

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Estabilidad Oxidativa de Aceite de Pescado por Catequina
Incorporada en Película Compatibilizada de Polietileno de
Baja Densidad**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presentan:

**Juan Franciso Apodaca Mendoza
José Jesús Castañeda Palafox**

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, por darme salud y una gran familia, por rodearme de gente buena, de cariño y amor. Gracias por permitirme culminar mi Licenciatura.

A la Universidad de Sonora, por ser mi segundo hogar, inclusive más hogar que mi propia casa durante el transcurso de mi carrera.

Al Departamento de Ciencias Químico – Biológicas y sobre todo a todos aquellos maestros que reforzaron mi gusto por la ciencia, por todos aquellos maestros que si en algún momento llegué a titubear de la decisión de estudiar esta carrera, me supieron aconsejar para reforzar mi elección. Gracias a todos los maestros por brindarme parte de sus conocimientos, por esmerarse en que aprendiera sus enseñanzas.

A la Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo por permitirme ser parte de este proyecto, por su paciencia, consejos y ayuda durante todo el trabajo.

A mis sinodales, Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera, M.C. Rosalina Ramírez Olivas y M.E. Francisca Ofelia Muñoz Osuna, por sus sabios consejos y apoyo en este importante proyecto.

Al maestro César Benjamín Otero León por sacarnos de apuros siempre que lo necesitábamos, gracias por ayudarnos siempre.

Al Laboratorio de Investigación en Alimentos (LIA), por abrirme sus puertas y permitirme hacer uso de sus instrumentos y equipos. A los compañeros del LIA (Erika, Machuy, Susana, Edgar, Eliezer y Erendida) por hacerme más ameno todo el trabajo en el laboratorio y por su apoyo brindado.

A todos mis compañeros de clases, que durante todo este tiempo formaron mi segunda familia, con quienes incluso formé grandes lazos de amistad que estoy seguro perdurarán por muchos años más. A ti Pepe por compartir este proyecto y sacarlo adelante juntos, fuiste y serás siempre un gran compañero, amigo y colega. A ti Gaby por ser nuestro apoyo en el laboratorio durante los muestreos, parte de este proyecto es gracias a ti.

A mis Padres porque me han enseñado a vivir y a luchar honestamente, por ser mi gran pilar a lo largo de mi vida, por estar ahí siempre que los he necesitado, por cuidarme de pequeño, cuando enfermaba, siempre han estado ahí, mil gracias y Dios me los cuide y proteja siempre.

A mis hermanos menores (Ivette, Aldo y Alan), sé que no siempre me he comportado como el mejor hermano, pero ustedes siempre han estado cuando yo los he necesitado, gracias por ser ustedes mis hermanos, gracias por su ayuda y cariño, los quiero mucho.

A Luz Jhoana, por formar parte esencial de mi vida, por compartir a lo largo de toda la carrera tantos momentos lindos, por ser paciente conmigo, por las veces que te necesite y ahí estuviste, siempre estás en mi corazón.

Agradezco el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo de tesis al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto: “Cinética de difusión de catequina en películas de polietileno compatibilizadas para actividad antioxidante y antimicrobiana” (Proyecto No. 105235, Fondo SEP-CONACYT CB-2008-01).

Juan Francisco Apodaca Mendoza

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a la Universidad de Sonora por permitir formarme como una persona de bien, por brindarme las bases con las que podré desarrollarme tanto académica como profesionalmente, así como por la posibilidad de poder ser una mejor persona que pueda ayudar al desarrollo y bienestar del ámbito en el que me encuentre, así como a la sociedad misma.

De una manera especial quiero agradecer al Departamento de Polímeros y Materiales, al equipo de trabajo del LIA y a toda la gente que hizo posible este trabajo, ya que con su ayuda fue más fácil la realización del mismo.

Asimismo quiero reconocer a la Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo, la cual desde un principio me apoyó con lo necesario para poder llevar a cabo este trabajo, mostrando siempre una disponibilidad y accesibilidad que permitió crear un ambiente de trabajo muy agradable. De la misma manera agradezco el apoyo brindado por mis sinodales, Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera, M.E. Francisca Ofelia Muñoz Osuna y M.C. Rosalina Ramírez Olivas. Agradezco también al maestro César Benjamín Otero León, por estar siempre disponible para ayudarnos.

A mi amigo Juan, por trabajar juntos en este proyecto y dar un paso más en nuestra carrera, compartiendo un logro importante para ambos. A Gabriela, por apoyarnos en nuestro trabajo experimental que también llegó a ser suyo. De manera especial quiero darle las gracias a Erika, ya que su ayuda y consejos durante este trabajo fueron de mucha utilidad, haciéndolo más fácil tanto en el laboratorio como a la hora de realizar las presentaciones.

Agradezco el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo de tesis al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del proyecto: "Cinética de difusión de catequina en películas de polietileno compatibilizadas para actividad antioxidante y antimicrobiana" (Proyecto No. 105235, Fondo SEP-CONACYT CB-2008-01).

José Jesús Castañeda Palafox

DEDICATORIA

A mis padres:

Gracias a ustedes por ser los primeros maestros en mi vida, por ser ustedes quienes me enseñaron por primera vez, por quererme y amarme tanto, por darme todo su esfuerzo, los admiro y quiero mucho, por sacar adelante a mis tres hermanos y a mí.

Para ustedes este trabajo, en el que pongo a prueba todos los conocimientos aprendidos en mis estudios.

A mis abuelos (QEPD):

Martín Mendoza R. por ser como mi segundo padre, por criarme los primeros años de mi vida, por quererme y cuidarme como si fuera su propio hijo, por todo lo que me enseñaste, por enseñarme el mundo en mis primeros años de vida, por protegerme y cuidarme siempre. Hubiera deseado tanto que compartieras este momento tan importante conmigo, pero sé que desde el cielo estás mirándome y cuidándome siempre.

María Estrella S. por ser mi segunda madre, por consentirme tanto de pequeño, por convivir tanto con mis hermanos y conmigo. Porque te nos fuiste y no alcanzaste a estar presente en cuerpo en esta fecha, pero al igual que mi abue Martín, sé que están juntos mirándome desde el cielo y espero estén orgullosos de mí como yo lo estoy de ser su nieto.

Juan Francisco Apodaca Mendoza

DEDICATORIA

En primer lugar, le doy gracias a Dios por permitirme terminar una etapa más de mi vida, por darme la oportunidad de prepararme y poder realizarme profesionalmente, así como por poder compartir este logro con mis seres queridos.

A mis padres, que siempre han estado a mi lado para aconsejarme, para platicar, para escucharme, para guiarme y poder ser la persona que hoy en día soy, ya que sin su apoyo no lo hubiera logrado.

A mis hermanos, que me brindan su apoyo y me motivan a ser siempre una mejor persona, por estar siempre conmigo en los momentos en los que los he necesitado, por demostrarme que siempre que lo necesite podré contar con ellos.

A mis amigos, con los cuales he vivido y compartido muchos momentos que se quedarán conmigo, a su motivación y palabras de aliento, porque gracias a ellos he disfrutado esta etapa de mi vida.

Este trabajo lo dedico a varias personas que me han apoyado siempre e incondicionalmente, especialmente a mi familia, los cuales sin esperar nada a cambio, me han apoyado en todo momento, brindándome no solo su cariño y confianza, sino también sus consejos y su tiempo.

José Jesús Castañeda Palafox

CONTENIDO

	Página
FORMA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
DEDICATORIA.....	6
CONTENIDO.....	8
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
OBJETIVOS.....	13
RESUMEN.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
ANTECEDENTES.....	18
Oxidación Lipídica.....	18
Efecto de los Ácidos Grasos Omega-3 de Origen Marino en la Salud y Nutrición.....	20
Antioxidantes.....	23
Antioxidantes Sintéticos.....	24
Antioxidantes Naturales.....	26
Flavonoides.....	28
Envasado Activo.....	32
Materiales Plásticos Empleados en Envases.....	33
Clasificación de Polímeros.....	34
Copolímeros.....	34
Aleatorio.....	34
En bloque.....	35
De injerto.....	35
Películas Compatibilizadas y su Aplicación en el Desarrollo de Envases Activos.....	36
Evaluación de la Oxidación Lipídica.....	38
Dienos Conjugados.....	39
Índice de Peróxidos.....	39
Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.....	40

Evaluación de la Actividad Antioxidante.....	41
Prueba de ABTS.....	41
Prueba de DPPH.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
Materiales.....	45
Elaboración de Películas.....	45
Contenido de Galato de Epigallocatequina en Películas Plásticas.....	46
Evaluación de la Oxidación Lipídica de Aceite de Pescado.....	47
Dienos Conjugados.....	47
Índice de Peróxidos.....	48
Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.....	48
Evaluación de la Actividad Antioxidante de Películas.....	49
Prueba de ABTS.....	49
Prueba de DPPH.....	49
Análisis Estadístico.....	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
Contenido de Galato de Epigallocatequina en Películas Plásticas.....	52
Evaluación de la Oxidación Lipídica de Aceite de Pescado.....	53
Almacenamiento a 4°C.....	53
Dienos conjugados.....	53
Índice de peróxidos.....	54
Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	55
Almacenamiento a 25°C.....	58
Dienos conjugados.....	58
Índice de peróxidos.....	59
Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	61
Evaluación de la Actividad Antioxidante de Películas.....	63
Prueba de ABTS.....	63
Prueba de DPPH.....	65
CONCLUSIONES.....	67
RECOMENDACIONES.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70
ANEXOS.....	76

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Formulación de las películas de PEBD a elaborar indicando su contenido de GEGC y compatibilizante (COMP).....	46
2.	Contenido de GEGC en las películas elaboradas.....	52
3.	Contenido de dienos conjugados en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 4°C por dos semanas.....	53
4.	Contenido de dienos conjugados en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 25°C por dos semanas.....	59
5.	Actividad antioxidante de las películas desarrolladas evaluadas mediante el radical ABTS.....	64
6.	Actividad antioxidante de las películas desarrolladas evaluadas mediante el radical DPPH.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mecanismo de oxidación de lípidos.....	18
2. Fases de la oxidación lipídica.....	20
3. Beneficios derivados del consumo de ácido eicosapentanoico (EPA) en la salud cardiovascular.....	21
4. Beneficios derivados del consumo de ácido docosahexanoico (DHA) en la función del sistema nervioso y visual.....	22
5. Mecanismo de acción antioxidante sobre radicales.....	23
6. Estructuras de antioxidantes sintéticos comúnmente utilizados en alimentos.....	25
7. Estructura básica de un flavonoide.....	29
8. Tipos de flavonoides.....	30
9. Copolímero aleatorio.....	34
10. Copolímero en dibloque (a) y tribloque (b).....	35
11. Copolímero de injerto.....	36
12. Copolímero de injerto a base de PEBD modificado con anhídrido maleico (LDPEgMA).....	37
13. Estructura de dienos conjugados.....	39
14. Cromógeno formado entre dos moléculas de TBA y una molécula de MA.....	40
15. Estructura del 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato).....	42
16. Estructura del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.....	43
17. Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.....	44
18. Índice de peróxidos en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 4°C.....	55
19. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 4°C.....	57
20. Índice de peróxidos en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 25°C.....	60

21. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 25°C.....

62

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estabilidad a la oxidación de aceite de pescado adicionado con catequina a través de un envase activo compatibilizado de polietileno de baja densidad.

Objetivos Específicos

Elaborar películas compatibilizadas de Polietileno de Baja Densidad (PEBD).

Evaluar el efecto de la compatibilización y concentración de catequina de las películas desarrolladas en la estabilidad a la oxidación de aceite de pescado durante su almacenamiento en diferentes temperaturas.

Evaluar la actividad antioxidante de las películas de catequina mediante técnicas de estabilización de radicales libres.

RESUMEN

La oxidación de lípidos es la principal causa de deterioro de alimentos que contienen grasas y aceites, desarrollando sabores, olores y colores indeseables resultando en un producto con escasa aceptación. Para este tipo de productos, los sistemas de envases activos antioxidantes pueden ser una opción para la estabilización de radicales libres. Entre los antioxidantes naturales con potencial aplicación en estos sistemas, se tiene al flavonoide Galato de Epigallocatequina (GEGC) que se puede encontrar en el té verde, té negro, uva, manzana, granada, entre otros. Debido a que este tipo de antioxidante es de naturaleza polar, a diferencia de los materiales en los que se incorporan como el PEBD, se requiere evaluar el uso de compuestos que mejoren la miscibilidad entre componentes de diferente naturaleza química, como los agentes compatibilizantes. Con base en lo anterior, en el presente estudio se elaboraron películas de PEBD adicionadas con GEGC, en dos concentraciones (1 y 3%) y un agente compatibilizante (PEBD injertado con anhídrido maléico). Se evaluó el efecto de las películas elaboradas en la estabilidad a la oxidación de aceite de pescado durante su almacenamiento a 4 y 25°C, mediante la determinación de Dienos Conjugados (DC), Índice de Peróxidos (IP) y Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Asimismo, se determinó la actividad antioxidante de las películas mediante técnicas de estabilización de radicales libres usando la prueba del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y la prueba del radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). De acuerdo a los resultados obtenidos, durante el almacenamiento a 4°C se encontró una menor oxidación en el aceite en contacto con las películas incorporadas con GEGC y libres de compatibilizante, mientras que a 25°C no se encontró un efecto estabilizante respecto al tratamiento control, aunque fue mejor que el Butilhidroxitolueno (BHT) usado como antioxidante de referencia. Respecto a la evaluación de la actividad antioxidante, tanto DPPH como ABTS indicaron que las películas con GEGC, con y sin compatibilizar, presentaron una mayor actividad antioxidante (19.96% - 71.52%) respecto a las películas con el antioxidante de referencia (6.90% - 17.19%). De acuerdo a los resultados obtenidos la incorporación de GEGC a envases activos antioxidantes pudiera brindar una alternativa de incorporación de antioxidantes a alimentos aunque se requiere continuar caracterizando su efecto en la oxidación lipídica de alimentos con diferente contenido de lípidos y conservados bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

INTRODUCCIÓN

Al trabajar con alimentos que tienen un contenido significativo de lípidos, se puede llegar a presentar la oxidación o rancidez oxidativa, la cual es un problema que afecta la calidad del producto. Durante este proceso de deterioro se produce una descomposición de los lípidos lo que a su vez genera una pérdida de vida de anaquel, palatabilidad, funcionalidad y calidad nutricional del alimento, además existe un riesgo potencial de que se produzcan compuestos tóxicos (Mildner y col., 2009). El resultado final de este proceso de deterioro químico es un producto alimenticio con menos aceptación o inaceptable por el consumidor. Por lo tanto, la oxidación debe controlarse y retardarse el mayor tiempo posible, primordialmente en aquellos alimentos con alto contenido graso, pues además de poder llegar a generar un riesgo a la salud, genera pérdidas económicas así como desechos alimenticios.

Entre los alimentos más susceptibles a la oxidación se encuentran los aceites vegetales y los de origen marino, especialmente los últimos por su alto contenido de ácidos grasos insaturados (Ní Eidhin y col., 2003).

Entre las herramientas más utilizadas para controlar la oxidación lipídica se encuentran los antioxidantes, sustancias que pueden retardar el inicio o reducir la velocidad de oxidación de las sustancias autooxidables, como los lípidos de alimentos (Wessling y col., 2000). Existen cientos de compuestos, naturales y sintéticos, con propiedades antioxidantes; y si bien la mayoría de los antioxidantes comerciales actuales son sintéticos, las recientes preocupaciones por parte del consumidor con respecto al uso de sustancias químicas seguras han originado un creciente interés en el uso de antioxidantes naturales (Akoh y Min, 2002). Entre los antioxidantes naturales se tiene el flavonoide GEGC que se puede encontrar en fuentes como el té verde, té negro, uva, manzana, granada, entre otros y que en diferentes estudios se ha relacionado con una elevada actividad antioxidante (Pollorena, 2012). Cervantes y col. (2010) evaluaron la actividad antioxidante en manzanas y la relacionaron con su contenido de compuestos fenólicos como el ácido caféico, procianidinas y catequinas.

La incorporación de los antioxidantes en alimentos puede realizarse, entre otros, en el sistema de envasado, obteniendo así una de las tecnologías más recientes e innovadoras en la conservación de alimentos, el envasado activo, donde el envase, más allá de cumplir sus

funciones básicas de contención y protección, juega un papel dinámico en la preservación del alimento. Legislaciones de la Unión Europea (1935/2004/CE y 2009/450/CE) consideran materiales activos a los "materiales y artículos que pretenden extender la vida útil y mejorar la condición de empaquetado del alimento" por la incorporación decidida de componentes liberados que absorben sustancias en o desde el envase de alimentos (López de Dicastillo y col., 2010).

Debido a que este tipo de antioxidante es de naturaleza polar, a diferencia de los materiales en los que se incorporan como el PEBD, se requiere evaluar el uso de compuestos que mejoren la miscibilidad entre componentes de diferente naturaleza química, como los agentes compatibilizantes que se caracterizan por poseer en su estructura una porción polar y otra apolar que permite la interacción entre componentes de diferente naturaleza química (Wessling y col., 2000).

Para evaluar el efecto antioxidante de un sistema de envasado activo se deben realizar pruebas específicas para cada alimento que se desee envasar, pero debido a la compleja composición de muchos alimentos, esto no siempre puede hacerse. En su lugar, se emplean agentes que simulen a los alimentos, frecuentemente líquidos, que son más fácilmente analizados y preparados en forma reproducible (Wessling y col., 2000). En este trabajo se utiliza aceite de pescado como modelo alimenticio, que además de ser un alimento relativamente simple es altamente susceptible a la oxidación.

Las pruebas para evaluar el efecto antioxidante en alimentos pueden clasificarse en dos grupos: análisis para evaluar la oxidación lipídica y análisis para medir la capacidad de secuestrar radicales libres, también denominada actividad antioxidante. En la primera de éstas se emplea un sustrato lipídico bajo condiciones controladas y se evalúa el grado de inhibición de la oxidación, mediante métodos como DC, IP y TBARS. El segundo grupo, incluye técnicas como DPPH y ABTS que evalúan la capacidad antioxidante para estabilizar radicales libres, monitoreando la inhibición de la oxidación de un sustrato adecuado. Después de que el sustrato se oxida bajo condiciones estándar se mide por métodos químicos, instrumentales o sensoriales; en el caso de las técnicas de DPPH y ABTS, se evalúa por espectrofotometría (Sánchez, 2002).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se planteó determinar el efecto antioxidante de películas compatibilizadas de PEBD conteniendo GEGC, evaluando la estabilidad a la oxidación de aceite de pescado en contacto con la película antioxidante durante su almacenamiento a diferentes temperaturas (4 y 25°C). Adicionalmente, se evaluó la capacidad antioxidante de las películas obtenidas mediante técnicas de estabilización de radicales libres.

Cabe mencionar que este trabajo es parte del megaproyecto de investigación “Cinética de difusión de catequina en películas de polietileno compatibilizadas para actividad antioxidante y antimicrobiana” (Proyecto No. 105235, Fondo SEP-CONACYT CB-2008-01), que contempla el desarrollo de sistemas de envasado activo de liberación de agentes antimicrobianos y antioxidantes con la finalidad de contribuir a la preservación de productos de origen marino, sector de destacada importancia económica en nuestra región.

ANTECEDENTES

Oxidación Lipídica

La oxidación lipídica es la principal causa de deterioro de muchos alimentos que contienen grasas y aceites, desarrollando sabores, olores y colores indeseables resultando en un producto con escasa aceptación (Farkas y col., 1997).

