

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

DESARROLLO DE UN ENVASE ACTIVO CON BHT Y SU EFECTO EN LA
AUTOXIDACIÓN DE QUESO ASADERO

POI:

CLAUDIA DINORAH SOTO CANTÚ

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

ENERO DE 2007

APROBACIÓN


Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Química Claudia Dinorah Soto Cantú, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como un requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



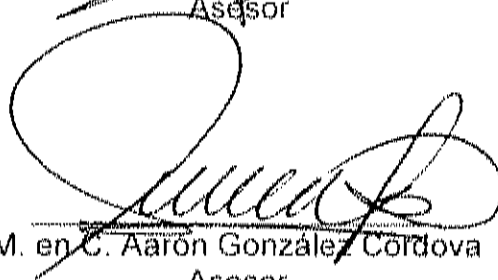
Dra. Herlinda Soto Valdez
Directora de Tesis



Dra. Alma Rosa Islas Rubio
Asesora



Dr. Alberto González León
Asesor



M. en C. Aarón González Córdova
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita de la directora de tesis.



Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar
Director General del CIAD, A.C.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo brindado tan importante

Al programa SAGARPA CONACYT COFUPRO proyecto 2003-C01-095

A Fundación Produce Sonora

A todo el personal que labora en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., por darme la oportunidad de formarme como Maestra en Ciencias, y en especial a la Dra. Ana María Calderón,

A la empresa Productores Unidos de Rayón por todas las facilidades que amablemente se nos brindó.

A la Universidad de Santiago de Chile por la colaboración en la realización de este trabajo.

Al personal de la empresa Qualypplast por su valiosa asesoría.

A mi directora de tesis Dra. Herlinda Soto, por su admirable amor a la ciencia, por su paciencia y su amistad.

A la Dra. Alma Rosa, Dr. Alberto González y M. en C. Aarón González, por su tiempo e invaluable consejos.

A Dios, por darme lo que necesito, cuando lo necesito.

A mis papás y hermanos, por ser la piedra angular de mi vida.

A Ricardo, por volverte un gran impulso y darle sentidos a mi vida.

A Elizabeth Peralta, Erika Javier, Abril Graciano, Juan Arreola, Mónica Villegas, Jorge Mercado, Ancrés Torres, Rosita, a la Q.B. Karla Martínez ☺, Ale y Carmen Estrada, por su disposición amable para cooperar siempre y por su amistad.

A los jóvenes de la biblioteca: Luis y Gerardo, siempre haciéndonos sentir en confianza y con una enorme sonrisa.

A todos mis compañeros de generación, en especial a: Cipa, Tere, Julia Esperanza, Oralia, Malicha y Bibiana, por todo lo que compartieron conmigo, me siento muy afortunada de ser su amiga

A la familia Rochin Cantú, por su amor y apoyo, las quiero!

A mi abuela Esther, por incluirme siempre en sus oraciones, la quiero mucho!

A Irene y Alejandra Soto, por ser más que mis primas, unas excelentes amigas y hermosas 😊

A Betty y Laura Félix, Manuel Hernández, Nora Valdivia, Miriam Palafox y Elsa López, por las innumerables porras e incondicional amistad.

Y en sí a todas las personas que se vieron involucradas directa o indirectamente para que este proyecto llegara a término... reciban mi más sincero y profundo agradecimiento.

DEDICATORIA

A los que me amaron con todas sus fuerzas
antes de conocerme: mis padres.

A Erick y Gaby: los tres somos uno.

A Ricardo: mi complemento para ser feliz.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Queso	2
Clasificación	2
Autoxidación	3
Antioxidantes	8
Materiales de envase para quesos	9
PEBD	12
Poliamida (Nylon ®)	13
Copolimeros ácidos	13
Elaboración de películas plásticas	14
Extrusión	14
Coextrusión	15
Resistencia a la tensión y porcentaje de elongación	18
Antioxidantes para plásticos	21
Envases activos	21
Migración	22
Primera Etapa: difusión del migrante	22
Modelo I: No migración	23
Modelo II: Migración independiente, no controlada por el alimento	24
Modelo III: Migración controlada por el alimento	24
Segunda Etapa: Solvatación o disolución en la interfase alimento-envase	24
Tercera Etapa: Dispersión en el alimento	25
Factores que influyen en la migración	25
Estudios de migración de antioxidantes en envases plásticos hacia alimentos o simulantes	26
Legislación	29
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos:	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Etapa 1 Diseño, elaboración y caracterización de películas coextruidas con BHT	32
Diseño de las películas	32
Fabricación de las películas	35
Determinación de BHT en las películas tricapa	40
Caracterización de las películas	42
Espesor	42

Velocidad de transmisión al oxígeno (VTO).....	42
Resistencia a la tensión y porcentaje de elongación.....	42
Diseño experimental y análisis estadístico	42
Etapa 2 Determinación de la velocidad de migración de BHT desde la película y su efecto en la oxidación lipídica de queso.	43
Origen y composición del queso	43
Envasado y almacenamiento del queso	43
Determinación de la velocidad de migración de BHT en películas.....	44
Medición de oxidación en queso.....	44
Cuantificación de THF en queso por espacio de cabeza.	44
Entrenamiento de Panel para Evaluación Sensorial	46
Evaluación Sensorial.....	47
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
Etapa 1 Elaboración y caracterización de películas coextruídas con BHT.....	51
Determinación de BHT en las películas tricapa	51
Caracterización de las películas	55
Espesor.....	55
VTO.....	55
Resistencia a la tensión y porcentaje de elongación.....	59
Etapa 2 Determinación de la velocidad de migración de BHT desde la película y su efecto en la oxidación lipídica de queso.	61
Composición del queso.....	61
Determinación de la velocidad de migración de BHT en películas.....	61
Medición de oxidación en queso.....	65
Condiciones de estandarización de procedimiento de cuantificación de THF por espacio de cabeza.	65
Cuantificación de THF en queso por espacio de cabeza.	66
Evaluación Sensorial de Olor	69
CONCLUSIONES	72
RECOMENDACIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	74
APÉNDICE A	81
Identificación de compuestos volátiles y prueba de interacción BHT-queso. ...	81
Primera prueba de interacción BHT-queso.....	81
Segunda prueba de interacción BHT-queso.....	82
Resultados de prueba de identificación de compuestos volátiles y prueba de interacción BHT-queso.....	83
Primera prueba de interacción BHT-queso.....	83
Segunda prueba de interacción BHT-queso.....	86
APÉNDICE B	89

Establecimiento de procedimiento de cuantificación de THF por espacio de cabeza en queso asadero.....	89
Programa de temperaturas y flujo de gas acarreador.....	89
Solventes.....	89
Liberación de THF.....	90
Estándar Interno.....	90
Volumen de inyección, del vial y tamaño de muestra.....	90
Resultados de establecimiento de procedimiento de cuantificación de THF por espacio de cabeza en queso asadero.....	91
Programa de temperaturas y flujo de gas acarreador.....	91
Solventes.....	91
Liberación de volátiles.....	91
Estándar Interno.....	91
Volumen de inyección, del vial y tamaño de muestra.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de oxidación de grasas	4
Figura 2. Estructura de BHT	10
Figura 3. Ubicación de las 4 zonas de un extrusor	16
Figura 4. Anillo de enfriamiento.	17
Figura 5. Cabezal para coextrusión.	19
Figura 6. Torre de enfriamiento.	20
Figura 7. Diagrama de la metodología general.	33
Figura 8. Proceso de <i>pelotización</i> de PEBD con BHT.	36
Figura 9. Esquema de proceso de elaboración de películas tricapa con diferentes	37
Figura 10. Diagrama de películas tricapa.	38
Figura 11. Formato para entrenamiento en evaluación de olor	48
Figura 12. Formato de evaluación de olor.	50
Figura 13. Microfotografía de película tricapa PEBD/Adhesivo/PA.	57
Figura 14. Migración de BHT desde películas tricapa a queso.	63
Figura 15. Curva estándar de THF en queso espacio de cabeza de queso.	67
Figura 16. Cromatograma de CG-FID de espacio de cabeza de queso asadero almacenado a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ envasado en películas con diferentes concentraciones de BHT.	68
Figura 17. Evaluación sensorial de olor en queso asadero contenido en películas con diferentes concentraciones de BHT.	70
Figura 18. Cromatograma en CG-masas de espacio de cabeza de queso sin BHT a los 5 días de almacenamiento $30^{\circ}\text{C}/\text{luz}$	84
Figura 19. Patrones de fragmentación.	85
Figura 20. Formación de 2-pentil furano a partir del hidroperóxido de 9-linoleato	87
Figura 21. Cromatogramas de CG-masas de espacio de cabeza de queso asadero almacenado a $30^{\circ}\text{C}/\text{luz}$	88
Figura 22. Cromatograma (CG-FID) de THF ($80\ \mu\text{g}/\text{g}$) y 4M2P ($4\ \mu\text{g}/\text{g}$) en queso.	92
Figura 23. Cromatograma en CG-FID de espacio de cabeza de queso y THF. .	94

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Métodos e indicadores utilizados para medir el nivel de oxidación en queso.....	6
Cuadro 2. Combinaciones de materiales plásticos utilizados en el envasado de quesos.....	11
Cuadro 3. Estructura meta de las películas diseñadas.....	34
Cuadro 4. Condiciones de fabricación de películas tricapa.....	39
Cuadro 5. Concentración y porcentaje residual de BHT en las películas tricapa.....	52
Cuadro 6. Retención de BHT en diferentes películas en rollo almacenadas en refrigeración a 4°C.....	54
Cuadro 7. Espesores de películas tricapa con diferentes concentraciones de BHT.....	56
Cuadro 8. VTO de las películas tricapa con diferentes concentraciones de BHT en PEBD.....	58
Cuadro 9. Resistencia a la tensión y % de elongación en dirección máquina de las películas tricapa con diferentes concentraciones de BHT.....	60
Cuadro 10. Áreas de THF en queso probando diferentes condiciones.....	95

RESUMEN

La grasa del queso es susceptible a oxidarse en presencia de luz y/o oxígeno generando olores y sabores indeseables. Los métodos actuales para minimizar tal problema no son integralmente satisfactorios. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue desarrollar un envase activo conteniendo el antioxidante butilhidroxitolueno (BHT), evaluar su migración, y su efecto en la oxidación de queso. Para ésto se diseñaron y fabricaron películas plásticas coextruídas (Poliamida/Adhesivo/Polietileno de baja densidad (PEBD)) adicionadas con BHT 0.8 (tratamiento A) y 1.4 % (tratamiento B) en la capa de PEBD. El BHT retenido después de su fabricación, determinado por HPLC, fue de 97 y 70%, respectivamente. La capa de Poliamida contribuyó a lograr velocidades de transmisión al oxígeno entre 21-47 $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$. La concentración de BHT tuvo un efecto en la resistencia a la tensión y % de elongación en dirección máquina de las películas. El comportamiento de migración del BHT al queso durante todo el período de almacenamiento (100 días a 5°C/luz) fue muy similar entre los 2 tratamientos. La mayor pérdida de BHT de las películas se dio durante los primeros 20 días de almacenamiento. Los niveles de BHT estimados en el queso para el tratamiento A se encontraron por debajo de los límites establecidos por la FDA, tanto para su uso como aditivo y como migrante. El tratamiento B sobrepasó dichos límites. El tetrahidrofurano, utilizado como indicador de oxidación y determinado por cromatografía de gases con detección por ionización de flama, se cuantificó a los 60 días de almacenamiento (<12.0-24.5 $\mu\text{g/g}$ THF en queso) sólo en el queso contenido en la película Testigo. Se realizó una evaluación sensorial de olor, y a partir del día 80 los panelistas detectaron mayor intensidad de oxidación en el queso contenido en la película Testigo en comparación con el queso contenido en la película del tratamiento A.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se consumen anualmente 500 millones de toneladas de leche y sus derivados. México se encuentra en el treceavo lugar como productor de leche, siendo el país que más importa leche en polvo para complementar la demanda nacional (Ángeles-Montiel y cols., 2004). En enero de 2006, las importaciones de leche y derivados ascendieron a 78 millones de dólares (Informes de Comercio Exterior, 2006).

El queso es un derivado de la leche y su composición puede variar bastante de un tipo de queso a otro. No obstante, tienen en común que la mayoría posee las condiciones ideales para sufrir deterioro a causa de microorganismos y enzimas. Sin embargo, existen otros tipos de reacciones que pueden ir en detrimento de la calidad como es la oxidación lipídica, inducida principalmente por luz y por oxígeno. La susceptibilidad a este deterioro es una relación directa al contenido de grasa en el queso. Las consecuencias de esta oxidación son básicamente la pérdida de color, del valor nutritivo y generación de malos olores y sabores.

Para reducir la oxidación lipídica en quesos, actualmente se pigmentan los envases con colores oscuros, o esporádicamente se utilizan antioxidantes. Con la primera opción no se obtienen resultados integralmente satisfactorios. Lo anterior es básicamente porque el consumidor prefiere un envase transparente. Así pues, se propone diseñar películas plásticas transparentes coextruidas conteniendo BHT que migre hacia el queso asadero provocando un retraso en la velocidad de las reacciones de oxidación.

ANTECEDENTES

Queso

El queso, según la Norma Oficial Mexicana es el producto obtenido de la coagulación de la caseína con cuajo, bacterias acidolácticas, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles, drenada, y puede ser prensada o no (NOM-121-SSA1, 1994). En el mercado existen quesos y análogos de queso, por lo que es importante hacer la distinción entre uno y otro ya que la composición y susceptibilidad al deterioro son diferentes. Un análogo de queso, según el Codex Alimentarius (CODEX STAN 192-1995, 2005a), es un producto que se ve como un queso, pero su grasa láctea ha sido parcial o completamente reemplazada por otras grasas, y así también las proteínas pueden ser sustituidas. Incluye imitaciones de queso, imitación de mezclas de queso, e imitación de polvos de queso.

Clasificación

Básicamente, hay 3 maneras de clasificar a los quesos. La primera es de acuerdo a su consistencia: extraduros o muy duros (<41 % de humedad), duros (49-56 % de humedad), semi duros (54-63 % de humedad), semi suaves (61-69 % de humedad) y suaves (69 % de humedad). La segunda clasificación es en base a su contenido graso: desnatados (10 %), bajos en grasa (10-25 %), grasa media (25-45 %), altos en grasa (45-60 %) y extremadamente altos en grasa (>60 %). La última clasificación es de acuerdo a su grado de madurez: madurado, semimadurado, sin madurar y frescos (Cheese and cheese making,

2002; Nasanovsky y cols., 2001). Cabe mencionar que a su vez, estas clasificaciones presentan mucha variación entre una fuente de información y otra.

En cuanto a su composición de ácidos grasos todos tienen en común que de los saturados, el que se encuentra en mayor cantidad es el ácido palmítico (16:0), de los monoinsaturados es el oleico (18:1) y de los poliinsaturados es el linoleico (18:2) (Posati y Orr, 1976). Otro aspecto en común es que la mayoría de ellos son vulnerables al ataque de microorganismos y enzimas como reacciones deteriorativas principales. Además existen otro tipo de deterioros que pueden causar rechazo del consumidor hacia el queso, como la oxidación lipídica (Juric y cols., 2003).

Autoxidación

La oxidación lipídica o autoxidación (figura 1), es llamada así porque genera compuestos que a su vez mantienen y aceleran la reacción. Al extraer un hidrógeno, preferentemente de una doble ligadura de un ácido graso, genera que éste se convierta en radical libre. Al encontrarse con la molécula de oxígeno, el radical libre se le une y forman radicales hidroperóxidos. Éstos buscarán a otro ácido graso para repetir el proceso o se estabilizarán al unirse a otro radical de la misma naturaleza. También puede que los radicales se rompan formando compuestos volátiles de bajo peso molecular, como aldehídos, alcoholes y cetonas que generan olores indeseables (Mortensen y cols., 2003; Mortensen y cols., 2004; van Aardt y cols., 2005a). También la autoxidación de los quesos degrada varias vitaminas y puede generar compuestos tóxicos (Mortensen y cols., 2004; Sieber, 2005, Kristensen y cols., 2001). La autoxidación se divide en tres etapas: iniciación (formación del primer radical libre), propagación (formación de otros radicales libres) y terminación

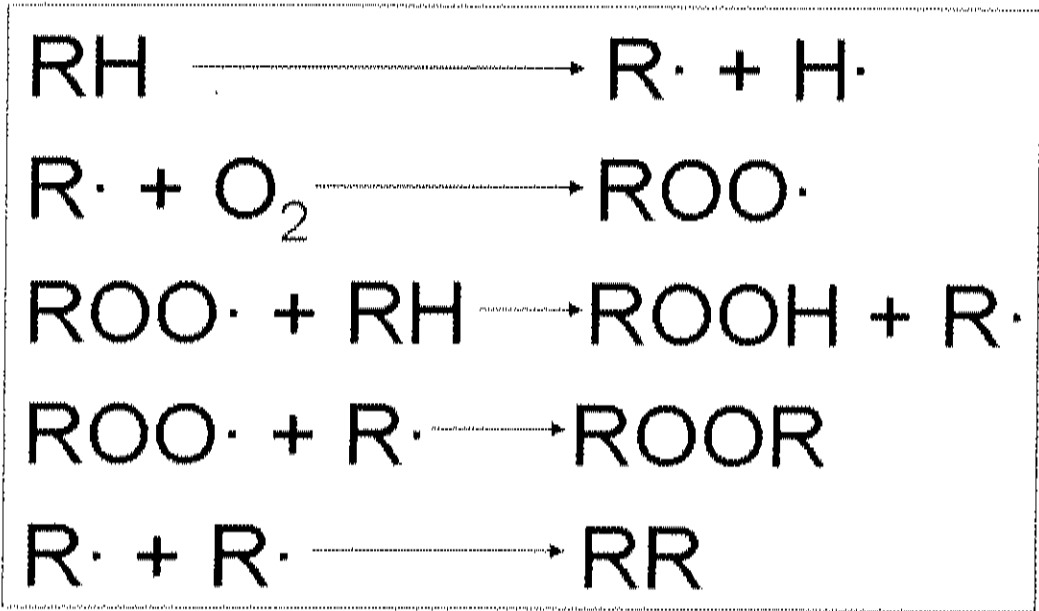


Figura 1. Esquema de oxidación de grasas.

(estabilización de radicales o escisión de ellos mismos) (Badui, 1999; Mortensen y cols., 2004). Los métodos e indicadores usados para medir la oxidación en el queso son muy variados. Algunos ejemplos se enlistan en el cuadro 1.

De tales métodos, la identificación y cuantificación de compuestos volátiles por cromatografía de gases-masas es de los más recurridos. Por lo tanto, es importante conocer ejemplos de compuestos volátiles reportados en la bibliografía que son producto de la oxidación del queso, algunos de ellos son: 2-butanona, 2-pentanona, octano, hexanal, heptanal, 3-metil butanal, 2-pentil furano, 1-pentanol, 1-octanol, 2-heptanona, tetrahidrofurano (THF), pentanal y octanal (Juric y cols., 2003; Sunesen y cols., 2002; Andersson y Lingnert; 1998).

Un factor externo que influye más que cualquier otro para que se desencadene la autoxidación en quesos es la luz. A su vez, la susceptibilidad a la oxidación se incrementa en la medida en que aumenta el contenido de grasa (18 % en adelante) (Hong y cols., 1995), o específicamente, el contenido de ácidos grasos insaturados en el queso (Mortensen y cols., 2004).

La luz influye significativamente en la producción de compuestos volátiles de la autoxidación y en el consumo de oxígeno en el espacio de cabeza de envases como los de crema en polvo y queso de leche de cabra (Andersson y Lingnert., 1998; Kim y cols., 2003). Mortensen y cols. (2003), encontraron que la luz visible ocasiona oscurecimiento, degrada la riboflavina y genera aldehidos y alcoholes en queso Havarti. La luz en combinación con el aumento de temperatura, generan peróxidos lipídicos y volátiles tanto en queso procesado como en el queso crema (Sunesen y cols., 2002; Kristensen y cols., 2001). El efecto de la luz en los quesos es tan inmediato, que puede manifestarse incluso al poco tiempo de exposición (12 h – 4 días) en quesos duros y semi duros (Mortensen y cols., 2002b; Mortensen y cols., 2004).

Cuadro 1. Métodos e indicadores utilizados para medir el nivel de oxidación en queso.

Método	Detecta	Referencia
CG*-masas	Volátiles	During y cols. (2000)
Espectrometría	Cambios en color	Sunesen y cols. (2002)
ESR**	Radicales libres	Mortensen y cols. (2002a)
Índice de peróxidos	Peróxidos	Mortensen y cols. (2002a)
Colorimetría triestímulo	Cambios en color	Mortensen y cols. (2002a)
TBARS***	Malonaldehído-TBA	Kristensen y cols. (2001)
Fluorescencia	Aldehídos -compuestos nitrogenados	Vidaud y cols. (1998)
Evaluación sensorial	Cambios en color, olor, sabor	During y cols. (2000)
SPME****-CG-masas	Volátiles	Mortensen y cols. (2002b)

*CG: cromatografía de gases

**ESR: Resonancia de giro de electrones

***TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

****SPME: microextracción en fase sólida

Convencionalmente, para evitar la autooxidación en el queso se recurre a la pigmentación de envases (Mortensen y cols., 2004; Mortensen y cols., 2002a; Mortensen y cols., 2002b; van Aardt y cols., 2001; Mestdagh y cols., 2005; Juric y cols., 2003). Sin embargo, ésta no es la mejor opción desde el punto de vista del consumidor, quien desea que el queso se expenda en un envase transparente para apreciarlo antes de su compra (Juric y cols., 2003; Mortensen y cols., 2004). Otra manera de controlar la autooxidación en quesos es mediante los antioxidantes, y aunque existen pocos reportes sobre su uso, son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos (Ángeles, 2006).

