

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**CARACTERIZACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE
CARVACROL Y EUGENOL CONTENIDOS EN
FILMS DE WPI**

Presentado por

Patricia Pérez de los Bueis Martín

**INGENIERO TÉCNICO AGRÍCOLA EN INDUSTRIAS AGRARIAS Y ALIMENTARIAS
*NEKAZARITZAKO INGENIARI TEKNIKO NEKAZARITZA ETA ELIKADURA INDUSTRIAK***

Pamplona, febrero de 2012

Titulo del trabajo Fin de Carrera:

CARACTERIZACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE CARVACROL Y EUGENOL CONTENIDOS EN FILMS DE WPI.

DIRECTORES: JUAN IGNACIO MATÉ CABALLERO Y IDOYA FERNÁNDEZ PAN

DEPARTAMENTO: TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

ALUMNO: Patricia Pérez de los Bueis Martín.

El presente Trabajo de Fin de Carrera se basa en la investigación sobre films de WPI llevada a cabo en el Área de Tecnología de los alimentos.

Juan Ignacio Maté Caballero, profesor de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos autoriza la presentación de dicho trabajo.

El director del Trabajo,

La alumna,

JUAN IGNACIO MATÉ CABALLERO

Patricia Pérez de los Bueis Martín.

Pamplona, febrero de 2012

Índice

1	INTRODUCCION	8
1.1	Generalidades	8
1.2	Historia.....	11
1.3	Películas comestibles	12
1.3.1	Funciones.....	13
1.3.2	Composición y características de las películas comestibles.....	14
1.3.3	Aditivos	21
1.4	Películas comestibles de proteína de aislada de suero lácteo (WPI).	25
1.5	Recubrimientos antimicrobianos.....	26
1.5.1	Tipos de sustancias con propiedades antimicrobianas.	27
1.5.2	Aceites esenciales.....	29
1.6	Migración	32
1.6.1	Evaluación de la Migración.....	32
1.6.2	Legislación	35
1.7	HPLC (CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN)	37
1.7.1	Introducción a la cromatografía	37
1.7.2	Partes del HPLC.....	39
1.7.3	La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC o LC).....	42
1.7.4	HPLC WATERS 2695	43
2	OBJETIVOS Y MODELO EXPERIMENTAL.....	46
2.1	Objetivo.....	46
2.2	Diseño experimental.....	47
3	Materiales y Métodos.....	49
3.1	Materiales	49
3.2	Métodos.....	51
3.2.1	Método para la obtención de films WPI de Carvacrol y Eugenol.....	51
3.2.2	Extracción de compuesto activo restante en el film.	55
3.2.3	Medida de la difusión de compuesto activo a simulantes alimentarios..	56
4	Resultados y discusión.....	60

4.1	Caracterización de soluciones formadoras de películas y films	60
4.1.1	Caracterización de soluciones formadoras de película	60
4.1.2	Caracterización de los films de WPI	61
4.2	Pruebas preliminares:	61
4.2.1	Determinación de la concentración de Carvacrol y Eugenol mediante HPLC. 61	
4.3	Construcción de las rectas patrón	65
4.4	Determinación del tiempo de extracción total.....	69
4.5	Difusión de compuestos activos de los films de WPI al simulante alimentario 74	
5	Conclusiones.....	90
6	Bibliografía.....	91

Índice de figuras

Figura 1: Efecto barrera de los recubrimientos comestibles aplicados a alimentos.	14
Figura 2: Modelo de películas compuestas, laminadas.....	20
Figura 3: Modelo de películas compuestas, emulsiones o conglomerados. Adaptado de (Mendoza, 2009).	20
Figura 4: Estructura química Carvacrol	31
Figura 5: Estructura química Eugenol.....	31
Figura 6: Partes HPLC Waters 2695	39
Figura 7: Uno de los cinco carruseles. (carrusel A vial 1-24).....	45
Figura 8: Pesado de componentes del film	51
Figura 9: Soluciones formadoras de película en agitación en los agitadores magnéticos	52
Figura 10: Baño termostático empleado para la desnaturalización de la proteína WPI.	52
Figura 11: Homogenización de la solución por ultrasonidos	53
Figura 12: Placa nivelada para secado de nuestros films durante 48 horas.	54
Figura 13: Film despegado y visto con lupa iluminada.....	54
Figura 14: Micrómetro digital empleado para la medida del grosor	55
Figura 15: Gradilla con viales de etanol para la extracción.....	56
Figura 16: Herramientas para realizar discos de 17mm.....	57
Figura 17: Discos en contacto con el simulante	58
Figura 18: Diagrama de proceso de cuantificación del compuesto activo difundido....	58
Figura 19: SFPs tras 24horas.....	60
Figura 20: SFPs tras 1 semana	60
Figura 21: Film despegado de WPI	61
Figura 22: Materiales empleados para filtrado	62
Figura 23: Filtrado.....	62
Figura 24: Espectro de absorción del Carvacrol a 210nm	65
Figura 25: Espectro de absorción del Eugenol a 210nm	65
Figura 26: Cromatograma obtenido para la concentración de 10^{-3} ppm de patrón de Eugenol	66

Figura 27: Cromatograma obtenido para la concentración de 10^{-3} ppm de patrón de Carvacrol.....	66
Figura 28: Recta patrón del Carvacrol a 210nm.....	67
Figura 29: Recta patrón del Eugenol a 210nm.....	68
Figura 30: Extracción del Carvacrol con y sin compensación.....	72
Figura 31: Extracción del Eugenol con y sin compensación.....	72
Figura 32: Concentración de C. activo no difundido del film al aceite en función del tiempo de contacto.....	75
Figura 33: Concentración de C. activo no difundido del film a la solución acuosa 10% de etanol (v/v) en función del tiempo de contacto.....	75
Figura 34: Concentración de C. activo no difundido del film al agua en función del tiempo de contacto.....	76
Figura 35: Concentración de Carvacrol no difundido del film a los distintos simulantes en función del tiempo de contacto.....	76
Figura 36: Concentración de Eugenol no difundido del film a los distintos simulantes en función del tiempo de contacto.....	77
Figura 37: Evolución del porcentaje % de compuesto activo liberado al aceite al lo largo de 240 horas de contacto.....	79
Figura 38: Evolución del porcentaje % de compuesto activo liberado al aceite al lo largo de 24 horas de contacto.....	79
Figura 39: Evolución del % de compuesto activo liberado a la solución acuosa de 10% etanol (v/v) a lo largo de 240 horas de contacto.....	81
Figura 40: Evolución del % de compuesto activo liberado a la solución acuosa de 10% etanol (v/v) a lo largo de 24 horas de contacto.....	81
Figura 41: Evolución del % de compuesto activo liberado al agua a lo largo de 240 horas de contacto.....	82
Figura 42: Evolución del % de compuesto activo liberado al agua a lo largo de 24 horas de contacto.....	82
Figura 43: % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 0,5 horas de contacto.....	85

Figura 44: % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 2 horas de contacto	86
Figura 45: % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 8 horas de contacto	87
Figura 46: % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 24 horas de contacto	88
Figura 47: % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 240 horas de contacto	89

Índice de tablas

Tabla 1: Posibles aplicaciones de films y recubrimientos comestibles.	21
Tabla 2: Tipos de alimentos y simulantes de alimentos.....	33
Tabla 3: Lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios.....	36
Tabla 4: Diseño experimental del presente PFC.....	47
Tabla 5: Método de referencia. (Villa et al., 2007).....	64
Tabla 6: Método utilizado.....	64
Tabla 7: Áreas obtenidas para cada una de las concentraciones de Carvacrol	67
Tabla 8: Áreas obtenidas para cada una de las concentraciones de Eugenol.....	68
Tabla 9: Concentraciones (ppm) de Carvacrol y Eugenol para cada uno de los tiempos de extracción	69
Tabla 10 :Datos de extracción del Carvacrol y Eugenol	71
Tabla 11: Concentraciones máximas (ppm)	73
Tabla 12: Medias de las concentraciones de Carvacrol (ppm) obtenidas para los distintos simulantes y los diferentes tiempos de extracción	74
Tabla 13: Medias de las concentraciones de Eugenol (ppm) obtenidas para los distintos simulantes y los diferentes tiempos de extracción	74
Tabla 14: Porcentaje de Carvacrol del total contenido en el film difundido a los distintos simulantes para cada uno de los tiempos de contacto	78
Tabla 15: Porcentaje de Eugenol del total contenido en el film difundido a los distintos simulantes para cada uno de los tiempos de contacto.....	78

RESUMEN

La creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos más sanos y ecológicos ha llevado a los investigadores a desarrollar nuevos sistemas de envasado que prolonguen la vida útil de los productos y que, al mismo tiempo, sean reciclables. La búsqueda de alternativas deriva en las películas biodegradables basadas en materiales renovables (almidones, celulosas, PHA, etc.). Otra alternativa, es el uso de recubrimientos comestibles en contacto directo con los alimentos, como complemento de los envases plásticos.

Este Trabajo fin de carrera está enmarcado en el desarrollo de películas comestibles antimicrobianas capaces de aumentar la seguridad y vida comercial de productos alimentarios frescos a través del control de la difusión de agentes antimicrobianos contenidos en su formulación.

El objetivo fundamental de este trabajo es la caracterización de las cinéticas de liberación de compuestos activos retenidos en matrices basadas en proteína aislada de suero lácteo.

La liberación de compuestos activos (Carvacrol y Eugenol) desde la matriz proteica se detectará y cuantificará mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La cuantificación se realizará a través de la elaboración de rectas de calibración obtenidas a partir de patrones comerciales.

Se determinará la cinética de liberación de los aditivos incorporados en las películas mediante la realización de pruebas de transferencia de materia en medios simulados (agua, agua: etanol y aceite de oliva). Se utilizarán condiciones estándar de agitación, temperatura y tiempo de contacto. Esta prueba se realizará siguiendo la metodología descrita por Rossi-Márquez et al. (2009) y Masstromateo et al. (2009).

1 INTRODUCCION

1.1 Generalidades

La Real Academia Española define alimento como cada una de las sustancias que un ser vivo toma o recibe para su nutrición. Los alimentos se presentan en muchas formas diferentes aunque siempre poseen las mismas funciones químicas básicas: suministrar la energía necesaria a las células del cuerpo y ejercer las funciones de materia prima para el crecimiento, la restauración y el mantenimiento de los tejidos y órganos vitales.

Todos los alimentos que ingiere el ser humano son de origen biológico, pues derivan de las plantas y de los animales. Este carácter biológico es lo que lo hace alterable mediante cambios de origen biótico o abiótico que hacen que el alimento no sea adecuado para el consumo. Las causas por las cuales se da el deterioro de alimentos, es provocada por 3 factores existentes que son: microbiológicos, donde los agentes que afectan al alimento son diferentes tipos de hongos, bacterias y levaduras, que provocan que la calidad y características del producto se vayan deteriorando y provoquen su descomposición. Físicos, donde se encuentran los golpes, mordeduras, picaduras que provocan el deterioro de los alimentos. Y las reacciones químicas es decir la maduración, oxidación, oscurecimiento enzimático o no enzimático.

El concepto general de la preservación de los alimentos es prevenir o evitar el desarrollo de microorganismos (bacterias, levaduras y mohos), para que el alimento no se deteriore durante el almacenaje. Al mismo tiempo, se deben controlar los cambios químicos y bioquímicos que provocan deterioro. De esta manera, se logra obtener un alimento sin alteraciones en sus características organolépticas típicas (color, sabor y aroma), y puede ser consumido sin riesgo durante un cierto período (no inferior a un año).

El ritmo de vida y las características actuales de la sociedad han originado una demanda de alimentos **poco procesados**, que conservan sus propiedades originales

gracias al desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas a la conservación, envasado y procesado de alimentos.

La demanda de **comodidad y seguridad** son las fuerzas directrices del envasado alimentario en todo el mundo. La comodidad está relacionada con la facilidad de apertura, la posibilidad de poder cerrar de nuevo un envase una vez abierto.

También es necesario tener en cuenta en **la innovación** del envasado aspectos como la conciencia medioambiental y la diferenciación, entre otros. Las principales áreas de evolución del campo de los envases de alimentos, se dirigen a:

- Utilización de nuevos gases o materiales de envasado, centrados principalmente en el análisis de las posibles interacciones entre alimentos y materiales de envasado
- Innovación en el diseño de envases, debido a la diversidad de productos en el mercado
- Estudios de reciclado e impacto ambiental de diferentes envases (en auge por la creciente sensibilización con el ambiente). Posibilidad de reutilización de los envases
- Desarrollo de nuevas técnicas de envasado

El envasado actual de alimentos, se adapta totalmente al producto, siendo totalmente “a medida”, según los requerimientos específicos del alimento que contenga. Así, el diseño (opacidad, por ejemplo), la permeabilidad, composición de gases, tipo de material empleado, dependerán del producto.

La gran mayoría de los envases de hoy en día están compuestos de los polímeros sintéticos plásticos (polietileno, polipropileno...) debido a sus excelentes propiedades técnicas (transparencia, flexibilidad durabilidad, permeabilidad) y a su bajo precio. Sin embargo, los plásticos constituyen entre el 24-30% de la basura municipal y aproximadamente la mitad proviene de aplicaciones de envasado (Rowat, 1993). Por este motivo, los envases plásticos son el centro de los programas de reducción del volumen de las basuras municipales.

La creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos más sanos y ecológicos ha llevado a los investigadores a desarrollar nuevos sistemas de envasado que prolonguen la vida útil de los productos y que, al mismo tiempo, sean reciclables. La búsqueda de alternativas hace nacer las películas biodegradables basadas en materiales renovables (almidones, celulosas, PHA,...). Otra alternativa, es el uso de recubrimientos comestibles en contacto directo con los alimentos, como complemento de los envases plásticos.

1.2 Historia

En el año 8000 antes de nuestra era, el uso de vasijas de arcilla como recipiente hace comenzar la historia del embalaje. Desde entonces su uso ha ido en aumento, evolucionando y diversificándose enormemente en los últimos años, al amparo de las nuevas tecnologías y tratando de satisfacer las nuevas necesidades sociales.

Se utilizan envases en el sector de la alimentación, de la construcción, cosméticos, electrodomésticos, y en general todo tipo de productos, rehusando incluso el consumidor aquellos productos que no disponen de un embalaje adecuado. Esto ha llevado a la sociedad a plantearse un grave problema acerca de qué hacer con todos los envases, una vez que estos han sido utilizados. Debido a que la mayor parte de los envases son de un solo uso, han empezado a surgir normas y leyes que impulsan su reutilización y el reciclado de los materiales.

En sí un envase tiene como función principal: preservar, contener, transportar, informar, expresar, impactar y proteger al producto que contiene. Desde la antigüedad siempre existió la necesidad de conservación, desde el calor de nuestro cuerpo hasta la de una casa o la de los alimentos. Así, con el objetivo de conservar y proteger frente al paso del tiempo, en conjunto con la evolución de la tecnología, se han creado envases innovadores con base a un consumidor más exigente cada día, dándoles diferentes usos, siempre sin olvidar su principal función: conservar. La historia del hombre y la de los envases ha corrido a la par; evolucionando éste último y siendo influido de acuerdo a los eventos que han afectado a la historia. En la prehistoria el hombre estaba rodeado de envases naturales que protegían, y cubrían a las frutas u otras clases de alimentos. Viendo su utilidad buscó imitarlas, adaptándolas y mejorándolas según sus necesidades. En el año de 8000 a. C se encuentran ya los primeros intentos formados por hierbas entrelazadas, vasijas de barro sin cocer y vidrio. Posteriormente, los griegos y romanos utilizarían botas de tela y barriles de madera, así como botellas, tarros y urnas de barro cocidos. En el año 1700 se envasa champagne en fuertes botellas y con apretados corchos. En el año 1800 se vende la primera mermelada en tarro de boca ancha y se utilizan los cartuchos de hojalata soldada a mano para

alimentos secos. Así ha ido creciendo el desarrollo de los envases y cada vez se hallan nuevas maneras de formarlos y crearlos con diversos materiales según sea su necesidad. (Matias S. Perez)

1.3 Películas comestibles

Un film o película comestible se define como una capa fina y continua de material comestible que sirve para recubrir o separar los componentes de un alimento (Krochta, 1994).

Las películas comestibles se han empleado desde épocas muy antiguas. Actualmente se les presta mayor atención debido a un creciente interés por los recursos renovables y la mejora de la conservación de la calidad de los alimentos (Caner et al., 1998).

Para poder emplear una película comestible sobre un alimento se han de cumplir los siguientes requisitos (Mc Hugh y Krochta, 1994):

- Buenas propiedades sensoriales y organolépticas, compatibles con la naturaleza del alimento.
- Solubilidad y dispersabilidad en su preparación y posterior consumo.
- Propiedades mecánicas y protectoras adecuadas.
- Estabilidad suficiente
- Buena adhesión a la superficie del alimento
- Requerimientos sencillos de tecnología
- Cumplimiento de la reglamentación alimentaria (sustancias GRAS)
- No toxicidad

Las películas y recubrimientos comestibles pueden mantener la calidad de un alimento actuando como barrera a la humedad, al oxígeno, los aceites y a la migración de aromas entre el alimento y el exterior (Guilbert, 1996; Kester y genoma, 1986; Krochta,

1992) o entre los componentes de un sistema alimentario heterogéneo (por ejemplo evitando la transferencia de humedad entre un helado y los frutos secos presentes en el mismo). Un envase tradicional sin el uso de recubrimientos comestibles, no podría evitar este tipo de migraciones.

Si se controlan los fenómenos indeseables de transferencia de materia en la superficie del alimento, se pueden reducir las funciones del envase. Aunque los Films comestibles no van a reemplazar a los envases basados en polímeros sintéticos, tienen el potencial de disminuir la cantidad necesaria de embalajes, al limitar la transferencia de materia entre el alimento y su entorno (lo cual permite la utilización de envases químicamente más simples, basados en un único polímero, aumentando así su reciclabilidad a la vez que disminuyen su coste)

1.3.1 Funciones

La eficacia de los PRCs depende de la naturaleza de sus componentes y de su estructura física. Tienen una serie de funciones interesantes para la industria agroalimentaria en función del hidrocoloide elegido:

- Reducir la pérdida de humedad.
- Reducir el transporte de gases (O_2 Y CO_2).
- Reducir la migración de grasas y aceites.
- Reducir el transporte de solutos.
- Mejorar las propiedades mecánicas y de manejo de los alimentos, permitiendo así disminuir el tamaño y el grosor de los envases exteriores.
- Limitar pérdidas de aromas y absorción de olores extraños.
- Contener aditivos.

Los PRCs no van a reemplazar a los envases de polímeros sintéticos, pero en combinación mejora sus prestaciones y tienen el potencial de reducir la cantidad

necesaria de embalajes, al limitar la transferencia de materia entre el alimento y el entorno.

Además de poder incorporar aditivos antioxidantes y antimicrobianos en los PCR son bastante importantes retardar la migración de humedad y controlar el transporte de gases como el Etileno, el O₂ y el CO₂, retener aromas, mejorar las propiedades mecánicas manteniendo así las buenas propiedades mecánicas y organolépticas de los alimentos durante más tiempo. (Kester y Fennema, 1986).

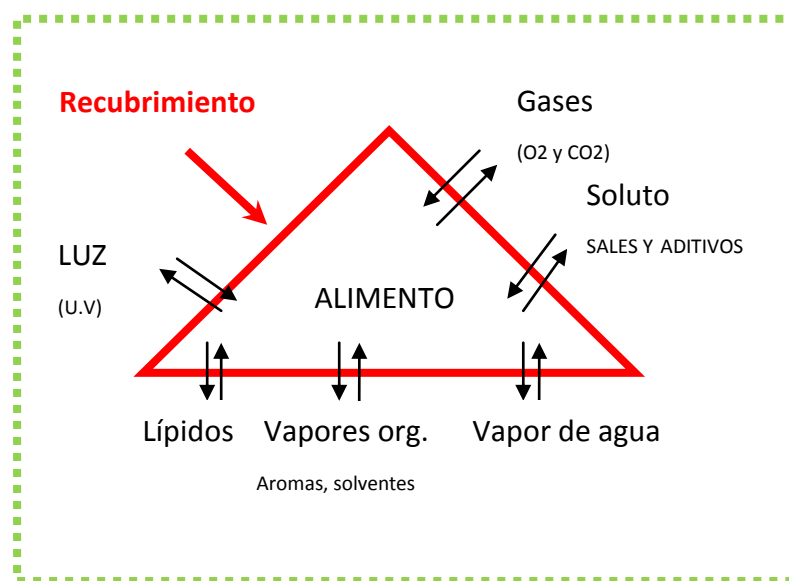


Figura 1: Efecto barrera de los recubrimientos comestibles aplicados a alimentos.

Adaptado de (Debeaufort y Quezada-Gallo, 1998)

1.3.2 Composición y características de las películas comestibles

En la formación de películas y de recubrimientos las propiedades funcionales dependen de la naturaleza de sus componentes, composición y estructura. La composición se elegirá en función del objetivo que busquemos, la naturaleza del alimento que queramos proteger, y del método de aplicación.