La rancidez de las grasas producida por la oxidación lipídica ocurre por varios mecanismos, los cuales incluyen la lipólisis (rancidez hidrolítica) y la autooxidación (rancidez oxidativa); la primera se debe básicamente a la acción de las lipasas que liberan ácidos grasos de los triacilglicéridos, mientras que la segunda se refiere a la acción del oxígeno o de las lipooxigenasas sobre las insaturaciones de los ácidos grasos. Existe una tercera forma de deterioro que se produce por un fenómeno llamada reversión, cuyo mecanismo es poco conocido; a pesar de que se presenta en algunos lípidos cuando se almacenan en ciertas condiciones, tiene menos importancia que los dos anteriores (Badui, 2006).

La principal vía de oxidación lipídica en alimentos es la autooxidación que implica un mecanismo de radicales libres, el cual incluye tres fases: iniciación, propagación y terminación (Farkas y col., 1997) (Figura 1).

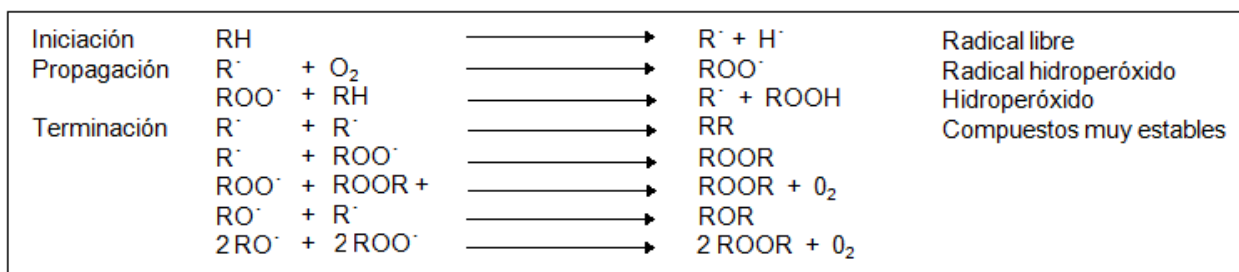


Figura 1. Mecanismo de oxidación de lípidos (Badui, 2006).

La iniciación puede comenzar por acción de la luz, el calor o iones metálicos para formar radicales libres, lo cual se debe a la presencia de un átomo de hidrógeno altamente reactivo por influencia de los dobles enlaces de una molécula o fracción de ácido graso; esto hace que la energía de un fotón sea suficiente para producir un radical (R^\bullet) al actuar sobre uno de los hidrógenos. El radical libre alquilo resultante reacciona con oxígeno atmosférico para formar un radical libre peróxido inestable, que a su vez sustrae un átomo de hidrógeno de otro ácido graso insaturado para formar un hidroperóxido y un nuevo radical libre álcali. Este radical libre inicia más oxidaciones y contribuye a la reacción en cadena o propagación que podría ser finalizada en la formación de productos más estables resultado de la combinación de dos especies de radicales (Akoh y Min, 2002).

En las reacciones de propagación, los radicales libres son convertidos en otros radicales. Por lo tanto, una característica general de los radicales libres es que proceden de la reacción en cadena, es decir, un radical genera otro y así sucesivamente. Así, la formación inicial de un radical es responsable de las innumerables transformaciones químicas de las moléculas. De hecho, la propagación de los radicales libres en el proceso de oxidación se produce por las reacciones en cadena que consumen el oxígeno y la producción de nuevos radicales libres o para la formación de peróxidos (Madhavi y col., 1996).

En la etapa de terminación hay una reducción en la cantidad de lípidos insaturados y las especies radicales reaccionan entre sí formando un compuesto no radical más estable. A esto se le llama reacciones de terminación que da lugar a la interrupción de la secuencia repetitiva de las reacciones de propagación (Figura 2) (Cruz y Gastélum, 2011).

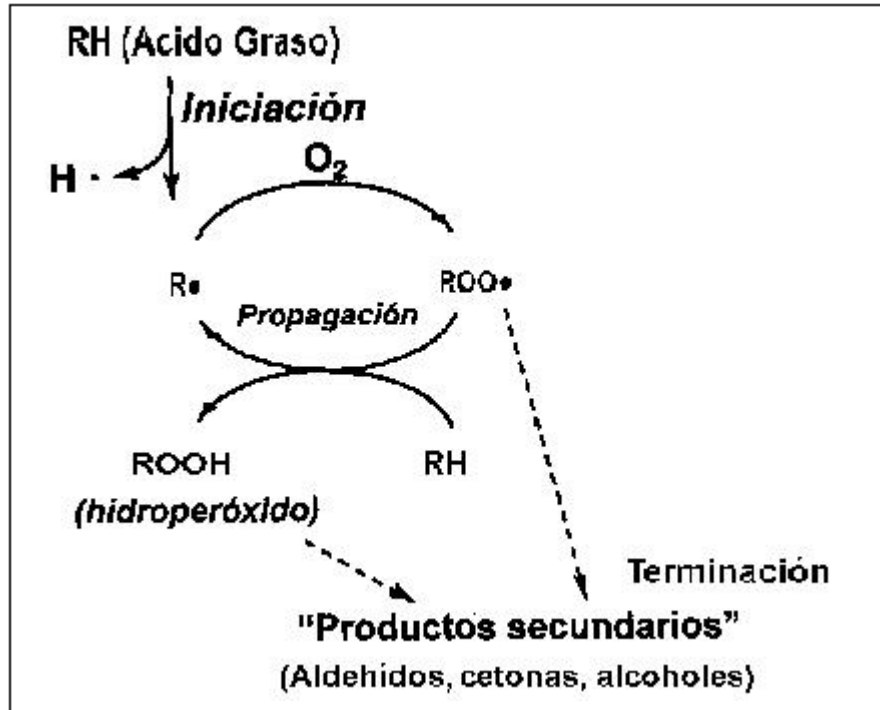


Figura 2. Fases de la oxidación lipídica (Wessling, 2000).

Efecto de los Ácidos Grasos Omega-3 de Origen Marino en la Salud y Nutrición

El aceite de pescado se caracteriza por su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados incluyendo el Ácido Docosahexanoico (DHA) y Ácido Eicosapentanoico (EPA). Estos compuestos pueden representar hasta un 25% del contenido total de ácidos grasos en este tipo de aceites (Bimbo, 1989) haciéndolos muy susceptibles a la oxidación.

Dado que en numerosos estudios el consumo de estos ácidos grasos ha sido relacionado con beneficios en la salud (Watkins y col., 1996) resulta de especial importancia retardar su deterioro por autooxidación mediante el empleo de sustancias antioxidantes.

Hoy en día, existen numerosos estudios donde se ha comprobado que los aceites de pescado representan alimentos de muy alta calidad nutricional, debido a que aportan ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA). Algunos de los beneficios de consumir estos ácidos grasos ω -3 han sido asociados con la reducción en el riesgo de enfermedades cardiovasculares y enfermedades inflamatorias (Ní Eidhin y col., 2003).

Los beneficios a la salud y nutricionales derivados del consumo de ácidos grasos omega-3 de origen marino están sólidamente demostrados en la literatura científica y su consumo es fuertemente recomendado por las autoridades de salud y nutrición en todo el mundo, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés). El beneficio del consumo de EPA se asocia principalmente con la protección de la salud cardiovascular, principal causa de muerte en el mundo occidental. El consumo diario de EPA disminuye los triglicéridos y el colesterol sanguíneo, ambos son un determinante importante de riesgo cardiovascular. El EPA, además, baja la presión vascular y tiene efectos antitrombóticos y antiinflamatorios (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

Recientemente, se ha demostrado que el consumo de EPA ejerce un efecto protector sobre las arritmias cardíacas, que son una de las principales causas de infarto al miocardio. La Figura 3 resume los beneficios biológicos derivados del consumo de EPA (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

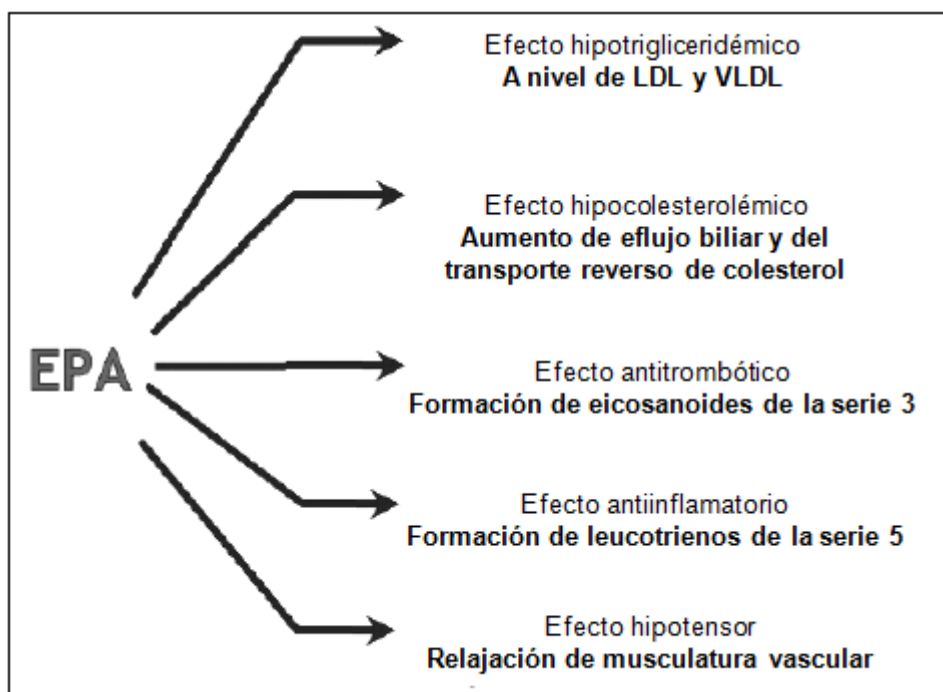


Figura 3. Beneficios derivados del consumo de ácido eicosapentanoico (EPA) en la salud cardiovascular (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

El consumo de DHA es fundamental para la formación y función del sistema nervioso y visual de los humanos y mamíferos en general, ya que permite el trabajo neuronal, particularmente en las funciones de aprendizaje y de memorización, con lo cual el DHA está muy vinculado con el desarrollo de la inteligencia de las personas. La Figura 4 resume los beneficios derivados del consumo de DHA (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

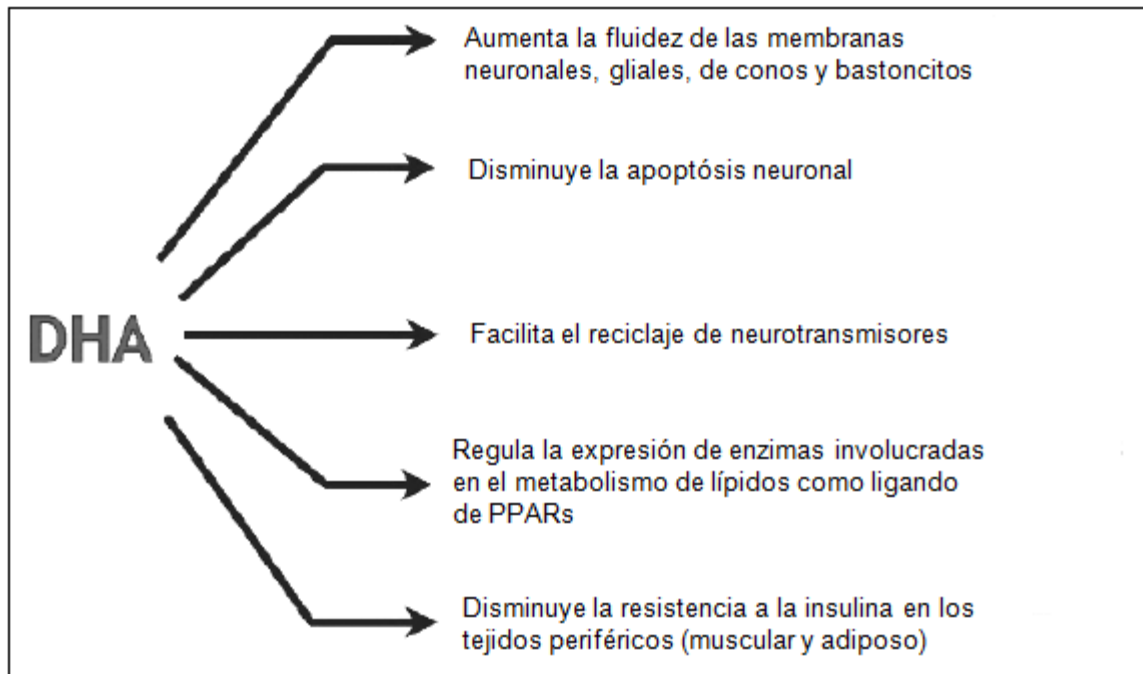


Figura 4. Beneficios derivados del consumo de ácido docosahexanóico (DHA) en la función del sistema nervioso y visual (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

Las recomendaciones de consumo de EPA y DHA aún no están del todo establecidas ya que en diferentes países se han estimado cantidades distintas. Sin embargo, FAO/OMS recomiendan un consumo diario de al menos 500 mg/día de EPA + DHA en los adultos (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

Antioxidantes

Un antioxidante, es una molécula capaz de retardar la oxidación de otras moléculas (Castañeda y col., 2008). De acuerdo a la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), los antioxidantes son sustancias utilizadas para preservar el alimento retardando su deterioro, rancidez o decoloración debido a la oxidación. Estas sustancias pueden encontrarse naturalmente en los alimentos, pero pueden también ser añadidos intencionalmente a los productos durante el procesamiento. Su papel no es mejorar la calidad de los alimentos, sino mantener la calidad de los mismos e incrementar su vida de anaquel (Castillo, 2010).

La eficacia de los antioxidantes depende de su reactividad química (como aceptores de radicales o como quelantes de metales), su potencial de redox, sus interacciones con otros componentes del alimento, las condiciones del entorno (pH, concentración) y la localización física del antioxidante en diferentes sistemas alimentarios (Choe y Min, 2009).

Los antioxidantes contienen uno o más grupos hidroxilo que actúan en la iniciación y propagación de la oxidación al ceder un átomo de hidrógeno a los radicales ácido graso (R^\bullet) y a los hidroperóxidos (ROO^\bullet), restaurando el ácido (RH) y el hidroperóxido ($ROOH$) (Figura 5).

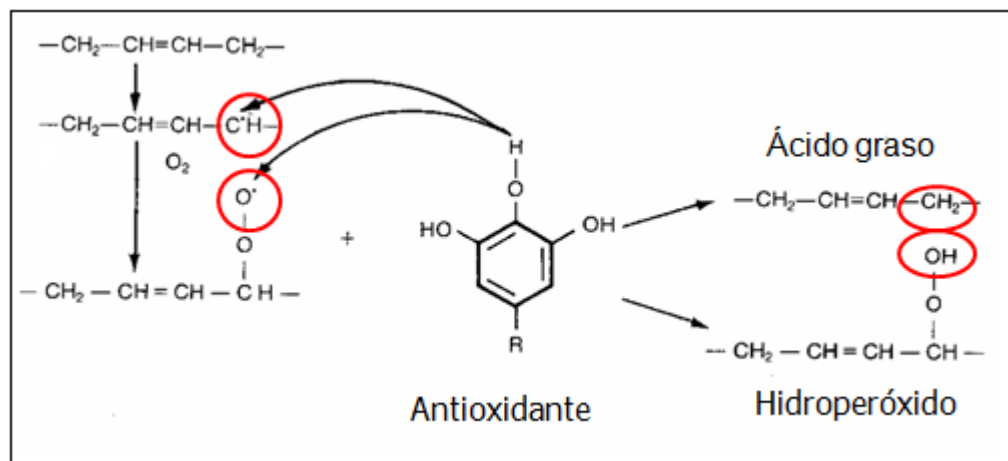


Figura 5. Mecanismo de acción antioxidante sobre radicales (Badui, 2006).

De acuerdo a su mecanismo de acción, los antioxidantes son de dos tipos: primarios (interruptores de cadena) y secundarios (preventivos o sinergistas). Los antioxidantes primarios terminan la reacción en cadena de radicales libres al donar hidrógenos o electrones ya sea a los radicales libres ácido graso R^\bullet en la fase de iniciación de la autooxidación regenerando así la molécula de ácido graso RH o a los radicales peróxido ROO^\bullet en la fase de propagación antes de que reaccionen con otra molécula de ácido graso y el ciclo se repita; estos antioxidantes son efectivos a concentraciones muy bajas y a concentraciones altas pueden actuar como prooxidantes. Los antioxidantes secundarios son compuestos que retardan la velocidad de iniciación de la reacción en cadena por varios mecanismos: quelando metales, absorbiendo oxígeno, descomponiendo hidroperóxidos a productos no radicales, absorbiendo la luz UV, desactivando al oxígeno singulete y/o regenerando antioxidantes primarios; por lo general necesitan la presencia de un antioxidante primario para su efecto (Choe y Min, 2009).

Los antioxidantes deben satisfacer varios requisitos antes de ser aceptados para su incorporación en alimentos. El antioxidante debe ser barato, no tóxico, efectivo a concentraciones bajas, estable a procesamiento térmico, no debe impartir color, olor ni sabor, debe ser soluble en grasas, debe ser efectivo al menos un año a temperaturas de 25-30°C y debe incorporarse fácilmente (Akoh y Min, 2002).

Antioxidantes Sintéticos

Los antioxidantes más comúnmente empleados en la industria alimentaria son los sintéticos debido a que son más efectivos y económicos que los antioxidantes naturales. Entre los antioxidantes sintéticos más comunes aprobados para su uso en alimentos se encuentran los compuestos fenólicos BHT, Butilidroxianisol (BHA), Terbutilidroxiquinona (TBHQ) y el Galato de Propilo (GP) (Figura 6). Los compuestos fenólicos representan algunos de los antioxidantes más antiguos y más frecuentemente utilizados en alimentos y las diferencias en su actividad antioxidante son debidas a las variaciones en sus estructuras que directamente influyen sus propiedades físicas como volatilidad, solubilidad y estabilidad térmica (Choe y Min, 2009).

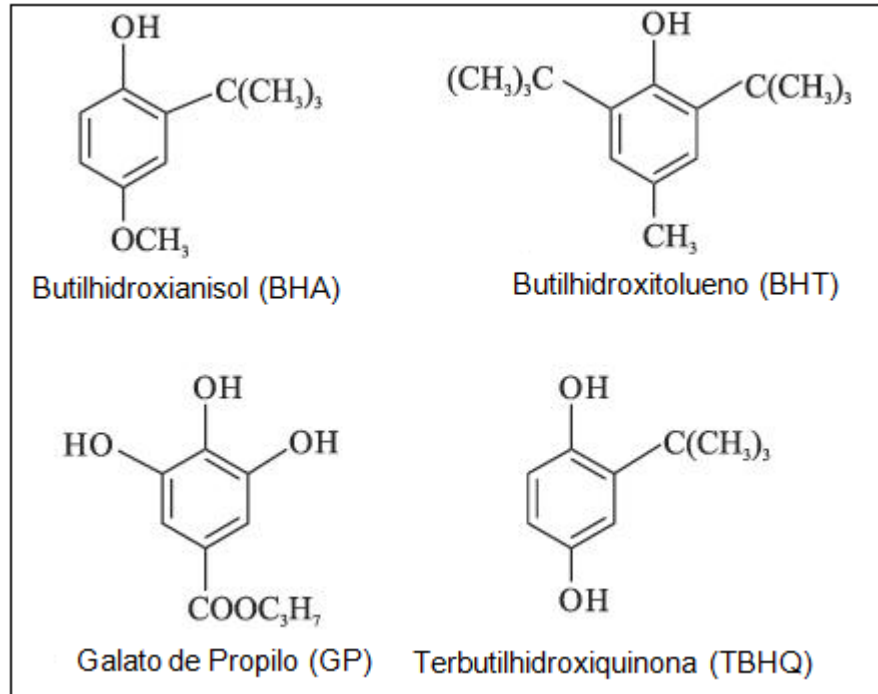


Figura 6. Estructuras de antioxidantes sintéticos comúnmente utilizados en alimentos (Akoh y Min, 2008).