Actualmente, no existe mucha información sobre el uso de antioxidantes en leche y lácteos. En lo referente a leche, se ha intentado adicionar ácido ascórbico y α -tocoferol tanto al alimento del ganado, como por vía intramuscular y directamente a la leche. Los resultados mostraron que tanto en la adición al alimento del ganado como en el músculo, se obtienen bajas cantidades de antioxidantes en la leche (van Aardt y cols., 2001; van Aardt y cols., 2005a). Además estos antioxidantes se consumen rápidamente (reaccionando con los radicales libres generados) una vez que se encuentran en la leche. Debido a que los quesos al igual que la leche son fotosensibles, se deduce que algo similar puede suceder si los antioxidantes son agregados directamente al queso.

Recientemente, van Aardt y cols. (2005b) evaluaron el efecto en la oxidación de leche expuesta a la luz adicionada semanalmente con una mezcla ya sea de BHT-BHA o tocoferol-ascorbil palmitato. Para ambas combinaciones observaron que la adición semanal brindó mucha mejor protección contra la oxidación que una dosis inicial, lo que da pie a realizar estudios donde el material de envase funcione como vehículo para la liberación controlada de antioxidante hacia productos lácteos, de los cuales cabe mencionar que existe poca información.

Antioxidantes

Los antioxidantes alimentarios son conservadores que evitan que las grasas y aceites de los alimentos se oxiden o adquieran un mal sabor. De manera general el funcionamiento de los antioxidantes es el mismo. Durante las etapas de iniciación y propagación de la autooxidación, los antioxidantes donan el electrón faltante a los radicales libres, estabilizándolos. La estabilidad del lípido siempre dependerá de la *cantidad remanente del antioxidante agregado* (Badui, 1999).

Los antioxidantes se pueden clasificar en naturales y sintéticos. Dentro de los primeros se encuentran el α -tocoferol, ácido ascórbico, y extractos crudos de frutas, hierbas y cereales ricos en compuestos fenólicos (Javanmardi y cols., 2003). Algunos ejemplos de antioxidantes sintéticos son: galato de propilo (PG), terbutil hidroxiquinona (TBHQ), butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT). El uso de antioxidantes sintéticos está regulado por organismos como la Food and Drug Administration (FDA). Dicho organismo estipula que la concentración de antioxidantes sintéticos en la mayoría de los alimentos como lo es en leche y crema en polvo, no debe exceder del 0.02 % de la materia grasa (CODEX STAN 192-1995, 2005b).

El BHT es muy utilizado en la elaboración de alimentos debido a que es liposoluble, volátil, efectivo y de costo bajo (Galindo, 2004). Se clasifica dentro de los antioxidantes donadores de protones. Es decir, no detiene la formación de radicales que se generan en la oxidación, sino que al reaccionar con ellos los estabiliza y se producen radicales del antioxidante que son menos reactivos. El BHT posee un grupo hidroxilo (OH) (figura 2) que actúa en los pasos de iniciación y propagación de la oxidación, ya que pueden ceder un átomo de hidrógeno tanto a los radicales ácido graso ($R\cdot$) como a los hidroperóxidos

(ROO·), restaurando el primero al ácido (RH) y formando el correspondiente hidroperóxido (ROOH) con el segundo (Badui, 1999).

Materiales de envase para quesos

Los envases que se utilizan para quesos deben evitar el ingreso de oxígeno, la deshidratación y mantener la estabilidad oxidativa por más tiempo. También es importante que contengan el olor del queso y deben presentar excelente resistencia al agrietamiento (Jenkins y Harrington, 1991b).

La tasa de transmisión del oxígeno y de la luz, deben ser consideradas dentro del diseño de los envases. Para ambos casos, el espesor de la película, así como la cantidad de aditivos, puede tener una influencia importante sobre tales transmisiones y desde luego sobre los quesos. La tasa de transmisión del oxígeno a través del envase depende de los materiales usados, pero también de la concentración del oxígeno dentro del mismo, la humedad relativa y la temperatura de almacenamiento. En el caso de los quesos envasados al vacío, por ejemplo, se recomienda una velocidad de transmisión al oxígeno (VTO) de $170 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{día}/\text{atm}$ a 25°C y 75 % de humedad relativa (Robertson, 1993b). La tasa de transmisión de la luz depende en gran medida de la coloración del envase. Mientras más oscura sea la pigmentación, la entrada de luz disminuirá (Mortensen y cols. 2004).

Existe una gama amplia de materiales plásticos que se utilizan para envasar quesos. Algunas de sus combinaciones se muestran en la cuadro 2. La razón por la que se utilizan combinaciones de materiales, es porque así se logra reunir los requisitos de envase para queso. Por ejemplo, en la película tricapa (Polietilenterefalato (PET)/Cloruro de Polivinilideno (PVdC)/Polietileno (PE)), el

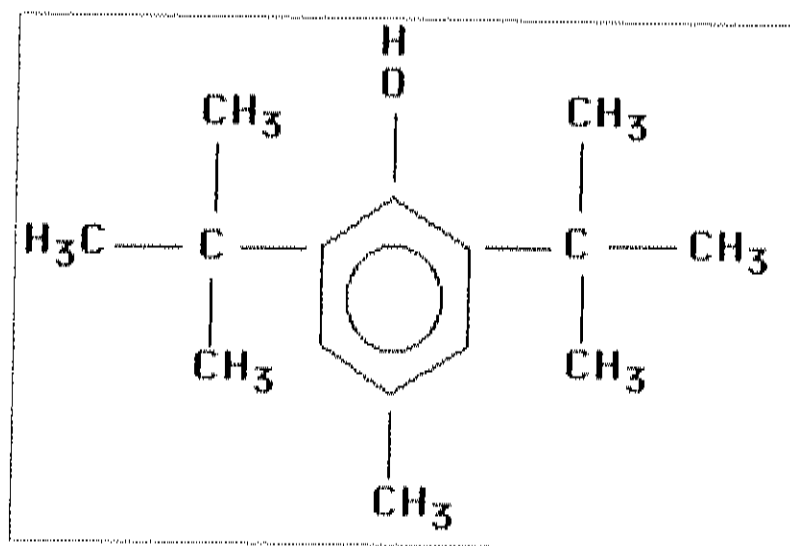


Figura 2. Estructura de BHT

Cuadro 2. Combinaciones de materiales plásticos utilizados en el envasado de quesos.

Capa externa	Capa media	Capa interna
Poliamida ¹ (PA)		Ionómero
PA	Adhesivo	PE ²
PET ³		PE
PET	PVdC ⁴	PE

Fuente: Robertson, 1993b; Coextruded Plastic Technologies, Inc., 2006; Juric y cols. 2003; Mortensen y cols. 2002a.

¹Poliamida

²Polielileno

³Polietiléntereftalato

⁴Cloruro de Polivinilideno

PET es resistente y transparente, con una permeabilidad al oxígeno entre 52-130 mL/mil/m²/día y al vapor de agua de 27.5 g/mil/m²/día. El PVdC es resistente, flexible e inerte, su permeabilidad al oxígeno es de 15.5 mL/mil/m²/día y la del vapor de agua es de 3.1 g/mil/m²/día. Además, los polietilenos son muy flexibles, e inertes al agua.

El polietileno de baja densidad (PEBD) y la poliamida (PA) son polímeros muy utilizados en la industria del envasado de alimentos, incluyendo a los quesos. Tales materiales en conjunto, pueden lograr los requerimientos de envases para queso, como se explicará posteriormente. Sin embargo debido a su incompatibilidad, se debe recurrir también al uso de otro polímero que funja como adhesivo. Por lo tanto, enseguida se describen las características principales de PEBD, PA y de los copolímeros ácidos a tener en consideración.

PEBD

El PEBD pertenece a las poliolefinas que son termoplásticos. El PEBD es un material resistente, ligeramente translúcido que se puede extruir por soplado en forma tubular. Tiene una buena fuerza extensible, es resistente al impacto y fuerza al corte. El PEBD es una excelente barrera al agua y su vapor (50.8-81.28 g/μm/m²/día), pero no así hacia a el oxígeno (99,060–330,200 mL/μm/m²/día) (Robertson, 1993d; Kondo, 1990; Soto-Valdez y cols., 1999). Esta poliolefina resalta debido a su estabilidad frente a las temperaturas de procesamiento y a su bajo costo para utilizarse como material de envase.

Poliamida (Nylon ®)

Poliamida es el término utilizado para las resinas poliméricas fabricadas por la polimerización de condensación de un ácido orgánico y una amida. En envases, son dos los tipos de poliamidas más importantes: Nylon® 6 y Nylon® 6,6. El Nylon 6 es el más común, porque tiene un punto de ablandamiento más bajo y un rango de fundición más amplio. Lo anterior, lo hace ser más fácil para sellar con calor y coextruirse con otras resinas termoplásticas. La poliamida es una película clara con buena barrera al oxígeno ($393.7 \text{ mL}/\mu\text{m}/\text{m}^2/\text{día}$), pero pobre contra la humedad ($3,200.4 \text{ g}/\mu\text{m}/\text{m}^2/\text{día}$) (Soto-Valdez y cols., 1999). También posee una fuerza superior y una excepcional resistencia al corte y a la punción (Brown, 1992). Su resistencia a la tensión es de $172 - 255 \text{ N}/\text{mm}^2$ y el porcentaje de elongación de 70-120 % (Jenkins y Harrington, 1991a).

En resumen, el PEBD ofrece al envase flexibilidad y al ser barrera al vapor de agua, evita que el queso se deshidrate. Mientras que la poliamida evita el ingreso de oxígeno, contribuyendo al aumento en la estabilidad oxidativa. En conjunto evitan la entrada y salida de gases conservando así también el olor del queso por más tiempo.

Copolímeros ácidos

Muchos monómeros de hidrocarburos insaturados se pueden copolimerizar con etileno para producir una familia de copolímeros de etileno. Un copolímero más especializado está hecho por la copolimerización de la alta presión de los radicales libres del ácido acrílico o ácido metacrílico con etileno para formar ácido acrílico de etileno y ácido metacrílico de etileno, respectivamente. Su uso principal es como adhesivos, pudiéndose utilizar en películas por soplado (Jenkins y Harrington, 1991a).

Los envases, pueden tener la capacidad de reducir la entrada de luz y oxígeno y así, al igual que los antioxidantes, reducir o retardar la oxidación. Actualmente el material plástico es muy utilizado sobre todo por ser barato y versátil. Es por ello que a continuación se describen algunos aspectos importantes sobre los envases plásticos.

Elaboración de películas plásticas

Los envases plásticos para quesos se logran mediante varios procesos de elaboración y actualmente todos son utilizados con éxito en la industria. El proceso de elaboración que es la base para los demás es el de extrusión. Algunos derivados del anterior son coextrusión y laminado. A continuación se describen brevemente los procesos de extrusión y coextrusión.

Extrusión

Todos los termoplásticos se forman en películas por el proceso de extrusión-tornillo. El corazón de un extrusor es un tornillo que mezcla la resina dentro de un barril caliente. El tornillo estándar de un extrusor recibe la resina en polvo o en forma de *pellets* a través de una tolva, para ser transportados hacia el barril y de ahí llegar a la zona de compresión del tornillo donde el material es fundido. Existen dos formas del proceso de extrusión que dependen del tipo de dado utilizado y que pueden ser por soplado o tubular y de película plana. En el primero, la película se extruye en un tubo delgado (usualmente en dirección vertical hacia arriba) y se le sopla aire a través del dado, así el tubo se infla en una burbuja delgada, después se enfría y se aplana. En la película plana, el

polimero fundido se extruye a través de un dado de corte dentro de un baño de agua templada o sobre un rodillo frío (Robertson, 1993a).

Los extrusores están conformados por 4 zonas básicamente (figura 3). La zona 1 es la zona de alimentación; la zona 2 es donde se encuentra el barril y el tornillo, en la zona 3 se ubica al final del barril y, finalmente la zona 4 es el cabezal o dado. Sus temperaturas se controlan de manera independiente y se adaptan a las necesidades de cada polimero. En la zona 4 además se encuentra colocado el anillo de enfriamiento (figura 4), que rodea con aire a la película y ayuda a definir y calibrar el espesor.

Los alimentos poseen ciertas características o atributos que se deben mantener durante su vida de anaquel. Sin embargo, generalmente el material de envase plástico fabricado de un sólo polimero (o película de una sola capa), no reúne las características para lograr tal objetivo. De ahí la necesidad de complementarse con otras capas de polimeros que también conformen el envase, mediante el proceso de coextrusión.

Coextrusión

La coextrusión consiste en acoplar dos o más extrusores con diferentes materiales plásticos a una cabeza de dado sencilla para obtener una película formada de varias capas. Las principales ventajas de este método sobre los laminados convencionales son (Robertson, 1993a):

- Bajo costo
- Menor tendencia a la deslaminación
- Mayor flexibilidad para obtener una gama amplia de propiedades.

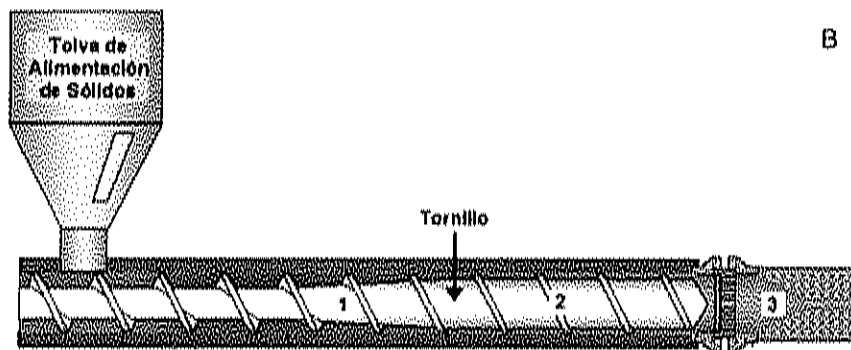
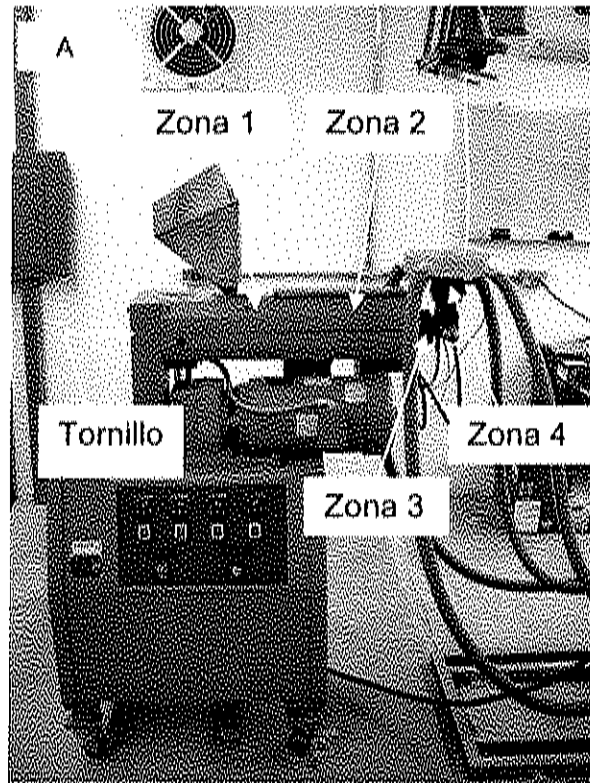


Figura 3. Ubicación de las 4 zonas de un extrusor. A: esquema externo. B: esquema interno.



Figura 4. Anillo de enfriamiento.

Los polímeros fundidos en los extrusores, se unen en un cabezal (figura 5) para formar una sola película. La película formada es recibida por una torre de enfriamiento de la cual, los componentes más importantes son el jalador y el embobinador (figura 6). Estos dos últimos, también juegan un rol importante en el acomodo de las moléculas de los polímeros en la película. Tal acomodo de las moléculas, que dependen del material de envase, repercutirá en las propiedades mecánicas del mismo, como la dureza, el módulo tensil, la resistencia a la tensión, el porcentaje de elongación, etc.

Resistencia a la tensión y porcentaje de elongación

La determinación de las propiedades mecánicas de los envases es importante porque permite evaluar la calidad de la materia prima y/o del producto terminado, cubrir las especificaciones y normas, verificar y monitorear el proceso de elaboración, desarrollar pruebas de diseño, evaluar productos de la competencia, etc. Dentro de tales pruebas están la resistencia a la tensión y el porcentaje de elongación, las cuales se definen brevemente a continuación:

La resistencia a la tensión es la prueba mecánica más simple para visualizar. En esta prueba se aplica un creciente esfuerzo de tensión al material y los cambios resultantes son monitoreados. El esfuerzo σ se define como la fuerza por unidad de área transversal del material. De este modo, si la fuerza es F (Newtons) y el área transversal es A (mm^2), entonces el esfuerzo está dado por (Robertson, 1993e):

$$\sigma = F/A \text{ ó } \text{N/mm}^2$$

La resistencia a la tensión es la máxima fuerza tensil a la cual un material puede mantenerse sin romperse y se toma como la carga máxima ejercida sobre la muestra durante la prueba, dividida entre la sección transversal de la muestra.

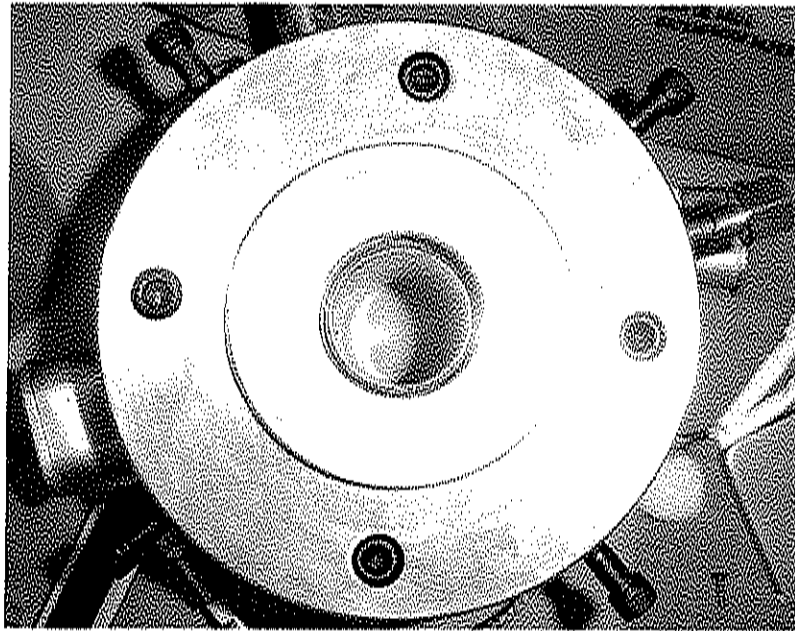


Figura 5. Cabezal para coextrusión.

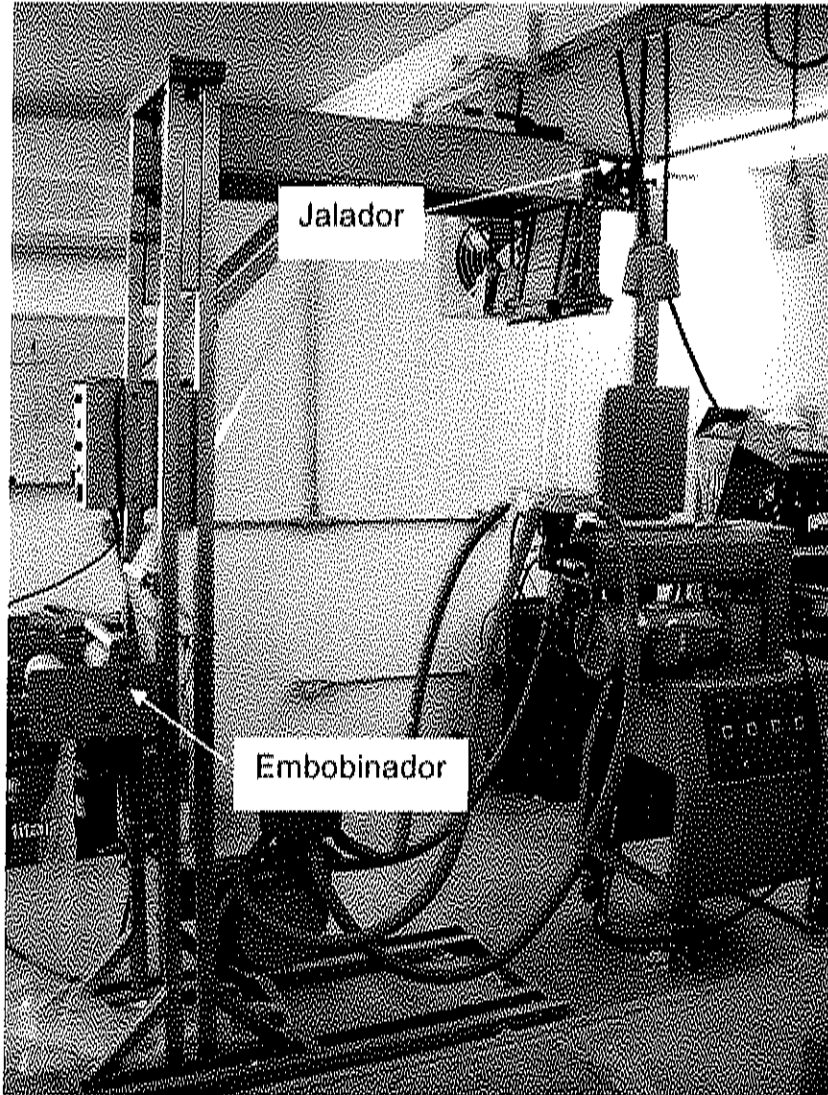


Figura 6. Torre de enfriamiento.

