

Efecto de la temperatura y tipo de simulante de alimento en la cinética de liberación de limoneno a partir de envase activo de PEBD

Jesús García Hernández

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de la temperatura y tipo de simulante de alimento en la cinética de liberación de limoneno a partir de envase activo de PEBD

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Jesús García Hernández

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2019

Efecto de la temperatura y tipo de simulante de alimento en la cinética de liberación de limoneno a partir de envase activo de PEBD

Jesús García Hernández

Resumen. Los envases activos tienen una interacción con los alimentos para mantener y alargar la calidad y vida útil del producto. En estos envases es necesario entender el mecanismo de liberación del compuesto de interés para su aplicación a nivel comercial. Actualmente diversos compuestos químicos se usan en estos envases, sin embargo, existe una tendencia en el consumo de productos con ingredientes de origen natural. El limoneno es un compuesto presente en el aceite esencial de cítricos, posibilitando su uso a nivel comercial. El objetivo de este estudio fue comparar las propiedades mecánicas de dos películas de polietileno de baja densidad (PEBD), una con limoneno al 8% (p/p) y otra sin limoneno, así mismo analizar la cinética de liberación del limoneno. Las películas se elaboraron por extrusión-soplado. La adición de limoneno redujo el módulo de Young y la fuerza máxima de ruptura, sin embargo, el porcentaje de elongación se incrementó. Para la difusión, la película activa estuvo en contacto con dos simulantes de alimento (etanol al 10 y 50%) a tres temperaturas (5, 20 y 40 °C) por 10 días. La cuantificación de limoneno se realizó con espectrofotometría UV-vis. Los coeficientes de difusión obtenidos en etanol al 10% fueron de 9×10^{-9} , 2.19×10^{-9} , 6.08×10^{-9} cm²/s; en etanol al 50% se obtuvo 1.15×10^{-8} , 6.47×10^{-9} , 5.73×10^{-9} cm²/s a 5, 20 y 40 °C, respectivamente. A excepción del tratamiento a 20°C y etanol al 10% se encontró un incremento en el coeficiente de difusión en medida que la temperatura y la concentración de etanol aumenta.

Palabras clave: Cítricos, espectrofotometría UV-vis, extrusión-soplado, ley de Fick, migración

Abstract. The active packaging in addition to complying with food preservation, interacts with the food to maintain and extend the quality of the product. In these packages, it is necessary to understand the mechanism of release of the compound of interest for its commercial application. Currently, various chemical compounds are used in these containers, however, there is a trend in the consumption of products with ingredients of natural origin. Limonene is a compound present in citrus essential oil allowing its commercial use. The objective of this study was to compare the mechanical properties of two PEBD films, one with limonene at 8% (w / w) and the other without limonene, as well to analyze the kinetics of limonene release. The films were made by extrusion-blowing. The addition of limonene reduced Young's modulus and the maximum breaking strength, however, the elongation percentage increased. For diffusion, the active film was in contact with two food simulants (10% and 50% ethanol) at three temperatures (5, 20 and 40 °C) for 10 days. Limonene quantification was performed with UV-vis spectrophotometry. The diffusion coefficients obtained in 10% ethanol were 9×10^{-9} , 2.19×10^{-9} , and 6.08×10^{-9} cm²/s; in 50% ethanol 1.15×10^{-8} , 6.47×10^{-9} , and 5.73×10^{-9} cm²/s at 5, 20 y 40 °C, respectively. Except for the treatment at 20 °C and 10% ethanol, an increase in the diffusion coefficient was found as the temperature and the concentration of ethanol increases.

Key words: Citrus, extrusion-blowing, Fick's law, migration, UV-vis spectrophotometry

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| Portadilla | i |
| Página de firmas | ii |
| Resumen | iii |
| Contenido | iv |
| Índice de Cuadros, Figuras y Anexos..... | v |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 3 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 10 |
| 4. CONCLUSIONES | 25 |
| 5. RECOMENDACIONES | 26 |
| 6. LITERATURA CITADA..... | 27 |
| 7. ANEXOS | 32 |

INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

| Cuadros | Página |
|---|--------|
| 1. Tratamientos usados para analizar el efecto de la temperatura y tipo de simulantes de alimento en la difusión de limoneno. | 9 |
| 2. Propiedades mecánicas de película control y con limoneno (8%) | 11 |
| 3. Coeficientes de difusión de los tratamientos expresado en cm^2/s | 22 |
| | |
| Figuras | Página |
| 1. Extrusor para elaboración de películas..... | 4 |
| 2. Diseño de bolsas..... | 5 |
| 3. Barridos de abs para diluciones con etoh puro, concentraciones de 3.93,0.99 y 0.02 mg/ml para D1, D2, D6 respectivamente | 12 |
| 4. Curvas de abs vs concentración (mg/ml) de limoneno a) curva de ETOH 10% b) curva de ETOH 50% | 13 |
| 5. Barrido de abs película activa y control, espectro de 200-300 nm..... | 13 |
| 6. Barrido transmitancia película activa y control, espectro de 200-800 nm | 14 |
| 7. Espectro de ftir de s-(-)-limoneno (96%) Sigma-aldrich (España) | 14 |
| 9. Espectro de (s)-(-)-limoneno (96%) Sigma-aldrich (España) | 15 |
| 10. Espectro correspondiente a la película activa ($4000\text{-}500\text{cm}^{-1}$) | 16 |
| 11. Espectro correspondiente a la película control ($4000\text{-}500\text{cm}^{-1}$)..... | 16 |
| 12. Absorbancia a 210 nm de simulante en contacto con película activa a)-f) corresponden a los tratamientos T1-T6 respectivamente | 18 |
| 13. Absorbancia a 210 nm de simulante en contacto con película control a)-f) corresponden a los tratamientos T1-T6 respectivamente | 20 |
| 14. Absorbancia a 210 nm de película activa y control hasta las 240 horas a)-f) corresponden a los tratamientos T1-T6 respectivamente | 21 |
| 15. Modelo para cálculo de e_a a) etanol al 10% b) etanol al 50% | 24 |
| | |
| Anexos | Página |
| 1 a) Micrómetro ddt cady & co. b) simplicity uv millipore (Darmstadt, Alemania) c) balanza analítica mettler AE240 (Suiza) | 32 |
| 2. a) Espectrofotómetro uv-vis cary 50 varian® (California, Estados Unidos de América) b) extrusor (beutelspacher, México)..... | 32 |
| 3 Película activa(izquierda) y control (derecha)..... | 33 |

1. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria a través de los años ha desarrollado diferentes tipos de envases para alimentos con el propósito de alargar la vida útil de los mismos. Su función es proteger los alimentos de la contaminación y deterioro, facilitar el transporte y almacenamiento de estos, así como proveer al consumidor sobre información del alimento (Robertson 2010).

Los envases han evolucionado en respuesta a las exigencias de los consumidores, principalmente en cuanto a durabilidad, conservación de nutrientes, frescura y apariencia, dejando los sistemas tradicionales de envasado. Como respuesta a estas exigencias se han desarrollado nuevas tecnologías, una de ellas son los envases activos (Díaz 2005).

Los envases activos son aquellos que además de suponer una barrera entre el alimento y el exterior, incorporan ciertos aditivos a la película de envasado con el objetivo de mantener y alargar la calidad del producto a través de una interacción entre el envase y el alimento. Los aditivos que se usan pueden ser capaces de eliminar oxígeno, adsorber dióxido de carbono, humedad, etileno y olores extraños, o bien liberar antioxidantes u otros conservantes (Rodríguez 2013). Para la elaboración de este tipo de envases se debe de estudiar primero el mecanismo de deterioro del alimento antes de su aplicación (Rodríguez 2013). En envases activos con liberación de compuestos es fundamental estudiar la cinética de liberación de estos, así como su interacción con el alimento para analizar y determinar las mejores condiciones para su aplicación a gran escala.

La industria mundial del envasado destinado ubica a los alimentos con un 50% de participación (FAO 2014). Los plásticos son los principales materiales para envase y embalaje gracias a su flexibilidad, plegabilidad, adaptabilidad y facilidad de manejo (Ministerio de Comercio Exterior y Turismo de Perú 2009).

Los plásticos pueden moldearse mediante procesos térmicos a bajas temperaturas y presiones (Díaz 2005). Las poliolefinas son una de las principales familias de materiales de los polímeros, siendo el polietileno (PE) y el polipropileno los de mayor consumo mundial alcanzando más del 65% del consumo mundial en el 2005 (Delgado 2007).

El PE es químicamente el polímero más simple, formado a partir del monómero etileno (C_2H_4) que a través de un proceso catalítico se transforma en una cadena de carbonos e hidrógenos (Delgado 2007). El PE es considerado el material plástico más importante para el envase y embalaje.

El PE se clasifica en dos grupos principales; PE de baja densidad (PEBD) para los ramificados y PE de alta densidad (PEAD) para los más cristalinos, cada uno de estos PE posee una densidad entre 0.91-0.925 y 0.941-0.965 g/cm³, respectivamente. Independiente de su densidad, todos se basan en cadenas de etileno, es por esto su resistencia a casi todos los productos químicos, aunque algunos disolventes pueden causar hinchamiento (Miravete 2012). El PEBD permite un fácil termosellado, es resistente y flexible (Ministerio de Comercio Exterior y Turismo de Perú 2009).

Los aceites esenciales son una mezcla de aceites volátiles responsables de las fragancias de las flores y otros órganos vegetales. Estos son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, alimentación, licorería y confitería (Tránsito 2004).

En los últimos años se ha incrementado el interés en el uso y estudio de estos aceites esenciales, así como de sus componentes, tal es el caso de los obtenidos de los cítricos. En la cáscara de naranja podemos encontrar compuestos como: benzaldehído, terpineno, limoneno, linalol, canfor, acetato de benzilo, nerol, acetato de linalilo y acetato de geranilo, siendo el limoneno el componente mayoritario del aceite esencial de la cáscara de naranja (Yáñez *et al.* 2007)

El limoneno es el monoterpenoide más frecuente en las plantas. Este es un líquido incoloro que se clasifica como monoterpeneo, se compone de dos unidades de isopreno y se puede presentar en dos formas L-limoneno y D-limoneno. (Nikfar y Behboudi 2014). Es responsable por el típico olor a naranja-limón, un olor cítrico. Así mismo ha sido utilizado como agente antimicrobiano en contra de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Cryptococcus neoformans*, (van Vuuren y Viljoen 2007).

El término de migración es referente a la transferencia de componentes a un alimento en cantidades que podrían poner en peligro la salud humana, provocar un cambio inaceptable en la composición de los alimentos o en las características organolépticas de los mismos (Piringer 1994). Esta transferencia puede aprovecharse para elaborar formulaciones de polímero y aditivos con actividad antimicrobiana, procesarse como película para que por medio de la migración puedan liberarse a alimentos. Los estudios de migración son para estudiar la cinética de liberación, estos, se realizan con simulantes de alimentos, ya que son soluciones simples que facilitan los análisis de los compuestos activos y mantienen bajos los costos de los estudios.

Esta investigación se llevó a cabo con el fin determinar el efecto de la temperatura y el tipo de simulante en la cinética de liberación del limoneno a partir de un envase activo de PEBD. Para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

- Elaboración y caracterización de propiedades mecánicas de película activa a partir de PEBD con limoneno.
- Determinar la migración de limoneno hacia simulantes de alimentos a partir de una película de PEBD.
- Evaluar el efecto de la temperatura y el tipo de simulante de alimento en la migración de limoneno.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.

El estudio se realizó en el laboratorio de Envases y Vida de Anaquel, el cual pertenece a la Coordinación de Ciencia y Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), ubicado en Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, N0. 46 Col. La Victoria, CP. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

Reactivos.

