA. Como ya se había descrito anteriormente, en la película de PLA-Cate el P_M de 96.9 kDa no se vio afectado cuando estuvo en contacto con el sistema etanol al 95 % ($p>0.05$), por lo que no se vio afectado ni por la temperatura ni por el tiempo en el que estuvo expuesta la película para llevarse a cabo la difusión. Sin embargo, el P_M para la película PLA-Epi después de la difusión a 30 °C en etanol al 95 %, disminuyó de 105.8 a 101.9 kDa ($p<0.05$), permaneciendo igual a las otras temperaturas de difusión para este sistema ($p>0.05$). A 20 °C la película estuvo por 240 h, que es mayor el tiempo en el que estuvieron las películas de PLA-Epi a 30 °C, influyendo de esta manera la temperatura de difusión. Por otro lado, a 40 y 50 °C el P_M no sufrió cambios ($p>0.05$), debido a que los tiempos en que llegaron al equilibrio los sistemas fueron más cortos. Por lo cual, la temperatura y el tiempo de exposición de las películas en etanol al 95 %, pueden afectar el P_M del PLA.

El efecto en el P_M de las películas de PLA al utilizar etanol al 50 % y agua, se muestran en el Cuadro 8. Para PLA-Cate y PLA-Epi, el P_M disminuyó al utilizar etanol al 50 % ($p<0.05$), debido a que el agua favoreció la hidrólisis de las cadenas. En el sistema 100 % agua la hidrólisis se hace más evidente, permaneciendo del P_M original de las películas de PLA-Cate y PLA-Epi, el 74.12 y 75.33 %, respectivamente. Manzanarez-López *et al.* (2011) concluyeron que los niveles de hidrólisis del PLA en contacto con etanol pudieron estar relacionados con los niveles de migración de α -tocoferol. Sin embargo, PLA con catequina y epicatequina, debido a que el sistema que presentó mayor hidrólisis fue 100 % agua, no presentó migración de los antioxidantes, pudiendo permanecer atrapados interaccionando entre las cadenas del polímero. Por lo tanto, la presencia de agua favorece la hidrólisis de los enlaces éster de las del PLA, afectando su P_M , más no las interacciones de los antioxidantes con él.

Cuadro 8. Efecto de las condiciones de difusión en el P_M de las películas de PLA con catequina y PLA con epicatequina.

Migración	T (°C)	Tiempo (h)	P_M (kDa)	
			PLA-Cate	PLA-Epi
Película			96.9±0.72 ^c	105.8±0.58 ^d
95 % etanol	20	240	96.4±0.12 ^c	102.9±0.77 ^{cd}
95 % etanol	30	168	94.8±0.96 ^c	101.9±0.83 ^c
95 % etanol	40	24	96.7±0.92 ^c	102.1±0.38 ^{cd}
95 % etanol	50	14	97.9±3.20 ^c	103±0.80 ^{cd}
50 % etanol	40	98	88.5±2.84 ^b	93.8±0.62 ^b
100 % Agua	40	480	71.3±2.69 ^a	79.7±2.14 ^a

Medias con diferente literal en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$), $n=3$.

Efecto del Procesamiento y Difusión en la Actividad Antioxidante de Catequina y Epicatequina

En la obtención de las películas de PLA incorporadas con catequina y epicatequina por separado, los antioxidantes estuvieron sometidos a tres procesamientos a temperaturas altas. Por lo cual, fue necesario conocer si cada uno de los compuestos perdió actividad antioxidante.

El EC₅₀, es decir la concentración requerida de antioxidante para inhibir el 50 % del radical DPPH, de los estándares de catequina y de epicatequina utilizados en el presente estudio fueron 159.17±3.53 y 111.20±3.11 µg/mL, respectivamente. Por otro lado, se han reportado valores menores de EC₅₀ para catequina de 1.74 y 1.94 µg/mL y para epicatequina de 1.30 y 1.97 µg/mL (Villaño *et al.*, 2007; Iacopini *et al.*, 2008). Sin embargo, para fines de este estudio, el objetivo no fue resaltar estas diferencias, sino el efecto del procesamiento de las películas del PLA en la actividad antioxidante de catequina y epicatequina.

La Figura 19 muestra el porcentaje de inhibición del radical DPPH para catequina y epicatequina antes y después de la elaboración de las películas de PLA. Catequina con una concentración de 46.42 µg/mL tuvo el 32.90±0.85 % inhibición. Una vez procesada la película, la actividad antioxidante no se vio afectada ($p > 0.05$) con 35.30±2.85 % inhibición. Por otro lado, epicatequina alcanzó el 36.68±1.14 % inhibición con una concentración de 57.52 µg/mL, pero una vez procesada la película, el % inhibición a la misma concentración aumentó ($p < 0.05$), alcanzando el 49.54±1.20 %. Al ver el efecto del aumento en la actividad antioxidante, se consideró que el PLA estuviera aportando esa actividad. Después de que la película de PLA-Testigo estuvo expuesta a las mismas condiciones de extracción, se obtuvo un 5.60±0.59 % inhibición de

