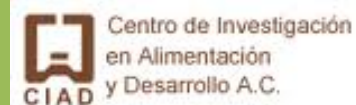




INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

INGENIERIA BIOQUÍMICA

PROYECTO DE RESIDENCIA PROFESIONAL



“DESARROLLO DE PELÍCULA DE ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA) CON ÁCIDO CLOROGÉNICO Y SU
DIFUSIÓN A SIMULANTES DE ALIMENTOS”

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

FECHA DE INICIO:

09/ENERO/2012

FECHA DE TÉRMINO:

04/MAYO/2012

ASESOR INTERNO:

DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

REVISORES:

DRA. PATRICIA GPE. SANCHEZ ITURBE

DR. ARNULFO ROSALES QUINTERO

PRESENTA ALUMNA:

CAROLINA JIMENEZ COELLO

No. DE CONTROL:

07270250

TUXTLA GUTIERREZ,
CHIAPAS.

A 13/JUNIO/12

ÍNDICE

I.	INTRODUCCION	6
II.	JUSTIFICACIÓN.....	8
III.	OBJETIVOS	8
III.1	GENERALES.....	8
III.2	ESPECÍFICOS	8
IV.	CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA.....	9
V.	PROBLEMÁTICA A RESOLVER	11
VI.	ALCANCES Y LIMITACIONES.....	11
VII.	FUNDAMENTO TEÓRICO	13
VII.1	ALIMENTOS Y SU VIDA ÚTIL	13
VII.1.1	OXIDACIÓN Y CALIDAD EN LOS ALIMENTOS	14
VII.1.2	MECANISMOS DE OXIDACIÓN	15
VII.2	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VIDA ÚTIL DE LOS ALIMENTOS.....	16
VII.2.1	EFFECTO DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS ALIMENTOS	17
VII.2.2	PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS	17
VII.3	TECNOLOGÍAS PARA EXTENDER LA VIDA DE ANAQUEL DE LOS ALIMENTOS.....	20
VII.3.1	ANTIOXIDANTES Y COMPUESTOS FENÓLICOS	21
VII.3.2	ÁCIDO CLORÓGENICO (ACG) COMO ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANO	21
VII.3.3	IMPORTANCIA DEL ACG.	22
VII.4	ENVASES BIODEGRADABLES CON ANTIOXIDANTES “BIOPOLÍMEROS”	22
VII.4.1	IMPORTANCIA DE ENVASES BIODEGRADABLES.....	23
VII.4.2	ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA).....	24
VII.4.3	UTILIZACIÓN DEL PLA.....	26
VII.4.4	CARACTERÍSTICAS DEL PLA	26
VII.4.5	PROCESO DE OBTENCIÓN DEL PLA	27
VII.4.6	IMPORTANCIA DEL PLA	27
VII.5	IMPORTANCIA DE ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES Y ADITIVOS AL PLA.....	28
VII.5.1	ACEITE EPOXIDADO DE SOYA (ESO) COMO ADITIVO EN EL PLA.....	29
VII.5.2	APLICACIONES DEL ESO.....	29
VII.6	ENVASES ACTIVOS Y MIGRACIÓN	30
VII.6.1	FUNCIONES DE LOS ENVASES	31

VII.7 PROCESAMIENTO DE LA PELÍCULA DE PLA “EXTRUSIÓN”	31
VII.8 MIGRACIÓN.....	33
VII.8.1 SIMULANTES DE ALIMENTOS.....	34
VII.9 EFECTOS DE LA MIGRACIÓN	35
VII.9.1 TIPOS DE MIGRACIÓN.....	35
VII.9.2 MODELOS MATEMÁTICOS DE LA DIFUSIÓN	36
VII.9.3 MECANISMOS DE TRANSFERENCIA.....	36
VII.10 MODELOS DE MIGRACIÓN	38
VII.10.1 CLASE I: “NO MIGRACIÓN”.....	38
VII.10.2 CLASE II: MIGRACIÓN INDEPENDIENTE.....	38
VII.10.3 CLASE III: MIGRACIÓN CONTROLADA POR EL ALIMENTO.....	39
VII.11 TRANSFERENCIA DE COMPONENTES NO POLIMÉRICOS DE PLÁSTICOS A ALIMENTOS	39
VII.11.1 RESIDUOS DE POLIMERIZACIÓN	40
VII.11.2 ADITIVOS	40
VII.11.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MIGRACIÓN.....	41
VII.11.4 MIGRACIÓN ESPECÍFICA.....	43
VII.11.5 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ADITIVOS EN PLÁSTICOS	43
VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS.....	51
VIII.1 MATERIALES Y MÉTODOS:	51
IX. ETAPA I	52
IX.1 ELABORACIÓN DE PELÍCULAS DE PLA CON ACEITE EPOXIDADO DE SOYA Y ÁCIDO CLOGÉNICO.....	52
IX.2 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS PELÍCULAS DE PLA TESTIGO, PLA-ESO Y PLA-ESO-ACG	55
IX.3 ETAPA II.....	57
IX.3.1 DIFUSIÓN DE ACG A SIMULANTES DE ALIMENTOS A BASE DE ETANOL	57
IX.3.2 DETERMINACIÓN DE REMANENTES DE ACG DESPUÉS DE LOS ESTUDIOS DE DIFUSIÓN.....	58
IX.3.3 DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE DIFUSIÓN (<i>D</i>) DE LOS ANTIOXIDANTES MIGRADOS DE LA PELÍCULA PLA-ESO-ACG A SIMULANTES DE ALIMENTOS.....	59
IX.4 ETAPA III.....	60
IX.4.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PELÍCULA CON ACG EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITE DE SOYA.....	60

IX.4.2	ÍNDICE DE PERÓXIDOS.....	61
IX.5	ETAPA IV.	62
IX.5.1	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PELÍCULA CON ACG EN EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS.....	62
X.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
XI.	CONCLUSIONES	80
XII.	RECOMENDACIONES	81
XIII.	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	82

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades típicas del polímero	29
Cuadro 2. Aditivos utilizados en materiales poliméricos.	40
Cuadro 3. Longitudes de onda (Absorbancia)	48
Cuadro 4. Resultados de los Espesores de las películas.	63
Cuadro 5. Valores de L^* , a^* y b^* en películas de PLA testigo 1, PLA-ESO testigo 2 y PLA-ESO-ACG	67
Cuadro 6. Resistencia a la Tensión y % de Elongación.	69
Cuadro 7. Coeficiente de Difusión (D), coeficiente de partición ($K_{p,s}$) y α de ACG de películas de PLA-ESO a Etanol al 95% a 40°C.	74

ÍNDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS

Figura 1. Estructura del Ácido Clorogénico	21
Figura 2. Estructura del Ácido Poliláctico.	26
Figura 3. Ejemplo de Extrusor Monohusillo.	32
Figura 4. Esquema de flujo para HPLC	44
Figura 5. Detector	46
Figura 6. Cromatograma de ACG en películas de PLA-ESO-ACG a 40°C y a 320nm	47
Figura 7. Espectro electromagnético	49
Diagrama 1. Condiciones de procesamiento de 3 películas de PLA	54
Figura 9. Sistema de migración. (ASTM D4754-98, 2003)	57
Diagrama 2. Efecto de la película con ACG en el crecimiento de baterías.	61
Figura 10. Prueba Microbiológica.	62
Figura 11. Películas de PLA Testigo	
Figura 12. Barrido Espectral por UV-Vis de las películas PLA, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG.	63
Figura 13. Películas de PLA, PLA-ESO (1.3%) y PLA-ESO (1.3%)-ACG (1.9%)	66
Figura 14. Curva Estándar de ACG en Etanol a 320 nm.	70
Figura 15. Cromatograma de ACG (110.71 $\mu\text{g/mL}$) extraído de la película de PLA-ESO-ACG en Etanol 95% a 40°C y 320 nm.	72
Figura 16. Resultados de Migración de ACG en Etanol 95% a 40°C,	72

presentado el promedio de 3 repeticiones \pm DS.

Figura 17. Migración de ACG de la película PLA-ESO-ACG en Etanol 95% a 40°C 73

Figura 18. Resultados de Índice de Peróxidos del aceite en contacto con las películas PLA, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS. 76

Figura 19. Resultados de Índice de Peróxidos de aceite de soya conteniendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ACG Estándar. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS. 77

Figura 20. Caja Petri inoculada con *Escherichia coli* O157:H7 78

I. INTRODUCCION

La mayoría de los plásticos están hechos a base de petróleo y combustibles fósiles (alrededor del 5% es utilizada para la producción de estos) y son por definición productos no sustentables lo que atribuye un impacto ambiental muy fuerte y con consecuencias irreversibles, es por eso que se han buscado alternativas para controlar estos efectos. Una de las alternativas con mejores resultados es el uso de biopolímeros (plásticos biodegradables producidos a base de almidón, celulosa o bacterias), en especial para utensilios que tienen una vida útil reducida o no son de fácil reciclaje, como las envolturas de alimentos.

El biopolímero de interés es el ácido poliláctico (PLA), este es de origen microbiano, que se deriva principalmente de la fermentación de azúcares a ácido láctico. Los azúcares pueden derivar de la hidrólisis de polisacáridos como el almidón. El PLA deriva de una catálisis molecular y requiere de rodajes de dímeros cíclicos de Ácido Láctico "lactida" para obtenerlo, la lactida es un producto natural renovable que se produce como subproducto de la fermentación de biomasa con alto contenido de almidón, tales como la remolacha de maíz, el trigo o el azúcar.

El PLA es un material obtenido de fuentes renovables, biodegradable en condiciones de composta, biocompatible y con diversas aplicaciones, pero tiene sus limitantes, una de ellas es su inestabilidad estructural a temperaturas sobre 60°C por lo que no soporta el llenado en caliente de un alimento líquido, por lo anterior, las aplicaciones actuales se restringen a charolas, bandejas, películas y botellas para contener, almacenar y comercializar alimentos que no requieren llenado en caliente. Es por eso que se toma en cuenta su aplicación potencial del PLA en envases para aceites vegetales o alimentos con alto contenido de grasa. Sin embargo, otra de sus desventajas es su limitada barrera al oxígeno por lo que alimentos susceptibles a la oxidación y envasado en PLA, quedarán expuestos al oxígeno y sus consecuencias.

El PLA está siendo investigado como materia prima de muchos productos fabricados, ya que presenta similitud y en algunos casos mejores propiedades que los polímeros tradicionales derivados del petróleo, con el beneficio significativo de que es biodegradable en condiciones de composta. La comunidad científica muestra un interés para encontrar aditivos que sean capaces de producir dichos biomateriales con mejores propiedades o

con valor agregado como los envases activos antioxidantes. Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales.

Si se observa la tendencia hacia la sustitución del uso de antioxidantes sintéticos en la elaboración de envases de alimentos mediante la adición de inhibidores de la oxidación de origen natural, es muy extensa pero muy poco estudiada, es por ello que el mejor método puede ser producir envases con aditivos naturales para la estabilidad de nuestros alimentos.

Este estudio fue principalmente dirigido a antioxidantes primarios que incluyen compuestos fenólicos. Es por eso que el uso de ácido clorogénico (ACG) fue aceptado para interactuar con el PLA. El ACG tiene enlaces múltiples conjugados es por ello que representa una actividad antioxidante desde el punto de vista tecnológico y nutricional.

Así, los compuestos fenólicos, como es el caso del ACG, intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes sintéticos, a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales. Por lo anterior se ha decidido estudiar el uso del ACG como aditivo en PLA y su uso potencial como envase activo.

II. JUSTIFICACIÓN

El PLA es un material biodegradable en condiciones de composta, biocompatible y con diversas aplicaciones, pero tiene sus limitantes. Una de ellas es su inestabilidad estructural a temperaturas sobre 60°C por lo que no soporta el llenado en caliente de un alimento líquido, así como su limitada barrera al oxígeno, por lo que alimentos susceptibles a la oxidación y envasado en PLA, quedarán expuestos al oxígeno y sus consecuencias. Por lo anterior, las aplicaciones actuales se restringen a charolas, bandejas, películas y botellas para contener, almacenar y comercializar alimentos que no requieren llenado en caliente. Es por eso que se toma en cuenta su aplicación potencial del PLA en envases para aceites vegetales o alimentos con alto contenido de grasa. La difusión de ACG se lleva a cabo de manera gradual de una película de PLA a simulantes de alimentos durante el almacenamiento, produciendo un efecto en la estabilidad oxidativa de los mismos.

III. OBJETIVOS

III.1 GENERALES

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

III.2 ESPECIFICOS

Elaborar película de PLA incorporando ACG.

Verificar después de la fabricación por extrusión con dado plano, la concentración de este antioxidante y la de sus productos de descomposición.

Determinar la difusión de ACG a simulantes de alimentos a base de etanol a 40 y 20°C.

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

Evaluar el efecto de las películas y del ACG en el crecimiento de bacterias.

IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA

“CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.”

El CIAD se creó por decreto presidencial publicado en el Diario Oficial de la Federación el martes 22 de septiembre de 1981 y se constituyó como una empresa de participación estatal mayoritaria mediante acta constitutiva de fecha 16 de marzo de 1982. El 31 de marzo del año 2000 la Asamblea de Asociados autorizó la constitución del CIAD como Centro Público de Investigación con nuevos estatutos, al amparo de la Ley, para la Promoción de la Investigación Científica y Tecnológica.

La vitalidad del CIAD se fundamenta en el reconocimiento de su razón de ser y se establece en el sentido de una organización que busca ampliar la frontera del conocimiento, así como contribuir a elevar el bienestar social a través de propuestas para abatir los problemas de marginación, desnutrición y deformación en la estructura competitiva en el sistema alimentario mexicano, a proporcionar los conocimientos y la tecnología adecuada para a) mejorar las condiciones de los alimentos y la alimentación en todas sus etapas, b) seleccionar aquellos proyectos que tengan una mayor relación beneficio: costo, particularmente para los grupos marginados y c) contribuir al aseguramiento de la calidad y la seguridad alimentaria.

MISIÓN

Somos un centro de reflexión crítica que genera conocimiento, innova, transfiere tecnología y forma recursos humanos especializados en alimentos, nutrición, salud pública, desarrollo regional y recursos naturales, vinculado con la sociedad.

VISIÓN

Ser una institución de liderazgo internacional con equilibrio entre sus actividades de investigación, vinculación y docencia, que desarrolle líneas emergentes afines y proyectos transdisciplinarios que impacten el bienestar social; que promueva en sus empleados la superación, sentido de permanencia, apertura y compromiso.

OBJETIVOS

- Contribuir a la generación y difusión del conocimiento científico y tecnológico, a través de proyectos de investigación en alimentos, nutrición y desarrollo.
- Formar recurso humano especializado en las competencias regionales a través de Programas académicos de Iniciación Científica y Posgrado con registro en el PNPC del Conacyt.
- Apoyar a los sectores público, social y privado mediante la gestión y desarrollo de proyectos, procesos, productos, servicios y asesorías orientadas a la producción, manejo y comercialización de alimentos.
- Impulsa la innovación y competitividad a través de alianzas Científico-Empresariales estratégicas.

COORDINACION DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Esta Dirección ha dado origen a un grupo especializado de investigadores en el estudio de la fisiología y tecnología pre- y pos-cosecha de frutas, hortalizas, cereales y hongos. Actualmente está integrada por 27 investigadores y 11 técnicos y laboratoristas. Dentro de esta Dirección de Área se llevan a cabo proyectos de investigación básica y de desarrollo tecnológico en base a seis líneas de investigación:

- Biología y Tecnología Postcosecha de Frutas y Hortalizas
- Procesamiento e Ingeniería de Frutas y Hortalizas
- Biotecnología de Vegetales y Hongos
- Inocuidad de Frutas y Hortalizas Frescas
- Ciencia y Tecnología de los Cereales
- Envases de Alimentos y Vida de Anaquel

Nombre de la Institución:

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), **Director General:** Dr. Ramón Pacheco Aguilar. Correo Electrónico: rpacheco@ciad.mx. **Dirección:** Carretera a la Victoria Km. 0.6, Hermosillo, Sonora. C.P. 83304 Apdo. Postal: 1735 **Teléfono y Fax:** (52) - 6622- 800146; (52) - 6622- 80 00 10 (52) - 6622- 89 24 0 Fax: (52) - 6622- 80 01 46.

V. PROBLEMÁTICA A RESOLVER

Desde hace tiempo, las personas se preocupan por el cuidado y la conservación del medio ambiente. El uso de envases de plástico daña la ecología ya que el plástico tarda años en degradarse. En la industria alimenticia, se usa en gran mayoría plástico para envasar, esto daña al medio ambiente ya que, el material utilizado tarda aproximadamente 500 años en degradarse.

Ante este problema, han surgido actividades como el reciclaje (acción de volver a introducir en el ciclo de producción y consumo productos materiales obtenidos de residuos, también se refiere a reutilizar partes de artículos que en su conjunto han llegado al término de su vida útil, pero que admiten un uso adicional para alguno de sus componentes).

Ante esta falta de interés por reciclar, las personas preocupadas por el medio ambiente han hecho diferentes investigaciones para encontrar envases que no tarden tanto tiempo en degradarse. En un futuro no muy lejano, los envases para alimentos y bebidas dejarán de ser un problema para el medio ambiente y el consumidor. Varias compañías, tanto mexicanas como internacionales, trabajan en las tendencias de envases que, serán inteligentes, útiles y funcionales.

VI. ALCANCES Y LIMITACIONES

Existe una combinación de factores que está impulsando la utilización de plásticos biodegradables. Entre estos están:

- El alto precio de las resinas derivadas del petróleo
- La creciente conciencia de los consumidores sobre la necesidad de proteger el medio ambiente
- La madurez tecnológica ya alcanzada en la generación de productos de alto desempeño con estas resinas
- Las leyes gubernamentales que se están gestando en varios países, especialmente de Europa, fomentando el uso de estos productos biodegradables.

- La exclusión de sistemas de gestión de residuos tales como los vertederos y la mala imagen de la valorización energética como solución final.

Debido a esto en los últimos cinco años los proveedores de envases han lanzado al mercado envases de plásticos biodegradables, fabricados a partir de diversas plantas, especialmente maíz, confiados en que la demanda responderá positivamente a sus ofertas. Debido al incremento en precio que desde el 2005 tuvieron las resinas convencionales, de entre el 30 y el 80%, muchas empresas se inclinaron por buscar alternativas.

Algunos plásticos biodegradables han desarrollado un nivel de madurez que les permite ser competitivos; la brecha en precio que los separaba de las resinas comunes se ha disminuido considerablemente, y materias primas como la caña de azúcar y el almidón son actualmente más económicas que el petróleo.

La productividad y la competitividad tienden a aumentar en la perspectiva a largo plazo, y ya se evidencian las primeras aplicaciones concretas y masivas para estos polímeros. Los plásticos biodegradables pueden ser fabricados a partir de recursos renovables de origen animal o vegetal, o de recursos fósiles. Las materias primas más comunes son el PLA, ácido poliláctico, y los PHA, poli-hidroxi-alcanoatos.

Es la estructura química lo que hace a un polímero biodegradable, lo diferencia de un polímero convencional, y permite que pueda ser destruido por microorganismos, como hongos y bacterias en ambientes biológicamente activos. Aunque las cifras no son oficiales, se estima que el mercado actual de biopolímeros está alrededor de las 300.000 toneladas al año (base 2007), en el que el consumo de Europa está alrededor de las 50.000 toneladas. De mantenerse el crecimiento continuo que se ha producido hasta ahora, la capacidad global necesaria de producción de polímeros biodegradables alcanzaría el millón de toneladas alrededor del año 2010.

VII. FUNDAMENTO TEÓRICO

VII.1 ALIMENTOS Y SU VIDA ÚTIL

Por lo general, la vida media o vida útil de un alimento se define como el periodo de tiempo, durante el cual resulta deseable el consumo de un producto alimenticio elaborado. Con ellos, se quiere expresar el tiempo que tarda la calidad de un alimento en alcanzar niveles considerados inaceptables para su consumo. No obstante, los términos de la definición puede ser motivo, en algunas ocasiones de dudas o confusiones ⁽¹⁾.

En consecuencia, el tiempo de duración de la vida útil de un producto alimenticio comercializado puede ser muy variable, según puedan incidir con mayor o menor intensidad todo un conjunto de factores, siempre vinculados a las circunstancias que acompañan a las distintas fases implicadas en el proceso alimentario: presentación, almacenado, transporte, distribución, venta y manipulación en el hogar.

Entre todos ellos cabe destacar los siguientes:

1. Estado físico del producto: concentrado, liofilizado, en polvo, entre otros.
2. Composición química: contenido de agua, proporción de azúcar, sustancias conservantes.
3. Acondicionamiento: calidad y tipos de envasado.
4. Tecnología de conservación aplicada para su almacenado: refrigerado, ultracongelado.

Cualquiera que sea la importancia adquirida por cada uno de estos factores, el envejecimiento del producto se suele manifestar por una serie de modificaciones fisicoquímicas (color, olor, sabor, etc.), que pueden ser debidas a reacciones entre algunos de sus componentes químicos ocasionadas por agentes de diversa naturaleza: la luz, enzimas, materiales de contacto, temperaturas, etc., o bien por algunas transformaciones debidas a la actividad metabólica de la proliferación microbiana.

Todos estos fenómenos acarrearán una reducción de la calidad estable del producto, que tiene su reflejo en las propiedades intrínsecas del alimento: cualidades organolépticas, valor nutritivo e incluso inocuidad, para la posible formación de sustancias tóxicas ⁽¹⁾.

En los últimos años se han realizado numerosos trabajos para establecer métodos que permitan predecir la duración de la vida útil de un alimento, de acuerdo con todos los factores que pueden incidir sobre su calidad. Estos métodos de predicción se suelen basar en el estudio de los diversos mecanismos capaces de provocar alteraciones, así como de las velocidades a las que se desarrollan. En este sentido, resulta de gran relevancia el manejo del binomio temperatura-tiempo, que sirve de fundamento para una serie de indicadores usados en la actualidad por la industria alimentaria ⁽²⁾.