El porcentaje de elongación se mide generalmente como la longitud del punto donde la película se rompe y se expresa como el porcentaje de cambio del largo original del material entre las mordazas de la máquina de prueba. Su importancia está en que es una medida de la estabilidad de la película, un gran valor de elongación indica que el material absorberá una gran cantidad de energía antes de romperse (Robertson, 1993e).

Antioxidantes para plásticos

Los antioxidantes se agregan a los plásticos para reducir su degradación durante el proceso de extrusión o termoformado. También protegen al polímero durante su exposición a la intemperie (efecto combinado de exposición a la luz y al oxígeno atmosférico) (Galindo, 2004; Robertson, 1993c). La mayoría de los antioxidantes utilizados tienen estructura fenólica: fenoles alquilados y bisfenoles, alquilidenos y polifenoles, productos de condensación del fenol.

Envases activos

Un envase activo posee una función adicional a la del envase convencional o pasivo, ya que interactúa directamente con el alimento y su medio ambiente para incrementar una o más propiedades de calidad y seguridad (Rojas, 2001). Dentro de este tipo de envases, están a los que se les agregan sustancias (como los antioxidantes) para que se transfieran al alimento, valiéndose del fenómeno conocido como *migración*.

Migración

La migración se define, a nivel de envases plásticos, como la transferencia de masa del polímero al alimento y al entorno, si bien se aplica más específicamente a la interacción plástico/producto envasado, definiéndose como la transferencia de masa de una fuente externa al alimento por un proceso submicroscópico. Los polímeros base de los materiales plásticos son moléculas de elevado peso molecular, inertes y de solubilidad limitada tanto en sustancias de naturaleza lipófila como hidrófila, cuya transferencia del envase al alimento está limitada. Las sustancias del material del envase que sí pueden migrar son los compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en la matriz polimérica, por ejemplo residuos de la polimerización, aditivos, compuestos de la degradación de aditivos, etc. (Catalá, 2000).

La transferencia de las sustancias presentes en los materiales de envase a los alimentos se desarrollan en tres etapas: difusión del migrante en la matriz polimérica, solvatación o disolución en la interfase alimento-envase y dispersión en el alimento (Catalá, 2000).

Primera Etapa: difusión del migrante.

Esta etapa tiene lugar en la matriz polimérica, aquí la migración está controlada por el proceso de difusión del migrante, que consiste en la transferencia de masa a través de los espacios libres transitorios originados por los movimientos moleculares naturales aleatorios (movimiento browniano) de fragmentos de cadena del polímero que ocurren en ausencia de fuerzas externas tales como agitación, mezclado, o corrientes de convección de líquidos (Catalá, 2000; Catalá y Gavara, 2002).

Este modo de transporte molecular obedece, en la mayoría de los casos a las leyes de Fick para la difusión. La primera ley de Fick, que describe el flujo del migrante en estado estacionario a través de una unidad de área viene expresada por la ecuación (Catalá, 2000; Catalá y Gavara, 2002):

$$F = -D_p (\delta C_p / \delta x)$$

Es decir, el flujo F de migrante ocurre en dirección contraria a la diferencia de concentración C_p a lo largo de espesor x del polímero. La constante de proporcionalidad es el coeficiente de difusión del migrante en el polímero D_p . Esta expresión sólo es válida cuando las magnitudes representadas son independientes del tiempo. Cuando la concentración varía con el tiempo, esta dependencia viene expresada por la segunda ley de Fick, que en el caso del coeficiente de difusión no dependa de la concentración, se presenta en la siguiente ecuación (Catalá, 2000; Catalá y Gavara, 2002):

$$\delta C_p / \delta t = D_p (\delta^2 C_p / \delta x^2)$$

Es posible que las propiedades de barrera de un material varíen cuando está expuesto a un alimento o simulante, si éste penetra el material. La alteración de estas propiedades se debe a cambios en el coeficiente de difusión molecular del migrante en la matriz. En consecuencia, la velocidad de migración hacia el alimento se altera. Atendiendo a esa capacidad de las moléculas para difundir en el entramado polimérico, de forma clásica se han propuesto tres modelos para describir la migración de los compuestos de bajo peso molecular (Catalá, 2000; Catalá y Gavara, 2002).

Modelo I: No migración. Cuando las moléculas tienen poca tendencia a difundir del interior del plástico hacia su superficie ($D_p < 10^{-12}$ cm²/seg) únicamente se transfieren los componentes situados en la superficie de contacto con el producto mediante un mecanismo de disolución. Este modelo se presenta en el

caso de aditivos combinados químicamente con el polímero, algunos antioxidantes y residuos de catalizadores (Catalá, 2000).

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. El coeficiente de difusión tiene un valor finito ($D_p > 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{seg}$), constante e independiente del tiempo y del tipo de producto que está en contacto (Galindo, 2004). A este modelo se ajustan las moléculas pequeñas: monómeros, oligómeros, subproductos de degradación y agentes antiestáticos y deslizantes, que ejercen su función en la superficie del material (Catalá, 2000).

Modelo III: Migración controlada por el alimento. Se requiere de la presencia del alimento, que interacciona con el material plástico modificando la estructura física y disposición molecular de la capa más próxima al producto, que se manifiesta en un hinchamiento progresivo del plástico, originándose un sistema multifásico no homogéneo caracterizado porque el coeficiente de difusión no permanece constante, sino que aumenta con el tiempo. Por lo que puede presentar $D_p < 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{seg}$ en ausencia del alimento y al entrar en contacto con él puede tener $D_p > 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{seg}$ (Galindo, 2004). La mayoría de los aditivos presentes en poliolefinas y poliestireno siguen este modelo cuando se ponen en contacto con fluidos y sustancias de naturaleza grasa (Catalá, 2000).

Segunda Etapa: Solvatación o disolución en la interfase alimento-envase.

En la segunda etapa, que se desarrolla en la interfase entre el alimento y el polímero, ocurre la solvatación o disolución de los migrantes en el alimento, produciéndose un equilibrio químico (Catalá, 2000; Catalá y Gavara, 2002).

Tercera Etapa: Dispersión en el alimento.

La tercera y última etapa representa la dispersión del migrante en el alimento. El migrante llega aquí ya solvatado por el alimento. Si el alimento es sólido, un líquido muy viscoso o el producto envasado no sufre manipulaciones que agiten el contenido, el migrante difunde en el alimento de acuerdo con las mismas leyes de la primera etapa (Catalá, 2000; Catalá y Gavara, 2002).

Factores que influyen en la migración.

Los factores más importantes que influyen en la migración son (Catalá, 2000):

- La densidad del plástico
- Concentración del migrante
- Temperatura
- Naturaleza de la fase de contacto
- Espesor del material
- Superficie del material en contacto
- Factores mecánicos
- Diferencias morfológicas y estructurales en la matriz polimérica originadas durante el proceso de fabricación

Actualmente varios antioxidantes se incorporan a los envases plásticos para retrasar el efecto de la oxidación lipídica de los alimentos. Por ejemplo, algunos envases para cereales para el desayuno contienen BHT. Debido a que el oxígeno y la luz primero atacan a la superficie del alimento (Lee y cols., 2004), y al encontrarse el antioxidante entre el envase y el alimento, resulta muy útil para dar esta protección inmediata al ser liberado constantemente hacia el alimento, en este caso al cereal.

Estudios de migración de antioxidantes en envases plásticos hacia alimentos o simulantes

Dentro de los primeros estudios de migración de antioxidantes que se hicieron está, el de Till y cols. (1982) pero desde un punto de vista estrictamente de seguridad. En este estudio se comparó el comportamiento de migración de BHT desde polietileno de alta densidad (PEAD) en agua y aceite de oliva a 40°C por 10 días. La migración en el aceite de oliva fue más rápida, pues se perdió totalmente el antioxidante de la película, mientras que en agua se perdió sólo el 0.5%, lo cual lo atribuyeron al carácter lipófilo del BHT, ambos en el periodo de tiempo antes mencionado.

Wessling y cols. (1998), evaluaron la movilidad de α -tocoferol (0.04 %) y BHT (0.25 %) desde PEBD hacia aceite de girasol y etanol (95 %) almacenando en oscuridad a 4 y 20°C por 7 semanas. Observaron que la migración de α -tocoferol fue más lenta que el BHT, este último se perdió totalmente de la película durante la primera semana de almacenamiento para todos los tratamientos. Después, Wessling y cols. (2000a) evaluaron el efecto de metales traza (Fe y Cu), el pH, temperatura (6 y 40°C) y la concentración de etanol sobre la migración de α -tocoferol (0.0035 y 0.0075%) desde películas de PEBD. Observaron que los metales aceleran la migración del antioxidante, los ácidos, contrarrestan dicho efecto, y una concentración de etanol mayor a 50 % causa una pérdida total, mientras que a concentraciones menores, el antioxidante es retenido en la película. A todos los factores anteriores, se les suma el de la temperatura que al aumentar favorece la migración del antioxidante.

A la par de la migración, también se ha evaluado el efecto de los antioxidantes en estudio. Por ejemplo Huang y Hueng (1998), evaluaron la migración y el efecto antioxidante de BHT (4 %) desde polietileno (PE) hacia músculo de

pescado (4°C). Observaron que en un período de 50 h se había perdido entre 37.5 y 55 % de BHT de la película. Así también observaron que el BHT ofreció buena protección contra la oxidación lipídica encontrando 50% menos especies reactivas al ácido tiobarbitúrico que el grupo testigo.

Wessling y cols. (2000) evaluaron la migración y la habilidad antioxidante de BHT (0.029 %) y α -tocoferol (0.07 y 0.395 %) desde PEBD hacia avena a 20, 30 y 40°C. Observaron que en todos los tratamientos, el BHT se perdió totalmente de la película en menos de 2 días de almacenamiento. En lo referente a α -tocoferol, a 20°C tuvo su máxima migración a las 6 semanas de almacenamiento, mientras que a 30 y 40°C se retuvo durante los primeros 8 días, que fue el tiempo total que se probó para esas temperaturas. En cuanto a la habilidad como antioxidante, se observó que el BHT ofreció una mejor protección que el α -tocoferol en la avena almacenada a 20°C. Así también, Galindo (2004) evaluó la migración y efectividad de BHT (0.085 %) desde PEBD hacia aceite de soya almacenado a 25°C y luz. Observó que la migración total se dio a las 5 h y que la película con antioxidante ofreció mucha mejor protección contra la oxidación del aceite que la película testigo.

Como se mencionó antes, el tipo de polímero y simulante o alimento juegan un papel muy importante en la migración de componentes de películas plásticas. Así lo observaron Tawfik y Huyghebaert (1999), quienes evaluaron la migración y estabilidad oxidativa de aceite de girasol, oliva y palma en los plásticos cloruro de polivinilo (PVC), poliéster (PET), polipropileno (PP) y poliestireno (PS), cuyas formulaciones contenían una mezcla de BHT (0.035-0.180 %) y BHA (0.017-0.180 %). El almacenamiento fue a 24 y 37°C. Observaron que la migración se dio a una baja velocidad, la cual fue dependiente de la concentración inicial del antioxidante en el plástico, así como de la temperatura y tiempo de almacenamiento. Observaron también que la migración de los antioxidantes fue

así: aceite de girasol> aceite de oliva>aceite de palma. También observaron que los antioxidantes en las películas no tuvieron efecto en la estabilidad de los aceites y sí lo tuvo la velocidad de transmisión de oxígeno de los materiales plásticos, por lo que el orden de estabilidad de los aceites respecto a los polímeros quedó así PVC≥PET>PP>PS.

En lo referente a coextrusión, Lee y cols. (2004) compararon el comportamiento de migración y la efectividad de BHT (0.1137 %) y α -tocoferol (0.0073 %) desde un coextruido de Ionómero/Etil vinil acetato (EVA)/PEAD, conteniendo el antioxidante en la capa de Ionómero/EVA, hacia un modelo liofilizado de ácido linoleico a 23 y 45°C. A 23°C se observó que en un período de 2 semanas, se había perdido aproximadamente el 50 % de BHT, mientras que el tocoferol se había perdido en un 10 %. A 45°C, para el día 6 de almacenamiento, el BHT ya no se encontraba en las películas, mientras que el α -tocoferol había tenido una pérdida de aproximadamente 75 %. En cuanto a efectividad, el BHT retardó más la oxidación lipídica en el modelo que el α -tocoferol a 45°C.

Posteriormente, Chick (2002) evaluó la migración de BHT desde diferentes coextruidos hacia arroz (21 y 38°C) por 8 semanas. Los coextruidos que utilizaron fueron:

- 1) PET(12 μ m)/Polipropileno biorientado(17 μ m),
- 2) PET(12 μ m)/PEAD orientado(29 μ m),
- 3) PET metalizado (12 μ m)/Polietileno lineal de baja densidad (51 μ m) y
- 4) PP (22 μ m)/Polietileno lineal de baja densidad (38 μ m).

El BHT que se probó en 4 concentraciones, fue agregado en el adhesivo que unió a las dos capas. Chick observó que a 21°C las combinaciones 2 y 4 liberaron el BHT tres veces más rápido que 1 y 3. También observó que la migración máxima se dio dentro de los primeros cinco días de almacenamiento. A 38°C observaron un comportamiento similar, sólo que el BHT se liberó

aproximadamente dos veces más rápido desde la combinación 1 a esta temperatura que a 21°C.

Legislación

La migración de componentes del envase hacia el alimento en ocasiones puede afectar la salud del consumidor. Por lo tanto, es importante que las legislaciones de los diferentes países generen reglamentaciones para establecer límites de *migración global y específica*. Por migración global, se entiende la cantidad total de componentes conocidos o no, del material de envase que son transferidos al alimento en las condiciones de preparación y almacenamiento menos favorables. La migración específica se refiere a la cantidad de una sustancia concreta e identificable que es transferida al alimento (Angulo y Suárez, 1997).

A nivel internacional, actualmente existen dos legislaciones que han especificado límites máximos de migración global. Una de ellas es la de la Unión Europea, la cual establece que los fabricantes de envases y equipamientos plásticos en contacto con alimentos, están obligados a demostrar la calidad de sus productos ante las autoridades. Esta legislación dispone que la migración global no deba exceder de 60 mg/kg ó 10 mg/dm². La segunda legislación es la de MERCOSUR, que es más restrictiva que la de la Unión Europea, estableciendo un límite máximo de 50 mg/kg u 8 mg/dm² (Ariosti, 2002). Dicho límite también está establecido por la FDA en su Código de Regulaciones Federales para los antioxidantes BHT, BHA y galato de propilo (Codex of Federal Regulations, 2006).

En el desarrollo de nuevos productos alimenticios, es de suma importancia asegurar que todos sus requisitos sanitarios se practiquen. De la misma manera ocurre con los envases que los contienen. Por lo tanto, es primordial determinar

la migración del envase para conocer si cumple con las legislaciones correspondientes.

Como se ha observado, la grasa del queso es susceptible a oxidarse y los métodos convencionales para reducir el problema no son integralmente satisfactorios. Atendiendo a que la luz y el oxígeno atacan primeramente la superficie del alimento originando la oxidación lipídica y, a que existe escasa información sobre migración de antioxidantes desde envases hacia productos lácteos, es necesario diseñar y elaborar películas plásticas con baja permeabilidad a gases y conteniendo antioxidantes, como el BHT, para conocer la migración del mismo y su efecto sobre la estabilidad oxidativa del queso.

HIPÓTESIS

La liberación de BHT del material de envase hacia el queso asadero, retarda la propagación de reacciones oxidativas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar una película plástica por coextrusión, conteniendo BHT, evaluar su migración y su efecto en la oxidación de queso tipo asadero.

Objetivos específicos:

- Diseñar, fabricar y caracterizar películas plásticas coextruidas adicionadas con BHT.
- Evaluar la velocidad de migración de BHT desde las películas hacia queso asadero.
- Evaluar el efecto de BHT migrado desde las películas, en la oxidación de queso asadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se desarrolló en 2 etapas. En la primera se diseñaron, elaboraron y caracterizaron las películas coextruidas (o tricapa) con diferentes concentraciones de BHT. En la segunda etapa, se aplicaron las películas desarrolladas en queso asadero y se determinó la velocidad de migración de BHT y su efecto antioxidante en la estabilidad oxidativa del queso. La figura 7 muestra el diagrama de flujo de la metodología general.

Etapa 1 Diseño, elaboración y caracterización de películas coextruidas con BHT

Diseño de las películas

En base a la VTO requerida para un envase para queso, se diseñaron películas tricapa buscando una estructura como se muestra en el cuadro 3. Para la PA se decidió utilizar un espesor de 22.8 μm para ofrecer barrera al oxígeno y un buen vacío. En el caso del Adhesivo se consideró utilizar 2.6 μm , ya que con ese espesor se logró unir la capa externa e interna y abarcó toda la burbuja. Finalmente, el espesor de PEBD se diseñó para completar un espesor total al utilizado en las películas comerciales para queso, que es alrededor de 76.2 μm (Coextruded Plastic Technologies, Inc., 2006).

Para establecer las concentraciones de BHT (TCl, Japón) a utilizar, se consideró tanto la máxima cantidad permitida en alimentos por la FDA (0.02 % de la materia grasa), como la suposición de que migrara todo el antioxidante al alimento (50 mg/Kg) (Codex of Federal Regulations, 2006).

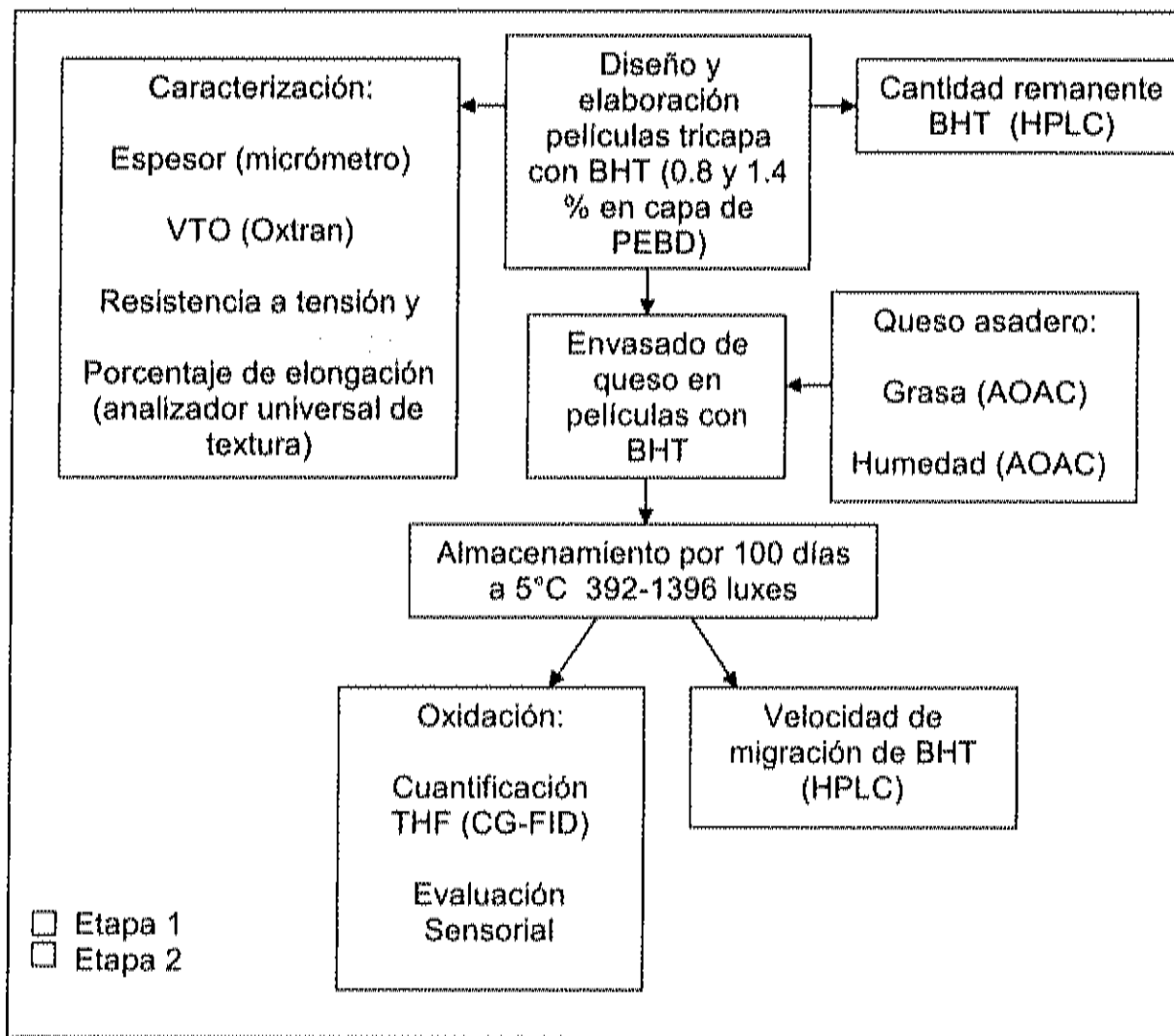


Figura 7. Diagrama general de la metodología utilizada para este estudio.