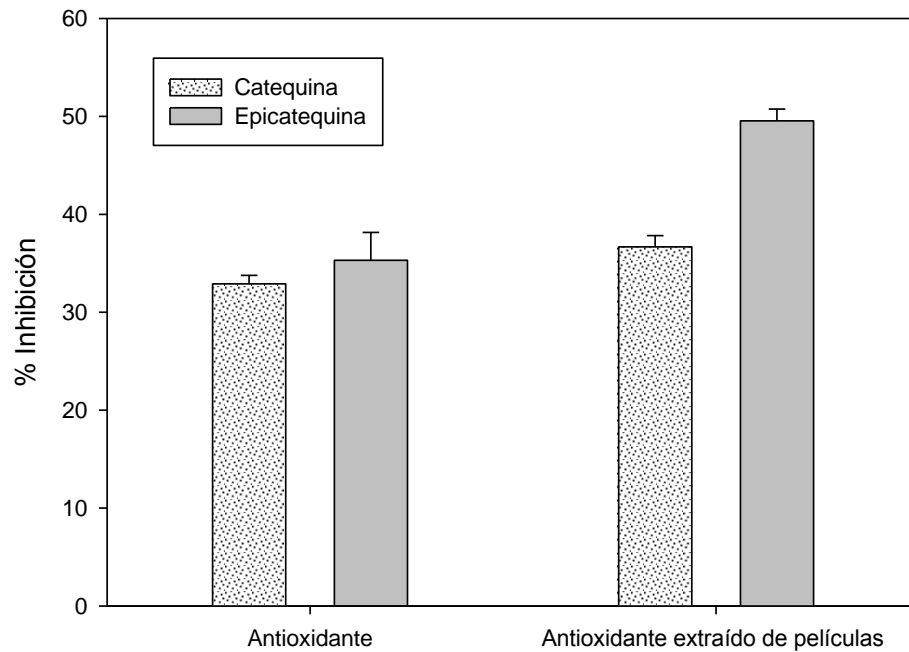


Figura 19. Inhibición del radical DPPH (%) en presencia de catequina (46.42 $\mu\text{g/mL}$) y epicatequina (57.52 $\mu\text{g/mL}$) antes y después de ser incorporados en películas de PLA. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS.

radical DPPH, justificando el aumento en la actividad antioxidante de los compuestos. Debido a que los polímeros rara vez son procesados puros, la resina de PLA pudo contener aditivos como antioxidantes que pudieron haber contribuido al aumento en el % inhibición. Por lo tanto, catequina y epicatequina no perdieron su actividad antioxidante durante el procesamiento para la obtención de películas de PLA.

Estudios realizados por López-de-Dicastillo *et al.* (2010) en películas de EVOH con catequina a dos concentraciones (0.5 y 2 %) midieron la actividad antioxidante por el método de DPPH, expresando sus resultados como equivalentes de ácido ascórbico. Encontraron que después del procesamiento la actividad antioxidante de ambas películas disminuyó alrededor de un 30 %. De la misma manera, López-de-Dicastillo *et al.* (2011) al incorporar extracto de té verde en películas de EVOH, observaron una disminución en la actividad antioxidante del extracto de un 20 %. La pérdida de actividad antioxidante pudo haberse debido a las condiciones y temperatura de procesamiento llegando a temperaturas de 200 °C. La actividad antioxidante de catequina y epicatequina en las películas de PLA no se vieron afectadas, pudiéndose deber a que la temperaturas de procesamiento no alcanzaron los 200 °C, sino que fueron más bajas (160 °C).

Para probar la actividad antioxidante de las películas, éstas fueron evaluadas indirectamente en el antioxidante difundido a etanol al 95 % como simulante de alimento graso a diferentes temperaturas. Dichos resultados se muestran en la Figura 20 como porcentaje de inhibición del radical DPPH. Como era de esperarse, la actividad antioxidante fue proporcional a la temperatura de difusión de 20 a 40 °C ($p < 0.05$). Sin embargo, en ambas películas a 40 y 50 °C el porcentaje de inhibición no aumentó ($p > 0.05$) de acuerdo a la temperatura. Conforme aumentaba la temperatura mayor cantidad de antioxidante migraba al