La calidad de un alimento viene determinada por su adecuación a un patrón de referencia, basado en aquellas propiedades del alimento que van a ser determinantes de una aceptación o a un rechazo por parte del consumidor. Al ser los alimentos productos biológicamente activos, caracterizados por un sistema fisicoquímico inmerso dentro de un sistema dinámico, esta calidad puede ser algo que varíe hacia valores más reducidos.

Los distintos factores vinculados con el almacenamiento de un alimento, tales como temperatura, humedad relativa, radiaciones luminosas, etc., pueden incidir de modo negativo sobre la estabilidad del alimento almacenado. Como consecuencia de todo ello, el alimento pierde calidad a velocidades que dependerán de la cinética de cada reacción responsable ⁽¹⁾.

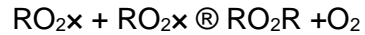
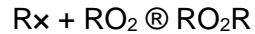
VII.1.2 OXIDACIÓN Y CALIDAD EN LOS ALIMENTOS

La oxidación es una de las principales causas de deterioro de los alimentos, lo que representa un gran interés económico para la Industria Alimentaria, ya que da lugar a la aparición de sabores y olores desagradables, llamados en general de enranciamiento; lo que hace que disminuya la vida útil del alimento o que los mismos sean inaceptables para el consumidor. Además de disminuir la calidad del alimento pueden producirse productos de oxidación potencialmente tóxicos ⁽²⁾.

La oxidación se da principalmente en los lípidos, este se produce a través de mecanismos de radicales libres, que incluyen las etapas de iniciación, propagación y terminación.

Iniciación: $RH \rightarrow R\cdot + H\cdot$

Propagación $R\cdot + O_2 \rightarrow RO_2\cdot$



Estos mecanismos muestran que la velocidad de la oxidación lipídica será mayor cuando mayor sea la cantidad de radicales libres involucrados.

El proceso puede ser analizado en tres estados. En el estado temprano, las reacciones de iniciación y propagación son dominantes y la probabilidad de ocurrencia de las reacciones de terminación es baja dado que las concentraciones de radicales libres son bajas y esto dificulta la reacción entre los mismos.

En los estados tardíos del proceso, debido al incremento en la concentración de radicales libres, la probabilidad de que ocurran las reacciones de terminación, comienzan a ser importantes. En el estado final del proceso es poco probable que ocurran las reacciones de iniciación, debido a la disminución de los sustratos.

Especies de oxígeno activo son posibles iniciadores de las reacciones oxidativas en alimentos. La eliminación de estas especies podría ser realizada usando sistemas naturales ⁽³⁾.

VII.1.3 MECANISMOS DE OXIDACIÓN

Las principales reacciones de oxidación en los alimentos se deben a la Peroxidación de los lípidos. Entre los componentes de los lípidos (grasas) se encuentra ácidos grasos insaturados (con dobles enlaces) los cuales al presentar *posiciones* (o metilenos adyacentes a dobles enlaces) reactivas sufren la auto-oxidación generando hidroperóxidos que son sustancias inestables que descomponen a productos secundarios de reacción, generando moléculas más pequeñas y volátiles. ⁽⁴⁾

La oxidación de ácidos grasos es un gran número de instauraciones donde se producirá un mayor número de hidroperóxidos que por descomposición posterior genera numerosos

productos volátiles como aldehídos, ácidos carboxílicos, cetonas, alcoholes, etc., éstos compuestos más pequeños son los que causan la rancidez de los alimentos detectada por olores fuertes y desagradables. Es el caso de la mantequilla rancia cuyo olor se atribuye al ácido butanoico (butírico). Tales productos secundarios como también los hidroperóxidos y radicales libres peroxídicos de los lípidos pueden reaccionar con proteínas y vitaminas causando pérdida del valor nutricional de los constituyentes de los alimentos ⁽⁵⁾.

Así, en tejidos de músculo congelado, la autooxidación de lípidos ocurre en el microambiente de los alrededores del producto conteniendo oxígeno, con vegetales sin pelar y pelados la oxidación procede en su mayor parte de la enzima lipoxigenasa, la cual está presente en el maíz, guisantes, habichuelas, coles de Bruselas y espárragos. Esta enzima cataliza la oxidación de ácidos grasos como el linoléico, linolénico y araquidónico ⁽⁴⁾.

La AOAC proporciona análisis estadísticos y específicos en alimentos, se rige por tener una transcripción íntegra de los métodos de análisis publicados en el Diario Oficial de la CEE (Comunidades Europeas), dando así al alimento seguridad de consumo. Es por ello, que en este estudio se utiliza el análisis de índice de peróxidos ⁽⁶⁾, siendo el aceite de soya uno de nuestros alimentos de interés, este análisis determina la cantidad (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de peróxidos en la muestra que ocasiona la oxidación. Este análisis se lleva a cabo en condiciones ya descritas por la AOAC. ⁽⁷⁾

VII.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VIDA ÚTIL DE LOS ALIMENTOS

Un alimento puede estar expuesto a diversos agentes y perder su calidad sanitaria. Los agentes pueden ser físicos, químicos o biológicos, que al alterar el alimento pueden provocar un daño en la salud del consumidor. Entre los agentes físicos más alarmantes encontramos a la luz que promueve decoloraciones, oxidación de lípidos; además se pueden tener golpes y magulladuras por agentes mecánicos, por temperaturas extremas, modificaciones en el pH e inclusive la presencia de oxígeno.

Con respecto a los agentes químicos, no podemos descartar la acción del oxígeno, que puede conducir a la desnaturalización de proteínas, al enranciamiento auto-oxidativo de

lípidos o destrucción de vitaminas. También la presencia de metales pesados inactivan enzimas y son tóxicos a concentraciones altas o inducen la oxidación, e inclusive un agente químico puede llegar a considerar a algunos compuestos químicos adicionados incorrectamente que se aplican paradójicamente con la finalidad de conservar el alimento y ampliar su vida de anaquel o tiempo que permanece con calidad aceptable antes de consumirse ⁽⁵⁾.

VII.2.1 EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS ALIMENTOS

La importancia de los microorganismos en los alimentos es más evidente. La producción de alimentos por técnicas microbiológicas es una actividad de larga historia: los microorganismos alteran los constituyentes de los alimentos de forma que los estabilizan permitiendo su mayor duración y, además, proporcionan compuestos que confieren sabores característicos a los alimentos por ellos producidos. Esta faceta se complementa con la acción de microorganismos alterantes de los alimentos y responsables de su deterioro de forma que se hagan inaceptables por los consumidores.

Desde el punto de vista sanitario, los alimentos pueden ser vehículos de infecciones (ingestión de microorganismos patógenos) o de intoxicaciones (ingestión de toxinas producidas por microorganismos) graves. En este sentido se han desarrollado las técnicas de control microbiológico de alimentos.

Muchas veces la causa de la contaminación del alimento se debe a medidas higiénicas inadecuadas en la producción, preparación y conservación; lo que facilita la presencia y el desarrollo de microorganismos que producto de su actividad y haciendo uso de las sustancias nutritivas presentes en éste, lo transforman volviéndolo inaceptable para la salud humana.⁽⁶⁾ Es por eso que es necesario realizar algunas pruebas microbiológicas que nos indiquen la calidad de nuestro alimento.

VII.2.3 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

El crecimiento microbiano se define como un incremento en el nº de células, es decir, se refiere al crecimiento de poblaciones. Este viene dado como consecuencia del crecimiento de cada célula individual y su división celular. El crecimiento de un microorganismo depende de varios factores como:

1. El microorganismo en sí. Así por ejemplo, en condiciones óptimas *E. coli* tiene un ciclo de vida de 15-20 minutos, mientras que *Mycobacterium tuberculosis* lo tiene de 18 horas.
2. La composición del medio de cultivo. Las células crecerán más lentamente en un medio mínimo (MM) que en un medio rico (MR) con todos los nutrientes. Dependiendo de la fuente de carbono y de la facilidad con que la asimilen crecerán más o menos rápidamente (por ejemplo, crecen mejor con glucosa (Glc) como fuente de carbono que con galactosa (Gal)).
3. Las condiciones de incubación. La temperatura de incubación, la concentración de CO₂ en la atmósfera de cultivo, la agitación, entre otras, son factores importantes.
4. La procedencia y características del inóculo. La curva de crecimiento variará dependiendo de que se parta de un cultivo estacionario o de uno en crecimiento exponencial, que se pase un cultivo crecido en MM+Glc a MM+Gal o de MR a M+Glc.

Existen varios métodos para medir el crecimiento microbiano:

Métodos directos: son aquellos en los que se cuenta el número total de células en un volumen conocido y así se estima el número total en la población. Entre ellos:

- Recuento directo del número de células al microscopio.

Se utilizan portas especialmente diseñados para el recuento celular y denominados cámaras de recuento. Existen varios tipos de cámaras de recuento, una de ellas es la cámara Thoma que es la que nosotros utilizaremos. Éste método tiene el inconveniente de que no diferencia entre células viables y no viables. Es poco preciso.

- Contadores electrónicos.

Las células son suspendidas en un fluido conductor que pasa lentamente a través de una abertura fina por la que pasa una corriente eléctrica. Cada célula que pasa produce un cambio en la conductividad y estos cambios o pulsos convenientemente amplificados son registrados electrónicamente dando una medida directa del número de células en el medio. No teniendo diferencia entre células viables y no viables ni entre células o partículas inertes.

- Recuento de células viables.

Haciendo diluciones apropiadas seguidas de siembra sobre placas Petri podemos obtener crecimiento de colonias aisladas procedentes cada una de una única célula. Si se multiplica por el factor de dilución tendremos el número de células en cultivo. ⁽⁹⁾

Sólo detecta viables pero es un método lento y caro por el elevado número de placas que hay que utilizar para que los resultados sean significativos.

Métodos indirectos. Son aquellos que utilizan parámetros distintos del número de células, pero que pueden relacionarse de forma directa con éste (masa celular, actividad metabólica, etc.). Ello es posible porque durante el crecimiento de un cultivo hay un aumento ordenado de todos los constituyentes celulares y así la velocidad de crecimiento de la población puede estimarse por la velocidad del incremento de cualquiera de estos parámetros. Entre los métodos indirectos se encuentran:

- Determinación del peso seco.

Se trata de medir la masa celular presente en un cultivo y estimar el número de células proporcional a ésta.

- Determinación del nitrógeno celular.

Medir el contenido proteico del cultivo.

- Determinación del DNA.
- Determinación de una actividad metabólica según el tipo de microorganismo:

Consumo de oxígeno (en aerobios), liberación de CO₂ u otro producto de fermentación, aumento de la concentración de alguna enzima constitutiva, incorporación en la célula de algún material radiactivo.

- Medida de la turbidez del cultivo.

Se basa en la capacidad de las células y partículas en general de absorber y/o dispersar la luz que incide sobre ellas. Un cultivo celular aparece turbio porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. La turbidez es proporcional al número de células y

puede medirse utilizando un espectrofotómetro. El espectrofotómetro es un aparato que hace pasar la luz a través de una suspensión celular y detecta la luz no dispersada. ⁽⁹⁾

VII.3 TECNOLOGÍAS PARA EXTENDER LA VIDA DE ANAQUEL DE LOS ALIMENTOS

El envasado es una técnica que surge para satisfacer la necesidad de preservar los alimentos, a través de ello se busca no sólo lograr proteger a los alimentos del deterioro físico y químico, la contaminación y deterioro por microorganismos, parásitos y otros agentes contaminantes, sino además prolongar la vida de éstos durante más tiempo. La técnica de envasado cumple con lo anteriormente citado, pero una gran desventaja de ello es la contaminación que esto conlleva, las millones de toneladas de residuos de envases que se generan día a día.

Los materiales plásticos son la base de la mayoría de los productos de consumo habituales. Una vez que dejan de ser útiles, estos materiales se convierten en residuos permanentes difíciles de eliminar del medio ambiente. Al no ser biodegradables, acaban amontonándose en los vertederos, puesto que la capacidad de reciclaje es todavía bastante reducida. Además, los plásticos se producen a partir de combustibles fósiles, una fuente de energía contaminante, causante de las emisiones de gases de efecto invernadero, y no renovable ya que en pocos años sus reservas se habrán agotado.

Existen otras tecnologías para conservar alimentos que tratan de contrarrestar la oxidación en los alimentos. Una de ellas es disminuyendo el oxígeno del envase que contiene el alimento por vacío o modificando la atmósfera del mismo. Además, se puede hacer una incorporación de antioxidantes en el alimento, que no detendrán la formación de radicales, sino que reaccionarán con ellos y los estabilizarán produciendo radicales de los antioxidantes menos activos.

La efectividad de los antioxidantes depende de sus propiedades químicas y físicas. La presencia de enlaces de baja energía con el hidrógeno ayuda a que éste sea donado al radical libre con mayor rapidez. Los radicales de los antioxidantes debido a su baja energía, tienen una deslocalización de su electrón desapareado, presentando resonancia, lo cual reduce la rapidez de reacción con el oxígeno. Cualquier compuesto que tiene un

potencial de reducción menor al potencial de reducción de un radical libre es capaz de donar el hidrógeno y actuar como antioxidante. ⁽¹⁰⁾

VII.3.1 ANTIOXIDANTES Y COMPUESTOS FENÓLICOS

El término «Compuestos Fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenólicos no son polifenoles, sino monofenoles.

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. Los fenoles son sintetizados *de novo* por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales.

VII.3.2 ÁCIDO CLORÓGENICO (ACG) COMO ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANO

Los polifenoles son un grupo de compuestos que se encuentran principalmente en plantas y verduras, y la actividad antioxidante de varias plantas polifenólicas ha quedado bien establecida. El ACG es el polifenol preponderante en el café, aunque hay otros, como son el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico. ⁽¹¹⁾

El ACG está presente en casi todas las plantas superiores en las que juega el papel de responder al estrés medioambiental como por ejemplo, al desgarro de las hojas o de las flores o a los cortes que tengan lugar en la piel de la fruta. Así, los granos de café sin tostar contienen entre un 6 y 7% de este ácido, si bien al tostarlos el ACG se transforma en ácido cafeico y ácido quínico. ⁽¹¹⁾

El ACG cuenta también con poder antimicrobiano, el cual protege de manera directa a los alimentos, este antioxidante puede interactuar con otros compuestos como son las ciclodextrinas. Ya que aparentemente dan una estabilidad de almacenamiento mayor a los alimentos y a su vez lo protege de microorganismos que puedan producir sabores y olores desagradables. ⁽¹²⁾

VII.3.3 IMPORTANCIA DEL ACG.

El ACG es un flavonoide, que se encuentra presente en plantas. Este producto químico está presente en la dieta como parte de las frutas, el té, el café y el vino.

Existe un creciente interés en las múltiples propiedades farmacológicas de los flavonoides, tales como ACG. Los ácidos tienen propiedades anti-inflamatorias, anti-mutagénica y actividad anticancerígena ⁽¹¹⁾ (Figura 1).

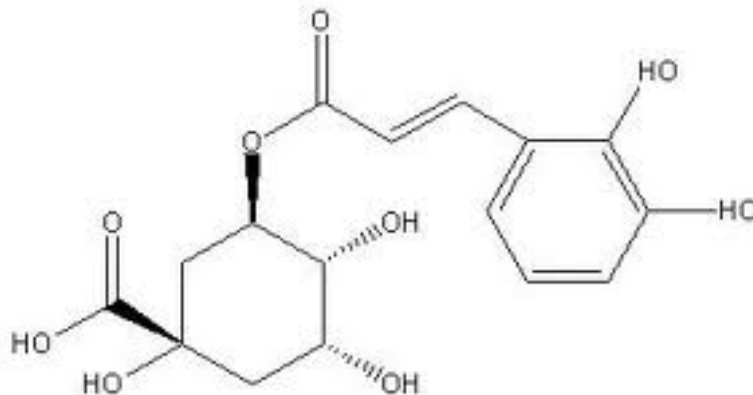


Figura 1. Estructura del Ácido Clorogénico.

VII.4 ENVASES BIODEGRADABLES CON ANTIOXIDANTES “BIOPOLÍMEROS”

La necesidad de reducir el alto grado de dependencia de los compuestos de origen fósil, hace pensar en la incorporación dentro de la cadena del petróleo de materias primas renovables, que no sólo afecten a la producción energética sino también a los productos derivados de la industria petroquímica, como los plásticos. Esta posibilidad viene dada entre otras, por la producción de polímeros biodegradables, a partir de una fuente de carbono residual como materia prima. ⁽¹³⁾

Para la producción de materiales plásticos comunes, se usan reservas fósiles no renovables, lo que contribuye al agotamiento de las reservas energéticas naturales que el planeta posee, contribuyendo al aumento de los gases de efecto invernadero (GEI). Estos materiales convencionales, por su propia naturaleza, son estables desde el punto de vista

químico, lo que quiere decir que permanecen inalterados durante largos periodos de tiempo en el medio ambiente.

Los biopolímeros plásticos de origen renovables son unas estructuras moleculares compuestas por cadenas de monómeros, que en conjunto poseen una estructura y propiedades similares a los plásticos de origen fósil. Usando como materia prima para la fermentación bacteriana de fuentes de carbono de origen renovable, como pueden ser los azúcares procedentes de cultivos energéticos o los residuos generados en diferentes industrias (biodiesel, aguas residuales, biomasa) se pueden conseguir dichos biopolímeros, con la propiedad fundamental de que son biodegradables y totalmente inocuos en el momento de su descomposición.

En el caso de usar como materia prima, los residuos obtenidos en la industria del biodiesel (glicerina cruda), los biopolímeros con mayor proyección son el PLA (Ácido Poliláctico) y el PHA (Polihidroxicarbonatos), obtenidos mediante fermentación bacteriana y con propiedades similares a los termoplásticos.

Las propiedades y características de biodegradabilidad que dichos polímeros poseen, los hacen muy versátiles para un gran número de funciones, como por ejemplo su uso en el packaging (envases), utilidades biomédicas (suturas, cápsulas de liberación controlada y cirugía facial) principalmente. ⁽¹³⁾

Los polímeros sintéticos se han convertido en parte de la vida cotidiana, y es por eso que se han dedicado a investigar por la cuestión de cómo disponer y gestionar adecuadamente todos los residuos plásticos, teniendo como resultados efectos en los estilos de vida y en los avances tecnológicos para beneficio de nuestro medio ambiente y del planeta, ya que la demanda de productos biodegradables y materiales sostenibles está en aumento. ⁽¹⁴⁾

VII.4.1 IMPORTANCIA DE ENVASES BIODEGRADABLES

Existe una combinación de factores que está impulsando la utilización de plásticos biodegradables. Entre estos están: - el alto precio de las resinas derivadas del petróleo - la creciente conciencia de los consumidores sobre la necesidad de proteger el medio ambiente - la madurez tecnológica ya alcanzada en la generación de productos de alto desempeño con estas resinas. Esto explica por qué en los últimos cinco años los

proveedores de envases han lanzado al mercado envases de plásticos biodegradables, fabricados a partir de diversas plantas, especialmente maíz, confiados en que la demanda responderá positivamente a sus ofertas. ⁽¹⁵⁾

Debido al incremento en precio que desde el 2005 tuvieron las resinas convencionales, de entre el 30 y el 80%, muchas empresas se inclinaron por buscar alternativas. Algunos plásticos biodegradables han desarrollado un nivel de madurez que les permite ser competitivos; la brecha en precio que los separaba de las resinas comunes se ha disminuido considerablemente, y materias primas como la caña de azúcar y el almidón son actualmente más económicas que el petróleo. La productividad y la competitividad tienden a aumentar en la perspectiva a largo plazo, y ya se evidencian las primeras aplicaciones concretas y masivas para estos polímeros. ⁽¹⁵⁾

Los plásticos biodegradables pueden ser fabricados a partir de recursos renovables de origen animal o vegetal, o de recursos fósiles. Los polímeros más comunes son el PLA y los PHA. Es la estructura química lo que hace a un polímero biodegradable, lo diferencia de un polímero convencional, y permite que pueda ser destruido por microorganismos, como hongos y bacterias en ambientes biológicamente activos. Aunque las cifras no son oficiales, se estima que el mercado actual de biopolímeros está alrededor de las 300.000 toneladas al año (base 2007), en el que el consumo de Europa está alrededor de las 50.000 toneladas. ⁽¹⁶⁾

De mantenerse el crecimiento continuo que se ha producido hasta ahora, la capacidad global necesaria de producción de polímeros biodegradables alcanzaría el millón de toneladas alrededor del año 2010. Ante esta perspectiva ⁽¹⁶⁾, el Instituto de Productos Biodegradables (BPI), tiene interesantes puntos de vista sobre el rápido crecimiento del uso de bioplásticos como reemplazo de los polímeros basados en el petróleo.

Uno de estos materiales es el biopolímero PLA, utilizado en el desarrollo de materiales biomédicos por sus características biodegradables. Así mismo, se considera el uso de PLA por sus propiedades de barrera, biodegradables y biocompatibilidad. ⁽¹⁷⁾

VII.4.2 ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA)

El PLA es un polímero biodegradable derivado del ácido láctico. Es un material altamente versátil, que se hace a partir de recursos renovables al 100%, como son el maíz, la

remolacha, el trigo y otros productos ricos en almidón. Este ácido tiene muchas características equivalentes e incluso mejores que muchos plásticos derivados del petróleo, lo que hace que sea eficaz para una gran variedad de usos. ⁽¹⁸⁾

Las ventajas son su biodegradabilidad y su posible procedencia a partir de materias primas renovables. La principal ruta seguida actualmente para la producción comercial de ácido láctico está basada en el uso de sustratos azucarados o amiláceos (normalmente de origen vegetal) por parte de bacterias fermentativas.