Las materias primas utilizadas en la elaboración de películas comestibles pueden dividirse en tres categorías:

- a. Hidrocoloides: Incluyen proteínas, derivados de celulosa, pectinas, almidones y otros polisacáridos.
- b. Lípidos: ceras, acetoglicéridos y ácidos grasos.
- c. Compuestos: lípidos + hidrocoloides.

A. Hidrocoloides:

Los films elaborados a partir de hidrocoloides pueden ser usados en aquellas aplicaciones donde el control de la migración de agua no es el objetivo.

Sin embargo, presentan buenas propiedades de barrera frente al oxígeno, dióxido de carbono y los lípidos. La mayoría también poseen propiedades mecánicas deseables, útiles para mejorar la integridad estructural de productos frágiles (Greener, 1992). Dado su carácter hidrofílico, son solubles en agua caliente, y se disuelven sin alterar las propiedades sensoriales del alimento sobre el cual están aplicados (Fennema y col., 1994).

Dentro de los hidrocoloides se engloba a los carbohidratos y a las proteínas.

➤ Carbohidratos

Los carbohidratos como son: almidones, alginatos, carragenanos, pectinas, derivados de celulosa, quitosano, gomas, etc.

- ✓ *Almidón*: las películas comestibles de almidón se producen por vaciado o moldeado de una dispersión acuosa gelatinizada de amilasa, seguida por la evaporación del solvente, lo que da lugar a la formación de una película transparente.

Estas películas se usan como recubrimientos comestibles de los alimentos para suministrar una barrera al oxígeno, a los lípidos y para mejorar la apariencia en la textura.

- ✓ *Alginatos*: El alginato se obtiene principalmente del alga gigante *Macrocystis Pyrifera*. El alginato forma geles que se usan para la formación de las películas (los más utilizados son los de calcio). Se forman mediante la evaporación de una solución acuosa de alginato, seguido de un ligamiento entrecruzado iónico con una sal de calcio. Las películas de alginatos se usan en productos cárnicos, actuando éstas como agente sacrificante, es decir, la humedad se pierde de la cobertura antes que el alimento se deshidrate de manera significativa.

- ✓ *Carragenatos*: Proceden de las algas rojas, se extraen de forma industrial. Se disuelven en agua caliente formando una solución acuosa del polímero, esta gelificación ocurre probablemente por la formación de una estructura de doble hélice en forma de red que se origina mediante la adición de una sal específica, lo cual da lugar a puentes intercatenarios de gran importancia. Los recubrimientos elaborados a partir de carragenanos retardan la pérdida de humedad.

- ✓ *Pectinas*: Son carbohidratos purificados, a partir de la corteza interna de los frutos cítricos. Poseen una alta capacidad de melificar. Las películas o recubrimientos elaborados a partir de pectina ofrecen una alta permeabilidad al vapor de agua.

- ✓ *Derivados de celulosa*: La celulosa tiene un origen vegetal, proviene de los tejidos fibrosos de las plantas, por lo que es el más abundante de los materiales orgánicos.

Las películas elaboradas a partir de celulosa no son buenas barreras a los gases ni al vapor de agua, pero son excelentes para la protección de ciertos productos que a humedades altas tienen tasas de respiración elevadas, este material no permite la formación de condensados.

- ✓ *Quitosano*: Es un excelente formador de películas. Debido a su buena solubilidad puede ser modificado químicamente en diferentes formas y presentaciones (fibras, películas, cápsulas, recubrimientos). Se obtiene de la desacetilación de quitina presente en los desechos de los mariscos.

Es buena barrera frente al oxígeno y frente al dióxido de carbono.

➤ Proteínas

Las proteínas usadas para la formulación de recubrimientos comestibles pueden ser: caseína, proteína aislada de suero lácteo, colágeno, albúmina de huevo, proteína de pescado, queratina, etc., de origen animal como son:

- ✓ *Caseína*: Los casinatos forman fácilmente películas en soluciones acuosas debido a su estructura desordenada. Dan como resultado películas, transparentes, flexibles y de naturaleza blanda.
- ✓ *Proteínas aisladas de suero lácteo*: Se obtienen mediante el calentamiento de soluciones de 8-12%, el secado se realiza a temperatura ambiente. Resultan películas de gran fragilidad, necesitan plastificantes.
- ✓ *Colágeno*: Se encuentra de forma natural en los tejidos animales como tendones, piel y huesos. Las películas de colágeno se desarrollan por extrusión y dispersión de un ácido coloidal. El colágeno ha sido estudiado durante mucho tiempo como recubrimiento para productos cárnicos.

A continuación de algunas de las proteínas de origen vegetal como: zeína, gluten de trigo, proteína de soja, etc.

- ✓ *Zeína*: Son aislados de proteína de maíz. A partir de la zeína se desarrollan soluciones alcohólicas dando lugar a películas y recubrimientos con buenas características de permeabilidad al vapor de agua, así como presentan buenas propiedades mecánicas. También posee buenas características frente al termosellado.
- ✓ *Gluten de trigo*: Este material se ha utilizado como un reemplazo del colágeno, en la manufacturación de recipientes de salsas.
- ✓ *Proteína de soja*: Es un compuesto de de soja purificada. Se ha estudiado su uso para la formación de bolsas solubles para salsas.

B. Lípidos

Los films elaborados a base de lípidos se caracterizan por sus excelentes propiedades como barrera frente a la humedad. Dentro de este grupo se incluyen las ceras, resinas, ácidos grasos y monoglicéridos y diglicéridos (Baldwin et al., 1997).

Por ejemplo, las ceras comestibles son más resistentes a la humedad que la mayoría de las películas. Destaca la parafina, que es la más resistente de todas. En las frutas, se aplica una capa de ceras como suplemento en la superficie por si hubiera podido verse alterada en el procesado de la pieza. Los films lipídicos son empleados con el fin de ser éstos una capa protectora frente a intercambios con el medioambiente o como barrera entre dos compartimentos de un alimento heterogéneo. También su uso está enfocado a ser soporte de aditivos liposolubles, como a procurarles brillo a los productos de confitería. (Kester et al., 1986; Greener, 1992).

Muchos lípidos existen en forma cristalina y sus cristales individuales son altamente impermeables a los gases y al vapor de agua. Aún así, hay que considerar que el permeante puede pasar a través de los cristales y por tanto las propiedades de barrera dependen del empaquetamiento intercristalino. Cuanto más hermética sea la disposición de los cristales, mayor es la resistencia a la difusión; asimismo los cristales orientados perpendicularmente al flujo permeante proporcionan un mejor efecto barrera que agrupados con otra orientación. (Greener, 1992).

El uso de los lípidos en forma pura como recubrimientos está limitado pues no poseen suficiente integridad estructural ni durabilidad. Su fragilidad hace que requieran ser empleados con una matriz que actúe de soporte. Debido a esto, se dan los films compuestos

C. **Film compuesto**

Los films compuestos son films con formulaciones mixtas entre hidrocoloides y lípidos, de tal modo, que se pueden combinar las ventajas de ambos, y disminuir sus inconvenientes. (Kester et al., 1986; Greener, 1992; Martin Polo et al., 1992). Por ejemplo, cuando lo que se persigue es una película que sea buena barrera al vapor de agua la porción lipídica puede cumplir esta función, mientras que la durabilidad la proporciona la parte de la formulación que es hidrocoloide.

Los films compuestos pueden ser de dos tipos:

-laminados.

-emulsiones o conglomerados.

-**laminados**, se obtienen por superposición de capas formando una bicapa, en general un ácido

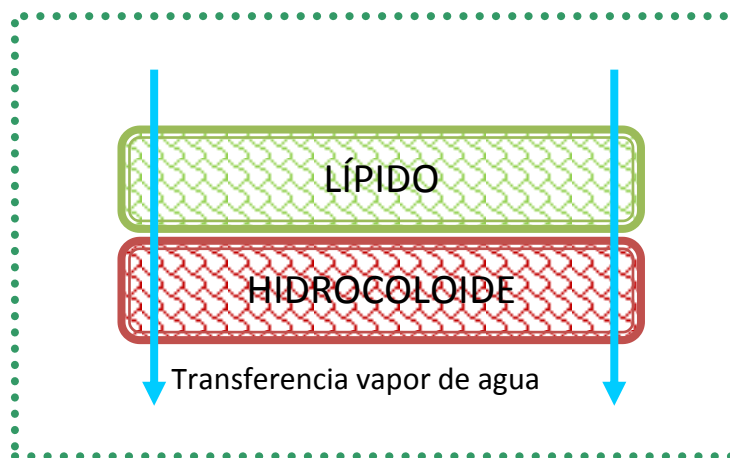


Figura 2: Modelo de películas compuestas, laminadas.

Adaptado de (Mendoza, 2009).

Estos ofrecen la ventaja de ser más fáciles de aplicar debido a las distintas naturalezas de la matriz soporte y el lípido, permitiendo por ejemplo, un control separado de las temperaturas de procesamiento de ambos componentes. (Anker, 1996).

-**emulsiones o conglomerados**, donde son mezclas heterogéneas de partículas hidrófobas (lípidos) dentro de una matriz hidrofílica (hidrocoloides) obtenidas mediante emulsión o micro emulsión grasa sobre un film de polisacárido.

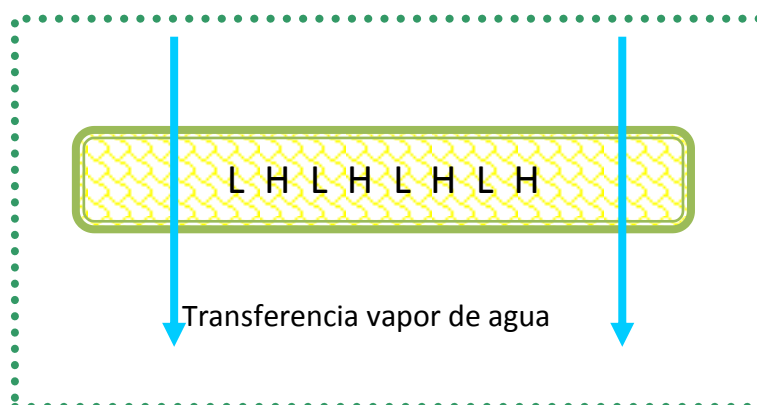


Figura 3: Modelo de películas compuestas, emulsiones o conglomerados. Adaptado de (Mendoza, 2009).

En la siguiente tabla se puede observar el tipo de film a utilizar dependiendo de la aplicación final que queramos darle.

Tabla 1: Posibles aplicaciones de films y recubrimientos comestibles.

Aplicación	Tipo de film apropiado
Retardar la migración de la humedad	Lípidos, compuestos
Retardar la migración de gases	Hidrocoloides, lípidos o compuestos
Retardar la migración de lípidos	Hidrocoloides
Retardar la migración de solutos	Hidrocoloides
Mejorar la estabilidad estructural	Hidrocoloides, lípidos o compuestos
Retener los compuestos volátiles	Compuestos
Transportar aditivos alimenticios	Hidrocoloides , lípidos

Además de estas sustancias, los films suelen llevar aditivos como plastificantes, surfactantes y aditivos como antimicrobianos y antioxidantes.

1.3.3 Aditivos

Guilbert (1986) menciona que varios materiales pueden ser incorporados dentro de las películas comestibles y tener influencia en las propiedades mecánicas, protectoras y sensoriales. Menciona también que para incrementar las propiedades organolépticas o nutricionales en el alimento se pueden incorporar agentes saborizantes, pigmentos o aditivos nutricionales en las películas comestibles o cubiertas.

Los aditivos pueden ser:

- A. Aditivos tecnológicos
- B. Aditivos funcionales

La influencia que tendrá el aditivo en las propiedades de la película dependerá en el grado de concentración, en la estructura química, en el grado de dispersión en la película y en la interacción de los polímeros (Okhamafe y York, 1954)

A. Aditivos tecnológicos

Son aquellos que tienen por finalidad la de modificar sus propiedades físicas.

a) Plastificantes

Un plastificante es una sustancia no volátil con un alto punto de ebullición que cuando se añade a un polímero modifica las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del mismo (Banker, 1966). Los plastificantes actúan debilitando las fuerzas intermoleculares entre las cadenas poliméricas adyacentes de los diferentes bio-polímeros, lo que hace que las películas seas más flexibles y con menor fuerza de tensión (Guilbert, 1986). Esta reducción en las uniones internas implica a su vez una menor cohesión del conjunto y una malla estructural más espaciada, que facilita la difusión de los gases y el vapor de agua a través del film. (Greener, 1992; Park, 1995; Krochta et al., 1996).

El plastificante más efectivo es aquel que más se asemeja químicamente al polímero que plastifica (Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008). También es muy importante que el polímero y el plastificante tengan solubilidades similares con respecto al solvente utilizado para la obtención de la película.

Como también es de relevada importancia que el plastificante permanezca en la matriz del recubrimiento, pues influye en la estabilidad física y mecánica de éste. (Osés, 2006).

Los plastificantes más utilizados en recubrimientos y películas comestibles son polioles (glicerol, sorbitol y polietilenglicol), oligosacáridos (sacarosa, glucosa y fructosa) y lípidos (ácidos grasos y monoglicéridos). El agua también actúa como plastificante en las películas hidrofílicas y su contenido se ve afectado por la humedad relativa ambiental (Gontard et al., 1993).

b) Surfactantes

Los emulsificantes, tensoactivos o surfactantes son sustancias anfílicas con actividad superficial. Reducen la tensión interfacial sólido-líquido aumentando la capacidad del recubrimiento para impregnar al alimento en la etapa de aplicación del mismo. También reducen la tensión interfacial agua-lípido, favoreciendo la dispersión de los lípidos en agua y, por tanto, la formación de recubrimientos emulsionados. Por su carácter anfipático, estabilizan las emulsiones y reducen las fuerzas intermoleculares entre las cadenas de los polímeros, actuando, en cierto modo, como plastificantes de los mismos. Algunos de los emulsificantes usados en la formulación de recubrimientos comestibles son: ácidos grasos, monoacilgliceroles, lecitina y sus derivados, etilenglicol, monoestearato, glicerol monoestearato, ésteres de ácidos grasos y sorbitan o polioxeno (Tweens) y ésteres de sacarosa y ácidos grasos (Baldwin, 1999).

B. Aditivos funcionales

Son componentes activos que tienen por finalidad la de mejorar la calidad y aumentar la vida útil de un alimento.

a) Acidificantes

Son aquellos compuestos que poseen la propiedad de comunicar sus cualidades ácidas a los demás cuerpos.

b) Enriquecimiento nutricional:

Actualmente se está estudiando la posibilidad de incluir en el recubrimiento o película ciertos componentes como vitaminas o nutrientes extras de los que pueda carecer el alimento (Bravin et al., 2006). La técnica normalmente utilizada es la microencapsulación, que consiste en atrapar partículas sólidas, gotas líquidas o gases dentro de recubrimientos poliméricos finos, que proporciona protección a los aditivos encapsulados y permite su liberación controlada. Alguno de los materiales que se usan

para la producción de cápsulas son gomas, almidón, como sus derivados. (Debeaufort et al., 1998)

Así como también se están desarrollando estudios que incorporan colorantes, aromas, especias o hierbas aromáticas, ácidos, azúcares o sales en los recubrimientos y películas, para darle al film una carga organoléptica. Es el desarrollo de los estudios de envases activos.

A. Antimicrobianos (apartado 1.5)

B. Antioxidante

Se añaden para incrementar la estabilidad y mantener el valor nutricional y color de los productos alimenticios protegiendo frente al enranciamiento, la degradación y la decoloración oxidativa (Park et al., 1996a).

La oxidación de las grasas es la forma de deterioro de los alimentos más importante después de las alteraciones producidas por microorganismos. La reacción de oxidación es una reacción en cadena, es decir, que una vez iniciada, continúa acelerándose hasta la oxidación total de las sustancias sensibles. Con la oxidación, aparecen olores y sabores a rancio, se altera el color y la textura, y desciende el valor nutritivo al perderse algunas vitaminas y ácidos grasos polinsaturados. Además, los productos formados en la oxidación pueden llegar a ser nocivos para la salud.

Principalmente se emplean ácidos, como el cítrico o el ascórbico, y sus ésteres y compuestos fenólicos (Del Nobile et al., 2008).

La mayoría de los productos grasos tienen sus propios antioxidantes naturales. Las grasas vegetales son en general más ricas en sustancias antioxidantes que las animales. También otros ingredientes, como ciertas especias (el romero, por ejemplo), pueden aportar antioxidantes a los alimentos elaborados con ellos.

Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos:

- Deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas.
- Eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto, o el presente en el espacio que queda sin llenar en los envases, el denominado espacio de cabeza.
- Eliminando las trazas de ciertos metales, como el cobre o el hierro, que facilitan la oxidación.

Los que actúan por los dos primeros mecanismos son los antioxidantes propiamente dichos, mientras que los que actúan de la tercera forma se agrupan en la denominación legal de "sinérgicos de antioxidantes", o más propiamente de agentes quelantes. Los antioxidantes frenan la reacción de oxidación, pero a costa de destruirse ellos mismos. El resultado es que la utilización de antioxidantes retrasa la alteración oxidativa del alimento, pero no la evita de una forma definitiva. Otros aditivos alimentarios (por ejemplo, los sulfitos) tienen una cierta acción antioxidante, además de la acción primaria para la que específicamente se utilizan.

1.4 Películas comestibles de proteína de aislada de suero lácteo (WPI).

La proteína de suero lácteo es uno de los principales productos que se obtienen durante el proceso industrial del queso y la caseína. La leche tiene un 6.25 % de proteínas de las cuales el 20% corresponden al suero y el 80 % al caseinato. Hasta hace relativamente poco tiempo, el suero estaba considerado como producto de desecho pero, actualmente, se sabe que tiene un enorme valor Biológico (VB), además de contener una cantidad de lactosa muy reducida.

El suero lácteo contiene lactosa, minerales, vitaminas y proteínas principalmente beta-lactoglobulina (~65%), la alfa-lactoalbumina (~25%). Mediante la ultrafiltración del suero se obtiene un concentrado de proteína (WPC), si se agregan pasos de diafiltración al sistema de ultrafiltración se desnaturaliza la proteína obteniéndose la proteína aislada del suero de la leche (WPI). (Krochta, 2002).

Los recubrimientos hechos a base de proteínas son flexibles, transparentes y presentan excelentes propiedades de barrera a los gases, sin embargo, la resistencia que presenta al vapor de agua es pobre debido a su naturaleza hidrofílica. La adición de lípidos a estos films mejora sus propiedades barrera a la humedad al aumentar la hidrofobicidad de las películas. (Pérez-Gago y Krochta, 2002). Gontard et al. (1996).

Estas películas de WPI se realizan desde algunos años mediante el calentamiento de soluciones acuosas de proteínas entre los 75-100°C (Krochta, 1997). Al secarse la solución a temperatura ambiente se forma la película. El tratamiento térmico es fundamental para la obtención de una película en buenas condiciones, además se le adicionan plastificantes como aditivos para inferir flexibilidad al film y corregir de esta manera su fragilidad o facilidad para quebrarse.

En resumen, las películas comestibles de WPI presentan una buena barrera al oxígeno debido a su estructura firme y compacta de puentes de hidrógeno (Mchugh, 1994). La principal aplicación de esta propiedad es que reducirá el enranciamiento oxidativo en el producto que recubra.

1.5 Recubrimientos antimicrobianos.

La contaminación microbiana reduce la vida útil de productos de alimentación y aumenta el riesgo de enfermedades alimentarias. Los métodos tradicionales para conservar los alimentos del efecto de crecimiento microbiano incluyen: proceso térmico, secado, congelación, refrigeración, irradiación, envasado en atmósfera modificada y adición de agentes antimicrobianos o sales. Desgraciadamente, algunas

de estas técnicas no se pueden aplicar a todos los productos de alimentación, como carne fresca y productos “listos para comer”.

El envasado antimicrobiano es una forma prometedora de envasado activo. El empleo de películas que contienen agentes antimicrobianos podría ser más eficiente, por la migración lenta de los agentes de material de envasado a la superficie del producto. Esto ayuda a mantenerlos a altas concentraciones donde son necesarios. Si un antimicrobiano puede ser liberado del envasado durante un periodo ampliado, la actividad también puede ser ampliada en el transporte y la fase de almacenaje de distribución de alimentos. (Quintavalla y Vicini, 2002)

Las sustancias antimicrobianas incorporadas en el envasado pueden controlar la contaminación microbiana reduciendo la tasa de crecimiento y el máximo crecimiento de la población y extendiendo la fase logarítmica del microorganismo objetivo o por inactivación de microorganismos por contacto (Jung, 2000)

1.5.1 Tipos de sustancias con propiedades antimicrobianas.

Los antimicrobianos son sustancias que pueden inhibir o detener el crecimiento de microorganismos; estos pueden ser de origen natural (animal, vegetal y microbiano) ó sintético (ácidos orgánicos y ésteres).

En las industrias alimentarias hay distintos tipos de sustancias con propiedades antimicrobianas:

➤ Aceites esenciales:

Los aceites esenciales (A.E.) son compuestos lipídicos muy olorosos obtenidos mediante la extracción de diferentes partes de plantas (flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierba, madrea, frutos, raíces, etc.) usando solventes orgánicos ó técnicas como la destilación. Estos aceites están compuestos por mezclas de ésteres,

aldehídos, cetonas, terpenos, hidrocarburos cíclicos y alcoholes. Además son compuestos muy solubles en alcohol pero poco solubles en agua.