- (S)-(-)-limoneno (96%) Sigma-Aldrich (España).
- Agua Milli-Q filtrada con SIMPLICITY UV MILLIPORE (Darmstadt, Alemania).
- Etanol grado para cromatografía líquida, LiChrosolv (Darmstadt, Alemania).
- PEBD de Braskem IDESA® (Ciudad de México, México).

Equipo.

- Extrusor (Beutelspacher, México).
- Espectrofotómetro UV-VIS CARY 50 VARIAN® (California, Estados Unidos de América).
- Balanza analítica Mettler AE240 (Suiza).
- Micrómetro DDT CADY & CO (IL, Estados Unidos de América).
- Analizador de textura TAXT2 (Scardale, Nueva York)
- Infrarrojo Thermo Fisher Scientific Nicolet iS50 (Langensfeld, Alemania).

Materiales.

Pipetas Pasteur (3 ml) y Celdas de cuarzo (3 ml)

Preparación de simulantes de alimento.

Se prepararon los simulantes de alimentos a dos diferentes concentraciones de etanol grado para cromatografía líquida, LiChrosolv (Darmstadt, Alemania), una al 10% y otra al 50% respecto al volumen. Se prepararon 2 litros de cada simulante para lograr las concentraciones deseadas, para lo cual se mezcló etanol puro con agua Milli-Q siguiendo la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de concentración} = \frac{\text{Volumen de soluto}}{\text{Volumen de solución}} \times 100 \quad [1]$$

$$\frac{\% \text{ de concentración (Volumen de solución)}}{100} = \text{Volumen de soluto} \quad [2]$$

Para el cálculo del solvente (agua Milli-Q), se restó el valor del volumen de la solución menos el volumen del soluto (Etanol puro). Las sustancias se midieron en diferentes probetas y se depositaron en un contenedor de vidrio color ámbar.

Elaboración de película.

Se usó el proceso de extrusión-soplado (Figura 1.) con un extrusor de 2.5 kg/h de capacidad con un dado de salida circular (Beutelspacher, México). Las películas se elaboraron con PEBD porque es uno de los materiales mayormente usados en el envasado de alimentos y tiene uno de los coeficientes de difusión más altos (Maia *et al.* 2016). Se procesaron dos películas, la primera únicamente de PEBD correspondiente a la película control, y la segunda película con 8% de limoneno agregado. El limoneno se mezcló con los pellets de PEBD antes de ser colocados en la tolva de alimentación. En este proceso el equipo de extrusión se alimentó con los pellets de PEBD en una tolva hacia dentro de un barril de extrusión donde se calienta y funde (Groover 2007). Posteriormente el material fluyó a través de un tornillo sin fin hasta su salida en el dado, el cual es una boquilla por donde sale la película extruida (preforma), posteriormente es soplada hasta obtener la forma adecuada (López Romero 2013). La temperatura que se usó fue de 105 y 110 °C, para las zonas I, II, III, y 118 °C para las zonas IV y V respectivamente, a una velocidad de 70 rpm para el jalador y 26 rpm para el tornillo, teniendo un tiempo de residencia de 5 minutos. Todo el procesamiento se realizó en ausencia de luz UV, haciendo uso de luz roja.

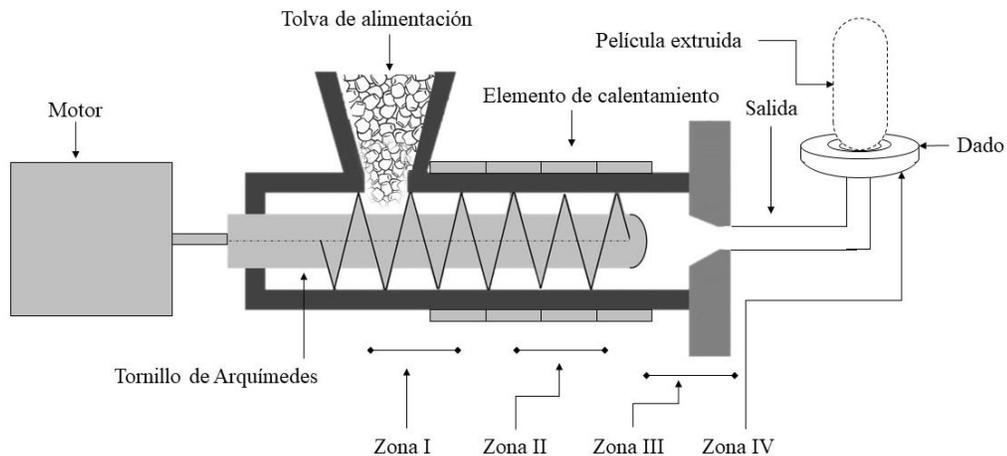


Figura 1. Extrusor para elaboración de películas.

Almacenamiento de películas.

Las películas se cubrieron con papel aluminio, en bolsas de polietileno aluminizado a una temperatura de -20 °C en una cámara de almacenamiento para evitar pérdidas de durante el

almacenamiento. Existe evidencia en la disminución de limoneno durante su almacenamiento por efecto de la temperatura y la presencia de oxígeno; estos cambios pueden producir cambios sensoriales que afecten la calidad de los alimentos al entrar en contacto. La presencia de oxígeno afecta la estabilidad de este compuesto en aceite esencial de lima a partir de los tres meses almacenado a 4 °C (Bringas *et al.* 2012).

Elaboración de bolsas.

Se elaboraron bolsas con un área de 1 dm², para la cual se cortaron películas de 10.5 × 12cm, estas dimensiones permitieron sellar la bolsa y dejar una pestaña que permitió depositar las muestras durante la toma de datos. La bolsa tuvo un orificio en uno de los lados más cortos para permitir la toma de muestra, dicho orificio tuvo una longitud de 1.3 cm aproximadamente. Las bolsas fueron cortadas individualmente y selladas por los lados que se describen en la siguiente ilustración. Para el orificio de muestreo, se colocó una tira de papel aluminio entre las películas de PEBD para evitar que se sellara.

Preparación de ensayo de migración.

Elaboración de bolsas de PEBD. Para el desarrollo del experimento fue necesario elaborar bolsas de la película activa, así como de la película control, se determinó un decímetro cuadrado de área de exposición durante el experimento. En la figura 2 se describe el diseño de las bolsas usadas en las pruebas de migración.

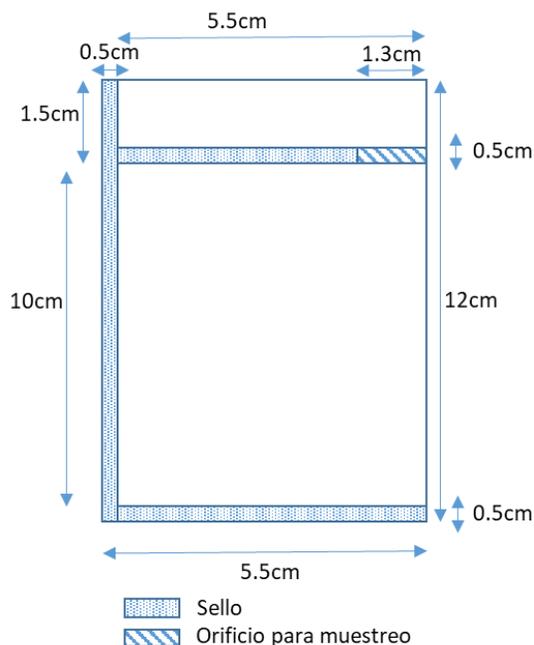


Figura 2. Diseño de bolsas.

Las bolsas fabricadas se llenaron con los simulantes de alimentos de acuerdo con los tratamientos presentados en el cuadro 1. Se colocó una etiqueta de identificación a cada una de las bolsas correspondiente al tratamiento y número de repetición. Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento. Antes de depositar el simulante en las bolsas se pesaron las bolsas en la balanza analítica Mettler AE240.

Con ayuda de una micropipeta de 10000 μ l se depositaron 40 ml del simulante dentro de la bolsa. Posteriormente se pesó el volumen depositado, con la balanza tarada con la bolsa correspondiente. Las bolsas se cerraron con sujetadores de documentos de acero templado, estos fueron colocados en el sitio del orificio de toma de muestra con un doblez de la pestaña de la bolsa hacia el frente. Las bolsas se colocaron en forma horizontal y con la pestaña doblada hacia al frente para evitar derrames. Las bolsas se depositaron en canastas plásticas cubiertas de papel aluminio para reducir pérdidas del compuesto activo.

Propiedades mecánicas.

Se midió elongación con un analizador de textura TA-XT (Scardale, N.Y., EE. UU.). Esta prueba originó tres propiedades: fuerza de tensión, % de deformación y módulo de elasticidad (Muñoz 2014). Dichas propiedades permitieron conocer la resistencia de las películas. Se usaron probetas de 30 mm de largo y 10 mm de ancho. La longitud final correspondió a la distancia al momento de la fuerza máxima, ya que se observó que después de alcanzar la fuerza de tensión la longitud final variaba mostrando diferentes comportamientos.

El porcentaje de deformación se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Deformación lineal} = \frac{(l-l_0)}{l_0} \times 100 \quad [3]$$

Donde:

l = Longitud final

l_0 = Longitud inicial

El módulo de Young se calculó como la pendiente de la región lineal de la curva de tensión en función de la deformación.

Absorbancia (ABS) y Transmitancia (TRS).

Ambas propiedades se midieron con un espectrofotómetro UV-VIS (CARY 50, VARIAN®). Se realizaron barridos de 200 a 800 nm para ambas pruebas. Las pruebas se realizaron por triplicado en cada caso.

FTIR (Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier por sus siglas en inglés).

La espectroscopia FTIR ofrece un método simple, eficiente y no destructible para identificar y distinguir la mayoría de los polímeros, basados en bandas de absorción infrarroja conocidas que representan distintas funcionalidades químicas presentes en el material. Se analizó la película activa y la película control con un infrarrojo (Thermo Fisher Scientific Nicolet iS50)

Curva estándar.

Se realizó una curva estándar para correlacionar la absorción (ABS) del limoneno con la concentración de este, esta curva se realizó a partir de una solución madre (Etanol puro + Limoneno(s)) con una concentración de 17.12 mg/ml, las diluciones se prepararon con los dos simulantes usados.

Muestreos.

Los muestreos se realizaron con pipetas Pasteur de 3 ml. Se tomó una alícuota de 3 ml de simulante contenido en las bolsas y se depositó en una celda de cuarzo de 3 ml para su lectura en el espectrofotómetro UV-VIS. Las lecturas de absorbancia se realizaron cada 20 minutos durante las primeras 2 - 3 horas desde el contacto de la película con el simulante, a partir de ese momento se observó que no había cambios en la absorbancia respecto al tiempo, demostrando que la difusión había llegado al equilibrio. Posteriormente, las lecturas se realizaron cada hora, hasta la hora seis. Para cada lectura se realizó una calibración con un blanco de simulante de alimento correspondiente al tratamiento a medir.

El reglamento No. 10/2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, menciona que el tiempo de contacto para materiales que estén en contacto con alimentos es entre 3 y 20 días, y debe de realizarse hasta los 10 días la determinación de migración de compuestos (Comisión Europea 2011). Se midió ABS de las muestras al día 10 y para algunos casos también se tomaron lecturas durante ese periodo, asumiendo que las lecturas corresponden a un intervalo de 24 horas. La alícuota tomada fue devuelta a la bolsa correspondiente.

Determinación y cuantificación de limoneno.