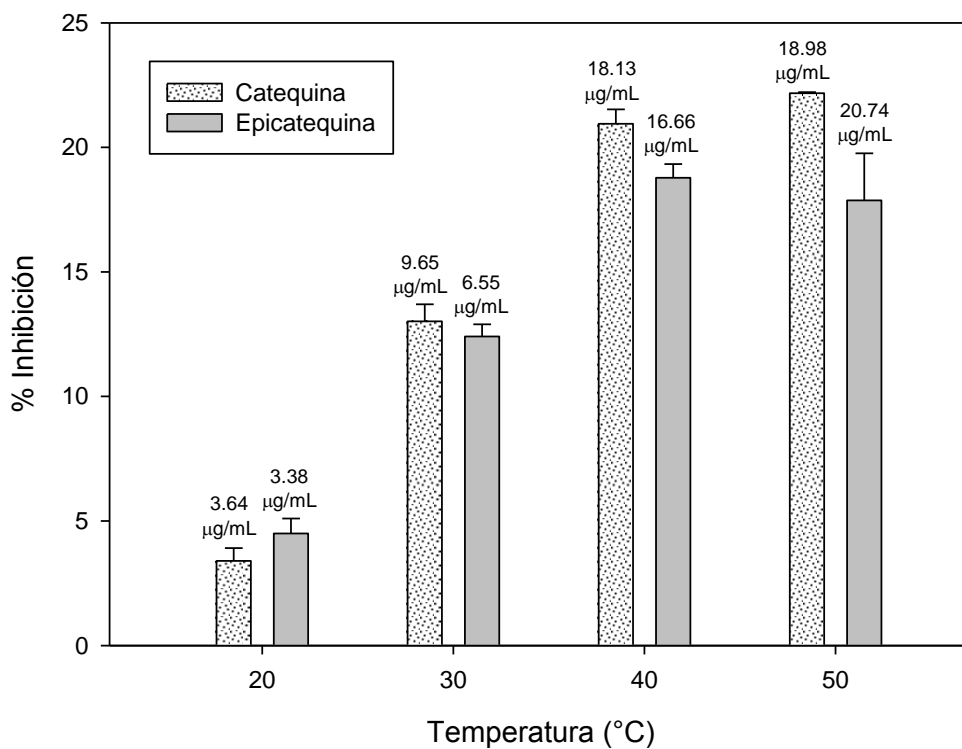


Figura 20. Inhibición del radical DPPH (%) en presencia de catequina y epicatequina después de su difusión en etanol al 95 %. Las concentraciones sobre las barras corresponden a la concentración de antioxidante en etanol al 95 % cuando llegó el sistema al equilibrio. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS.

simulante, donde hubo una correlación entre concentración de antioxidante y porcentaje de inhibición.

La correlación entre concentración de antioxidante y porcentaje de inhibición fue positiva para catequina ($r=0.9918$) y para epicatequina ($r=0.9056$). La correlación para epicatequina fue menor, debido a que a pesar de tener una concentración mayor de antioxidante en el simulante a 50 °C, el porcentaje de inhibición fue menor que a 40 °C, aunque no hubo diferencias ($p>0.05$). Por lo tanto, entre mayor fue la temperatura de exposición de las películas, mayor fue la actividad antioxidante, debido a la concentración que migró de catequina y epicatequina.

En trabajos donde se realizó difusión de antioxidantes hacia simulantes de alimentos (López-de-Dicastillo *et al.*, 2010; López-de-Dicastillo *et al.*, 2011) la actividad antioxidante fue proporcional a la concentración de los compuestos en el medio. Se ha visto el mismo comportamiento en extractos de frutos como la uva y sus diferentes variedades, donde conforme aumentaba el contenido de compuestos fenólicos en el fruto, la actividad antioxidante era proporcional (Frankel y Meyer, 1998; Kedage *et al.*, 2007).

Las películas fabricadas, retuvieron el 62.19 ± 2.22 % de catequina y el 70.32 ± 2.27 % de epicatequina agregadas inicialmente a la resina de PLA. De la catequina y epicatequina retenidas, su actividad antioxidante no se vio influida por las condiciones de almacenamiento o manejo de las películas, donde la propia matriz polimérica pudo haber otorgado una ligera actividad antioxidante. Estas características le brindarían a las películas un valor agregado, indicando el potencial para su uso como envases activos antioxidantes.

Ensayo de estabilidad oxidativa

La Figura 21 muestra el resultado de IP en el aceite de soya almacenado por 15 días a 30 °C en presencia de luz, cuando se le adicionó de manera directa catequina, epicatequina y BHT a la misma concentración de 250 mg/kg (0.025 %). Los valores de IP presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el aceite testigo y con cada uno de los antioxidantes. Los valores de IP para el aceite testigo se encontraron entre 0.93 ± 0.23 meq/kg al día 0 y 67.15 ± 0.59 meq/kg al día 15. Los valores alcanzados en el día 15 para el aceite con catequina, epicatequina y BHT fueron de 26.19 ± 0.41 , 26.76 ± 0.42 y 26.94 ± 1.46 meq/kg, respectivamente. El comportamiento para cada uno de los tratamientos indica que el desarrollo de la oxidación del aceite estuvo en el período de inducción, sin haber una disminución del IP.

El período de inducción es un parámetro importante, dado que su extensión es una medida de la estabilidad oxidativa de los aceites, reflejando su capacidad para resistir su oxidación (Rauen-Miguel *et al.*, 1992). La adición de antioxidantes en el aceite de soya ayudó a la estabilidad oxidativa, viéndose reflejado en la producción de peróxidos, resistiéndose a la pronta aparición de olores rancios comparado con el aceite testigo. Al adicionar un antioxidante sintético liposoluble como el BHT éste tuvo el mismo valor de IP, protegiendo de igual manera que catequina y epicatequina. Por lo tanto, el uso de antioxidantes naturales, podrían reemplazar a aquellos sintéticos para mantener la estabilidad oxidativa del aceite.