La acción antimicrobiana de los aceites esenciales, al tener un gran número de compuestos, no se atribuye a un único mecanismo, sino a varios debido a los múltiples blancos en la célula. Una característica importante de los aceites esenciales es su hidrofobicidad, característica que les permite unirse a los lípidos de la membrana celular desestabilizando su estructura y aumentando su permeabilidad, generando la salida de iones, metabolitos y demás moléculas que pueden conllevar a la muerte. Estudios demuestran que la mayoría de las propiedades antibacterianas frente a microorganismos patógenos por parte de los A.E se debe en un alto porcentaje a los compuestos fenólicos como el timol, el carvacrol y el eugenol presentes en estos.

➤ Ácidos orgánicos y sus sales:

Es importante señalar que los ácidos ejercen sobre los microorganismos dos tipos de efectos distintos, aunque estrechamente relacionados. En primer lugar, existe un efecto antimicrobiano debido a la acidez en sí, esto es, a la bajada del pH extracelular. El segundo tipo, más importante en la práctica, es el efecto antimicrobiano específico debido a la forma no disociada.

➤ Bacteriocina:

Las bacteriocinas son producidas por diferentes bacterias y poseen diferentes modos de acción, espectros antimicrobianos y propiedades químicas. La Nisina, es la bacteriocina más conocida. La Nisina es un polipéptido de naturaleza anfifílica producido por bacterias del grupo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, capaz de inhibir el desarrollo de un amplio espectro de bacterias Gram-positivas como *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Es empleada comúnmente en la conservación de queso y se ha estudiado su actividad antimicrobiana en carnes, verduras carnes y otros productos lácteos.

La Nisina afecta a la permeabilidad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros provocando la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos (Pintado et al., 2009). Como otros agentes antimicrobianos, la nisina es más efectiva en condiciones ácidas, debido a su mayor estabilidad, solubilidad y actividad a menor pH (Pintado et al., 2009).

Los efectos inhibitorios de la nisina pueden ampliarse al grupo de bacterias Gramnegativas gracias a su combinación con agentes quelantes como EDTA o lisozima capaces de alterar la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias (Gadang et al., 2008). Se ha aplicado con éxito en películas y recubrimientos comestibles (PSI, WPI, etc.)

Existen otros antimicrobianos utilizados además de los citados anteriormente como son extractos vegetales, lisozima, lactoferrina, ovotransferrina, etc.

1.5.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales, resinas, extractos y especias son conocidos y utilizados desde la antigüedad en gran número de aplicaciones: perfumes, ambientadores, cosméticos y fármacos. Entre los siglos XVI y XVII se dan a conocer la mayor parte de los aceites esenciales de que se dispone en la actualidad. Con la llegada de la medicina moderna, la utilización de vacunas y antibióticos sustituyó a los antiguos remedios basados en aceites esenciales, aunque desde el siglo XIX su demanda creció hasta hacer necesaria la industrialización de la producción debido a su empleo masivo en perfumes y sabores para alimentación (Ortuño, 2006).

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas sintetizadas, semillas y ciertos extractos de origen animal. Son intensamente aromáticos, no grasos y volátiles. Los aceites naturales de un número importante de especies vegetales, por ejemplo de los géneros *Cytrus*, *Thimus*, *Salvia*, *Mentha*, *Rosmarinus*, *Abies*, *Pinus*, *Lavandula*, entre

otros, han sido evaluados por su capacidad antifúngica, y algunos de los componentes terpénicos responsables de esta actividad han sido identificados, entre ellos destacan el carvacrol, el p-anisaldehído, la l-carvona, el eugenol o la d-limolina. La actividad antifúngica de los aceites esenciales está ampliamente documentada por distintos autores (Reuveni et al., 1984; Deans y Ritchie, 1987; Alankararao et al., 1991; Baruah et al., 1996; Gogoi et al., 1997; Pitarokili et al., 1999; Meepagala et al., 2002). En este proyecto, los aceites que empleamos son:

❖ Carvacrol:

Carvacrol , o cymophenol , $C_6H_3CH_3(OH)$ (C_3H_7), es un monoterpenoide fenol aceite esencial de *Origanum vulgare* , el aceite de tomillo , el aceite obtenido de Rompepiedras y bergamota salvaje . El aceite esencial de tomillo subespecie contiene entre 5% y 75% de carvacrol, mientras que Satureja (salados) subespecies tienen un contenido de entre el 1% y el 45%. El *Origanum* especies majorana y Dittany de Creta son ricos en carvacrol, el 50% respectivamente. 60-80%.

Propiedades biológicas y el uso

Carvacrol inhibe el crecimiento de varias bacterias cepas, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* . Su baja toxicidad, junto con su agradable sabor y olor sugiere su uso como aditivo alimentario para prevenir la contaminación bacteriana. En *Pseudomonas aeruginosa* que ocasiona daños a la membrana celular de estas bacterias y, a diferencia de otros terpenos , inhibe la proliferación de este germen. La causa de las propiedades antimicrobianas se cree que es ruptura de la membrana de bacterias.

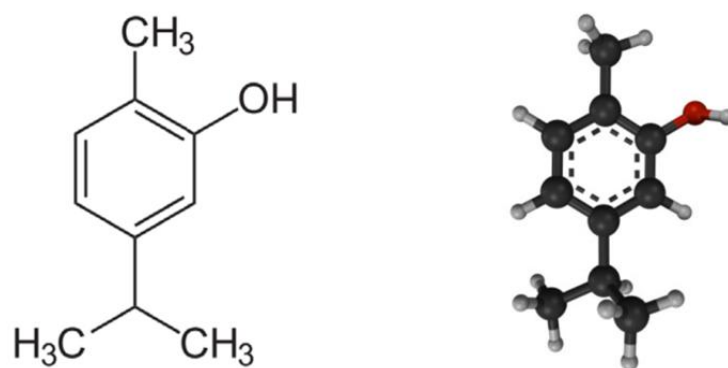


Figura 4: Estructura química Carvacrol

❖ Eugenol:

El Eugenol es un derivado fenólico conocido comúnmente como esencia de clavo con fórmula ($C_{10}H_{12}O_2$), que también puede extraerse de pimienta, hojas de laurel, canela, alcanfor y otros aceites. Es de consistencia líquida y aceitosa, de color amarillo claro y con aroma característico.

Propiedades biológicas y el uso

Eugenol además de su función antimicrobiana se utiliza en perfumería, aromas, aceites esenciales y en la medicina como un local antiséptico y anestésico. Se trata de un ingrediente clave en Indonesia kretek (clavo) cigarrillos. Fue utilizado en la producción de isoeugenol para la fabricación de vainillina, aunque la mayoría de la vainillina se produce ahora a partir de fenol o de lignina.

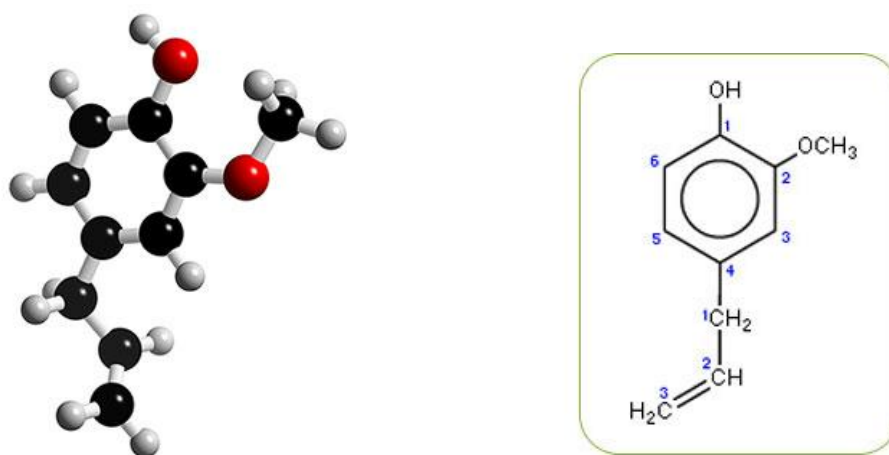


Figura 5: Estructura química Eugenol

1.6 Migración

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. Migrante potencial puede ser usado para describir a las sustancias susceptibles a una situación de migración (Katan, 1996).

Cualquier sustancia 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 (Katan, 1996b). Los migrantes pueden tener efectos en la seguridad sanitaria y toxicológica así como en las características organolépticas del producto (apariencia, sabor y olor) (Katan, 1996b, Wessling, 2000). 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 (Demertzis y Franz, 1998).

1.6.1 Evaluación de la Migración

La mayoría de los controles legislativos para plásticos en contacto con alimentos requieren evidencia como la migración o extractibilidad para determinar la posible contaminación de los alimentos y riesgos para el consumidor. La experimentación con alimentos reales en contacto con alimentos es difícil debido a varias razones, entre las principales se encuentra que los alimentos son muy complejos por lo que el análisis de cantidades traza de sustancias en éstos es analíticamente muy complicado. Debido a

esto es práctica común usar simulantes de alimentos, en vez de alimentos reales. Estos simulantes son fluidos que ejercen una acción extractiva similar a los alimentos.

Los líquidos propuestos como substratos para propósitos legislativos dentro de las Directivas de la EC 93/8/EEC y 97/48/EEC se presentan en el Cuadro 2. Estos líquidos simulan alimentos respecto a la acidez o neutralidad, naturaleza acuosa o grasa o contenido alcohólico. Los resultados de migración obtenidos con estos simulantes de alimentos dan clara información para cada clase de alimentos representados por los simulantes.

Tabla 2: Tipos de alimentos y simulantes de alimentos

Tipos de alimentos	Clasificación Convencional	Simulante de alimento	Abreviatura
Alimentos acuosos (es decir, alimentos acu-sosos que tengan un pH > 4,5).	Productos alimenticios cuyo ensayo sólo está prescrito con el simulante A.	Agua destilada o agua de calidad equivalente.	Simulante A.
Alimentos ácidos (es decir, alimentos acuosos que tengan un pH << 4,5).	Productos alimenticios cuyo ensayo sólo está prescrito con el simulante B.	Ácido acético al 3% (p/v).	Simulante B.
Alimentos alcohólicos.	Productos alimenticios cuyo ensayo sólo está prescrito con el simulante C.	Etanol al 10% (v/v). Esta concentración se ajustará a la graduación alcohólica real del alimento si es superior al 10% (v/v).	Simulante C.
Alimentos grasos.	Productos alimenticios cuyo ensayo sólo está prescrito con el simulante D.	Aceite de oliva rectificado u otros simulantes de alimentos grasos.	Simulante D.
Alimentos secos.		Ninguno.	Ninguna.

Los criterios para seleccionar un adecuado simulante de alimento para migración específica son, en orden de importancia: solubilidad similar al alimento envasado, similar coeficiente de difusión o velocidad de migración del alimento a través de la matriz plástico-alimento, similar solubilidad de los componentes plásticos en el alimento, fácil de usar, analizar y rápida disponibilidad y reproducibilidad a bajo costo.

✓ Migración Global

La determinación de la migración global consiste en evaluar la masa total de todas las sustancias que han sido transferidas del envase al alimento, por lo que se sigue un procedimiento gravimétrico. En los simulantes acuosos, el método consiste en la evaporación total del simulante tras el ensayo y la pesada del residuo resultante. En los simulantes grasos el procedimiento es más complejo, ya que no puede realizarse la

evaporación y requiere el control de la masa por diferencia de pesada del simulante antes y después del ensayo. Este proceso se completa con la extracción y posterior análisis del simulante graso absorbido por el material de envase durante el ensayo (Nerín, 2000).

✓ 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 (Nerín, 2000). 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. Aun 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 (Wessling, 2000).

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 (Choudhry, et al., 1998). Según Demertzis y Franz (1998) 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 el análisis de aditivos polares y no polares los cuales usualmente no pueden ser determinados por GC. La medición de la migración específica 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 evaluados y analizados por su importancia en el diseño de pruebas para el control de la migración global y para la protección al consumidor.

1.6.2 Legislación

En la Comunidad Europea las sustancias permitidas en envasado de alimentos están publicadas en la Directiva 90/128/CEE como una lista positiva con límites de migración específica (SML). Mediante esta Directiva se ha establecido como límite de migración global válido para todo tipo de productos 10 mg/dm² de material (o 60 mg/Kg de alimento). En cuanto a los límites de migración específica, se dan individualmente para aquellos productos en que se ha establecido, así como las cantidades máximas autorizadas para la fabricación de polímeros (listas positivas). Los procedimientos para las pruebas de migración se figuran en la Directiva 82/711/CEE (Baner et al., 1994).

En EE.UU. las reglamentaciones para aditivos alimentarios (los materiales de envasado se consideran aditivos indirectos de alimentos) respecto al envasado de alimentos, se presentan como listas positivas en el Título 21 del CFR (Code of Federal Regulations) en las partes 174-179 (Kuznesof, 2002, Baner et al., 1994). En estas regulaciones se encuentran los SML para sustancias así como límites de migración global. Las reglamentaciones establecen la identidad del aditivo y las condiciones de inocuidad para su uso. Frecuentemente, se incluyen especificaciones respecto a su identidad, pureza y propiedades físicas. Para las resinas poliméricas se especifican comúnmente los límites de todas las sustancias extraíbles de la resina o artículo acabado. Cuando se estipulan tales límites, generalmente se dan los métodos analíticos y las condiciones de tiempo/temperatura del análisis. En estas regulaciones también se señala el uso de los aditivos bajo condiciones de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) en concentraciones que no excedan lo mínimo necesario para conseguir el efecto técnico deseado.

Tabla 3: Lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios

Numero de referencia	Denominación de los productos alimenticios	Simulante que se deberán utilizar			
		A	B	C	D
03.03	Azúcares y artículos de confitería:				
	A. En forma sólida.				
	B. Miel y similares.	X			
	C. Melazas o jarabes de azúcar.	X			
04	Frutas, hortalizas y sus derivados.				
04.01	Frutas enteras, frescas o refrigeradas.				
04.02	Frutas transformadas:				
	A. Frutas secas o deshidratadas, enteras o en forma de harina o de polvo.				
	B. Frutas en trozos, o en forma de puré o de pasta.	X(a)	X(a)		
	C. Frutas en conserva (mermeladas y productos similares, frutas enteras o en trozos, en forma de harina o de polvo, conservas en un medio líquido):				
	I. En un medio acuoso.	X(a)	X(a)		
	II. En un medio oleoso.	X(a)	X(a)		X
	III. En un medio alcoholico (≥ 5 por 100 vol)		X*	X	
04.03	Frutos de cascara (cacahuete, castañas, almendras, avellanas, nueves comunes, piñones y otros):				
	A. Sin cascara, secados.				
	B. Sin cascara y tostados.				X/5***
	C. En forma de pasta o de crema.	X			X/3***
04.04	Hortalizas enteras, frescas o refrigeradas.				
04.05	Hortalizas transformadas:				
	A. Hortalizas secas o deshidratadas, enteras o en forma de harina o de polvo.				
	B. Hortalizas en trozos, o en forma de puré.	X(a)	X(a)		
	C. Hortalizas en conserva				
	I. En un medio acuoso.	X(a)	X(a)		
	II. En un medio oleoso.	X(a)	X(a)		X
	III. En un medio alcoholico (≥ 5 por 100 vol)		X*	X	
05	Grasas y aceites				
05.01	Grasas y aceites animales y vegetales, naturas o elaborados (incluidos la mantequilla de cacao, la manteca, la mantequilla fundida).				X
05.02	Margarina, mantequilla y otras materias grasas compuestas de emulsiones de agua en aceite				X/2
06	Productos animales y huevos.				
06.01	Pescados:				
	A. Frescos, refrigerados, salados, ahumados.	X			X/3***
	B. En forma de pasta, de crema.	X			X/3***
06.02	Crustaceos y moluscos (incluidos las ostras, los mejillones y los caracoles) que no estén protegidos naturalmente por su caparaz'n o su concha.	X			
06.03	Carnes de todas las especies zoologicas (incluidas las aves de corral y la caza):				X/4
	A. Frescas, refrigeradas, saladas, ahumadas.	X			X/4
	B. En forma de pasta, de crema.	X			
06.04	Productos transformados a base de carne (jamon, salchichon, bacon y otros).	X			X/4
06.05	Conservas o semiconservas de carne o de pescado				
	A. En un medio acuoso.	X(a)	X(a)		
	B. EN un medio oleoso	X(a)	X(a)		X

1.7 HPLC (CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN)

1.7.1 Introducción a la cromatografía

En 1906, el botánico Ruso M. Tswett realizó un experimento que condujo al descubrimiento de lo que hoy conocemos como cromatografía. Colocó un extracto de pigmentos vegetales en la parte superior de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio (CaCO_3). Al agregar éter, observó que la mezcla original se separaba en diversas bandas coloridas que descendían a través de la columna a diferentes velocidades.

Un rasgo característico de la cromatografía es la presencia de dos fases; dispuestas de tal manera que mientras una permanece estacionaria dentro del sistema (fase estacionaria), la otra se desplaza a lo largo de él (fase móvil).

La clave de la separación en cromatografía es que la velocidad con la que se mueve cada sustancia depende de su afinidad relativa por ambas fases (equilibrio de distribución). En el experimento de Tswett, la separación de los pigmentos vegetales se logró gracias a que cada uno de ellos tenía una afinidad diferente por las fases. En general, los componentes más afines a la fase estacionaria avanzan lentamente (más retenidos) mientras que los más afines a la fase móvil (menos retenidos) se mueven con mayor rapidez. Como consecuencia, el medio cromatográfico (columna, placa o papel) funciona como un controlador de la velocidad de cada sustancia que constituye la mezcla, logrando así su separación y mediante el uso de un detector, su caracterización química. Aunque los principios fundamentales son los mismos, se acostumbra clasificar los métodos cromatográficos según el estado físico de la fase móvil.

En una primera etapa, la cromatografía de líquidos se realizaba en columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. En este tipo de columnas realizó Tswett sus trabajos originales. Para asegurar unos caudales razonables, el diámetro de las partículas de la fase estacionaria sólida por lo general era de 150 a 200

μm . Incluso así, los caudales eran bajos, llegando a unas pocas décimas de mililitro por minuto. En consecuencia, los tiempos de separación eran largos (varias horas).

Los intentos para acelerar el procedimiento clásico mediante la aplicación de vacío, o por bombeo no resultaron efectivos, puesto que el aumento de caudal originaba un aumento de la altura de plato por encima del mínimo característico que se observa en las gráficas de la altura de plato frente al caudal y el resultado era una menor eficacia.

En las primeras etapas del desarrollo de la cromatografía de líquidos, los científicos se dieron cuenta de que se podían conseguir grandes aumentos en la eficacia de la columna disminuyendo el tamaño de las partículas de los rellenos.

Sin embargo, no fue sino hasta finales de los años sesenta cuando se desarrolló la tecnología adecuada para producir y utilizar rellenos de tamaño de partícula del orden de los 3 o 10 μm . Esta tecnología requiere una instrumentación sofisticada, que contrasta con las simples columnas de vidrio de la cromatografía de líquidos clásica. Para distinguir estos procedimientos más nuevos de los métodos básicos, que todavía se utilizan con fines preparativos, se emplea la denominación de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La cromatografía líquida de alta resolución, es en definitiva una cromatografía en fase líquida en columna a la cual se aplica una sobrepresión que permite acelerar el proceso de separación.

Su gran ventaja es la disminución del tiempo de análisis, aun incluso en mezclas muy complejas (productos biológicos). Además, permiten el análisis de sustancias termolábiles que no podrían ser manejadas por vaporización en un cromatógrafo de gases (se descomponen al vaporizarse).

En esencia, la fase móvil líquida (constituida por un disolvente adecuado que vehicula a la muestra) se bombea a través de un sistema de separación compuesto por un

prefiltro y una columna, esta última conteniendo la fase estacionaria, a una elevada presión. Por su distinta interacción entre las dos fases, la muestra es retenida con variable intensidad, eluyendo separada de la columna.

1.7.2 Partes del HPLC

Elementos que participan en una cromatografía:

1. Fase estacionaria
2. Fase móvil
3. Muestra

En general, una cromatografía se realiza permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar (muestra) interaccione con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria. Un segundo medio (la fase móvil) que es inmisible con la fase estacionaria se hace fluir a través de ésta para "lavar" (eluir) a las moléculas en la muestra.