Cuadro 3. Estructura meta de las películas diseñadas

CAPA	MATERIAL	ESPESOR (μm)
Externa	Poliamida (Honeywell®, E.U.A.)	22.8
Intermedia	Adhesivo (Capron®, E.U.A.)	2.6
Interna	PEBD (Equistar®, E.U.A.)	50.8

Además, fue necesario considerar que una porción de BHT agregado se pierde durante la elaboración. Lo anterior se ha observado en otros estudios de película monocapa de PEBD cuyas pérdidas fueron de 45% (Wessling y cols., 1998), de 50 a 70 % (Huang y Weng, 1998) y de 30 a 57 % (Galindo, 2004). Después de los cálculos pertinentes, las concentraciones que se eligieron para adicionar fueron: 0, 0.8 y 1.4 % de BHT en la capa de PEBD. La máxima cantidad permitida a migrar del BHT en este caso fue de 48 mg/Kg de queso, que es el equivalente al 0.02% de materia grasa del queso del presente estudio.

Fabricación de las películas

Las películas se obtuvieron mediante el uso de 3 extrusores a nivel planta piloto (Beutelspacher, México) acoplados a un mismo cabezal para coextrusión para formar la película tricapa (capa externa: PA; capa intermedia: Adhesivo; y capa interna: PEBD). Previo a la formación de las películas y, con el fin de obtener las resinas de PEBD con las diferentes concentraciones de BHT lo más homogéneas posible, se realizó una *peletización* para cada una. Este proceso consistió en mezclar los *pellets* de PEBD con el BHT (0.8 y 1.4 %) y procesarlos en un extrusor (figura 8-foto 1) (130°C) para obtener un filamento (figura 8-foto 2). El filamento se enfrió (figura 8-foto 3) y se cortó en pequeños trozos dando lugar así a los nuevos *pellets* de PEBD con BHT (figura 8-foto 4). Después, se colocaron la PA y el adhesivo en sus correspondientes extrusores y los *peletizados* de PEBD con BHT en sus diferentes concentraciones uno tras otro, así como el PEBD sin BHT para formar la película Testigo (figura 9), de ese modo se obtuvieron 3 rollos de películas tricapa (uno de cada concentración de BHT) (figura 10). Las condiciones de elaboración se muestran en el cuadro 4.

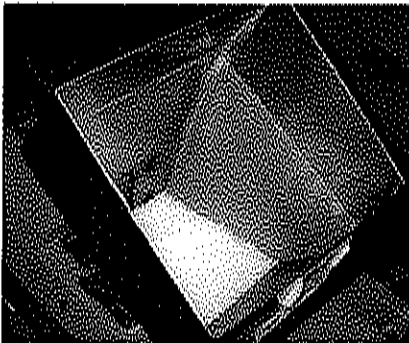


Foto 1

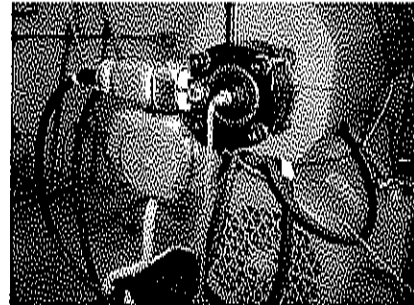


Foto 2

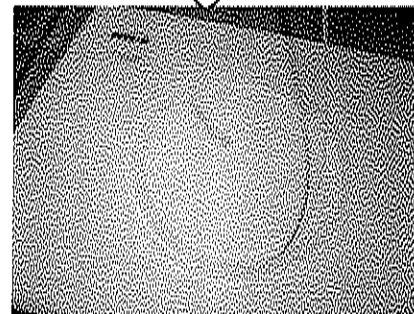


Foto 3

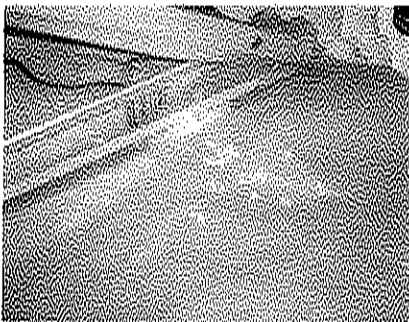
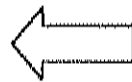


Foto 4

Figura 8. Proceso de *peletización* de PEBD con BHT. FOTO 1: tolva de alimentación. FOTO 2: filamento extrudido. FOTO 3: enfriado del filamento. FOTO 4: corte manual de los filamentos.

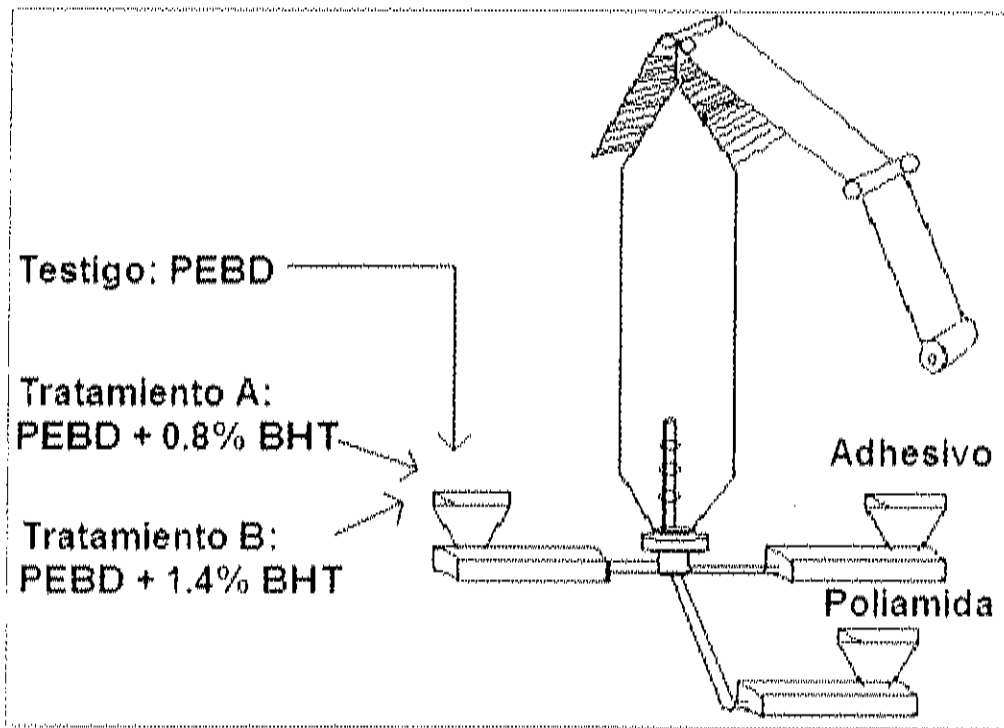


Figura 9. Esquema de proceso de elaboración de películas trícapa con diferentes concentraciones de BHT.

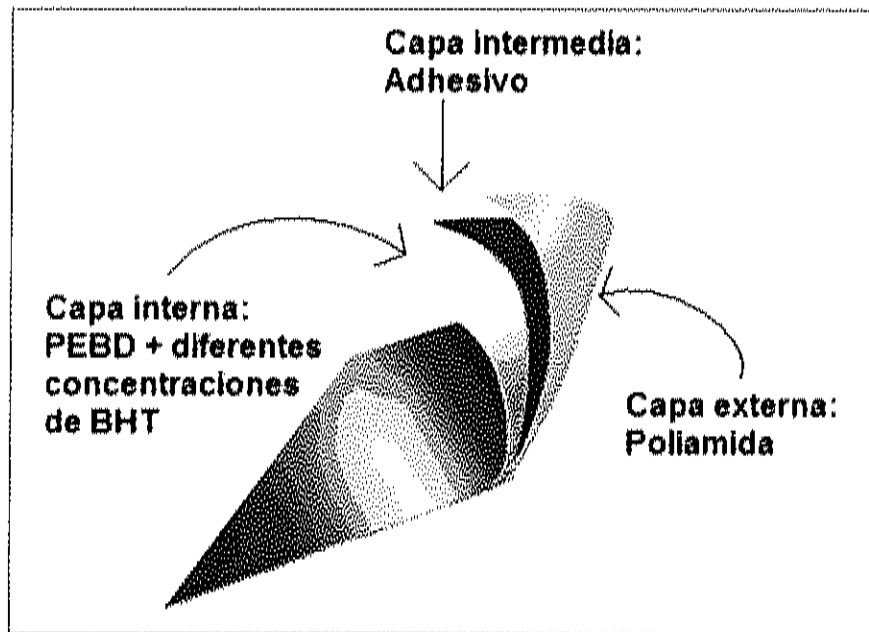


Figura 10. Diagrama de películas tricapa.

Cuadro 4. Condiciones de fabricación de películas tricapa

EXTRUSOR	RANGO DE TEMPERATURAS (°C)
Capa interna (PEBD)	140-165
Capa intermedia (adhesivo)	105-115
Capa externa (PA)	150-175

Una vez elaboradas las películas, se les hizo una extracción y cuantificación de BHT como se describe en la siguiente sección. Además, para conocer el comportamiento de retención del BHT en los rollos de película, se realizó una segunda extracción a los 48 días de elaboradas y habiéndose mantenido en refrigeración (4-7°C).

Determinación de BHT en las películas tricapa

A las películas elaboradas, se les cuantificó la cantidad remanente de BHT por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por el método establecido por Galindo (2004) con modificaciones. Un área de 144 cm² de película (~ 1.1 g) se cortó en piezas de aproximadamente 1 cm². Para la extracción de BHT, a la película cortada se le agregaron 250 mL de acetonitrilo grado HPLC (JT Baker, Xalostoc, México), se puso en agitación constante y reflujo a 60°C por 10 hr. Después se tomó una alícuota y se filtró con un microfiltro de membrana de 0.22 µm Durapore (Millipore, Cork, Ireland). Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

La cuantificación de BHT se llevó a cabo mediante un equipo HPLC Varian modelo 9012, acoplado a un detector de fluorescencia 9075, un inyector de 7125 con una capacidad de 10 µL y una estación de trabajo Star 5 (Varian, México). Se utilizó una columna C18 Omnipher de 150 x 4.6 mm de D.I., protegida por una precolumna de 5 cm de longitud. El flujo de la fase móvil de metanol/agua (98:2) grado HPLC (JT Baker, Xalostoc, México) fue de 1 mL/min, manteniéndose isocráticamente. Se utilizó un factor de detección de 2 y las longitudes de onda usadas fueron de 282 y 308 nm de emisión y excitación, respectivamente.

La cuantificación se realizó con un estándar de BHT, con el cual se preparó una curva de calibración de 1, 10, 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$ usando como solvente acetonitrilo. Para obtener la ecuación de la curva se graficó la concentración de BHT contra el área obtenida en el cromatograma. Los resultados se expresaron en mg/g de BHT en película.

Con el fin de conocer la eficiencia del proceso de elaboración de las películas tricapa, se estimó la cantidad de BHT agregada en la capa de PEBD equivalente a la distribuida en el peso de la película tricapa, de la siguiente manera:

Se inició agregando en su correspondiente extrusor la resina de PEBD solamente. Una vez que se lograron las condiciones de diámetro y espesor de dicho material, se agregó simultáneamente y en su correspondiente extrusor, la resina de PA, por lo que en esta fase se obtuvo una película bicapa (PA/PEBD) con los espesores meta para la película tricapa. Enseguida se tomó una muestra representativa de dicha película bicapa ($\sim 10 \text{ m}$), de la cual aleatoriamente se tomaron 6 muestras de 144 cm^2 , se separaron las 2 capas y se registró el peso de PEBD en esa área para obtener una media.

Después se agregó el adhesivo en su correspondiente extrusor, dando lugar a las películas tricapa como se mencionó previamente. Una vez elaboradas las películas, se tomaron muestras (144 cm^2) de diferentes tramos de los rollos y se registró su peso para obtener nuevamente una media de cada rollo con diferente concentración de BHT. Se hipotetizó que de ese peso total de película, el peso de PEBD obtenido de la película bicapa se mantuvo constante en la película tricapa. De ese modo fue posible calcular la cantidad de BHT en las películas tricapa, para que al momento de obtener los resultados de la extracción de BHT, por diferencia, conocer el porcentaje de retención tanto en la película entera como en la capa de PEBD solamente.

Caracterización de las películas

Espesor. El espesor se determinó mediante un micrómetro EJ Cady and Co. modelo DTT (EUA). Se tomaron 6 diferentes tramos de película y se hicieron 10 mediciones a cada uno. Los resultados se expresaron en micras (μm).

Velocidad de transmisión al oxígeno (VTO). La VTO se midió en un equipo OXTRAN MS 2/20 (Mocon) de acuerdo a la norma ASTM D 3985-81 (1988). El área de la muestra fue de 95 cm^2 . El análisis se realizó por duplicado, una muestra de espesor delgado y otra de espesor grueso para conocer los valores extremos de VTO. Los resultados se expresaron en $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$.

Resistencia a la tensión y porcentaje de elongación. La resistencia a la tensión y porcentaje de elongación se determinaron mediante un Analizador Universal de Textura Zwick/Roell (ASTM D 882-91, 1992). La velocidad de carga utilizada fue de 50 mm/min y la carga máxima fue de 500 N (Newton). Se realizaron 10 repeticiones por cada tratamiento en dirección máquina. Los resultados para la resistencia a la tensión se expresaron en N/mm^2 .

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), considerando como efecto principal la concentración de BHT en las películas. La unidad experimental fue la película plástica. El modelo estadístico se presenta a continuación:

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

Donde:

Y_{ij} : efecto sobre las películas (resistencia a la tensión y porcentaje de elongación)

μ : media general

T_i : concentración de BHT en película

ϵ_{ij} : error experimental

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95%. En caso de encontrarse diferencias significativas, se procedió a realizar una comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$) mediante el programa estadístico Number Cruncher Statistical Systems (NCSS, 2001).

Etapa 2 Determinación de la velocidad de migración de BHT desde la película y su efecto en la oxidación lipídica de queso.

Origen y composición del queso

El queso con el que se trabajó fue de tipo asadero y se obtuvo de la empresa Productores Unidos de Rayón (Rayón, Sonora) como parte de su producción estándar. Se eligió al queso asadero para la presente investigación ya que en estudios preliminares comparativos con queso fresco y queso crema, se observó que el queso asadero fue el más adecuado, además el productor se encuentra en la región. Los análisis proximales de humedad y grasa se realizaron de acuerdo a sus respectivos métodos oficiales de la AOAC (AOAC, 2000a; AOAC, 2000b).

Envasado y almacenamiento del queso

Se utilizó queso del mismo lote de producción. Para los análisis de migración y cuantificación de la oxidación se utilizaron quesos de 7 x 10 cm con 1.5 cm de espesor (100±5 gr) y para evaluación sensorial de 3.5 x 10 cm con 1.5 cm de

espesor (50 ± 5 g). Los quesos se envasaron al vacío (-1 bar) (selladora manual de vacío Loma Q NT-300/2 DOO-IL RS Co. Ltd.) en las películas (16 x 12.5 cm) con las diferentes concentraciones de BHT.

Los quesos se almacenaron a $5\pm 1^\circ\text{C}$ y 392-1396 luxes de iluminación, rotándolos cada 5 días para minimizar diferencias por exposición a la luz. Para los análisis, se homogenizó todo el queso contenido en el envase para después tomar la cantidad de muestra requerida según la variable a analizar.

Determinación de la velocidad de migración de BHT en películas

La migración se determinó analizando el BHT perdido por las películas de los tratamientos A y B con el método para la determinación de BHT en las películas, descrito en la primera etapa del trabajo, procurando que el área elegida estuviera totalmente en contacto con el queso. Los muestreos se realizaron a los 0, 1.5, 3, 5, 20, 40, 60, 80 y 100 días de almacenamiento. En cada muestreo, el queso se retiró de las películas las cuales se limpiaron superficialmente para reducir al mínimo la pérdida de BHT. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. Los resultados se expresaron en mg/g de BHT en película y la velocidad de migración se expresó graficando la concentración de BHT en las películas contra el tiempo de almacenamiento.

Medición de oxidación en queso

Cuantificación de THF en queso por espacio de cabeza. En estudios preliminares con queso asadero adicionado con BHT y sometido a condiciones oxidantes, se buscaron e identificaron compuestos volátiles que presentaran una respuesta con respecto a la presencia del antioxidante mediante cromatografía

de gases acoplada a un espectrómetro de masas (Apéndice A). Después se procedió al establecimiento del procedimiento de cuantificación (Apéndice B) cuyas condiciones finales, procedimiento y estandarización se presentan a continuación.

Se estableció un procedimiento para la cuantificación de THF por espacio de cabeza utilizando un cromatógrafo de gases (CG) Varian Star 3400CX acoplado a un detector de ionización de flama (FID) y a la estación de trabajo Star Chromatography Version 4.0, equipado con una columna Supelco Wax 10 30m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno.

La cuantificación de THF en queso se realizó a los 0, 20, 40, 60, 80 y 100 días de almacenamiento. Se colocaron 30 g del homogenizado obtenido de las muestras de queso asadero en un vial de 40 mL al que se le adicionó 5 μ L de una solución estándar de 4-metil-2-pentanona (4M2P) (Sigma St. Louis, MO) como estándar interno (24 mg/mL 4M2P) utilizando hexano (Sigma-Aldrich, E.U.A.) como solvente, y se tapó con tapa horadada y septa de silicón. Se aplicó un calentamiento a 90°C/30min, se tomaron 25 μ L del espacio de cabeza y se inyectaron (jeringa gastight de 25 μ L, Hamilton, U.S.A.) en el cromatógrafo de gases-FID. Se utilizó un programa de temperaturas iniciando a 30°C/2 min, con un incremento a 40°C a 1°C/min, seguido de otro a 200°C a 10°C/min, y manteniéndose en 200°C/2 min. El flujo del gas acarreador (nitrógeno) fue de 1 mL/min, la temperatura del inyector de 220°C y la del detector de 200°C. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento. Los datos se expresaron en μ g/g de THF en queso.

La curva de calibración se preparó adicionando los estándares a 30 g de queso (almacenado a -20°C y descongelado 24 h antes de su uso a 4-7°C) al que previamente se había confirmado la ausencia de THF, realizando una inyección del espacio de cabeza del homogenizado de queso sólo, por el procedimiento

antes mencionado. Se usaron cinco puntos para preparar la curva de calibración agregándolos al queso para eliminar la variación que éste aporta: 16, 24, 40, 47 y 79 $\mu\text{g/g}$ de THF (J.T. Baker, U.S.A.), en queso. La concentración de 4M2P se mantuvo en 4 $\mu\text{g/g}$. El cociente de áreas de THF/4M2P fue la respuesta utilizada para estandarizar el procedimiento. Para determinar la linealidad se calculó la recta de regresión $y = a + bx$, donde x fue la concentración y y la respuesta THF/4M2P, también se calculó el coeficiente de correlación lineal (R^2).

El límite mínimo de cuantificación (LOQ) se calculó agregando una concentración de 16 $\mu\text{g/g}$ de THF al queso y se fue disminuyendo hasta 11.3 $\mu\text{g/g}$ de THF en queso, concentración en la que el área de la señal no pudo ser integrada (~ 500 unidades). Se consideró como LOQ la concentración inmediatamente superior a la que no pudo ser integrada. La repetibilidad del procedimiento se analizó calculando el coeficiente de variación (CV) para las respuestas de 6 inyecciones del espacio de cabeza en queso que se les agregó 24 $\mu\text{g/g}$ de THF y 4 $\mu\text{g/g}$ de 4M2P. El porcentaje de recuperación se determinó agregando 24 $\mu\text{g/g}$ de THF y 4 $\mu\text{g/g}$ de 4M2P. Esta determinación se realizó por triplicado. El porcentaje de recuperación se calculó en base a la concentración de estándares agregados.

Entrenamiento de Panel para Evaluación Sensorial Para determinar el efecto de los tratamientos en el olor del queso, 7 panelistas fueron semi-entrenados en una sala de evaluación sensorial. Durante 4 sesiones, a los panelistas se les proporcionaron 2 referencias de queso (10 g) en vasos de poliestireno de 15 mL de capacidad, con tapa y mantenidos a $14 \pm 1^\circ\text{C}$. Los quesos (almacenados a -20°C y descongelados 24 h antes de su uso a $4-7^\circ\text{C}$) utilizados tanto como referencias y como muestras para el entrenamiento, fueron de una producción diferente al queso contenido en las películas de los diferentes tratamientos (películas con diferentes concentraciones de BHT conteniendo el queso). La

referencia positiva fue de queso que sometido a irradiación ultravioleta (UV) por 10 min para provocar la oxidación de las grasas, mediante una lámpara General Electric G15 T8 de 15 Watt. La otra referencia consistió en un queso sin ningún tratamiento.