Los fenoles en los que el anillo aromático contiene grupos alquilo (fenoles impedidos) son antioxidantes extremadamente efectivos. Los antioxidantes sintéticos son propiamente donadores de protones, no detienen la formación de los radicales, si no que reaccionan con ellos, los estabilizan y producen radicales del antioxidante menos activos; es decir, se consumen la reacción y, por lo tanto, la estabilidad del lípido siempre va a depender de la cantidad residual del antioxidante (Badui, 2006).

Las características del alimento determinan la selección del antioxidante a utilizar, por ejemplo, el BHT es uno de los más antiguos y posee un costo relativamente bajo. Tiene una apariencia de un polvo blanco cristalino, liposoluble menos estable que el BHA a procesamientos y a altas temperaturas se volatiliza. Se emplea en productos bajos en grasas, productos marinos, materiales de envase, parafina y aceites minerales; actúa mejor en grasas animales que en vegetales y no es muy activo en aceites vegetales refinados. Comúnmente se emplea en combinación con otros antioxidantes como el BHA, el GP y el ácido cítrico para estabilizar aceites y alimentos altos en grasa (Akoh y Min, 2002; Badui, 2006).

El BHA es un sólido blanco y ceroso, que contiene un solo hidroxilo al igual que el BHT, es hidrofóbico y muy lipofílico; es efectivo para prevenir la oxidación de grasas animales y pigmentos liposolubles, pero inefectivo para las grasas vegetales. Es estable al horneado pero en el freído se volatiliza y desprende olores fenólicos; comúnmente se adiciona a los materiales de envase (Akoh y Min, 2002; Badui, 2006).

El TBHQ es un polvo beige cristalino, por presentar dos grupos hidroxilos es un poco más hidrosoluble que los anteriores y es el antioxidante más efectivo para los aceites insaturados (soya, canola, algodón, cártamo) y los usados en frituras, también se emplea en la confitería. Muestra un excelente sinergismo con el ácido cítrico en aceites vegetales. El uso del TBHQ en alimentos no está permitido en Canadá ni en la Comunidad Económica Europea debido a falta de información adecuada sobre su toxicología (Akoh y Min, 2002; Badui, 2006).

El GP es un polvo blanco cristalino que por contener tres hidroxilos es más hidrosoluble que los antioxidantes antes mencionados. Son inestables a temperaturas mayores de 180°C, por lo que no se recomienda su uso en aceites de fritura ni en productos horneados. Se emplean en conjunto con BHT y BHA para reforzar la actividad de los últimos. Sin embargo, en ciertas ocasiones pueden llegar a formar complejos coloridos en presencia de iones metálicos (principalmente hierro y cobre), afectando la apariencia del producto (Akoh y Min, 2002; Badui, 2006).

La adición de antioxidantes sintéticos directamente en un alimento está regulada por agencias gubernamentales, y generalmente está limitada a 200 ppm de peso graso cuando se emplea una mezcla de antioxidantes, y en el caso de utilizarse uno solo, por ejemplo BHT, no debe exceder 100 ppm (Akoh y Min, 2008; Wessling, 2000).

Antioxidantes Naturales

Los antioxidantes sintéticos han demostrado ser efectivos al prevenir la oxidación en los alimentos, sin embargo, los consumidores muestran en la actualidad una preocupación cada vez mayor sobre la seguridad de sus alimentos y sobre sus efectos potenciales de aditivos sintéticos en su salud. A pesar de su eficacia superior, menor costo y alta estabilidad, la

sospecha de que estos compuestos puedan actuar como promotores de la carcinogenicidad ha llevado a un decremento en su uso. Esto aunado al hecho de que la síntesis de novedosos antioxidantes para su uso en alimentos se ve limitada debido a los crecientes costos de investigación y a los asociados al aseguramiento de su inocuidad y al tiempo requerido para obtener aprobación regulatoria como aditivos, lo cual ha llevado a la industria a considerar materiales naturales como fuente de antioxidantes novedosos (Akoh y Min, 2002).

Una amplia investigación se ha dedicado en los últimos años a la identificación de antioxidantes a partir de varias fuentes naturales. Los antioxidantes naturales más utilizados comercialmente en alimentos son los tocoferoles, compuestos monofenólicos que presentan alta solubilidad en aceites, siendo los antioxidantes más importantes presentes naturalmente en aceites y grasas comestibles. Entre los tocoferoles, el de mayor importancia es el α -tocoferol, que es la forma más activa de la vitamina E.

El ácido ascórbico o vitamina C se encuentra en la naturaleza como componente de tejidos de plantas y es producido sintéticamente en grandes cantidades. El ácido ascórbico es atractivo como antioxidante debido a que tiene estatus Generalmente Reconocido Como Seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) y no tiene límite en uso, al igual que el tocoferol. En los alimentos, el ácido ascórbico es un antioxidante secundario con múltiples funciones: absorbe oxígeno, cambia el potencial redox de los sistemas alimentarios reduciendo el rango, actúa sinérgicamente con quelantes y regenera antioxidantes primarios (Akoh y Min, 2002).

Adicionalmente, existen compuestos fenólicos presentes en fuentes vegetales denominados catequinas, que son flavonoides que en años recientes han atraído la atención en relación a su papel fisiológico como agentes antimutagénicos y antitumorígenos. Además, han sido reconocidos como antioxidantes eficientes. Su mecanismo de acción propuesto es que actúan atrapando radicales de oxígeno y quelando iones metálicos. Su actividad antioxidante en sistemas modelo de pescado ha sido comparada a la de otros antioxidantes sintéticos y naturales. Los resultados sugieren que sus propiedades antioxidantes se deben a su capacidad de quelar fierro. La amplia hidroxilación de los flavonoides fue también importante para explicar su eficacia (Castillo, 2010).

Algunos ejemplos de estudios donde se han empleado catequinas como antioxidantes es el estudio realizado por Nieto y col. (1993) donde se comparó el efecto antioxidante de seis

flavonoides comerciales respecto al efecto de α -tocoferol, BHT y BHA, en la oxidación de aceite de sardina a 60°C, mostrando tres de ellos, incluyendo la catequina, un fuerte efecto antioxidante, mayor a los antioxidantes de referencia. En un estudio realizado por Roeding-Penman y Gordon (1997) se evaluó el efecto antioxidante de un extracto de té y BHT en emulsiones de aceite en agua durante su almacenamiento a 30°C por 40 días y se encontró que el antioxidante natural mostró una actividad similar a la del BHT. Asimismo, en un estudio realizado por Mildner y col. (2009), los compuestos fenólicos del extracto de té verde mostraron actividad antioxidante (evaluada por DPPH) elevada (mayor a BHT) al adicionarse a galletas almacenadas a 60°C, además de que un extracto de té verde al 1% mostró un efecto excelente para inhibir la formación de hidroperóxidos en la fracción lipídica de galletas, comparado con BHA 0.02% (47-73% vs 16-60% de inhibición).

Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en alimentos, entre otros. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidas en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana.

La quercetina y la catequina son compuestos fenólicos que se encuentran comúnmente en plantas comestibles. Se ha informado que tienen múltiples efectos biológicos, incluyendo alta actividad antioxidante. La actividad antioxidante de compuestos fenólicos se atribuye a su habilidad para donar átomos de hidrógeno o electrones o quelar cationes metálicos como resultado de su estructura química. Además de su carácter antioxidante, estos dos flavonoides poseen las siguientes características que pudieran resultar benéficas en aplicaciones de envasado activo:

1. No son volátiles, reduciendo la pérdida del agente durante el proceso de elaboración de envases, como ocurre con otros compuestos como BHT o carvacrol.
2. Podrían proteger el polímero durante el proceso de extrusión y, además,

3. Su liberación en alimentos aumenta el contenido de compuestos bioactivos del producto en lugar de representar un riesgo toxicológico, como ocurre con los antioxidantes sintéticos (López de Dicastillo y col., 2010).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilos y superóxidos, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenil-piranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura 7) (Martínez y col., 2002).

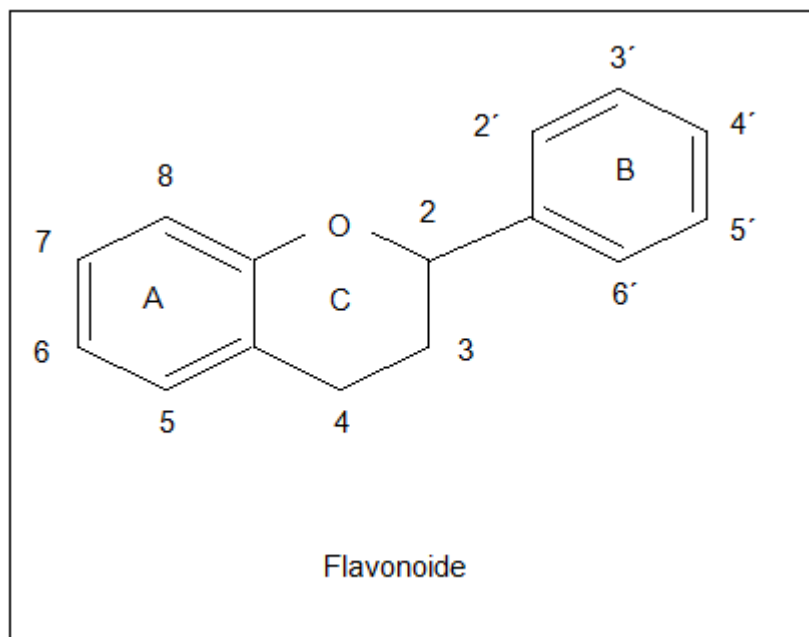


Figura 7. Estructura básica de un flavonoide (Martínez y col., 2002).

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo –OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Figura 8).

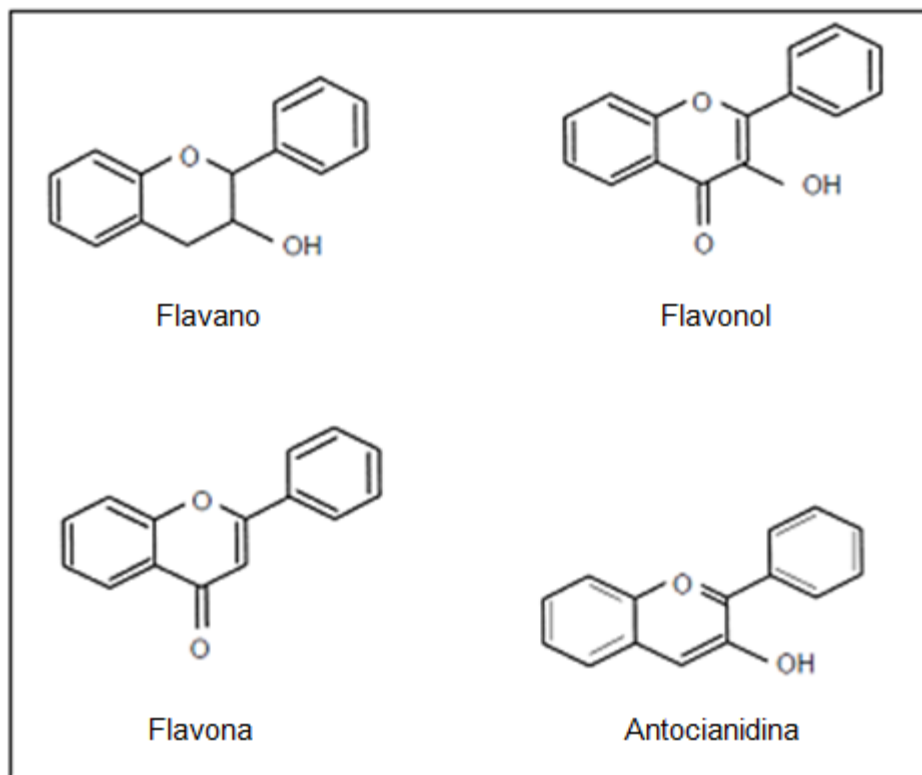


Figura 8. Tipos de flavonoides (Martínez y col., 2002).

Dentro de cada una de estas divisiones de los flavonoides se pueden encontrar subdivisiones, como es el caso de las catequinas (flavanos), de los cuales se tienen 4 tipos principales: 1. (-) - Galocatequina (GC), 2. (-) - Epicatequina (EC), 3. (-) - Epigalocatequina (EGC) y 4. (-) - Galato de Epigalocatequina (GEGC) (López de Dicastillo y col., 2011). La

fuerza más importante de catequinas son el té verde y el té negro, aunque también se encuentran en productos como la uva, manzana, cereza, durazno, frambuesa, granada, cacao.

Miles de moléculas que presentan estructura polifenólica han sido identificadas en plantas superiores y cientos de ellas se encuentran en plantas comestibles. Los compuestos fenólicos son constituyentes regulares de la alimentación humana. Las fuentes más ricas son las frutas, bebidas como el té (negro y verde), café, vino y los jugos de frutas, y en menor grado hortalizas, cereales y leguminosas (Pollorena, 2012).

El Extracto de Té Verde (ETV) es una gran fuente de flavonoides que puede ser utilizado como aditivo alimentario. Rietveld y Wiseman (2003), Graham (1992), Pedrielli y col. (2001) y Lambert y col. (2010) han reportado que poseen actividad antiviral, antialérgica, antiinflamatorias, antitumorales y antioxidante. Komatsu y col. (2003) demostraron que los componentes del té oolong mejoraron el gasto energético en mujeres japonesas.

En diferentes estudios se ha incorporado el ETV en alimentos para extender su vida útil, resultando en la protección del alimento sin percibir un cambio en el color u olor. Martín y col. (2008) evaluaron el extracto de té verde como un tratamiento conservador para lechuga fresca cortada almacenada a 20°C al evaluar marcadores de calidad mostrando una mayor capacidad antioxidante en comparación con cloro. Wanasundara y Shahidi (1998) utilizaron el extracto de té verde en aceite obtenido de dos especies diferentes durante su almacenamiento a 65°C y monitorearon la progresión de la oxidación mediante el valor de peróxidos y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, mostrando un efecto pro-oxidante en ambos aceites examinados. Gramza y Regula (2007) realizaron un estudio para investigar el posible uso de polifenoles de extractos de té verde y negro (*Camellia sinensis*) en caramelos de gelatina en una concentración de 1.0% y 1.5%, analizando su sabor, color, consistencia y aceptación general del consumidor para incluirlos en la dieta humana como un factor importante en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, neoplásicas y disminución de los procesos de envejecimiento y reportó la aceptación por los consumidores como componentes de alimentos (López de Dicastillo y col., 2011).

Envasado Activo

El envasado es uno de los métodos de conservación más importantes para mantener la calidad de productos alimentarios durante su almacenamiento, transporte y uso final, previniendo el deterioro de la calidad y facilitando la distribución y el mercadeo (Kelsey, 1985). Distintas fuentes identifican diversas funciones atribuidas a los sistemas de envasado, pero su función principal sigue siendo lograr la preservación y entrega segura de productos alimentarios hasta su consumo. Durante su distribución, la calidad de un alimento puede deteriorarse biológica, química y físicamente, y en consecuencia, el envasado de alimentos contribuye a la extensión de la vida de anaquel y al mantenimiento de la calidad y la seguridad de los productos alimentarios (Han, 2005).

De manera tradicional, se espera que el envasado ayude en el mantenimiento de la calidad de los alimentos en el nivel alcanzado en la etapa final de procesamiento. En la práctica, la calidad decrece durante el almacenamiento ya envasado, debido en parte a que la combinación del proceso y material de envasado no cumplen exactamente los requerimientos específicos de cada alimento o bebida. Normalmente se ha esperado que el envasado sea inerte en relación al producto, sin embargo el envase puede contribuir a la retención de calidad del alimento (Rooney, 2005). La exploración de este potencial fue lo que dio origen a lo que hoy conocemos como envasado activo de alimentos. Los envases tradicionales de alimentos son barreras pasivas diseñadas para retardar los efectos adversos del ambiente sobre el producto; el envase activo, por su parte, permite al envase interactuar con el alimento y el ambiente y jugar un papel dinámico en la preservación del alimento (Brody y col., 2008).

Los mecanismos más frecuentes de deterioro de alimentos son la descomposición microbiana y la oxidación. Los envases activos pueden contribuir a la preservación de alimentos perecederos que son sensibles a estos tipos de daños. En particular, en el segundo caso, los antioxidantes pueden ser incorporados a las películas plásticas y ser liberados para proteger a los alimentos de la degradación oxidativa (Lee, 2005). El uso de este tipo de envases activos ha sido reportado en diversos alimentos como leche en polvo (Soto y col., 2011) con excelentes resultados en cuanto a la protección del producto contra la oxidación lipídica. Del mismo modo, se ha estudiado el efecto protector en filetes de pescado fresco (*Scomberomorus sierra*) empacados con película de PEBD adicionado con BHT (Torres y col., 2009).

Una de las tendencias actuales en aplicaciones de alimentos, es sustituir el uso de antioxidantes sintéticos por naturales, tanto en la incorporación directa al alimento como en el envasado activo, tal como lo reportado por López de Dicastillo y col. (2012) en donde el ETV incorporado a películas de Etilen Vinil Alcohol (EVOH) reportó un mejor comportamiento en comparación con la quercetina y el ácido ascórbico para proteger a sardina entera de la oxidación lipídica. Del mismo modo, algunos estudios iniciales han demostrado que compuestos polifenólicos naturales tales como catequina o epicatequina pueden reemplazar antioxidantes sintéticos en envases para su protección (López de Dicastillo y col., 2010).

Materiales Plásticos Empleados en Envases

Los plásticos son materiales sintéticos fabricados a partir de derivados del petróleo. Están formados por largas cadenas de unidades repetitivas (monómeros), las cuales pueden ser lineales, ramificadas o en forma de red (Morton, 2007). Las unidades monoméricas pueden ser de diferente naturaleza química, originando múltiples tipos de plásticos que pueden ser empleados en el envasado de alimentos. Estos materiales poliméricos incluyen a poliolefinas, poliésteres, Cloruro de Polivinilo (PVC), Cloruro de Polivinilideno (PVDC), Poliestireno (PS), Poliamida (PA) y EVOH (Marsh y Bugusu, 2007).

Las poliolefinas incluyen a su vez al PEBD, Polietileno de Alta Densidad (PEAD), Polietileno Lineal de Baja Densidad (PELBD) y Polipropileno (PP). Las polioleofinas son los plásticos más comunes y económicos a nivel comercial. En el envasado de alimentos estas poliolefinas, son ampliamente utilizadas como capas resistentes a la humedad, mientras que las Poliamidas (PA) y polímeros como el copolímeros de EVOH se utilizan debido a su excelente característica de barrera de oxígeno (Villalpando y col., 1999).

Entre los polímeros de mayor uso en aplicaciones de envasado de alimentos e industriales, se tiene el PEBD, el cual se elabora por polimerización de adición del etileno. El PEBD es extremadamente versátil, se caracteriza por ser flexible, fuerte, duro, fácil de sellar, y resistente a la humedad. Sus aplicaciones son muy variadas, debido a sus propiedades se emplea en la protección de cultivos de agricultura, en aislamientos térmicos en la construcción, en recubrimientos sobre papel y en tuberías de baja presión, siendo esta última aplicación de

gran importancia para la agricultura (Albano y col., 2001). El PEBD es el principal polímero usado en el envasado de alimentos en forma de película y moldeado por sople, debido a su bajo costo (Robertson, 2006), su buena transparencia y alta resistencia a la elongación, buena barrera a la humedad y baja barrera a los gases. Este polímero es utilizado principalmente para la fabricación de bolsas y en aplicaciones donde se requiere como material de sellado.