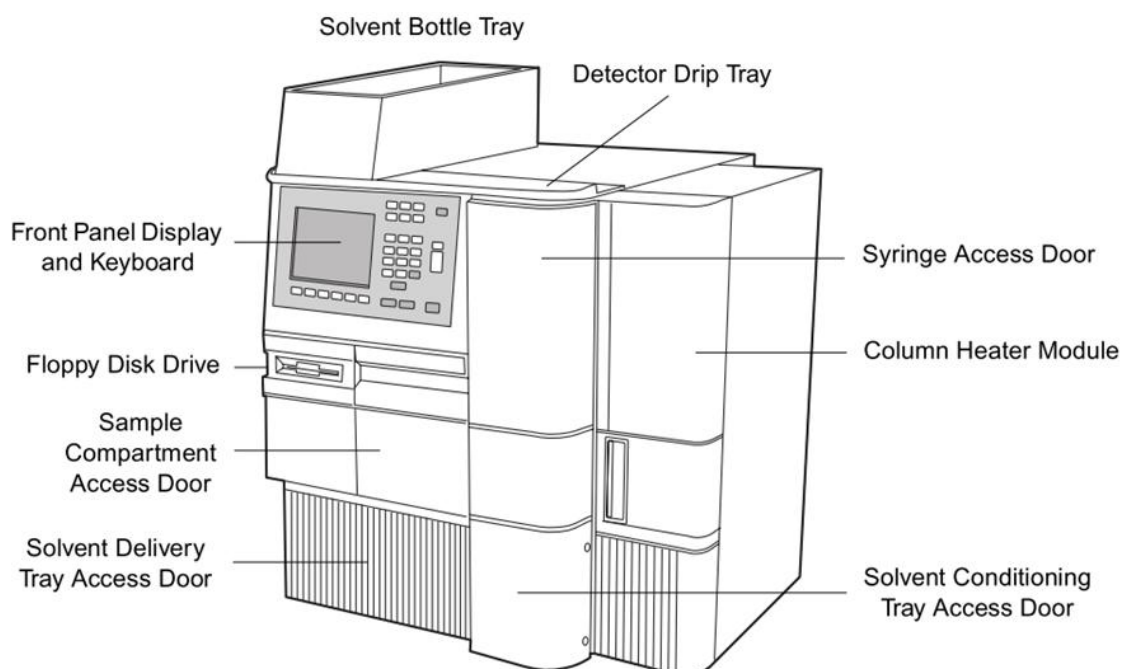


Figura 6: Partes HPLC Waters 2695

A) FASE MÓVIL

- ✓ Alta pureza (calidad HPLC).
- ✓ Inactividad frente a la fase estacionaria.
- ✓ Baja viscosidad.
- ✓ Compatibles con la muestra.
- ✓ Facilitar la recuperación de la muestra.
- ✓ Compatibilidad con el sistema de detección.

Según su composición varíe o no con el tiempo:

- ✓ Elución isocrática
- ✓ Elución en gradiente

Los disolventes deben desgasificarse antes de su uso en HPLC (La desgasificación reduce el riesgo de formación de burbujas en la columna o en el detector).

- ✓ Posibilidades:

- Desplazamiento con un gas menos soluble (He)
- Aplicación de vacío
- Sonicación
- Calentamiento

B) BOMBAS

- ✓ Presión estable hasta 5000 psi (400 atm) 1 atm = 14,696 psi
- ✓ Flujo libre de pulsaciones
- ✓ Amplio rango de flujos (0,1 a 10 mL/min)
- ✓ Control, exactitud y reproducibilidad del flujo
- ✓ Componentes químicamente inertes y resistentes a la corrosión

C) SISTEMAS DE INYECCIÓN

- Se emplean válvulas inyectoras de volumen (loop) constante
- Pueden ser manuales o automáticas
- Para variar el volumen de inyección se debe cambiar el “loop” correspondiente
- Se debe evitar la entrada de burbujas en el sistema de inyección

D) PRECOLUMNAS

- Se trata de una pequeña columna (0,5 – 3 cm) colocada entre el inyector y la columna
- Ayuda a prevenir la entrada de suciedad, procedente de la muestra o del eluyente, en la columna analítica
- Va a permitir alargar la duración de las columnas
- Debe ser del mismo relleno que el de la columna analítica

E) COLUMNAS

- Gran avance en la última década por el progreso en la tecnología de rellenos y columnas
- Rellenos más uniformes y de menor tamaño
- Fases químicamente ligadas a los soportes aumentando su eficacia y resolución
- Mejora en los métodos de empaquetado

Al disminuir el tamaño del relleno aumenta la eficiencia pero también la presión de trabajo

Las columnas constan de:

- Cuerpo –normalmente de acero inoxidable
- Relleno – material con i.d. definido

Algunas casas comerciales permiten la renovación del relleno sin tener que comprar la columna completa.

Existen columnas de compresión radial, cuyo cuerpo puede ser presurizado para aumentar su eficiencia.

F) DETECTORES

Cualquier propiedad física o química que se pueda medir en la disolución podría usarse como método de detección. Los detectores en HPLC no son destructivos.

Se pueden clasificar en:

- Detectores que miden una propiedad de la fase móvil

- Detectores que miden una propiedad de los solutos

Principales detectores empleados en HPLC:

- UV/Vis
- Fotodiodos
- Índice de refracción
- Fluorescencia
- Conductividad
- Dispersión de luz
- Espectrometría de masas

1.7.3 La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC o LC).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC o LC) es una técnica que se utiliza para separar compuestos de una mezcla o muestra en las diferentes sustancias individuales que la componen. Esta separación de compuestos ocurre cuando la muestra se introduce en una fase móvil líquida que atraviesa, con una presión elevada, una fase estacionaria, sólida y fija, denominada columna cromatográfica.

La fase móvil y la columna de un sistema cromatográfico se eligen de forma que los distintos componentes de la muestra presenten diferentes solubilidades o interacciones para cada una de ellas.

La columna contiene un determinado material cromatográfico empacado que sirve para realizar la separación de los compuestos presentes en la mezcla inicial a su paso por esta. De esta forma, un compuesto totalmente soluble en la columna tardará más tiempo en atravesarla que un compuesto poco soluble en esta fase pero muy soluble en la fase móvil.

Dependiendo de la naturaleza de los compuestos a analizar, de la fase móvil y de la columna utilizada, se describen diferentes tipos de cromatografía líquida, como la cromatografía en fase normal, fase inversa, exclusión molecular o intercambio iónico, entre otras.

Actualmente casi todos los procedimientos empleados para la determinación de compuestos antimicrobianos, utilizan la técnica LC en fase inversa. Este tipo de cromatografía es tan ampliamente empleada que a menudo se le denomina HPLC o LC sin ningún tipo de especificación adicional, y es en este modo como se va a denominar en este documento.

La técnica se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre una fase móvil de polaridad moderada, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar

Todos los sistemas cromatográficos cuentan además con un sistema de detección acoplado al sistema de separación, que identifica los compuestos eluidos de la columna y traduce la señal recibida en forma de cromatograma.

A partir del cromatograma (representación gráfica), se identifica y cuantifica el residuo o analito analizado, utilizando el tiempo de retención obtenido, el área del pico del cromatograma y en caso de existir, la comparación del espectro del compuesto con librerías existentes en el sistema o “software” empleado.

1.7.4 HPLC WATERS 2695

Módulo de separaciones e2695

La base del Sistema Alliance® HPLC es el Módulo de separaciones e2695 y sus funciones integradas de administración de eluyentes y de muestras, que garantizan un funcionamiento constante en cualquier sistema y una alta reproducibilidad.

Gestión de Eluyentes

El sistema de gestión de eluyentes del módulo desgasifica y combina hasta cuatro eluyentes cromatográficos en proporciones exactas para permitir el suministro constante de eluyente. El sistema ofrece:

- La trayectoria del flujo en serie con solo dos válvulas de retención de entrada reduce la complejidad y minimiza los periodos de inactividad

- La desgasificación por vacío usa la tecnología eficiente de membranas poliméricas de segunda generación
- La mezcla cuaternaria exacta a baja presión (primero en entrar, primero en salir) proporciona perfiles de gradiente reproducibles en todo el intervalo de caudal
- Los émbolos independientes producen un flujo de eluyentes sin pulsos sin necesidad de amortiguadores de pulsos
- Volumen de retraso del gradiente fijo (a pesar de la contrapresión del sistema) para una cromatografía constante y previsible
- El intervalo de caudales programable abarca dos órdenes de magnitud (de 50 μ L a 5 mL por minuto) sin modificaciones del hardware
- Mantenimiento de rutina de émbolos, juntas y lavado de juntas sin herramientas
- Lavado automatizado activo de las juntas del émbolo

Gestión de Muestras

Los cinco carruseles de muestras del e2695 admiten hasta 120 viales estándar. Las colas de muestras se configuran rápidamente, no importa si hay solo una muestra o una secuencia de varios métodos de diferentes analistas.

- Las inyecciones son reproducibles de uno a cientos de microlitros, y son compatibles con todas las químicas de columna de LC, a cualquier escala analítica

- Las inyecciones de volumen variable eliminan la necesidad de cambiar los bucles para los métodos analíticos
- Un ciclo programable de lavado de agujas y una solución de lavado de agujas activa (sin viales de lavado) evitan la contaminación de las muestra
- La altura programable de las agujas de inyección permite utilizar viales de distintas formas geométricas y tiene en cuenta el grosor inferior del vial
- Velocidad programable de aspiración de la jeringa para muestras y eluyentes viscosos
- Los cinco carruseles de muestras independientes permiten analizar las muestras de un carrusel mientras se prepara la siguiente secuencia en otro, y permiten añadir muestras o carruseles al sistema sin interferir en la cola de muestras
- Rutinas de muestreo para la adición automatizada de picos de referencia o procedimientos automatizados de derivatización en precolumna
- Para facilitar el mantenimiento de rutina, el lavado de las juntas inferiores y el recambio de la jeringa de inyección se llevan a cabo sin herramientas



Figura 7: Uno de los cinco carruseles. (carrusel A vial 1-24)

2 OBJETIVOS Y MODELO EXPERIMENTAL

2.1 Objetivo

El objetivo de este Trabajo de Fin Carrera es el estudio de las cinéticas de liberación de dos compuestos antimicrobianos/ antioxidantes (Carvacrol y Eugenol), desde una película de proteína aislada de suero lácteo (WPI) hacia 3 simulantes alimentarios distintos (Aceite de oliva, Agua y Solución acuosa de etanol 10% v/v).

Para llevar a cabo este objetivo fue necesario poner a punto del método de cuantificación de estos compuestos utilizando cromatografía líquida de alta precisión con un detector de lámpara de infrarrojos.

2.2 Diseño experimental

Para alcanzar el objetivo descrito en punto anterior se realizó el siguiente diseño experimental. Se estudió la migración de Eugenol y de Carvacrol en films a una concentración del 2% hacia 3 simulantes alimentarios recogidos Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. Los simulantes eran:

- Simulante A: agua destilada o agua de calidad equivalente.
- Simulante C: etanol al 10 por 100 (V/V), en solución acuosa.
- Simulante D: aceite de oliva.

Por lo tanto, el diseño experimental del trabajo de investigación quedó establecido de la siguiente manera

Tabla 4: Diseño experimental del presente PFC.

Compuesto Activo	Simulante	Tiempo de Contacto (horas)
Carvacrol	Simulante A	0
		0.5
		2
	Simulante B	8
		24
		240
Eugenol	Simulante A	0
		0.5
		2
	Simulante B	8
		24
		240

Para llevar a cabo este diseño experimental fue necesario realizar una serie de experimentación preliminar:

- *Puesta a punto del método de análisis mediante HPLC:* Se partió del método utilizado Otín Acín que nos presentó varios problemas, por lo que nos vimos obligados a un cambio de columna con la consiguiente modificación de los tiempos, el caudal y los eluyentes para obtener la separación deseada para la correcta identificación y cuantificación del Eugenol y del Carvacrol.
- *Determinación de la recta patrón:* Utilizando las variables analíticas fijadas en el punto 1, se obtuvieron las rectas patrón para cada uno de los 2 compuestos activos a partir de diluciones decimales de patrones de Eugenol y Carvacrol $\geq 98\%$ Sigma Aldrich Co. (Alemania).
- *Determinación del método de extracción total de los compuestos activos:* Se realizaron ensayos de cara a obtener el tiempo de extracción total utilizando films de WPI con Carvacrol y Eugenol con una concentración del 2%

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales

a. Materiales para la formación de los films

- Carvacrol ≥ 98 % Sigma Aldrich Co. (Alemania).
- Eugenol ≥ 98 % Sigma Aldrich Co. (Alemania).
- Glicerol. Panreac química S.A. (Barcelona, España).
- Proteína aislada de suero lácteo (WPI) Domisco.
- Pipetas Pasteur.
- Baño termostático.
- Agitadores magnéticos.
- Báscula.
- Placas Petri de vidrio.
- Vasos de precipitados.

b. Materiales empleados para el análisis en HPLC.

- Metanol HPLC Gradient grade Scharlab S.L. (Barcelona, España).
- Acetonitrilo HPLC SupraGradient grade Scharlab S.L. (Barcelona, España).
- Agua estilada grado reactivo.
- Filtros Millipore diámetro de poro 0,22 μm (Irlanda).
- Columna HPLC Li Chro-CART Lichrospher100 RP18 columna (250mm x 4mm i.d.) (5 μm) Merck (Alemania).
- HPLC Waters 2695.
- Detector infrarrojo Waters 996.
- Bomba de vacío 1,9 m³/h Vacuubrand GMBH (Alemania).
- Viales vidrio 2 ml Teknokroma (Barcelona, España).

c. Materiales empleados para la extracción.

- Aceite de oliva.
- Etanol 96 %. Panreac Química S.A. (Barcelona, España).
- Agua destilada.
- Viales plásticos 15ml.
- Jeringuillas 20ml.
- Filtros para jeringuillas Olimpeak, 0,45µm1 Teknokroma (Barcelona, España).

3.2 Métodos

3.2.1 Método para la obtención de films WPI de Carvacrol y Eugenol.

Elaboramos dos tipos de films diferentes en función del compuesto activo empleado, Carvacrol o Eugenol.

Para la realización de las películas comestibles de proteína aislada de suero lácteo (WPI) se realizó el método desarrollado por Mc Hugh et al. (1994)

Las soluciones formadoras de películas se elaboraron a partir de soluciones acuosas con un 10% (p:p) de WPI, un 5% (p/p) de glicerol como plastificante y un 2% (p/p) del compuesto activo correspondiente.



Figura 8: Pesado de componentes del film

En primer lugar se añadía la proteína (10g), luego el glicerol (5g) y por último el agua (83g), esta operación la realizábamos dos veces con el fin de añadir posteriormente en cada uno de ellos (2g) el compuesto activo correspondiente.

Posteriormente lo agitábamos en un agitador magnético hasta la completa solubilización de la proteína.



Figura 9: Soluciones formadoras de película en agitación en los agitadores magnéticos

Una vez realizada la agitación , la introducimos en un baño termostático a 90°C durante 30 minutos y con una agitación de 33 revoluciones por minuto con el fin de que la proteína se desnaturalizase y se formasen los enlaces de sulfuro necesarios para la formación del film.



Figura 10: Baño termostático empleado para la desnaturalización de la proteína WPI.

Una vez se ha desnaturalizado la proteína se dejaron enfriar las soluciones a temperatura ambiente antes de añadir el Carvacrol y Eugenol, debido a que son muy volátiles a altas temperatura y perderíamos compuesto activo. Una vez enfriado se añadió (2g) de compuesto activo a cada una de ellas.

La homogeneización se realizó mediante ultrasonidos en un equipo Hielscher UP400S a la máxima amplitud y con un ciclo continuo durante 5 min siguiendo el método de (Otín Acín, 2011).



Figura 11: Homogeneización de la solución por ultrasonidos

Debido al incremento de temperatura ocasionado por el ultrasonido colocamos el vaso de precipitados en una bandeja con hielo para evitar que este incremento calentara la solución y perdiésemos compuesto activo.

Tras el homogeneizado se procedió a dispensar las Soluciones formadoras de película en placas Petri de vidrio con un diámetro de 13,5 cm y 14,5 cm. Dispensábamos entre 14 y 14,5g en función del diámetro de la placa con el fin de obtener un espesor 160 μm en nuestros films. Estas placas se situaban sobre una placa nivelada para obtener películas de grosores homogéneos, dentro de la concavidad de las placas.

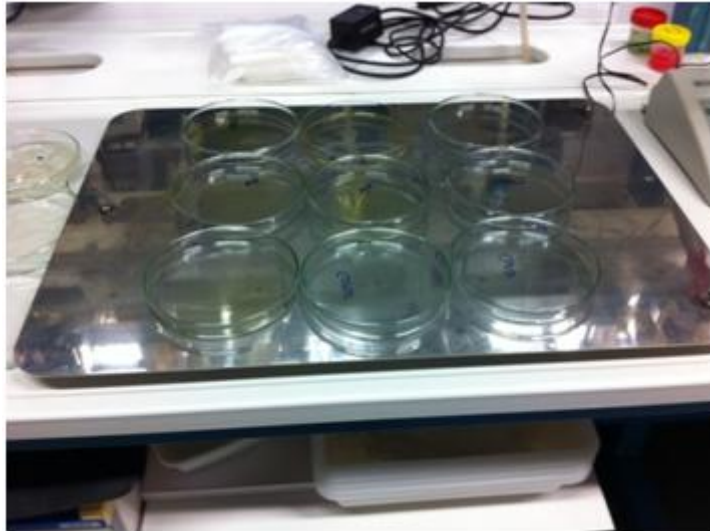


Figura 12: Placa nivelada para secado de nuestros films durante 48 horas.

El secado se realizó durante 48 horas en condiciones ambientales, siempre en torno a 25°C y 45% RH. Una vez se habían secado se despegaban de forma íntegra de las placas con ayuda de un cutter.

De cada tipo de solución y film se realizó una valoración visual resaltando aspectos tales como la facilidad para despegarlos, color, olor, presencia de burbujas, fragilidad o espesor obtenido.

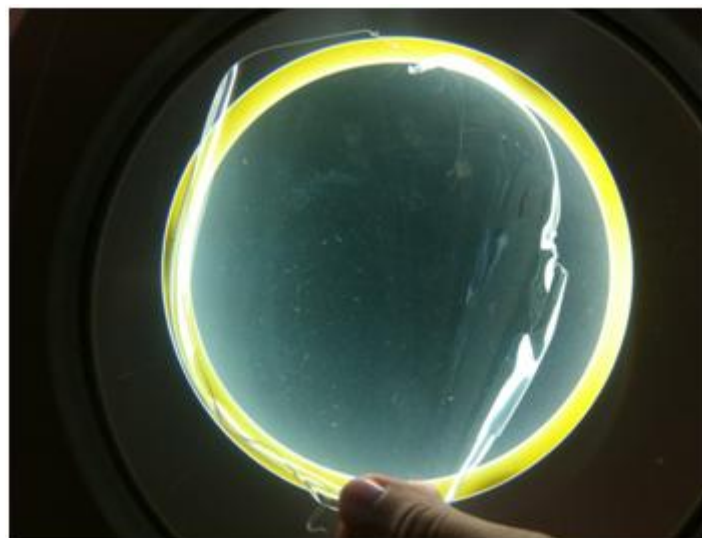


Figura 13: Film despegado y visto con lupa iluminada

El espesor se midió gracias a un micrómetro digital (modelo ID-F125, Mitutoyo Corp., Tokio, Japan) con una precisión de 1 μm , seleccionando aquellos que tuviesen un espesor 160 μm .



Figura 14: Micrómetro digital empleado para la medida del grosor .

3.2.2 Extracción de compuesto activo restante en el film.

Las propiedades de alguno de los simulantes alimentarios como el aceite de oliva hacen imposible pincharlos directamente en el HPLC puesto que nos arriesgaríamos a dañar el equipo y la columna. Por este motivo nos vemos obligados a recuperar el disco de film del simulante alimentario y realizar una extracción completa del compuesto activo restante en dicho disco.

Para realizar la extracción completa realizaremos los siguientes pasos:

En primer lugar, se determinó la cantidad total de compuesto activo presente en un disco de 17mm de diámetro mediante una extracción total en un vial de 15 ml de etanol absoluto. En segundo lugar, se realizó una extracción completa de los discos recuperados de cada simulante en cada uno de sus tiempos de contacto utilizando también 15 ml de etanol absoluto.



Figura 15: Gradilla con viales de etanol para la extracción

Así se obtenía la cantidad de etanol que difundía a cada uno de los simulantes para cada uno de los tiempos de contacto.

Para saber el tiempo en el que se producía la extracción total realizamos una serie de pruebas previas de las cinéticas de extracción de los compuestos en etanol, determinando que se producía dicha extracción total de compuesto activo a partir de los 60 minutos en agitación continua.

Tras los 60 minutos en agitación se retiraba el disco de film quedando el compuesto activo del mismo extraído en el etanol, que posteriormente se pincharía en el HPLC.

3.2.3 Medida de la difusión de compuesto activo a simulantes alimentarios.

Como hemos especificado en el apartado anterior el estudio de la migración de Eugenol y de Carvacrol se realizó en 3 simulantes alimentarios recogidos Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo. Los simulantes eran:

- Simulante A: agua destilada o agua de calidad equivalente.
- Simulante C: etanol al 10 por 100 (V/V), en solución acuosa.
- Simulante D: aceite de oliva.

Cada uno de los compuestos activos se ponía en contacto con cada simulante durante 0,5 horas, 2 horas, 8 horas, 24 horas y 240 horas (10 días), para poder evaluar la cinética de migración.



Figura 16: Herramientas para realizar discos de 17mm

De los films obtenidos se sacaron discos de 17mm de diámetro con ayuda de un sacabocados y sobre una tabla. La concavidad de las placas de vidrio hacía que la homogeneidad en el espesor de los films no fuese buena por lo que con ayuda de un micrómetro digital de 1 μm de precisión (Mitutoyo Corp, Model ID-F125, Japón) fuimos seleccionando aquellos discos que tuviesen un espeso 160 μm .