La estabilidad oxidativa del aceite de soya al estar expuesto a la luz y en contacto con películas de PLA a 30 °C, se muestra en la misma Figura 21. El aceite en contacto con PLA-Testigo presentó el mismo comportamiento que el aceite en contacto con las películas con antioxidantes (PLA-Cate y PLA-Epi)

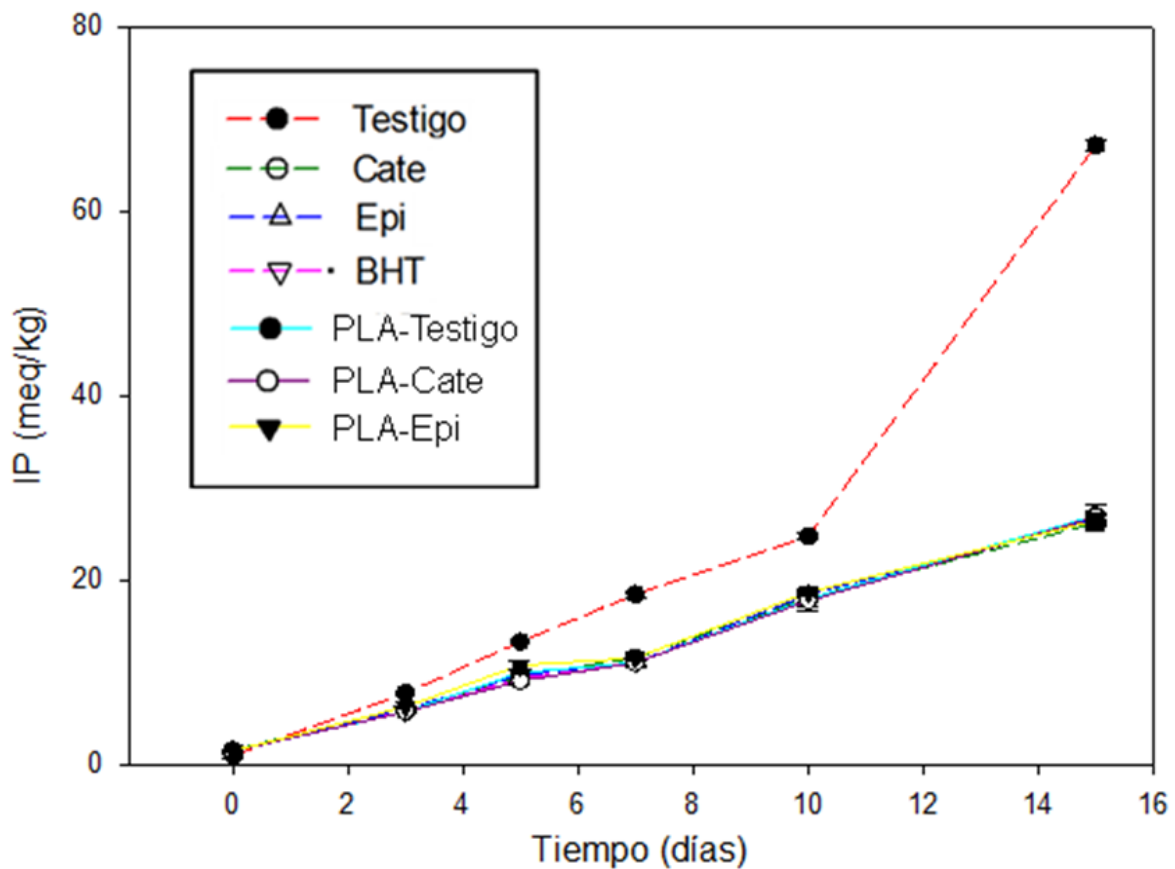


Figura 21. Índice de peróxidos en aceite de soja sin antioxidante (Testigo), adición directa de catequina (0.025 %), epicatequina (0.025 %) y BHT (0.025 %); aceite de soja en contacto con PLA-Testigo, PLA-Cate y PLA-Epi, almacenados a 30 °C. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones±DS.

teniendo un valor alrededor de IP en el día 15 de 26.87 ± 0.28 meq/kg. Al no haber diferencias significativas en los tres tratamientos ($p > 0.05$), se comprueba la no migración de catequina y epicatequina en el estudio de difusión en aceite de soya, quedando atrapadas e interaccionando con las cadenas del PLA.