Clasificación de Polímeros

Los polímeros se clasifican como homopolímeros y copolímeros dependiendo del tipo de unidad repetitiva que se presenta en el polímero. Los homopolímeros incluyen a todos aquellos polímeros formados por solo una clase de unidad estructural, mientras que los copolímeros son los polímeros constituidos por dos o más clases de unidades monoméricas. En un copolímero los monómeros se pueden ubicar en diferentes posiciones, por lo que se clasifican a su vez en de bloques, aleatorios y de injerto (Alvarado, 2008).

Copolímeros

Aleatorio. Los copolímeros se denominan alternados o aleatorios si hay una alternancia entre las unidades monoméricas (Ramos y col., 2003).

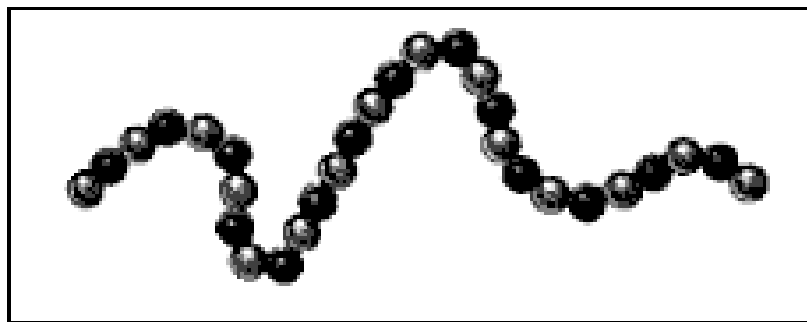


Figura 9. Copolímero Aleatorio (Ramos y col., 2003).

En bloque. De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) los copolímeros en bloques son sustancias formadas por macromoléculas constituidas por bloques dispuestos en una secuencia lineal. Para este organismo, un bloque es una porción de una macromolécula, que comprende varias unidades constitutivas, que tiene al menos una característica que no está presente en las porciones adyacentes (Pasquali y col., 2005).

Existen copolímeros formados por dos o por tres bloques, los que se suelen simbolizar, respectivamente, como AB y ABA o BAB, donde A y B son los bloques poliméricos (Figura 10). También son posibles copolímeros en bloques constituidos por la repetición de unidades formadas por dos bloques, $(AB)_n$ y por la incorporación a un polímero de dos bloques de una tercera cadena (ABC) (Pasquali y col., 2005).

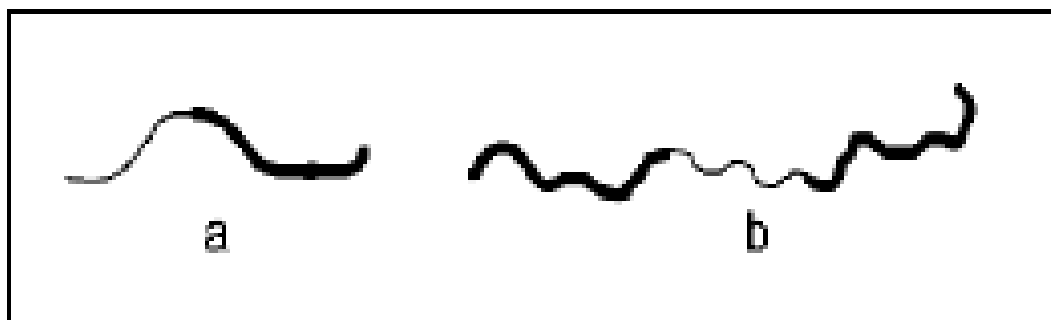


Figura 10. Copolímero en dibloque (a) y tribloque (b) (Pasquali y col., 2005).

De injerto. Los copolímeros injertados están constituidos por macromoléculas con uno o más tipos de bloques conectados a una cadena principal formando cadenas laterales; estas cadenas laterales tienen características constitutivas o configuracionales diferentes a las de la cadena principal (Figura 11) (Pasquali y col., 2005).

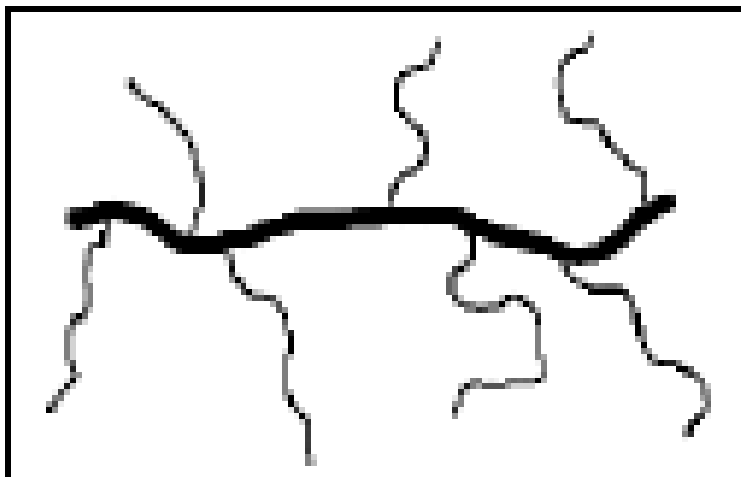


Figura 11. Copolímero de Injerto (Pasquali y col., 2005).

Películas Compatibilizadas y su Aplicación en el Desarrollo de Envases Activos

Las mezclas de polímeros permiten la obtención de nuevos materiales con mejores características que los materiales individuales. Actualmente ha resurgido un interés en desarrollar nuevos materiales poliméricos a partir de la combinación de los que se tienen disponibles comercialmente. El mayor problema de las mezclas poliméricas, es la inmiscibilidad debida a su escasa compatibilidad, por lo que se obtienen mezclas poliméricas heterogéneas que presentan pobres propiedades mecánicas, como resultado de la débil adhesión entre las fases. Una estrategia para mejorar la miscibilidad de estas mezclas es su compatibilización mediante la adición de un tercer componente, en la mayoría de los casos, copolímeros de bloque o de injerto. Los copolímeros de injerto pueden ubicarse en la interfase polímero-polímero, reduciendo la tensión interfacial e intensificando las interacciones entre los polímeros. Lo anterior permite la obtención de una dispersión fina de la mezcla polimérica que repercute en mejores propiedades de los materiales obtenidos (Inciarte y Oliva, 2011).

La funcionalización de poliolefinas con monómeros polares ha despertado un interés creciente en las últimas décadas. La funcionalización de poliolefinas se puede definir como la adición de grupos polares a la poliolefina, con el fin de obtener un compuesto que pueda mejorar la miscibilidad de mezclas de poliolefinas con polímeros polares, como el EVOH, con el

objetivo de producir nuevos materiales con propiedades tecnológicas mejoradas (Rojas de Gáscue y col., 2005).

La selección del monómero a ser injertado en la poliolefina, que generará el agente compatibilizante, debe hacerse considerando que el mismo sea insaturado, polar y estable a la temperatura de las reacciones y de funcionalización, además de que sea soluble en el medio de reacción. Entre los diferentes compuestos que se han utilizado se reportan compuestos de bajo peso molecular derivados de ácidos orgánicos polares como los maleatos, fumaratos y anhídridos, así como moléculas más reactivas que puedan introducir grupos hidroxilo dentro de la cadena como el ácido acrílico (Rojas de Gáscue y col., 2005).

Con la finalidad de obtener películas de PEBD con mejores propiedades, se han realizado mezclas de éstas y otras poliolefinas, las cuales son compatibilizadas con diferentes compuestos como el copolímero de injerto a base de PEBD modificado con anhídrido maleico (LDPEgMA) (Figura 12). Estos compuestos compatibilizantes poseen grupos polares que permiten promover interacciones moleculares entre los componentes de la mezcla y resolver en gran parte estas dificultades de incompatibilidad al mejorar la afinidad de los componentes, lográndose obtener un material que permite aprovechar propiedades particulares de cada polímero (Abdul y col., 2010). En cuanto al nivel de uso del agente compatibilizante, la mayoría de los autores utilizan proporciones del 10% en peso del agente compatibilizante respecto a la poliolefina (Rojas de Gáscue y col., 2005).

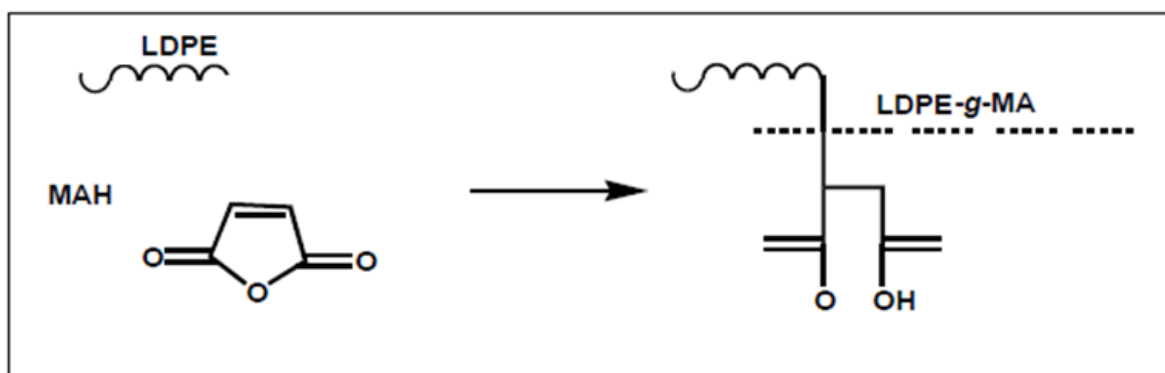


Figura 12. Copolímero de injerto a base de PEBD modificado con anhídrido maleico (LDPEgMA) (Abdul y col., 2010).

En el caso del envasado activo, una dificultad técnica que se presenta al seleccionar un compuesto para su incorporación en el material activo, es su naturaleza química, la cual determina la compatibilidad con el material polimérico y en consecuencia, la efectividad del sistema activo desarrollado. En diferentes estudios de envases activos, particularmente antimicrobianos, se ha reportado una reducida capacidad de los compuestos antimicrobianos en contacto con alimentos o modelos alimenticios (Joerger, 2007). Lo anterior se ha atribuido a una limitada migración del compuesto adicionado al envase debido a la incompatibilidad del agente con el material de envasado (Ha y col., 2001; Leung y col., 2003; Matche y col., 2006; Supakkul y col., 2003; Weng y Hotchkiss, 1992).

En diferentes desarrollos de envases activos, se han incorporado compuestos compatibilizantes como el copolímero de polietileno con ácido metacrílico, copolímero de polietileno-ácido acrílico y copolímero en base a poliamida con la finalidad de incrementar la afinidad entre el material base y el componente activo encontrándose mayor actividad antimicrobiana de las películas modificadas que las de referencia sin compatibilizar (Ha y col., 2001; Matche y col., 2006; Weng y col., 1998).

En el caso de envases activos antioxidantes aún no se encuentran reportes del efecto de la compatibilización en este tipo de reacciones deteriorativas. El principal y más económico material polimérico empleado para el envasado de alimentos, es el PEBD, el cual es de naturaleza no polar. Una característica común entre los diferentes compuestos activos antioxidantes empleados en estos sistemas, es su naturaleza polar, de aquí la importancia de desarrollar sistemas de envasado que permitan mejorar la afinidad de estos componentes.

Evaluación de la Oxidación Lipídica

La industria alimentaria requiere de métodos sistemáticos para la determinación de la oxidación de lípidos, como condición imprescindible para llevar a cabo con seguridad un buen control de calidad; éstos varían desde las evaluaciones sensoriales sencillas, hasta análisis químicos (IP, TBARS, método de carbonilos totales, índice de anisidina) o físicos (métodos de fluorescencia, espectroscopía infrarroja y cromatografía de gases) algunos de los cuales pueden requerir de instrumentos muy complejos (Badui, 2006). Estos métodos detectan productos de la oxidación

lipídica generados en diferentes etapas de esta reacción de deterioro. Debido a lo anterior, suele emplearse al menos dos técnicas analíticas para evaluar el grado de oxidación de un producto.

Dienos Conjugados

Los productos de la autooxidación de grasas y aceites muestran espectros característicos en la región Ultravioleta (UV). Los dobles enlaces en los ácidos grasos insaturados cambian de posición durante el curso de la oxidación lipídica y resultan en la formación de dienos conjugados (Figura 13), debido a la isomerización y conjugación formada, que muestran una intensidad de absorción a 233 nm (Shahidi, 1997).

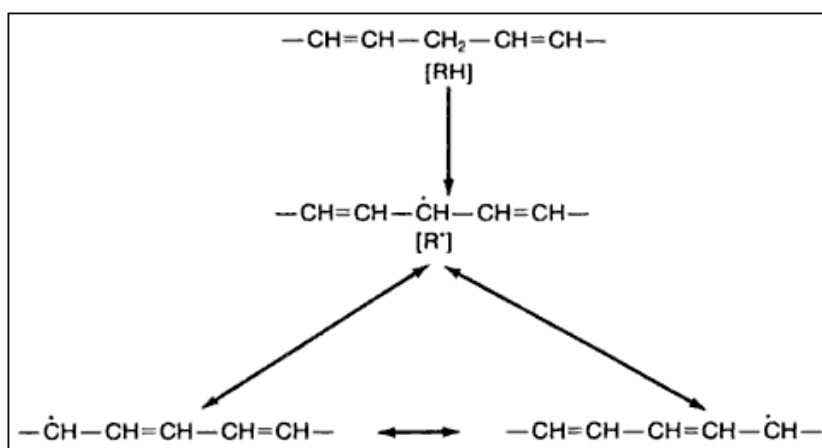


Figura 13. Estructura de dienos conjugado (Badui, 2006).

Índice de Peróxidos

Los peróxidos son intermediarios primarios de la autooxidación de lípidos, y su determinación es útil para monitorear la oxidación en etapas tempranas. Los métodos estándar para su determinación se basan en su habilidad de liberar yodo a partir de yoduro de potasio o de oxidar iones ferrosos a iones férricos.

Debido a que los peróxidos están sujetos a reacciones secundarias de degradación, el método está limitado solo a las primeras etapas de la oxidación, en donde los peróxidos alcanzan una concentración máxima que después disminuye debido a su descomposición; es decir, al estudiar una grasa demasiado oxidada, es probable que este índice sea bajo, a pesar de que el olor sea característico de reacciones muy avanzadas. Este análisis es poco exacto en productos deshidratados y en aquellos que tienen un contenido bajo de lípidos (Badui, 2006).

En virtud de que en la literatura científica hay varios métodos similares basados en el mismo principio, en ocasiones, se dificulta la interpretación y la comparación de los resultados; siempre que se haga un análisis de esta índole se debe mencionar el procedimiento que se ha utilizado y, si es posible, las condiciones en que se efectuó (Badui, 2006).

Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico

Esta prueba se basa en la formación de un complejo color rojo después de la reacción entre dos moléculas de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) y una molécula de Malonaldehído (MA), un dialdehído que se produce durante la oxidación de ácidos grasos con tres o más dobles ligaduras (Figura 14). El complejo formado presenta una absorción máxima a 530 nm y su presencia se determina mediante espectroscopía. Esta determinación es útil para monitorear la oxidación en etapas avanzadas.

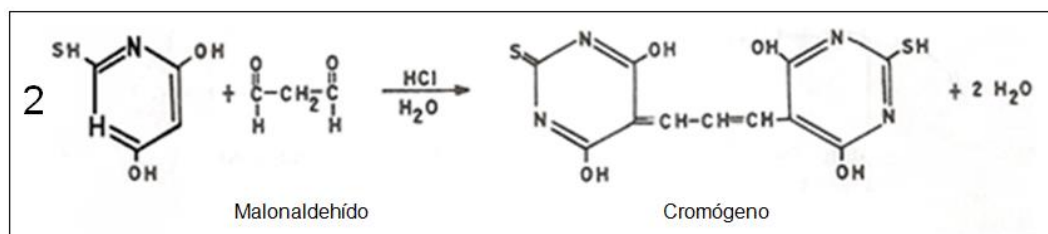


Figura 14. Cromógeno formado por dos moléculas de TBA y una molécula de MA (Badui, 2006).

Evaluación de la Actividad Antioxidante

Las pruebas para evaluar el efecto antioxidante en alimentos y sistemas biológicos pueden clasificarse en dos grupos: análisis para evaluar la oxidación lipídica y análisis para medir la capacidad de secuestrar radicales libres (cualquier especie química que posee uno o más electrones desapareados y es capaz de existir independientemente), también denominada como capacidad antioxidante.

En la primera de éstas se emplea un sustrato lipídico bajo condiciones controladas y se evalúa el grado de inhibición de la oxidación, mediante métodos como DC, IP y TBARS, la principal desventaja de estos métodos es que implican que el alimento debe presentar oxidación para ser evidente su estatus oxidativo. El segundo grupo, incluye técnicas como DPPH y ABTS, que se caracterizan por formar soluciones coloridas, que permiten evaluar la capacidad de antioxidantes para estabilizar radicales libres monitoreando la inhibición de la oxidación de un sustrato adecuado, lo cual se hace evidente mediante la decoloración de la solución. Después de que el sustrato se oxida bajo condiciones estándar se mide, principalmente por métodos espectrofotométricos. Por lo tanto, para estas últimas pruebas se requiere de un sustrato adecuado, un iniciador de oxidación y un monitoreo del punto final (Sánchez, 2002).

Prueba de ABTS

El ensayo de ABTS está basado en la inhibición del radical catión 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (Figura 15) por antioxidantes. En este ensayo, el ABTS se oxida por radicales peróxido u otros oxidantes originando el radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$, que es intensamente colorido y la capacidad antioxidante es medida como la capacidad del compuesto de prueba (el antioxidante) para disminuir el color, reaccionando directamente con el radical $ABTS^{\bullet+}$ (Prior y col., 2005).

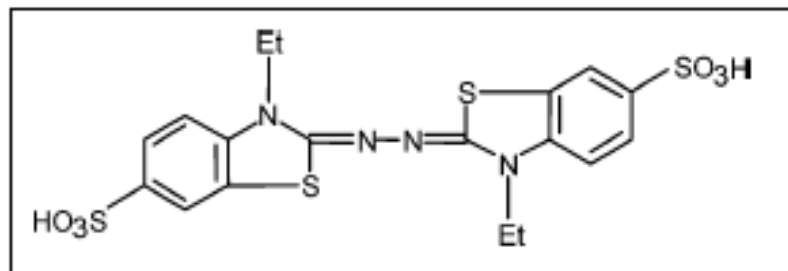


Figura 15. Estructura de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (Prior y col., 2005).

Originalmente, este ensayo usaba metamioglobina y H_2O_2 para generar ferromioglobina, la cual reaccionaría con el ABTS originando el radical $ABTS^{\bullet+}$. La muestra a analizar se agregaba a la mitad de la reacción antes de que se formara el radical. Este orden de adición de reactivos en el ensayo fue altamente criticado, ya que los antioxidantes pueden reaccionar con agentes oxidantes propios y, por tanto, llevar a una sobreestimación de la capacidad antioxidante. Así, se propusieron los protocolos de "post-adición" para mejorar este ensayo. En estas versiones mejoradas, la muestra a analizar se añade después de la generación del radical $ABTS^{\bullet+}$, esperando minimizar la interferencia de compuestos con oxidantes durante la formación de radical y evitar la posible sobreestimación. Además de esta modificación, otras más fueron probadas en función del método utilizado para generar el radical $ABTS^{\bullet+}$, diferentes longitudes de onda y variaciones en los métodos de cuantificación reportados (Prior y col., 2005).