Dichos discos se colocaban en viales de 15 mililitros y en el interior de una estufa a una temperatura constante de 25°C y en continua agitación, durante el tiempo correspondiente a (0,5, 2, 8, 24 y 240 horas) de contacto.

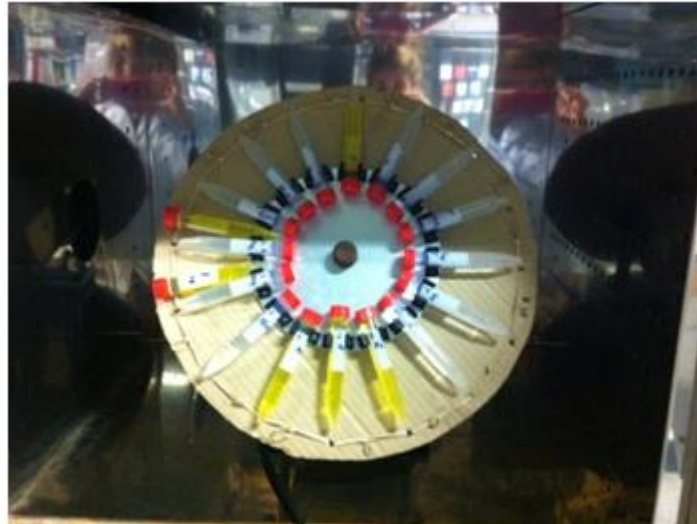


Figura 17: Discos en contacto con el simulante

Después de esto se rescataba el disco del simulante para cada tiempo y se realizaba una extracción total en etanol para determinar la concentración de compuesto activo restante en el film, es decir, lo que no había difundido al simulante correspondiente a cada tiempo de contacto específico.

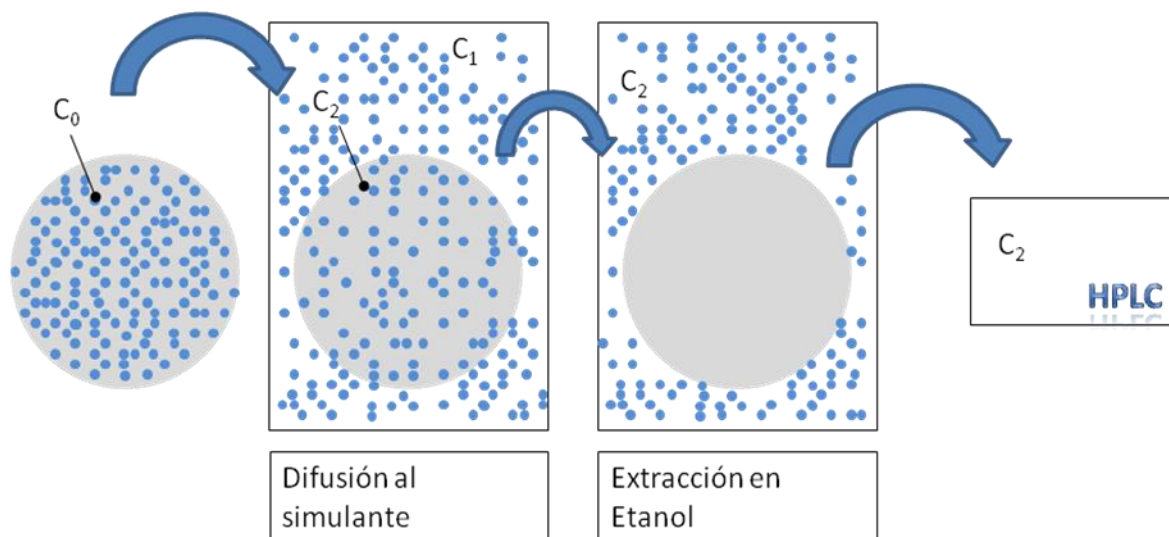


Figura 18: Diagrama de proceso de cuantificación del compuesto activo difundido

A modo de resumen, el procedimiento comenzaba con el disco de film de 17 mm de diámetro que tenía una cantidad inicial de C_0 de compuesto activo. Este disco se colocaba en contacto con el simulante correspondiente, difundiendo parte del

compuesto activo presente en el film hacia el simulante. Obtenemos así dos nuevos valores, C_1 que es la cantidad de compuesto activo que ha migrado hacia el simulante durante el tiempo de contacto correspondiente (0,5, 2, 8, 24 y 240 horas) y C_2 que es la cantidad restante en el film. Pasado el tiempo correspondiente se recuperaba el film del simulante con una cantidad de compuesto activo C_2 y se procedía a una extracción total, de tal manera que todo el contenido de compuesto activo presente en el film tras el contacto con el simulante migraba hacia el etanol. Este etanol, previo proceso de filtrado, se pinchaba en el HPLC para obtener C_2 .

$$C. \text{ activo difundido al simulante}(C_1)(g) = C. \text{ activo total}(C_0)(g) - C. \text{ activo restante en el film}(C_2)(g)$$

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con el software SPSS (Chicago, EEUU) a través del análisis de la varianza (ANOVA) para un nivel de significación del 95%. Las diferencias entre muestras se analizaron a través del test de Duncan.

4 Resultados y discusión

4.1 Caracterización de soluciones formadoras de películas y films

4.1.1 Caracterización de soluciones formadoras de película.

Una vez realizadas las soluciones se llevó a cabo un estudio visual y se comprobó que eran estables en el tiempo, observándose que no existía separación de fases incluso pasada una semana.



Figura 19: SFPs tras 24horas



Figura 20: SFPs tras 1 semana

4.1.2 Caracterización de los films de WPI

Los Films utilizados, tanto los control como los formados a partir de una solución de 2% (p/p) de Carvacrol o Eugenol, fueron continuos, transparentes, flexibles y homogéneos. Los Films se despegaron con facilidad de las placas una vez cumplido el tiempo de secado de 48 horas.



Figura 21: Film despegado de WPI

4.2 Pruebas preliminares:

Para alcanzar el objetivo del estudio de la difusión de compuesto activo al simulante son necesarias unas pruebas previas, tal y como se describió en el apartado de diseño experimental

4.2.1 Determinación de la concentración de Carvacrol y Eugenol mediante HPLC.

En primer lugar se realizaba la preparación de las muestras:

Consistía en un filtrado antes de introducirlas en el HPLC. Se filtraba el etanol absoluto que contenía el compuesto activo utilizando jeringas plásticas de 20 mililitros y filtros

Olimpeak para jeringa con un diámetro de poro de 0,45 μm . El material filtrado se vertía directamente en viales de vidrio de 2 ml para medir en el HPLC



Figura 22: Materiales empleados para filtrado

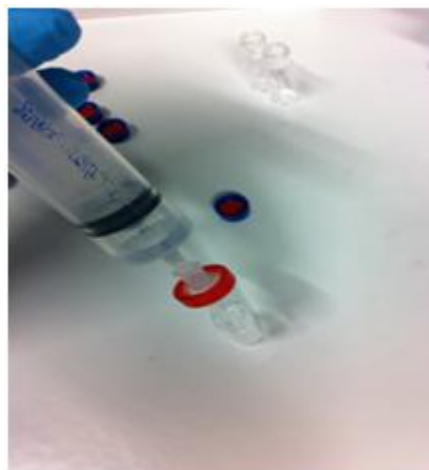


Figura 23: Filtrado

En un primer momento utilizamos el método empleado por (Otín-Acín, 2011) que tenía como referencia del método utilizado por Villa et al., 2007 para la determinación simultánea de 24 alérgenos entre los que se encontraba el Eugenol mediante HPLC. Debido a problemas de presión y variación de los tiempos de retención, que nos surgieron con la columna con la que anteriormente se habían realizado los análisis, tuvimos que tomar una serie de decisiones:

- Solvente A no circulaba, con lo que cambiamos método y trabajamos con solvente B,C Y D. Posicionando los solventes de la siguiente manera:
 - ✓ Solvente B: Acetonitrilo
 - ✓ Solvente C: Metanol
 - ✓ Solvente D : Agua tipo I filtrada
- Limpieza de columna con solventes de diferentes polaridades: para descartar una mala limpieza u obstrucción debida a las características de nuestras muestras.
- Invertimos la columna desconectando el detector: para descartar obstrucción de la Columna o Pre-Columna por partículas.
- Cambio de precolumna : por si fuese que estaba muy usada.
- Renovación de solventes
- Cambio de flujo: redujimos el flujo de 0.3ml/min a 0.2ml/min y finalmente a 0.1 ml/min puesto que al reducir el flujo, reducimos también la presión pero solo conseguimos pinchar algunas muestras y aumentaba de nuevo la presión.
- Cambio de columna de igual relleno: con el fin de comprobar si era la propia columna la que fallaba o era por cualquier otro motivo. Visto que continuaba saltando la presión llegamos a la conclusión de que no era por causa de la columna.
- Aumento de límite de presión de 4500 psi a 5000 psi para ampliar el margen antes de que saltase la alerta.

Una vez realizado lo anteriormente mencionado y sin éxito alguno la solución definitiva fue el cambio de columna de PurospherStar a LiChroCART . Tuvimos que realizar la puesta a punto del método para esta nueva columna. Pasamos de un flujo de 0.3 ml/min a 1 ml/min, y realizamos una evaluación de la máxima definición de los picos que finalizó con la decisión de que las lecturas se realizarían a 210 nm.

Como eluyentes, al igual que en el método de referencia utilizamos una combinación de acetonitrilo y agua.

A continuación, se pueden observar unas tablas donde podemos realizar una comparación entre el método de referencia y el método puesto a punto para realizar nuestras medidas.

Tabla 5: Método de referencia. (Villa et al., 2007)

Tiempo (min)	Flujo(ml/min)	Acetonitrilo(%)	Agua (%)
0	0.7	50	50
5	0.7	50	50
15	0.7	60	40
24	1	60	40
40	1	90	10

Tabla 6: Método utilizado

Tiempo (min)	Flujo(ml/min)	Acetonitrilo(%)	Agua (%)
0	1	50	50
5	1	50	50
15	1	50	50
20	1	50	50

Con este método de análisis obteníamos picos bien definidos, sin hombros. Los tiempos de retención fueron aproximadamente de 9 minutos para el Carvacrol y de 6,3 minutos para el Eugenol. Para la detección se utilizó un detector ultravioleta Waters 996 a una longitud de onda de 210nm. Acortamos el tiempo del método puesto que observamos que nuestros picos aparecían mucho antes del min 50 con lo que lo redujimos a 20 el doble del tiempo en el que el pico más retrasado salía.

4.3 Construcción de las rectas patrón

Para determinar la concentración de las muestras en función del área de los picos obtenida del HPLC, realizamos una curva patrón. Para ello se realizaron diluciones de los 2 patrones Carvacrol $\geq 98\%$ Eugenol $\geq 98\%$ de compuesto activo. Las concentraciones de las diluciones fueron de 10^0 , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} ppm para cada uno de los dos compuestos activos, pinchando cada una de ellas en el HPLC por triplicado. De esta manera se relacionaron el área de pico obtenida mediante el HPLC y la concentración existente.

En primer lugar realizamos las rectas patrón de cada uno de los compuestos activos, para poder determinar la concentración de las muestras en función del área de los picos obtenidos en el HPLC:

Para ello obtuvimos los espectros de absorción de cada uno de los compuestos con el fin de poder identificarlos a lo largo de todo el trabajo. Los espectros para el Eugenol y Carvacrol fueron respectivamente:

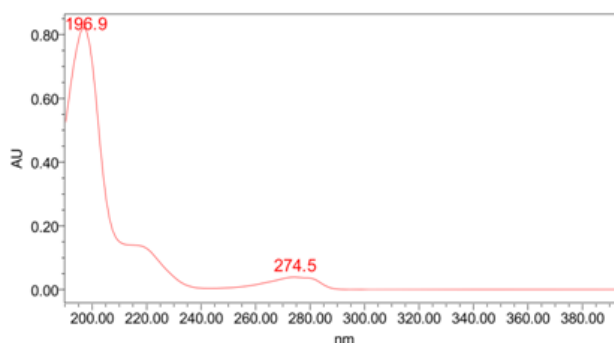


Figura 24: Espectro de absorción del Carvacrol a 210nm

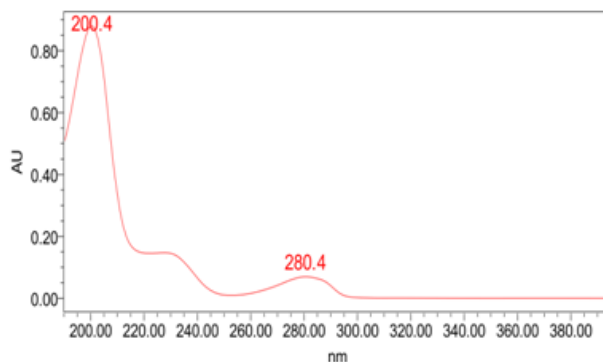


Figura 25: Espectro de absorción del Eugenol a 210nm

En segundo lugar, realizamos diluciones 10^{-0} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} ppm para cada uno de los compuestos activos y se pincharon en el HPLC por triplicado, con el fin de poder construir las rectas patrón, obteniendo así los cromatogramas siguientes:

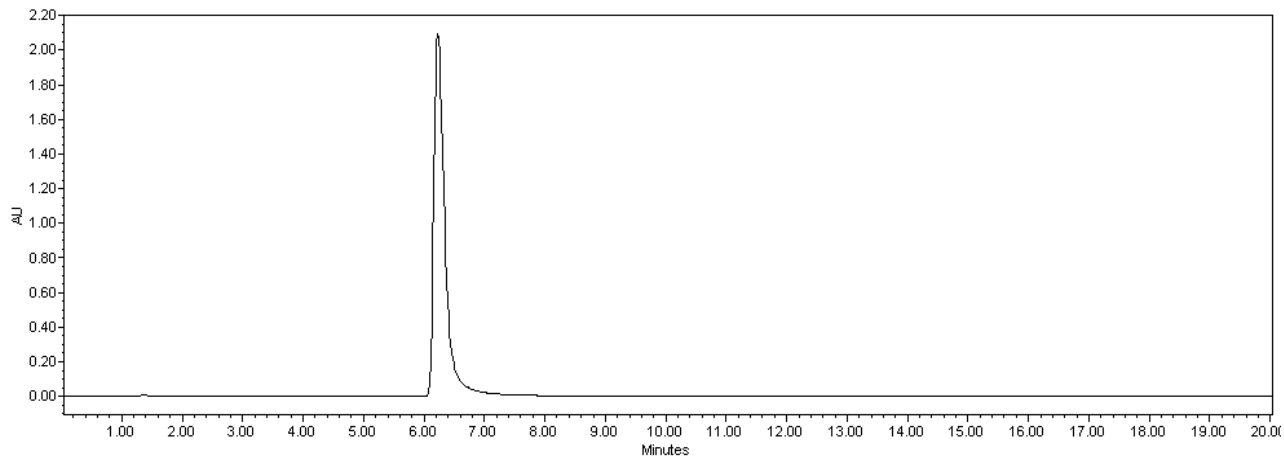


Figura 26: Cromatograma obtenido para la concentración de 10^{-3} ppm de patrón de Eugenol

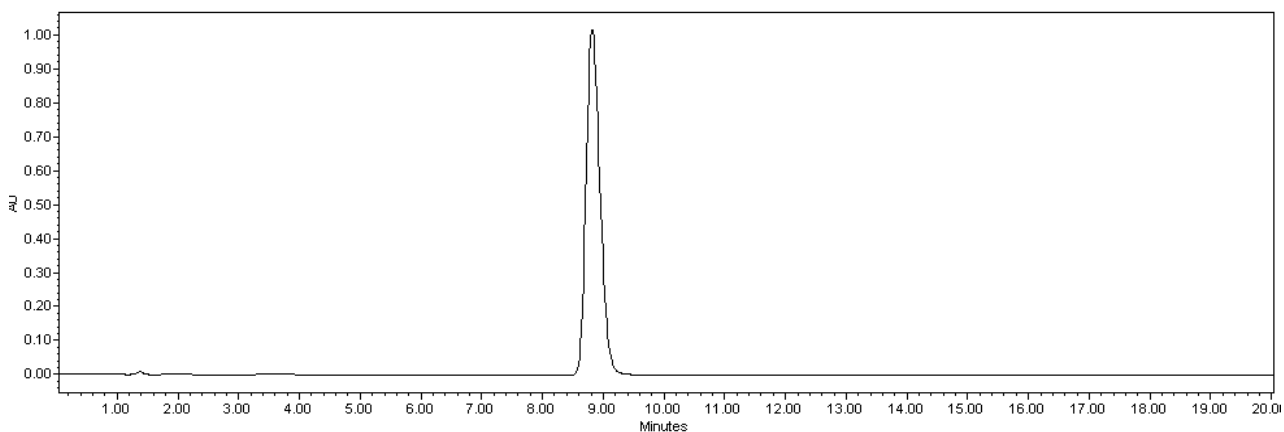


Figura 27: Cromatograma obtenido para la concentración de 10^{-3} ppm de patrón de Carvacrol

Sobre estas líneas podemos observar los cromatogramas correspondientes al Eugenol y al Carvacrol para una concentración de 10^{-3} , como podemos observar se tratan de picos muy bien definidos. Para las demás concentraciones 10^{-1} , 10^{-2} tanto para el Eugenol como para el Carvacrol los cromatogramas son muy similares solo se diferencian en las unidades de absorbancia.

Conociendo las concentraciones de las diluciones y una vez extraídos los datos de las aéreas de los picos obtenidos en el HPLC, obtuvimos los puntos necesarios para poder construir las rectas patrón de las concentraciones en función del área para cada uno de los compuestos. Las rectas patrón fueron las siguientes:

Tabla 7: Áreas obtenidas para cada una de las concentraciones de Carvacrol

	Tiempo retención (min)	Área (UA)	concentraciones(mg/l)=ppm
CARV-0	0	0	0
CARV-3	9,605	221305,8968	0,00976
CARV-2	9,615	1809308,155	0,0976
CARV-1	8,818	16016362,09	0,976

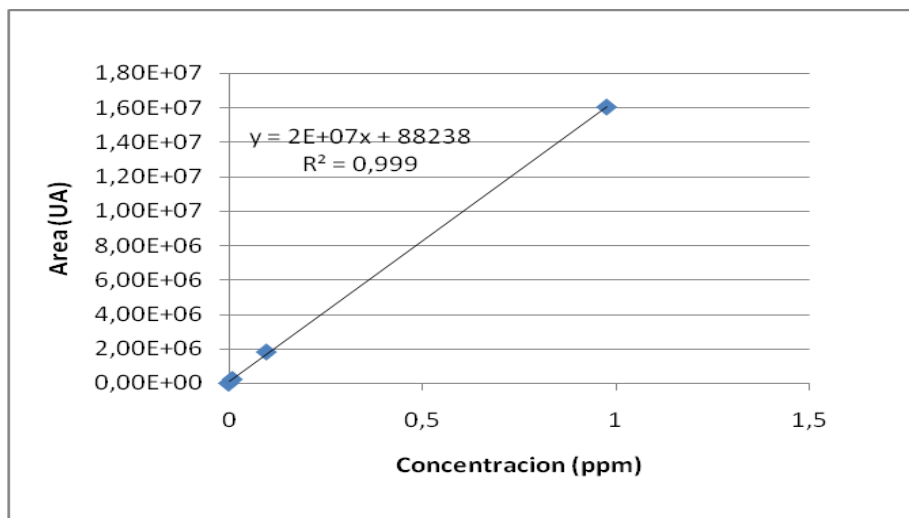


Figura 28: Recta patrón del Carvacrol a 210nm

Tabla 8: Áreas obtenidas para cada una de las concentraciones de Eugenol

	Tiempo retención (min)	Área(UA)	concentraciones(mg/l)=ppm
EUG-0	0	0	0
EUG-3	6,457	418201,89	0,00976
EUG-2	6,315	2865084,62	0,0976
EUG-1	6,231	26762418,81	0,976

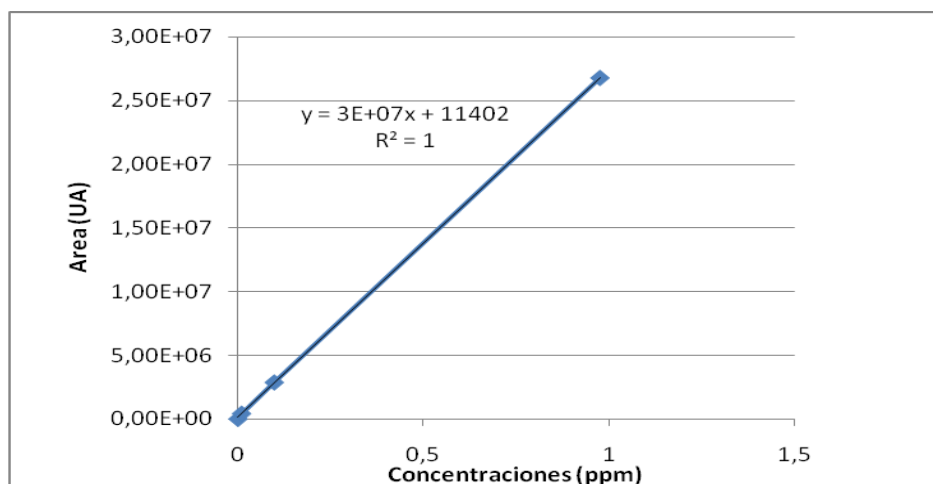


Figura 29: Recta patrón del Eugenol a 210nm

Como puede observarse en resultados obtenidos, podemos decir que los puntos se ajustan muy bien a una recta obteniendo unos coeficientes R^2 de 0.999 para el Carvacrol y de 1 para el Eugenol.