El entrenamiento consistió en presentar a los panelista las referencias antes mencionadas bien identificadas. Simultáneamente se realizó el mismo procedimiento con las referencias pero sin ser reconocidas por el panelista, para observar si éste era capaz de detectar la presencia de oxidación en el queso. A los panelistas se les indicó que olieran primero las referencias identificadas y en base a ellas ubicar a las referencias sin identificar de acuerdo a la intensidad de oxidación percibida en una escala no estructurada de 13 cm (figura 11).

Evaluación Sensorial Cinco panelistas mostraron suficiente sensibilidad para diferenciar el olor del queso sometido a condiciones oxidantes al responder acertadamente al 100% de las evaluaciones aplicadas durante el entrenamiento. Por lo tanto, dichos panelistas participaron en la evaluación sensorial de olor de queso cada día de muestreo (20, 40, 60, 80 y 100 días).

A cada panelista se le presentaron 10 g del homogenizado obtenido de las muestras de cada tratamiento y el testigo. En cada muestreo los panelistas dispusieron de dos referencias que se prepararon igual que las referencias para el entrenamiento.

A los panelistas se les indicó que olieran primero las referencias y enseguida las muestras en un orden específico. Después se les pidió ubicar en una escala no estructurada de 13 cm (cada centímetro equivalió a un punto en la escala) la intensidad de oxidación de la muestra, que iba desde "nada oxidado" (cero) a "muy oxidado" (trece) (figura 12) (Pedrero y Pangborn, 1989).

Nombre: _____ Fecha: _____

INSTRUCCIONES: Primeramente huelga las referencias que se le presentan. Después huelga las muestras de izquierda a derecha e indique con una X su intensidad de oxidación

Intensidad de oxidación

Muestra 777	-----	Muy oxidado
	Nada oxidado	
501	-----	Muy oxidado
	Nada oxidado	

Figura 11. Formato para entrenamiento en evaluación de olor

La intensidad de oxidación se determinó colocando una regla en la escala y midiendo la distancia desde su inicio hasta la indicación de la intensidad de oxidación registrada por el panelista. El análisis se hizo por duplicado para cada tratamiento. Los resultados se graficaron para cada tratamiento colocando en el eje de las x los días de almacenamiento y en el eje de las y el promedio de las respuestas de intensidad de oxidación proporcionada por los panelistas para cada tratamiento.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se realizó un análisis completamente al azar para la determinación de la velocidad de migración de BHT para las diferentes concentraciones de BHT, considerando como covariable el tiempo de almacenamiento. La unidad experimental fue la película tricapa. El modelo estadístico fue así:

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

Donde:

Y_{ij} : % de pérdida de BHT en las películas

μ : media general

βx_{ij} : efecto de la covariable (tiempo de almacenamiento)

T_i : Tratamiento A y Tratamiento B

ϵ_{ij} : error experimental

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1 Elaboración y caracterización de películas coextruídas con BHT

Determinación de BHT en las películas tricapa

La concentración final de BHT en la capa de PEBD de las películas después de su elaboración fue de 0.78 y 0.98 %, para los Tratamientos A y B, respectivamente (cuadro 5). Esta cantidad corresponde al 97.5 y 70 % de la cantidad adicionada originalmente a la capa de PEBD de los Tratamientos A y B, respectivamente.

Para ambos tratamientos, la cantidad consumida y/o evaporada de BHT durante su elaboración fue baja en comparación a estudios como el de Galindo (2004), quien en películas monocapa de PEBD con concentraciones de 0.05, 0.1 y 0.2 % de BHT, encontró que el porcentaje remanente fue de 70.3, 51.2 y 42.7 %, respectivamente. Esta diferencia se puede deber a que en el presente estudio se utilizaron temperaturas más bajas de elaboración (datos no reportados en el estudio de Galindo, 2004), lo que disminuyó notablemente el riesgo de que el BHT se volatilizara o se consumiera al atrapar radicales libres producidos durante la oxidación de los polímeros por acción de elevadas temperaturas.

Además, las películas del presente estudio se elaboraron en equipos distintos a las películas de Galindo (2004). Asimismo, se observó que a mayor cantidad de BHT agregado, menor fue la cantidad recuperada; 97% para el Tratamiento A y 70% para el Tratamiento B. Lo anterior concuerda con el estudio de Galindo (2004).

Cuadro 5. Concentración y porcentaje remanente de BHT en las películas tricapa

Concentración agregada de BHT (mg/g de BHT en película)	Concentración después de elaboración (mg/g de BHT en película)	Remanente (%)
Testigo: 0	0	0
Tratamiento A: 3.6 ¹	3.5±0.24 ³	97.5±6.66
Tratamiento B: 6.2 ²	4.3±0.60 ⁴	70.0±10.03

¹ Equivale a 0.80 % de BHT en capa de PEBD

² Equivale a 1.40 % de BHT en capa de PEBD

³ Equivale a 0.78 % de BHT en capa de PEB

⁴ Equivale a 0.98 % de BHT en capa de PEB

Los resultados están expresados en medias ± desviación estándar de 4 réplicas

Adicionalmente, se realizó una nueva extracción a las películas de los rollos que tenían 48 días de elaboradas y habían permanecido en refrigeración (cuadro 6). Como se puede observar, no hubo pérdida de antioxidante durante ese tiempo ya que la concentración de BHT en la capa de PEBD para el Tratamiento A en ese período de tiempo estuvo entre 0.77 y 0.78 % y para el Tratamiento B estuvo entre 0.98 y 1.07%. A partir de este punto, se identifica como Tratamiento A a la película con 0.78 % de BHT en la capa de PEBD, y al Tratamiento B a la película con 0.98 % de BHT en la capa de PEBD.

Por lo tanto, bajo esas condiciones se puede concluir que la capa de PA al no tener afinidad con el BHT, actúa como barrera impidiendo su rápida volatilización al medio ambiente y de este modo las películas sólo requieren de refrigeración durante su almacenamiento. Es importante enfatizar que existen pocos estudios donde se haya analizado la retención de los antioxidantes en las películas después de cierto tiempo de almacenamiento y en condiciones determinadas. Chick (2002), observó que la cantidad de BHT adicionado en el adhesivo en diferentes materiales de películas multicapa (para observar cuáles materiales, remitirse a página 27) en rollo, no cambió en un período de tiempo prolongado (sin reportar cuánto tiempo ni temperatura de almacenamiento).

Galindo (2004), observó que en películas monocapa de PEBD con 0.085% de BHT en contacto con aceite de soya y almacenadas a 25°C, el antioxidante migró al ambiente entre 50.8 y 69.4 % en 4 h. Por lo tanto, las películas debían ser almacenadas en congelación (-20°C) a manera de precaución. Wessling y cols. (2000), observaron en películas monocapa de PEBD con 0.29 % de BHT conteniendo avena, que el BHT se perdió completamente de las películas en menos de 2 días de almacenamiento a 20°C, asumiendo que la mayor cantidad se evaporó al ambiente.

Cuadro 6. Retención de BHT en diferentes películas en rollo almacenadas en refrigeración a 4°C.

Días de almacenamiento	Tratamiento A: Película adicionada con 0.8 % BHT en PEBD (%)	Tratamiento B: Película adicionada con 1.4 % BHT en PEBD (%)
2	0.78±0.06	0.98± 0.14
48	0.77±0.02	1.07±0.05

Los resultados están expresados en medias ± desviación estándar de 4 réplicas

Caracterización de las películas

Espesor. El espesor de las películas es un factor importante tanto para la velocidad de transmisión a los gases, como para las propiedades mecánicas y en este caso también, para la liberación del antioxidante. En el cuadro 7 se muestran los espesores de las películas tricapa con las diferentes concentraciones de BHT que estuvieron entre 90 y 98 μm . Los espesores tanto de PEBD ($43.55 \pm 9.79 \mu\text{m}$) como de PA ($31.45 \pm 14.26 \mu\text{m}$) individualmente son diferentes a los planeados teóricamente (50.8 y 22.8 μm , respectivamente). Además, al incluir una nueva resina (adhesivo) en la coextrusión, altera el espesor total de la película tricapa (cuadro 7) que se puede deber a que esta resina tenía una temperatura más baja que las usadas para PEBD y PA (cuadro 4). Por ejemplo, en una microfotografía de una de las películas tricapa (figura 13) se observó que el espesor de la capa de PEBD no cambió con respecto al espesor esperado, en cambio el espesor de PA sí aumentó.

VTO. Las VTO obtenidas de las películas tricapa se muestra en el cuadro 8. Un requerimiento de envase para queso es evitar el ingreso del oxígeno. Específicamente, los envases para vacío deben poseer una VTO de 170 $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$ (Robertson, 1993b) y, en el presente estudio se lograron VTOs entre 21 y 47 $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$.

En el presente estudio se observó que el aumento en la VTO es inversamente proporcional al espesor. Este mismo comportamiento lo observó Galindo (2004) en película monocapa de PEBD, con VTOs más elevadas que oscilaron entre 7000 y 7800 $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$, sin embargo también los espesores fueron más delgados (26.67-31.75 μm). Por lo tanto, al comparar las presentes VTOs con las de monocapa de PEBD, se demuestra que la incorporación de PA en los coextruidos proporciona la barrera al oxígeno al reducir la VTO, ya que se ha

Cuadro 7. Espesores de películas tricapa con diferentes concentraciones de BHT

Tratamiento	Espesor (μm)
Testigo	90.97 \pm 24.01
A	94.95 \pm 24.36
B	98.42 \pm 22.48

Los resultados están expresados en medias \pm desviación estándar de 60 réplicas

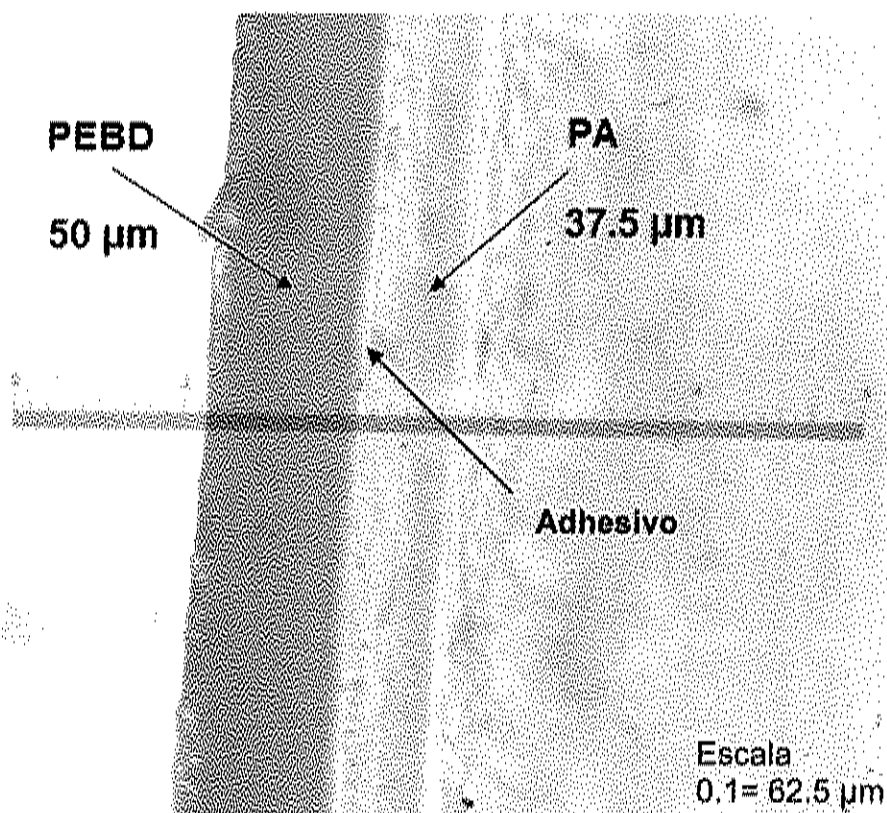


Figura 13. Microfotografía de película tricapa PEBD/Adhesivo/PA.

Cuadro 8. Rangos de VTO de las películas tricapa con diferentes concentraciones de BHT en PEBD

BHT en PEBD (%)	VTO a 25°C (cm ³ / m ² /día)	Espesor (µm)
Testigo	24.00-46.99	73
Tratamiento A	21.00-38.03	72-114
Tratamiento B	26.93-41.3	65-115

Datos de VTO provenientes de 2 réplicas

reportado que las películas de PA de 19.5 μm de espesor, pueden poseer VTOs tan bajas como de 50.5 $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{día}$ a 25°C (Soto-Valdez y Mendoza-Wilson, 1998). Así también, el espesor PA tiene un rol importante en el comportamiento de la VTO.

Por lo tanto, se observa que el espesor es un parámetro importante para definir la VTO pero sólo en películas de un mismo material. Así también, la VTO está dictada por el(los) material(es) que conforman las capas (Tawfik y Huyghebaert, 1999).

Resistencia a la tensión y porcentaje de elongación La resistencia a la tensión (22.5-36.8 N/mm^2) y el porcentaje de elongación (413.8-487.3 %) en dirección máquina se muestran en el cuadro 9. Estos resultados son ligeramente más elevados a los de Galindo (2004) quien para el caso de la resistencia a la tensión en película monocapa de PEBD encontró valores entre 23.81-26.34 N/mm^2 . Para el porcentaje de elongación, los datos fueron más elevados en el presente estudio que los de Galindo (2004) quien obtuvo datos entre 175 y 205 % (espesores 26.6-31.7 μm) que puede deberse a que los espesores del PEBD del presente estudio (que es el que proporciona la elasticidad) fueron más elevados (43 μm). Debido a lo anterior, es de esperar que al tener mayor espesor, las moléculas de PEBD de las películas del presente estudio tenían mayor capacidad de estirarse o desenredarse, provocando obtener películas con mayor elasticidad y elongación que las películas de Galindo (2004). Además, en el presente estudio se observó que ambas propiedades mecánicas aumentaron a la par que la concentración de BHT, lo cual puede ser indicativo de que el antioxidante tuvo un efecto directo en la capa de PEBD. En el estudio de Galindo (2004), que utilizó concentraciones más bajas de BHT en PEBD (0.05-0.2 %), no encontró efecto del antioxidante en las propiedades mecánicas.

Cuadro 9. Resistencia a la tensión y % de elongación en dirección máquina de las películas tricapa con diferentes concentraciones de BHT

BHT en PEBD (%)	Resistencia a la tensión (N/mm ²)	Elongación (%)
Testigo	22.58±3.2 ^a	413.87±32.31 ^a
Tratamiento A	31.03±4.82 ^b	446.75±24.41 ^b
Tratamiento B	36.87±3.75 ^c	487.38±31.53 ^c

Diferente superíndice dentro de la misma columna indica diferencias estadísticas ($p < 0.05$)

Los resultados están expresados en medias \pm desviación estándar de 10 réplicas

Etapa 2 Determinación de la velocidad de migración de BHT desde la película y su efecto en la oxidación lipídica de queso.

Composición del queso

El contenido de grasa en base húmeda y humedad en el lote de queso utilizado fueron de 24.00 ± 0 % y 52.91 ± 0.06 %, respectivamente.

Determinación de la velocidad de migración de BHT en películas

La pérdida de BHT de la película durante el almacenamiento se muestra en la figura 14. Como se puede apreciar, el comportamiento con el que se liberó el BHT de las películas fue muy parecido para ambos tratamientos. La mayor pérdida se presentó dentro de los primeros 20 días de almacenamiento, 63 y 67 %, para el Tratamiento A y B, respectivamente. A los 1.5 días la pérdida de BHT fue de 36 y 28 %, para el Tratamiento A y B, respectivamente. Entre los días 3 y 5, la pérdida fue de 32 % para ambos tratamientos, observándose por lo tanto una menor pérdida de BHT en el Tratamiento A, comparado con el día 1.5. En el día 40 se observó un ligero incremento inesperado de 48 y 60 %, para el Tratamiento A y B, respectivamente. Por último, a partir del día 60 no se observaron más pérdidas de BHT en ambos tratamientos.

Es de hacerse notar que la migración de BHT se dio de una manera paulatina comparado con la reportada por Galindo (2004), quien evaluó la migración de BHT (0.85 %) desde películas monocapa de PEBD en contacto con aceite de soya y almacenadas a 25°C, encontrando que la pérdida total del antioxidante se

dio a las 4 h. Lo anterior se atribuye a hechos como que en el presente estudio se utilizó una baja temperatura de almacenamiento, al estado físico y composición del queso, entre otros. Tawfik y Huyghebaert (1999) al analizar la migración de BHT desde diferentes materiales plásticos hacia diferentes aceites a 24 y 37°C, observaron que al incrementar la temperatura, la migración también se incrementaba incluso al doble.

Lee y cols. (2004) observaron que la velocidad de migración de BHT desde Ionómero/EVA/PEAD hacia un producto modelo de ácido linoleico se duplicó al aumentar la temperatura de 23 a 45°C. Además, el contenido de grasa y el estado físico del medio tienen un efecto en la afinidad del antioxidante hacia el alimento, observándose por ejemplo, que el BHT tiene menor afinidad a la leche en polvo que al aceite de maíz o a solventes orgánicos como heptano (Till y cols. 1982).

Como se mencionó antes, Galindo (2004) observó que en película monocapa de PEBD, el BHT puede evaporarse al medio ambiente hasta más del 50% en 4 h. Sin embargo, en el presente estudio suponemos que todo el antioxidante perdido de la película migró al queso debido a que la PA posee poca afinidad al BHT. De ese modo la PA pudo actuar como barrera para el BHT. Además cabe recordar que se observó que no hubo pérdidas de BHT durante el almacenamiento en rollo de las películas en refrigeración por un periodo de 48 días. Por lo tanto, en este estudio el comportamiento de migración del BHT se dio gradualmente al queso, por lo que se dieron las condiciones para que no fuera rápidamente consumido en el alimento ofreciendo así una protección

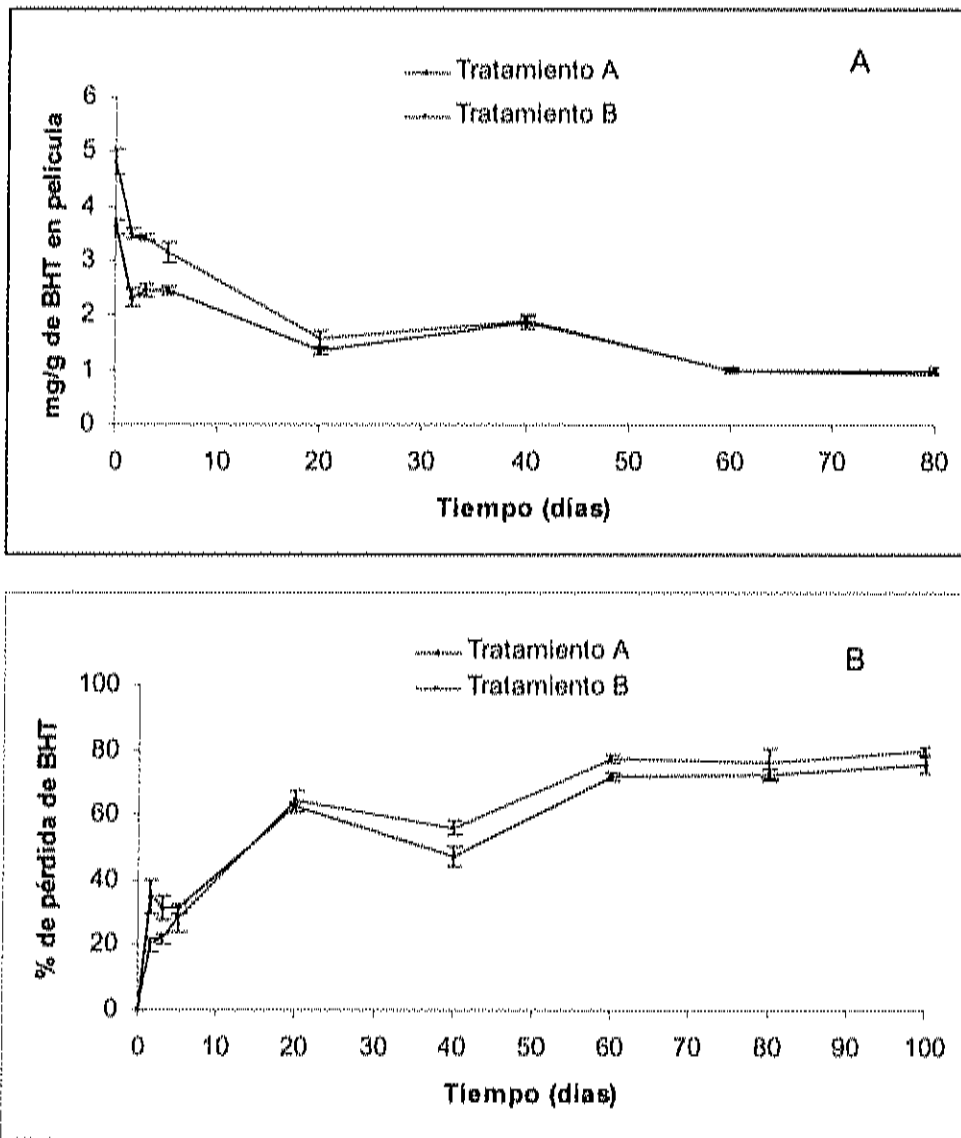


Figura 14. Migración de BHT desde películas tricapa a queso, A: en mg/g de película, B: porcentaje de pérdida de las películas.

prolongada contra la oxidación.