La migración se determinó con la absorbancia (ABS) del simulante de alimento en contacto con la película con limoneno. El limoneno muestra un pico de absorbancia a 207 nm debido a los enlaces dobles aislados (Berger y Sicker 2009). Se realizaron barridos para determinar la longitud de onda a la que se mediría el limoneno.

Coefficiente de difusión (D).

Se usó un modelo simplificado de migración para tiempos de contacto cortos (Hamdani *et al.* 1997), el cual hace referencia al comienzo del proceso de migración para calcular el coeficiente de difusión (D) de limoneno desde la película de PEBD hacia el simulante. Se

asumió que el limoneno únicamente migró hacia el simulante de alimento, así mismo, el limoneno disminuye su concentración durante el contacto (envase finito).

La ecuación se adaptó para este estudio, ya que se hizo uso de la absorbancia del simulante respecto al tiempo para observar la cinética de liberación del limoneno, la ecuación es:

$$\frac{m_{F,t}}{m_{F,\infty}} = \frac{2}{L} \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \quad [4]$$

Donde $m_{F,t}$ es la absorbancia de limoneno difundido al simulante de alimento después del tiempo t ; $m_{F,\infty}$ es la absorbancia de limoneno difundida al simulante en estado de equilibrio; L es el espesor de la capa de LDPE; D es el coeficiente de difusión; y t es el tiempo. Los valores de $m_{F,t}/m_{F,\infty}$ se graficaron en función de $t^{\frac{1}{2}}$. D se calculó a partir de la pendiente ($S_{F,\infty}$), de acuerdo con la ecuación 5 (Soto CD. *et al.* 2008).

$$D = \frac{\pi}{4} (S_{F,\infty} L)^2 \quad [5]$$

Energía de activación para la difusión (E_a).

La E_a se calculó para la película con limoneno mediante la ecuación 6. para difusión (Garde *et al.* 2001).

$$D = D_0 e^{\left(-\frac{E_a}{RT}\right)} \quad [6]$$

Donde E_a , es la energía de activación para la difusión, R es la constante ideal de gases ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta ($^{\circ}\text{K}$). Se graficó el valor logarítmico de D contra el recíproco de la temperatura absoluta, resultando en una correlación lineal (Welle y Franz 2011). E_a fue obtenido usando la pendiente (m) de la línea ($m = -E_a/2.303R$) (Graciano *et al.* 2010).

Diseño Experimental.

Se usó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial de 3×2 . Los factores fueron temperatura de contacto ($5, 20$ y 40°C) y tipo de simulante de alimento (etanol al 10 y al 50% v/v). Se emplearon un total de tres repeticiones para cada tratamiento. El experimento se desarrolló con película activa y película control para un total de 36 unidades experimentales. Las variables respuesta que se evaluaron fueron las propiedades mecánicas tales como: fuerza máxima de ruptura, porcentaje de elongación y módulo de Young, así como el coeficiente de difusión expresado en cm^2/s .

Para realizar las pruebas de migración, se tomó como referencia el reglamento No. 10/2011 de la comisión europea sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, el cual establece los criterios para realizar ensayos de migración (Comisión Europea 2011). El cuadro 1. se describen los tratamientos realizados. La temperatura a 5°C simula condiciones de refrigeración ($0-5^{\circ}\text{C}$), la temperatura de 20°C simula condiciones de ambientes reales de clima frío-templado entre los 5°C y 20°C , mientras que a 40°C se simula condiciones reales de clima cálido entre los 20°C y 40°C . Se realizó la medición

hasta el día 10, ya que se consideró como una película que puede estar en contacto por más de tres días y menor a 20. El etanol al 10% es considerado como simulante alimentario A y el etanol al 50% es considerado como D1. El primero se usa para ensayos en los que involucren alimentos de carácter hidrofílico, mientras que el segundo es usado para alimentos de carácter lipofílico, con un grado de alcohol superior al 20% y para aceite en emulsiones acuosas (Comisión Europea 2011).

Cuadro 1. Tratamientos usados para analizar el efecto de la temperatura y tipo de simulantes de alimento en la difusión de limoneno.

| Tratamiento | ID | Película con limoneno | | Película control | |
|-------------|----|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | Simulante (%) | Temperatura (°C) | Simulante (%) | Temperatura (°C) |
| 1 | T1 | Etanol 10 | 40 | Etanol 10 | 40 |
| 2 | T2 | Etanol 50 | 40 | Etanol 50 | 40 |
| 3 | T3 | Etanol 10 | 20 | Etanol 10 | 20 |
| 4 | T4 | Etanol 50 | 20 | Etanol 50 | 20 |
| 5 | T5 | Etanol 10 | 5 | Etanol 10 | 5 |
| 6 | T6 | Etanol 50 | 5 | Etanol 50 | 5 |

Análisis de datos.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa “SAS®”; se realizó un ANDEVA con un modelo lineal general y una prueba de medias DUNCAN, se usó una prueba de interacción de dos factores para la variable coeficiente de difusión, a través de medias ajustadas con el procedimiento LS Means.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante las últimas décadas se han logrado realizar aportes científicos sobre el proceso de migración y su comportamiento en los materiales de envasado de alimentos. Las investigaciones relacionadas a migración han contribuido a las legislaciones y directrices internacionales y europeas sobre materiales en contacto con alimentos. Así mismo, se ha demostrado que la migración podría ser un proceso tanto físico como matemático, predecible y descriptivo, de esta manera la transferencia másica de un material plástico a simulantes de alimentos se ha considerado un proceso previsible que en la mayoría de los casos obedece las leyes de difusión de Fick (Gavriil *et al.* 2018). Los estudios de migración usan simulantes de alimentos autorizados oficialmente, su uso se estableció en EUA y Europa evitando los estudios analíticos de migración con alimentos reales, debido a la complejidad de analizar los mismos (Comisión Europea 2011).

La Directiva 85/572 / CEE define las condiciones de prueba de acuerdo con las condiciones de uso previstas y enumera los simulantes de alimentos para usar con las pruebas de migración (Arvanitoyannis y Bosnea 2004).

Película activa con limoneno.

Se elaboraron 400 g de PEBD, se obtuvieron cuatro lotes de película, el mayor porcentaje de compuesto activo se obtuvo en los lotes #2 y 3, mismos que fueron usados para el estudio. La película control mantuvo la homogeneidad del grosor, por lo que no fue necesario separar en lotes la película.

Se usó la película del lote dos para todos los tratamientos a excepción del T3 (Etanol 10%, 20°C), el cual se realizó con película del lote tres ya que se repitió el tratamiento, pero la película del lote #2 no fue suficiente para las tres repeticiones. El lote dos y tres tuvieron una anchura de película de 7 cm en ambos casos. El espesor de las películas fue medido con un micrómetro (E.J CADY & CO, Modelo DTT). Los espesores expresados en MILS se convirtieron en centímetros, teniendo valores promedio de 0.007, 0.066, 0.0032, 0.0066, 0.0083 y 0.0072 cm para las bolsas de los tratamientos uno al seis respectivamente. Sin embargo, para el cálculo del coeficiente de difusión se utilizó el espesor de cada una de las bolsas, con la finalidad de ajustar el cálculo de este, ya que existe heterogeneidad en la película del mismo lote y esto supone una mayor cantidad de limoneno difundándose en el simulante de alimento.

La película control y película con limoneno no mostraron tener diferencias en color a simple vista antes y después del tratamiento, al igual que películas de PLA con limoneno donde el limoneno no afecta en la transparencia del material (Arrieta *et al.* 2013).

Propiedades mecánicas.

Las propiedades mecánicas expresan la resistencia de un material a la elongación y a la ruptura. La fuerza de tensión representa la máxima resistencia de una película sometida a una prueba de elongación (Alendy 2018). Cuando se somete a una tensión, el módulo de elasticidad indica cuan rígido es un material. La deformación por elongación mide la flexibilidad o ductilidad de las películas (Chariguaman 2015).

Como se puede apreciar en el cuadro 2, la incorporación de limoneno causó una reducción en el módulo de Young, así como en la fuerza Máxima de ruptura, en el caso del porcentaje de elongación fue menor para la película control. Este mismo comportamiento se observó en películas de PLA donde la adición de limoneno aumento significativamente la flexibilidad debido al efecto de plastificación logrado por la adición de limoneno (Arrieta *et al.* 2013)

Cuadro 2. Promedio y desviación estándar de propiedades mecánicas de película control y con limoneno (8%).

| Película | Fuerza Máxima de ruptura (MPa) | Elongación (%) | Módulo de Young (MPa) |
|-----------------|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Control | 89.64 ^A ± 4.18 | 283 ^A ± 18 | 10.61 ^A ± 0.32 |
| Limoneno | 61.38 ^B ± 1.94 | 306 ^A ± 34 | 6.89 ^B ± 0.45 |
| CV (%) | 0.2 | 0.09 | 0.23 |

Letras A-B indican diferencia estadística ($P < 0.05$) en la misma columna.

DE = Desviación estándar

CV = Coeficiente de variación

No hubo diferencia significativa en la distancia de ruptura de las películas, ni para el porcentaje de elongación, el módulo de Young y la Fuerza de ruptura fueron significativamente diferentes en la película activa y el control, la película control mostró una media mayor que la película activa.

Absorbancia y transmitancia.

Se realizaron barridos a diluciones de limoneno con etanol grado para cromatografía líquida, LiChrosolv (Darmstadt, Alemania) a partir de una solución madre (SOL M) de 17.12 mg/ml. Se puede observar solamente en la solución madre existen picos definidos, sin embargo, cuando disminuyó la concentración de la solución madre la expresión de los picos también disminuyó. A pesar de que no hubo un pico definido que diferenciara el etanol del limoneno, se puede apreciar una curva que va desde los 200 nm hasta los 220 nm, quedándose 210 nm como la longitud de onda a medir ABS del limoneno presente en

los simulantes de alimentos. Se ha reportado que el limoneno tiene un pico de ABS a 207 nm lo cual hace muy cercano a las lecturas tomadas en esta investigación (Berger y Sicker 2009).

Como se puede observar en la figura 3 a pesar de que los barridos de las diluciones de limoneno no mostraron un pico definido que lo diferenciara de la absorbancia del ETOH puro, se observó una notable curvatura en el rango de 200-220 nm en las diluciones de limoneno, esta curvatura no se presentó en el ETOH de alimento. Se midió ABS a 210 nm ya que fue la longitud de onda de mayor expresión registrada para el estándar de s-limoneno en las pruebas de barrido en el rango 200-220 nm.

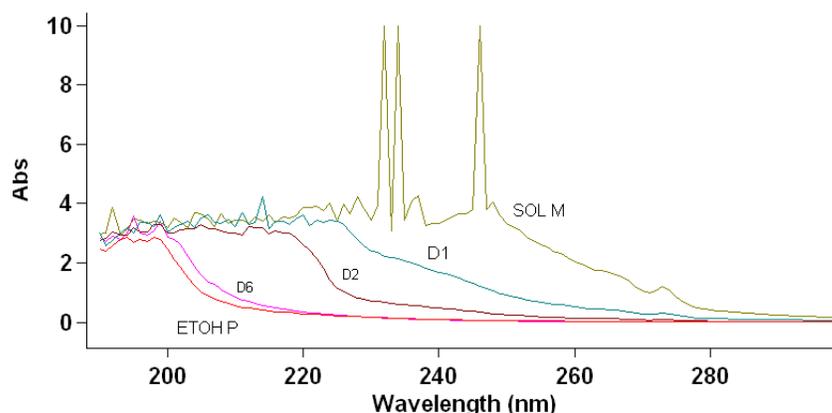


Figura 3. Barridos de ABS para Diluciones con ETOH puro, concentraciones de 3.93, 0.99 y 0.02 mg/ml para D1, D2, D6 respectivamente.