4.4 Determinación del tiempo de extracción total

Para poder realizar correctamente las extracciones en etanol de los diferentes simulantes, era necesario conocer el tiempo total de extracción, es decir, conocer el tiempo necesario de contacto entre el disco de film y el etanol para que la extracción fuera completa y que todo el compuesto activo presente en el disco migrara hasta el etanol.

Para la realización de la recta de extracción, seguimos el método desarrollado por (Otín Acín ,2011). Para ello fue necesaria la preparación de tubos de 15 ml en los que introducíamos los discos de espesor 160 y los introducíamos en la estufa a 25°C en continua agitación. Para cada uno de los compuesto activos realizamos extracciones a los (2, 4, 7, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100) por triplicado para uno de los 2 compuestos activos, compensando la pérdida de solvente con 1 ml de etanol. Obtuvimos los siguientes resultados:

Tabla 9: Concentraciones (ppm) de Carvacrol y Eugenol para cada uno de los tiempos de extracción

Compuesto	Tiempo extracción(min)	tiempo ret (min)	Área pico	concentración (ppm)
Eugenol 0	0	0	0	0
Eugenol 2	2	6,121	2242375,24	0,093
Eugenol 4	4	6,114	3315416,92	0,139
Eugenol 7	7	6,058	4684485,15	0,181
Eugenol 10	10	6,036	5559293,84	0,199
Eugenol 20	20	6,086	6774736,32	0,221
Eugenol 30	30	6,225	6649198,04	0,211
Eugenol 40	40	5,953	6062801,19	0,197
Eugenol 60	60	5,349	5333734,37	0,186
Eugenol 80	80	5,935	5247747,04	0,171
Eugenol 100	100	5,407	4818456,88	0,163

Compuesto	Tiempo extracción(min)	Tiempo ret (min)	Área pico	concentración (ppm)
Carvacrol 0	0	0	0	0
Carvacrol 2	2	8,959	1950300,13	0,0743
Carvacrol 4	4	9,291	2872780,57	0,110
Carvacrol 7	7	9,412	3716074,15	0,155
Carvacrol 10	10	9,500	4084394,10	0,184
Carvacrol 20	20	8,958	4509667,17	0,225
Carvacrol 30	30	9,365	4317562,46	0,221
Carvacrol 40	40	8,964	4030364,25	0,201
Carvacrol 60	60	9,401	3819803,01	0,177
Carvacrol 80	80	9,280	3522921,57	0,174
Carvacrol 100	100	8,6490	3349949,92	0,160

Al realizar la compensación se producía una dilución en la solución con lo que se hacía necesario modificar las concentraciones obtenidas para cada una de las extracciones, teniendo en cuenta para cada uno de los tiempos la cantidad de compuesto activo que se había retirado en las extracciones anterior. Para ello se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_{nr} = \frac{C_n * 15 + \sum_{x=1}^{x=n-1} 1 * C_x}{15}$$

Donde:

C_{nr} = concentración real en el minuto n.

C_n = Concentración medida en el tiempo n.

De esta manera se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 10: Datos de extracción del Carvacrol y Eugenol

Compuesto	Tiempo extracción(min)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	tiempo ret (min)	Área pico	concentración (ppm)	desviación	concentración compensada
Carvacrol 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Carvacrol 2	2	0,092	0,091	0,096	8,959	1950300,14	0,093	0,002	0,093
Carvacrol 4	4	0,135	0,138	0,142	9,291	2872780,58	0,139	0,003	0,145
Carvacrol 7	7	0,178	0,177	0,188	9,412	3716074,15	0,181	0,006	0,196
Carvacrol 10	10	0,201	0,196	0,201	9,500	4084394,1	0,199	0,003	0,227
Carvacrol 20	20	0,235	0,216	0,211	8,958	4509667,17	0,221	0,012	0,261
Carvacrol 30	30	0,228	0,206	0,199	9,365	4317562,46	0,211	0,015	0,267
Carvacrol 40	40	0,212	0,194	0,184	8,964	4030364,26	0,197	0,014	0,266
Carvacrol 60	60	0,201	0,181	0,176	9,401	3819803,02	0,186	0,013	0,269
Carvacrol 80	80	0,184	0,1681	0,162	9,280	3522921,57	0,171	0,011	0,267
Carvacrol 100	100	0,172	0,160	0,156	8,649	3349949,93	0,163	0,008	0,269
Eugenol 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eugenol 2	2	0,081	0,074	0,066	6,121	2242375,24	0,074	0,007	0,074
Eugenol 4	4	0,106	0,114	0,108	6,114	3315416,92	0,110	0,004	0,115
Eugenol 7	7	0,150	0,169	0,147	6,058	4684485,16	0,155	0,011	0,168
Eugenol 10	10	0,177	0,194	0,182	6,036	5559293,84	0,184	0,008	0,207
Eugenol 20	20	0,219	0,234	0,223	6,086	6774736,32	0,225	0,007	0,260
Eugenol 30	30	0,214	0,230	0,219	6,225	6649198,05	0,221	0,00	0,269
Eugenol 40	40	0,198	0,205	0,200	5,953	6062801,19	0,201	0,003	0,266
Eugenol 60	60	0,181	0,182	0,167	5,349	5333734,38	0,177	0,008	0,255
Eugenol 80	80	0,169	0,174	0,179	5,935	5247747,04	0,174	0,004	0,264
Eugenol 100	100	0,156	0,158	0,165	5,407	4818456,89	0,160	0,004	0,261

A continuación podemos observar los gráficos correspondientes a los datos de extracción del Carvacrol y del Eugenol:

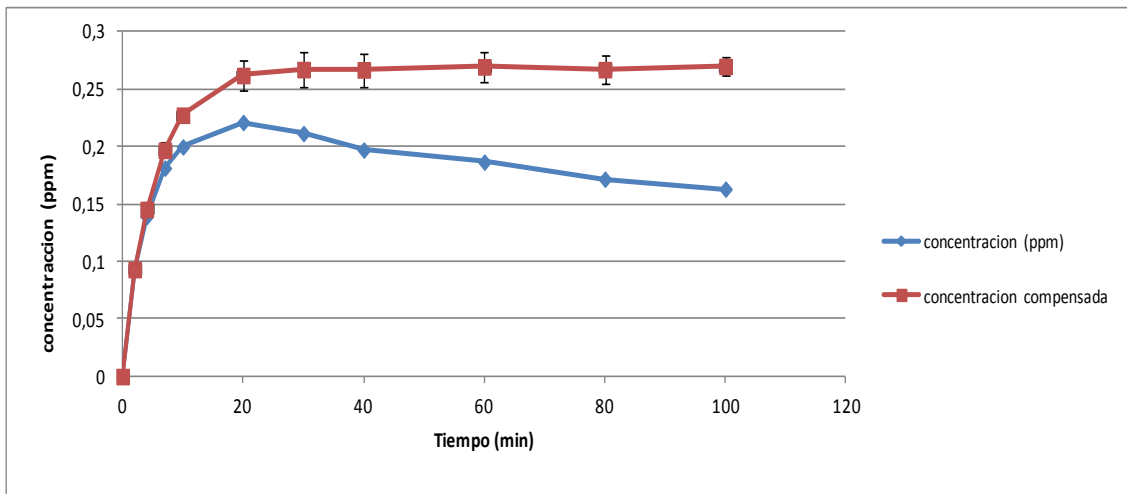


Figura 30: Extracción del Carvacrol con y sin compensación

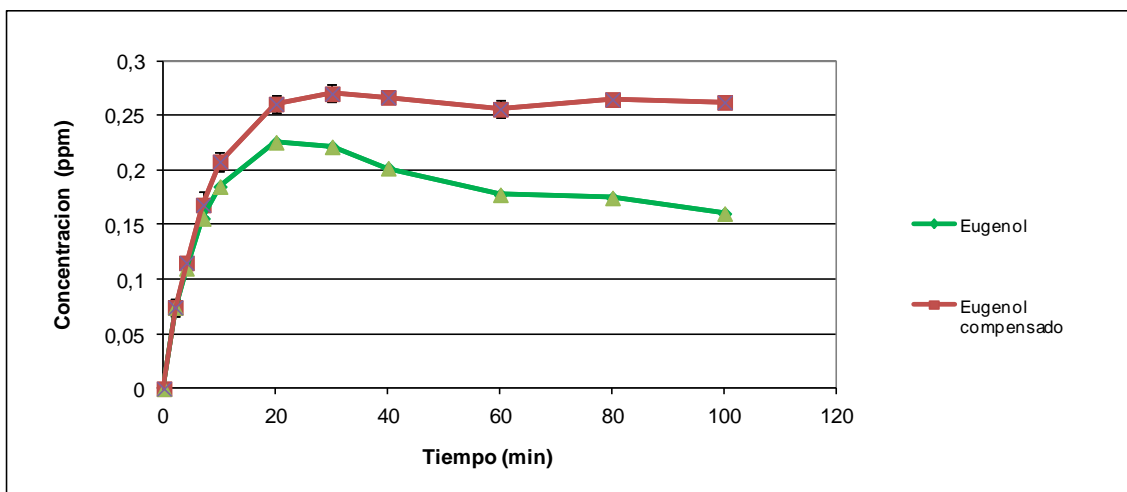


Figura 31: Extracción del Eugenol con y sin compensación

Como podemos observar en los gráficos anteriores la dinámica de extracción del Eugenol y del Carvacrol son muy similares. En ambos casos podemos destacar un incremento importante desde el momento inicial hasta llegar al minuto 20, una vez alcanzado este se estabiliza.

Además, sabemos que alrededor de los 60min de extracción se produce la extracción completa, tiempo que utilizaremos para las extracciones después del contacto con el simulante. De estos valores extraemos también la concentración inicial máxima C_0 para cada uno de los dos compuestos activos en un disco de film de 17mm que utilizaremos después para la construcción de las gráficas.

Tabla 11: Concentraciones máximas (ppm)

Concentración máxima Carvacrol
0,269456507
Concentración máxima Eugenol
0,255652174

4.5 Difusión de compuestos activos de los films de WPI al simulante alimentario

Para el estudio de la cinética de migración se utilizaron tres simulantes alimentarios, aceite, agua y 10% de etanol (v/v), en solución acuosa. Los tiempos de contacto de los simulantes con los discos de films fueron de 0,5, 2, 8, 24 y 240 horas. Tras la extracción en etanol absoluto durante 60 minutos y pinchar el HPLC obtenemos los siguientes resultados de concentraciones utilizando la recta patrón descrita en el apartado 4.1. Las tablas que podemos observar a continuación nos facilitan los datos de las concentraciones en ppm de compuesto activo que no ha difundido del film al alimento.

Tabla 12: Medias de las concentraciones de Carvacrol (ppm) obtenidas para los distintos simulantes y los diferentes tiempos de extracción

Tiempo (horas)	Aceite(ppm)	10%Etanol (ppm)	Agua (ppm)
0	0,269	0,269	0,269
0,5	0,242	0,123	0,137
2	0,239	0,034	0,004
8	0,142	0,027	0,030
24	0,214	0,032	0,037
240	0,008	0,025	0,020

Tabla 13: Medias de las concentraciones de Eugenol (ppm) obtenidas para los distintos simulantes y los diferentes tiempos de extracción

Tiempo (horas)	Aceite(ppm)	10%Etanol (ppm)	Agua (ppm)
0	0,255	0,255	0,255
0,5	0,273	0,067	0,072
2	0,221	0,011	0
8	0,175	0,021	0,023
24	0,148	0,021	0,021
240	0,002	0,011	0,011

Estos datos en bruto nos dan los siguientes gráficos si representamos para cada uno de los simulantes la variación de la concentración de compuesto activo extraído del film tras el contacto con el simulante, o lo que es lo mismo la cantidad de film que no ha difundido al alimento, a lo largo del tiempo de contacto.

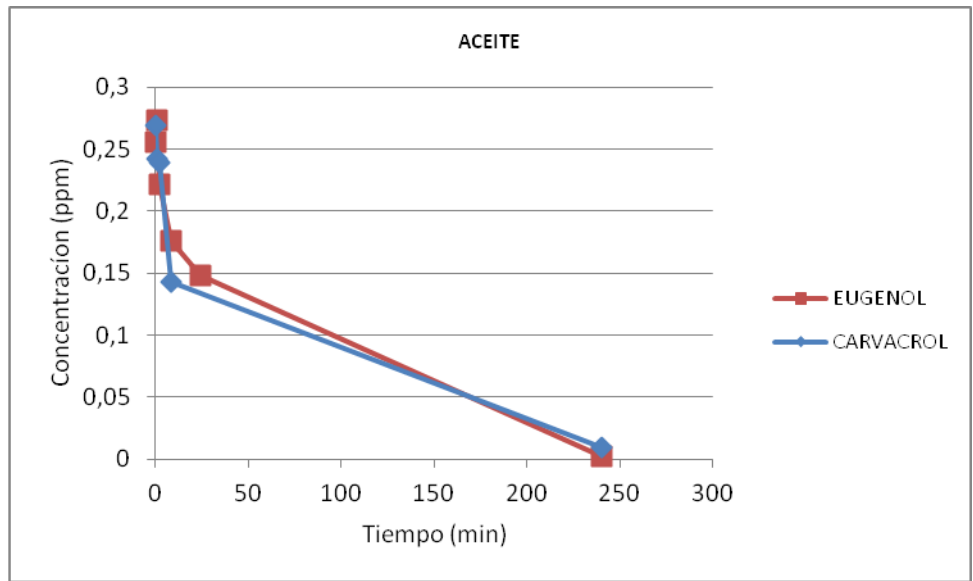


Figura 32: Concentración de C. activo no difundido del film al aceite en función del tiempo de contacto

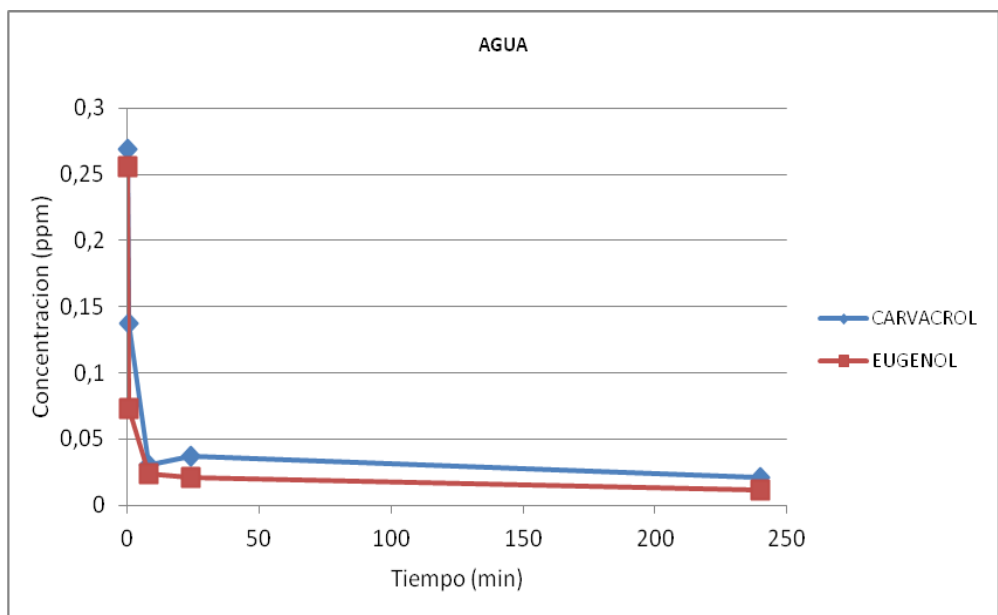


Figura 33: Concentración de C. activo no difundido del film a la solución acuosa 10% de etanol (v/v) en función del tiempo de contacto

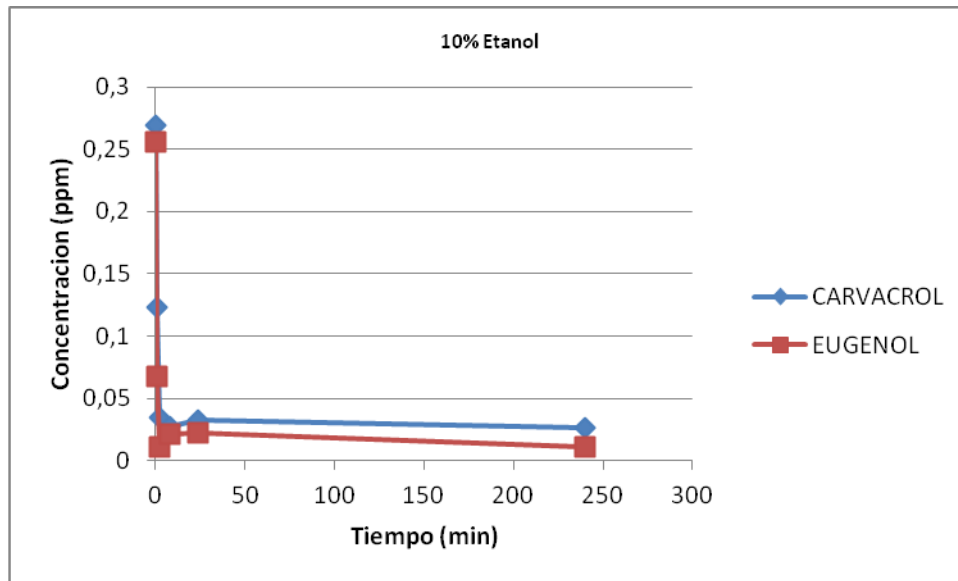


Figura 34: Concentración de C. activo no difundido del film al agua en función del tiempo de contacto

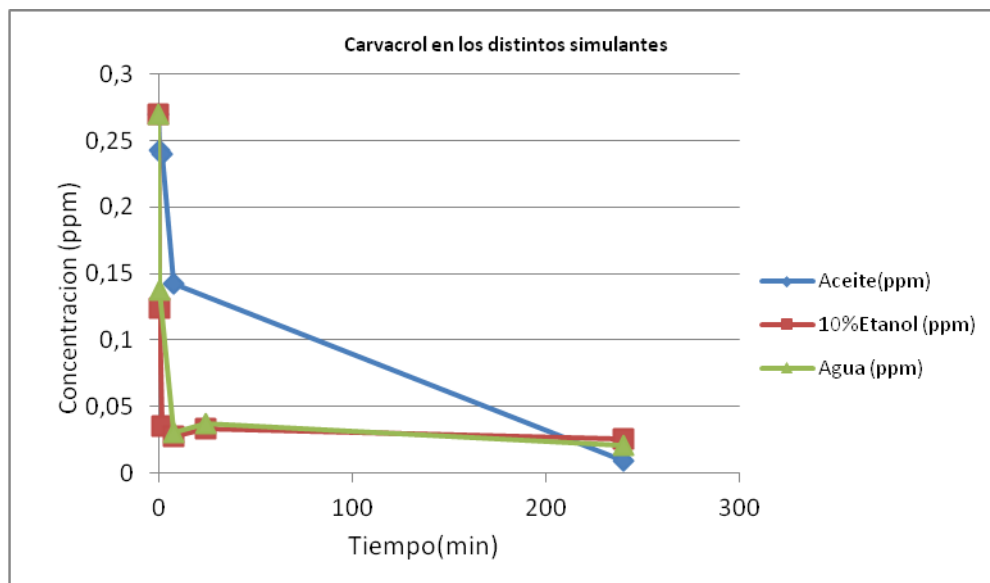


Figura 35: Concentración de Carvacrol no difundido del film a los distintos simulantes en función del tiempo de contacto

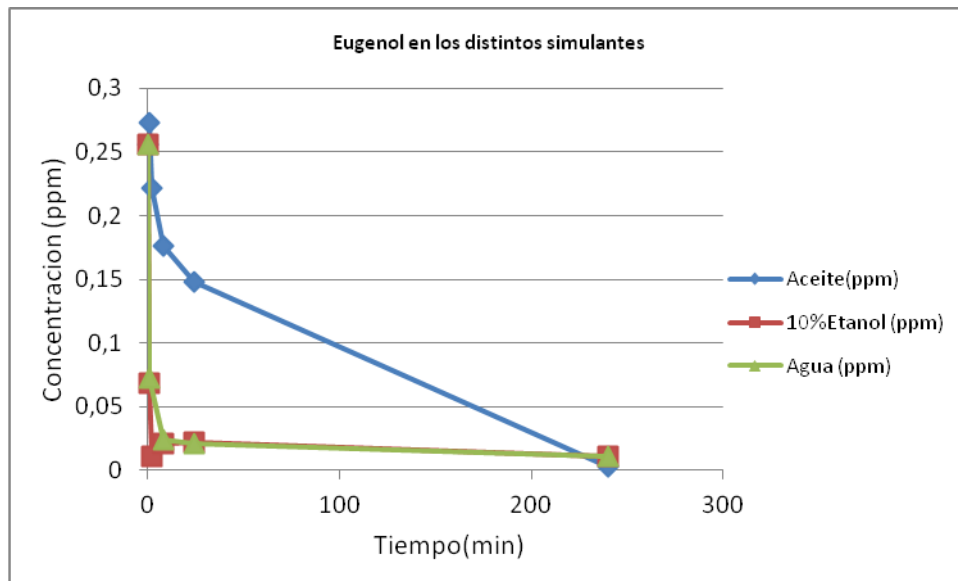


Figura 36: Concentración de Eugenol no difundido del film a los distintos simulantes en función del tiempo de contacto

Normalmente se habla de control de la difusión, por lo que será más fácil si nos referimos al porcentaje total de compuesto liberado desde el film al alimento. Para ello transformaremos el dato de concentración en partes por millón utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de compuesto activo liberado} = \frac{C_0 - C}{C_0} * 100$$

Donde C_0 es la concentración máxima en ppm obtenida en los ensayos de extracción total descritos anteriormente para cada uno de los compuestos activos; C es la concentración en ppm, obtenida al introducir el área en la recta patrón para cada una de los simulantes y tiempos de contacto. Teniendo en cuenta que los valores de C_0 para el Carvacrol y el Eugenol son 0,2694 y 0,2556 respectivamente obtenemos los valores recogidos en las siguientes tablas:

Tabla 14: Porcentaje de Carvacrol del total contenido en el film difundido a los distintos simulantes para cada uno de los tiempos de contacto

Tiempo(horas) Carvacrol	Aceite (%)	10%Etanol (%)	Agua (%)
0	0	0	0
0,5	10,07	54,10	49,12
2	11,12	87,06	98,31
8	47,15	89,82	88,57
24	20,41	87,81	86,15
240	96,68	90,39	92,29

Tabla 15: Porcentaje de Eugenol del total contenido en el film difundido a los distintos simulantes para cada uno de los tiempos de contacto

Tiempo(horas) Eugenol	Aceite (%)	10%Etanol (%)	Agua (%)
0	0	0	0
0,5	0	73,45	71,51
2	13,45	95,59	100
8	31,17	91,66	90,75
24	42,04	91,46	91,62
240	99,05	95,58	95,67

Para poder comparar de una manera más visual las tablas, representamos el porcentaje de compuesto activo liberado frente a los tiempos de contacto para cada uno de los simulantes obteniendo así los siguientes gráficos. Se presentan la evolución a lo largo de las 240 horas totales con el simulante, y el detalle de las primeras 24 horas de contacto puesto que es en las primeras 24 horas donde se aprecia una mayor difusión.