Según Cano y col. (2002), el radical $ABTS^{\bullet+}$ puede ser generado por reacción química entre el ABTS y compuestos como dióxido de manganeso, persulfato de potasio o reacciones enzimáticas (metamioglobina, hemoglobina o peroxidasa de rábano). En general, las reacciones químicas requieren mucho tiempo (por ejemplo, hasta 16 h para la generación del radical $ABTS^{\bullet+}$ empleando persulfato de potasio) o altas temperaturas, mientras que la generación enzimática es más rápida y las condiciones de reacción más leves. Cano y col. (1998) utilizaron peroxidasa de rábano para generar el radical $ABTS^{\bullet+}$ y demostraron que la reacción puede ser estudiada en un amplio rango de valores de pH. Esta variación se ha adaptado también para medir selectivamente antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos al ejecutar el ensayo en medio buffer y en solventes orgánicos, respectivamente, o por el uso de antioxidantes en mezclas entre hexano y solventes acuosos. Sin embargo, las reacciones solubles en agua parecen ser favorecidas (Prior y col., 2005).

Los valores máximos de absorción del radical $ABTS^{*\cdot}$ se encuentran en longitudes de onda de 415, 645, 734 y 815 nm. Entre éstas, las longitudes de onda de 415 y 734 nm han sido adoptadas por la mayoría de los investigadores para monitorear la reacción entre los antioxidantes y el radical $ABTS^{*\cdot}$, empleando espectrofotometría para evaluar la disminución de la absorbancia del radical en un tiempo fijo (Prior y col., 2005).

Prueba de DPPH

El radical $DPPH^{\cdot}$ (Figura 16), es un radical estable de nitrógeno orgánico, no tiene ninguna similitud con los radicales peróxido (altamente reactivos y transitorios) involucrados en la peroxidación. Se encuentra disponible comercialmente, por lo que esta prueba tiene la ventaja de que el radical no se tiene que generar durante el ensayo, como en la prueba de ABTS. Este ensayo se basa en la medición de la capacidad reductora de antioxidantes hacia el radical $DPPH^{\cdot}$. La capacidad antioxidante se evalúa mediante la disminución de su absorbancia.

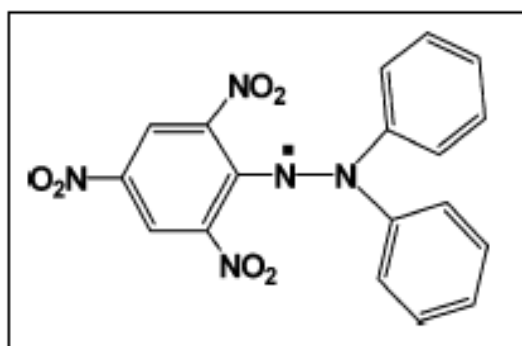


Figura 16. Estructura de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Prior y col., 2005).

El método se basa en la medición de la pérdida del color violeta característico del $DPPH^{\cdot}$, en presencia de un compuesto de prueba (antioxidante) evaluado a una longitud de onda de 515 nm. Lo anterior se fundamenta en que el radical $DPPH^{\cdot}$ tiene un electrón desapareado, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante (Figura 17) (Prior y col., 2005; Castañeda y col., 2008).

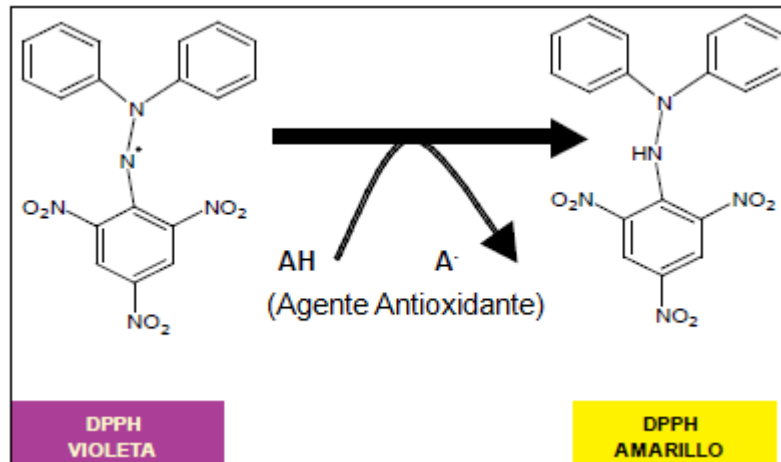


Figura 17. Método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Castañeda y col., 2008).

La prueba es simple, rápida y necesita sólo de un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible (UV-Vis) para realizarse, lo que probablemente explica su uso generalizado en evaluación de antioxidantes. Sin embargo, la interpretación es complicada cuando los compuestos de prueba tienen espectros que se superponen al radical DPPH• a 515 nm. Los carotenoides, en particular, interfieren. El ensayo no es una reacción competitiva ya que el radical DPPH actúa como oxidante y como radical de prueba. El color del DPPH puede perderse a través de una reacción radical o reducción, así como reacciones relacionadas, y la accesibilidad estérica es determinante en la reacción. Por lo tanto, las moléculas pequeñas que tienen mayor acceso al sitio activo del radical, tienen mayor capacidad antioxidante con esta prueba (Prior y col., 2005).

Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peróxido pueden reaccionar lentamente o incluso pueden ser inertes al radical DPPH debido a la inaccesibilidad estérica lo que también contribuye a interpretaciones inexactas (Prior y col., 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la elaboración de las películas se utilizó resina de PEBD (grado PX 20020X, PEMEX Petroquímicos, Coatzacoalcos, Ver., México), GEGC (Teavigo[®], 94% de pureza, DSM Nutritional Products México, México DF, México), BHT (Sigma-Aldrich B1378-5006, St. Louis, MO, USA), y compatibilizante (copolímero de PEBD-anhídrido maléico, LLDPEgMA, ADMER[®] grado NF498A, Mitsui Chemical America, Inc., New York, NY, USA). Para la evaluación de estabilidad oxidativa se empleó aceite de pescado refinado, libre de antioxidantes (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA).

Elaboración de las Películas

Las películas de PEBD se elaboraron por un proceso de extrusión utilizando una máquina extrusora para pequeños volúmenes de mezclas a nivel laboratorio (LME Laboratory Mixing Extruder, Atlas Polymer Evaluation Products, NJ, USA), a una temperatura de 160 °C en rotor y 180 °C para el cabezal y una velocidad del motor de salida de 120 rpm. Se prepararon películas por extrusión de pellets de PEBD previamente mezclados con los diferentes componentes de acuerdo a las diferentes formulaciones a realizar (Tabla 1), proporcionados por el Laboratorio de Investigación en Alimentos de la Universidad de Sonora. De igual manera se preparó una película compatibilizada (CBHT) y sin compatibilizar (SCBHT) con un antioxidante sintético de referencia conteniendo 1% (p/p) de BHT y una película libre de antioxidantes como película control. El espesor de las películas se determinó utilizando un micrómetro digital Fowler (Fred V. Fowler Company, Newton, MA, USA).

Tabla 1. Formulación de películas de PEBD a elaborar indicando su contenido de GECG y compatibilizante (COMP).

GECG (%)	Compatibilizante (%)	
	0	5
0	SC¹	C
1	SC1%	C1%
3	SC3%	C3%

¹Todas las películas contienen PEBD como material base.
C: Película de PEBD adicionada con 5% de compatibilizante.
SC1%: Película de PEBD adicionada con 1% de GECG, sin compatibilizante.
SC3%: Película de PEBD adicionada con 3% de GECG, sin compatibilizante.
C1%: Película de PEBD adicionada con 1% de GECG, con 5% de compatibilizante.
C3%: Película de PEBD adicionada con 3% de GECG, con 5% de compatibilizante.

Contenido de Galato de Epigallocatequina en Películas Plásticas

Se realizó la cuantificación de GEGC en las películas SC, SC1%, SC3%, C, C1% y C3% después de la extrusión para de esta manera calcular el porcentaje de degradación del antioxidante en las películas e igualmente conocer las cantidades reales presentes en las películas al momentos de evaluar su efecto antioxidante. Se llevó a cabo un método espectrofotométrico donde inicialmente se extrajo el GEGC de las películas plásticas para después leer su absorbancia a 280 nm, longitud de onda de máxima absorción reportada para GEGC (Lee y Lee, 2008). La extracción se realizó de acuerdo a lo recomendado por Bentayeb y col. (2007) para la extracción de compuestos fenólicos de películas plásticas, con algunas modificaciones: una muestra de películas de aproximadamente 0.12 g (1.4 x 25 cm), se puso en contacto con 60 mL de metanol en frascos de vidrio tapados y protegidos de la luz durante 24 hrs, y posteriormente se obtuvo la absorbancia a 280 nm del extracto y los valores de GEGC fueron calculados a partir de una curva estándar en base a GEGC (Teavigo®) (Anexo 1). Para cada muestra, el proceso de extracción fue repetido hasta en 4 ocasiones (período tras el cual se garantizó la extracción total de GEGC), sumando los valores de GEGC obtenidos en cada ocasión. El análisis se realizó por triplicado.

Evaluación de la Oxidación Lipídica de Aceite de Pescado

Con la finalidad de evaluar el efecto antioxidante de las películas elaboradas se determinó la estabilidad oxidativa de aceite de pescado, libre de antioxidantes, bajo diferentes condiciones de almacenamiento. La evaluación se realizó de acuerdo a la metodología de inmersión descrita por Wessling y col. (2000), con algunas modificaciones. Muestras de cada película de aproximadamente 0.22 g, cortadas en tiras de 1.4 x 40 cm se sumergieron en 90 g de aceite de pescado contenidos en frascos de vidrio de 100 mL. Los frascos fueron almacenados en la oscuridad bajo dos condiciones distintas de temperatura: a 4°C por 16 semanas, y a 25°C por 8 semanas, simulando temperaturas de refrigeración y ambiente, respectivamente. En el almacenamiento a 4°C se realizaron muestreos en las semanas 3, 6, 8, 10, 12, 14 y 16, mientras que en el de 25°C se hicieron en las semanas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Las muestras recolectadas fueron analizadas para medir su grado de oxidación mediante las técnicas de DC, IP y TBARS.

Dienos Conjugados

El análisis se llevó a cabo de acuerdo al método AOCS Ti 1a-64 (AOCS, 1998). Los valores fueron calculados a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DC} = 0.84 * (\text{Abs}_{233\text{nm}} / bc - K_o)$$

donde:

Abs = absorbancia observada a 233nm

b = longitud de la celda en cm

c = concentración de la muestra en g/L de la dilución final utilizada para la medición

K_o = absortividad por grupos ácidos (0.03) o ésteres (0.07)

El valor de dienos conjugados se reportó como porcentaje de dienos conjugados.

Índice de Peróxidos

Esta determinación se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Kirk y col. (1996), la cual consistió en pesar un g de aceite en un tubo de ensaye al cual se le agregó un g de Yoduro de Potasio (KI) en polvo y 20 mL de ácido acético: cloroformo (2 volúmenes de ácido acético glacial: 1 volumen de cloroformo). Posteriormente, se colocó en un baño de agua a ebullición por 30 seg, enseguida se vació el contenido con rapidez a un matraz con 20 mL de solución de KI (5%), se lavó el tubo con 25 mL de agua y se tituló con tiosulfato de sodio 0.002 M empleando almidón como indicador. El valor de peróxido se reportó como miliequivalentes de peróxido por kilogramo de muestra (mEq/Kg).

Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico

El análisis se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Zuta y col. (2007), modificada por Castillo (2010), la cual involucró la extracción de malonaldehído mediante homogenización de la muestra de aceite de pescado (0.5-1.0 g) con 25 mL de Ácido Tricloroacético (TCA) al 5% (p/v) en agua destilada, mezclando en vortex por 30 s. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm/5 min a 25 °C, se filtró (filtro Whatman No. 1) y se tomaron alícuotas de 2 mL para mezclarse con 3 mL de TBA 0.002 M. Los tubos se colocaron en baño maría a ebullición por 20 min y se enfriaron antes de su lectura a 532 nm. Los valores de TBARS se calcularon a partir de una curva estándar de MA en base a 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) en un rango de concentraciones de 0 a 10 nMol/mL (Anexo 2). Los resultados se expresaron como nMol MA/g de muestra.

Evaluación de la Actividad Antioxidante de Películas

Prueba de ABTS

Para esta prueba, se siguió el procedimiento descrito por Arrua y col. (2010). El ABTS se preparó en agua destilada para obtener una solución 7 mM. La solución del radical catión se preparó incubando un mL de la solución ABTS con 3.42 mL de una solución 2.45 mM de persulfato de potasio y permitiendo reaccionar durante 16 h a temperatura ambiente en la oscuridad para generar el radical ABTS. Posteriormente, la solución se diluyó para obtener una absorbancia de 1.00 ± 0.01 unidades a 734 nm en el espectrofotómetro, mezclando un mL de solución de ABTS con 60 mL de metanol. Para determinar la capacidad antioxidante de las películas, se colocaron aproximadamente 125 mg de película (equivalentes a 26 cm^2) en un matraz volumétrico con 25 mL de solución de ABTS, se reposó 30 min y se evaluó la absorbancia a 734 nm. Para cada tratamiento se realizó un triplicado. Los valores de actividad antiradical (ARA) fueron calculados a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ARA} = 100 * (1 - \text{Abs}_{734\text{nm}} / \text{Blanco})$$

reportando los resultados como porcentaje de actividad antioxidante en base a 100 mg de película (% ARA/100 mg de película). Con la finalidad de determinar la concentración de GEGC ($\mu\text{g/mL}$) responsable de la actividad antioxidante de las películas, se elaboró una curva de calibración de GEGC vs % ARA en un rango de concentración de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Se adicionaron alícuotas de cada solución estándar a 25 mL de solución de ABTS, se dejó reposar por 30 min y se evaluó la absorbancia a 734 nm. Posteriormente, se obtuvo el % ARA y se graficó contra la concentración de GEGC.

Prueba de DPPH

La solución madre se preparó disolviendo 24 mg de DPPH con 100 mL de metanol. La solución de trabajo se obtuvo mezclando 10 mL de solución madre con 45 mL de metanol para obtener

una absorbancia de 1.1 ± 0.02 unidades a 515 nm con el espectrofotómetro. El ensayo de DPPH se realizó de acuerdo con el método de Arrua y col. (2010). Aproximadamente 125 mg de películas (equivalentes a 26 cm^2) se colocaron en un matraz volumétrico conteniendo 25 mL de solución de DPPH en metanol, se dejó reposar 30 min y se evaluó la absorbancia a 515 nm. Los valores de ARA fueron calculados a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ARA} = 100 * (1 - \text{Abs}_{515\text{nm}} / \text{Blanco})$$

reportando los resultados como porcentaje de actividad antioxidante en base a 100 mg de película (% ARA/100 mg de película), así como en concentración de GEGC ($\mu\text{g/mL}$) usando una curva de calibración de concentración de GEGC vs % ARA. Con la finalidad de determinar la concentración de GEGC ($\mu\text{g/mL}$) responsable de la actividad antioxidante de las películas, se elaboró una curva de calibración de GEGC vs % ARA en un rango de concentración de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Se adicionaron alícuotas de cada solución estándar a 25 mL de solución de DPPH, se dejó reposar por 30 min y se evaluó la absorbancia a 734 nm. Posteriormente, se obtuvo el % ARA y se graficó contra la concentración de GEGC.

Análisis Estadístico

En el ensayo del efecto antioxidante de las películas en aceite de pescado, para cada una de las temperaturas evaluadas, se realizó un diseño completo al azar, con arreglo factorial $3 \times 2 \times 8$ y $3 \times 2 \times 9$, con tres factores: la concentración de catequina en tres niveles (0, 1, 3%), la concentración de compatibilizante en dos niveles (0, 5%) y el tiempo de almacenamiento (los niveles para el almacenamiento a 4°C fueron 0, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 semanas mientras que a 25°C fueron 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 semanas). En el resto de las evaluaciones se aplicó estadística descriptiva. En cuanto a la actividad antioxidante de las películas desarrolladas se realizó un diseño completo al azar con un solo factor: la formulación de las películas (8 formulaciones: SC, SC1%, SC3%, SCBHT, C, C1%, C3% y CBHT).

El análisis de varianza se realizó por modelos lineales generales a un nivel de significancia de 0.05 en el error. Las comparaciones de medias se realizaron por la prueba de

rangos múltiples de Tukey. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software NCSS v6.0 (Hintze, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de Galato de Epigallocatequina en las Películas Plásticas

El nivel de GEGC después de la extrusión en las películas SC1%, C1%, SC3% y C3% fue de 0.43, 0.96, 1.88 y 2.27, respectivamente (Tabla 2). El mayor nivel de degradación del GEGC (57.0%) por efecto del proceso de extrusión se encontró en la película SC1%, elaborada con la menor concentración de GEGC y libre de compatibilizante. Durante el proceso de extrusión parte del GEGC adicionado puede ser utilizado por el polímero para evitar su degradación (Al Malaika e Issenhuth, 1999), asimismo, el GEGC es susceptible a la degradación por las altas temperaturas empleadas. Comparando con trabajos similares, respecto a la degradación obtenida al emplear antioxidantes naturales en películas, los resultados encontrados concuerdan, incluso se han reportado mayores porcentajes de degradación, como en el caso de α -tocoferol incorporado en películas de PEBD obtenidas por extrusión, reportándose una degradación entre 50 y 70% en películas elaboradas con un contenido inicial de 0.1 y 1% de α -tocoferol (Wessling, 2000). Los altos porcentajes de pérdida en el anterior estudio pueden relacionarse con las altas temperaturas de procesamiento utilizadas, señaladas entre 200 y 300°C, mientras que en el presente estudio aunque se utilizó una menor temperatura (165°C) no se logró evitar la degradación del GEGC.

Tabla 2. Contenido de GEGC en las películas elaboradas.

Tratamiento	GEGC (%)		Degradación del GEGC ¹ (%)
	Antes de la Extrusión	Después de la Extrusión	
SC1%	1	0.43 \pm 0.05	56.98
C1%	1	0.96 \pm 0.12	4.02
SC3%	3	1.88 \pm 0.10	37.18
C3%	3	2.27 \pm 0.37	24.50

¹Porcentaje de degradación del GEGC respecto al total (100%) de GEGC adicionado antes de la extrusión.

*Los valores son la media de tres repeticiones \pm EE.

Evaluación de la Oxidación Lipídica de Aceite de Pescado

Se evaluó la estabilidad a la oxidación lipídica de aceite de pescado, libre de antioxidantes en contacto con las películas plásticas desarrolladas, monitoreando su grado de oxidación durante su almacenamiento a 4 y 25°C.

Almacenamiento a 4°C

Dienos conjugados. En la Tabla 3 se muestra el grado de oxidación del aceite de pescado en contacto con las películas desarrolladas almacenadas durante 2 semanas a 4°C. Como se puede observar los valores variaron entre 0.02% y 0.03%. De acuerdo al análisis estadístico de los datos, no se encontró efecto de los diferentes factores así como de su interacción ($p > 0.05$). Después de este tiempo de almacenamiento no fue posible observar el desarrollo de DC, ya que éstos no fueron detectados mediante la técnica de espectrofotometría empleada. Por su parte, Zuta y col. (2007) encontraron un valor de 4% para las 2 semanas de almacenamiento y un valor máximo de 10% a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Tabla 3. Contenido de dienos conjugados en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 4°C por dos semanas.