La concentración de BHT en queso se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$A = (B - C) (1.267) (100)$$

Donde:

A: $\mu\text{g/g}$ BHT en queso

B: cantidad retenida de BHT en 144 cm^2 de película (μg)

C: cantidad encontrada de BHT en 144 cm^2 de película a los 60 días de almacenamiento (μg)

1.267: razón de dividir área total de queso/área de película analizada ($182.5 \text{ cm}^2/144 \text{ cm}^2$)

100: peso promedio de las muestras de queso (g)

Considerando que todo el BHT perdido de la película migró al queso, se estimó que la cantidad de BHT para el día 100 fue de $42.42 \pm 1.07 \text{ mg/Kg}$ en el queso del Tratamiento A y $55.80 \pm 0.75 \text{ mg/Kg}$ para el Tratamiento B. Por lo tanto, la película del Tratamiento A se encontró dentro de los límites máximos permitidos por la FDA para su uso como aditivo, $<48 \text{ mg/Kg}$ que equivale al 0.02% de la materia grasa para el queso en este estudio. Tampoco excedió el límite máximo permitido a migrar por la FDA (50 mg/Kg). Sin embargo, la película del Tratamiento B superó ambos límites. Lo anterior fue debido a que para el diseño de las películas, se hipotetizó que sería una cantidad mayor de BHT lo que se consumiría durante la elaboración de las mismas.

En base a los resultados, se puede decir que en las condiciones de este experimento, el comportamiento de migración de BHT fue más lento que los reportados a temperaturas mayores (Galindo, 2004; Tawfik y Huyghebaert,

1999; Lee y cols., 2004) y que a partir del día 60 se volvió asintótico para ambos tratamientos, por lo que no aumentará significativamente su concentración en el queso, mismo que ya estaría en la etapa final de su vida de anaquel. Por lo tanto, estos resultados son útiles para tener en consideración en el momento de diseñar posteriores películas. Este comportamiento de migración se considera típico, ya que al ponerse en contacto la película con BHT con el queso, el antioxidante que se encontraba en mayor concentración en la película, se difundió hacia el queso hasta llegar al equilibrio en ambas fases (Catalá y Gavara, 2002).

Medición de oxidación en queso

Condiciones de estandarización de procedimiento de cuantificación de THF por espacio de cabeza. Durante el establecimiento del procedimiento de cuantificación de THF por espacio de cabeza, los valores de los coeficientes de variación (CV) estuvieron entre 4 y 12 %, que se consideran adecuados, ya que en otros estudios donde también se han cuantificado compuestos volátiles en queso, los coeficientes de variación oscilan entre 4-21 % (Sunesen y cols., 2002; Tavaría y cols. 2004; Leclercq-Perlat, 2004). La ecuación de regresión obtenida es como sigue:

$$y = 0.3694x - 0.978$$

La R^2 fue de 0.968 que se considera una correlación dentro de los límites reportados para estudios similares de cuantificación de compuestos volátiles (ácido acético, butanol, metano, butano, etc.) mediante nariz electrónica encontraron correlaciones entre 0.95 y 0.99 (Maricou y cols. 1998). Además, se debe tener en cuenta a su vez que son compuestos volátiles en pequeñas cantidades los que se están cuantificando (figura 15). En cuanto a la repetibilidad, dentro de las 6 inyecciones realizadas, se presentó una variación

de 6%, que representa la repetibilidad del procedimiento completo, incluyendo la preparación de la muestra y que también es un valor comparable con lo reportado el estudio de Maricou y cols. (1998), donde los valores estuvieron entre 3.2 y 7.5 %.

El porcentaje de recuperación del procedimiento fue de 111 ± 12 % y el LOQ del procedimiento fue de 12 $\mu\text{g/g}$ de THF en queso. Freire y cols. (2006) obtuvieron valores entre 73 y 124 % al determinar el porcentaje de recuperación de plastificantes en películas de PVC concluyendo que las películas no interferían en la determinación de tales componentes.

En el presente estudio se logró establecer y estandarizar un procedimiento para la cuantificación de THF en queso por espacio de cabeza. Este procedimiento requiere de pocos reactivos, es fácil, confiable y rápido.

Cuantificación de THF en queso por espacio de cabeza. El THF se encontró en el día 60 ($<12 - 24.5 \mu\text{g/g}$ de THF en queso) de muestreo y sólo en el queso contenido en la película testigo (sin antioxidante) (figura 16). Lo cual, para este análisis, parece indicativo de que el BHT protegió al queso de la oxidación lipídica. Así también se sospecha que no se encontró THF en el día 80 y 100 de almacenamiento debido a que es una molécula volátil y muy susceptible a formar peróxidos (Stecher, 1968) o pudo estar interactuando con otros componentes. Ya que se ha observado que los productos de la oxidación, pueden reaccionar por ejemplo, con las proteínas (Mortensen y cols., 2004; Wold y cols., 2002).

La mayoría de los productos de la oxidación de las grasas, son muy susceptibles a transformarse a otros compuestos y de ese modo disminuir su concentración con respecto al tiempo. Por ejemplo, en el estudio de Mortensen y cols. (2002a)

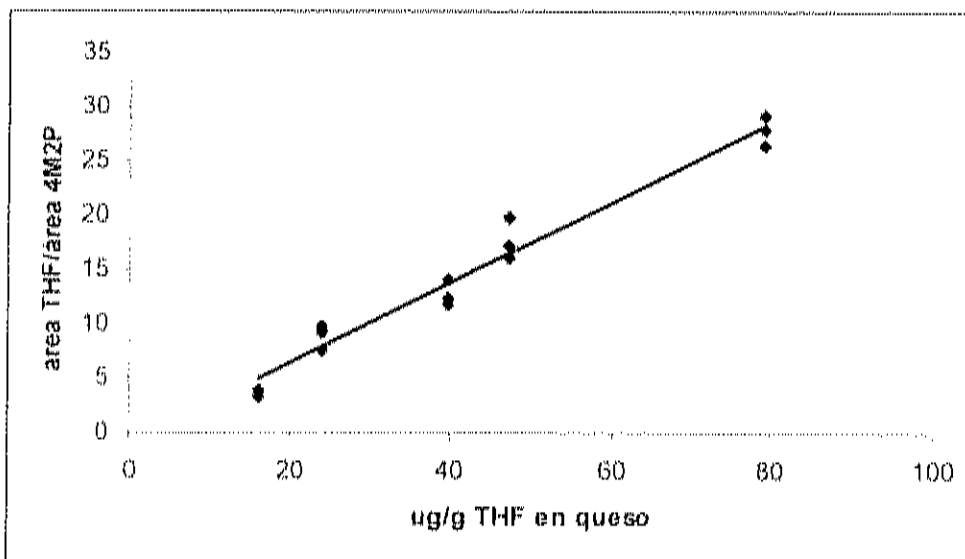


Figura 15. Curva estándar de tetrahidrofurano (THF) en queso. Determinada por cromatografía de gases-FID. Estándar interno: 4 $\mu\text{g/g}$ de 4-metil-2-pentanona (4M2P) en queso.

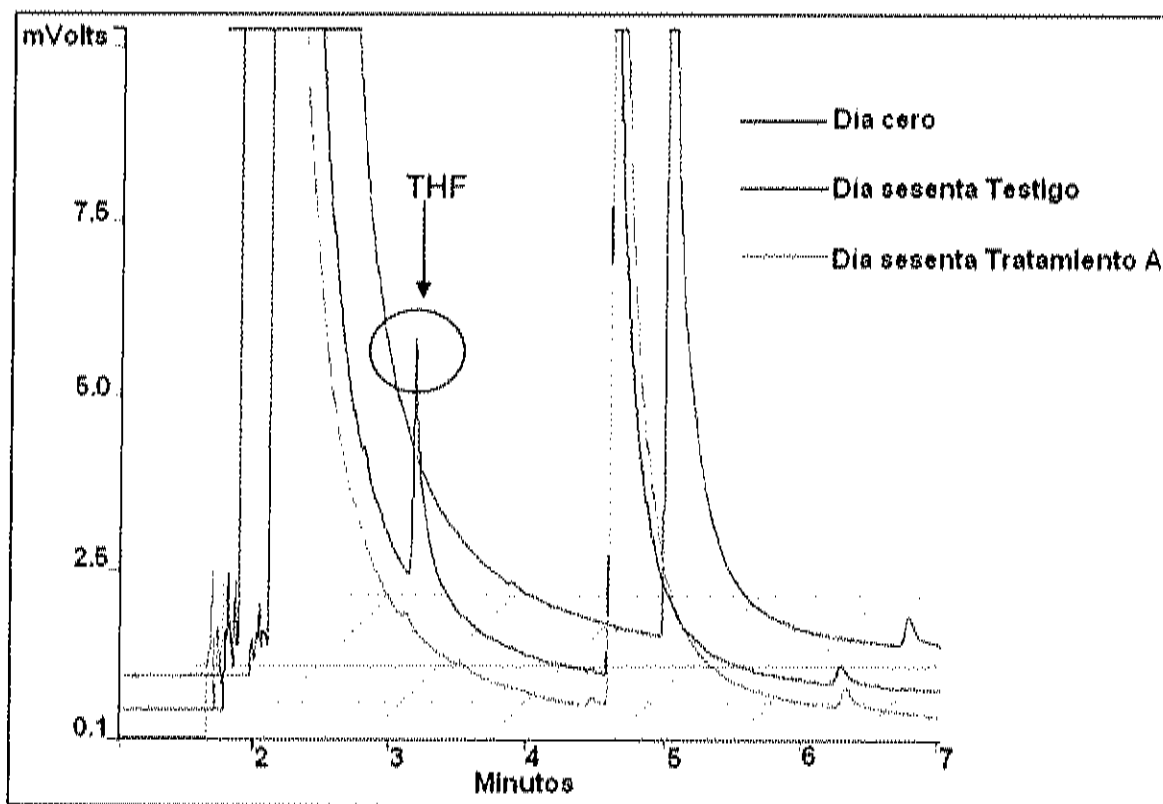


Figura 16. Cromatograma de CG-FID de espacio de cabeza de queso asadero almacenado a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ envasado en películas con diferentes concentraciones de BHT. Película Testigo: sin BHT; película de tratamiento A: 0.78 % de BHT en capa de PEBD.

de queso Havarti, encontraron las concentraciones más elevadas de hexanal, 1-pentanol y 1-hexanol a los 12.5 días de almacenamiento.

Existen otros estudios como el de Sunesen y cols. (2002) en el que en queso danés procesado (31 % de grasa) observaron que los compuestos volátiles octano, hexanal, heptanal, nonanal y octanal aumentaron con respecto al tiempo de almacenamiento. Un dato interesante también de ese estudio fue que la formación de 2-pentil-furano, decreció con respecto al tiempo, debido a que hay menos producción de este compuesto en presencia de luz.

Evaluación Sensorial de Olor Para estos resultados, se decidió trabajar con el Tratamiento A ya que se encontró dentro de los límites máximos permisibles de BHT en alimentos por la FDA. Se observó que ambos tratamientos fueron aumentando su intensidad de oxidación con respecto al tiempo hasta el día 60 y 80, para el Tratamiento A y Testigo, respectivamente. Después de ese tiempo ambos tratamientos empezaron a disminuir su intensidad de oxidación. Sin embargo, el Tratamiento A se mantuvo en niveles de intensidad alrededor de "medianamente oxidado" (figura 17).

Los compuestos volátiles que confirieron el olor oxidado al queso pudieron estar reaccionando con otros componentes de tal manera que tuvieron un máximo de intensidad de oxidación en cierto período de tiempo y después decrecieron. Dicho comportamiento se tiene bien documentado en otros estudios. Por ejemplo, Mortensen y cols. (2002a) observaron los cambios más drásticos en olor en queso Havarti (38 % grasa) en menos de 12 h de almacenamiento con luz (6°C). Mortensen y cols. (2003), encontraron cambios marcados en olor en queso Havarti (38.9% grasa) en las primeras 24 h de almacenamiento con luz (0-2°C). Así también Kristensen y cols. (2000), en el mismo tipo de queso que en los ejemplos anteriores (34 % grasa), reportaron que los panelistas notaron

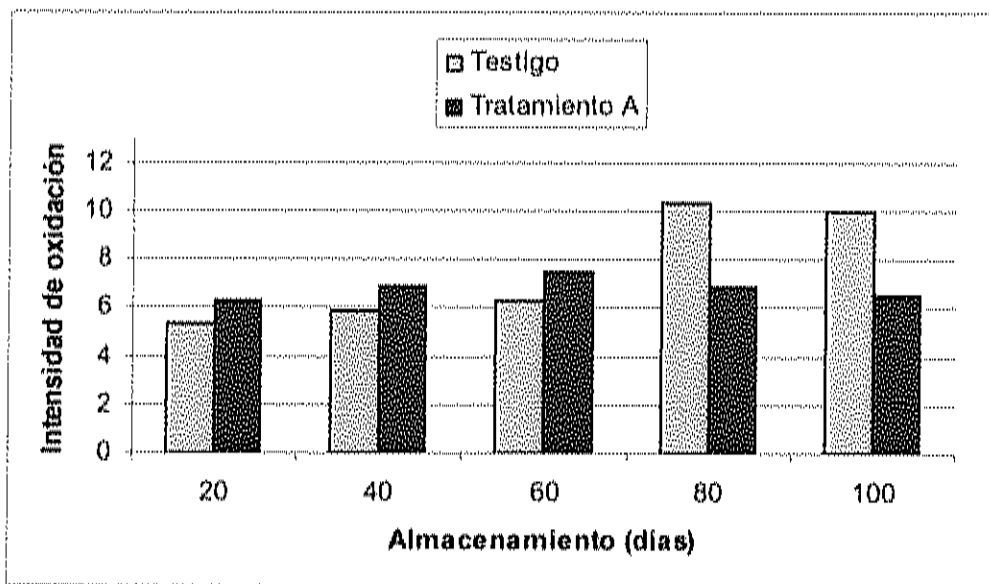


Figura 17. Evaluación sensorial de olor en queso asadero contenido en películas con diferentes concentraciones de BHT. Intensidad de oxidación 0: nada oxidado, 13: muy oxidado. Promedios de 5 panelistas que realizaron 2 análisis por cada tratamiento.

olores a ácido y rancio a los 4 días de exposición con luz (5°C).

La razón por la que originalmente se decidió realizar evaluaciones sensoriales cada 20 días se debe a que se especuló que por tener menos contenido de grasa el queso objeto del presente estudio, comparado con los mencionados previamente en Havarti, los cambios se darían de modo más gradual. Ya que en el estudio con queso con 24 % de grasa, se reportó la presencia de THF a los 21 días de almacenamiento. Sin embargo, en ese estudio los cambios sensoriales más notables en olor y textura se presentaron entre el día 0 y 4 de almacenamiento. Por lo que la recomendación es que en posteriores estudios hacer evaluaciones sensoriales en menos días de almacenamiento, ya que de acuerdo a los resultados se hipotetiza que se pudieran observar cambios más marcados en menos de 20 días de almacenamiento.

Juric y cols. (2003) encontraron THF en queso Samsø (24 % grasa, mismo contenido que del queso del presente estudio), observaron que el THF se correlacionó con los atributos sensoriales de rancio-ácido. Tales descriptores concuerdan con lo encontrado en el presente estudio, ya que varios panelistas hicieron hincapié en percibir un olor ácido para los quesos almacenados en la película Testigo (días 60 y 80). En el presente estudio, pudo suceder que los panelistas detectaron oxidación porque se encontraban compuestos volátiles diferentes al THF que le podían conferir el olor a oxidado al queso. También pudo ocurrir que el THF se formó antes de los primeros 20 días de almacenamiento y reaccionó con otros componentes después de ese tiempo, diluyendo su concentración en la mayoría de los tratamientos (excepto para el día 60 del Testigo donde se formó en mayor concentración).

CONCLUSIONES

Se elaboró un envase plástico tricapa (PA/Adhesivo/PEBD) conteniendo BHT (0.8 % en la capa de PEBD) que presentó una alta retención del antioxidante después de su elaboración. También presentó una buena barrera al oxígeno, resistencia a la tensión y porcentaje de elongación. La velocidad de migración de BHT de la película hacia el queso fue mayor durante los primeros 20 días de almacenamiento a 5°C.

El indicador de oxidación (THF) se detectó a los 60 días de almacenamiento y sólo en el queso envasado en la película sin BHT, lo que no coincidió con el análisis de evaluación sensorial donde fue hasta el día 80 que los panelistas detectaron mayor intensidad de oxidación en el queso contenido en la película sin BHT, comparado con la película con antioxidante.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de vida útil de las películas del presente estudio a temperatura ambiente, que son las condiciones habituales de comercialización de materiales de envases pasivos o tradicionales.

Profundizar sobre el efecto de BHT en la resistencia a la tensión y porcentaje de elongación de las películas.

Realizar estudios para conocer el mecanismo de formación de THF en el queso del presente estudio.

Realizar estudios de evaluación sensorial y cuantificación de THF en periodos más cortos que los utilizados en el presente estudio. En el caso de evaluación sensorial, para observar si existen cambios marcados antes de los primeros 20 días de almacenamiento; y para la cuantificación de THF, para observar en cuáles tratamientos se pudiera estar produciendo antes del período de almacenamiento mencionado previamente.

Evaluar la migración de BHT desde las películas del presente estudio hacia análogos de queso y su efecto en su estabilidad oxidativa.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersson K. y Lingnert H. 1998. Influence of Oxygen Concentration and Light on the Oxidative Stability of Cream Powder. *Lebensm-Wiss U Technol* **31**: 169-176.
- Ángeles M. 2006. Aditivos en la Industria Cárnica y Láctea. *Carnilac* **21(2)**: 36-38.
- Ángeles-Montiel R., Móra-Flores J.S., Martínez-Damián M.A. y García-Mata R. 2004. Efecto de las Importaciones de Leche en el Mercado Nacional del Producto. *Agrociencia* **38(5)**: 555-564.
- Angulo I. y Suárez G. 1997. "Materiales Plásticos para uso Alimentario: Legislación, Normativa y Recomendaciones". Disponible en: <http://www.plastunivers.com/Tecnica/Hemeroteca/ArticuloCompleto.asp?ID=5721>. Fecha de acceso: Febrero 20 de 2005.
- AOAC. 2000a. AOAC Official Method 948.12 Moisture in Cheese. En: Official Methods of Analysis AOAC International. Volumen II, edición 17. Editado por: Horwitz W. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. pp. 33-70.
- AOAC. 2000b. AOAC Official Method 995.18 Fat in Cream. En: Official Methods of Analysis AOAC International. Volumen II, edición 17. Editado por: Horwitz W. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. pp. 33-55 a 33-56.
- Ariosti A. 2002. Aptitud Sanitaria de Envases y Materiales Plásticos en Contacto con Alimentos. En: Migración de Componentes y Residuos de Envases en Contacto con Alimentos. Editado por: Catalá R y Gavara R. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, España. pp. 89-90.
- ASTM. 1988. Standard Test Method for Oxygen Gas Transmission Rate Through Plastic Film and Sheeting Using a Coulometric Sensor (D 3985-81). American Society for Testing Materials Standard. Annual Book of ASTM Standards.
- ASTM. 1992. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting (D 882-91). American Society for Testing Materials Standard. Annual Book of ASTM Standards.

- Badui S. 1999. Lípidos. En: Química de los alimentos. Editado por: Badui S. Addison Wesley Longman, México. pp. 259-260.
- Brown W.E. 1992. Properties of Plastics Used in Food Packaging. En: Plastics in Food Packaging. Editado por: Brown W.E. Marcel Dekker Inc. E.U.A. pp. 129-130.
- Catalá R. 2000. Migración en Envases de Materiales Plásticos. En: Memorias II Congreso RISEA-2000. Editado por: Soto-Valdez H. México. pp. 83-93.
- Catalá R. y Gavara R. 2002. Fundamentos y Mecanismos de los Fenómenos de Migración. En: Migración de Componentes y Residuos de Envases en Contacto con Alimentos. Editado por: Catalá R y Gavara R. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC. España. pp. 3-4.
- Cheese and cheese making. 2002. Disponible en: <http://www.cip.ukcentre.com/20.htm>. Fecha de acceso: Mayo 14 de 2005.
- Chick J. 2002 Antioxidant Delivery Method. Worlpack 2002. Improving the Life Through Packaging Innovation. Volumen 1. CRC Press. E. U. A. pp. 144-149.
- Choe E. y Min D.B. 2006. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5: 169-186.
- Code of Federal Regulations. 2006. Food and Drugs. Disponible en: <http://www.washingtonwatchdog.org/documents/cfr/title21/part181.html>. Fecha de acceso: Noviembre de 2006.
- CODEX STAN 192-1995. 2005a. General Standard for Food Additives. pp. 21. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/4/CXS_192e.pdf. Fecha de acceso: Noviembre 14 de 2006.
- CODEX STAN 192-1995. 2005b. General Standard for Food Additives. pp. 75. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/4/CXS_192e.pdf. Fecha de acceso: Noviembre 14 de 2006.
- Coextruded Plastic Technologies, Inc. Disponible en: www.cptplastics.com. Fecha de acceso: Noviembre 27 de 2006.