Curvas de absorbancia de limoneno.

Las curvas de calibración se realizaron con diluciones que iban de 0.00096 a 0.058 mg/ml para simulante etanol al 10% y de 0.0017 a 0.308mg/ml para etanol al 50%. Se tuvo un R^2 del 98 y 91% para ETOH al 10 y 50%, respectivamente, estas curvas se hicieron a partir de una solución madre de 17.12 mg/ml.

A pesar de que las curvas de ETOH al 10 y 50% muestran un R^2 aceptable (figura 4.), no fue posible correlacionar la absorbancia con la concentración de limoneno debido a que al sustituir los valores de ABS por mg/ml en el gráfico para el cálculo de la pendiente de la recta, el coeficiente de variación de las repeticiones aumentaba su variabilidad, por lo que se decidió usar únicamente la ABS para el cálculo del coeficiente de difusión.

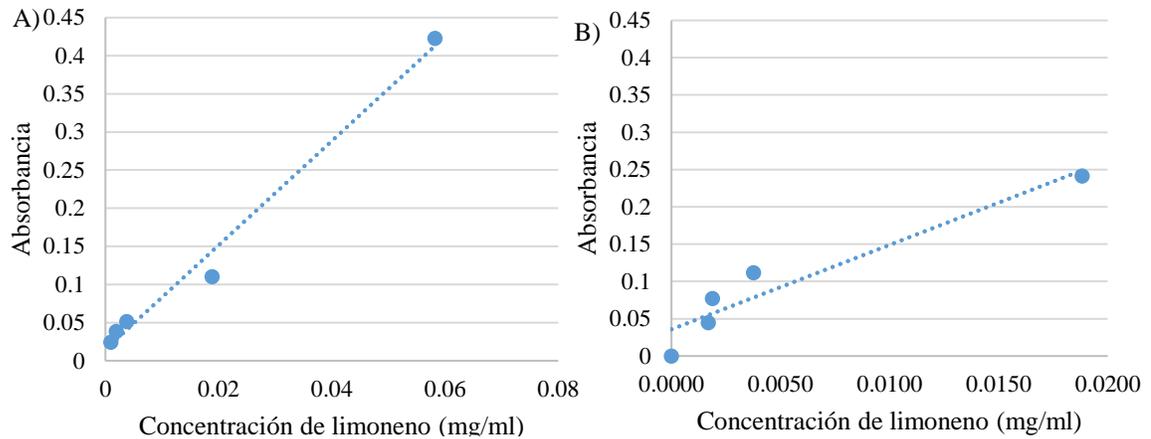


Figura 4. Curvas de ABS vs concentración (mg/ml) de limoneno A) Curva de ETOH 10% B) Curva de ETOH 50%.

Barrido de películas.

Absorbancia. El barrido de las películas al igual que el barrido realizado en las diluciones con ETOH puro (Figura 5) no mostró picos definidos que mostraran diferencias entre la película con limoneno y la película control, aunque es claro que hay una mayor absorbancia en la película con limoneno en el rango 200-220 nm.

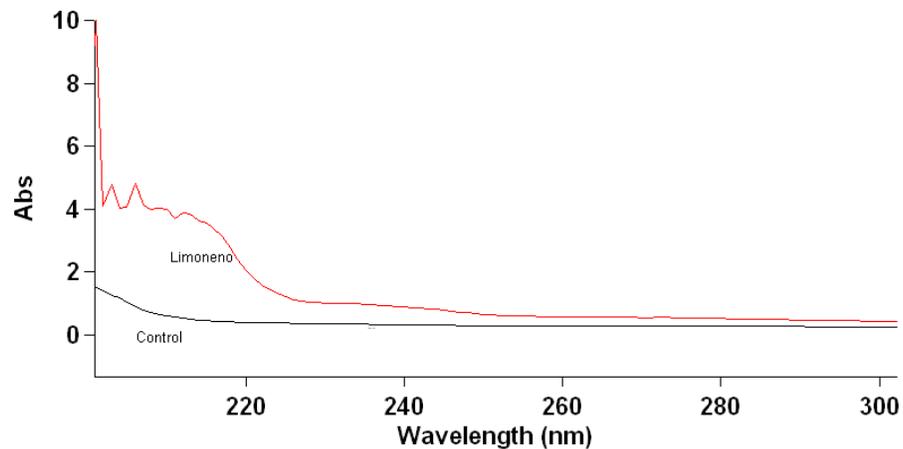


Figura 5. Barrido de ABS película activa y control, espectro de 200-300 nm.

Transmitancia. La transmitancia mostró un comportamiento inverso a la absorbancia, es decir, hay una mayor transmitancia en la película control en la región de 200-220 nm. En la figura 6 se muestra el barrido de transmitancia realizado a ambas películas.

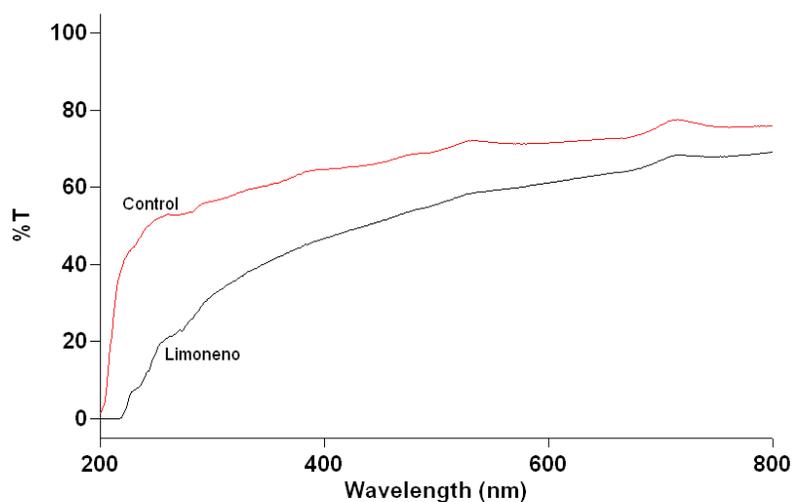


Figura 6. Barrido Transmitancia película activa y control, espectro de 200-800 nm.

Análisis FTIR (Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier por sus siglas en inglés).

La figura 7 muestra el espectro de FTIR de S-(-)-limoneno (96%) Sigma-Aldrich (España), se puede notar picos en la región de 2900, 1700-1600, 1500-1400 y 800-700 cm^{-1}

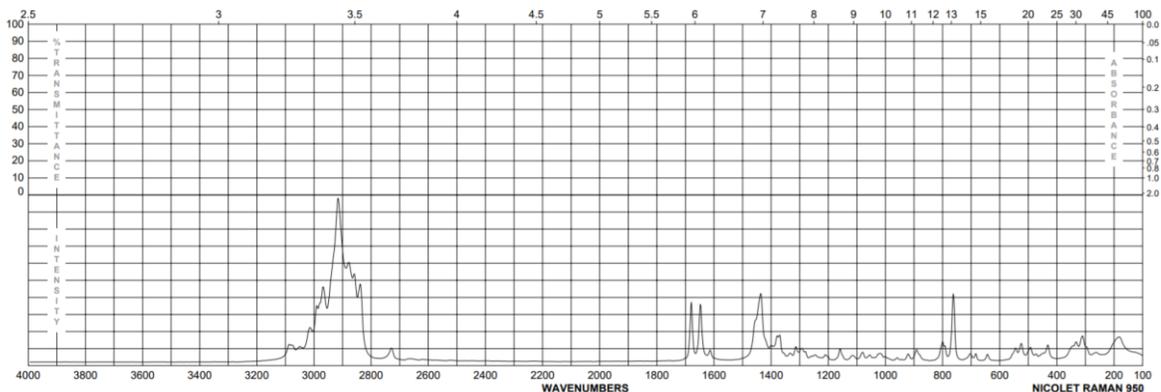


Figura 7. espectro de FTIR de S-(-)-limoneno (96%) Sigma-Aldrich (España).

En la figura 8 se puede observar un pico de transmitancia en la región de 2916, 1644, 1435, 885 y 796 cm^{-1} correspondiente al (S)-(-)-limoneno (96%) Sigma-Aldrich (España) los cuales concuerdan a las regiones de absorbancia de FTIR reportadas por el fabricante.

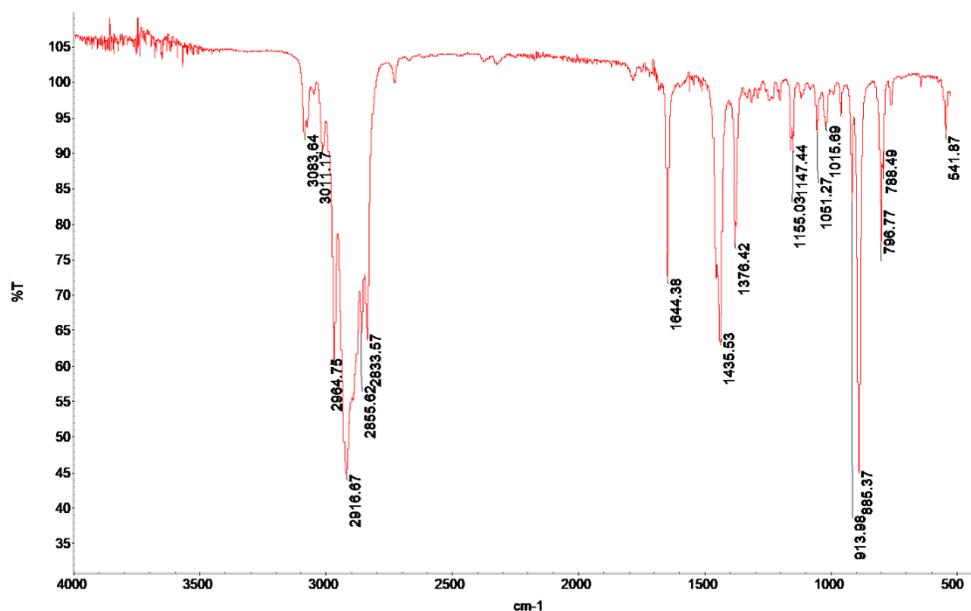


Figura 8. Espectro de (S)-(-)-limoneno (96%) Sigma-Aldrich (España).

Las moléculas absorben luz a longitudes de onda específicas basadas en diferentes modos vibratorios únicos para cada grupo funcional y característica estructural. Este tipo de análisis también ha sido utilizado para la identificación de compuestos volátiles del aceite esencial del limón (*Citrus lemon L.*) (Boughendjioua y Samah 2017).

En la figura 9 se puede notar un ligero pico a 888 cm^{-1} , este pico lo comparte (S)-(-)-limoneno (96%) demostrando la presencia de este compuesto en la película. Los picos que se hacen notar en el limoneno y en la película activa corresponden a enlaces alquenos (C-H) y Aromáticos (C-H) y enlaces dobles de carbono con una frecuencia de banda entre los $3100\text{-}3000$, $3150\text{-}3050$ y $1600\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, los cuales han sido reportado estar presentes en el aceite esencial de limón (Boughendjioua y Samah 2017). El PEBD muestra bandas de absorción a los 291, 2845 correspondiente a vibración de tensión de C-C, 1467, 1462, 1377 para la vibración de flexión de CH_2 y 730 y 717 cm^{-1} para flexión asimétrica en el plano (Jung *et al.* 2018).