Entre los diferentes materiales plásticos biodegradables, el PLA es el que mayor potencial posee como sustituto del plástico convencional, porque además de sus excelentes propiedades mecánicas y físicas, puede ser procesado por la maquinaria ya existente. El PLA es también un material muy versátil ya que puede ser elaborado con varias formulaciones para alcanzar la mayoría de especificaciones de los diferentes productos. ⁽¹³⁾

El PLA no es un material nuevo, nos acompaña desde hace unas décadas. En 1932, Wallace Carothers, científico para Dupont, obtuvo un producto de poco peso molecular calentando ácido láctico al vacío. En 1954, después de otras mejoras, Dupont patentó el proceso de Carothers.

Un impedimento importante en el desarrollo del polímero ha sido el elevado coste de producción. Pero gracias a los avances en la fermentación de la glucosa para obtener ácido láctico, ha experimentado una bajada importante del coste de producción del ácido láctico y por consiguiente, un interés creciente en el polímero. ⁽¹⁵⁾

Cargill fue una de las primeras compañías que desarrolló los polímeros de PLA. Cargill comenzó a investigar la tecnología de producción de PLA en 1987, y su producción en planta data de 1992. En 1997 Cargill se asoció con la empresa Dow Chemical Company, creando LLC de los polímeros de Cargill (CDP), instalado en Blair, Nebraska. Hay planes para construir una planta adicional en Europa en un futuro.

Es por ello que se concluye con que el PLA es un polímero biodegradable hecho de recursos renovables. Y como material versátil que es, está aumentando su uso en la medicina, en las diferentes aplicaciones de la industria textil y del empaquetado,

principalmente en esta industria está despertando mucho interés por sus excepcionales características y su biodegradabilidad. El PLA es un polímero que veremos mucho en el futuro por ser una verdadera innovación en materiales de empaquetado. ⁽¹⁸⁾

VII.4.4 UTILIZACIÓN DEL PLA

El PLA es un polímero versátil que tiene muchas aplicaciones, incluyéndose en la industria textil, en la industria médica y sobretodo en la del empaquetado. Se tienen 4 tipos de PLA disponibles para empaquetar, cada uno de ellos con características especiales.

- 4041D; gran estabilidad hasta los 265°F (130°C)
- 4031D: también se utiliza a gran temperatura hasta 130°C
- 1100D: se utiliza para hacer tazones, las cajas de las patatas fritas, empaquetado de congelado vegetal.
- 2000D: se utiliza en envases transparentes de alimentos, para fabricar tazas, envases de leche.

Dentro de la industria textil, son conocidas las aplicaciones del PLA para la creación de telas empleadas en la tapicería, la elaboración de telas y la confección de toldos y cubiertas resistentes a la luz U.V. ⁽¹⁸⁾

El PLA se ha convertido en un material muy importante en la industria médica, donde lleva funcionando más de 25 años. Por sus características, el PLA se ha convertido en un candidato ideal para implantes en los huesos o en los tejidos (cirugía ortopédica, facial, de pecho, abdomen).

VII.4.4 CARACTERÍSTICAS DEL PLA

El PLA es un polímero termoplástico e inodoro. Es claro y brillante como el poliestireno (se utiliza para fabricar baterías y juguetes). Resistente a la humedad y a la grasa. Tiene características de barrera del sabor y del olor. La fuerza extensible y el módulo de elasticidad del PLA es también comparable al polietileno. Pero es más hidrofílico que el polietileno, tiene una densidad más baja. Es estable a la luz U.V., dando como resultado telas que no se decoloran. Su inflamabilidad es demasiado baja. El PLA se puede formular para ser rígido o flexible y puede ser copolimerizado con otros materiales. El PLA

se puede hacer con diversas características mecánicas dependiendo del proceso de fabricación. ⁽¹⁸⁾

VII.4.5 PROCESO DE OBTENCIÓN DEL PLA

Su proceso implica la extracción de los azúcares (principalmente dextrosa, pero también de la glucosa y de la sacarosa) del almidón de la remolacha o del trigo y después fermentarlo con ácido láctico. El ácido láctico se convierte en el dímero o láctida que se purifica y se polimeriza (método de apertura del anillo) a ácido poliláctico sin la necesidad de solventes. Como ácido fermentado se tiene el 99,5% L-isómeros y 0,5% D-isómero. La conversión al dímero o láctida se puede controlar para dar tres formas L, D y Mesoláctides ⁽¹⁸⁾ (Figura 2).

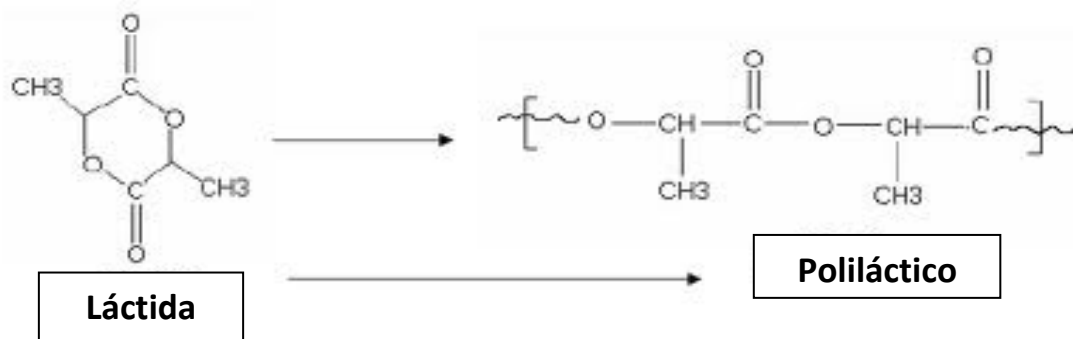


Figura 2. Estructura del ácido Poliláctico.

VII.4.6 IMPORTANCIA DEL PLA

Generalmente los envases se elaboran a partir de fuentes no renovables como el petróleo, pero esta materia prima eventualmente va a agotarse. Aunado a esto, su uso indiscriminado ha generado serios problemas ecológicos. Una alternativa es la utilización de materiales derivados de fuentes renovables como la agricultura. Un caso de éxito es el PLA, que también es biodegradable en condiciones de compostaje, para reducir los problemas de contaminación. ⁽¹⁰⁾

El PLA parece ser un producto biodegradable, y de él se hacen recursos renovables. Una crítica importante del polímero ocurre durante su fase de descomposición biológica. El PLA emite CO₂ y CH₄ durante este proceso. Son dos de los gases invernaderos que se quieren reducir sus emisiones por los Comités Internacionales. Otra crítica es que aún se

necesita de los combustibles fósiles para producir el PLA, aunque estos fósiles no se usan en el polímero directamente, son necesarios en el proceso de cosecha de las plantas y la producción química. ⁽¹⁸⁾

El PLA es atractivo y de gran interés para el desarrollo de materiales con aplicaciones en envases de alimentos, no sólo por la necesidad de reemplazar los polímeros derivados del petróleo, sino por sus propiedades físicas y mecánicas. Estas propiedades, al igual que otros polímeros dependerán de la composición química, de su peso molecular, cristalinidad, morfología y orientación de las cadenas. ⁽¹⁰⁾

En respuestas a estas preocupaciones, los partidarios del PLA reconocen que los combustibles fósiles se están utilizando para producir el plástico, pero indican que este proceso requiere de entre un 20 y 50% menos de recursos fósiles que si lo obtenemos directamente del petróleo.

Para la producción de plásticos convencionales, el petróleo es el recurso primario, mientras que el carbón y el gas natural se utilizan en la fabricación de plásticos biodegradables. Se está investigando cómo utilizar energía renovable o aprovechar la energía que se utiliza para fabricar los plásticos biodegradables (cogeneración y biomasa), también se buscan otras materias primas para el PLA.

Además esta tecnología de obtener ácido láctico, y por lo tanto PLA, a partir de trigo, remolacha, data de hace poco tiempo, mientras que la obtención de plásticos a partir del petróleo lleva 100 años, con lo cual la mejora puede ser muy grande. También se intenta reducir el consumo de energía en el proceso de fabricación de los plásticos biodegradables en un 50%.

VII.5 IMPORTANCIA DE ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES Y ADITIVOS AL PLA

Los sistemas de envases activos con antioxidantes se pueden dividir de acuerdo a su mecanismo de acción:

- a) Inclusión en la matriz polimérica y liberación al alimento por migración.
- b) Inmovilización en la superficie del envase.
- c) Envase con actividad antioxidante inherente. Por lo cual, el mecanismo de liberación del antioxidante dependerá del tipo de envase activo usado.

Los envases antioxidantes proporcionan a los alimentos una vida de anaquel mayor que un envase convencional, ya que la oxidación de lípidos se inicia en la superficie de los alimentos, donde el oxígeno es el principal promotor de la oxidación, la cual es promovida y difundida a través del alimento. ⁽²⁰⁾

Por lo tanto, los compuestos antioxidantes actúan removiendo las especies reactivas de oxígeno, evitando reacciones de oxidación y protegiendo al alimento envasado. Así, la concentración de antioxidantes incrustados en la matriz polimérica disminuye durante su almacenamiento por difusión a través del polímero, estabilizando al alimento y retrasando el proceso de oxidación. ⁽²¹⁾

La difusión del antioxidante del polímero al exterior del envase puede ser controlado utilizando una capa polimérica de baja permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno en la parte externa del envase antioxidante, y con ello garantizar la difusión del antioxidante a la matriz del alimento. En este sentido, éste tipo de envases activos representa una alternativa de protección del producto frente al deterioro oxidativo.

Para mejorar aún más las características de nuestro biopolímero, se han realizado estudios donde se adicionan plastificantes, los cuales mejoran de manera positiva la calidad y presencia del mismo. Es por ello que se toma en cuenta el uso de Aceite Epoxidado de Soya. ⁽²²⁾

VII.5.1 ACEITE EPOXIDADO DE SOYA (ESO) COMO ADITIVO EN EL PLA

El ESO es de la más alta calidad, producido a partir de aceite comestible de soya de impecable pureza. Tiene una excelente compatibilidad con resinas de PVC, que le permite ser utilizado en compuestos flexibles, tanto como plastificante o como estabilizador.

Su alto contenido de valor Oxirano lo hace indispensable para mantener una excelente estabilidad a la luz y a la temperatura. Su bajo nivel de acidez evita la descomposición del compuesto. Actúa eficientemente en forma sinérgica con los estabilizadores metálicos. ⁽²²⁾

VII.5.2 APLICACIONES DEL ESO

Es recomendado en películas atóxicas que estarán en contacto con alimentos, bolsas para sangre o suero, garrafones de agua, etc. También es un excelente lubricante y

ayuda de proceso en compuestos rígidos, así como medio de dispersión de pigmentos. Es compatible con hule clorado, nitrocelulosa, neopreno y emulsiones de PVC y PVA. (Cuadro 1).

Cuadro 1. Propiedades típicas del polímero

Propiedades típicas del polímero			
Apariencia	Líquido claro	Apariencia	Líquido claro
Viscosidad a 25°C, cps	360	Viscosidad a 25°C, cps	300-400
# ácido, mg. KOH/g	0.6	# ácido, mg KOH/g	0.8 máximo
Gravedad específica a 25/25°C	0.994	Gravedad específica a 25/25°C	0.988 - 0.996
Índice de Yodo, (% Yodo)	1.4	Índice de Yodo (% Yodo)	1.8 máximo
Índice de Oxirano, (% Oxígeno)	6.9	Índice de Oxirano, (% Oxígeno)	6.7 mínimo
Olor	Característico	Color Apha	150 máximo
Humedad	0.15		

VII.6 ENVASES ACTIVOS Y MIGRACIÓN

Los alimentos son perecederos por naturaleza, aún en productos considerados estables se presentan cambios durante el almacenamiento y comercialización que se manifiestan como una disminución en la calidad. La única excepción a esta regla es el caso de las bebidas alcohólicas (*brandies, whiskeys, vinos, entre otros.*) en los que se requieren largos periodos de tiempo para que se desarrollen los sabores y olores característicos de un producto de calidad. ⁽²³⁾

Las principales causas de deterioro que provocan pérdidas de calidad pueden ser biológicas (microorganismos, insectos y roedores), químicas (enzimáticas, no enzimáticas y oxidativas) y físicas (golpes, trituración, pérdida y ganancia de humedad, quemaduras por congelación, recristalización, fundido y congelado recurrente, etc.).

Factores ambientales como la temperatura, humedad relativa, presencia de oxígeno y luz afectan considerablemente la velocidad de estas reacciones de deterioro durante el transporte o almacenamiento. Es por esto que la selección del material de envase adecuado para mantener los niveles de humedad y oxígeno óptimos para la conservación

de cada alimento o bebida es primordial para extender su vida útil evitando pérdidas económicas. ⁽²³⁾

VII.6.1 FUNCIONES DE LOS ENVASES

La principal y más importante función del envase es proteger al producto y preservar su calidad. Un requerimiento en la selección del sistema de envasado para alimentos es la permeabilidad del material. La permeabilidad es la propiedad que tienen las películas plásticas de permitir el paso de gases o vapores a través de su estructura molecular, ya sea hacia adentro o hacia afuera del envase.

La protección al alimento del intercambio de gases y vapores depende de la integridad del envase y de la permeabilidad del material. Existen dos procesos por los que se puede dar el paso a través de materiales poliméricos: uno es el efecto poro en el cual los gases y vapores fluyen a través de microporos, imperfecciones y pequeñas grietas del material.

El otro proceso es el efecto de difusión-solubilidad en el cual se disuelven en la superficie de la película, se difunden a través de ella por efecto del gradiente, evaporándose de la superficie y desplazándose a lugares de menor concentración. Los principales factores que influyen en la permeabilidad a gases y vapores son la naturaleza del polímero y del permeante, temperatura y espesor del material de envase. ⁽²³⁾

La permeabilidad de una película plástica varía de polímero a polímero. Los materiales poliméricos presentan un amplio rango de propiedades dependientes de su composición y estructura química, interacción establecida entre éste y la molécula del permeante y condiciones de procesamiento, factores que afectan las propiedades barrera a los gases y vapores. Debido a lo anterior, la apropiada selección del material de envasado es indispensable para extender la vida útil de los alimentos. ⁽²³⁾

VII.7 PROCESAMIENTO DE LA PELÍCULA DE PLA “EXTRUSIÓN”

Las tecnologías de procesamiento que se utilizan para transformar polímeros en envases son también aplicables a PLA. Estos se basan principalmente en su punto de fusión y sus propiedades termoplásticas, ya que el PLA es fundido para posteriormente ser moldeado

y solidificado. Dentro de los diferentes tipos de procesamiento que se pueden aplicar al PLA se encuentran: extrusión, inyección por moldeo, laminado, termoformado, espumado, entre otros.

La extrusión es un tipo de procesamiento común para polímeros termoplásticos como el PLA, donde la resina se funde para posteriormente formarse como película, la cual puede ser soplada, aplanada, entre otros procesos poliméricos. El proceso de extrusión se compone de un barril de metal calentado eléctricamente, una tolva para la alimentación de la resina, un motor para hacer girar un tornillo y un dado para dar forma al polímero fundido. La combinación de la energía térmica (generada por un calentador y calor por fricción debido al roce entre el plástico), el tornillo y el barril, proporcionan calor suficiente para fundir los pellets. ⁽²⁴⁾

La relación entre la duración de vuelta de la masa fundida. Los tornillos con una L/D alta proporcionan un mayor calentamiento por cizalladura, una mejor mezcla y un mayor tiempo de residencia para fundirse en el extrusor. Otro parámetro importante es la relación de compresión del tornillo, que es la relación de la profundidad de vuelo en la sección de alimentación, cuanto mayor sea la relación de compresión que tiene un tornillo, mayor es el calentamiento por cizalladura que se tiene. ⁽²⁴⁾

Dentro de las ventajas que presenta el PLA para ser utilizado como envase de alimentos se encuentra su naturaleza biodegradable. Lo cual permite degradar al polímero en un periodo de tiempo inferior al que requieren los polímeros convencionales, contribuyendo a la disminución de la contaminación ambiental que a diario se genera por residuos plásticos. Otra ventaja que presenta el PLA es su origen procedente de fuentes renovables, permitiendo sustituir a este tipo de envases por aquellos procedentes de fuentes no renovables como es el petróleo.

Así mismo, este tipo de envases termoplásticos pueden ser utilizados como vehículo de transporte de compuestos tales como ACG hacia alimentos con contenido lipídico, con la finalidad de protegerlos del deterioro oxidativo y con ello incrementar su vida de anaquel. Estos antioxidantes pueden ser extraídos de fuentes naturales, conservando así la naturaleza del polímero aunado a la tendencia por parte del consumidor por adquirir alimentos con antioxidantes naturales.

Por medio del proceso de extrusión del PLA se pueden incorporar a la matriz polimérica ACG sin afectar su actividad antioxidante. Lo cual se debe a que la temperatura de degradación de este antioxidante es superior al punto de fusión del PLA, generando así un envase activo aplicable a alimentos (Figura 3).

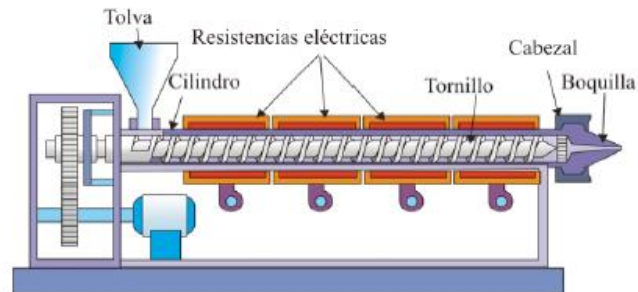


Figura 3. Ejemplo de extrusor monohusillo.

VII.8 MIGRACIÓN

La utilización de los materiales poliméricos, comúnmente plásticos, para el envasado de alimentos comenzó por los años 50's, adquiriendo una importancia creciente y desplazando de forma progresiva para algunos usos a otros materiales clásicos. Los polímeros aportan ligereza, flexibilidad, buena inercia química, versatilidad y sobre todo una amplia gama de formulaciones que, por sí mismas, como complejos y en combinación con otros materiales como el papel, el cartón o el aluminio, han determinado la aparición de envases muy diversos, adaptables a las necesidades que plantea el envasado de todo tipo de alimentos. ⁽²⁴⁾

La mayoría de los alimentos envasados pueden interaccionar en cierto grado con su envase. Los materiales plásticos no son inertes y donde se presente un contacto directo entre el alimento envasado y el contenedor plástico puede presentarse la migración de sustancias hacia el producto. Entre las sustancias que pueden transferirse del plástico al material envasado se encuentran los aditivos del polímero, impurezas como monómeros, residuos de catalizadores, solventes de polimerización y de fracciones poliméricas de bajo peso molecular con el consiguiente riesgo toxicológico para los consumidores.

La migración de estos componentes puede llegar a alterar las características físico-químicas y mecánicas del material de envase durante la vida útil del producto envasado,

bien sea por pérdida de componentes presentes en el material polimérico o por absorción de sustancias que originalmente estaban en el producto envasado. Por otra parte la migración también puede ocasionar cambios en la composición del producto envasado, que pueden afectar su calidad final y aptitud para el consumo, debido a la incorporación o pérdida de componentes por permeabilidad o migración, desde su producción hasta el momento de su consumo. ⁽²⁴⁾

El término migración define la transferencia de masa de materiales plásticos a alimentos bajo condiciones específicas y se define como la transferencia de masa de una fuente externa del alimento en contacto físico con este por medio de un proceso submicroscópico. Las sustancias que son transferidas al alimento como resultado del contacto o interacción entre el alimento y el material de envasado son frecuentemente referidas como migrantes y usualmente consisten de monómeros (o reactantes residuales) y aditivos de procesamiento. El migrante potencial puede ser usado para describir a las sustancias susceptibles a una situación de migración.

VII.8.1 SIMULANTES DE ALIMENTOS

En este estudio se utilizaron dos simulantes de alimentos para demostrar de manera demostrativa el efecto que tienen los antioxidantes y los aditivos en los alimentos. Los simulantes fueron: Etanol para el estudio de migración y aceite de soya para el estudio de vida de anaquel.

VII.8.1.1 “ETANOL”

El etanol es un líquido incoloro, volátil, con un olor característico y sabor picante. De manera natural, se obtiene a través de fermentación, por medio de levaduras a partir de frutas, caña de azúcar, maíz, cebada, sorgo, papas y arroz entre otros, generando las variadas bebidas alcohólicas que existen en el mundo. Después de la fermentación puede llevarse a cabo una destilación para obtener un producto con una mayor cantidad de alcohol. ⁽²⁵⁾

VII.8.1.2 “ACEITE DE SOYA”

La soya (*Glycinemax*) es una especie de la familia de las leguminosas (*Fabaceae*) cultivada por sus semillas, de alto contenido en aceite y proteína. El grano de soja y sus

subproductos (aceite y harina de soja, principalmente) se utilizan en la alimentación humana y del ganado. Es usada para una infinidad de productos que pueden reemplazar a otros de origen animal. El alto valor proteico de la legumbre lo hace un buen substitutivo de la carne en las naciones pobres.

De la soja se producen subproductos como el jugo de soja, la carne de soja. El aceite de soya es un aceite ligero, amarillento, perfumado que debe emplearse en frío (sin freír) por su abundancia en ácidos grasos poliinsaturados.

Los lípidos, son un grupo de compuestos químicamente diversos, solubles en solventes orgánicos (como cloroformo, metanol o benceno), y casi insolubles en agua. La mayoría de los organismos, los utilizan como reservorios de moléculas fácilmente utilizables para producir energía (aceites y grasas). Los mamíferos, los acumulamos como grasas, y los peces como ceras; en las plantas se almacenan en forma de aceites protectores con aromas y sabores característicos.