Tratamiento	Porcentaje (%)
SC	0.03 ± 0.00
SC1%	0.03 ± 0.00
SC3%	0.03 ± 0.00
SCBHT	0.03 ± 0.00
C	0.02 ± 0.00
C1%	0.02 ± 0.00
C3%	0.02 ± 0.00
CBHT	0.03 ± 0.00

*Los valores son la media de cuatro repeticiones ± EE.

Los DC se generan en la etapa inicial de la oxidación y en etapas posteriores. Este valor disminuye dado que durante la reacción de oxidación, se van degradando y transformando a productos secundarios. Los resultados obtenidos indicaron que el aceite se encontraba estable durante su almacenamiento o bien presentaba cierto grado de oxidación al inicio del experimento. Esto último fue confirmado con los resultados obtenidos en IP y TBA.

Akoh y Min (2002) indican que durante la oxidación se presenta un aumento de absorción debido a la formación de dienos y trienos conjugados y es proporcional a la captación de oxígeno y formación de peróxidos durante las primeras etapas de oxidación. El método de DC es más rápido que la determinación de IP, mucho más simple, no depende de reacciones químicas o desarrollo de color y requiere una menor cantidad de muestra. No obstante, la presencia de compuestos que absorban en la misma región de longitud de onda pueden interferir con la determinación, aspecto que debe tenerse en cuenta al utilizar esta prueba.

Índice de peróxidos. En la Figura 18 se observan los valores de IP en el aceite de pescado para los ocho tratamientos a través de su almacenamiento durante 18 semanas. El valor inicial fue de 20.07 ± 0.55 mEq de peróxidos/Kg de aceite, siendo este valor mayor al encontrado por Cruz y Gastélum (2011), quienes obtuvieron valores iniciales de 6.30 ± 0.10 mEq/Kg al evaluar la estabilidad oxidativa de aceite de pescado a 25°C por ocho semanas. De acuerdo al análisis estadístico de los datos, se encontró efecto de los diferentes factores así como de su interacción ($p < 0.05$).

Como se puede observar, el aceite de pescado en contacto con la película con 1% de GEGC sin compatibilizante y con las películas compatibilizadas con 1% de GEGC y con BHT como antioxidante de referencia, se mantuvo estable durante 10 semanas con valores de 22.87, 26.40 y 20.73 mEq de peróxidos/Kg de aceite respectivamente y fueron diferentes a los tratamientos control ($p < 0.05$).

El aceite en contacto del tratamiento control sin compatibilizar solo se mantuvo estable por seis semanas, presentando valores de 54.07 mEq de peróxidos/Kg de aceite en la décima semana de almacenamiento. Por su parte, el aceite de pescado en contacto con la película control compatibilizada, presentó un contenido de IP de 78.93 mEq de peróxidos/Kg de aceite en el mismo tiempo de almacenamiento.

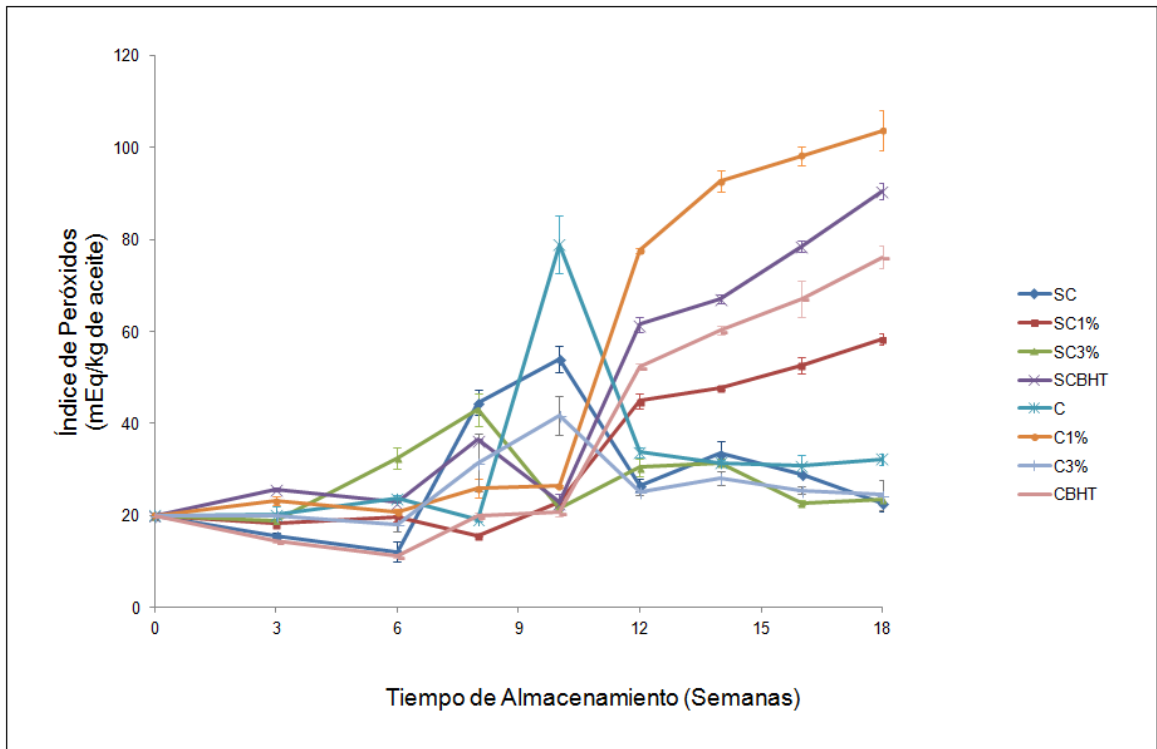


Figura 18. Índice de peróxidos en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 4 °C. *Los valores son la media de tres repeticiones \pm EE.

Otro de los tratamientos que permitió estabilizar el aceite de pescado hasta por 10 semanas con diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a los tratamientos control, fue la película compatibilizada con un contenido de 1% de GEGC, presentando el aceite un valor de IP igual 26.40 mEq de peróxidos/Kg de aceite. El valor máximo de IP en el aceite de pescado en contacto de los diferentes tratamientos, se obtuvo en la semana dieciocho, para el tratamiento C1% con un valor de 103.67 mEq/Kg.

De acuerdo al índice de calidad descrito por Kirk y col. (1996) el sabor a rancio de aceites comienza a ser notable cuando el valor de peróxido es de 20 a 40 MEq/Kg. Considerando lo anterior, el aceite desde el inicio del almacenamiento se encontraba en el límite de calidad, lo cual difiere de lo encontrado mediante la evaluación de TBA como se discutirá en el apartado correspondiente, que cuantifica productos finales de la oxidación.

Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. El valor inicial de TBARS en los tratamientos a 4°C fue de 9.93 ± 0.13 nMol MA/g de aceite, siendo éste muy similar al reportado por Castillo (2010), quien obtuvo valores de 10.94 ± 0.76 nMol MA/g de aceite, los cuales son valores altos en comparación con los reportados por Zuta y col. (2007), quienes obtuvieron valores iniciales muy cercanos a 0 nMol MA/g de aceite.

De acuerdo al análisis estadístico de los datos, se encontró efecto de los diferentes factores así como de su interacción ($p < 0.05$). Los valores de TBARS mostraron un incremento a lo largo del almacenamiento para todos los tratamientos, en donde el valor máximo registrado fue de 68.21 ± 1.09 nMol MA/g de aceite, presentándose al final del almacenamiento en el aceite de pescado en contacto con la película control sin compatibilizar (SC).

Como se puede observar en la Figura 19, a las tres semanas de almacenamiento el aceite de pescado en contacto con las películas con 3% de GEGC (con y sin compatibilizante), presentaron valores similares a los encontrados al inicio del almacenamiento ($p > 0.05$) y fueron menores que el resto de los tratamientos ($p < 0.05$). El aceite en contacto con estas películas presentó un comportamiento similar hasta la doceava semana de almacenamiento, observándose un incremento notable del valor de TBA (45.12 nMol MA/g de aceite) en el aceite de pescado en contacto de la película con 3% de GEGC y compatibilizante (C3%) a las 14 semanas de almacenamiento, mientras que el aceite en presencia de la película sin compatibilizar y la misma concentración de GEGC (SC3%) mantuvo valores menores hasta el final del almacenamiento. Del mismo modo, el tratamiento con 1% de GEGC sin compatibilizar se mantuvo por debajo del límite de calidad hasta el final del almacenamiento.

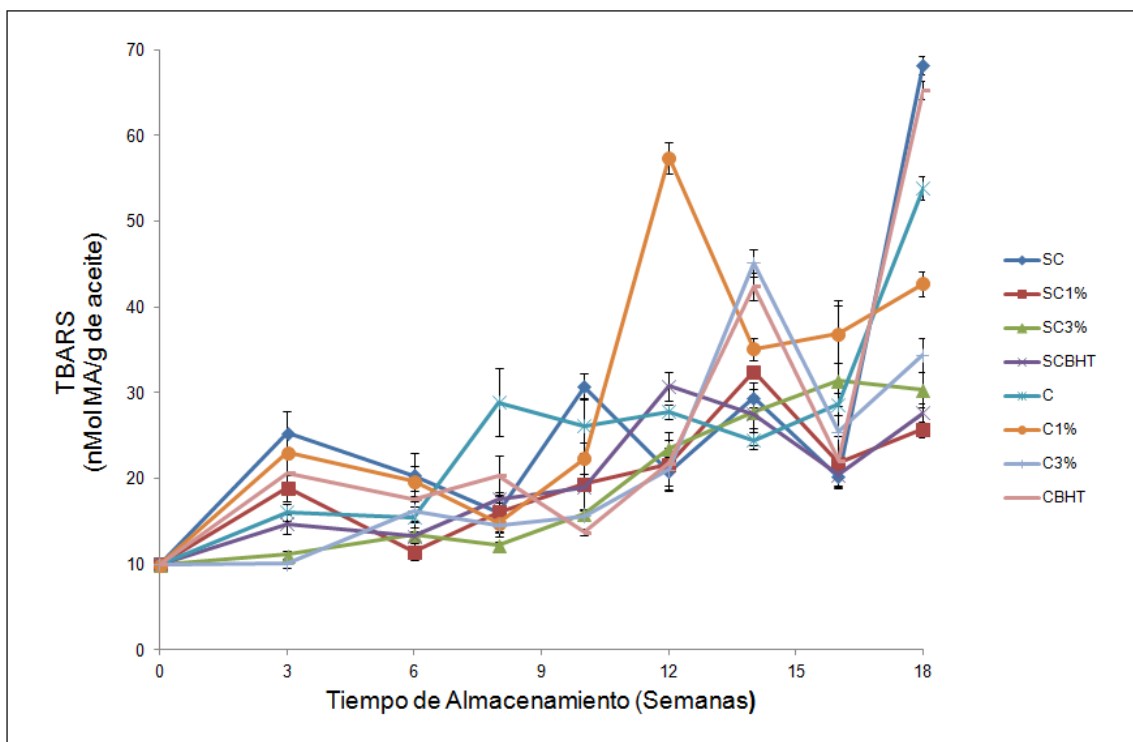


Figura 19. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 4 °C. *Los valores son la media de tres repeticiones \pm EE.

De acuerdo a Köse y Erdem (2001), los valores de TBARS mayores a 3-4 mg MA/kg de aceite (41.70-55.60 nMol MA/g de aceite) indican pérdida de calidad en el alimento. Considerando este indicador, el aceite de pescado al inicio del almacenamiento se encontraba dentro de los límites de calidad (9.93 ± 0.13 nMol MA/g de aceite). Respecto a la estabilidad a la oxidación del aceite en contacto con las diferentes películas, los tratamientos que presentaron mejor comportamiento fueron las películas sin compatibilizar, tanto con GEGC y BHT (SC1%, SC3% y SCBHT). El aceite de pescado en contacto con estos tratamientos presentó valores inferiores al límite de calidad hasta el final del almacenamiento, con valores en un rango de 25.73 a 30.37 nMol MA/g de aceite a las 18 semanas de almacenamiento. Cabe mencionar que los menores valores de TBA encontrados en el aceite a través del almacenamiento, se presentaron en el aceite en contacto con la película con 3% de GEGC y sin compatibilizar (SC3%).

La pérdida de calidad del aceite para el resto de los tratamientos ocurrió en la doceava semana en el tratamiento C1%; en la catorceava semana para los tratamientos C3% y CBHT y al final del almacenamiento en los tratamientos control (SC y C) y C1%.

Los resultados obtenidos permitieron observar un efecto antioxidante de las películas conteniendo GEGC y sin compatibilizar, presentando un comportamiento similar al antioxidante de referencia. Dado que la prueba de TBARS evalúa la etapa final de la oxidación así como productos secundarios que pueden ser detectados sensorialmente, pudiera considerarse como mejor indicador para evaluar la estabilidad a la oxidación del aceite en contacto de los tratamientos evaluados.

Almacenamiento a 25°C

Dienos conjugados. En la Tabla 4 se muestran el grado de oxidación del aceite de pescado en contacto con las películas desarrolladas almacenadas durante 2 semanas a 25°C. De acuerdo al análisis estadístico de los datos, no se encontró efecto de los diferentes factores así como de su interacción ($p > 0.05$). Como se puede observar, los valores variaron entre 0.03% y 0.04%, y fueron similares entre los diferentes tratamientos, lo cual puede deberse a que la temperatura de almacenamiento fue mayor ocasionando una mayor velocidad de oxidación. Por su parte, Cruz y Gastélum (2011) encontraron un valor de 0.30% para las 2 semanas de almacenamiento y un valor máximo de 1.31%. Al igual que en el almacenamiento a 4°C, después de este tiempo de almacenamiento no fue posible observar el desarrollo de DC lo cual puede deberse a que éstos sufrieron reacciones de transformación a productos secundarios de oxidación. De acuerdo al análisis estadístico, se encontró efecto de la formulación de las películas plásticas en la oxidación del aceite de pescado.

Tabla 4. Contenido de dienos conjugados en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 25°C por dos semanas.

Tratamiento	Porcentaje (%)
SC	0.04 ± 0.00
SC1%	0.04 ± 0.00
SC3%	0.04 ± 0.00
SCBHT	0.03 ± 0.00
C	0.03 ± 0.00
C1%	0.03 ± 0.00
C3%	0.04 ± 0.00
CBHT	0.03 ± 0.00

*Los valores son la media de cuatro repeticiones ± EE.

Índice de peróxidos. En la Figura 20 se observan los valores de IP en el aceite de pescado en contacto con las diferentes películas a través de su almacenamiento a 25°C. El valor inicial de IP fue de 15.67 ± 0.07 mEq de peróxido/Kg de aceite, siendo este valor mayor al encontrado por Kulas y Ackman (2001), quienes obtuvieron valores iniciales muy cercanos a cero. Por su parte, Cruz y Gastélum (2011) obtuvieron valores iniciales de 6.30 ± 0.10 mEq/Kg.

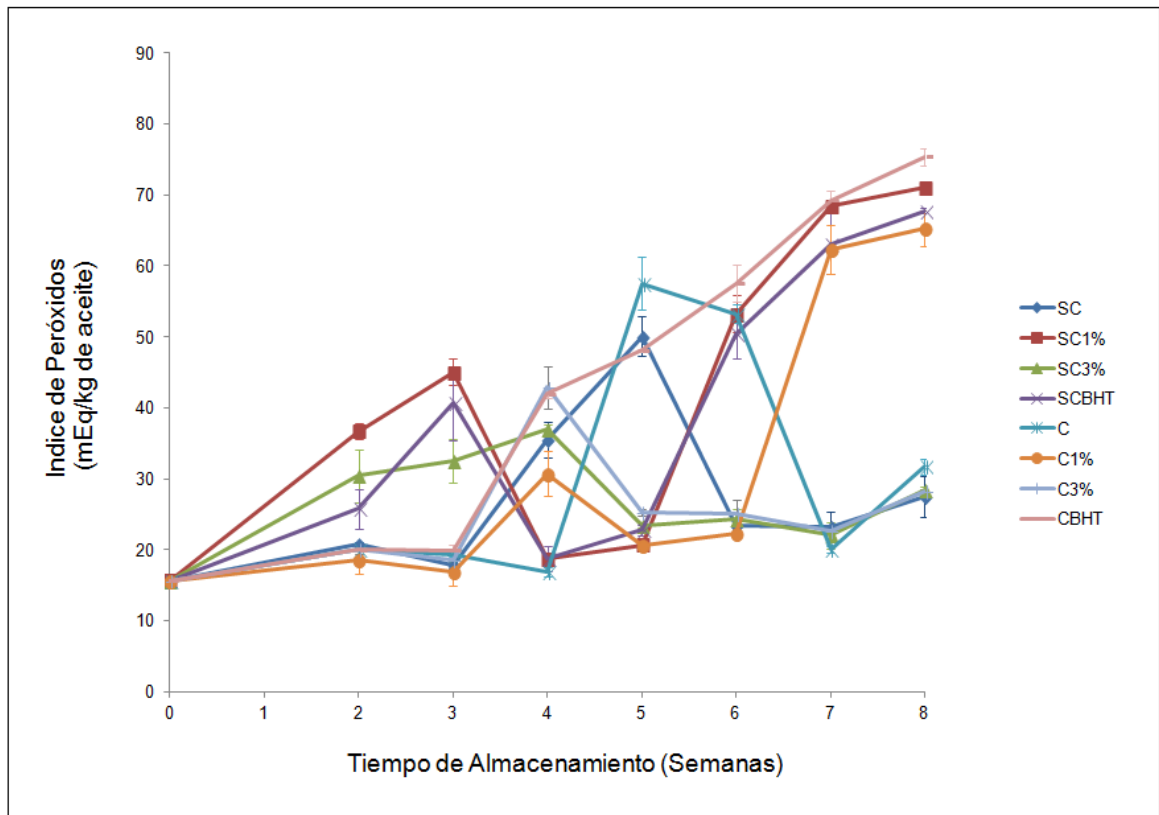


Figura 20. Índice de peróxidos en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 25°C. Los valores son la media de tres repeticiones \pm EE.

En general se puede observar que el aceite de pescado en contacto con las diferentes películas tendió a incrementar su IP a través del almacenamiento, presentándose picos máximos en el aceite de pescado en contacto con los diferentes tratamientos. Posteriormente se presentó un comportamiento fluctuante que se puede atribuir al mecanismo de autooxidación característico de los lípidos en donde los peróxidos son metabolitos transitorios que en estados más avanzados de la oxidación dan paso a nuevos productos, haciendo imposible su detección.

De acuerdo al análisis estadístico de los datos, se encontró efecto de los diferentes factores así como de su interacción ($p < 0.05$). Como se puede observar en la Figura 18, el aceite de pescado en contacto con las diferentes películas sin compatibilizar (SC1%, SC1% y SCBHT) desde la segunda semana de almacenamiento se encontraban por arriba del límite de calidad indicado por Kirk y col. (1996). En la cuarta semana de almacenamiento, el aceite de pescado en contacto con el tratamiento control sin compatibilizar (SC) y con las películas

compatibilizadas con 1 y 3% de GEGC y BHT no cumplían con este criterio de calidad, presentando valores de 30.73, 42.87 y 41.93 mEq de peróxido/Kg de aceite, respectivamente, que fueron similares entre sí ($p>0.05$). Se encontró que la película control compatibilizada logró estabilizar el aceite de pescado por una semana más en comparación del resto de los tratamientos, observándose un incremento notable en su valor de IP (57.53 mEq de peróxido/Kg de aceite) en la quinta semana de almacenamiento. El valor máximo de IP se obtuvo en la octava semana para el aceite de pescado en contacto del tratamiento CBHT con un valor de 75.40 mEq/Kg.