En lo que respecta al IP en el aceite testigo y PLA-Testigo se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), protegiendo la película de PLA al aceite de la oxidación con un IP de 27.11 ± 0.52 meq/kg a los 15 días. Manzanarez-López *et al* (2011) en su ensayo de estabilidad oxidativa de aceite de soya con películas de PLA con α -tocoferol a 30 °C, obtuvieron un IP de 27.48 meq/kg a los 15 días utilizando película testigo, valor que coincide con el presente estudio. Detectar actividad antioxidante en las películas testigo, fue un hallazgo inesperado y pudo lograrse porque en el experimento se incluyó un tratamiento de aceite testigo. Buscando una explicación, se pueden mencionar dos opciones: que el PLA tenga actividad antioxidante o que la resina comercial contenga antioxidantes. La segunda opción es la más probable porque por lo general, los polímeros rara vez son procesados puros, por lo que la resina de PLA pudo contener aditivos que migraron al aceite retardando su oxidación (Lim *et al.*, 2010). En futuros experimentos habrá que buscar la razón de este comportamiento.

La adición directa de catequina y epicatequina comprueba el efecto en la estabilidad oxidativa del aceite. Al no haber migrado al aceite de soya y estar interaccionando con las cadenas del PLA, estos compuestos no actuaron como antioxidantes. Por lo tanto, si éstos hubieran migrado y con el efecto protector del PLA, pudieron haber disminuido aun más la formación de peróxidos.

Existen aditivos que pueden ser incorporados en la matriz del polímero, los cuales cambian la estructura del polímero, así como su facilidad para ser

procesados. Mascheroni *et al.* (2010) en su estudio de la difusión de componentes del propoleo de películas de PLA, incorporó aditivos para incrementar la velocidad de migración de los compuestos. Utilizó una mezcla de bentonita de calcio para abrir las cadenas del PLA y polietilenglicol como plastificante. De esta manera, es necesario cambiar la estructura o polaridad del PLA para disminuir las interacciones presentes entre las moléculas de catequina y/o epicatequina con las cadenas del polímero, para que se puedan difundir y retardar la oxidación en alimentos.

CONCLUSIONES

- Se estableció el proceso de fabricación de películas de PLA con catequina y epicatequina por medio de extrusión utilizando un dado para película plana.
- La transmisión de luz UV y la T_m de las películas de PLA se vieron disminuidas por efecto de la adición de catequina y epicatequina.
- La difusión de catequina y epicatequina en etanol al 95 % y 50 % mostraron un comportamiento Fickiano. Estos antioxidantes no migraron desde las películas de PLA hacia aceite, agua, emulsión y mezcla aceite-agua, donde las interacciones entre estas moléculas y el polímero impidieron su difusión. Por lo tanto, etanol al 95 % no es un buen simulante de alimento graso para envases de PLA.
- Catequina y epicatequina incorporadas en las películas de PLA no tuvieron un efecto en la estabilidad oxidativa de aceite de soya, debido a que no presentaron migración en aceite.

RECOMENDACIONES

- Implementar cambios que modifiquen la polaridad de la matriz polimérica para disminuir las interacciones de catequina y epicatequina con el PLA, para que de esta manera éstos puedan migrar hacia alimentos grasos.
- Incrementar la concentración de estos flavonoides en las películas de PLA para fomentar la migración.
- Estudiar la influencia del PLA en la estabilidad oxidativa del aceite de soya y la posible actividad antioxidante que pueda otorgar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 97/48/CEE. (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. Unión Europea. Diario Oficial de la Unión Europea n° L 22 de 12.8.97.
- AOCS (2009). Peroxide Value Acetic Acid-Isooctane Method. Method Cd 8b-90. Sampling and Analysis of commercial fats and oils. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. Firestone D. Vol. 1, 6a Ed, Champaign, IL: AOCS Press.
- ASTM. (2006). Annual Book of American Society for Testing and Materials Standards. Consadhocken. PA. USA. pp. 630-634.
- Auras R, Harte B y Selke S. (2004). An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 4(9): 835-864
- Badui S. (2006). Química de los alimentos. México, Pearson. 4 Ed. pp. 245-300.
- Balasundram N, Sundram K y Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99(1): 191-203
- Barreiro JA y Sandoval AJ. (2002). Operaciones de conservación de los alimentos por bajas temperaturas. Caracas, Editorial Equinoccio. pp. 234.
- Block C, Wynants L, Kelchtermans M, De Boer R y Compennolle F. (2006). Identification of polymer additives by liquid chromatography-mass spectrometry. *Polymer Degradation and Stability*. 91(12): 3163-3173
- Bocco A, Cuvelier ME, Richard H y Berset C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 2123-2129
- Brand-Williams W, Cuvelier M y Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 28(1): 25-30
- Brown TL, LeMay HE, Bursten BE y Burdge JR. (2004). Química: La Ciencia Central. Edo. de México, Pearson Educación. Novena Ed. pp. 274-313.
- Carpenter R, O'Grady MN, O'Callaghan YC, O'Brien NM y Kerry JP. (2007). Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork. *Meat Science*. 76(4): 604-610
- Castle L (2007). Chemical migration into food: an overview. Chemical migration and food contact materials. Barnes KA, Sinclair CR y Watson DH. Cambridge, Woodhead publishing limited pp. 1-13.
- Catalá R y Gavara R (2002). Fundamentos y mecanismos de la migración. Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos. Catalá R y Gavara R. Valencia, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. pp. 1-17.