VII.9 EFECTOS DE LA MIGRACIÓN

Cualquier substancia en un alimento que normalmente no es parte de este, es un contaminante, de aquí que los migrantes sean considerados contaminantes aunque en sistemas regulatorios sean llamados aditivos accidentales o indirectos. Los migrantes pueden tener efectos en la seguridad sanitaria y toxicológica así como en las características organolépticas del producto (apariencia, sabor y olor). El riesgo de un posible daño a la salud de los consumidores debido a la migración de componentes del material plástico al alimento, ha sido reconocido por largo tiempo derivando en el establecimiento de regulaciones alimentarias correspondientes. ⁽²⁴⁾

VII.9.1 TIPOS DE MIGRACIÓN

Usualmente se divide la migración en migración global y migración específica: La migración global (o total) es la suma de todos (usualmente desconocidos) los componentes móviles del envase transferidos al alimento, mientras que la migración específica relaciona sólo a uno o dos compuestos individuales e identificables ya sea con un interés toxicológico en particular o como compuestos usados en diseños experimentales para elucidar el grado o mecanismo de migración. La migración global es

una medida de todos los compuestos transferidos en el alimento sean o no de interés toxicológico e incluye sustancias que son fisiológicamente dañinas.

VII.9.2 MODELOS MATEMÁTICOS DE LA DIFUSIÓN

Debido a la existencia de gradientes de concentración en el alimento, los materiales de envasado y su medio ambiente, transfieren masa de componentes de regiones de alta concentración a regiones de baja concentración. Éste fenómeno es conocido como difusión y se presenta en los estados líquido, sólido y gaseoso. Mientras que la transferencia de sustancias de materiales plásticos a alimentos es indudablemente un proceso complejo, la difusión es el principal mecanismo de control y el gradiente de concentración la fuerza conductora de este fenómeno. Esta transferencia obedece en la mayoría de los casos a las leyes de Fick para la difusión. ⁽²⁴⁾

La primera ley de Fick describe el flujo del migrante en estado estacionario a través de una unidad de área y está expresado por la siguiente ecuación 1:

$$F = D_p \frac{\partial C_p}{\partial x} \quad (1)$$

Es decir, el flujo F de migrante ocurre en dirección contraria a la diferencia de concentración (Cp) a lo largo del espesor (x) del polímero. La constante de proporcionalidad es el coeficiente de difusión del migrante en el polímero (Dp). Ésta expresión sólo es válida cuando las magnitudes representadas son independientes del tiempo.

Cuando la concentración varía con el tiempo, ésta dependencia viene expresada por la segunda ley de Fick, en el caso de que el coeficiente de difusión no dependa de la concentración, lo anterior se presenta en la siguiente ecuación 2:

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = D_p \frac{\partial^2 C_p}{\partial x^2} \quad (2)$$

VII.9.3 MECANISMOS DE TRANSFERENCIA

Dependiendo de las características del alimento en contacto con el material plástico y de parámetros externos como temperatura y humedad, los componentes no poliméricos y en

particular los aditivos pueden ser perdidos del material a través de diferentes mecanismos p. ej. Reacciones de descomposición o procesos de difusión. En el caso de la transferencia de sustancias el proceso se desarrolla en tres etapas: difusión del migrante en la matriz polimérica, solvatación o disolución en la interfase alimento-envase y dispersión en el alimento. ⁽²⁶⁾

VII.9.3.1 1ª ETAPA: DIFUSIÓN DEL MIGRANTE

En la primera etapa, que tiene lugar en la matriz polimérica, la migración está controlada por el proceso de difusión del migrante, que consiste en la transferencia de masa a través de 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 en líquidos. ⁽²⁶⁾

VII.9.3.2 2ª ETAPA: SOLVATACIÓN O DISOLUCIÓN EN LA INTERFASE ALIMENTO-ENVASE

En esta 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. Termodinámicamente, el equilibrio entre fases se establece cuando el potencial químico (m) de las sustancias presentes ($i=1, 2, 3.$), en ambas fases (a y b) se igualan. El equilibrio termodinámico puede expresarse de forma simple a través de las concentraciones de cada soluto en las diferentes fases:

$$K = \frac{C_i^a}{C_i^p} = \frac{C_i^p}{C_i^a} \quad (3)$$

Donde K es la constante de partición del componente i entre las fases a y b . En el presente caso, las fases serían el polímero (P) y el alimento (a). Cuando la constante presenta un valor elevado ($\gg 1$), la concentración de equilibrio en el polímero es muy superior a la concentración en el alimento, es decir el migrante “prefiere” el polímero y, por tanto, habrá poca migración desde el polímero al alimento y será muy lenta. Si la constante es muy baja ($\ll 1$), la concentración de equilibrio en el polímero es muy inferior a la concentración en el alimento, lo que favorece una migración fácil y continua al alimento. ⁽²⁶⁾

VII.9.3.3 3ª 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.

VII.10 MODELOS DE MIGRACIÓN

El modelo básico del proceso de migración considera las interacciones entre los tres componentes: el alimento, el plástico y el medio ambiente, donde el plástico es interpuesto efectivamente entre el alimento y el medio ambiente. En contenedores cerrados, el alimento es separado esencialmente de su medio ambiente aunque no todos los plásticos presentan barrera a la transferencia de gases. También puede ocurrir la transferencia en dirección inversa y puede haber pérdida de volátiles (aroma) del alimento. Sin embargo, la migración toma en cuenta solamente la interacción entre el plástico y el alimento y el medio ambiente no toma parte significativa. ⁽²⁶⁾

La migración se puede clasificar en tres clases basadas en el mecanismo de control limitante:

VII.10.1 CLASE I: “NO MIGRACIÓN”

No se presenta migración con o sin la presencia de alimento. Cuando las moléculas tienen poca tendencia a difundir del interior del plástico hacia su superficie 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. También incluye a ciertos alimentos secos y/o duros envasados en contenedores inertes p.ej. frutas y vegetales duros (especialmente secos), azúcar, sal (secos) y pasta. ⁽²⁶⁾

VII.10.2 CLASE II: MIGRACIÓN INDEPENDIENTE

Esta migración no está controlada por el alimento, aunque la presencia de éste puede acelerar la migración. 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, constante e independiente del tiempo y del tipo de producto que está en contacto. A este modelo se ajustan moléculas pequeñas: monómeros, oligómeros, subproductos de degradación (formaldehído, acetaldehído) y agentes antiestáticos y deslizantes (lubricantes), que ejercen su función en la superficie del material.

VII.10.3 CLASE III: MIGRACIÓN CONTROLADA POR EL ALIMENTO

Se requiere la presencia del alimento para interactuar con el material plástico modificando la estructura física y la 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.

Este tipo de migración incluye a la mayoría de los agentes antiestáticos en plásticos en contacto de alimentos acuosos y a los agentes deslizantes y lubricantes en plásticos en contacto de alimentos lipofílicos. Asimismo, incluye a la mayoría de los antioxidantes y estabilizantes al calor en plásticos en contacto con alimentos grasos.

VII.11 TRANSFERENCIA DE COMPONENTES NO POLIMÉRICOS DE PLÁSTICOS A ALIMENTOS

Todos los polímeros además de su base plástica contienen usualmente varios componentes no poliméricos en cantidades generalmente menores al 5%, en el caso de aditivos como los agentes antibloqueo, antiestáticos y antioxidantes entre otros, son adicionados en niveles de tan solo 0.1%. Estas sustancias tienen implicaciones en la conveniencia de uso del plástico para aplicaciones que involucran el contacto con alimentos. Aunque el plástico por sí mismo (por su alto peso molecular), no puede contaminar al alimento, ciertos aditivos, los cuales usualmente son de relativamente bajo peso molecular pueden ser transferidos del plástico al alimento durante su almacenamiento.

Los aditivos de bajo peso molecular frecuentemente poseen una alta movilidad en los materiales plásticos y, en contraste a las macromoléculas, son capaces de migrar del material plástico al producto envasado. Debido a lo anterior han surgido cuestionamientos respecto a la toxicidad de los aditivos, las cantidades que se transfieren y las posibles

implicaciones de esto, desde el punto de vista toxicológico así como lo que concierne al consumidor. ⁽²⁴⁾

Los componentes no poliméricos están presentes en los plásticos en forma inevitable como resultado del proceso de manufactura o como resultado de la adición deliberada al plástico con la finalidad de mejorar algún aspecto que facilite el procesamiento o las propiedades finales del polímero. Los componentes no poliméricos incluyen a los residuos de polimerización y aditivos.

VII.11.1 RESIDUOS DE POLIMERIZACIÓN

Los residuos de polimerización cubren aquellas sustancias que están presentes en forma inevitable como oligómeros poliméricos de bajo peso molecular, catalizadores remanentes y solventes de polimerización. Muchos polímeros manufacturados contienen monómeros sin reaccionar o polímeros de bajo peso molecular (oligómeros) en cantidades de partes por millón hasta porcentajes mayores, dependiendo del proceso de manufactura utilizado y el tipo de polímero.

Polímeros como el polietileno se pueden encontrar en este caso con una pequeña cantidad (usualmente menor al 1%) de monómero sin reaccionar. Asimismo se han reportado migrantes potenciales en bolsas para microondas y rostizado elaboradas con Nylon 6,6 y Nylon 6 en contacto con aceite de oliva encontrándose monómeros y oligómeros cíclicos. En Nylon 6,6 se detectó una pequeña proporción de oligómeros lineales y cíclicos (2%) mientras que en Nylon 6 se encontró una mezcla de monómeros y oligómeros cíclicos (11%).

VII.11.2 ADITIVOS

Incluyen a sustancias que se usan para ayudar al proceso como antioxidantes térmicos y estabilizadores al calor adicionados para prevenir la descomposición del polímero durante el moldeado; aditivos deslizantes para facilitar el moldeado y agentes plastificantes así como aditivos que son adicionados deliberadamente al polímero durante su manufactura o subsecuentemente para mejorar las propiedades del polímero final. En esta categoría son utilizadas un amplio rango de sustancias como antioxidantes térmicos, estabilizantes UV, agentes antiestáticos, agentes antifúngicos, entre otros. Algunos de los más comúnmente empleados se muestran en el cuadro 2. ⁽²⁷⁾

Cuadro 2. Aditivos utilizados en materiales poliméricos.

Aditivos utilizados en materiales poliméricos	
Aditivo	Compuestos empleados
Plastificantes	Adipatos, citratos, ftalatos, fosfatos, plastificantes poliméricos, aceite de soya epóxico
Antioxidantes	Fenoles, aminas, fosfitos, tioésteres de ácidos grasos
Estabilizadores	U.V. Estearato de calcio y zinc, aceite de soya epóxicos
Pigmentos	Dióxido de titanio
Rellenos	Sílica, talco, óxido de zinc, carbonato de calcio, fibra de vidrio
Agentes antibloqueo	Sílica
Agentes antiestáticos	Derivados del glicol, compuestos cuaternarios de amonio, amidas y aminas de ácidos grasos
Modificadores de impacto	Polímeros
Lubricantes y agentes liberadores de molde	Estearato de calcio y zinc, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, LDPE, aceite de soya epóxicos
Agentes deslizantes	Amidas de ácidos grasos

VII.11.3 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MIGRACIÓN

La difusión de aditivos en polímeros juega una importante función en los mecanismos de pérdida total de aditivos de películas poliméricas. La velocidad a la cual un antioxidante es desprendido del polímero depende de varios factores tales como la naturaleza del plástico y el alimento, la naturaleza del aditivo, el tiempo de contacto, la temperatura de almacenamiento, la velocidad a la cual el aditivo se volatiliza de la superficie del polímero y su coeficiente de difusión y solubilidad en el polímero y alimento. ⁽²⁴⁾

Los factores que afectan la difusión de aditivos en polímeros incluye no solamente la naturaleza del sustrato sino también las propiedades y estructura química del aditivo y subsecuentes interacciones entre la molécula de aditivo difusora y el sustrato polimérico, de manera que moléculas pequeñas tienden a difundir más rápidamente que las grandes y las moléculas lineales más rápido que las esféricas o moléculas con cadenas laterales.

La temperatura es un factor importante a considerar debido a que una mayor cantidad de componentes del envase y sus productos de degradación pueden migrar a los alimentos a altas temperaturas. También a temperaturas elevadas, los aditivos químicos y otros residuos del envase migran más rápidamente a la superficie donde pueden ser transferidos al alimento. Los envases susceptibles a microondas son envases en los cuales el alimento se cocina a temperaturas que alcanzan los 400-500° F.

La velocidad de difusión de moléculas pequeñas en polímeros es gobernado por la movilidad del penetrante y las cadenas poliméricas. Esto es determinado por el tamaño y forma del material difusor y por la magnitud y distribución del volumen libre en el polímero. La teoría del volumen libre se refiere a que la movilidad de una molécula pequeña en un medio dado depende de la probabilidad de que la molécula encuentre en este un hueco de gran tamaño para su difusión.

Se ha mostrado que la velocidad de penetración de moléculas pequeñas depende solamente de la cantidad de volumen libre en el polímero y es generalmente aceptado que el transporte de moléculas pequeñas en polímeros semicristalinos toma lugar solamente en la región no cristalina. Las regiones amorfas de un polímero permiten una mayor movilidad que las regiones con estructura cristalina, y en general, la velocidad de difusión de sustancias en un material plástico se incrementa conforme el grado de cristalinidad del polímero disminuye. Esto implica que la difusión es mayor cuando el polímero está por encima de su temperatura de transición vítrea (T_g) que por abajo.

Los mecanismos de transferencia de los aditivos son diferentes dependiendo del alimento o medio de contacto. La difusión a través del polímero a la superficie del material depende del alimento o el medio ambiente y la solubilidad del aditivo en tal medio. Para polímeros en contacto con líquidos, la velocidad de pérdida del aditivo está determinada por la velocidad de difusión del aditivo a la superficie del polímero. En el envasado de un líquido hay un contacto directo entre el líquido y el material lo cual facilita la transferencia de componentes del material de envasado al producto. Además, también puede ocurrir la transferencia del mismo líquido y/o sus componentes al material plástico por el contacto entre los dos (sorción). Estos mecanismos de transferencia están controlados por la difusión.

VII.11.4 MIGRACIÓN ESPECÍFICA

La evaluación de la migración específica supone el análisis específico cualitativo y cuantitativo de cada sustancia, por lo que no se puede sistematizar, ya que dependerá de la naturaleza química de cada migrante. Para la migración específica los métodos usados son más laboriosos y complicados que los usados para la migración total. El plástico se expone al simulante, el cual es entonces analizado para determinar la cantidad de sustancia específica que ha migrado del plástico. Aún cuando los simulantes de alimentos líquidos ofrecen una forma simplificada de determinar el grado de migración, en ocasiones es más conveniente analizar el material de envase para determinar la cantidad de sustancia perdida durante el tiempo de contacto. ⁽²⁴⁾

El análisis de cantidades traza es caracterizado por la separación, identificación y determinación cuantitativa de componentes que están presentes en las muestras a concentraciones muy bajas. En la mayoría de los casos los componentes traza de interés tienen que ser transferidos del extracto original en un solvente el cual tiene adecuada polaridad y volatilidad para llevar a cabo una separación cromatográfica.

VII.11.5 METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ADITIVOS EN PLÁSTICOS

Se han desarrollado varios métodos para la determinación de aditivos en plásticos y/o simulantes de alimentos: cromatografía líquida (HPLC o LC), cromatografía de gases (GC), cromatografía en capa delgada y espectrometría de masas (MS). De estos, el método de HPLC es generalmente considerado como el método más adecuado, permitiendo los análisis de aditivos no volátiles, polares y no polares los cuales usualmente no pueden ser determinados por GC.

VII.11.5.1 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es básicamente una forma altamente mejorada de cromatografía en columna. En lugar de un disolvente que se dejó gotear a través de una columna por gravedad, es forzada a través de bajo altas presiones de hasta 400 atmósferas. Eso hace que sea mucho más rápido. También permite utilizar un tamaño de partícula mucho más pequeña para el material de relleno de la columna que da una superficie mucho mayor para las interacciones entre la fase estacionaria y las moléculas que fluyen pasado. Esto permite una separación mucho mejor de los

componentes de la mezcla. La otra mejora importante con respecto a cromatografía en columna se refiere a los métodos de detección que pueden ser utilizados. Estos métodos están altamente automatizados y extremadamente sensibles. ⁽²⁸⁾

La columna y el disolvente

Hay dos variantes en uso en HPLC en función de la polaridad relativa del disolvente y la fase estacionaria.

HPLC en fase normal

Esto es esencialmente lo mismo que ustedes ya han leído en cromatografía en capa fina o cromatografía en columna. Aunque se describe como "normal", no es la forma más común de HPLC. La columna se llena con diminutas partículas de sílice y el disolvente es no polar - hexano, por ejemplo. Una columna típica tiene un diámetro interno de 4,6 mm (y puede ser menor que), y una longitud de 150 a 250 mm.

Los compuestos polares en la mezcla se pasa a través de la columna se adhieren más a la sílice polar que no polares compuestos. Los no polares por lo tanto, pasarán más rápidamente a través de la columna.

HPLC en fase inversa

En este caso, el tamaño de la columna es el mismo, pero el sílice es modificado para que sea no polar uniendo largas cadenas de hidrocarburos a su superficie - típicamente con 8 ó 18 átomos de carbono en ellos. Un disolvente polar se utiliza - por ejemplo, una mezcla de agua y un alcohol tal como metanol.

En este caso, habrá una fuerte atracción entre las moléculas de disolvente polar y polar en la mezcla se pasa a través de la columna. No será tan atractivo tanto entre las cadenas de hidrocarburos unidos a la sílice (fase estacionaria) y las moléculas polares en la solución. Las moléculas polares en la mezcla por lo tanto, pasará la mayor parte de su tiempo en movimiento con el disolvente. No polares compuestos en la mezcla tiende a formar atractivos con los grupos de hidrocarburos, debido a las fuerzas de dispersión de van der Waals. También será menos soluble en el disolvente, debido a la necesidad de romper los enlaces de hidrógeno a medida que se escurren entre las moléculas de agua o

metanol, por ejemplo. Por lo tanto, menos tiempo en solución en el disolvente y esto les acelera su camino a través de la columna (Figura 4).

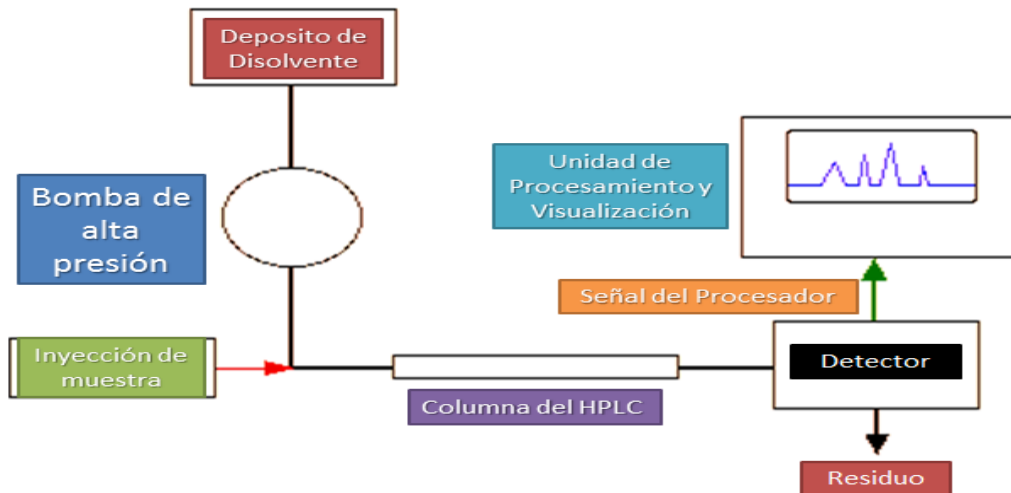


Figura 4. Esquema de flujo para HPLC

Inyección de la muestra.

La inyección de la muestra es totalmente automatizada o de forma manual. Depende mucho del modelo del Equipo con el que se cuenta.

Tiempo de retención

El tiempo necesario para que un compuesto particular para viajar a través de la columna al detector se conozca como su tiempo de retención. Este tiempo se mide desde el momento en que se inyectó la muestra hasta el punto en que la pantalla muestra un pico de altura máxima de ese compuesto.

Compuestos diferentes tienen diferentes tiempos de retención. Para un compuesto particular, el tiempo de retención pueden variar dependiendo de: la presión utilizada (ya que afecta a la velocidad de flujo del disolvente), la naturaleza de la fase estacionaria (no sólo de qué material está hecho, sino también del tamaño de partícula), la composición exacta del disolvente, la temperatura de la columna. Eso significa que las condiciones tienen que ser cuidadosamente controlada si está utilizando tiempos de retención como una forma de identificar compuestos.

El detector

Hay varias formas de detectar cuando una sustancia ha pasado a través de la columna. Un método común que es fácil de explicar utiliza ultra-violeta de absorción.

Muchos compuestos orgánicos absorben la luz ultravioleta de longitudes de onda diferentes. Si tiene un haz de luz UV brilla a través de la corriente de líquido que sale de la columna, y un detector de UV en el lado opuesto de la corriente, puede obtener una lectura directa de la cantidad de la luz es absorbida.

La cantidad de luz absorbida dependerá de la cantidad de un compuesto particular que está pasando a través del haz en el momento (Figura 5).