Los resultados encontrados indican que no hubo un efecto estabilizante del aceite de pescado por la incorporación del GEGC, lo cual difiere de lo observado en la temperatura de almacenamiento de 4°C, donde se observó efecto del GEGG. Este comportamiento coincide con lo obtenido por Wessling y col. (2000) en emulsiones de ácido linoleico expuestas a películas de PEBD conteniendo α -tocoferol almacenadas a 6, 20 y 40°C por 25 días. Estos autores no encontraron diferencias significativas en el incremento de hidroperóxidos en el aceite almacenado a 20 y 40°C respecto a la película control, lo cual difirió del comportamiento obtenido en las muestras almacenadas a 6°C, donde la oxidación se retrasó por ~15-20 días respecto a la película control. Este comportamiento lo relacionaron con el efecto de la temperatura, ya que a 20 y 40°C la oxidación procede más rápido (Wessling y col., 2000).

Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Los tratamientos almacenados a 25°C presentaron un valor inicial de 13.30 ± 0.28 nMol MA/g de aceite, los cuales concuerdan con el valor inicial de TBARS reportado por Castillo (2010), quien obtuvo valores de 10.94 ± 0.76 nMol MA/g de aceite, sin embargo son valores altos en comparación con los reportados por Zuta y col. (2007), quienes obtuvieron valores iniciales muy cercanos a 0 nMol MA/g de aceite.

De acuerdo al análisis estadístico de los datos, se encontró efecto de los diferentes factores así como de su interacción ($p<0.05$). Como se puede observar en la Figura 21, el aceite de pescado en contacto con la mayoría de las películas (SC1%, SCBHT, C1%, C3% y CBHT), desde la segunda semana de almacenamiento se encontraban por arriba del límite de calidad indicado por Kirk y col. (1996) y con valores similares entre sí ($p<0.05$). Cabe resaltar que el aceite en contacto con las películas con el antioxidante de referencia, tanto compatibilizadas como sin compatibilizar (SCBHT y CBHT), presentaron este comportamiento.

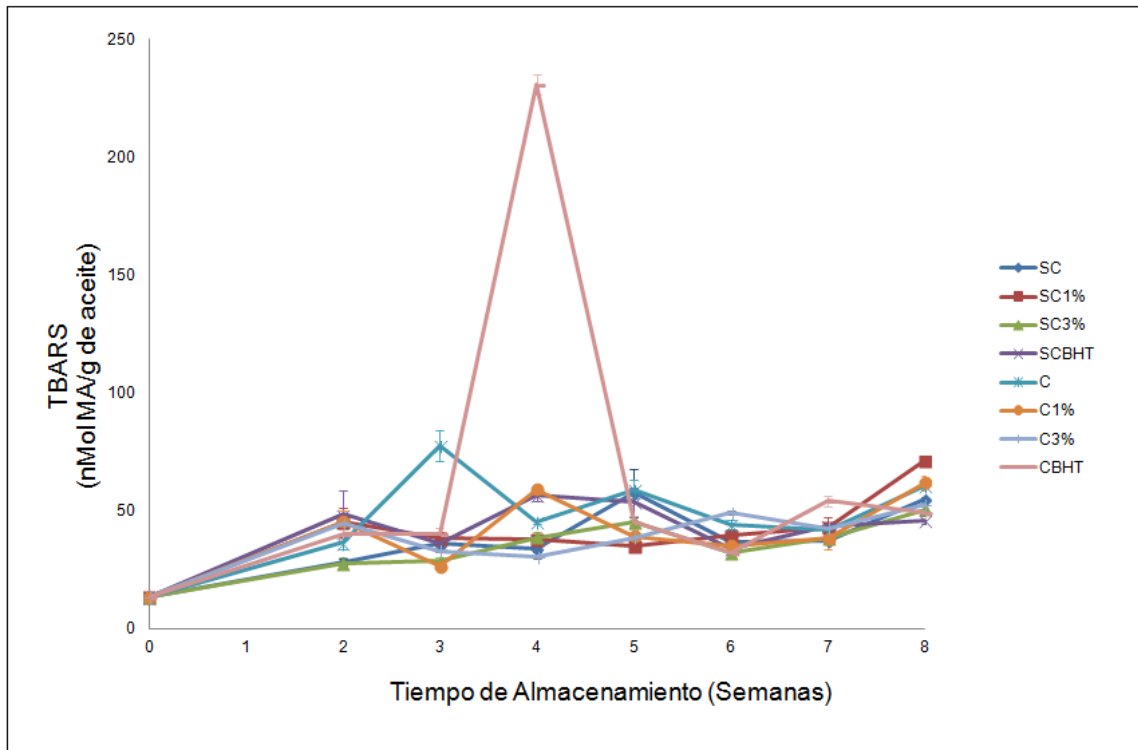


Figura 21. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en aceite de pescado en contacto con películas desarrolladas durante su almacenamiento a 25°. Los valores son la media de tres repeticiones \pm EE.

Respecto al resto de los tratamientos, solo el aceite en contacto con las películas control (sin y con compatibilizante) y la película con 3% de GEGC sin compatibilizar (SC3%) presentaron valores inferiores a este límite durante la segunda semana de almacenamiento. Para la película control compatibilizada (C), el límite de calidad se superó a la tres semanas, observándose un valor elevado para de 77.48 nMol MA/g de aceite. Por otra parte, el aceite en contacto con las películas sin compatibilizar control y con 3% de GEGC (SC y SC3%) alcanzó el límite de calidad a la quinta semana de almacenamiento con valores de 57.53 y 45.02 nMol MA/g de aceite, respectivamente. Se pudo observar que en el almacenamiento a las semanas 3, 5, 6 y 8 los valores de TBA obtenidos con esta última película (SC3%) fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que la película control (SC).

El máximo grado de oxidación encontrado en el aceite de pescado fue de 230.81 ± 4.34 nMol MA/g de aceite para el aceite en contacto con la película compatibilizada con BHT (CBHT). Los valores de TBA observados al final del almacenamiento son menores que los reportados por Zuta y col. (2007), quienes encontraron valores máximos de TBARS de 300

nMol MA/g de aceite, mientras que superan a lo reportado por Castillo (2010) con valores de 166 nMol MA/g de aceite. Estas diferencias pueden deberse al hecho que tanto en el presente estudio como en el realizado por Castillo (2010) se utilizaron películas compatibilizadas inmersas en aceite de pescado, mientras que en el realizado por Zuta y col. (2007) se agregó directamente el antioxidante a estudiar en el aceite de pescado.

De acuerdo a los resultados obtenidos no se encontró un efecto estabilizante del aceite de pescado por la incorporación del GEGC y agente compatibilizante, lo cual concuerda con lo obtenido en la evaluación de IP y que se puede relacionar con el efecto de la temperatura, explicado anteriormente.

Haciendo una comparación entre el GEGC, antioxidante natural empleado en el presente estudio y el α -tocoferol, antioxidante natural que más ha sido reportado en estudios de envasado activo de liberación de antioxidantes (Wessling, 2000; Graciano-Verdugo, 2005) podemos destacar la ventaja de la naturaleza polar del GEGC, en comparación con la naturaleza no polar del α -tocoferol. Al incorporar GEGC en una película de PEBD empleada para el envasado de alimentos grasos (como el aceite de pescado), el antioxidante polar migra más fácilmente a la interfase entre el material de envase y alimento, ambos de naturaleza no polar, siendo en este sitio donde predominan las reacciones de oxidación y por tanto donde más se requiere de un efecto antioxidante para proteger al alimento envasado.

Evaluación de la Actividad Antioxidante de Películas

Prueba de ABTS

En la Tabla 5 se muestran los valores de actividad antioxidante de las películas desarrolladas, evaluado mediante la prueba de ABTS. Los resultados indican que los tratamientos SC3% y C3% presentaron una mayor capacidad antioxidante, 71.52 y 71.07% respectivamente, en comparación con el resto de los tratamientos ($p < 0.05$), lo cual concuerda con lo esperado dado su mayor contenido de GEGC. La actividad antioxidante de las películas SC3% y C3% fue equivalente a una concentración de 70.22 y 69.70 μg de GEGC/mL de acuerdo a la curva de calibración elaborada. Las películas conteniendo solo 1% de GEGC mostraron una capacidad antioxidante de 26.05% y 19.96% para SC1% y C1%, respectivamente y fue equivalente a una

concentración de 18.26 y 11.29 µg de GEGC/mL. Respecto al antioxidante sintético de referencia (BHT), como se puede observar, las películas desarrolladas presentaron menores valores de actividad antioxidante que las películas con 1% de GEGC sin compatibilizar (SC1%) ($p < 0.05$) y fue similar a la película con 1% de GEGC compatibilizada (C1%) ($p > 0.05$). Cabe mencionar que la película sin compatibilizar con el antioxidante de referencia (SCBHT) fue similar al control ($p > 0.05$).

Los valores de actividad antioxidante obtenidos en el presente estudio son mayores a los reportados por Arrua y col. (2011) al incorporar ácido caféico a películas de polipropileno, reportando una actividad antioxidante de las películas, evaluadas por el método ABTS, de 18% ARA/100mg de película.

Tabla 5. Actividad antioxidante de las películas desarrolladas evaluadas mediante el radical ABTS.

Tratamiento	% ARA/100mg de película	Concentración de GEGC (µg /mL)
SC	8.23 ± 0.68 ^d	ND
SC1%	26.05 ± 0.04 ^b	18.26 ± 0.05
SC3%	71.52 ± 3.06 ^a	70.22 ± 3.50
SCBHT	15.66 ± 0.58 ^{cd}	NA
C	9.01 ± 1.32 ^d	ND
C1%	19.96 ± 0.65 ^{bc}	11.29 ± 0.74
C3%	71.07 ± 1.08 ^a	69.70 ± 1.23
CBHT	17.19 ± 1.62 ^c	NA

*Los valores son la media ± EE. Diferente literal indica diferencia estadística

ND: no detectado

NA: no aplica

Prueba de DPPH

En la Tabla 6 se muestran los valores de actividad antioxidante de las películas desarrolladas evaluado mediante la técnica de DPPH. Como se puede observar, los tratamientos SC3% y C3% mostraron una capacidad antioxidante de 71.50% y 71.38% respectivamente, presentando mayores valores ($p < 0.05$) que el resto de las películas elaboradas, lo cual concuerda con lo encontrado en la prueba de ABTS. La actividad antioxidante de las películas SC3% y C3% fue equivalente a una concentración de 82.68 y 82.51 μg de GEGC/mL, de acuerdo a la curva de calibración elaborada. Se encontró un efecto significativo del tratamiento (formulación de las películas) ($p < 0.05$) en la actividad antioxidante.

Respecto a los tratamientos SC1% y C1%, estos presentaron una capacidad antioxidante de 26.88 y 35.04%, respectivamente, que si bien es menor que las películas conteniendo 3% de GEGC, respecto a las películas conteniendo BHT en una concentración similar de antioxidante, la capacidad antioxidante de las películas con 1% de GEGC es hasta cuatro veces mayor que el antioxidante de referencia ($p < 0.05$). La actividad antioxidante de las películas SC1% y C1% fue equivalente a una concentración de 24.23 y 34.92 μg de GEGC/mL.

Tabla 6. Actividad antioxidante de las películas desarrolladas evaluadas mediante el radical DPPH.

Tratamiento	% ARA/100mg de película	Concentración de GEGC (μg /mL)
SC	2.26 ± 0.17^c	ND
SC1%	26.88 ± 3.57^b	24.23 ± 4.68
SC3%	71.50 ± 0.90^a	82.68 ± 1.18
SCBHT	6.90 ± 1.74^c	NA
C	3.03 ± 0.16^c	ND
C1%	35.04 ± 2.14^b	34.92 ± 3.44
C3%	71.38 ± 0.80^a	82.51 ± 0.86
CBHT	9.07 ± 1.83^c	NA

*Los valores son la media \pm EE. Diferente literal indica diferencia estadística

ND: no detectado

NA: no aplica

El comportamiento mostrado por los tratamientos con 3% de GEGC (SC3% y C3%) es similar al reportado por Arrua y col. (2010) en películas de polipropileno conteniendo ácido caféico, reportando un valor de $89 \pm 6\%$ de ARA/100 mg de película al evaluar la actividad antioxidante mediante la prueba de DPPH. Asimismo, es similar al obtenido en películas antioxidantes basados en quercetina y catequina en películas de EVOH (López Dicastillo y col., 2010) y fue mayor a la encontrada en películas de quitosano incorporadas con concentraciones similares de ETV (2 y 5%) (Siripatrawan y Harte, 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos tanto en la prueba de ABTS como DPPH, las películas con una concentración de 3% de GEGC presentan mayor actividad antioxidante, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la estabilidad a la oxidación del aceite de pescado evaluados mediante la prueba de TBARS que evalúa productos finales de la oxidación de lípidos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la estabilidad a la oxidación de aceite de pescado en contacto de películas de PEBD con el antioxidante GEGC y un agente compatibilizante, depende de la temperatura de almacenamiento a la cual se lleve a cabo la evaluación. La incorporación de GEGC a películas plásticas de PEBD permitieron mantener la estabilidad oxidativa del aceite de pescado almacenado a 4°C respecto al tratamiento control mientras que a 25°C no se observó un incremento en la estabilidad oxidativa del aceite respecto al control.

Los resultados obtenidos mediante la prueba de TBARS, la cual evalúa la etapa final de la oxidación así como productos secundarios que se generan, permitieron observar a 4°C una tendencia a una menor oxidación del aceite de pescado en los tratamientos SC1% y SC3%, correspondientes a las películas incorporadas con 1 y 3% de GEGC sin compatibilizante en comparación del tratamiento control; mientras que a 25°C se observó que el aceite de pescado en contacto de la película con 3% de GEGC sin compatibilizar presentó menor oxidación de lípidos que el resto de las películas adicionadas con antioxidantes, aunque fue similar al tratamiento control.

Con base en lo anterior y considerando principalmente los resultados obtenidos durante el almacenamiento a bajas temperaturas, se considera que la película que proporcionó mayor estabilidad a la oxidación del aceite de pescado fue la película con 3% de GEGC y libre de agente compatibilizante, así como una opción para su aplicación como envase activo para el control de la oxidación lipídica de alimentos con alto contenido graso.

Los resultados encontrados indican que las películas con GEGC en combinación con un agente compatibilizante pudieran ser útiles en aplicaciones donde sea deseable una liberación gradual del antioxidante hacia el alimento durante su almacenamiento, aunque se requiere continuar con este tipo de estudios para establecer las cantidades de antioxidante apropiadas para diferentes alimentos y condiciones de almacenamiento.

Los tratamientos con 3% de GEGC, el SC3% y C3%, presentaron mayor actividad antioxidante que las películas conteniendo 1% de GEGC y el antioxidante de referencia.

En general, la estabilidad a la oxidación lipídica del aceite de pescado fue mayor empleando películas de PEBD con GEGC y sin compatibilizar, las cuales podrían ser de utilidad en la preservación de productos pesqueros almacenado en refrigeración.

RECOMENDACIONES

Evaluar el efecto antioxidante de las películas plásticas desarrolladas empleando diferentes temperaturas de almacenamiento para refrigeración y congelación.

Evaluar el efecto antioxidante de las películas plásticas desarrolladas empleando mayores tiempos de almacenamiento, incluso monitoreando en tiempos cortos de manera que se puedan encontrar diferencias más notorias en la oxidación del aceite.

Evaluar películas plásticas incorporadas con GEGC en concentraciones intermedias a las utilizadas en el presente estudio, por ejemplo un 2% y comparar sus propiedades y efecto antioxidante con las películas utilizadas en este trabajo.

Evaluar el efecto antioxidante de películas plásticas de PEBD incorporadas con GEGC elaborando bolsas plásticas que permitan realizar experimentos con mayor similitud a la aplicación alimentaria destinada.

Emplear otras técnicas que determinen los compuestos de degradación obtenidos de los procesos oxidativos.

Evaluar la concentración de antioxidante, que es transferida del envase hacia el alimento, para determinar el proceso de migración del antioxidante.

Realizar la incorporación de GEGC en películas plásticas coextruídas con distintos polímeros que le confieren mejores propiedades de barrera, para de esta manera evaluar el efecto antioxidante producido por el GEGC con ayuda de otros factores que retarden los procesos oxidativos en alimentos.

Evaluar otros compuestos que hayan presentado una elevada actividad antioxidante a fin de estudiar su comportamiento para retardar los procesos oxidativos en alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul MJ, Ismail H, Mat TR. 2010. Effects of polyethylene-g-maleic anhydride on properties of low density polyethylene/thermoplastic sago starch reinforced kenaf fibre composites. *Iranian Polymer Journal*. 19 (7): 505
- AOCS. 1998. Official methods and recommended practices of the AOCS. Vol. 1. D. Firestone, Ed. USA: American Oil Chemists Society
- Akoh C y Min D. 2002. Food lipids chemistry. Nutrition and biotechnology. 2nd ed. Ed. Marcel Dekker
- Akoh CC y Min DB. 2008. Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology. 3^o ed. New York, NY, USA: CRC PressTaylor & Francis Group
- Al Malaika S, Issenhuth S. 1999. The antioxidant role of α -tocopherol in polymers III. Nature of transformation products during polyolefins extrusion. *Polymer Degradation Stability*. 65: 143-151
- Albano C, Brito O, Massot F, Cruz M. 2001. Caracterización del polietileno de baja densidad pigmentado. *Información Tecnológica*. 12 (3): 130
- Alvarado OF. 2008. Síntesis, caracterización y propiedades de poliminas. Tesis Licenciatura. Universidad Austral de Chile
- Arrua D, Strumia MC, Nazareno MA. 2010. Immobilization of caffeic acid on a polypropylene film: synthesis and antioxidant properties. *J Agric Food Chem*. 58: 9228-9234
- Badui DS. 2006. Química de los alimentos. 3^a ed. Ed. Pearson Educación.
- Bimbo AP. 1989. Fish oils: past and present food uses. *J Am Oil Chem. Soc*. 66: 1717–1718, 1720–1726
- Bentayeb K, Rubio C, Battle R y Nerín C. 2007. Direct determination of carnosic acid in a new active packaging based on natural extract of rosemary. *Anal Bioanal Chem*. 389: 1989-1996
- Brody AL, Bugusu B, Han JH, Sand CK y McHug TH. 2008. Innovative food packaging solutions *J Food Sci*. 73 (8): 107-116
- Cano A, Hernandez RJ, Garcia CF, Acosta M. 1998. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal*. 9: 196-202
- Cano A, Alcaraz O, Acosta M, Arnao MB. 2002. On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS^{•+} assay. *Redox Report*. 7: 103-109