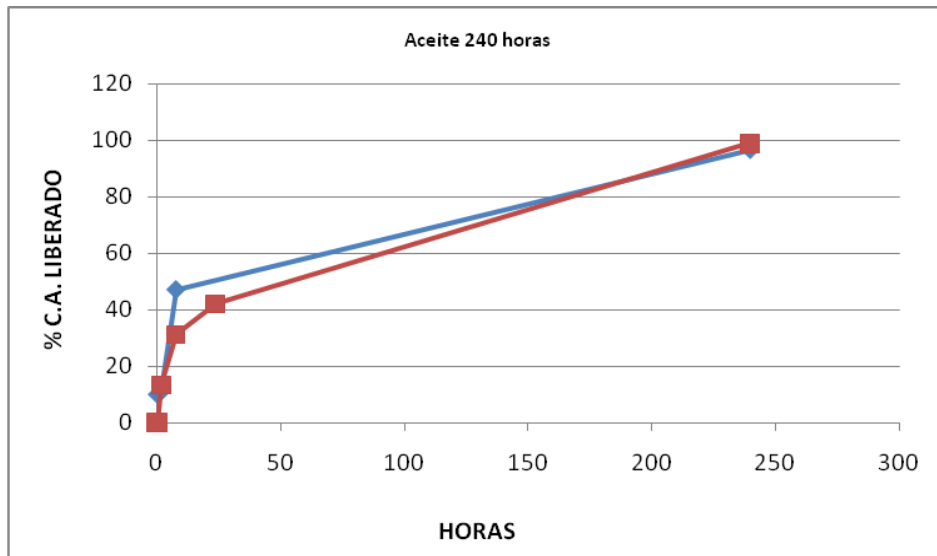


Figura 37: Evolución del porcentaje % de compuesto activo liberado al aceite a lo largo de 240 horas de contacto

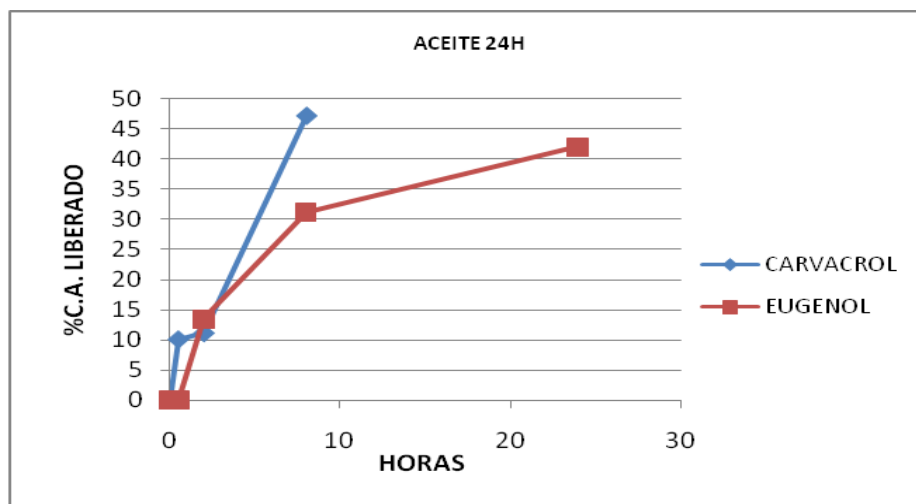


Figura 38: Evolución del porcentaje % de compuesto activo liberado al aceite a lo largo de 24 horas de contacto

Podemos observar que en contacto con el aceite el Carvacrol y el Eugenol difunden despacio hacia el simulante, ya que difunden un 10 % del total de compuesto pasada media hora de contacto tanto en el caso del Carvacrol como en el Eugenol. A partir de este punto el Carvacrol difunde a mayor velocidad en el simulante, alcanzando casi el 50% del total de compuesto activo a partir de las 8 horas de contacto a diferencia del Eugenol con un 30 %.

A partir de las 24 horas, observamos la misma pendiente en los 2 films, lo que nos dice que la dinámica de difusión muy similar en los 2 componentes llegando a los 10 días a una liberación del 99% y un 96% del total de compuesto activo para el Eugenol y el Carvacrol respectivamente.

Para el caso del Etanol 10% obtendríamos las siguientes graficas:

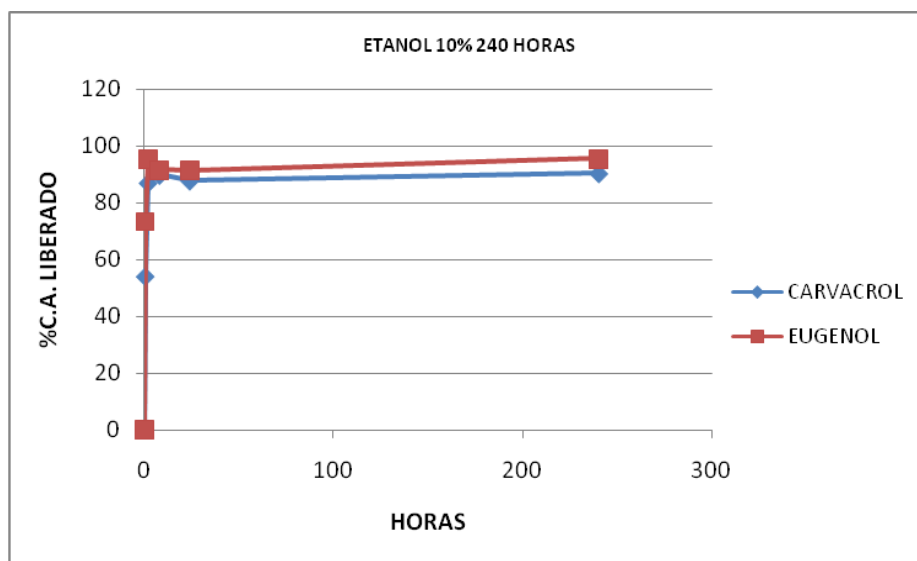


Figura 39: Evolución del % de compuesto activo liberado a la solución acuosa de 10% etanol (v/v) a lo largo de 240 horas de contacto

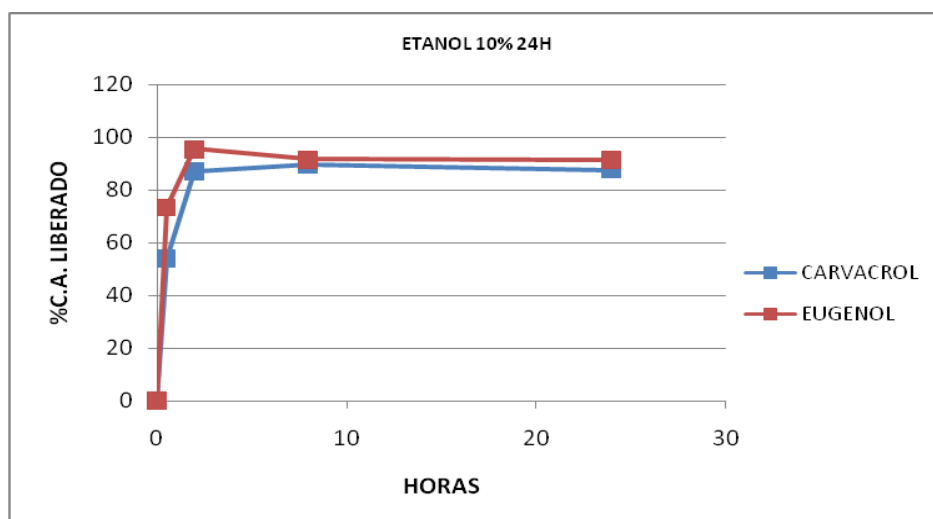


Figura 40: Evolución del % de compuesto activo liberado a la solución acuosa de 10% etanol (v/v) a lo largo de 24 horas de contacto

En el caso del simulante de solución acuosa de etanol 10% (v/v), observamos que tanto para el caso del Carvacrol como del Eugenol la difusión es mucho más rápida en el caso del aceite, alcanzándose valores por encima del 50 % del total del compuesto activo liberado pasadas 0.5 horas tanto para el Carvacrol como en el Eugenol, aunque contrariamente a el caso anterior difunde más rápido el Eugenol que el Carvacrol 73% y 54% respectivamente. A partir de las dos horas los valores de difusión se igualan y

prácticamente la totalidad del compuesto activo ha migrado al simulante, en torno al 90 % en ambos casos. A partir de las dos horas los valores difusión de ambos compuestos activos se mantienen constantes en el tiempo hasta los 10 días.

En el caso del agua podemos observar los siguientes resultados:

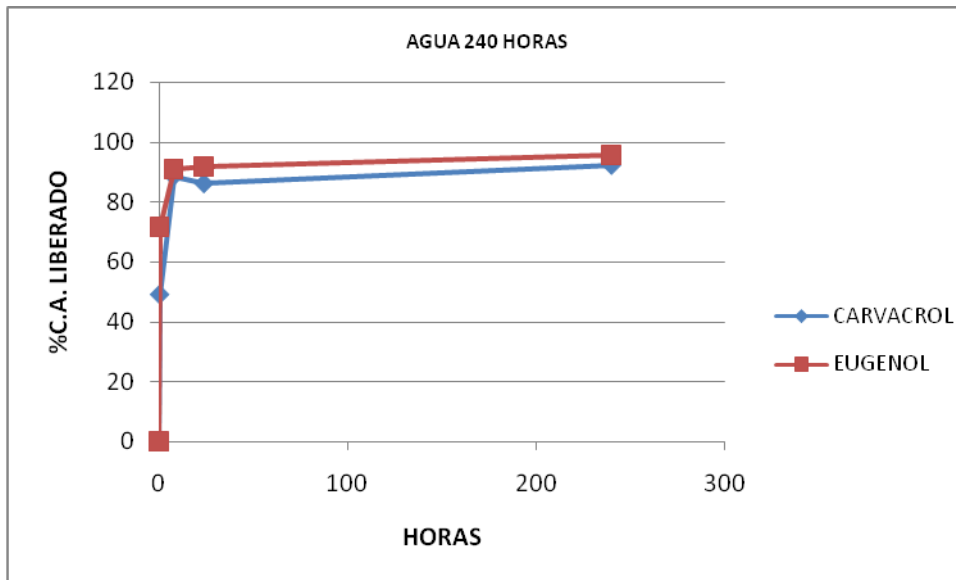


Figura 41: Evolución del % de compuesto activo liberado al agua a lo largo de 240 horas de contacto

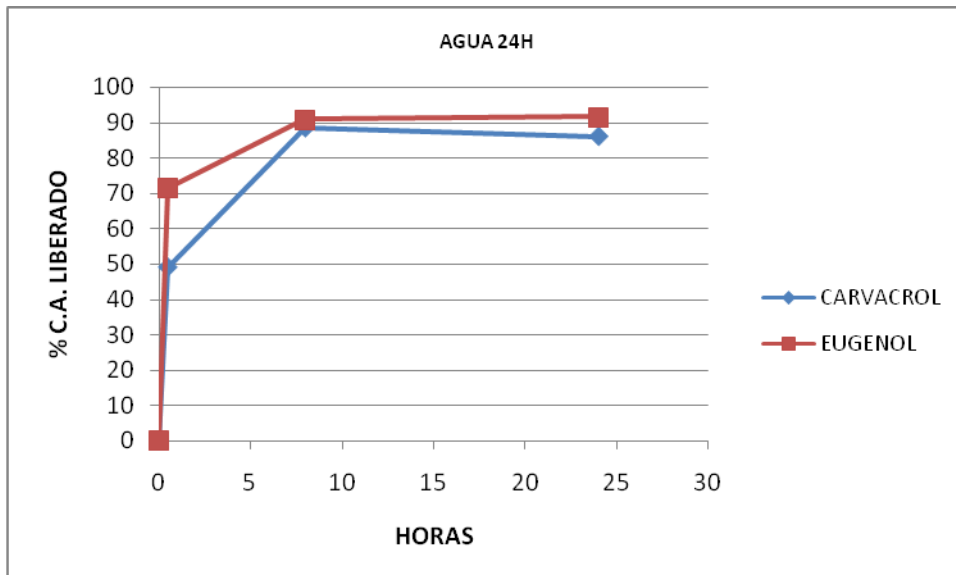


Figura 42: Evolución del % de compuesto activo liberado al agua a lo largo de 24 horas de contacto

Para el caso del agua como simulante alimentario vemos que el comportamiento tanto del Carvacrol como del Eugenol es muy similar al de la solución acuosa de etanol 10% (v/v).

La difusión del compuesto activo al simulante es muy rápida también, pudiéndose observar también que la liberación del Eugenol es más rápida que la del Carvacrol, 49% y 71 % respectivamente.

A las 2 horas de contacto con el simulante, ambos compuestos han difundido al film casi en su totalidad, la totalidad en caso del Eugenol 100% y el 98% en el caso del Carvacrol, manteniéndose ambos en torno al 88-95 % hasta los 10 días de exposición.

Conclusiones:

De lo expuesto anteriormente, se extrae que la difusión del compuesto activo es mucho más rápida en los simulantes polares, solución acuosa de etanol 10% (v/v) y agua, que en el aceite apolar, aunque se consiguen valores mayores de extracción en este último llegándose en el caso del Eugenol hasta el 99%.

También se observa que el Eugenol difunde mas rapido que el Carvacrol en el caso de los simulantes polares, igualándose las concentraciones a partir de las 2 horas. Sin embargo en el aceite (apolar) es el Carvacrol el que difunde mas rapidamente en un primer momento aunque pasados los diez dias es el Eugenol el que obtiene un porcentaje mayor 99% frente al 96% de Carvacrol.

Se observó que al retirar los discos de film de los distintos simulantes, los que habían estado en contacto con los simulantes acuosos aumentaban su tamaño multiplicándolo por 3 (17mm→52mm). Esto podría abrir los huecos presentes en la matriz proteica del film facilitando el arrastre de los compuestos activos por el simulante a pesar de las características apolares de los aceites esenciales. La extracción es más lenta en el caso del aceite, igualándose o incluso superándose en el caso del Carvacrol, la difusión a los 10 días de contacto con el simulante.

A continuación presentamos los gráficos de barras que representan para cada uno de los tiempos de extracción, las diferencias del compuesto activo liberado para cada uno de los simulantes alimentarios y para cada uno de los distintos compuestos activos.

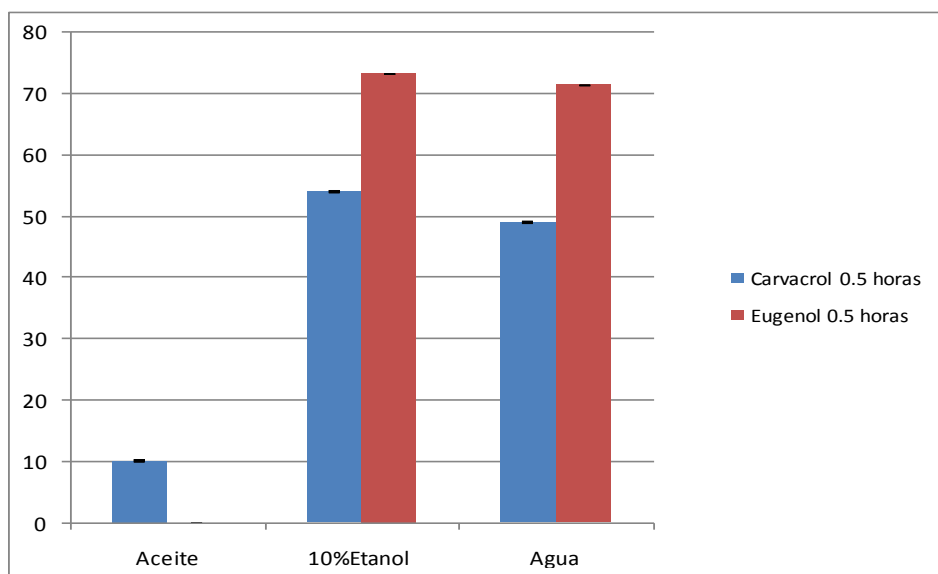


Figura 43: % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 0,5 horas de contacto

En primer lugar, podemos observar que, pasada media hora, tanto el Eugenol como el Carvacrol difunden mucho más rápido del film a los disolventes polares que al aceite.

En segundo lugar, podemos observar que, en el caso del aceite, es el Carvacrol el que tiene una mayor difusión alcanzando un 10% y que sin embargo el Eugenol no difunde apenas. Al contrario ocurre en los disolventes polares, solución acuosa de etanol 10% (v/v) y agua en los que la difusión es mucho más rápida alcanzando valores en torno al 50% en el caso del Carvacrol y superando el 70 % en el caso del Eugenol.

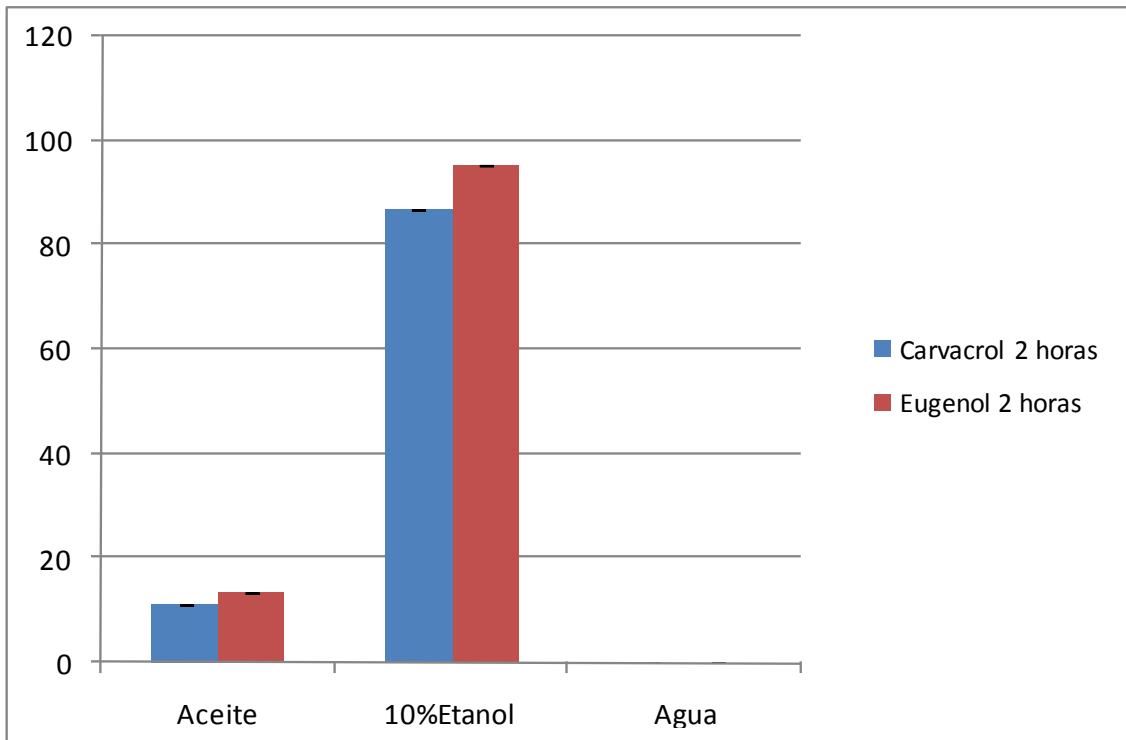


Figura 44: % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 2 horas de contacto

Una vez alcanzadas las 2 horas de contacto podemos destacar que al igual que como ocurre pasada media hora, tanto el Carvacrol como el Eugenol, difunden mucho menos en el aceite que en los compuestos polares. Como podemos observar en el caso del agua no apreciamos valores puesto que nos hemos visto obligados a eliminarlos, ya que nos daban valores que no se correspondían con los valores que deberíamos haber obtenido en base a otros estudios similares. Esto es debido a que el HPLC no estaba en sus condiciones óptimas y nos fue imposible volver a repetirlos.