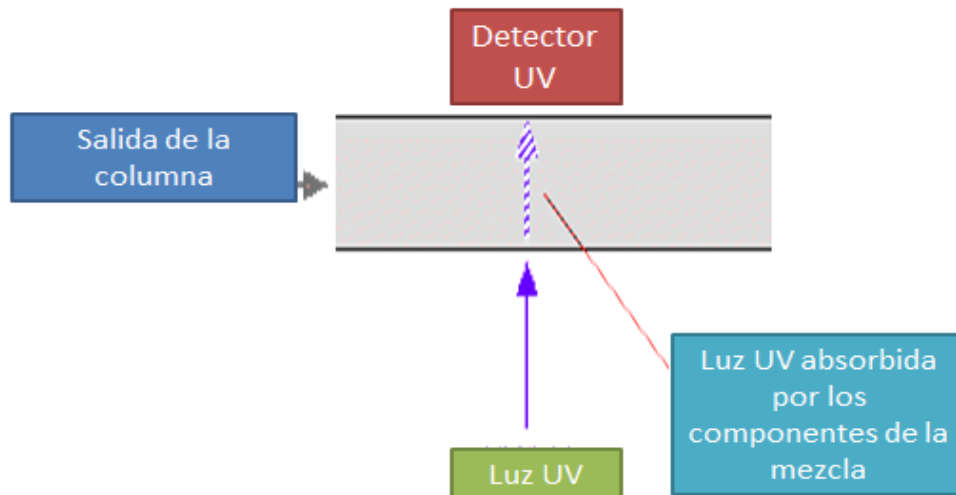


Figura 5. Detector

Interpretación de la salida del detector

El producto se registra como una serie de picos - cada uno representa un compuesto en la mezcla que pasa por el detector y la absorción de luz ultravioleta. Siempre y cuando tuvieron el cuidado de controlar las condiciones de la columna, puede utilizar los tiempos de retención para ayudar a identificar los compuestos presentes-siempre, claro está, que usted (o alguien más) ya les había medido para muestras puras de las distintas compuestos en las mismas condiciones.

Sin embargo, también puede utilizar los picos como una forma de medir las cantidades de los compuestos presentes. Supongamos que usted está interesado en un determinado compuesto, "X". Si usted inyecta una solución que contiene una cantidad conocida de puros "X" en la máquina, no sólo podría registrar su tiempo de retención, pero también se puede relacionar la cantidad de "X" a la cumbre que se formó.

El área bajo el pico es proporcional a la cantidad de X que ha pasado el detector, y esta área se puede calcular automáticamente por el ordenador conectado a la pantalla. El área mediría se muestra en verde en el diagrama (muy simplificado) ⁽²⁸⁾ (Figura 6).

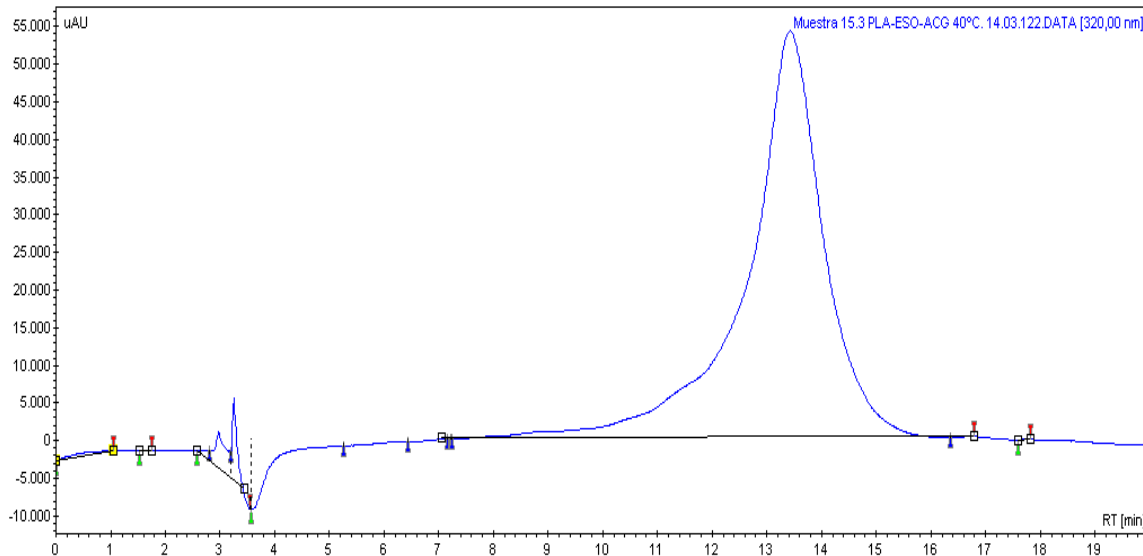


Figura 6. Cromatograma de ACG en películas de PLA-ESO-ACG a 40°C y a 320nm

VII.11.5.2 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

La espectrofotometría UV-Visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma.

En espectroscopia, el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano a 195-400 nm) y el visible (400-780 nm) ⁽²⁹⁾ (Figura 7).

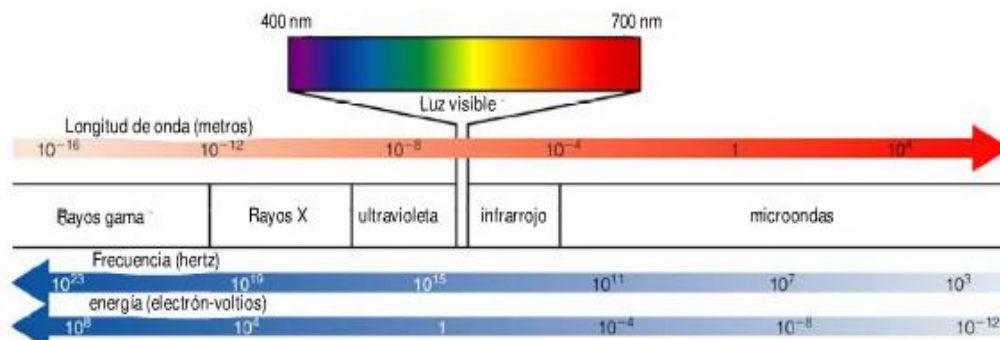


Figura 7. Espectro electromagnético

La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm, es una región de energía muy alta. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos.

En la región Visible apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite. Por lo tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada (Cuadro 3).

Cuadro 3. Longitudes de onda (Absorbancia)

longitud de onda aproximada	color de luz que se absorbe	color de luz que se refleja o ve
390 - 435	Violeta	Amarillo verdoso
435 - 490	Azul	Amarillo
490 - 580	Verde	Rojo
580 - 595	Amarillo	Azul
595 - 650	Naranja	Azul verdoso
650 - 780	Rojo	Verde azulado

La Transmitancia (T), de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra, y la cantidad de luz que incidió sobre ella.

La Absorbancia (A), es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma, y se define como el logaritmo de $1/T$ ⁽²⁹⁾ (Figura 8).

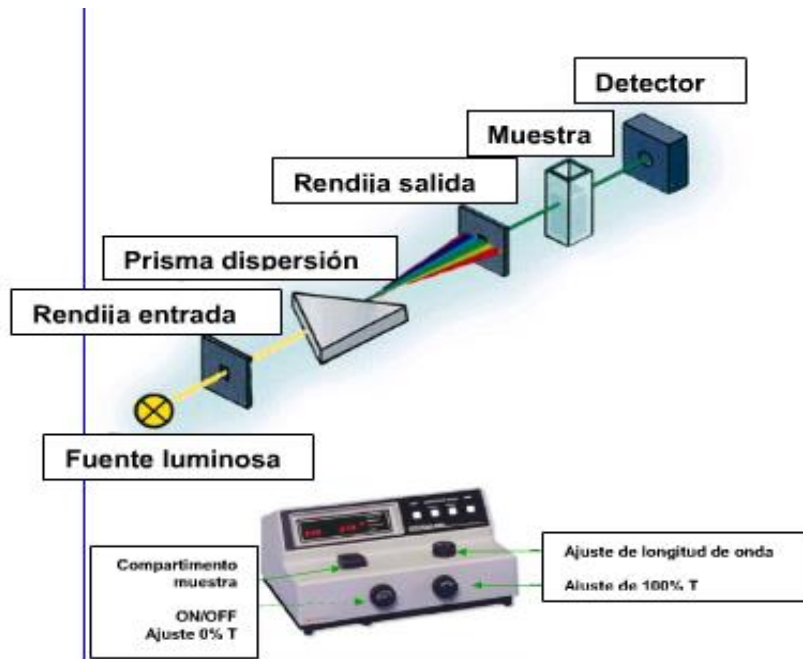


Figura 8. Espectrofotometría.

Por lo tanto, después de explicar las distintas formas de determinar la medición de la migración específica, se puede entender que generalmente ha contribuido al entendimiento de los procesos fundamentales de transferencia de aditivos de un plástico al alimento. Esto ha permitido determinar los efectos de parámetros tales como tiempo,

temperatura, extractantes, aditivos, plásticos, grosor, etc. para ser evaluado y analizados por su importancia en el diseño de pruebas, para el control de la migración global y para la protección al consumidor ⁽²⁴⁾.

El fenómeno de migración puede ser de gran beneficio para la industria alimentaria si se utiliza una matriz polimérica impregnada con antioxidantes procedentes de subproductos agrícolas. Dentro de los antioxidantes de peso molecular bajo que se pueden encontrar en estos subproductos agrícolas, se encuentra el ACG. Los cuales previenen y retardan el proceso de oxidación y los efectos causados por tal deterioro, como cambios de color y sabor. ⁽³⁰⁾

Por otro lado una de las limitantes para en la aplicación de PLA como material de envase es su inestabilidad estructural a temperaturas sobre 60 °C por lo que no soporta el llenado en caliente de un alimento líquido. Por lo anterior, las aplicaciones actuales se restringen a charolas, bandejas, película y botella para contener, almacenar y comercializar alimentos que no requieren llenado en caliente.

Considerando lo anterior, una aplicación potencial del PLA es en envases para aceites vegetales o alimentos con alto contenido de grasa. Sin embargo, otra desventaja del PLA es su limitada barrera al oxígeno (velocidad de transmisión al oxígeno, VTO de 550 cc·mil/m²·día·atm) por lo que alimentos susceptibles a la oxidación y envasados en PLA, quedarán expuestos al oxígeno y sus consecuencias.

Dentro de los compuestos fenólicos que se pueden incorporar al PLA se encuentran el ACG. Y en estudios recientes se ha demostrado que el uso de PLA con adición de antioxidantes como son el alfa-tocoferol y el resveratrol, sí resulta un proceso de difusión factible, pero al ser sometidos a temperaturas altas estos pueden sufrir una descomposición térmica dando como resultado productos de descomposición, los cuales son antioxidantes de alta capacidad estabilizadora de radicales libres.

El proceso de difusión no solo depende del antioxidante, polímero, simulante de alimento, polaridad de los mismos, temperatura del sistema, etc., sino de todos estos factores en conjunto, así como de las fuerzas de atracción electrostáticas que se generan entre el antioxidante y el polímero y con el simulante de alimento.

Es por eso que en este trabajo se evalúa el uso de ACG incorporado en la matriz polimérica del PLA, se determina también su migración de una película de PLA a un simulante de alimento etanólico.

VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS

VIII.1 MATERIALES Y MÉTODOS:

El trabajo experimental se desarrollo en 3 etapas:

Etapa I. Elaboración de películas por extrusión de PLA-ESO-ACG.

Etapa II. Estudio de difusión de ACG de la película de PLA-ESO a simulantes de alimentos a base de Etanol.

Etapa III. Evaluación del efecto de la película con ACG en la estabilidad oxidativa de aceite de soya.

Etapa IV. Evaluación del Efecto de la película con ACG en el crecimiento de bacterias.

Materiales:

Para la fabricación de las películas se empleó PLA 4043D, marca NatureWorks. Los antioxidantes utilizados fueron ACG al 95%, marca Sigma, así como Butilhidroxitolueno (BHT). Se utilizó Metanol grado reactivo y grado HPLC, Agua HPLC, marca J. T. Baker como solvente de extracción y fase móvil, así como Acido Fórmico 98-100% grado reactivo, marca Merck. Para la determinación de IP se utilizó Ácido Acético glacial, así como Almidón marca J. T. Baker, Iso-octano grado reactivo, marca Honeywell, Yoduro de potasio, marca ACS Fermont, tiosulfato de sodio 0.1 N, marca Golden Bell y lauril sulfatado de sodio 0.1 N, marca Golden Bell. Para cada determinación se utilizaron viales de 38 mL. Y tubos Eppendorf. Para el estudio de estabilidad oxidativa se utilizó Aceite de Soya sin antioxidantes proporcionado por Industrializadora Oleofinos S.A. de C.V. Para la prueba microbiológica, se utilizó una perforadora, una pinza, cajas Petri, mechero, hisopos, campana de extracción, Etanol 95% marca J.T. Baker y un asa bacteriológica.

Equipos:

Los equipos utilizados en el experimento fueron: Molino Thomas Wiley Laboratory Mill, modelo 4. Estufa convencional VWR, modelo 1321F para el caso de 40°C y una Incubadora Mechanical Convection PRECISION 30 MR para 20°C. Para la fabricación de las películas se utilizó extrusor de 2.5 Kg/h de capacidad, cortador y dado plano Beutelspacher. Balanza analítica Adventure-Pro, Ohaus. Para medir el espesor de las películas se utilizó micrómetro digital EJ: Cady y Co. Modelo DTT. La cuantificación de los antioxidantes extraídos de las películas se realizó por HPLC Varian Star, modelo 9012, con inyector Rheodyne, modelo 7125, acoplado a un detector UV con arreglo de diodos, modelo Varian Prostar 335 y una estación de trabajo Galaxy, en fase reversa con longitudes de onda de 320 nm. En una proporción de 98:2 a flujo isocrático de 1mL/min. Para determinar las propiedades ópticas de las películas se utilizó colorímetro Konica Minolta CR-300, espectrofotómetro UV-Visible Varian, Cary 50 Bio.

IX. ETAPA I

IX.1 ELABORACIÓN DE PELÍCULAS DE PLA CON ACEITE EPOXIDADO DE SOYA Y ÁCIDO CLOROGÉNICO.

Los pellets de PLA con ESO y las películas con antioxidante (ACG) se fabricaron en el Laboratorio de Envases del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Hermosillo, Sonora.

1.- Elaboración de pellets con ESO.

Primeramente, la resina de PLA se sometió a secado a 40°C por 24 horas en estufa convencional. Para fabricar los pellets de PLA con ESO, así como los testigos, se mezcló manualmente la resina con ESO (PLA-ESO), sometiéndose al proceso de extrusión con un extrusor de 2.5 kg/h de capacidad, utilizando un tornillo simple con dado con salida de filamento con temperatura de 140°C en las tres zonas de calentamiento, para la obtención de los pellets de forma cilíndrica, el filamento obtenido se pasó por un cortador Beutelspacher de 2 amperes, a partir de estos pellets, se tomaron sólo 100g para ser molidos, eso con la finalidad de reducir el tamaño de partícula y provocar un mejor mezclado en el segundo proceso.

2.- Elaboración de pellets de PLA-ESO-ACG.

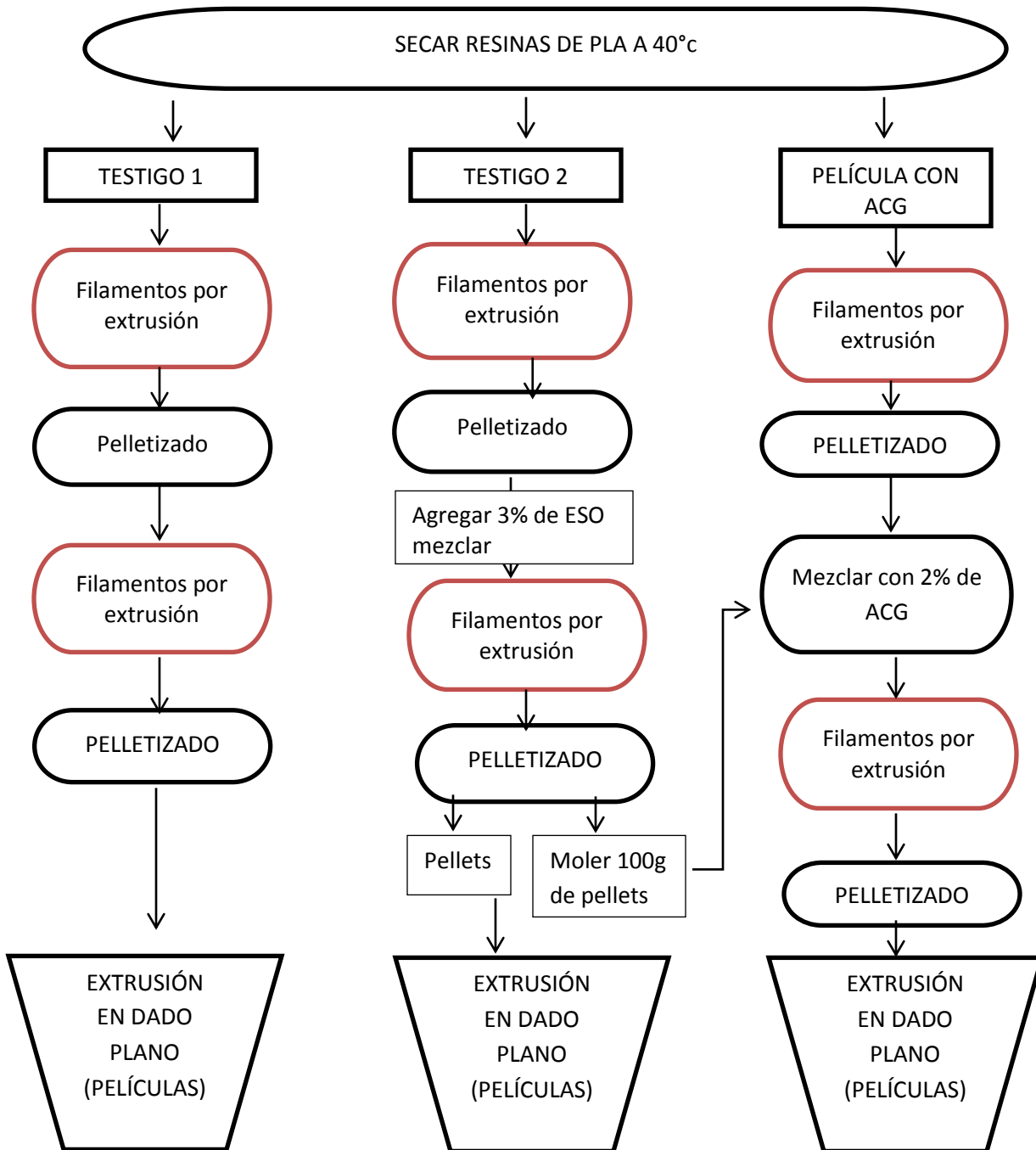
En este paso se usó el filamento molido y se mezcló manualmente para obtener un porcentaje final de 1.9% de ACG, a partir de esta mezcla se elaboró un nuevo filamento usando el mismo equipo y bajo las mismas condiciones que en el primer proceso.

Se elaboraron dos testigos, el testigo 1 fue obtenido a partir del procesamiento de resina de PLA y el testigo 2 se fabricó usando pellets de PLA-ESO, los testigos fueron sometidos exactamente al mismo número de procesos y bajo las mismas condiciones que fueron usadas en la fabricación de las películas de PLA-ESO-ACG.

3.- Elaboración de películas PLA-ESO-ACG y testigos.

Las películas de PLA-ESO-ACG y testigos 1 y 2 (PLA y PLA-ESO respectivamente) se obtuvieron al procesar los pellets previamente elaborados, utilizando un extrusor monohusillo de 2.5 kg/h de capacidad provisto de tres zonas de calentamiento y con un dado de salida plano. El perfil de temperatura utilizando para la fabricación de las 3 películas fue 160, 150 y 150° C para las zonas I, II y III respectivamente, con una velocidad de tornillo de 60 rpm. Las películas presentaron un espesor final de $53.34 \pm 5.03 \mu\text{m}$ para la película testigo 1 y $119.38 \pm 8 \mu\text{m}$ para la película testigo 2 y PLA-ESO-ACG, determinando mediante un micrómetro digital E.J. Cady and Co. Modelo DTT (EUA). Las películas elaboradas se almacenaron a -20 °C con protección de luz para su posterior análisis. La fabricación tanto de pellets como de las películas se realizó con luz roja. (Diagrama 1)

Diagrama 1. Condiciones de procesamiento de 3 películas de PLA



IX.2 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS PELÍCULAS DE PLA TESTIGO, PLA-ESO Y PLA-ESO-ACG

Propiedades Ópticas

Para determinar las propiedades ópticas de las películas obtenidas, primeramente se midió absorbancia de la luz UV-visible realizando un barrido de 200-800 nm a una velocidad media de 600 nm/s. Para el análisis se utilizaron películas de PLA testigo y con antioxidante con una medida de 1 x 5 cm y fueron colocadas directamente en un espectrofotómetro UV-Visible Modelo Cary 50 Bio (EUA). Los valores se expresaron como absorbancia. Posteriormente se calculó la diferencia de color entre las películas con ACG y las películas testigo (PLA y PLA-ESO).

El análisis se realizó utilizando un colorímetro *CR-300* Konica Minolta (EUA). Los resultados se expresaron en valores CIE L^* , a^* y b^* , donde L^* indica luminosidad, a^* y b^* son las coordenadas de cromaticidad (indican direcciones de colores). La coordenada $+a^*$ es la dirección del rojo, $-a^*$ es la dirección del verde, $+b^*$ es la dirección del amarillo y $-b^*$ es la dirección del azul. El diferencial de color (ΔE) indica el cambio de color y se calculó con la ecuación 4. Se hicieron 3 repeticiones por muestra ⁽²⁶⁾.

$$\Delta E = ((\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2)^{0.5} \quad (4)$$

Resistencia a la Tensión y Porcentaje de Elongación

Se evaluó la resistencia a la tensión y porcentaje de elongación de las películas de PLA testigo y con antioxidante utilizando un analizador de textura TA-XT2 (Texture Technologies Co., Scarsdale, NY, EUA) de acuerdo a la ASTM D 882-91 (1995c). Se empleó una carga de 500 N y una velocidad de prueba de 8.33 mm/s. Se utilizaron probetas de 60 x 10 mm. Las muestras se analizaron en dirección máquina (DM). La resistencia a la tensión fue expresada en MPa y se analizaron 5 réplicas por muestra. Para el porcentaje de elongación se analizaron 10 réplicas por muestra ⁽²⁶⁾.