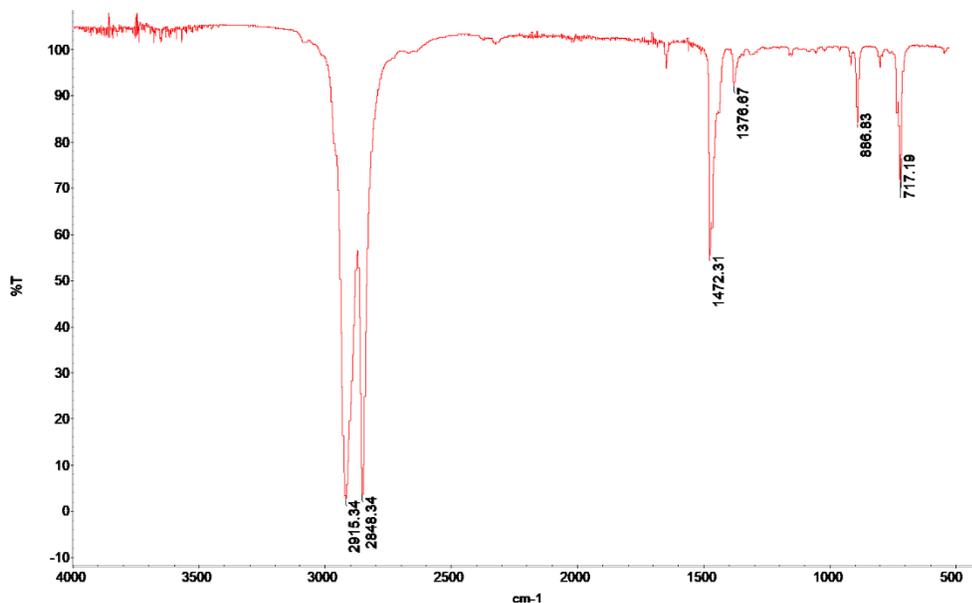


Figura 9. Espectro correspondiente a la película activa (4000-500cm⁻¹).

Se reportado que el limoneno en pruebas de espectroscopia presenta una banda de selección a los 888 cm C-H deformación (Cava *et al.* 2004). En la figura 10 no se observaron los picos característicos del espectro del limoneno y en el de la película con limoneno, los cuales están ubicados a los 1644 y 886 cm⁻¹, mostrando así la ausencia de este compuesto en la película control.

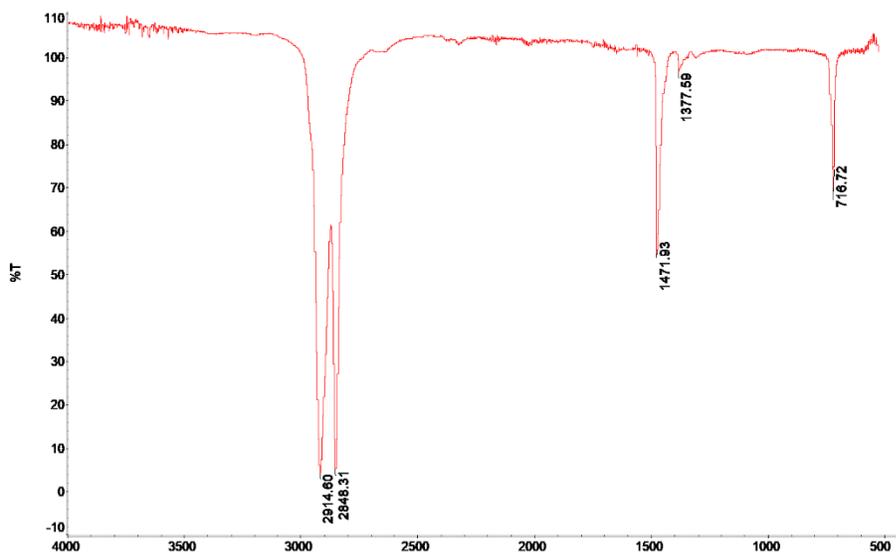


Figura 10. Espectro correspondiente a la película control (4000-500cm⁻¹).

Comportamiento de difusión.

El presente estudio estableció como tiempo de contacto entre simulante de alimento y película 10 días, ya que se consideró la prueba para una película que esté en contacto con alimento por más de tres y menor a 20 días (Comisión Europea 2011). A pesar de que el tiempo de contacto de la película con el simulante fue de 10 días, se observó que la difusión ocurrió durante las primeras 6 horas de contacto (figura 11 A-F). En pruebas de sorción de limoneno de jugo de naranja en PEBD donde también se ha estudiado la difusión del limoneno reportan un equilibrio del compuesto a los 29 días de almacenamiento en ausencia de luz, cabe destacar que si bien se puede calcular coeficiente de difusión para este caso, la morfología y la naturaleza del producto así como el proceso de migración alimento-envase hace que se extienda el tiempo de equilibrio, mientras que el tiempo de equilibrio entre envase-alimento se reduce (Cava *et al.* 2005).

Además, es posible observar que en la película control no existe un aumento considerable en la absorbancia durante las primeras 6 horas (figura 12 A-F), deduciendo que el limoneno migra hacia el simulante. Sin embargo, se puede apreciar que a partir de las 24 horas de contacto de ambas películas con el simulante, la ABS incrementaba (Figura 13 A-F) esto puede ser porque existen otros compuestos que se liberan a partir de este tiempo de contacto, sin embargo esta investigación no se enfocó en la identificación de dichos compuesto.

El tiempo en alcanzar el equilibrio, es decir el tiempo en que se mantuvo una difusión lineal; fue 0.6 horas, para los T1, T2 y T3, 1 hora para T4 y T6 y 1.6 horas para el T5. Dada la afinidad del limoneno con el etanol se esperaba un equilibrio en menor tiempo en los tratamientos con mayor concentración de etanol, sin embargo, en los tratamientos a 40 °C no hubo diferencia en el tiempo en alcanzar el equilibrio, a 20 °C fue más rápido el equilibrio en el tratamiento con ETOH al 10%, y a 5 °C el tiempo fue menor con etanol al 50%.

En la figura 11 (A-F) se puede observar que el equilibrio se alcanza en las primeras horas de contacto, a partir del punto de equilibrio la ABS deja de presentar un comportamiento lineal y no muestra aumento significativo de durante las primeras 6 horas. Así mismo, se puede apreciar que los diferentes tratamientos a pesar de tener un comportamiento similar en la curva de migración, la ABS para cada uno de los tratamientos fue diferente, esto puede deberse a que el método usado para la elaboración de la película, ya que este no asegura una distribución uniforme del limoneno, además este proceso tiene una limitación la cual radica en que la precisión es baja, por lo que el espesor de las paredes de un mismo lote puede variar considerablemente. Este es un defecto común para este método, sin embargo, existen equipos auxiliares que pueden mejorar la precisión de este método de conformación. (López Romero 2013).

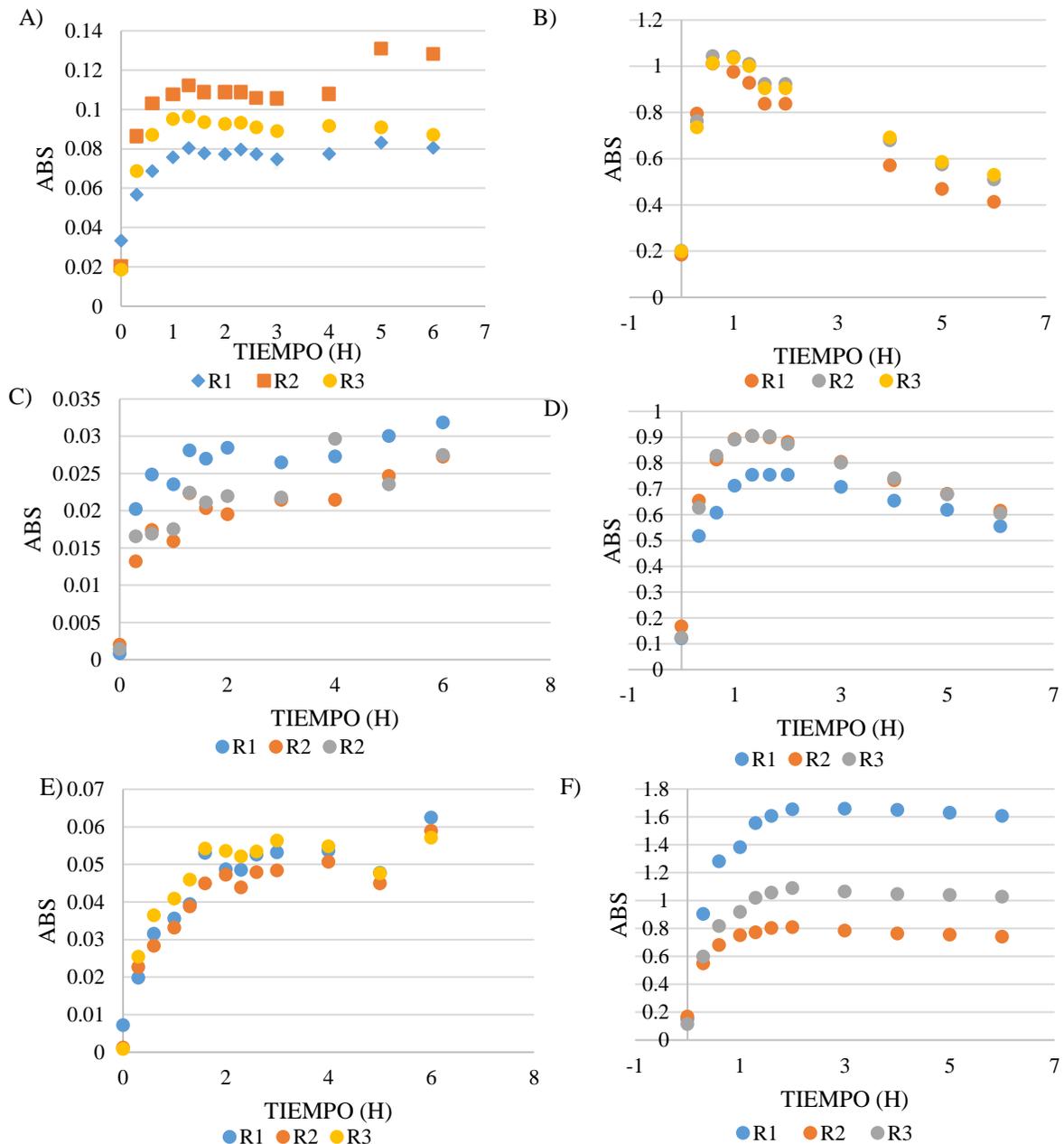


Figura 11. Absorbancia a 210 nm de simulante en contacto con película activa A)-F) corresponden a los tratamientos T1-T6, respectivamente.

T1-T3 = tratamientos con ETOH al 10% a 5, 20 y 40 °C respectivamente

T4-T6 = tratamientos con ETOH al 50% a 5, 20 y 40 °C respectivamente

R = repetición

Se ha reportado que el equilibrio en la migración de astaxantina desde películas de PEBD a temperaturas de 23, 30 y 40 °C se alcanzó a las 190.5, 50.38 y 12 horas con una relación de 59.62, 93.81 y 97.95% de astaxantina respectivamente (Colín *et al.* 2013). La liberación de α -tocoferol desde LDPE en ETOH al 95% a 30 y 40°C alcanzo el equilibrio después de

10 y 15 horas respectivamente (Shen 2012). Se ha reportado que el Irganox 1076 liberado de LDPE en ETOH al 95% alcanzó el equilibrio después de 30 y 24 horas a 30 y 40 °C (Galotto *et al.* 2011). Al igual que en todos estos casos en el presente estudio con excepción del tratamiento a 20 °C con etanol al 10%, el tiempo en alcanzar el equilibrio es menor en medida la concentración de etanol aumenta ya que el limoneno es un compuesto no polar, haciéndolo insoluble en agua (Adams y Demyttenaere 2003).