- Castañeda CB, Ramos LLE, Ibáñez VL. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Revista Horizonte México*. 8 (1): 58-59, 61
- Castillo MJ. 2010. Incorporación de un flavonoide a polietileno de baja densidad y evaluación de su efecto antioxidante en aceite de pescado. Tesis Licenciatura. Universidad de Sonora
- Cervantes CV, Rocha GNE, Gallegos IJA, Rosales CM, Medina TL, González LRF. 2010. Actividad antioxidante de extractos de semilla de tres variedades de manzana (*Malus domestica* Borkh -Rosaceae-). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9 (6): 446
- Choe E y Min DB. 2009. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. 345-349
- Cruz RS, Gastélum MD. 2011. Evaluación del efecto antioxidante de extractos metanólicos obtenidos de plantas medicinales, en aceite de pescado. Tesis Licenciatura. Universidad de Sonora
- Farkas JK, Floros JD, LineBack DS y Watkins BA. 1997. Oxidation kinetics of menhaden oil with TBHQ. *J Food Sci*. 62 (3): 505-507
- Graham HN. 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev. Med.* 21: 334-350
- Graciano-Verdugo AZ. 2005. Desarrollo de una película conteniendo α -tocoferol y su efecto en la estabilidad oxidativa en un simulante de alimento graso y carne de res. Tesis Doctorado. Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentos, A.C., Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal. Hermosillo: CIAD, A.C.
- Gramza MA, Regula J. 2007. Use of tea extracts (*Camellia sinensis*) in jelly candies as polyphenols sources in human diet. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16: 43
- Ha JU, Kim YM y Lee DS. 2001. Multilayered antimicrobial polyethylene films applied to the packaging of ground beef. *Packaging Technology and Science*. 14:55-62
- Han JH. 2005. New technologies in food packaging: overview. In J. H. Han, *Innovations in Food Packaging*. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press. pp. 3-11
- Hintze J. 2001. NCSS and PASS. Kaysville, UT, USA: Number Cruncher Statistical Systems
- Inciarte H, Oliva H. 2011. Compatibilización "in situ" de mezclas PS/PMMA mediante terpolímeros de bloques-injerto PS-b-PB-g-PMMA. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 12: 88-106
- Joerger, R.D. 2007. Antimicrobial films for food applications: a quantitative analysis of their effectiveness. *Packaging technology and Science*. 20:231-273
- Kelsey RJ. 1985. *Packaging in today's society*. 3rd ed. Lancaster, PA, USA: Technomic

Publishing Co

- Kirk RS, Sawyer R y Egan H. 1996. Composición y análisis de alimentos de Pearson. 2ª ed. Ed. CECOSA. México
- Komatsu T, Nakamori M, Komatsu K, Hosoda K, Okamura M, Toyama K, Ishikura Y, Sakai T, Kunii D, Yamamoto S. 2003. El té Oolong incrementa el metabolismo energético en mujeres japonesas. *J. Med. Invest.* 50: 170-175
- Köse S y Erdem ME. 2001. Quality changes of whiting (*Merlangius merlangus euxinus*, N. 1840) stored at ambient and refrigerated temperatures. *Turk k Fish Aquat Sci.* 1: 59-65
- Kulas E, Ackman R. 2001. Different tocopherol and the relationship between two methods for determination of primary oxidation products in fish oil. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1724-1729
- Lambert JD, Sang SM, Hong J, Yang CS. 2010. Anticancer and anti-inflammatory effects of cysteine metabolites of the green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J. Agric. Food Chem.* 58: 10016-10019
- Lee DS. 2005. Packaging containing natural antimicrobial or antioxidative agents. In J. H. Han, *Innovations in Food Packaging*. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press. pp. 108-122
- Lee KJ, Lee SH. 2008. Extraction behavior of caffeine and EGCG from green and black tea. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 13: 646-649
- Leung PP, Youself AE y Shellhammer TH. 2003. Antimicrobial properties of nisin-coated polymer films as influenced by film type and coating conditions. *Journal of Food Safety.* 23: 1-12
- López de Dicastillo C, Alonso JM, Catalá R, Gavara R y Hernández MP. 2010. Improving the antioxidant protection of packaged food by incorporating natural flavonoids into ethylene-vinyl alcohol copolymer (EVOH) films. *J Agric Food Chem.* 58 (20): 10958-10959
- López de Dicastillo C, Nerín C, Alfaro P, Catalá R, Gavara R, Hernández MP. 2011. Development of New antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *J Agric Food Chem.* 59: 7832-7833
- López de Dicastillo C, Gómez EJ, Catalá R, Gavara R, Hernández MP. 2012. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. *Food Chemistry.* 31: 1376–1384
- Marsh K, Bugusu B. 2007. Food packaging: roles, materials, and environmental issues. *Journal of Food Science.* 72 (3): 39-54

- Madhavi DL, Deshpande SS y Salunkhe DK. 1996. Food antioxidants technological, toxicological and health perspective. Ed. Marcel Dekker, Inc. USA
- Martin DAB, Rico D y Barry RC. 2008. Green tea extract as a natural antioxidant to extend the shelf-life of fresh-cut lettuce. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 9: 593
- Martinez FS, Gonzalez GJ y Tuñón MJ. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* XVII (6): 271-278
- Matche RS, Kulkarni G, Raj B. 2006. Modification of ethylene acrylic acid film for antimicrobial activity. *Journal of Applied Polymer Science.* 100:3063-3068
- Mildner SS, Zawirska WR, Obuchowski W y Gośliński M. 2009. Evaluation of antioxidant activity of green tea extract and its effect on the biscuits lipid fraction oxidative stability. *J Food Sci.* 00 (0): S1-S9
- Morton JDH. 2007. Procesamiento de plásticos: inyección, moldeo, hule y PVC. México: Limusa
- Ní Eidhin D, Burke J y O'Beirne D. 2003. Oxidative stability of ω -3-rich camelina oil and camelina oil-based spread compared with plant and fish oils and sunflower spread. *J Food Sci.* 68 (1): 345-353
- Nieto S, Garrido A, Sanhueza J, Loyola LA, Morales G, Leighton F, Valenzuela A. 1993. Flavonoids as stabilizers of fish oil: An alternative to synthetic antioxidants. *J. Am Oil Chem Soc.* 70: 773-778
- Pasquali RC, Chiappetta DA, Bregni C. 2005. Los copolímeros en bloques anfífilicos y sus aplicaciones farmacéuticas. *Acta Farm. Bonaerense.* 24 (4): 610
- Pedrielli P, Pedulli GF, Skibsted LH. 2001. Antioxidant mechanism of flavonoids. Solvent effect on rate constant for chain-breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3034–3040
- Pollorena LG. 2012. Capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Agave angustifolia Haw* y su efecto sobre la calidad de hamburguesas de res. Tesis Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Prior RL, Wu X y Scraich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 53 (10): 4295-4297
- Ramos CP, Jáuregui PA, De la Fuente UJ, Salazar GJ, Rey AJ, Prieto TS, Romero BC, Fernández OJ, Calvo LJ, Gómez AM, Cerro MA, Masegosa FR, Martínez RT, Bao IM y Carballeira OA. 2003. Residuos: alternativas de gestión. 1° ed. Ed. Pedro Ramos Castellanos. pp. 154

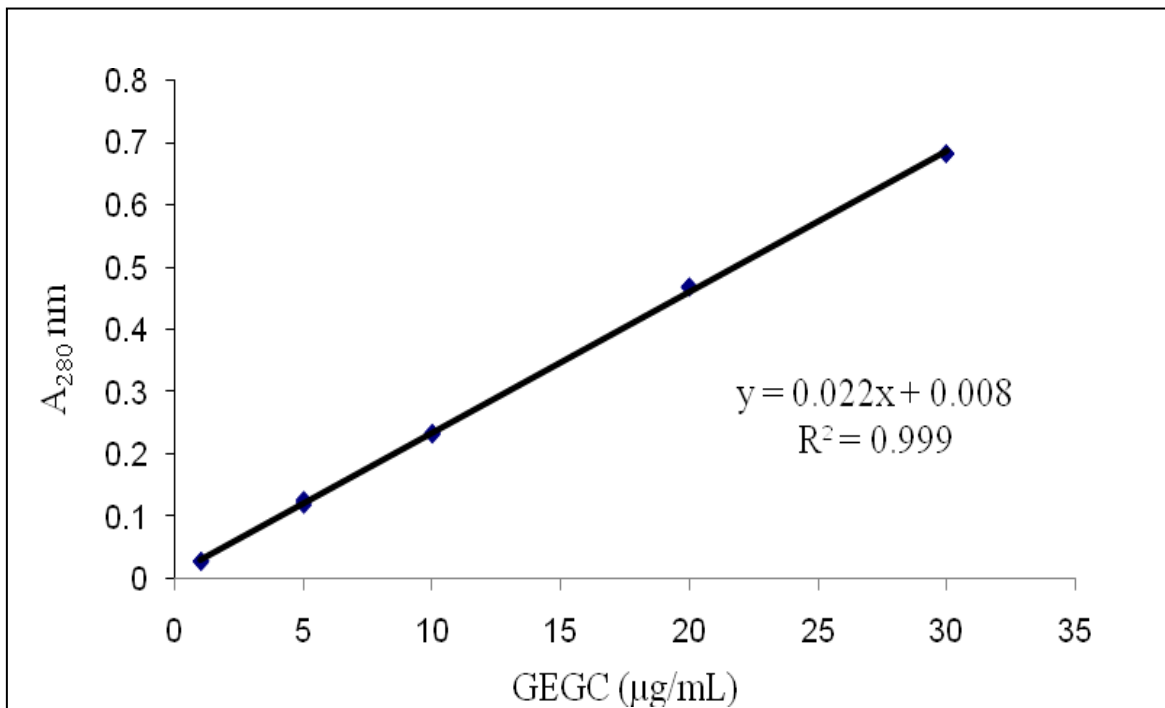
- Rietveld A, Wiseman S. 2003. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J. Nutr.* 133: 3285S-3292S
- Robertson GL. 2006. *Food packaging: principles and practice*. 2a ed. EUA: Taylor & Francis Group
- Roeding PA, Gordon MH. 1997. Antioxidant properties of catechins and green tea extracts in model food emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4267-4270
- Rojas de Gáscue B, López J, Prin JL, Hernández G, Reyes Y, Marcano LM, López CF, Puig C, Müller AJ. 2005. Síntesis y caracterización de agentes compatibilizantes obtenidos a partir de polietilenos y diferentes monómeros polares. *Interciencia. Revista de Ciencia y Tecnología de América.* 30 (7): 388-389
- Rooney ML. 2005. Introduction to active food packaging technologies. In J. H. Han, *Innovations in Food Packaging*. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press. pp. 63-79
- Sánchez MC. 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int.* 8 (3): 122
- Shahidi F. 1997. *Natural antioxidants chemistry, health effects, and applications*. Ed. AOCS Press Illinois
- Siripatrawan U y Harte BR. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids.* 24: 770-775
- Soto VH, Peralta E, Cano HDM, Martínez AOL, Granda RDM. 2011. Envases activos antioxidantes y su efecto sobre la calidad sensorial y los compuestos volátiles en leche entera deshidratada. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica.* 18 (2): 115
- Supakkul P., Miltz J., Sonneveld K. y Bigger S.W. 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. 68:408-420
- Torres AW, Soto VH, Peralta E, Cárdenas LJL, Ezquerro BJM. 2009. Effect of a Low-Density Polyethylene Film containing butylated hydroxytoluene on lipid oxidation and protein quality of sierra fish (*Scomberomorus sierra*) muscle during frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6140-6146
- Valenzuela BA y Sanhueza CJ. 2009. Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos. *Rev Chil Nutr.* 36 (3): 247-249
- Villalpandos OJ, Sánchez VS y Yáñez FI. 1999. Performance of polyethylene/ethylene-vinylalcohol copolymer/polyethylene multilayer films using maleated polyethylene blends. *Polymer Engineering and Science.* 39 (9): 1597-1598
- Wanasundara UN y Shahidi F. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chem.* 63: 335

- Watkins BA, Toborek M y Henning B. 1996. Dietary fat and health. Ch. 7 in Baily's Industrial Oil and Fat Products, Fifth Edition, Volume 1 Edible Oil and Fat Products: General Applications, Y.H. Hui (Ed.), pp. 159–214. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Weng YM, Hotchkiss JH. 1992. Inhibition of surface molds on cheese by polyethylene film containing the antimycotic imazalil. *Journal of Food Protection*. 55:367-369
- Weng YM, Chen MJ, Chen W. 1998 Antimicrobial food packaging materials from poly(ethylene-co-methacrylic acid) *Lebensmittel-Wissenschaftand Technologies*. 32: 191-195
- Wessling C. 2000. Antioxidant-impregnated polymers: antioxidant ability and interactions with food. Lund University, Department of Applied Nutrition & Food Chemistry. Lund: Lund University
- Wessling C, Nielsen T, Andres L. 2000. The Influence of α -tocopherol concentration on the stability of linoleic acid and the properties of low-density polyethylene. *Packag Technol Sci*. 13: 19-28
- Zuta PC, Simpson BK, Zhao X y Leclerc L. 2007. The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. *Food Chem*. 100: 800-807

ANEXOS

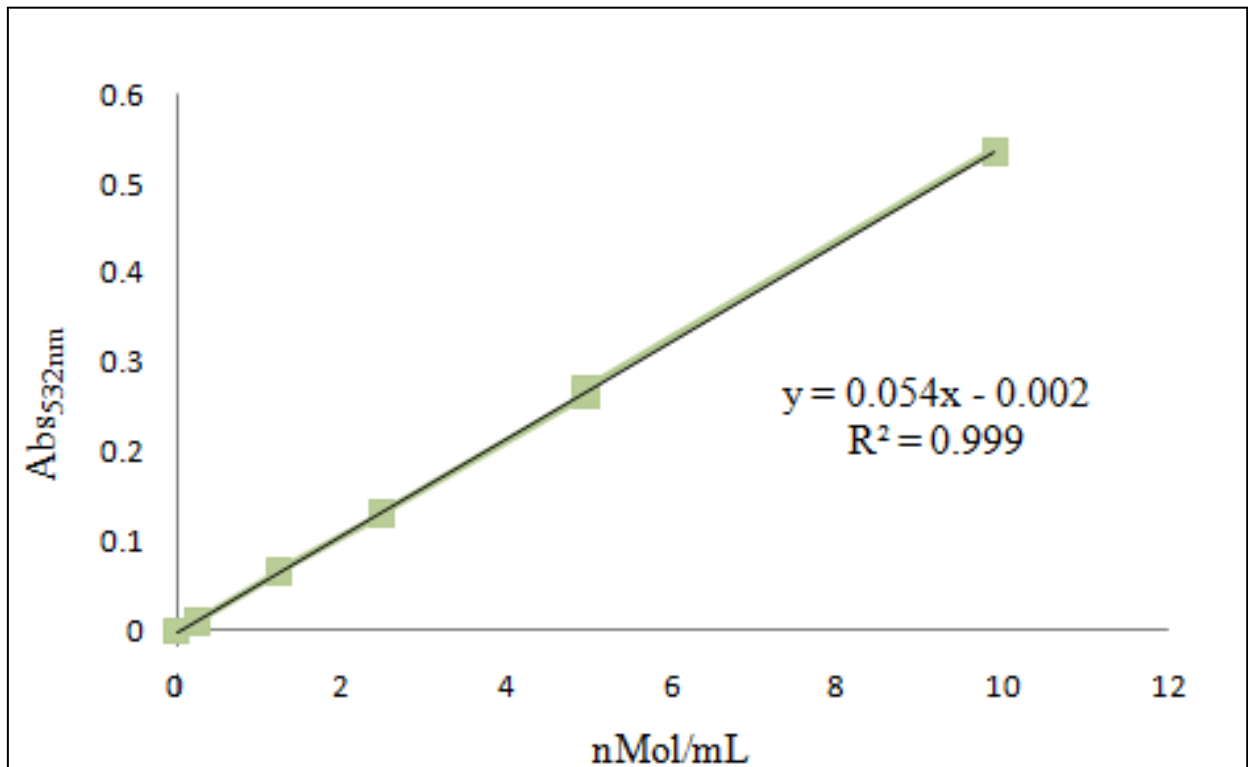
Anexo 1. Curva Estándar para Cuantificación de GEGC

Los cálculos realizados para la cuantificación de GEGC en las películas extruidas se hicieron en base a una curva estándar de GEGC (Teavigo®) en un rango de concentraciones de 0.00 a 30.00 µg/mL. La curva obtenida se muestra a continuación.



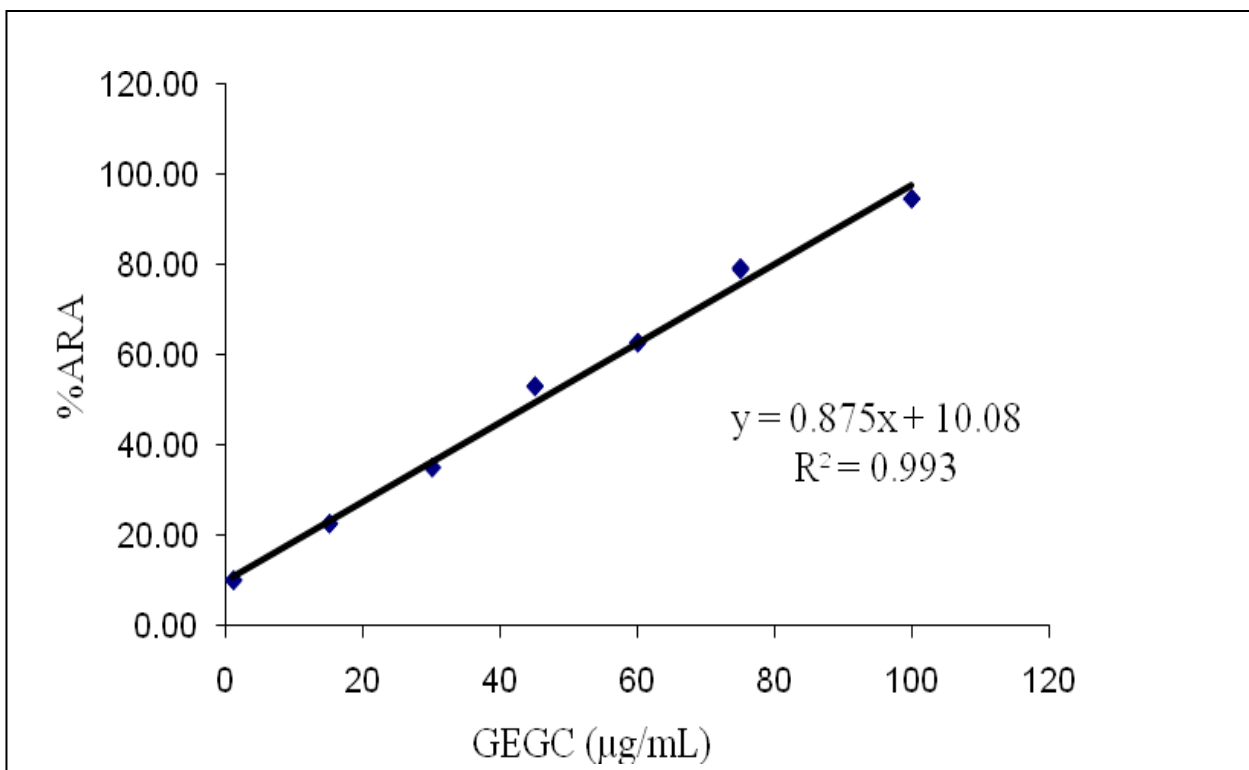
Anexo 2. Curva Estándar para TBARS

Los cálculos realizados para la evaluación de el efecto antioxidante de las películas se hicieron en base a una curva estándar de MA en base a 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) en un rango de concentraciones de 0.00 a 10.00 nMol/mL. La curva obtenida se muestra a continuación.



Anexo 3. Curva Estándar para ABTS

Para la evaluación de la actividad antioxidante de las películas se realizó una curva estándar con el radical ABTS y GEGC (Teavigo®) en un rango de concentraciones de 0.00 a 100.00 µg/mL. La curva obtenida se muestra a continuación.



Anexo 4. Curva Estándar para DPPH

Para la evaluación de la actividad antioxidante de las películas se realizó una curva estándar con el radical DPPH y GEGC (Teavigo®) en un rango de concentraciones de 0.00 a 100.00 µg/mL. La curva obtenida se muestra a continuación.