Cuantificación de ácido clorogénico en película de PLA-ESO.

Para cuantificar los remanentes de ACG en los pellets y películas PLA-ESO se realizaron extracciones utilizando 1 g película en 38 mL de metanol grado reactivo. Se agregó el 1% de BHT para las películas PLA-ESO-ACG. Las extracciones se realizaron en ausencia de

luz y agitación constante a 40 °C, por 24 horas. El procedimiento se repitió hasta que no se detectó el antioxidante en la película. Las extracciones se realizaron por triplicado.

Para lograr la extracción del ACG de las películas elaboradas, se siguió la metodología propuesta por Soto-Valdez y col., (2007) con algunas modificaciones, la cuales se describen a continuación: primero, aproximadamente cada 0.5 metros se cortaron trozos de la película, cuidando que todos tuvieran el mismo espesor. Estos trozos se homogenizaron para posteriormente pesar 0.1g de la mezcla en viales de 50 mL, adicionando 20 mL de etanol (Fermont, México) con 0.01 g de BHT (TCI, Japón).

Los viales se mantuvieron en reflujo con agitación constante y a una temperatura de 40°C. La extracción se realizó por 24 horas en oscuridad, con 3 repeticiones. Tomando 200 µL de muestra para posteriormente obtener resultados. Posteriormente se decantó el Etanol sobrante y se colocaron 10 mL más de Etanol para su segunda extracción (48 h), tomando 200 µL de muestra. Se hizo lo mismo para las 24 h siguientes, colocándole 10 mL de Etanol, y tomando 200 µL. de muestra, esto para corroborar que el ACG se haya extraído completamente de la película.

El ACG extraído de la película se cuantificó por HPLC en fase reversa en un equipo Varian, acoplado a un detector UV con arreglo de diodos y una estación de trabajo Galaxy, a una longitud de onda de 320 nm. Se utilizó una columna Varian Chromsep 150 x 4.6 mm protegida con una precolumna C₁₈. El volumen de muestra del inyector fue de 20 µL. La fase móvil empleada fue Agua Acidificada al 5% con Acido Fórmico: Metanol, en una proporción de 98:2 a flujo isocrático de 1 mL/min.

Se elaboró una curva estándar del antioxidante en metanol, la cual fue preparada bajo condiciones normales de laboratorio: temperatura ambiente (25° C), y protección de luz, de 3 a 500 µg del antioxidante en 10 mL de etanol estabilizado con 0.001g de BHT. La ecuación de la curva del antioxidante se obtuvo por análisis de regresión lineal graficando la concentración del antioxidante contra el área bajo la curva obtenida en el cromatograma. Las concentraciones de los antioxidantes se reportaron en µg de compuesto/mL de solvente.

Límite mínimo de Cuantificación.

El límite mínimo de cuantificación del equipo se determinó inyectando un estándar de ACG. Se inició con una concentración de 5 µg/mL, la cual fue disminuyendo hasta obtener un área no detectable por el equipo (menor a 300 unidades). Fue seleccionada la concentración del estándar inmediato superior a la no detectada como el límite mínimo. El análisis se realizó por triplicado.

El límite mínimo de cuantificación del método se obtuvo considerando el límite del equipo multiplicado por el volumen final de evaporación de la muestra durante el proceso de extracción de las películas en etanol dividido por el peso inicial de la película y se expresó en µg/mL.

IX.3 ETAPA II

IX.3.1 DIFUSIÓN DE ACG A SIMULANTES DE ALIMENTOS A BASE DE ETANOL

El estudio de difusión de los compuestos fenólicos hacia los simulantes de alimentos se realizó de acuerdo a la norma de la ASTM D4754-98 (ASTM, 2006).

Para la evaluación de la difusión de los antioxidantes a etanol a 98%, se cortaron 20 discos de la película con un sacabocado de 2 cm de diámetro y un espesor de 119.38 ± 8 µm. Obteniendo un área total de 125.66 cm². Los discos fueron colocados en soportes de acero inoxidable y separados por perlas de cristal para evitar el contacto entre ellos. Los soportes fueron colocados dentro de viales protegidos de la luz (Figura 9).

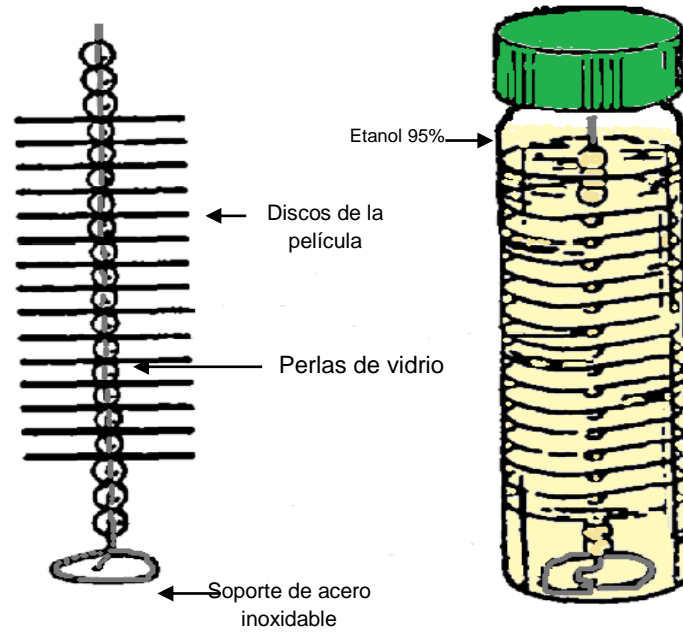


Figura 9. Sistema de migración. (ASTM D4754-98, 2003)

Etanol a 95%. A cada vial se le agrego 38 ml de etanol al 95%, así como BHT al 1%. La relación volumen/área obtenida fue de 0.6 mL/cm^2 , valor dentro del rango establecido por la ASTM D4754-98, la cual establece una relación entre 155 y 0.31 mL.cm^2 (ASTM, 2006). Los viales se mantuvieron a 20 y $40 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta alcanzar el equilibrio en la difusión. Se realizaron muestreos constantes tomando $200 \text{ }\mu\text{L}$, cuantificando el antioxidante migrado con respecto al tiempo, por la técnica previamente descrita en la etapa I. El contenido de ACG migrado se graficó como difusión ($\mu\text{g/mL}$) con respecto al tiempo de almacenamiento. El estudio se realizó por triplicado para cada temperatura.

IX.3.2 DETERMINACIÓN DE REMANENTES DE ACG DESPUÉS DE LOS ESTUDIOS DE DIFUSIÓN

Para determinar el remanente en la película PLA-ESO-ACG del simulante de alimento, se separó el solvente a temperatura ambiente en ausencia de luz. Posteriormente, se extrajo el antioxidante remanente con 10 ml de Metanol, ausencia de luz, agitación constante y 1% de BHT por 72 horas, verificando la extracción total de los antioxidantes en las películas.

IX.3.3 DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE DIFUSIÓN (D) DE LOS ANTIOXIDANTES MIGRADOS DE LA PELÍCULA PLA-ESO-ACG A SIMULANTES DE ALIMENTOS.

En este estudio se determinó la concentración de ACG en el simulante y discos en etanol al 95 % a una temperatura de 40°C, obteniendo así el coeficiente de difusión (D), utilizando las soluciones analíticas de la segunda ley de Fick, Ecuaciones 5 y 6.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{(2n+1)^2}{L^2} \pi^2 D t\right) \quad (5)$$

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

Cuando el volumen de la solución es finito o cuando parte del migrante queda en la película al alcanzar el equilibrio se utiliza la ecuación 6:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(1+\alpha)}{1+\alpha+\alpha^2 q_n^2} \exp\left\{-\frac{q_n^2 D t}{L^2}\right\} \quad (6)$$

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

Para determinar el D de cada uno de los compuestos es necesario conocer el coeficiente de partición ($K_{p,f}$) entre el polímero y la solución, así como el valor de α . El $K_{p,f}$ expresa la solubilidad relativa del migrante entre la matriz polimérica y el simulante de alimentos en el equilibrio y α es el flujo del migrante en el simulante de alimentos. Un $K_{p,f} > 1$ indica una concentración alta del migrante en el polímero, comparado con la concentración del

migrante en el líquido. Cuando el $K_{p,f}$ se presenta a concentraciones bajas se puede tomar como un valor constante, el cual se calcula por:

$$K_{p,f} = \frac{C_p}{C_f} \quad (7)$$

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

$$\alpha = \frac{V_s}{K_{p,f} V_p} \quad (8)$$

Donde V_s y V_f son el volumen del simulante de alimentos utilizado y del polímero respectivamente.

La Ecuación 5 se utiliza si el sistema es infinito, es decir si $K_{p,f} < 1$ y $\alpha > 1$, de lo contrario se debe utilizar la Ecuación 6 para sistemas finitos, es decir si $K_{p,f} > 1$ y $\alpha < 1$.

El valor de D (cm^2/s) se determinó minimizando la suma del cuadrado de los errores (SSE) de los datos experimentales y los valores estimados, Para determinar el ajuste de los datos de la ecuación 4 y 5, se utilizó la función de regresión no lineal en MATLAB R2020b.

IX.4 ETAPA III

IX.4.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PELÍCULA CON ACG EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITE DE SOYA

Para determinar el efecto del antioxidante en la estabilidad oxidativa del aceite de soya, se realizaron 2 experimentos:

El 1er. Experimento consistió en cortar trozos de película testigo y con antioxidante de 3 x 21 cm, equivalente al área del estudio de migración y mismo espesor. Los trozos se colocaron en viales de vidrio y posteriormente se adicionaron 102.5 mL de aceite de soya. Las muestras fueron almacenadas a 30 °C. El análisis se realizó con luz para simular condiciones de mercadeo, en un rango de intensidad de 1135-1845 Luxes. El monitoreo se realizó cada 12 h. los primeros 2 días, después cada 24 h. hasta el día 4. Se

analizaron 3 repeticiones. La estabilidad oxidativa del aceite de soya se monitoreó por medio del índice de peróxidos.

Y el 2do. Experimento consistió en colocar 20 mg de ACG en 200 mL de aceite de soya, posteriormente se tomaron 60 mL de esta solución en viales de vidrio. Las muestras fueron almacenadas a 30°C. El análisis se realizó en las mismas condiciones que el Experimento 1. Y el monitoreo se efectuó cada 12 h. los primeros 3.5 días y posteriormente cada 24 h. los siguientes 6.5 días, dando un total de 10 días de muestreo. Se analizaron 3 repeticiones. Y de la misma manera que el experimento 1, la estabilidad oxidativa del aceite de soya se monitoreó por medio de índice de peróxidos.

IX.4.2 ÍNDICE DE PERÓXIDOS.

El grado de oxidación del aceite de soya se determinó por índice de peróxidos (IP) y fue expresado como miliequivalentes de peróxido por kg de aceite de acuerdo al método de la AOCS. ⁽⁶⁾

IX.5 ETAPA IV.

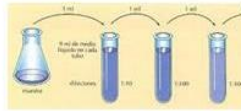
IX.5.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PELÍCULA CON ACG EN EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS.

Prueba Microbiológica

Se cortaron discos **PLA-ESO-ACG** de 0.6 cm de diámetro y $119 \pm 8 \mu\text{m}$ de espesor, la manipulación se hizo en condiciones de esterilidad.



Se usaron 3 diluciones (3, 10 y 30 $\mu\text{g/mL}$) de **ACG** en Metanol con 1% de BHT.



Se prepararon 400 mL de Agar **Mueller-Hinton** y se colocaron 25 mL de este en cajas petri teniendo 15 cajas petri en total.



Se hicieron pozos en el medio para colocar las diluciones, se depositaron 25 μL en cada pozo, demostrándose en la figura.



Se hicieron pruebas de actividad antimicrobiana con 6 microorganismos. Inoculando los medios y haciendo la prueba por duplicado.

Diagrama 2. Efecto de la película con ACG en el crecimiento de bacterias.

Microorganismos:

1. *Escherichia coli* O157:H7
2. *Listeria monocitogenes*
3. *Staphylococcus aureus*
4. *Escherichia coli*
5. *Klebsiella pneumoniae*
6. *Neisseria*

IX.5.1.1 METODOLOGÍA PARA ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA MICROBIOLÓGICA.

Para la realización de esta técnica, se hizo caldo de Agar Mueller-Hinton y se colocaron aproximadamente 10 mL de caldo en cada tubo de ensayo, en total fueron 6 tubos de ensayo. Se inoculó cada tubo de ensayo con un microorganismo diferente, comparándolo con una solución nefelométrica y un Antibiograma. Esto se realiza para tener una concentración conocida de microorganismos en el caldo y así se pueda inocular en las cajas Petri de manera masiva y se vea el crecimiento de los microorganismos después de 24 hrs. (Este es un método estandarizado por el laboratorio de ciencias de los alimentos del CIAD) (Figura 10).

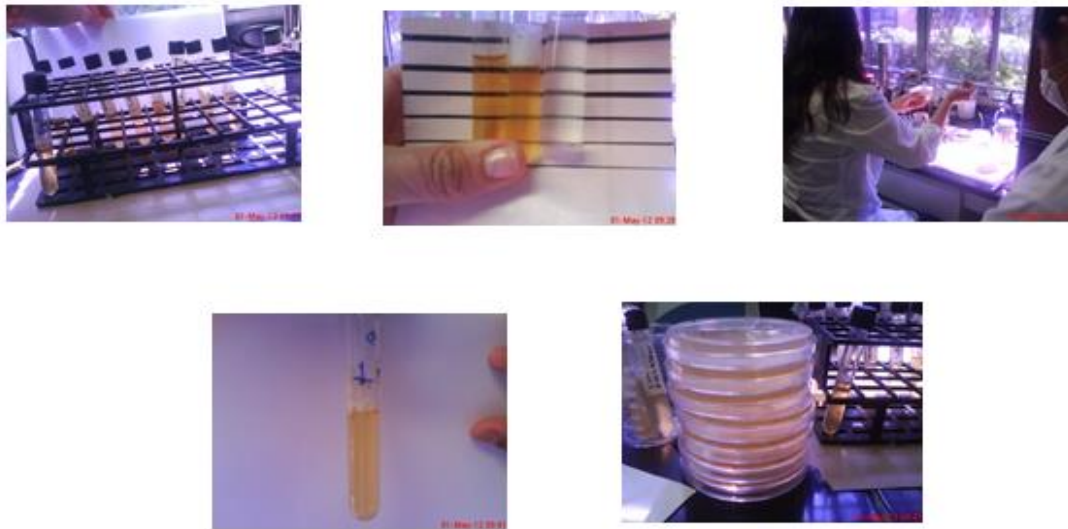


Figura 10. Prueba Microbiológica.

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA I

Las películas presentaron un color blanco-amarillo, con un espesor de $53.34 \pm 5.08 \mu\text{m}$ para la película testigo 1, y con un espesor de $119.4 \pm 8 \mu\text{m}$ para las películas Testigo 2 y PLA-ESO-ACG (Figura 11, Cuadro 4).



Figura 11. Películas de PLA Testigo

Características y Propiedades Físicas de las Películas de PLA Testigo, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG.

Espesor

En este estudio los espesores obtenidos de las películas fueron los siguientes (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados de los Espesores de las películas.

MUESTRA	ESPESOR (μm)
PLA TESTIGO 1	53.34 ± 0.3
PLA-ESO TESTIGO 2	119.4 ± 0.8
PLA-ESO-ACG	119.4 ± 0.8

La diferencia entre espesores que se observa entre la película de PLA con las películas de PLA-ESO y PLA-ESO-ACG, es por la adición del plastificante ESO.

Soto-Valdez y Mendoza-Wilson (1998) mencionan la importancia del espesor en la película, ya que este es uno de los factores que influyen en la velocidad de transmisión a los gases y vapores de las películas del material envasado, misma que puede ser afectada por variaciones en la formulación del plástico, tanto como la adición de plastificantes como la adición de antioxidantes. El espesor tiene un factor relevante en el proceso de migración, ya que tiene amplia relación con la masa total del migrante disponible.

Propiedades Ópticas

A continuación se muestra el barrido espectral de 200-800 nm en el UV visible tanto en las películas de PLA (testigo 1) y PLA-ESO (testigo 2), como las películas con antioxidante (PLA-ESO-ACG). La película testigo mostró una absorbancia entre 3.4-3.7 entre las longitudes de onda de 200-220 nm, permitiendo el paso de la luz hasta los 800 nm este aumento de absorbancia entre 200-220 pudo deberse a la absorción de los enlaces éster del PLA, los cuales tienen su máxima absorción a 205 nm. ⁽³⁾

En la Figura 12, el barrido no muestra diferencia alguna entre las películas PLA y PLA-ESO, ya que las dos se encuentran en el mismo rango de absorbancia, con esto se deduce que el ESO no es detectado por espectroscopia UV en el rango de 200 a 800 nm. El ESO principalmente está siendo utilizado en este estudio por su poder plastificante pero este tiende a proteger al polímero de la luz y del calor principalmente, sin tener reacciones secundarias. Siendo así un buen aditivo para nuestra película. Aunque este efecto se da principalmente por su espesor.

La película de PLA-ESO-ACG mostró una absorbancia entre 3.4 - 3.5, a partir de la longitud de onda de 320-330 nm, esta absorbancia se atribuye a que el ACG absorbe a los 320 nm. Estos resultados demuestran que un alimento envasado con películas PLA-ESO-ACG, tendría una ventaja con respecto a los otros envases debido a que éste otorgaría protección contra la luz UV en ese rango de absorción. ⁽³⁸⁾

En este barrido no se muestra diferencia entre el testigo 1 y 2, ya que las dos se encuentran en el mismo rango de absorbancia, con esto se deduce que el ESO no es detectado en el rango de 200 a 800 nm.

Manzanarez-López (2010) menciona que para que una molécula pueda absorber luz UV a ciertas longitudes de onda depende de transiciones electrónicas cuya energía necesaria

son en magnitud de las fuerzas de enlace, ya que los electrones participantes son los de valencia. Es decir, la energía de los cuantos de luz en esta región del espectro electromagnético es suficiente para excitar un electrón de su estado de enlace a otro de antienlace.⁽²¹⁾

Los resultados en este estudio sugieren que un alimento envasado con películas PLA-ESO-ACG podrían utilizarse para proteger al alimento de la luz UV en este rango (320 – 330 nm) de absorción.

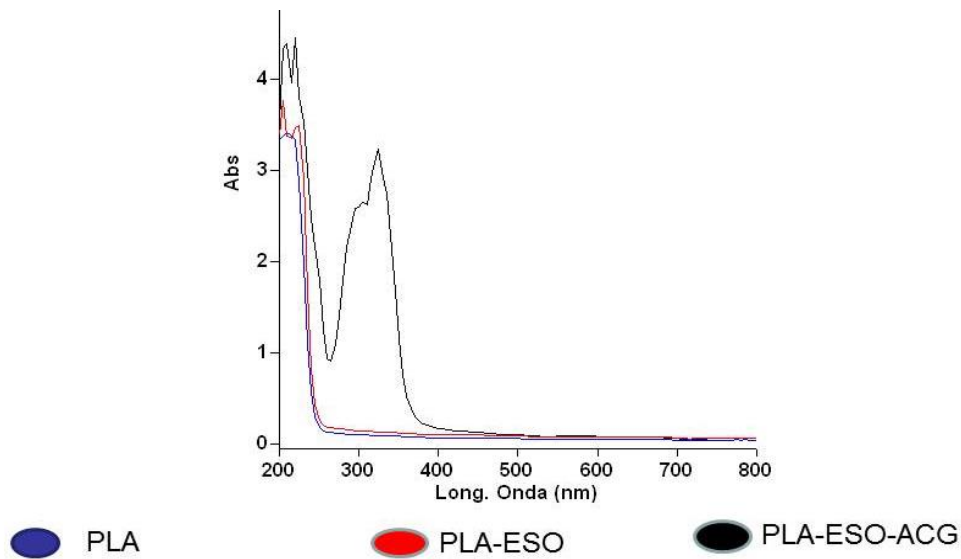


Figura 12. Barrido Espectral por UV-Vis de las películas

PLA, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG.

Color

Los resultados obtenidos de color en las películas de PLA, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG. Para la película de PLA se encontró un valor de -4.14 ± 0.015 en la coordenada b^* , lo cual indicó una dirección de color hacia el azul. La coordenada a^* presentó un valor de -2.033 ± 0.08 lo cual indicó una dirección de color hacia el rojo. Estas direcciones de color se apreciaron visualmente en la película de PLA, y se consideró a la película como transparente.

La película de PLA-ESO presentó un valor de -4.01 ± 0.091 en la coordenada b^* , indicando una dirección de color hacia el azul. La coordenada a^* presentó un valor de 2.11 ± 0.043 , indicando una dirección de color hacia el rojo. Y por último la película de PLA-ESO-ACG presentó un valor de -4.10 ± 0.02 , siguiendo la tendencia de las películas testigo, indica una dirección de color hacia el azul y en caso de la coordenada a^* presenta un valor de 2.04 ± 0.08 , indicando una dirección hacia el color rojo. Visualmente se apreciaron coloraciones ligeramente amarillas de las películas con PLA-ESO y PLA-ESO-ACG (Figura 13).