En un estudio de migración de flavonoides desde una película de PEBD se observó que el equilibrio se alcanzó en casi los mismos porcentajes de compuesto migrado en los diferentes tratamientos; 70.3, 72.5 y 73.7% respecto al contenido inicial de antioxidante añadido (Zhang y Zhao 2014). Contrariamente en este estudio se obtuvo una variación en la ABS en que se alcanzó el equilibrio, esto es producto de la variabilidad del grosor de la película, el proceso de elaboración de película usado dificulta mantener la homogeneidad del grosor de la película elaborada.

En la figura 12 (A-F) se puede apreciar que a diferencia del simulante en contacto con la película activa, el simulante con la película control no mostró un incremento en la ABS significativo durante las primeras horas, comparado con el incremento en ABS del simulante de la película activa, evidenciando la migración del limoneno desde la película activa.

En la figura 13 (A-F) es posible observar el incremento de la ABS a partir de las 24 horas en ambos simulantes, tanto el que estuvo en contacto con la película activa como el que tuvo contacto con la película control. La ABS del simulante de la película activa mostró una mayor ABS que el de la película control, sin embargo, durante las primeras horas no se observó un incremento significativo, lo que indica que a partir de las 24 horas ambas películas presentan migración de algún otro compuesto presente en el PEBD, sin embargo, la identificación de este compuesto no fue de interés de esta investigación.

Coefficiente de difusión.

El coeficiente de difusión (D) es un parámetro cinético el cual mide la capacidad promedio de las moléculas para viajar a través de la fase permeable de un medio, generalmente descrita por las leyes de Fick (Cava *et al.* 2005).

El uso de técnicas de gravimetría, así como cromatografía han sido usados para determinar D, incluso se ha usado FTIR con una buena correspondencia con los datos obtenidos por gravimetría. (Cava *et al.* 2004). El uso de estos análisis y un control en la uniformidad de la película, permiten obtener resultados con un mayor grado de precisión en la concentración de compuestos y valor de D. La espectroscopía UV-vis se ha usado para sustituir métodos analíticos que necesitan más tiempo y por lo general son más caros, este tipo de análisis se ha empleado para medir la calidad de aceite esencial del limón (León 2004). La espectrofotometría UV-vis se ha usado en estudios de migración, sin embargo esta es acompañada por el método de cromatografía líquida (HPLC por sus siglas en inglés) (Rodríguez *et al.* 2019).

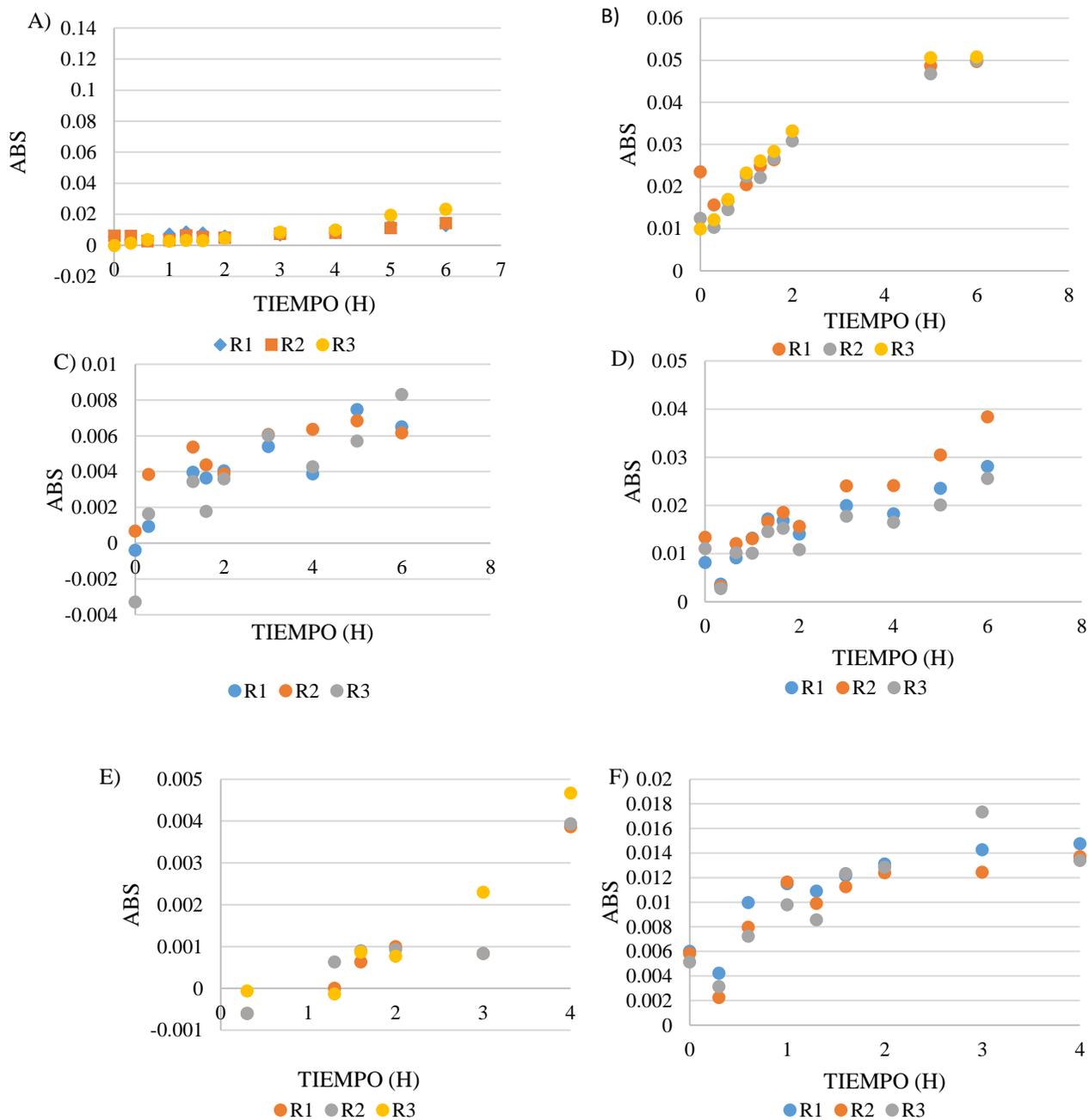


Figura 12. Absorbancia a 210 nm de simulante en contacto con película control A)-F) corresponden a los tratamientos T1-T6, respectivamente.

T1-T3 = tratamientos con ETOH al 10% a 5, 20 y 40 °C respectivamente

T4-T6 = tratamientos con ETOH al 50% a 5, 20 y 40 °C respectivamente

R = repetición

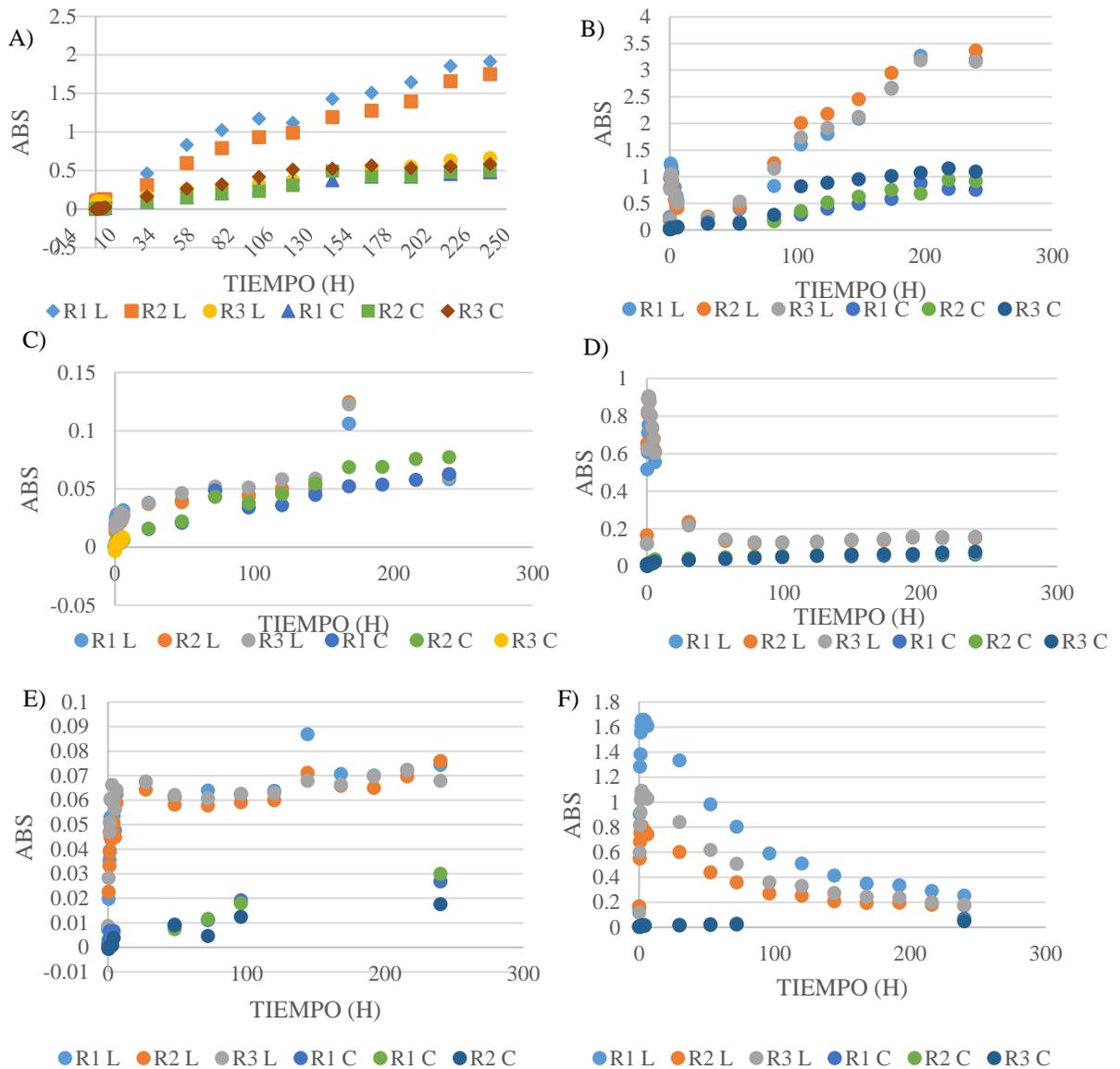


Figura 13. Absorbancia a 210 nm de película activa y control hasta las 240 horas A)-F) corresponden a los tratamientos T1-T6 respectivamente.

T1-T3 = tratamientos con ETOH al 10% a 5, 20 y 40 °C respectivamente

T4-T6 = tratamientos con ETOH al 50% a 5, 20 y 40 °C respectivamente

R = repetición

L = ABS de película con limoneno

C = ABS de película control

Los coeficientes de difusión obtenidos de la película activa se presentan en el Cuadro 3, la probabilidad del modelo para este estudio mostró diferencia significativa en al menos uno de los tratamientos ($P < 0.05$). La concentración de ETOH no tuvo influencia en los valores de D ($P > 0.05$), sin embargo, la temperatura de almacenamiento si tuvo influencia en los valores de D ($P < 0.05$).