- Coates J. (2000). Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester, John Wiley & Sons. pp. 10815-10837.
- Crank J. (1975). The Mathematics of Diffusion, segunda ed. Oxford Science Publications, Oxford. pp. 203-253.
- Chen YC, Lin JT, Liu SC, Lu PS y Yang DJ. (2011). Composition of flavonoids and phenolic acids in Lychee (*Litchi Chinensis* Sonn.) flower extracts and their antioxidant capacities estimated with human LDL, erythrocyte, and blood models. *Journal of Food Science*. 76(5): 724-728
- Chen Z, Wang L, Chan PT, Zhang Z, Chung HY y Liang C. (1998). Antioxidant activity of green tea catechin extract compared with that of rosemary extract. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 75(9): 1141-1145
- Choe E y Min DB. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5(4): 169-186
- Deaton CM y Marlin DJ. (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 2(3): 278-291
- Decker EA. (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science & Technology*. 9(6): 241-248
- Derrick MR, Stulik D y Landry JM. (1999). Infrared spectroscopy in conservation science. Los Angeles, The Getty Conservation Institute. pp. 4-15.
- Domínguez-Espinosa RM, Wang R y Pacho-Carrillo JD. (2002). Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. *Tecnología Ciencia Ed.(IMIQ)* 17 (2): 77-83
- Escamilla CI, Cuevas EY y Guevara J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Facultad de Medicina UNAM*. 52(2): 73-75
- FDA. (2007). Guidance for Industry: Preparation of Premarket Submissions for Food Contact Substances: Chemistry Recommendations. Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodIngredientsandPackaging/ucm081818.htm#iid1c>. Consultado en Marzo, 2011.
- Fernandez MT, Mira ML, Florencio MH y Jennings KR. (2002). Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 92: 105-111
- Frankel EN, Huang S y Aeschbach R. (1997). Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 74(10): 1309-1315
- Frankel EN, Huang S, Kanner J y German JB. (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 1054-1059
- Frankel EN y Meyer AS. (1998). Antioxidants in grapes and grape juices and their potential health effects. *Pharmaceutical Biology*. 36: 14-20

- Gobantes I, Gómez R y Choubert G. (2001). Envasado de alimentos. Aspectos técnicos del envasado al vacío y bajo atmósfera protectora. *Alimentación, equipos y tecnología*. 20(1): 75-84
- Gocalves CMB, Coutinho JAP y Marrucho IM (2010). Optical Properties. Poly(lactic acid): Synthesis, structure, properties, processing, and applications. Auras R, Lim LT, Selke SEM y Tsuji H. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc. pp. 97-112.
- Gorinstein S, Martín-Belloso O, Lojek A, Cíz M, Soliva-Fortuny R y Park YS. (2002). Comparative content of some phytochemicals in Spanish apples, peaches and pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82: 1166-1170
- Graciano-Verdugo AZ, Soto-Valdez H, Peralta E, Cruz-Zárata P, Islas-Rubio AR, Sánchez-Valdes S, Sánchez-Escalante A, González-Méndez N y González-Ríos H. (2010). Migration of α -tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability. *Food Research International*. 43(4): 1073-1078
- Granda-Restrepo D, Peralta E, Troncoso-Rojas R y Soto-Valdez H. (2009a). Release of antioxidants from co-extruded active packaging developed for whole milk powder. *International Dairy Journal*. 19(8): 481-488
- Granda-Restrepo D, Soto-Valdez H, Peralta E, Troncoso-Rojas R, Vallejo-Córdoba B, Gámez-Meza N y Graciano-Verdugo A. (2009b). Migration of α -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. *Food Research International*. 42: 1396–1402
- Granda-Restrepo DM, Soto-Valdez H, Peralta E, Troncoso-Rojas R, Vallejo-Córdoba B, Gámez-Meza N y Graciano-Verdugo AZ. (2009). Migration of α -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. *Food Research International*. 42(10): 1396-1402
- Güner FS, Yagci Y y Erciyas AT. (2006). Polymers from triglyceride oils. *Progress in Polymer Science*. 31: 633-670
- Gutiérrez C. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31: 126-133
- Hansen E, Lauridsen L, Skibsted LH, Moawad RK y Andersen ML. (2004). Oxidative stability of frozen pork patties: Effect of fluctuating temperature on lipid oxidation. *Meat Science*. 68(2): 185-191
- Ho KLG y Pometto AL. (1999). Effects of electron-beam irradiation and ultraviolet light (365 nm) on polylactic acid films. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 7(2): 93-100
- Huang S, Frankel EN, Aeschbach R y German JB. (1997). Partition of selected antioxidants in corn oil-water model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(6): 1991-1994
- Iacopini P, Baldi M, Storchi P y Sebastiani L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grapes: Content, *in vitro* antioxidant

- activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21: 589-598
- Jamshidian M, Tehrany EA, Imran M, Jacquot M y Desobry S. (2010). Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science Food Safety*. 9: 552-571
- Jenkins W y Harrington J. (1991). Packaging foods with plastics. USA, Technomic publication. pp. 29-30.
- Karpi ska M, Borowski J y Danowska-Oziewicz M. (2001). The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chemistry*. 72(1): 5-9
- Kedage VV, Tilak JC, Dixit GB, Devasagayam TPA y Mhatre M. (2007). A study of antioxidant properties of some varieties of grapes (*Vitis vinifera L.*). *Critical reviews in food science and nutrition*. 47: 175-185
- Kondo K, Kurihara M, Miyata N, Suzuki M y Toyoda M. (1999). Scavenging mechanisms of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epicatechin gallate on peroxy radicals and formation of superoxide during the inhibitory action *Free Radical Biology and Medicine*. 27: 855-863
- Kristensen D, Orlien V, Mortensen G, Brockhoff P y Skibsted LH. (2000). Light-induced oxidation in sliced Havarti cheese packaged in modified atmosphere. *International Dairy Journal*. 10(1-2): 95-103
- Lee J, Koo N y Min DB. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3(1): 21-33
- Leighton F y Urquiaga I. (2000). Polifenoles del vino y salud humana. *Antioxidantes y Calidad de Vida*. 7(27): 5-13
- Lim L, Auras R y Rubino M. (2008). Processing technologies for poly (lactic acid). *Progress in Polymer Science*. 33(8): 820-852
- Lim L, Cink K y Vanyo T (2010). Processing of poly(lactic acid). Poly(lactic acid): Synthesis, structure, properties, processing, and applications. Auras R, Lim LT, Selke SEM y Tsuji H. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc. pp. 191-215.
- Lim LT, Cink K y Vanyo T (2010). Processing of Poly(lactic acid). Poly(lactic acid): Synthesis, structure, properties, processing, and applications. Auras R, Lim LT, Selke SEM y Tsuji H. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc. pp. 191-215.
- Limm W y Hollifield C. (1996). Modelling of additive diffusion in polyolefins. *Food Additives and Contaminants*. 13(8): 946-967
- López-de-Dicastillo C, Alonso JM, Catalá 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

- López-de-Dicastillo C, Nerín C, Alfaro P, Catalá R, Gavara R y Hernández-Muñoz P. (2011). Development of new antioxidant active packaging films based on EVOH and green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/jf201246g.
- Madras G y McCoy BJ. (1997). Oxidative degradation kinetics of polystyrene in solution. *Chemical Engineering Science*. 52(16): 2707-2713
- 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
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM y Tuñón MJ. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17(6): 271-278
- Martínez-Valverde I, Periago MJ y Ros G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 50(1): 5-18
- Martínez N, Andrés A, Chiralt A y Fito P. (1998). Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno. Valencia, Universidad Politécnica de Valencia. pp. 229-230.
- Mascheroni E, Guillard V, Nalin F, Mora L y Piergiovanni L. (2010). Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. *Journal of Food Engineering*. 98: 294-301
- Mattia CD, Sacchetti G, Mastrocola D, Sarker DK y Pittia P. (2010). Surface properties of phenolic compounds and their influence on the dispersion degree and oxidative stability of olive oil O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*. 24: 652-658
- Mauriello G, De Luca E, La Stora A, Villani F y Ercolini D. (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology*. 41(6): 464-469
- Mendoza-Wilson AM (2006). Estudio computacional del mecanismo antioxidante de los flavonoides quercetina, (+)-catequina y cianidina, basado en su secuencia de desprotonación. Chihuahua, Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C. **Doctorado**: 1-150.
- Mendoza-Wilson AM y Glossman-Mitnik D. (2006). Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (C)-catechin and (K)-epicatechin related to their antioxidant ability. *Journal of Molecular Structure*. 761: 97-106
- Min DB y Boff JM. (2002). Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 1(1): 58-72
- Mitsumoto M, O'Grady MN, Kerry JP y Buckley DJ. (2005). Addition of tea catechins and vitamina C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. *Meat Science*. 69: 773-779

- Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, José Núñez M y Parajo JC. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72(2): 145-171
- Naitove M. (1998). Se prevé una bonanza de los biopolímeros más allá de los degradables. *Tecnología de Plásticos*. p. 63: 27-34
- NCSS. (2007). Number Cruncher Statistical Systems. Programa Estadístico para Windows, Hintze JL, EUA.
- O'Sullivan A, Mayr A, Shaw NB, Murphy SC y Kerry JP. (2005). Use of natural antioxidants to stabilize fish oil systems. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 14(3): 75-94
- Oliveira NS, Oliveira J, Gomes T, Ferreira A, Dorgan J y Marrucho IM. (2004). Gas sorption in poly(lactic acid) and packaging materials. *Fluid Phase Equilibria*. 222: 317-324
- Ortiz-Vazquez H, Shin J, Soto-Valdez H y 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(1): 37-44
- Pastor J, Jawhari T y Merino J. (2003). Caracterización de materiales polímeros mediante la utilización de la microespectroscopia vibracional (Raman, FTIR Y FT-RAMAN). *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 4(3): 1-43
- Pérez G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 22(1): 48-57
- Peterson J y Dwyer J. (1998). Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*. 18(12): 1995-2018
- Plackett DV, Holm VK, Johansen P, Ndoni S, Nielsen PV, Sipilainen-Malm T, Sodergard A y Verstichel S. (2006). Characterization of L-poly lactide and L-poly lactide-polycaprolactone co-polymer films for use in cheese-packaging applications. *Packaging Technology and Science*. 19: 1-24
- Primas U. (2002). Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 3(5): 295-301
- Rauen-Miguel AMO, Esteves W y Barrera-Arellando D. (1992). Determinación del período de inducción de aceite de soja-Correlación entre el Rancimat y otros índices *Grasas y Aceites*. 43(3): 119-122
- Reddy V, Urooj A y Kumar A. (2005). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. *Food Chemistry*. 90(1-2): 317-321
- Robertson GL. (2006). Food Packaging Principles and Practice. EUA, Taylor & Francis Group. 2 Ed. pp. 40-42, 80.
- Rojas-de-Gante C (2002). Migración global en simulantes grasos y simulantes grasos alternativos. Migración de componentes y residuos de envases en

- contacto con alimentos. Catalá R y Gavara R. Valencia, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. pp. 149-161.
- Sánchez-Alonso I, Jiménez-Escrig A, Saura-Calixto F y Borderías AJ. (2007). Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: evaluation by different methodologies. *Food Chemistry*. 101(1): 372-378
- Sanchez-Moreno C y Larrauri JA. (1998). Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. *Food Science and Technology International*. 4(6): 391-399
- Selke SEM, Culter JD y Hernandez RJ. (2004). *Plastics Packaging. Properties, processing, applications and regulations*. Alemania, Hanser. 2 Ed. pp. 141-335.
- Serna L, Rodríguez A y Albán F. (2003). Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. *Ingeniería y Competitividad*. 5(1): 16-23
- Seymour RB y Carraher CE. (1995). *Introducción a la Química de los Polímeros*. Barcelona, Reverté, S.A. pp. 91-118.
- Siracusa V, Rocculi P, Romani S y Rosa M. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 19(12): 634-643
- Skoog DA y Leary JJ. (1994). *Análisis Instrumental*. España, Mc Graw Hill. Cuarta Edición. pp. 173-200.
- Soto-Cantu CD, Graciano-Verdugo AZ, Peralta E, Islas-Rubio AR, Gonzalez-Cordova A, Gonzalez-Leon A y Soto-Valdez H. (2008). Release of Butylated Hydroxytoluene from an Active Film Packaging to Asadero Cheese and Its Effect on Oxidation and Odor Stability. *Journal of Dairy Science*. 91(1): 11
- Soto-Valdez H (2010). Migration. Poly(lactic acid): Synthesis, structure, properties, processing, and applications. Auras R, Lim LT, Selke SEM y Tsuji H. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc. pp. 181-188.
- 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): 970-978
- Su Y, Xu J, Ng CH, Leung LK, Y. H y Chen Z. (2004). Antioxidant activity of tea theaflavins and methylated catechins in canola oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 81(3): 269-274
- Tang S, Sheehan D, Buckley DJ, Morrissey PA y Kerry JP. (2001). Anti-oxidant activity of added tea catechins on lipid oxidation of raw minced red meat, poultry and fish muscle. *International Journal of Food Science and Technology*. 36: 685-692
- Taubner V y Shishoo R. (2001). Influence of processing parameters on the degradation of poly(L-lactide) during extrusion. *Journal of Applied Polymer Science*. 79: 2128-35

- van der Sluis AA, Dekker M, de Jager A y Jongen WMF. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 3606-3613
- Velasco J, Dobarganes MC y Márquez-Ruiz G. (2002). Oxidación en sistemas lipídicos heterofásicos: emulsiones aceite en agua. *Grasas y Aceites*. 53: 239-247
- 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 & Technology*. 10(3): 77-86
- Villada H, Acosta H y Velasco R. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios*. 12(2): 5-13
- Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM y García-Parrilla MC. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71: 230-235
- Walton HF y Reyes J. (2005). Análisis Químico e Instrumental Moderno. Barcelona, Editorial Reverté, S.A. pp. 190.
- 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
- Yilmaz Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*. 17(2): 64-71
- Yurkanis P. (2008). Química Orgánica. México, Pearson Educación. Quinta Edición. pp. 553.
- Zhu B, Li J, He Y, Yamane H, Kimura Y, Nishida H y Inoue Y. (2004). Effect of steric hindrance on hydrogen-bonding interaction between polyesters and natural polyphenol catechin. *Journal of Applied Polymer Science*. 91: 3565-3573