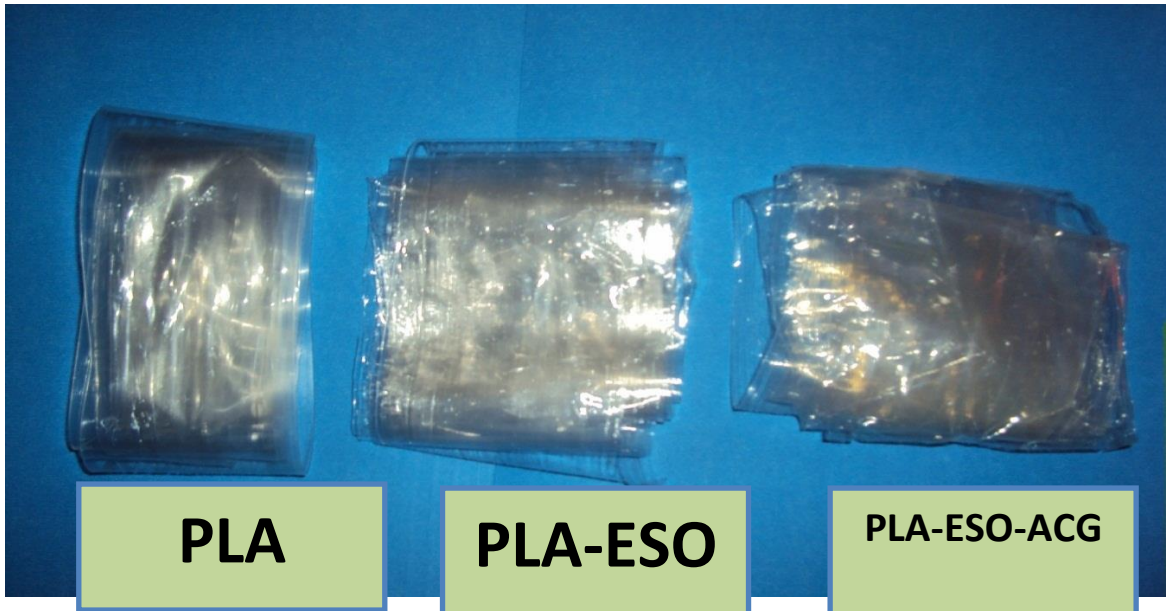


Figura 13. Películas de PLA, PLA-ESO (1.3%) y PLA-ESO (1.3%)-ACG (1.9%)

Con lo que respecta al resultado obtenido de la diferencia total de color (ΔE^*) se encontró un valor de 0.65, en el caso de PLA y PLA-ESO-ACG, y un valor de 0.31, en caso de PLA-ESO y PLA-ESO-ACG, lo cual indicó que hay un cambio de color al momento de adicionar el antioxidante. Estos resultados fueron similares a los reportados por Manzanarez-López (2010) para una película de PEBD con α -tocoferol en donde encontraron que un ΔE^* mayor a 0.40 confiere una coloración amarilla, lo cual es atribuido a la formación de productos coloridos de la oxidación como las tocoquinonas. En el caso del ACG el posible responsable de este cambio de color puede ser el Ácido Quínico, por ser productos de descomposición del ACG, pero aún no encuentra reportado. ⁽²¹⁾

Manzanarez-López (2010) también reportó resultados similares obteniendo una diferencia de color de 0.5, en el caso de una película de PLA con α -tocoferol. (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores de L^* , a^* y b^* en películas de PLA testigo 1, PLA-ESO testigo 2 y PLA-ESO-ACG.

Muestra	L^*	a^*	b^*	ΔE^{*1}
Película de PLA Testigo 1^(a)	91.40±0.14	2.033±0.08	-4.14±0.015	-----
Película de PLA-ESO Testigo 2^(b)	91.74±0.34	2.11±0.043	-4.01±0.091	-----
Película de PLA-ESO-ACG	92.05±0.21	2.04±0.08	-4.10±0.02	0.65 ^(a) 0.31 ^(b)

$$\Delta E = ((\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2)^{0.5}.$$

Cada valor es el promedio de 3 repeticiones

Resultado de ΔE para PLA Testigo (a) y PLA-ESO Testigo (b).

La Figura 13 muestra la apariencia visual de las películas de PLA, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG. A pesar que las películas de PLA-ESO y PLA-ESO-ACG mostraron una coloración amarilla, ésta fue ligeramente apreciable a simple vista.

Por lo tanto, el uso de estas películas no podría interferir en la percepción de color del alimento envasado, por ejemplo, aceites vegetales, como lo menciona Graciano-Verdugo (2005) para películas de α -tocoferol con quercetina.

Resistencia a la Tensión y Porcentaje de Elongación

Durante el período de almacenamiento del producto, el material de envase estará expuesto a diferentes condiciones que pondrán a prueba sus propiedades mecánicas. Es

necesario conocer la resistencia y el comportamiento de elongación de la combinación de polímeros y aditivos como antioxidantes utilizados en la estructura de la película. ⁽²⁸⁾

La resistencia a la Tensión y el % de Elongación nos dan una idea principal de cómo se comportará nuestra película en condiciones de uso como envase, el Cuadro 6 muestra los resultados obtenidos al medir la resistencia a la tensión y porcentaje de elongación de las películas de PLA, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG.

La medición se realizó en dirección máquina (DM) y los valores encontrados para la resistencia a la tensión fueron de 90.02, 74.75 y 44.99 MPa, respectivamente. Estos resultados fueron menores a los reportados en la hoja técnica de PLA utilizado en este estudio, la cual reporta un valor de 110.1 MPa (Hoja técnica Nature Works. PLA Polymer 4042D). Auras y col. (2004) reportaron un valor de 12.2 MPa en DM siendo menor al encontrado en este estudio, esto se pudo deber al tipo de procesamiento utilizado en la elaboración de la película, ya que Auras y col. (2004) procesaron la película mediante extrusión soplo a 195 °C y en nuestro trabajo se utilizó extrusión por dado plano, lo cual pudo influir en la orientación de las moléculas, lo que provoca un cambio en las propiedades mecánicas del PLA.

Cuadro 6. Resistencia a la Tensión y % de Elongación.

Muestra	Resistencia a la tensión DM (MPa)	Elongación (%)
Película de PLA- testigo	90.02 ± 6.78	9.89 ± 1.6
Película de PLA-ESO	74.75 ± 2.59	17.44 ± 1.1
Película de PLA-ESO-ACG	44.99 ± 3.07	17.42 ± 1.7

En las películas de PLA, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG analizadas se observó una resistencia a la tensión de 90.02 ± 6.78, 74.75 ± 2.59 y 44.99 ± 3.07 respectivamente. Estos resultados fueron menores a los reportados en la hoja técnica de PLA utilizado en

este estudio, la cual reporta un valor de 110.1 MPa (Hoja técnica Nature Works. PLA Polymer 4042D). El ESO (plastificante) y el ACG (antioxidante) al interactuar químicamente con el PLA modifican las propiedades del polímero, en este caso confiriéndole una menor resistencia a la tensión. La orientación del PLA juega un papel muy importante en esta propiedad. Al haber una interacción química entre el ESO, el ACG y las cadenas del PLA, orientado en dirección máquina, no mejora la resistencia mecánica. Pero tampoco se observa una textura indeseable en la película.

En lo que respecta al porcentaje de elongación de las películas de PLA, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG. Los valores para las películas testigos y con ACG fueron de $9.89\pm 1.6\%$, de $17.44\pm 1.1\%$, y de $17.42\pm 1.7\%$ respectivamente. Encontrándose diferencias entre la película testigo 1 (PLA) y las películas con ESO, ya que el ESO ayuda en las propiedades mecánicas (elongación) de cualquier polímero.

Con los resultados obtenidos se encontró que el PLA presenta buena resistencia a la tensión (comparándolo con la Poliamida), pero no demasiada elongación antes de su ruptura (comparándolo con el PET), por lo que es considerado un plástico rígido, ya que tiende a ser resistente, soporta deformación, pero no suele ser duro, es decir, es frágil. Por lo que requiere de plastificantes para hacerlo más flexible o combinarlo con otros polímeros o biopolímeros para adquirir diferentes propiedades, dependiendo de los requerimientos del alimento a envasar. ⁽²¹⁾

Por lo tanto en las películas de PLA-ESO-ACG analizadas se observó un efecto negativo en la resistencia a la tensión en comparación con la película de PLA testigo 1, puesto que la película con ESO-ACG redujo casi un 50% la resistencia a la tensión. Y en el caso de la elongación se puede ver un resultado favorecedor ya que tiene un aumento de un 76% de elongación, se esperaba tener resultados más altos pero por los tratamientos térmicos a los que estuvieron expuestos al momento de procesar las películas, pueden afectar al plastificante.

Cuantificación y extracción de ACG en película de PLA-ESO

Como se describió en la metodología de este trabajo, la ecuación de la curva se obtuvo por un análisis de regresión lineal, graficando la concentración de antioxidante contra el área bajo la curva obtenida en el cromatograma (Figura 14) obteniendo como resultado 9.46 ± 0.49 mg de ACG/g de película.

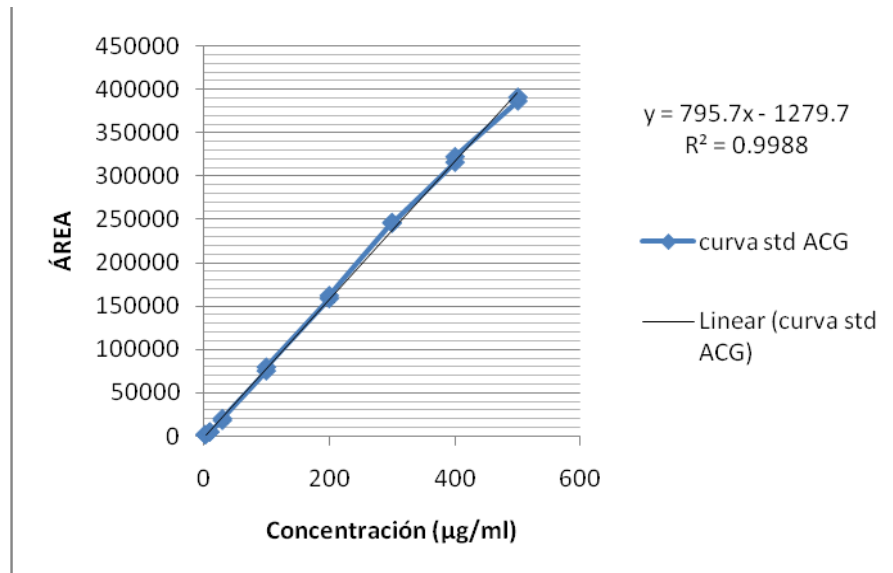


Figura 14. Curva Estándar de ACG en Etanol a 320 nm.

Límite Mínimo de Cuantificación y Porcentaje de Retención de ACG.

En este estudio el límite mínimo de cuantificación del equipo fue de $1\mu\text{g/mL}$. El porcentaje de retención de ACG en la película de PLA-ESO fue de 49.81%, por lo que el método no fue completamente eficiente y afectó la estabilidad del ACG con las condiciones establecidas en la técnica. En nuestro estudio no se observó un mayor porcentaje de retención, por lo que la temperatura de extracción pudo tener un efecto en la degradación del antioxidante. El porcentaje de pérdida fue de 50.19%.

ETAPA II

Determinación de Difusión de ACG de la Películas de PLA y PLA-ESO a Simulantes de Alimentos.

Difusión a Etanol al 95%.

De acuerdo con la FDA, el etanol al 95% es un simulante de alimento graso para poliolefinas, sin embargo, en años recientes se ha utilizado como simulante de alimento graso para estudios de difusión del PLA, ya que actualmente no existen especificaciones en las legislaciones para este polímero (Figura 15).

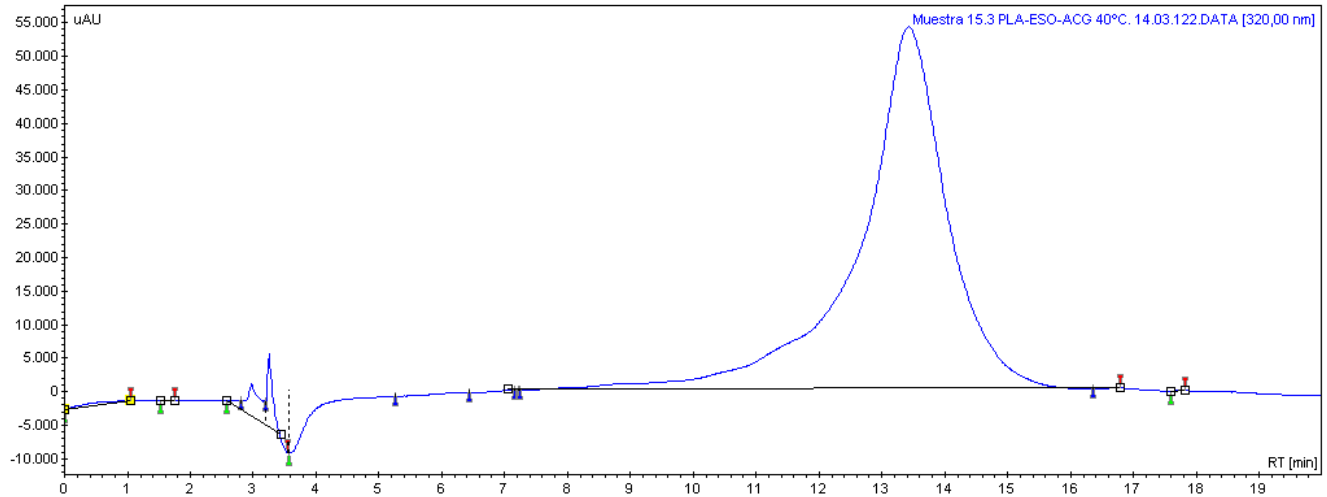


Figura 15. Cromatograma de ACG (110.71 $\mu\text{g/mL}$) extraído de la película de PLA-ESO-ACG en Etanol 95% a 40°C y 320 nm.

La difusión del antioxidante mostró la tendencia de las curvas típicas de las leyes de Fick, el equilibrio se alcanzó a los 3 días (4500 min) a 40°C. Dando como resultado una cuantificación del antioxidante de $8.48 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$, obteniendo $92.54 \pm 9.64\%$ del antioxidante contenido en la película. (Figura 16) Tomando en cuenta la pérdida que fue de un $7.45 \pm 9.64\%$, se puede explicar que el ACG pudo tener algún cambio en su estructura molecular y haberse convertido en otros compuestos que no se pudieron detectar en el equipo, también se puede deber a la presencia mínima de luz a las que las muestras estuvieron expuestas y se sabe que el ACG tiende a degradarse lentamente en presencia de luz o también se pudo quedar retenido permanentemente a la película.

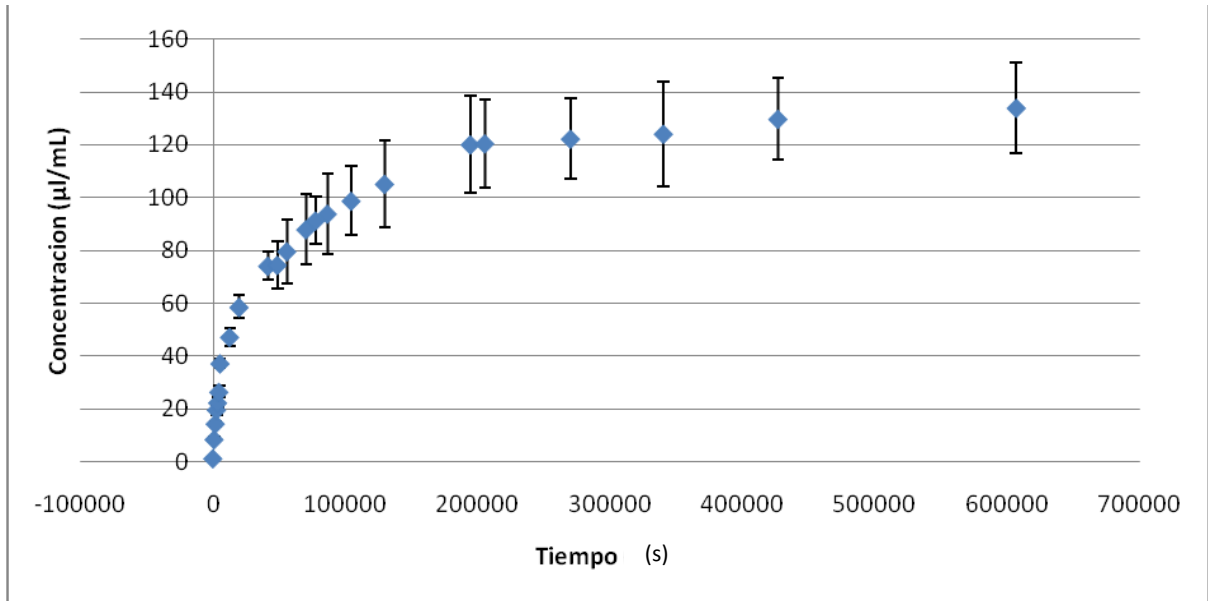


Figura 16. Migración de ACG en etanol 95% a 40°C, presentado el promedio de 3 repeticiones \pm DS.

En este estudio se determinó un $K_{p,f}$ (Coeficiente de partición) para cada uno de los experimentos de difusión a la temperatura que fue sometido el sistema, correspondiente a 40°C. El $K_{p,f}$, expresa la solubilidad relativa del migrante entre la matriz polimérica y el etanol al 95% en el equilibrio. Un $K_{p,f} > 1$ indica una concentración alta del migrante en el polímero, comparado con la concentración del migrante en el líquido. El valor cuantificado de $K_{p,f}$ fue de 2.49 ± 0.42 , esto se debe a que con el aumento de la temperatura en el sistema, se incrementa la energía requerida para romper las atracciones entre los grupos polares del ACG y el PLA-ESO, liberando con mayor facilidad al antioxidante. Así también, se incrementa la capacidad de absorción del etanol entre la matriz del PLA-ESO y la solubilidad del ACG en etanol.

El coeficiente de Difusión (D) fue calculado para cada uno de los sistemas de acuerdo a los valores de $K_{p,f}$ y α (de 18.11 ± 2.79) que se presentaron. A 40°C el valor del D se estimó con la ecuación 4, esta ecuación proporcionó el mejor ajuste de D para estas temperaturas con una predicción del 95% de confianza. La difusión de ACG a etanol a 95% a 40°C se presenta en la siguiente figura (Figura 17).

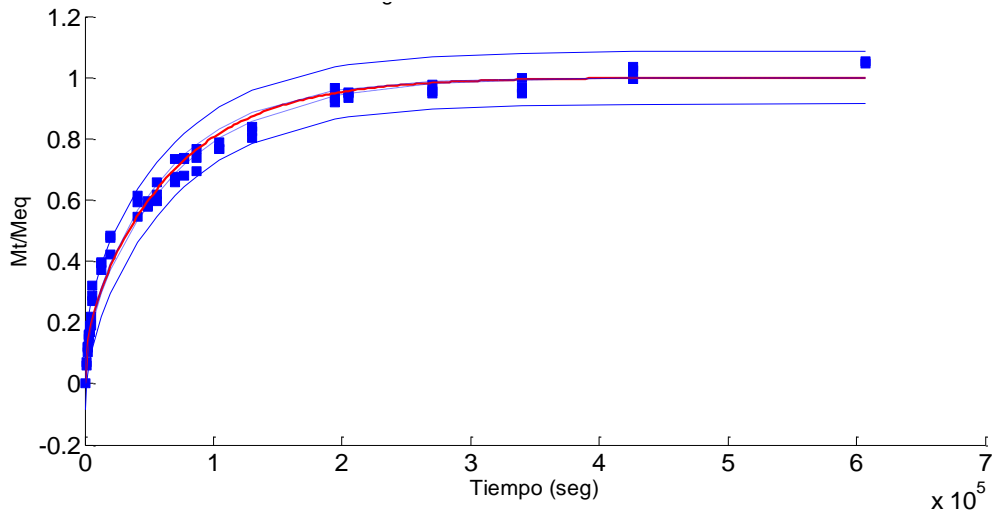


Figura 17. Migración de ACG de la película PLA-ESO-ACG en Etanol 95% a 40°C

Este resultado mostró que el tiempo de equilibrio disminuyó con el incremento de temperatura, debido a la dependencia de la difusión de los antioxidantes con esta variable. El valor de D a 40°C fue de $20.59 \pm 0.58 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Cruz-Zúñiga (2011) reportó este mismo análisis a la misma temperatura, utilizando quercetina como antioxidante en películas de PLA, su valor de D a 40°C es de $95.8 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, lo que nos lleva a compararlo con nuestro resultado, y decir que esta en el rango de los valores de D a esa temperatura (Cuadro 7).⁽²⁹⁾

Cuadro 7. Coeficiente de Difusión (D), coeficiente de partición ($K_{p,s}$) y α de ACG de películas de PLA-ESO a Etanol al 95% a 40°C.

Temperatura	$K_{p,s}$	α	$D \text{ (cm}^2/\text{seg)}$	$RCME^2$
40°C	2.49 ± 0.42	18.11 ± 2.79	$20.59 \pm 0.58 \times 10^{-11}$	0.431×10^{-11}

La migración de ACG en Etanol al 95% a 40°C, se puede deber a factores como la temperatura del sistema y afinidad del aditivo con el polímero y simulante de alimentos. A esta temperatura se genera un mayor movimiento de las cadenas del polímero, disminuyendo esta movilidad al disminuir la temperatura. Este movimiento permite el paso del etanol entre las cadenas del polímero.

Una vez que el etanol penetra el PLA-ESO, ejerce una atracción electrostática sobre los grupos hidroxilo del ACG-ESO, generando la ruptura de los puentes de hidrógeno existentes entre los grupos OH⁻ del antioxidante con los grupos carboxilo del PLA-ESO, permitiendo la liberación del ACG a Etanol a 95%. En estudios realizados por Manzanarez-López (2010), reporta que el Etanol absorbe entre las cadenas de la matriz polimérica del PLA y espacios vacíos entre ellas. Es por eso que se pudo añadir el plastificante como tal y el antioxidante sin modificar la estructura del PLA, ya que estas tienen atracción entre los grupos OH⁻.