Cuadro 3. Coeficientes de difusión de los tratamientos expresado en cm^2/s .

| Porcentaje de ETOH | | MEDIA (cm^2/s) | DE | CV (%) |
|--------------------|------|-----------------------------------|------------------------|--------|
| ETOH 10% | 40°C | $9 \times 10^{-9} \text{ AB}$ | 4.27×10^{-09} | 47 |
| | 20°C | $2.19 \times 10^{-9} \text{ C}$ | 3.5×10^{-10} | 16 |
| | 5°C | $6.08 \times 10^{-09} \text{ BC}$ | 2.68×10^{-10} | 4 |
| ETOH 50% | 40°C | $1.15 \times 10^{-08} \text{ A}$ | 1.04×10^{-09} | 9 |
| | 20°C | $6.47 \times 10^{-09} \text{ BC}$ | 7.04×10^{-10} | 11 |
| | 5°C | $5.73 \times 10^{-09} \text{ BC}$ | 2.25×10^{-09} | 39 |

Letras A-C indican diferencia estadística ($P < 0.05$) en la misma columna.

DE = Desviación estándar

CV = Coeficiente de variación

Los valores del D varían desde 1.15×10^{-08} hasta $2.19 \times 10^{-09} \text{ cm}^2/\text{s}$ lo cual contrasta con un estudio realizado para determinar la migración de limoneno desde película de PEBD a través de metodología gravimétrica a una temperatura de 30°C donde se obtuvo un coeficiente de difusión de $1.59 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$.

Se obtuvo una reducción en el valor de D como consecuencia de la reducción del espesor de la película, esto se atribuye a diferencias morfológicas del PEBD. En pruebas de migración de limoneno a través de PEBD el coeficiente de difusión puede variar como consecuencia fundamentalmente en la concentración de limoneno y la morfología del polímero, pudiendo estas observaciones justificar la gran variabilidad existente entre los valores de D (Cava *et al.* 2005).

Efecto de temperatura y tipo de simulante en el D.

En el cuadro 3 es posible observar los valores D para cada tratamiento, la comparación de medias por medio del método DUNCAN permitió agrupar los tratamientos en grupos de mayor a menor dependiendo de su diferencia estadística.

Los valores más altos para D fueron para los tratamientos a 40 °C, ya que como se menciona la temperatura afecta en la difusión del limoneno. Este comportamiento se ha observado también en películas activas de PEBD, donde se ha demostrado que la migración de Irganox 1076 (compuesto añadido a la película de PEBD), aumenta cuando se incrementa la temperatura. (Beldi *et al.* 2012). En el presente estudio, se encontró que los valores D disminuyen cuando la temperatura y la concentración de ETOH disminuye, sin embargo el T3 (20 °C, Etanol 10%) presentó un valor D muy bajo, esto se debe a que se realizó una repetición de este tratamiento y la película no contaba con las mismas características de

grosor que el resto de los tratamientos, para este caso fue de un grosor menor que el resto de película, el grosor es un valor considerado en la ecuación 3, para el cálculo del valor D y al modificarse este cambia directamente el resultado, siendo el valor D dependiente de este valor. De igual manera para el T5 el cual al tener un grosor mayor obtuvo un D mayor que el T6.

El valor de D es muy afectado por la temperatura así como el medio en donde se encuentre el compuesto migrante (polímero, alimento o tipo de simulante de alimento), este valor incrementa conforme la temperatura también aumenta (Maia *et al.* 2016).

Otro estudio también menciona que el valor D es mayor en los tratamientos con mayor concentración de ETOH ya que al ser un compuesto no polar su solubilidad en agua es muy baja. (Arias *et al.* 2007). En el caso de migración realizado con PEBD y Benzofenona con temperaturas de 20,40 y 60 °C se obtuvo como D un valor de 3.1×10^{-9} , 8.0×10^{-9} y 2.6×10^{-8} cm²/s, demostrando la relación entre la temperatura y el D (Maia *et al.* 2016).

En películas de PEBD cargados con carvona, otro terpenoide con estructura similar al limoneno, se obtuvieron los siguientes valores de D; 6.5×10^{-11} y 3×10^{-10} m²/s a 35 y 60 °C respectivamente. En ambos casos, las películas se impregnaron con CO₂ supercrítico a 273 kg m⁻³, mostrando de nuevo la dependencia del coeficiente de difusión de la temperatura (Goñi *et al.* 2018). En difusión de astaxantina desde PEBD los valores de D fueron 3.54, 7.4 y 32.67 a $23,30 \times 10^{-11}$ cm²/s a 23, 30 y 40 °C respectivamente (Colín *et al.* 2013). De igual manera se observó el incremento de D con el aumento de la temperatura en migración de flavonoides desde PEBD, donde se usaron temperaturas de 0, 15 y 30 °C; la concentración de migración más baja ocurrió a 0 °C y el mayor a 30 °C, es decir la temperatura influyo significativamente en la migración de flavonoides en los simulantes durante el almacenamiento (Zhang y Zhao 2014).

Además de la interacción entre el limoneno con el simulante de alimento, es importante considerar que durante la prueba de migración es posible que se lleven a cabo reacciones químicas en las que el limoneno esté involucrado perdiendo sus propiedades químicas. Los mono terpenos como el limoneno pueden tener reacciones que modifiquen su estructura, tales como oxidación, reducción y formación de alcoholes (Pino 2015). La reacción más común del limoneno almacenado inadecuadamente es la autooxidación al enantiómero de carvona correspondiente (Adams y Demyttenaere 2003).

Energía de activación (Ea).

La temperatura tiene una influencia en la velocidad de las reacciones químicas. Arrhenius, científico sueco y premio nobel de química en 2903 explicó en 1889 esta dependencia mediante una forma exponencial simple, partiendo de consideraciones termodinámicas con la ecuación de Van't Hoff. Al graficar 1/Temperatura en °Kelvin contra ln(D), con la pendiente de la recta se calcula la energía de activación (Ancheyta 2002).

La energía de activación es definida como la energía requerida para que un migrante se mueva entre las cadenas que forman la matriz polimérica (Shen 2012).

Se obtuvo una E_a de 9.52 kJ/mol y 14.68 kJ/mol para los tratamientos con simulantes al 10 y 50% respectivamente (figura 14). Para el caso del ETOH al 10% se obtuvo un R^2 de 0.0995, es decir, se aleja mucho de un comportamiento lineal, esto se debe a que el valor de D del TRT 3 hace que la ecuación de la recta no se ajuste al modelo lineal. Este valor, sufre variación debido a las causas anteriormente mencionadas para el valor de D. La energía de activación en los TRT con ETOH al 50% se obtuvo un R^2 de 0.9058, este modelo presenta un mejor ajuste a la ecuación lineal de la recta, lo que significa que se puede usar este valor para el cálculo de difusión a diferentes temperaturas dentro del rango en que se realizaron las pruebas (5-40 °C).

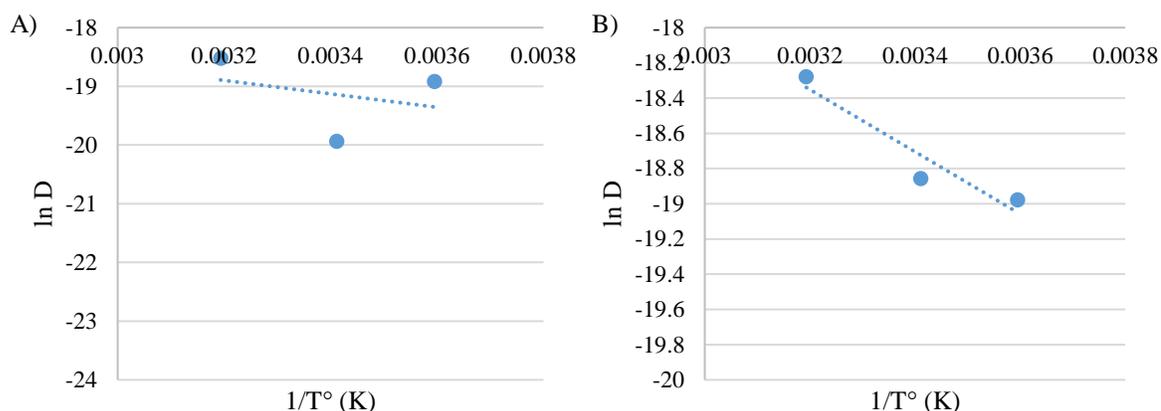


Figura 14. Modelo para cálculo de E_a A) etanol al 10% B) etanol al 50%

En general, la energía de activación es influenciada por el rango de temperaturas usadas en las pruebas, el propósito es predecir valores de D, aplicable solo en ese rango, mientras más amplio sea el rango probado, mejor será el cálculo de la energía requerida para abrir cadenas de la matriz polimérica (Colín *et al.* 2013).

En algunos casos los datos experimentales de la variación de la constante cinética respecto a la temperatura no presentan un comportamiento lineal. Este comportamiento se puede deber a que el mecanismo de la reacción cambia en el intervalo de temperaturas estudiado, la forma de expresión cinética empleada no corresponde a la reacción o la difusión puede ser lo suficientemente lenta controlando la reacción (Avery 1977).

Cuando la dependencia de los valores de coeficiente de variación con la temperatura muestra una buena linealidad, como el caso de la migración de Benzofenona desde PEBD, es posible estimar el valor de D entre las temperaturas en que se llevó el experimento. (Maia *et al.* 2016). Otro caso donde se mostró una buena linealidad fue en la difusión de Irganox 1076 en ETOH al 95%, donde se reporta un valor de $73.5 \text{ kJ mmol}^{-1}$, donde las temperaturas estudiadas fueron de 28,40,50 y 60 °C (Galotto *et al.* 2011).

4. CONCLUSIONES

- La adición de limoneno afecta las propiedades mecánicas del polietileno de baja densidad, haciéndola una película con una menor resistencia a la tensión, a su vez se convierte en un material menos rígido.
- Se puede hacer uso de la espectrofotometría UV-vis para la determinación del coeficiente de difusión como un método alternativo a los cromatográficos
- La temperatura y el tipo de simulante tuvieron un efecto directo en la migración del limoneno, entre mayor fue la temperatura y la concentración de etanol se obtuvo un coeficiente de difusión más alto, con excepción del tratamiento a 20 °C y con etanol al 10%
- La elaboración de la película es un factor clave en el desarrollo de pruebas de migración ya que es la morfología de la película y la homogeneidad del agente activo en la película es fundamental para reducir la variabilidad de los resultados.
- Es posible que la relación entre el coeficiente de difusión y la temperatura se mantengan de manera lineal, haciendo posible el cálculo de energía de activación con un buen ajuste al modelo lineal

5. RECOMENDACIONES

- Realizar una validación de método con el uso de cromatografía de gases o líquida para tener mayor grado de certeza sobre las concentraciones de agente activo migrado.
- Mantener en lo posible la homogeneidad de la película en grandes cantidades para reducir la variabilidad de los resultados.
- Realizar las pruebas de migración lo más pronto posible después de la elaboración de película para evitar reacciones de degradación de los compuestos.
- Tomar lecturas de absorbancia con un espectrofotómetro que permita tomar lecturas de ABS de más de una muestra al mismo tiempo para lograr aumentar el número de repeticiones por tratamiento y reducir la b, ya que la migración ocurre durante las primeras horas.
- Realizar pruebas con alimentos reales, para evaluar propiedades sensoriales de los mismos durante su almacenamiento.