- During A., Mazette S., Combe N. y Entressangles B. 2000. Lipolysis Stability of Soft Ripened Cheeses Containing Vegetable Oils. *J Dairy Res* **67**: 461-466.
- Frankel E.B. 1982. Volatile Lipid Oxidation Products. *Prog Lipid Res* **22**: 1-33.
- Freire M.T. de A., Santana I.A. y Reyes F.G.R. 2006. Plasticizers in Brazilian Food-packaging Materials Acquired on the Retail Market. *Food Addit Contam.* **23(1)**: 93-99.
- Galindo C. 2004. Migración del BHT de Películas de PEBD y su Efecto en la Estabilidad del Aceite de Soya. *Tesis de Maestría*. CIAD. México.
- Hong C.M., Wendorff W.L. y Bradley Jr. R.L. 1995. Factors Affecting Light-induced Pink Discoloration of Annatto-colored Cheese. *J Food Sci* **60**: 94-97.
- Huang C. y Weng Y. 1998. Inhibition of Lipid Oxidation in Fish Muscle by Antioxidant Incorporated Polyethylene Film. *J Food Process Pres* **22**: 199-209.
- Informes de Comercio Exterior de México. Disponible en: www.bancomext.com. Fecha de acceso: Abril 5 de 2006.
- Javanmardi J., Stushnoff C., Locke E., Vivanco J.M. 2003. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Iranian Ocimum* accessions. *Food Chem* **83(4)**: 547-550.
- Jenkins W.A. y Harrington J.P. 1991a. The Chemistry and Manufacture of Polymers Used in Packaging. En: *Packaging Foods with Plastics*. Editado por: Jenkins WA y Harrington JP. Technomic Publishing Co. E.U.A. pp. 36-61.
- Jenkins W.A. y Harrington J.P. 1991b. Dairy Products. En: *Packaging Foods with Plastics*. Editado por: Jenkins WA y Harrington JP. Technomic Publishing Co. E.U.A. pp. 159.
- Juric M., Bertelsen G., Mortensen G. y Petersen M.A. 2003. Light-induced Colour and Aroma Changes in Sliced, Modified Atmosphere Packaged Semi-hard Cheeses. *Int Dairy J* **13**: 239-249.
- Kim G., Lee J. y Min D.B. 2003. Study of Light-induced Volatile Compounds in Goat's Milk Cheese. *J Agric Food Chem* **51**: 1405-1409.

- Kondo K. 1990. Plastic Containers. En: Food Packaging. Editado por: Kadoya T. Academic Press. E.U.A. pp. 130-132.
- Kristensen D., Hansen E., Arndal A., Trinderup R.A. y Skibsted L.H. 2001. Influence of Light and Oxidative Stability of Processed Cheese. *Int Dairy J* **11**: 837-843.
- Kristensen D., Orlie V., Mortensen G., Brockhoff P. y Skibsted L.H. 2000. Light-induced Oxidation in Sliced Havarti Cheese Packaged in Modified Atmosphere. *Int Dairy J* **10**: 95-103.
- Kristensen D. y Skibsted L.H. 1999. Comparison of Three Methods Bases on Electron Spin Resonance Spectrometry for Evaluation of Oxidative Stability of Processed Cheese. *J Agric Food Chem* **47**: 3099-3104.
- Leclercq-Perlat M.N., Corrieu G. y Spinnler H.E. 2004. Comparison of Volatile Compounds Produced in Model Cheese Medium Deacidified by *Debaromyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*. *J Dairy Sci* **87(5)**: 1545-1550.
- Lee Y.S., Shin H., Han J., Lee M. y Giacín J.R. 2004. Effectiveness of Antioxidant-impregnated in Retarding Lipid Oxidation. *J Sci Food Agric* **84**: 993-1000.
- Lindsay S. 1992. Method Development. En: High Performance Liquid Chromatography 2nd Edition. Editado por: Barnes J. John Wiley & Sons. London. pp. 236.
- Maricou H., Pereira L., Verschuere S., Philips S. y Verstraete W. 1998. Measurements of Some Volatile Compounds by Means of the Electronic Nose. *Water Air Soil Poll.* **107**: 423-442.
- Martin N., Berger C., le Du C. y Spinnler H.E. 2001. Aroma Compound Production in Cheese Curd by Coculturing with Selected Yeast and Bacteria. *J Dairy Sci* **84**: 2125-2135.
- Mestdagh B., De Meulenaer J., De Clippeleer J., Devlieguere F. y Hyghebaert A. 2005. Protective Influence of Several Packaging Materials on Light Oxidation of Milk. *J Dairy Sci* **88**: 499-510.
- Mortensen G., Bertelsen G., Mortensen B.K. y Stapelfeldt H. 2004. Light-induced Changes in Packaged Chesse-a Review. *Int Dairy J* **14**: 85-102.

- Mortensen G., Sørensen J., Danielsen B. y Stapelfeldt H. 2003. Effect of Specific Wavelengths on Light-induced Quality Changes in Havarti Cheese. *J Dairy Res* **70**: 413-421.
- Mortensen G., Sørensen J. y Stapelfeldt H. 2002a. Effect of Light and Oxygen Transmission Characteristics of Packaging Materials on Photo-oxidative Quality Changes in Semi-hard Havarti Cheeses. *Packag Technol Sci* **15**: 121-127.
- Mortensen G., Sørensen J. y Stapelfeldt H. 2002b. Light Induced Oxidation in Semihard cheeses. Evaluation of Methods Used to Determine Levels of Oxidation. *J Agric Food Chem* **50**: 4364-4370.
- Nasanovsky M.A., Garijo R.D. y Kimmich R.C. 2001. Lecheria. Disponible en: <http://www.hipotesis.com.ar/hipotesis/Agosto2001/Catedras/Lecheria.htm>.
- NCSS. 2001. Number Cruncher Statistical Systems. Programa Estadístico para Windows, Hintze J.L.; U.S.A..
- NOM-121-SSA1.1994. Norma Oficial Mexicana Bienes y Servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados. Especificaciones Sanitarias. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14.html>. Fecha de acceso: Mayo 11 de 2006.
- Pedrero D.L. y Pangborn R.M. 1989. Métodos analíticos. En: Evaluación Sensorial de los Alimentos. Editado por: Pedrero D.L. y Pangborn R.M. Alhambra Mexicana, México. pp. 78-79
- Posati L.P. y Orr M.L. 1976. Cheeses, Natural and Process; Cheese Foods, Cheese Spreads. En: Composition of Foods: Dairy and Egg Products Raw-processed-prepared. Editado por: Posati L.P. y Orr M.L. Government Printing Office, E.U.A. pp. 01-004 a 01-048.
- Robertson G.L. 1993a. Processing and Converting of Thermoplastic Polymers. En: Food Packaging. Editado por: Robertson G.L. Editorial Marcel Dekker, E. U. A. pp.112-115.
- Robertson G.L. 1993b. Packaging of Dairy Products. En: Food Packaging. Editado por: Robertson G.L. Editorial Marcel Dekker, E. U. A. pp. 527.
- Robertson G.L. 1993c. Safety and Legislative Aspects of Packaging. Editado por: Robertson G.L. Editorial Marcel Dekker, E. U. A. pp.648-649.

- Robertson G.L. 1993d. Structural Properties of Plastic Polymers. Editado por: Robertson G.L. Editorial Marcel Dekker. E. U. A. pp. 26-28.
- Robertson G.L. 1993e. Optical and Mechanical Properties of Thermoplastics Polymers. Editado por: Robertson G.L. Editorial Marcel Dekker. E. U. A. pp. 64-65.
- Rojas de Gante C. 2001. Envases Biopoliméricos Activos: Envases Inteligentes. Disponible en: <http://www.mfy.itesm.mx/die/ddre/transferecia/56/56-III.05.html>. Fecha de acceso: Mayo 20 de 2005.
- Sieber R. 2005. Oxidized Cholesterol in Milk and Dairy Products. *Int. Dairy J.* **15**: 191-206.
- Soto-Valdez H. y Mendoza-Wilson A.M. 1998 Permeabilidad al Oxígeno y al Vapor de Agua de Películas Plásticas Utilizadas en el Envasado de Productos Hortofrutícolas y Cereales. II. *Horticultura Mexicana*. **6(2)**: 81-90.
- Soto-Valdez, H., Peralta, E. y Munguía-López, M. 1999. Materiales Plásticos Utilizados en Envases de Alimentos. III Congreso del Noroeste en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Universidad de Sonora, Hermosillo, Son. Del 1 al 6 de noviembre de 1999.
- Stecher P.G. 1968. Tetrahydrofuran. En: The Merck Index. Octava edición. Editado por: Stecher P.G. Merck Index & CO. Inc E.U.A. pp. 1026.
- Sunesen L.O., Lund P., Sørensen J. y Hølmer G. 2002. Development of Volatile Compounds in Processed Cheese During Storage. *Lebensm-Wiss u-Technol* **35**: 128-134.
- Tavaria F.K., Silva Ferreira A.C. y Malcata J. 2004. Volatile Free Fatty Acids as Ripening Indicators for Serra da Estrela Cheese. *J Dairy Sci* **87(12)**: 4064-4072.
- Tawfik M.S. y Huyghebaert A. 1999. Interaction of Packaging Materials and Vegetable Oils: Oil Stability. *Food Chem* **64**: 451-459.
- Till D.E., Ehntholt D.J., Reid R.C., Schwartz P.S., Sidman K.R., Schwoppe A.D. y Whelan R.H. 1982. Migration of BHT Antioxidant From High Density Polyethylene Foods and Food Simulants. *Ind Eng Chem Prod Res Dev* **21**: 106-113.

- Urbach G. 1993. Relations Between Cheese Flavour and Chemical Composition. *Int Dairy J.* **3**: 389-422.
- van Aardt M., Duncan S.E., Marcy J.E., Long T.E. y Hackney C.R. 2001. Effectiveness of Poly(ethylene terephthalate) and High-density Polyethylene in Protection of Milk Flavor. *J Dairy Sci* **84**: 1341-1347
- van Aardt M., Duncan S.E., Marcy J.E., Long T.E., O'Keefe S.F. y Nielsen-Sims S.R. 2005a. Effect of Antioxidant (α -tocopherol and Ascorbic Acid) Fortification on Light-induced Flavor of Milk. *J Dairy Sci* **88**: 872-880.
- van Aardt M., Duncan S.E., Marcy J.E., Long T.E., O'Keefe S.F. y Nielsen-Sims S.R. 2005b. Aroma Analysis of Light-Exposed Milk Stored with and Without Natural and Synthetic Antioxidants. *J Dairy Sci* **88**: 881-890.
- van Aardt M., Duncan S.E., O'Keefe S., Marcy J.E., Long T.E. y Nielsen S. 2001. Controlled Release of Antioxidants From Polymeric Films to Control Lipid Oxidation in Milk. *Int. Animal Agric. Food Sci Conference*, Indianapolis. Disponible en: <http://www.fass.org/fass01/pdfs/Duncan.pdf>.
- Vidaud C.Z.E., Gallo A.D.M. y Gonzalez G.E. 1998. Enranciamiento en Algunos Productos Lácteos de Humedad Intermedia Durante su Almacenamiento. *Rev Cubana Aliment Nutr* **12(1)**: 24-8.
- Wessling C., Nielsen T., Leufvén A. y Jägerstad M. 1998. Mobility of α -tocopherol and BHT in Contact With Fatty Food simulants. *Food Addit Contam* **15(6)**: 709-715.
- Wessling C., Nielsen T. y Giacín J.R. 2000. Antioxidant Ability of BHT- and α -tocopherol-impregnated LDPE Films in Packaging Oatmeal. Antioxidant Ability and Interactions with Food. PhD Thesis, Lund University, Sweden. Paper V.
- Wessling C., Nielsen T. y Leufvén A. 2000a. Influence of Trace Metals, Acids and Ethanol in Food Simulating Liquids in the Retention of α -tocopherol in Low-density Polyethylene Film. *Food Addit Contam* **17(8)**: 713-719.
- Wessling C., Nielsen T. y Leufvén A. 2000b. The Influence of α -tocopherol Concentration on the Stability of Linoleic Acid and the Properties of Low-density Polyethylene. *Packag Technol Sci* **13**: 19-28.
- Wold J.P., Jørgensen K. y Lundby F. 2002. Nondestructive Measurement of Light-induced Oxidation in Dairy Products y Fluorescence Spectroscopy and Imaging. *J Dairy Sci* **85**: 1693-1704.

APÉNDICE A

Identificación de compuestos volátiles y prueba de interacción BHT-queso.

Estas pruebas se realizaron para conocer cuáles compuestos volátiles se produjeron en el queso asadero en condiciones oxidantes. Además, observar cuáles de esos componentes se inhibían con respecto a la presencia de BHT.

Primera prueba de interacción BHT-queso

A 100 g de queso se les adicionó 5.8 mg de BHT (TCI, Japón) y se homogenizaron. Otros 100 g de queso sin antioxidante se utilizaron como testigo, también se homogenizaron para equiparar las condiciones. Se sometieron a condiciones oxidantes de almacenamiento: 30°C/ luz (>2000 luxes) (During y cols., 2000) y envasado en películas de PEBD con alta VTO (~ 7000 cm³/m²/día). Los muestreos se realizaron a los 0, 5, 8 y 12 días de almacenamiento. Se realizó un análisis por tratamiento y los resultados se presentaron en cromatogramas.

Para llevar a cabo la identificación de compuestos volátiles, se colocaron 5 g de queso en un vial ámbar de 30 mL con tapón horadado y septa de silicón, y se sometió a calentamiento a 60°C/30 min. Se tomó un volumen de inyección de 250 µL del espacio de cabeza y se analizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-masas) y a la estación de trabajo Varian Version 4.1. Se utilizó una columna DB5 Factor 4 (Varian) 30 m longitud y DI 0.25 µ. Se utilizó un programa de temperaturas iniciando a 40°C/12 min, con

un incremento a 230°C a una velocidad de 8°C/min, y manteniéndose en 230°C/9 min. Las condiciones analíticas fueron las siguientes: gas acarreador, Helio; temperatura de trampa iónica, 200°C; temperatura de inyección, 220°C; y temperatura de línea de transferencia, 230°C.

Segunda prueba de interacción BHT-queso

Se realizó una segunda prueba con condiciones más controladas en la que nuevamente se tomaron 100 g de queso al que se le agregó 20 mg de BHT. Después se colocaron porciones de 25 g en bolsas de PEBD y se sellaron. Simultáneamente, se realizó el mismo procedimiento con 100 g de queso sin BHT, como testigo. Los quesos se almacenaron en condiciones oxidantes: 30°C y luz (>2000 luxes). Los muestreos se realizaron a los 0, 3 y 9 días de almacenamiento, con un análisis por tratamiento. La preparación de la muestra, así como su análisis en el CG-masas, fue igual que en la sección anterior. Los resultados se presentaron en cromatogramas.

La identificación se llevó a cabo por la comparación de los patrones de fragmentación de los posibles componentes con los de la biblioteca del equipo. Para confirmar, se compararon los tiempos de retención y los patrones de fragmentación de los compuestos puros a los que se les aplicó el mismo tratamiento que a las muestras de queso.

Resultados de prueba de identificación de compuestos volátiles y prueba de interacción BHT-queso.

Primera prueba de interacción BHT-queso

En este experimento se trató de identificar productos de la oxidación volátiles en queso producidos durante el almacenamiento. Aparecieron algunos compuestos volátiles que se presentaban sólo en ciertos días de muestreo y de modo no consecutivo. Por ejemplo, 3-metil-2-hexanona (1.81 min), 3-metil-butanal (2.32 min) y 3-metil-1-butanol (3.38 min).

A los 5 días de almacenamiento en el queso que no contenía BHT se detectó un compuesto que parecía ser tetrahidrofurano (THF) (2.08 min) (figura 18), mientras que en el queso que contenía BHT apareció este mismo compuesto pero hasta el octavo día de almacenamiento. El THF se tiene reportado como un producto de la oxidación de las grasas del queso (Juric y cols., 2001). En tal estudio se detectó una concentración máxima equivalente a 1.5 mg/L de THF en agua a los 21 días (luz/5°C). En el presente trabajo se confirmó THF sometiendo el estándar al procedimiento descrito para espacio de cabeza y comparado con los iones principales del THF: 41, 55 y 71 (figura 19).

Como se mencionó antes, de acuerdo con lo reportado en la bibliografía el THF en queso es producto de la oxidación de grasas. Sin embargo, no se encontraron referencias que explicaran el mecanismo por medio del cual se forma (de cuál ácido graso proviene). No obstante, sí se encontró la formación de un furano el cual se puede tomar como posible antecesor de THF. La

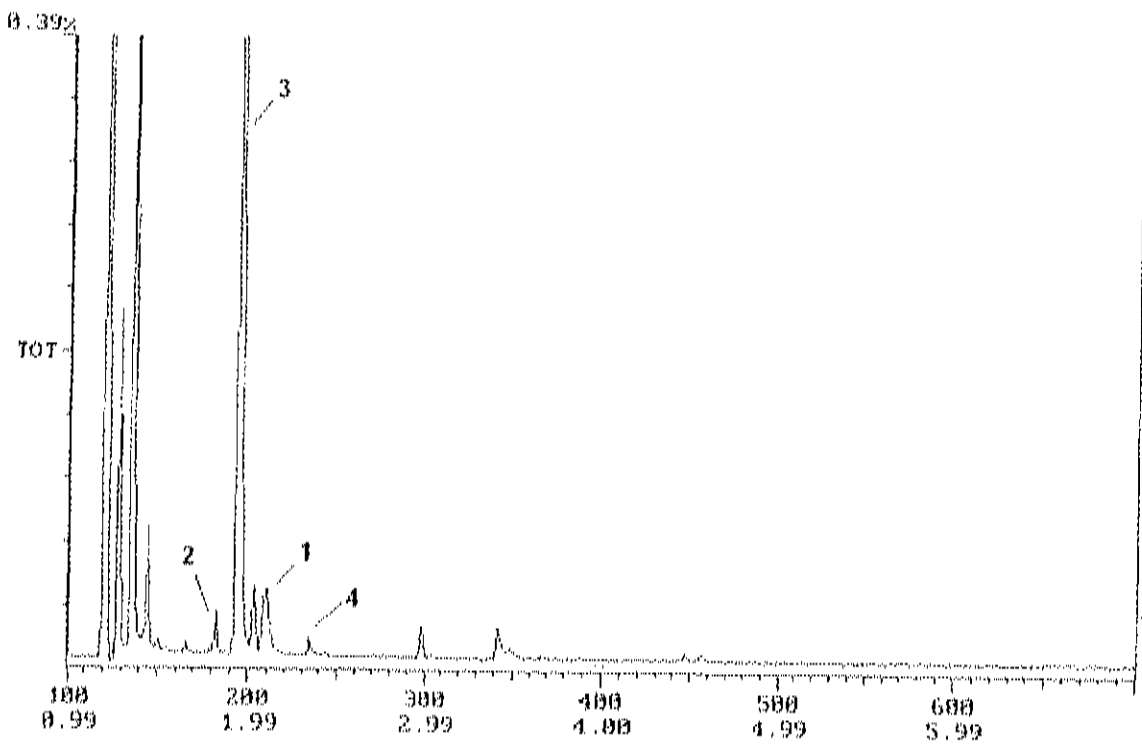


Figura 18. Cromatograma de CG-masas de espacio de cabeza de queso sin BHT a los 5 días de almacenamiento 30°C/luz. 1: THF (2.08 min). Posibles compuestos: 2: 2-metil-1-butanol (1.82 min); 3: 1-butanol (1.92 min); 4: 3-metil-butanol (2.33 min).