En el 2011 Soto-Valdez desarrolló una película de PLA con resveratrol, en su estudio de difusión a Etanol al 100% realizado a 43°C reportó un valor de D de $85.1 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, siendo un valor no comparativo al cuantificado en este estudio y también comparándolo con el de Cruz-Zúñiga (2011). Estos resultados pudieron variar por los diferentes aditivos que se le añadieron a las películas, al espesor, a la manipulación a al momento del procesamiento, la temperatura y la concentración del simulante de alimento para la migración.

El estudio de migración a 20°C no se incluirá en este informe. Ya que el tiempo de migración es mayor al de 40°C y aún no llega al equilibrio, y por lo tanto la velocidad de migración no pudo determinarse, por lo que no se mencionaran resultados a esa temperatura.

ETAPA III

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PELÍCULA CON ÁCIDO CLOROGÉNICO EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ACEITE DE SOYA

ÍNDICE DE PERÓXIDOS

Experimento 1

Películas con ESO y ACG.

El resultado de índice de peróxidos (IP) en aceite de soya almacenado por 5 días en contacto con las películas PLA, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG a 30°C en presencia de luz. Los valores se encontraron entre 3.18 meq/kg al día 0 y 15.47 meq/kg para el aceite en

contacto con la película testigo al día 5. El valor encontrado para el aceite en contacto con la película con antioxidante a esta temperatura fue de 28.88 meq/kg al día 5.

Para el aceite en contacto con la película de PLA-ESO-ACG se obtuvo 28.87 meq/kg en el día 4, para las películas testigo (PLA y PLA-ESO) alcanzaron 15.48 y 29.44 meq/kg respectivamente al día 4. El valor establecido por el Codex Alimentarius es de 10 meq/kg para estar dentro de los márgenes de calidad ⁽²¹⁾, por lo que estos resultados sugirieron que el ACG no logró migrar de la matriz polimérica al aceite y por ende, no hubo efecto del antioxidante, tanto el aceite en contacto con la película PLA-ESO como la de PLA-ESO-ACG no presentaron diferencias notorias puesto que las dos llegaron a valores cercanos a los 30 meq/kg en el día 4, a diferencia de la película de PLA, que se mantuvo en 15.48 meq/kg, lo que nos lleva a especular que las altas concentraciones de peróxidos se deben a la naturaleza del Aceite Epoxidado de Soya usado en estas las películas de PLA-ESO y PLA-ESO-ACG ya que éste es un aceite vegetal refinado, cuyas insaturaciones fueron tratadas parcialmente con peróxidos para formar grupos epoxi, los grupos epoxi en esta película pueden justificar el que éstas películas tengan valores mayores con respecto a la película de PLA, por lo que es probable que cierta cantidad de ESO haya migrado hacia el aceite de soya aumentando así la cantidad de peróxidos estimada en el análisis (Figura 18).

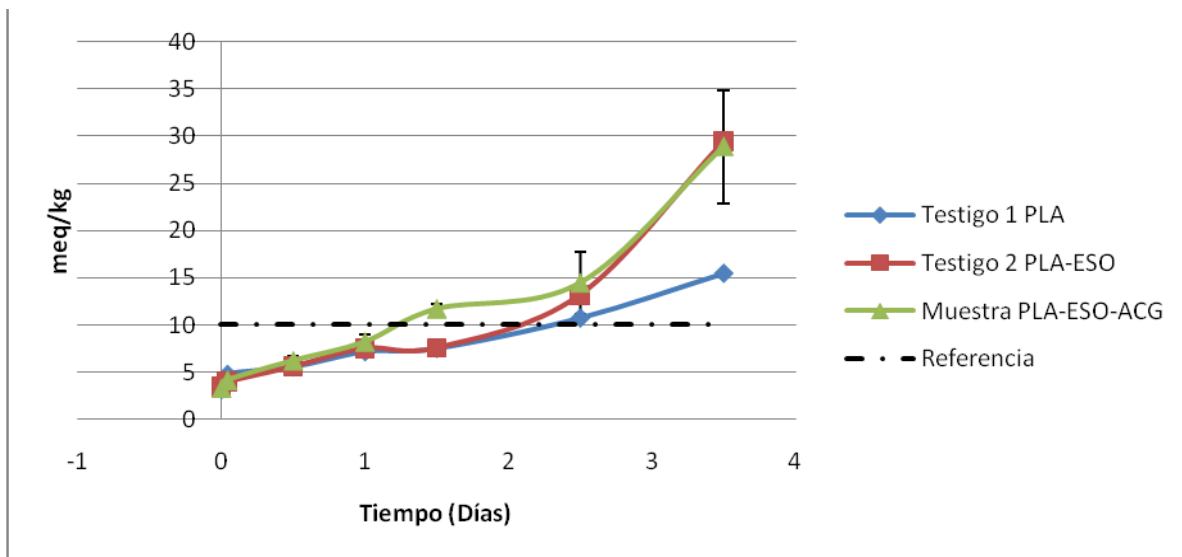


Figura 18. Resultados de Índice de Peróxidos del aceite en contacto con las películas PLA, PLA-ESO y PLA-ESO-ACG. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones \pm DS.

Experimento 2

Ácido clorogénico estándar.

Por otra parte, también se decidió evaluar el efecto del ACG como aditivo alimentario en la prevención de la oxidación del aceite de soya, por lo que se realizó otro experimento utilizando ACG estándar agregado directamente al aceite de soya, obteniendo una concentración de 100 µg/ml, este experimento se realizó bajo las mismas condiciones que en el experimento previo a éste y tuvo una duración de 10 días.

A 30°C y con una intensidad de luz de 1135-1845 luxes se obtuvieron los resultados de las pruebas usando ACG como aditivo antioxidante agregado directamente al aceite de soya (Figura 19). Los valores para el testigo fueron de 5.16 meq/kg en el día 0 y de 45.32 meq/kg el día 10, por otra parte el aceite con ACG (100µg/ml) llegó a los 28.49 meq/kg para el día 10, las diferencias fueron evidentes, puesto que el aceite con antioxidante se mantuvo estable durante 4 días, antes de alcanzar los 10 meq/kg establecidos por el Codex Alimentarius y el testigo sobrepasó los 10 meq/kg después del día 2, esto nos indicó que el ACG pudo retrasar 2 días la oxidación del aceite de soya, antes llegar a los 10 meq/kg.

Comparando los resultados de Índice de peróxidos para evaluar la capacidad antioxidante de las películas de PLA-ESO-ACG con los resultados obtenidos utilizando ACG como aditivo alimentario directo, podemos deducir que el ACG presenta actividad antioxidante en el aceite de soya, sin embargo, el ACG no logró migrar de la matriz polimérica hacia el aceite, o bien, no lo hizo en cantidades suficientes, como para provocar un efecto antioxidante en el aceite, podría sugerirse la adición de una concentración inicial mayor al 2% de ACG en la fabricación de una nueva película y realizar nuevos experimentos, esperando que con una concentración más elevada de ACG en la película permita una liberación gradual de éste en concentraciones suficientes para provocar una acción antioxidante en el aceite a evaluar. Además se especula que el ESO en interacción con el aceite de soya, acelera la oxidación de éste.

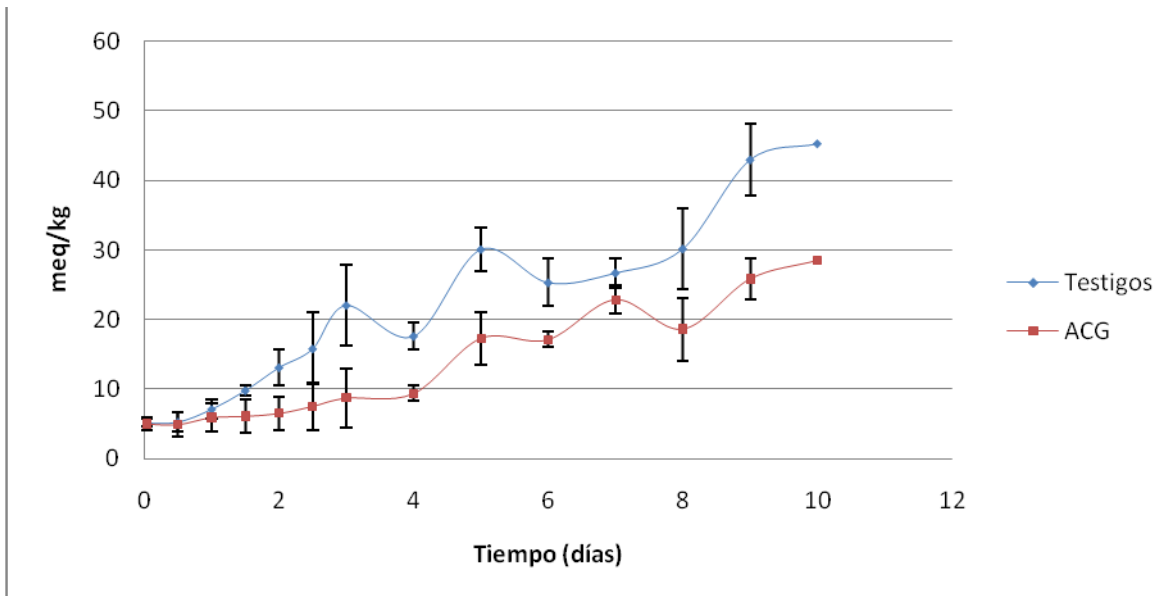


Figura 19. Resultados de Índice de Peróxidos de aceite de soya conteniendo 100 µg/mL de ACG Estándar. Los valores graficados son el promedio de 3 repeticiones ± DS.

Se puede observar que los dos experimentos se comportaron de manera distinta, y se puede elegir el Experimento 2 como el de mejor resultados, ya que expresa que el aceite de soya tarda más en oxidarse y este no pierde sus propiedades.

Anwar y col. (2007) evaluaron la estabilidad oxidativa del aceite de soya almacenado a temperatura ambiente (27°C) y a la luz solar. Encontraron un valor de peróxidos en aceite a temperatura ambiente de 8.14 meq/kg y a la luz solar de 17.20 meq/kg por 60 días. A temperatura ambiente el valor menor al encontrado a 30°C. Esto pudo deberse a la luz y temperatura de exposición, las cuales son iniciadores de la oxidación, por lo que es importante considerar las condiciones de almacenamiento de aceites vegetales y evaluar su calidad, para prolongar su vida de anaquel. ⁽³⁷⁾

ETAPA IV.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PELÍCULA CON ÁCIDO CLOROGÉNICO
EN EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS.

No se observó ningún resultado en ninguna de las cajas inoculadas por los 6 diferentes microorganismos, estos fueron comparados con un control (Caja Petri sin inocular), y los microorganismos crecieron de forma masiva en todas las cajas Petri, por lo que no existió ningún efecto antimicrobiano del ACG (Figura 20).



Figura 20. Caja Petri inoculada con *Escherichia coli* O157:H7

XI. CONCLUSIONES

El presente estudio sienta las bases para obtener películas de PLA con ESO como plastificante y ACG como antioxidante, con uso potencial como envases activos, los cuales podrían brindar mayor protección a los alimentos. También con la ventaja de que estos envases una vez desechados serían degradados en menor tiempo que los envases convencionales.

Etapa 1

El PLA con ESO y ACG puede ser procesado por extrusión con dado plano, por lo que fue factible fabricar las películas por este proceso. Las propiedades físicas y mecánicas de las películas: color, resistencia a la tensión (disminuyendo) y elongación (incrementando) por la presencia del plastificante y del antioxidante.

Etapa 2

El ACG migró de la película de PLA-ESO a etanol al 95% siguiendo un comportamiento Fickiano y con un coeficiente de difusión de $20.59 \pm 0.58 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$. La migración de ACG fue suficiente para proporcionar valores dentro del rango reportado por otros autores y dar un estudio de migración factible, protegiendo así a nuestro alimento sin ser afectado por el plastificante utilizado.

Etapa 3

El ACG, se utilizó como aditivo directo en el aceite de soya a 30°C en presencia de luz, permitió mantener una estabilidad oxidativa durante 2 días más que en el estudio sin adición de este. Por lo anterior, para la elaboración de un envase activo con ACG necesitaría una concentración de antioxidante mayor al 2% en la película.

Etapa 4

En este caso, el estudio microbiológico, no arrojó datos concretos y es necesario seguir haciendo pruebas, para poder concluir mejor, ya que los resultados obtenidos fueron los mismos en todos los casos inoculados con microorganismos patógenos y no patógenos, así que se sugiere seguir realizando las pruebas con concentraciones mayores de ACG. Y de igual manera este no se ve afectado por el plastificante.

XII.RECOMENDACIONES

Fabricar de nuevas películas de PLA-ACG con concentraciones de antioxidantes mayores al 2% y realizar experimentos de difusión en aceites así como evaluar el efecto de las películas en la estabilidad oxidativa de aceites vegetales.

Elaborar películas de PLA-ACG y hacer pruebas de Índice de peróxidos, esto con la finalidad de corroborar si el ESO afecta en la estabilidad oxidativa del aceite de soya

Utilizar otros aditivos plastificantes en el biopolímero que permitan la liberación gradual del antioxidante.

Complementar con un análisis sensorial para conocer el efecto del envase activo sobre los cambios en las propiedades organolépticas del producto contenido, con la finalidad de diseñar envases adecuados para cada alimento.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Héctor S. Villada, 2007.** BIOPOLÍMEROS NATURALES USADOS EN EMPAQUES BIODEGRADABLES, Universidad del PaísVasco. Francia.
<http://www.unicordoba.edu.co/revistas/rta/documentos/12-2/122-1.pdf>
2. **Jan Pokorny, 2003.** NATURAL ANTIOXIDANT FOR FOOD USE. Institute of Chemical Technology, Technická 1905, CS-166 28 Prague 6, Czechoslovakia
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422449190695F>
3. **Doval, Marina M, 2008.** ADITIVOS ANTIOXIDANTES. APLICADOS A UN SISTEMA MODELO GRASA DE CERDO, Facultad de Agroindustrias - UNNE. Chaco – Argentina <http://www1.unne.edu.ar/cyt/exactas/e-043.pdf>
4. **Pine, S.H., Hendrickson, J.B., Cram, D.J. y Hammond, G.S., 1982.** "Química Orgánica", 4a. Ed., Mc Graw-Hill, México, S.A.
5. **Cruz Zúñiga Johana M. 2011;** Difusión de rutina y sus productos de descomposición en una película de ácido poliláctico hacia simulantes de alimentos; Tesis de maestría, CIAD. Hermosillo, Sonora, México.
6. **Evaluación de Índice de Peróxidos. AOCS (Official Method Cd 8b-90 "Peroxide Value Acetic Acid-Isooctane, 2004)**
7. **Métodos Oficiales de Análisis, 1999.** Analíticos en Alimentaria, Aceites y Grasas, PANREAC, Química S.A.. <http://www.usc.es/caa/MetAnálisisStgo1/aceites.pdf>
8. **Universidad Nacional de Ingeniería 2010.** Microbiología de los Alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad. UNI – Norte
<http://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>
9. Departamento de Microbiología y Genética .Universidad de Salamanca,
<http://imb.usal.es/Practicas2/P2/Practicas2.pdf>

10. **Iñiguez Franco Fabiola María, 2011.** Estudios de la Difusión de Catequina y Epicatequina en películas de Ácido Poliláctico y su caracterización fisicoquímica. Tesis de Maestría. CIAD, Hermosillo, Sonora, México

11. **Majid Y. y Moridani, 2001.** CAFFEIC ACID, CHLOROGENIC ACID, AND DIHYDROCAFFEIC ACID METABOLISM: GLUTATHIONE CONJUGATE FORMATION. Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Ontario, Canada.
<http://img.exigo.com/public/1485/websites/39/images/articles/Bilberry%20Studies/CAFFEIC%20ACID,%20CHLOROGENIC%20ACID,%20AND%20DIHYDROCAFFEIC%20ACID%20METABOLISM.pdf>

12. **Mouming Zhao, 2009,** Identification of cyclodextrin inclusion complex of clorogénico acid and its antimicrobial activity. Elsevier. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609013545>.

13. **Södergard. 2000.** “Lactic Acid Based Polymers for Packaging Materials for the Food Industry”. Conference Proceedings. *The Food Biopack Conference* p 19-22. Copenhagen, Denmark .Cali, Colombia.

14. **Manuela Belén Silveira Rodríguez, ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRICIÓN ÓPTIMA.** 2003. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario de Getafe. Madrid. http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1135-572720030003000003&script=sci_arttext&tlng=e

15. **Perales-Castro, X CONGRESO NACIONAL DE MICROSCOPIA-MORELIA, SINTESIS DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES: ÁCIDO POLILÁCTICO.**2010. Altamira, Tamps., MÉXICO.
http://www.amemi.org/memorias_2010/Biomateriales_y_polimeros/POSTERS/SNTESIS_DE_POLMEROS_BIODEGRADABLES.pdf

16. **Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Jacquot, M. y Desabry, S. (2010).** POLY LACTIC ACID: PRODUCTION, APPLICATIONS, NANOCOMPOSITES, AND RELEASE STUDIES. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9:552-571
17. **Majid Y. y Moridani, 2001.** CAFFEIC ACID, CHLOROGENIC ACID, AND DIHYDROCAFFEIC ACID METABOLISM: GLUTATHIONE CONJUGATE FORMATION. Faculty of Pharmacy, University of Toronto, Ontario, Canada
<http://img.exigo.com/public/1485/websites/39/images/articles/Bilberry%20Studies/CAFFEIC%20ACID,%20CHLOROGENIC%20ACID,%20AND%20DIHYDROCAFFEIC%20ACID%20METABOLISM.pdf>
18. **Rooney, M.L. 1995.** Active food packaging. *Desarrollo de Métodos Analíticos para el Estudio en Alimentos de Fenómenos de Oxidación Lipídica y Migración provenientes del Material de Envase*, Santiago de Compostela.
19. **REVISTA VIRTUAL PRO PROCESOS INDUSTRIALES. BIOPOLÍMEROS.**
http://www.revistavirtualpro.com/ediciones/biopolimeros-2004-10-01_1
20. **Lim L-T, Auras R. y Rubino M, 2007.** PROCESSING. TECHNOLOGIES FOR POLY(LACTIC ACID), *PROGRESS IN POLYMER SCIENCE*, Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada
21. **Hoja de Seguridad “Etanol”.** <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/12etanol.pdf>
22. **Hoja Técnica Aceite Epoxidado de Soya.**
www.suministro.com.mx/descargar.php?id=OA==
23. **ASTM. 1995a.** Standard Test Method for Oxygen Gas Transmission Rate Through Plastic Film and Sheeting Using a Coulometric Sensor (D 3985-95). American Society for Testing Materials Standard. Annual Book of ASTM Standards.China.

24. **ASTM. 1995b.** Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials (E 95-96). American Society for Testing Materials Standard. Annual Book of ASTM Standards. China.

25. **ASTM. 2003.** Standard Test Method for Two-Sided Liquid Extraction of Plastic Materials Using FDA Migration Cell. D4754-98. American Society for Testing Materials Standard. Annual Book of ASTM Standards.China.

26. **Doval, Marina M, 2008** ADITIVOS ANTIOXIDANTES. APLICADOS A UN SISTEMA MODELO GRASA DE CERDO, Facultad de Agroindustrias - UNNE. Chaco – Argentina <http://www1.unne.edu.ar/cyt/exactas/e-043.pdf>

27. **HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-HPLC.**
<http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>

28. **Nieves, Abril Díaz.** Espectrofotometría, Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. <http://www.slideshare.net/asaor/espectrofotometria-presentation>

29. **Lim L-T, Auras R y Rubino M, 2007.** PROCESSING. TECHNOLOGIES FOR POLY(LACTIC ACID), PROGRESS IN POLYMER SCIENCE, Department of Food Science, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada

30. **ASTM. 2003.** Standard Test Method for Two-Sided Liquid Extraction of Plastic Materials Using FDA Migration Cell. D4754-98. American Society for Testing Materials Standard. Annual Book of ASTM Standards.China.

31. **Streitwieser A. Jr y Heathcock C. H. 1979.** Química Orgánica. Interamericana. SA de CV. México, DF. pp. 593-599.

32. **Solís L. D. y Herrera-H. C. 2005.** Desarrollo De Un Método De Análisis Para La Cuantificación De Ácidos Clorogénicos En Café. Agronomía costarricense-Universidad de Costa Rica, 29(2), 99-107.
33. **Graciano Verdugo, 2005.** PERMEABILIDAD Y VIDA ÚTIL DE LOS ALIMENTOS. ALIMENPACK, LA REVISTA DEL EMPAQUE Y EMBALAJE PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. CIAD, Hermosillo, Sonora, México.
34. **Graciano Verdugo, 2005.** MIGRACION DE ENVASES PLÁSTICOS HACIA ALIMENTOS. 2005 Tesis Doctorado, CIAD, Hermosillo, Sonora, México.
35. **Manzanarez-López F., Soto-Valdez H., Auras R. y Peralta E. 2011.** Release of - Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its Effect on the Oxidative Stability Of Soybean Oil. Journal of food engineering. 104:508–517, CIAD, Hermosillo, Sonora, México.
36. **Manzanarez-López F., 2010.** Difusión de α -tocoferol y sus productos de descomposición en una película de Ácido Poliláctico hacia simulantes de alimentos. Tesis Maestria CIAD, Hermosillo, Sonora, México.
37. **Granda Restrepo D. M. 2009.** Diseño de un Envase Activo con Antioxidantes para la Protección de Leche Entera Deshidratada. Tesis de Doctorado, CIAD. Hermosillo, Sonora, México.
38. **Graciano-Verdugo, A.Z., Soto-Valdez, H, Peralta,E., Cruz-Zarate, P., Islas-Rubio, A.R., Sanchez-Valdez, S., Sanchez-Escalante, A., Gonzalez-Rios, H. 2010.** Migration of α -Tocoferol from LDPE Films to Corn Oil And Its Effect On The Oxidative Stability, Food Research International. 43:1073-1078, CIAD, Hermosillo, Sonora, México.