6. LITERATURA CITADA

- Adams J an, Demyttenaere N. 2003. Biotransformation of (R)- (+)- and (S)- (-)-limonene to a-terpineol by *Penicillium digitatum*— investigation of the culture conditions. *Food Chem.* 80:525–534.
- Alendy C. 2018. Desarrollo, caracterización y validación de un bioplástico reforzado con orégano con acción antifúngica en alternaria (*Alternria alternata*) [Tesis]. Honduras: EAP Zamorano. 42 p.
- Ancheyta J. 2002. Cinética química para sistemas homogéneos. Valenzuela Zapata MÁ, editor. [sin lugar]: Instituto Politécnico Nacional. 1 online resource. ISBN: 9781449224578. Español.
- Arias GP, Stashenko E., Torres R. 2007. BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOS R(+)-LIMONENO, a-PINENO Y ?-TERPINENO POR MEDIO DE CLOROPEROXIDASA de *Caldariomyces fumago*. *Scientia et Technica.* (33):75–78.
- Arrieta M, López J, Ferrándiz S, Peltzer M. 2013. Characterization of PLA-limonene blends for food packaging applications. *Polymer Testing.* 32(4):760–768. doi:10.1016/j.polymertesting.2013.03.016.
- Arvanitoyannis IS, Bosnea L. 2004. Migration of substances from food packaging materials to foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 44(2):63–76. eng. doi:10.1080/10408690490424621.
- Avery HE. 1977. Cinética química básica y mecanismos de reacción. Barcelona: Editorial Reverté. 1 online resource (202. ISBN: 8429191615.
- Beldì G, Pastorelli S, Franchini F, Simoneau C. 2012. Time and temperature dependent migration studies of Irganox 1076 from plastics into foods and food simulants. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 29(5):836–845. eng. doi:10.1080/19440049.2011.649304.
- Berger S, Sicker D. 2009. Classics in spectroscopy: Isolation and structure elucidation of natural products / Stefan Berger and Dieter Sicker. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN: 978-3-527-32617-4.
- Boughendjioua H, Samah D. 2017. Fourier Transformed Infrared Spectroscopy Analysis of Constituents of Lemon Essential Oils from Algeria. *AJOP.* 5(3):30–35. doi:10.11648/j.ajop.20170503.12.

- Bringas M, Pino JA, Quijano C. 2012. Deterioro oxidativo en el aroma del aceite esencial de Lima microencapsulado. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 22(2):40–44. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bvuzamorano/detail.action?docID=3203438>.
- Cava D, Catala R, Gavara R, Lagaron JM. 2005a. Testing limonene diffusion through food contact polyethylene by FT-IR spectroscopy: Film thickness, permeant concentration and outer medium effects. *Polymer Testing*. 24(4):483–489. doi:10.1016/j.polymeresting.2004.12.003.
- Cava D, Lagarón JM, Gavara R, Catalá R. 2005b. Aplicación de la espectroscopia FT-IR para la evaluación de propiedades de transporte de componentes de aromas alimentarios a través de filmes poliméricos de uso en envases (II). *Revista de plásticos modernos: Ciencia y tecnología de polímeros*. (584):190–196.
- Cava D, Lagarón JM, López-Rubio A, Catalá R, Gavara R. 2004. On the applicability of FT-IR spectroscopy to test aroma transport properties in polymer films. *Polymer Testing*. 23(5):551–557. doi:10.1016/j.polymeresting.2003.11.003.
- Chariguaman JA. 2015. Caracterización de bioplástico de almidón elaborado por el método de casting reforzado con albedo de maracuyá (*Passiflora edulis spp.*) [Tesis]. Honduras: EAP Zamorano. 68 p.
- Colín C, Soto H, Peralta E, Lizardi J, Balandrán R. 2013. Diffusion of natural astaxanthin from polyethylene active packaging films into a fatty food simulant. *Food Research International*. 54(1):873–880. doi:10.1016/j.foodres.2013.08.021.
- Comisión Europea. 2011. Reglamento (UE) no 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. [sin lugar]: [sin editorial]. 89 p. (10/2011). 2011; [actualizado 2011].
- Delgado KA. 2007. Estudio de etileno en sistemas homogéneos [Tesis]. Santiago de Chile: Universidad de Chile, Departamento de ingeniería química y biotecnología. 49 p. http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2007/delgado_k/sources/delgado_k.pdf.
- Díaz R. 2005. Conservación de los alimentos. La Habana: Editorial Félix Varela. 356 p. ISBN: 9590712932.
- FAO. 2014. Soluciones apropiadas para el envasado de alimentos en los países en desarrollo. Roma. 44 p; [consultado el 19 de ago. de 2019]. <http://www.fao.org/3/a-i3684s.pdf>.
- Galotto MJ, Torres A, Guarda A, Moraga N, Romero J. 2011. Experimental and theoretical study of LDPE: Evaluation of different food simulants and temperatures. *Food Research International*. 44(9):3072–3078. doi:10.1016/j.foodres.2011.07.028.

- Garde JA, Catalá R, Gavara R, Hernandez RJ. 2001. Characterizing the migration of antioxidants from polypropylene into fatty food simulants. *Food Addit Contam.* 18(8):750–762. eng. doi:10.1080/02652030116713.
- Gavriil G, Kanavouras A, Coutelieris FA. 2018. Food-packaging migration models: A critical discussion. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 58(13):2262–2272. eng. doi:10.1080/10408398.2017.1317630.
- Goñi ML, Gañán NA, Martini RE, Andreatta AE. 2018. Carvone-loaded LDPE films for active packaging: Effect of supercritical CO₂-assisted impregnation on loading, mechanical and transport properties of the films. *The Journal of Supercritical Fluids.* 133:278–290. doi:10.1016/j.supflu.2017.10.019.
- Graciano A, Soto H, Peralta E, Cruz P, Islas AR, Sánchez-Valdes S, Sánchez-Escalante A, González-Méndez N, González-Ríos H. 2010. Migration of α -tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability. *Food Research International.* 43(4):1073–1078. doi:10.1016/j.foodres.2010.01.019.
- Groover MP. 2007. *Fundamentos de manufactura moderna: materiales, procesos y sistemas* (3a. ed.). España: McGraw-Hill España. 1 online resource (1037. ISBN: 9781456202514. Spanish.
- Hamdani M, Feigenbaum A, Vergnaud JM. 1997. Prediction of worst case migration from packaging to food using mathematical models. *Food Addit Contam.* 14(5):499–506. eng. doi:10.1080/02652039709374557.
- Jung MR, Horgen FD, Orski SV, Rodriguez C V, Beers KL, Balazs GH, Jones TT, Work TM, Brignac KC, Royer SJ, et al. 2018. Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. *Mar Pollut Bull.* 127:704–716. eng. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.12.061.
- León CA. 2004. Implementación de un método para determinar la calidad del aceite esencial de limón (*citrus aurantifolia*) por cromatografía en capa fina y espectroscopía ultravioleta como método alternativo a la cromatografía de gases [Tesis]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. 74 p.
- Limm W, Begley TH, Lickly T, Hentges SG. 2006. Diffusion of limonene in polyethylene. *Food Addit Contam.* 23(7):738–746. Ingles. doi:10.1080/02652030600654408.
- López Romero JM. 2013. Transformación de materiales termoplásticos (UF0726). Madrid: [sin editorial]. 261 p. spa. <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=4184171>.
- Maia J, Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, Sendón R, Cruz JM, Seiler A, Franz R, Simoneau C, Castle L, Driffield M, Mercea P. 2016. Determination of key diffusion and partition parameters and their use in migration modelling of benzophenone from low-density polyethylene (LDPE) into different foodstuffs. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 33(4):715–724. eng. doi:10.1080/19440049.2016.1156165.
- Ministerio de Comercio Exterior y Turismo de Perú. 2009. Guía de evases y embalajes. Perú. 56 p; [consultado el 19 de ago. de 2019]. <https://www.mincetur.gob.pe/wp->

content/uploads/documentos/comercio_exterior/Sites/ueperu/consultora/docs_taller/envases%20y%20embalajes.pdf.

- Miravete A. 2012. *Materiales compuestos I*. Barcelona: Editorial Reverté. 804 p. ISBN: 8429192247.
- Muñoz JM. 2014. Evaluación, caracterización y optimización de un bioplástico a partir de la combinación de almidón de maíz, yuca y glicerol en sus propiedades físicas y de barrera [Tesis]. [sin lugar]: EAP Zamorano. 58 p.
- Nikfar S, Behboudi AF. 2014. Limonene. En: *Encyclopedia of Toxicology*. [sin lugar]: Elsevier. p. 78–82.
- Pino JA. 2015. Aceites esenciales. Havana: Editorial Universitaria. 1 online resource (1 recurso electrónico (214. ISBN: 9591625561.
- Piringer OG. 1994. Evaluation of plastics for food packaging. *Food Addit Contam.* 11(2):221–230. eng. doi:10.1080/02652039409374220.
- Preedy V. 2016. *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Amsterdam: Academic Press. ISBN: 978-0-12-416641-7.
- Robertson GL. 2010. *Food packaging and shelf life: A practical guide* / edited by Gordon L. Robertson. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group. ISBN: 978-1-4200-7844-2.
- Rodriguez M. 2013. *Envasado y empaquetado de productos alimenticios*. Antequera: IC Editorial. 1219 p. ISBN: 9788415848943. spa. <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=4849901>.
- Rodriguez R, Castillo E, Sinuco D. 2019. Validation of an HPLC Method for Determination of Bisphenol-A Migration from Baby Feeding Bottles. *J Anal Methods Chem.* 2019:1989042. eng. doi:10.1155/2019/1989042.
- Shen L. 2012. Effect of controlled release of tocopherol on lipid oxidation [Tesis]. New Jersey: Universidad Estatal de Nueva Jersey. 90 p. <https://rucore.libraries.rutgers.edu/rutgers-lib/36665/PDF/1/play/>.
- Soto CD, Graciano AZ, Peralta E, Islas A, González A, Soto H. 2008. Release of butylated hydroxytoluene from an active film packaging to Asadero cheese and its effect on oxidation and odor stability. *J Dairy Sci.* 91(1):11–19. eng. doi:10.3168/jds.2007-0464.
- Tránsito L. 2004. Los aceites esenciales. *OFFARM.* 23(7).
- van Vuuren SF, Viljoen AM. 2007. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour Fragr. J.* 22(6):540–544. doi:10.1002/ffj.1843.
- Welle F, Franz R. 2011. Migration of antimony from PET bottles into beverages: determination of the activation energy of diffusion and migration modelling compared with literature data. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 28(1):115–126. eng. doi:10.1080/19440049.2010.530296.
- Yáñez X, Lugo LL, Parada DY. 2007. Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*citrus sinensis*, variedad valenciana) cultivada en Labateca (Norte de

- Santander, Colombia). BISTUA. 5(1):3–8. http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portalIG/home_10/recursos/general/pag_contenido/publicaciones/bistua_revista_ciencias_basica/2007/12082010/rev_bistua_vol5_num1_art1.pdf.
- Zhang S, Zhao H. 2014. Study on flavonoid migration from active low-density polyethylene film into aqueous food simulants. *Food Chem.* 157:45–50. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.018.

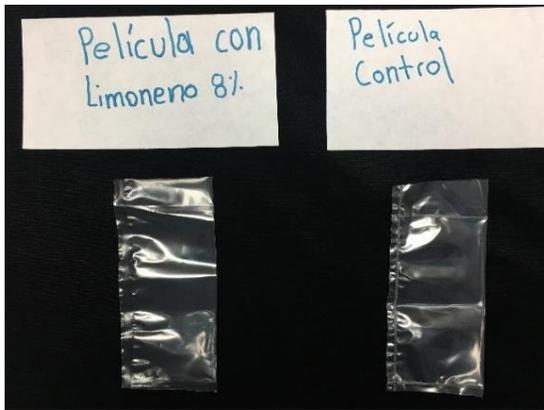
7. ANEXOS



Anexo 1 A) Micrómetro DDT CADY & CO. B) SIMPLICITY UV MILLIPORE (Darmstadt, Alemania) C) Balanza analítica Mettler AE240 (Suiza)



Anexo 2. A) Espectrofotómetro UV-VIS CARY 50 VARIAN® (California, Estados Unidos de América) B) Extrusor (Beutelspacher, México).



Anexo 3 Película activa(izquierda) y control (derecha)