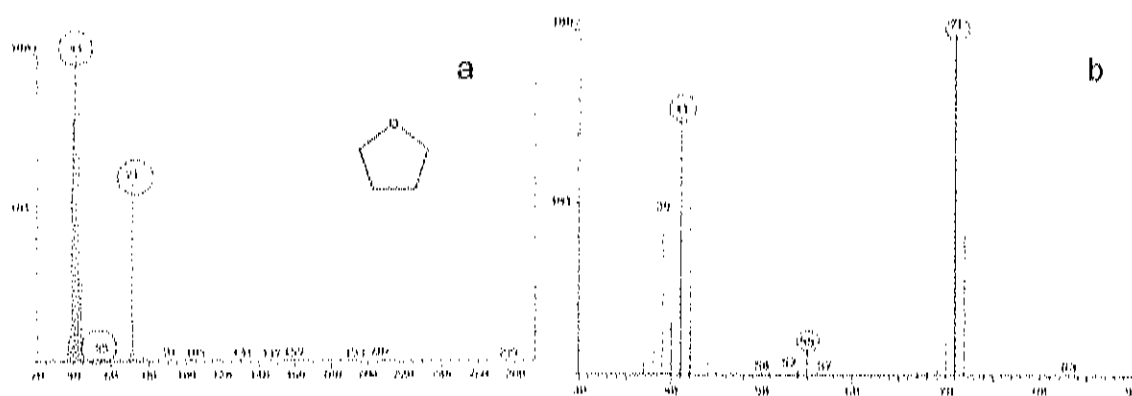


Figura 19. Patrones de fragmentación a: de THF del espacio de cabeza de queso asadero sin BHT a los 5 días de almacenamiento 30°C/luz. b: estándar de THF.

autooxidación del ácido linoleico produce una mezcla de cis, trans, dienos conjugados y 9- y 13- hidroperóxidos. La unión C-C entre un peróxido y una doble ligadura se considera fácil de romper. Entonces el 9-hidroperóxido puede producir alquil furanos al reaccionar con el oxígeno, para producir un hidroperóxido de vinilo que experimenta una ciclación vía el radical alcoxi formado por la pérdida del radical hidroxilo (figura 20) (Frankel, 1982). Con el ácido linolenico ocurre un mecanismo muy semejante, dando lugar a la formación de 2-pentenil furano (Choe y Min, 2006). Por consiguiente, es probable que la formación de THF provenga del ácido linoleico o linolenico, que se volvió radical libre, se rompió y se cicló, hidrogenándose finalmente. Los mecanismos de formación de diferentes productos de oxidación son complicados y muy diversos. Aunque el mecanismo de formación de THF en el queso aún no está dilucidado, existen reportes donde lo presentan como producto de oxidación (Juric y cols. 2001; Urbach, 1993).

Segunda prueba de interacción BHT-queso

El compuesto volátil cuya presencia fue constante tanto en el queso con BHT como en el testigo fue el THF (tiempo de retención 2.08 min). En la figura 21, se muestra su comportamiento en el queso con y sin BHT durante el almacenamiento. Como se puede apreciar, la señal de THF aumentó con respecto al tiempo y fue más grande en el queso que no contenía BHT. Se procedió a establecer un procedimiento para cuantificar el THF en queso.

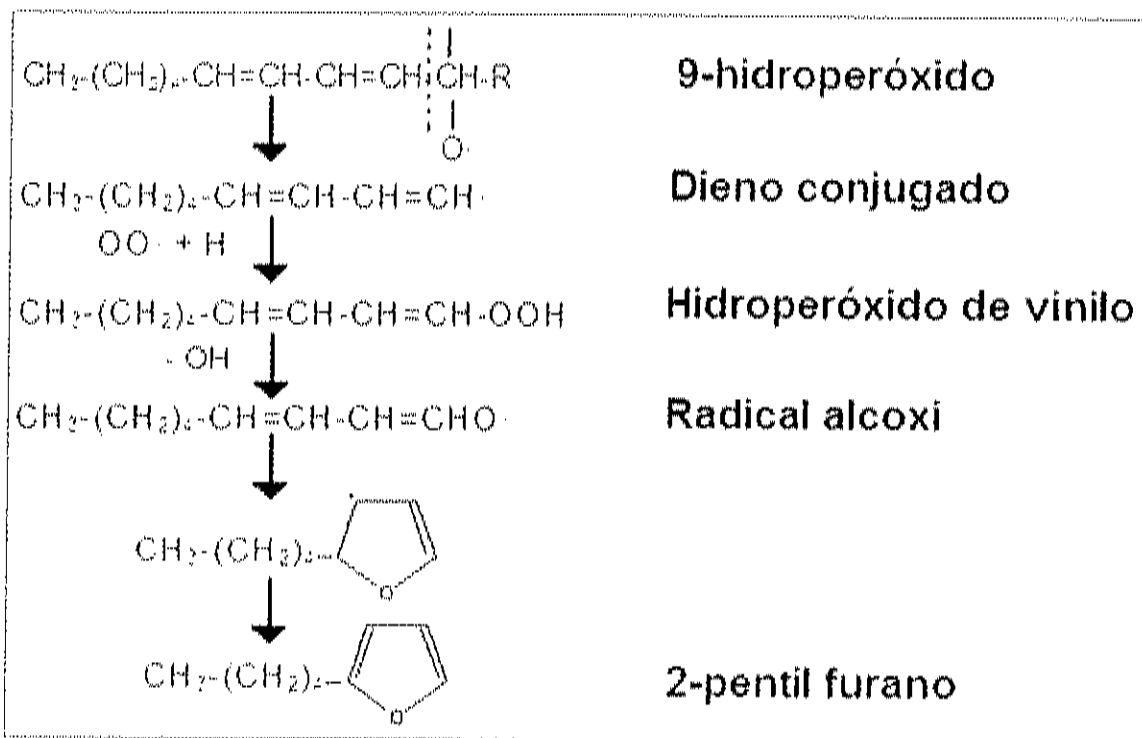


Figura 20. Formación de 2-pentil furano a partir del hidroperóxido de 9-linoleato (Frankel, 1982).

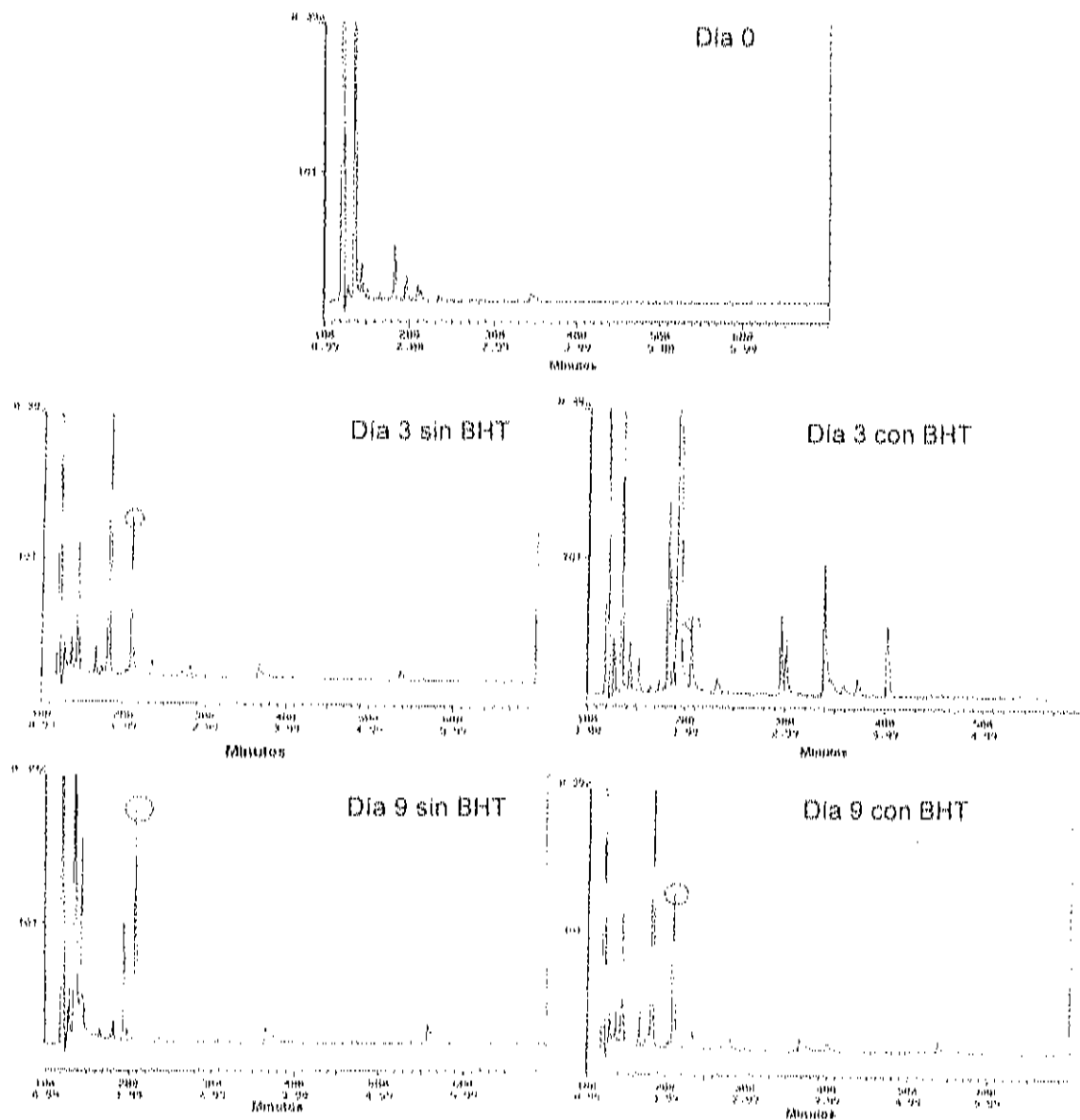


Figura 21. Cromatogramas de CG-masas de espacio de cabeza de queso asadero almacenado a 30°C/luz.

APÉNDICE B

Establecimiento de procedimiento de cuantificación de THF por espacio de cabeza en queso asadero.

El establecimiento del presente procedimiento, se llevó a cabo en el CG-FID utilizado en la sección de cuantificación de THF en queso, en materiales y métodos. También se utilizó la misma columna, temperatura del detector, del inyector y gas acarreador.

Programa de temperaturas y flujo de gas acarreador

Se probaron dos programas de temperaturas (figura 19). Programa 1: inicio a 30°C/15 min, con un incremento a 230°C a 8°C/min y manteniéndose en 230°C/9 min. Flujo: 0.6 mL/min. Programa 2: inicio a 30°C/2 min, con un incremento a 40°C a 1°C/min, seguido de otro a 200°C a 10°C/min y manteniéndose a 200°C/2 min. Flujo 1 mL/min.

Solventes

Las sustancias que se probaron como solventes para la preparación de las soluciones estándar fueron: metanol (JT Baker, Xalostoc, México) y hexano.

Liberación de THF

Para la liberación de volátiles (THF y 4M2P) al espacio de cabeza se probaron las siguientes temperaturas: 60°C/30 min; 80°C/30 min y 90°C/30 min.

Estándar Interno

El estándar interno se utiliza para compensar posibles fugas en los viales, variaciones en volúmenes de inyección y también por pequeños cambios en la sensibilidad del detector o cambios cromatográficos que pueden ocurrir. Debido a que no se necesita inyectar exactamente la misma cantidad cada vez, este método generalmente tiene mejor precisión que el uso de un estándar externo (Lindsay, 1992). Las sustancias que se probaron como estándares internos fueron: butanol (Sigma, U.S.A.) y 4M2P.

Volumen de inyección, del vial y tamaño de muestra

Los pesos de muestra probados fueron 5, 15 y 30 gr de queso. Se aseguró que los quesos (almacenados a -20°C y descongelados 24 h antes de su uso a 4-7°C) utilizados para estas pruebas, no presentaban THF. En cuanto al volumen del vial, se probaron: 30 y 40 mL. Los volúmenes de inyección del espacio de cabeza que se probaron fueron: 10, 25, 50 y 100 µL.

Resultados de establecimiento de procedimiento de cuantificación de THF por espacio de cabeza en queso asadero.

Programa de temperaturas y flujo de gas acarreador

El programa de temperaturas elegido fue el número 2, ya que aunque no se obtuvo la separación de los componentes, con el aumento de rampas de temperatura y flujo de gas acarreador, se logró una señal con mayor resolución. Además se acortó el tiempo de corrida de 49 a 30 min.

Solventes

Se eligió a hexano como solvente ya que se logró una adecuada separación de los estándares y la señal no interfirió de modo que no permitiera un adecuado cálculo del área de THF (figura 22). El metanol no permitió la separación de los componentes.

Liberación de volátiles

Se seleccionó el calentamiento a 90°C/30 min ya que con las otras temperaturas probadas se obtenían áreas más pequeñas (figura 23).

Estándar Interno

Como estándar interno se eligió a 4M2P (figura 22) ya que no interfirió con la señal de THF.

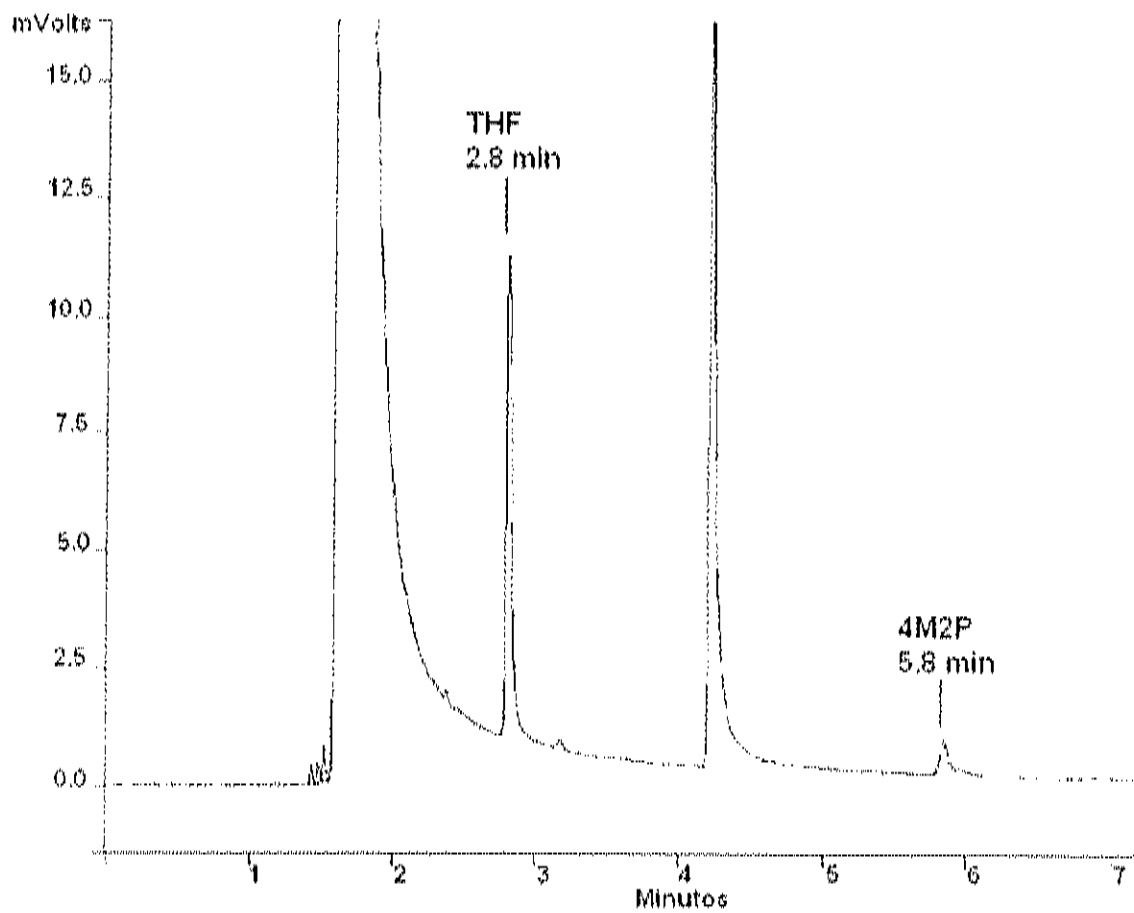


Figura 22. Cromatograma (CG-FID) de THF (24 mg/mL) y 4M2P (12 mg/mL). 30 g de queso en vial de 40 mL.

El butanol fue descartado debido a que se observó su presencia en el lote de queso utilizado para la elección del tamaño de muestra. Lo anterior no es de extrañar debido a que los alcoholes son producto tanto de autooxidación de grasas (Frankel, 1982) como de bacterias y levaduras (Martin y cols. 2001). Es pertinente aclarar que el butanol no se eligió como indicador de oxidación ya que en las pruebas de identificación por CG-masas, este compuesto no se detectó.

Volumen de inyección, del vial y tamaño de muestra

El volumen de inyección que se eligió fue de 25 μ L ya que con una cantidad mayor, la señal del solvente era tan alta (de 3 a 5 veces más) que interfería con la señal de THF. El volumen del vial elegido fue el de 40 mL, para poder agregar mayor cantidad de muestra. El tamaño de muestra elegido fue de 30 g, ya que con esta cantidad y en el vial seleccionado, se obtiene mayor cantidad de THF en un menor espacio de cabeza, permitiendo que se concentren más los volátiles.

En el cuadro 10 se presentan las áreas obtenidas al agregar una misma cantidad de THF al queso probando diferentes condiciones. El tamaño de muestra de 5 g fue descartado porque se obtenía un mayor espacio de cabeza, lo que diluyó la concentración de los volátiles presentes. El calentamiento a 90°C de 30 g de queso en vial de 40 mL, fue hasta 4 veces mayor con respecto al calentamiento a 60°C de 15 g de queso en vial de 30 mL.

Por lo tanto, el procedimiento quedó de la siguiente manera: en un vial de 40 mL se agregaron 30 g de queso y una cantidad conocida de 4M2P (en hexano) como estándar interno, se tapó con tapa horadada y septa de silicón. Después se sometió a calentamiento a 90°C/30 min y del espacio de cabeza se tomaron 25 μ L que se inyectaron en el CG-FID, cuyo programa de temperaturas

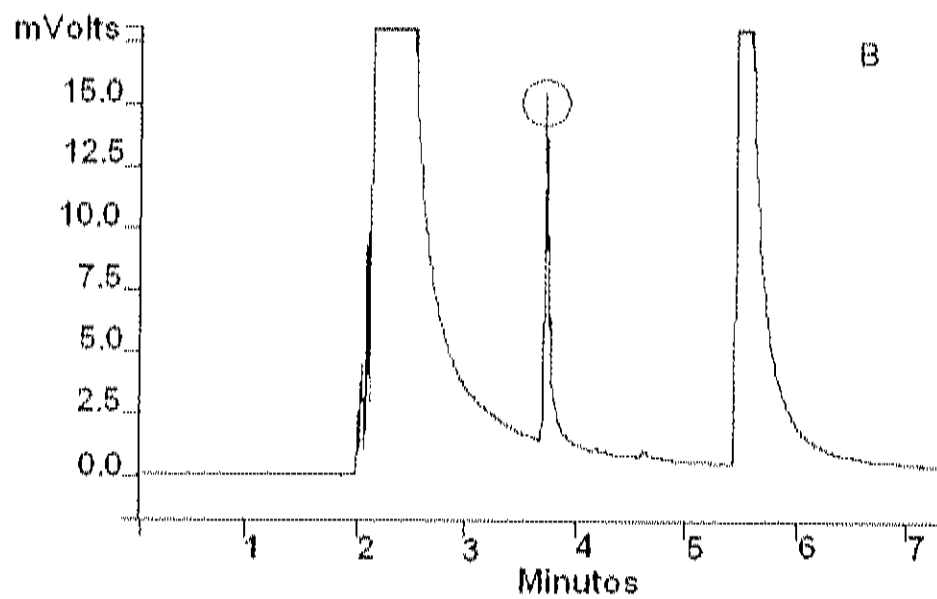
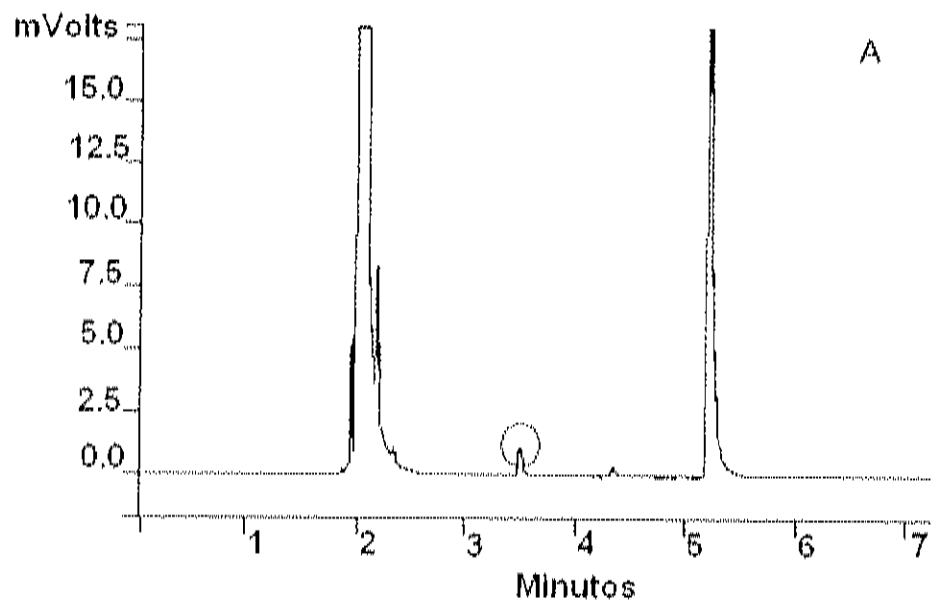


Figura 23. Cromatograma de CG-FID de queso con THF ($32 \mu\text{g/g}$). A: 60°C , B: 90°C . 15 g de queso en vial de 30 mL.

Cuadro 10. Áreas de THF en queso probando diferentes condiciones. Al queso se le agregó 5 μ L de una solución de 96 mg/mL de THF en hexano).

Peso de queso/volumen de vial (g/mL)	Temperatura de liberación (°C)	Concentración THF en queso (μ g/g)	Área THF
15/30	60	32	3,074 \pm 16
30/40	90	16	12,455 \pm 307

fue: inicio a 30°C/2 min, con un incremento a 40°C a 1°C/min, seguido de otro a 200°C a 10°C/min y manteniéndose a 200°C/2 min. Flujo de gas acarreador:1 mL/min.