En el caso del aceite se alcanzan valores superiores al 10% mientras que el caso de la solución acuosa se alcanzan valores muy cercanos al 90%, lo que indica que casi la totalidad del compuesto activo ha difundido al simulante alimentario.

Cabe destacar que, al contrario de cómo ocurre en 0,5 horas, es el Eugenol el que difunde más cantidad en los dos simulantes.

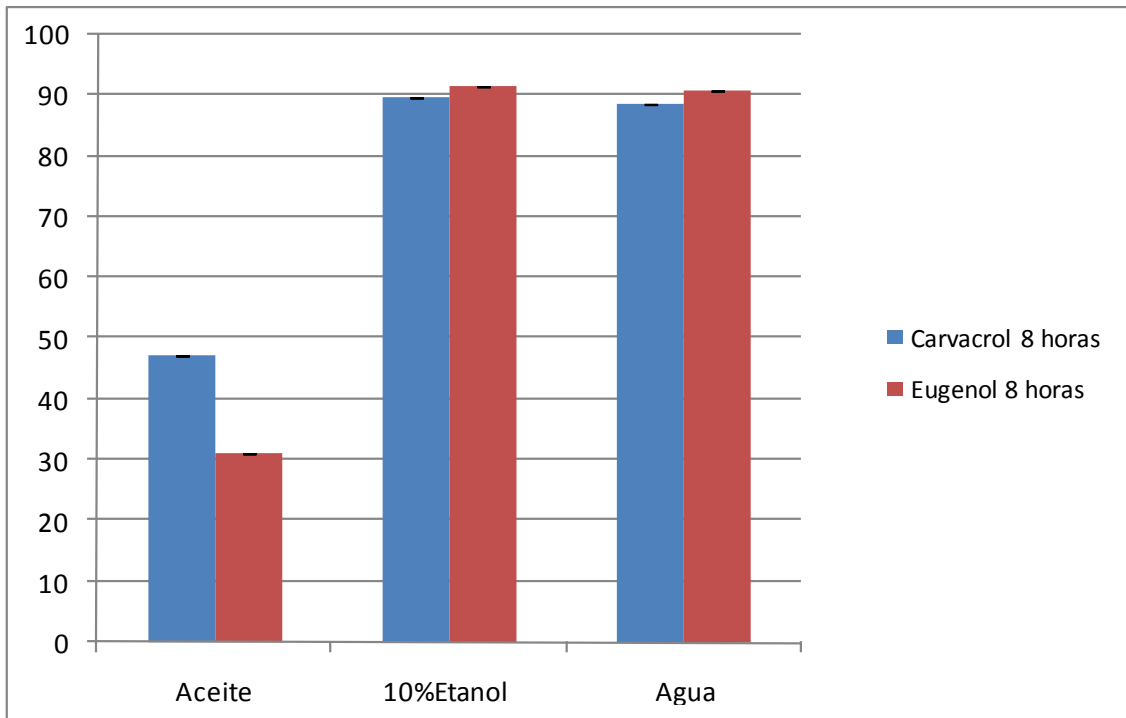


Figura 45: % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 8 horas de contacto

Tras observar la figura podemos apreciar que, tanto el Eugenol como el Carvacrol, continúan en valores en torno al 90%, sin embargo se aprecia un incremento considerable en el caso del aceite.

Cabe destacar en el caso del aceite que, al contrario que en 8 horas, es el Carvacrol el que difunde más aproximándose casi al 50% mientras el Eugenol tan solo alcanza el 31%.

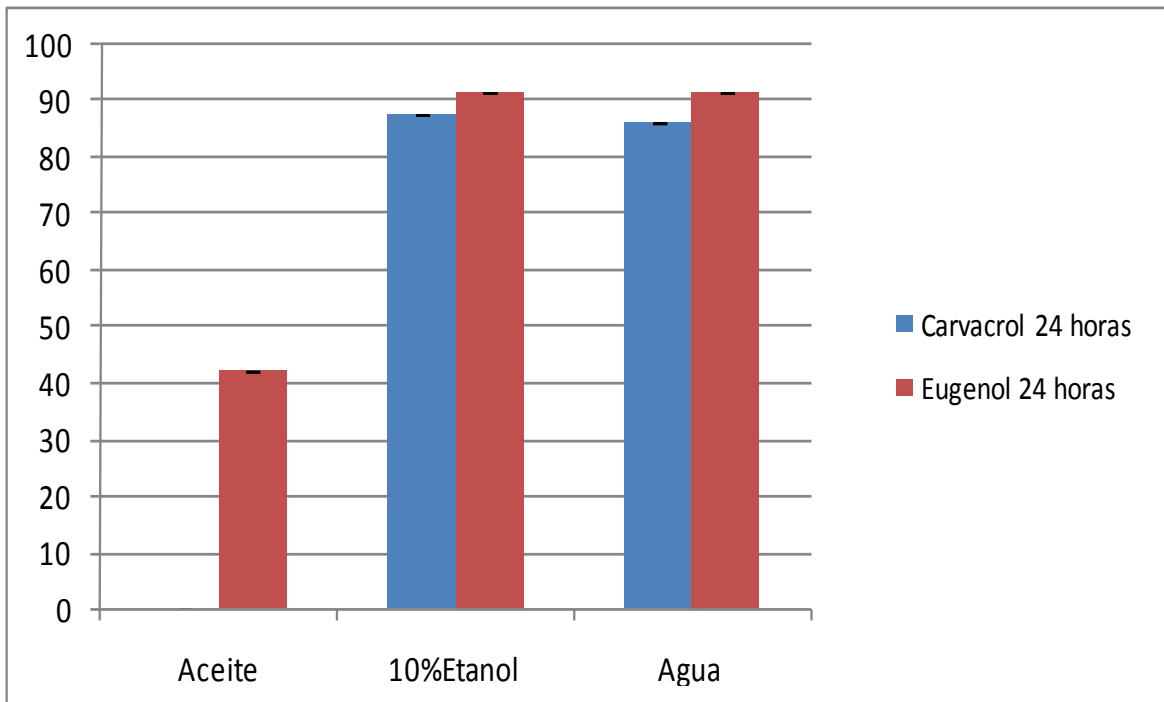


Figura 46: % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 24 horas de contacto

Pasadas 24 horas de contacto seguimos observando que, tanto el Carvacrol como el Eugenol, se mantienen en valores en torno al 90%, por lo que consideramos que hemos alcanzado los valores máximos de difusión para este tipo de film en el agua y en la solución acuosa .

Sin embargo, podemos observar que en el aceite, en el caso del Carvacrol, no apreciamos valor alguno, esto es debido a que nos hemos visto obligados a eliminar dicho valor por el mismo motivo que en el agua. Para el Eugenol comentar que continua difundiendo lentamente alcanzando valores en torno al 40% .

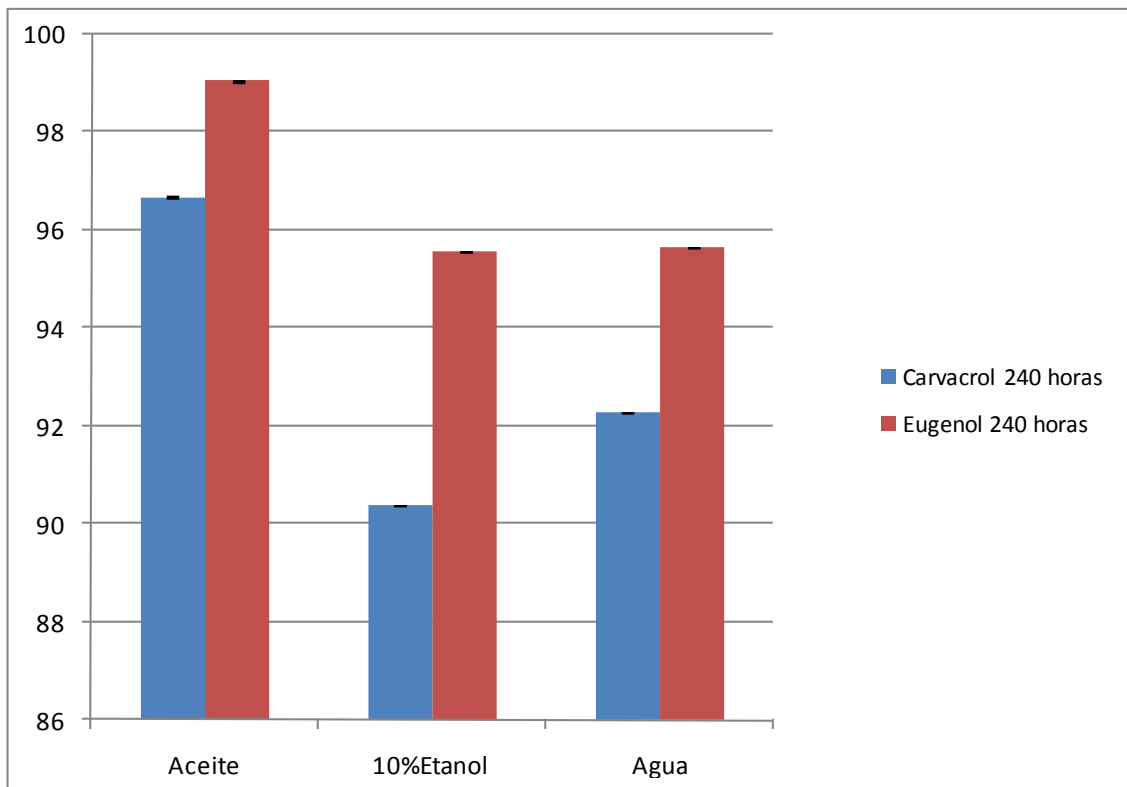


Figura 47: % de Carvacrol y Eugenol liberado para cada uno de los simulantes tras 240 horas de contacto

Según la norma UNE-EN 13130 sobre materiales y artículos en contacto con alimentos, y más en concreto su parte 1: “Guía de métodos de ensayo para la migración específica de sustancias procedentes de materiales plásticos a los alimentos y simulantes de alimentos, determinación de las sustancias en los materiales plásticos y selección de las condiciones de exposición a los simulantes alimentarios.” El estudio finalizaría pasados diez días para el estudio de la migración específica de sustancias a alimentos por lo que nuestro estudio finalizara en este tiempo.

Llegado este tiempo podemos considerar que ambos compuestos activos han llegado a su valor máximo de difusión. Observamos que el aceite llega a alcanzar, incluso superar (99%) los valores de los disolventes polares que rondan en torno al 90-95%. Cabe destacar que es el Eugenol el que más difunde en los tres disolventes.

5 Conclusiones

En este Trabajo fin de Proyecto, se puso a punto la metodología de análisis para la detección y cuantificación de Carvacrol y Eugenol a través de HPLC. Así, se pudo definir y aplicar el protocolo para el estudio de la difusión de estos compuestos activos incorporados en películas comestibles basadas en proteína aislada de suero lácteo.

A partir de este trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

- Se puede destacar que la difusión de ambos compuestos es más rápida hacia los simulantes acuosos y polares como el agua y la solución etanol/agua 10 % (v/v), a pesar de las características apolares de los aceites esenciales utilizados, que hacia el simulante graso apolar. En los componentes polares se alcanzan valores de 90% mientras que en el aceite tan solo se alcanzan valores de 30-40%.
- Además concluimos que tanto el Carvacrol como el Eugenol presentaron una cinética de difusión muy similar. Podemos destacar que el Eugenol es el que más rápidamente difunde en los componentes polares en todo momento. Sin embargo, en el caso del aceite, es el Carvacrol el que difunde más rápido en los primeros instantes aunque termina por ser el Eugenol el que más difunde.

La cuantificación de la difusión de compuestos activos es imprescindible para posibles aplicaciones alimentarias. De este estudio podemos concluir que en el caso de que el alimento tuviese la superficie grasa la liberación sería mucho más lenta que en el caso de alimentos con superficie acuosa en este tipo de film. Además también podemos concluir que es el Eugenol el que difundiría más rápido en alimentos con superficie acuosa mientras que en alimentos grasos sería el carvacrol el que difundiría más rápido en un primer instante pero a lo largo del tiempo sería también el Eugenol el que más difundiría.

6 Bibliografía

- Atarés, L., C. De Jesús, P. Talens and A. Chiralt. 2010. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering* 99(3): 384-391.
- Coma, V. 2008. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meatbased products. *Meat Science* 78(1-2): 90-103.
- Corzo-Martinez, M., Soria, A.C., Villamiel, M., Olano, A., Harte, F.M. and Moreno, F.J. 2011. Effect of glycation on sodium caseinate-stabilized emulsions obtained by ultrasound. *Journal Dairy Science* 94: 51-58.
- Dabeaufort, F.; Quezada-Gallo, J.A. y Voilley, A. 1998. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical reviews in food Science*, 38(4), 299-313.
- Del Nobile, M. A., A. Conte, A. L. Incoronato and O. Panza. 2008. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering* 89(1): 57-63.
- Emiroglu, Z. K., G. P. Yemiş, Coşkun, B. K. and K. Candoğan. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science* 86(2): 283-288.
- Fernández Pan, I. 2011. Desarrollo de películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos para la mejora de la seguridad y calidad microbiológica de productos cárnicos frescos. Tesis doctoral. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España.

- Gennadios, A., M. A. Hanna and L. B. Kurth. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *LWT - Food Science and Technology* 30(4): 337-350.
- Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B y Guilbert, S. 1996. Influence o relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 44, 1064-1069.
- Greenen, I. and Fennema, O. 1994. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions and testing methods. *Edible coatings and films to improve food quality*. Editores: Krotcha, J.M.; Baldwin, E.A.; Nisperos-Carriedo, M. Technomic Publishing Co., Lancaster EEUU.
- Guilbert, S. y Biquet, B. 1995. Películas y envolturas comestibles. *Embalaje de los alimentos de gran consumo*. Editores: Bureau, G; Multon, J.L. Editorial Acribia, Zaragoza.
- Kester, J. J., and Fennema, O.R. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology* 48(12): 47-59.
- Leong, T.S.H., Wooster, T.J., Kentish, S.E., Ashokkumar, M. 2009. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry* 16: 721-727.
- Martin-Belloso, O., M. A. Rojas-Graü and R. Soliva-Fortuny. 2009. Delivery of Flavorand Active Ingredients Using Edible Films and Coatings. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. M. E. Embuscado and K. C. Huber. New York, Springer: 295314.

- Mastromatteo, M., G. Barbuzzi, A. Conte and M. A. Del Nobile. 2009. Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(2): 222-227.
- Mei, Y. y Zao, Y. 2003. Barrier and mechanical properties of milk protein based edible films incorporated with nutraceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 1914-1918.
- Uttara, B., Simard, R.E., Begin, A., Holleu, R.A. 2000. Diffusion of Acetic and Propionic Acids from Chitosan-Based Antimicrobial Packaging Films. *Journal of Food Science*. 65(5): 768-773.
- Peltzer, M., Wagner, J. and Jimenez, A. 2009. Migration study of carvacrol as a natural antioxidant in high-density polyethylene for active packaging. *Food Additives and Contaminants*. 26(6):938-946.
- Peppas, N. A. and L. Brannon-Peppas. 1994. Water diffusion and sorption in amorphous macromolecular systems and foods. *Journal of Food Engineering* 22(1-4): 189-210.
- Quezada-Gallo, J. A. 2009. Delivery of Food Additives and Antimicrobials Using Edible Films and Coatings. *Edible Films and Coating for Food Applications*. M. E. Embuscado and K. C. Huber. New York, Springer: 315-334.
- Quintavalla, S. and L. Vicini. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* 62(3): 373-380.
- Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo.

- Rojas-Graü, M. A., R. J. Avena-Bustillos, C. Olsen, M. Friedman, P. R. Henika, O. Martín-Belloso, Z. Pan and T. H. McHugh. 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering* 81(3): 634-641.
- Royo, M., I. Fernández-Pan and J. I. Maté. 2010. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(9): 1513-1519.
- Sakellariou et al. 1996 .An evaluation of the interaction and plasticizing efficiency of the polyethylene glycols in ethyl cellulose and hydroxypropylmethylcellulose films using the torsional braid pendulum. *Int. J. Pharm.*,31-55.
- Soria, A.C., Villamiel, M. 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review.*Trends in Food Science & Technology* 21: 323-331.
- UNE-EN 13130, parte 1: “Guía de métodos de ensayo para la migración específica de sustancias procedentes de materiales plásticos a los alimentos y simulantes de alimentos, determinación de las sustancias en los materiales plásticos y selección de las condiciones de exposición a los simulantes alimentarios.”
- Villa, C., Gambaro, R., Mariani, E. y Doorato S. 2007. High Performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 23 fragrance allergens to study scented products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44: 755-762.
- Zivanovic, S., S. Chi and A. F. Draughon. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science* 70(1).

Autorización para la Comunicación Pública y Reproducción Parcial de Trabajos y Proyectos de Final de Carrera presentados y defendidos en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Pública de Navarra.

Baimena, Nafarroako Unibertsitate Publikoko Nekazaritza Ingeniarren Goi Mailako Eskola Teknikoan aurkezten diren eta defenditzen diren ikasketen Amaierako Lanen eta Proiektuen jakinarazpen publikoa eta zati batean erreproduzizioa egiteko.

D/D^a Patricia Pérez de los Bueios Mastín _____ jaunak/andreak
autor(a) y D/D^a JUAN J. MATÉ _____
eta _____
profesor(a) director(a) del TFC o PFC titulado _____
jaunak/andreak, _____

Caracterización de la liberación de
Patricia y Eugenio contenidos en film
W.P.E.

izeneko IALren/IAPren egile eta irakasle zuzendari baitira,

NO AUTORIZAN la integración de ese TFC/PFC en el repositorio digital de la Biblioteca de la Universidad

EZ DUTE BAIMENA EMATEN IAL/IAP hori Unibertsitateko Liburutegiaren biltegi digitalean sartzeko

AUTORIZAN EXPRESAMENTE la integración de este TFC/PFC en el repositorio digital de la Biblioteca de la Universidad para

ESPRESUKI BAIMENA EMATEN DUTE IAL/IAP hori Unibertsitateko Liburutegiaren biltegi digitalean sartzeko, honako xede honekin:

LA COMUNICACIÓN Y REPRODUCCIÓN PARCIAL PÚBLICA

JENDARTEAN JAKINARAZTEKO ETA ZATI BATEAN ERREPRODUZITZEKO

LA COMUNICACIÓN Y REPRODUCCIÓN PARCIAL RESTRINGIDA A LOS MIEMBROS DE LA COMUNIDAD UNIVERSITARIA. LA RESTRICCIÓN TENDRÁ UN PERIODO DE EMBARGO DE 6 MESES

SOILIK UNIBERTSITATEKO KIDEEN ARTEAN JAKINARAZTEKO ETA ZATI BATEAN ERREPRODUZITZEKO. BAIMEN MURRIZKETA HORREK 6 HILABETEKO ENBARGO-EPEA IZANGO DU.

El depósito, la consulta y la reproducción parcial de este TFC/PFC se autorizan únicamente para fines de conservación, estudio e investigación sin finalidad lucrativa, según reza la Ley 23/2006, por la que se modifica el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual.

IAL/IAP honen gordailua, kontsulta eta zati bateko erreproduzizioa soilik baimentzen dira irabazi asmorik gabeko kontserbazio, azterlan eta ikerketarako, Jabetza Intelektualari buruzko Legearen testu bategina aldatzen duen 23/2006 Legeari jarraikiz.

La reproducción del texto se hará sólo con citas breves e indicando siempre el autor y la fuente.

Testuaren erreproduzizioa aipu laburrekin soilik, eta, betiere, egilea eta iturria adierazita egingo da.

Pamplona 6 de Febrero de 2012

Iruñean, ___(e)ko _____aren ___(e)(a)n

El autor o autora / Egilea

El profesor o profesora / Irakaslea

Fdo./ Stua. _____

Fdo. / Stua. _____