

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Extracción de carotenoides de la yema de
huevo. Evaluación de aplicaciones”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

María Carpintero Pérez

Julio, 2021





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Manuel Rendueles de la Vega (Universidad de Oviedo)

Dr. D. Ismael Marcet Manrique (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **Maria Carpintero Pérez** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 15^a promoción curso 2020-2021.

Oviedo, 8 de ~~Julio~~ de 2021

D. Manuel Rendueles

~~D. Ismael~~ Marcet

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi familia su apoyo incondicional y sus consejos en los buenos y malos momentos durante toda mi vida académica. Especialmente a mis padres, un pilar fundamental en mi vida.

En segundo lugar, agradecer a mis tutores, Manuel Rendueles de la Vega e Ismael Marcet Manrique, la posibilidad de llevar cabo este proyecto, la confianza depositada en mí y, sobre todo, su asesoramiento y consejos, tanto para la elaboración del trabajo como para mi carrera investigadora.

A mi compañero de laboratorio Shihan, por toda la ayuda prestada y todos sus consejos, siendo determinante para la finalización del TFM.

Y a mis compañeros, de laboratorio y de máster, por las horas compartidas y los buenos momentos que hemos podido disfrutar durante este curso tan atípico.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	10
1.1	Objetivos	11
2	CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES	12
2.1	Carotenoides	12
2.2	Aplicaciones de los carotenoides	13
2.3	Extracción de carotenoides	14
2.4	Huevo	17
2.5	Carotenoides en la yema de huevo	19
2.6	<i>Films</i> o biopelículas biodegradables	22
3	METODOLOGÍA	27
3.1	Preparación de la yema de huevo y separación de sus fracciones	27
3.2	Extracción de carotenoides con aceite de girasol	27
3.2.1	Evolución de la calidad del aceite de girasol enriquecido bajo condiciones fotooxidativas	30
3.2.2	Colorimetría del aceite de girasol enriquecido	31
3.3	Extracción de carotenoides de la yema de huevo utilizando disolventes orgánicos. Obtención de aceite de yema de huevo	32
3.4	Elaboración de <i>films</i> de PLA con aceite de yema de huevo	33
3.4.1	Transmitancia y transparencia	33
3.4.2	Colorimetría	34
3.4.3	Propiedades mecánicas	34
3.4.4	Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	36
3.4.5	Solubilidad	37
3.4.6	Microestructura	37
3.4.7	Propiedades antimicrobianas	37
3.4.8	Propiedades antioxidantes	39
3.4.9	Ensayo de liberación	39
3.5	Aplicación de los <i>films</i> de PLA con aceite de yema de huevo como <i>packaging</i> primario	40
3.5.1	<i>Packaging</i> primario para AVOE	40
3.5.2	<i>Packaging</i> primario para resveratrol	41
3.6	Análisis estadístico	42

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1	Extracción de carotenoides con aceite de girasol	42
4.1.1	Extracción de carotenoides de la yema de huevo.....	43
4.1.2	Extracción de carotenoides del plasma.....	46
4.1.3	Extracción de carotenoides de los gránulos.....	49
4.1.4	Discusión extracción carotenoides.....	52
4.2	Evolución de la calidad del aceite de girasol enriquecido bajo condiciones fotooxidantes .	53
4.3	Propiedades colorimétricas del aceite de girasol enriquecido	56
4.4	Extracción de carotenoides de la yema de huevo utilizando disolventes orgánicos. Obtención de aceite de yema de huevo.	56
4.5	Elaboración de <i>films</i> de PLA con aceite de yema de huevo	57
4.5.1	Transmitancia y transparencia	57
4.5.2	Colorimetría.....	59
4.5.3	Propiedades mecánicas	60
4.5.4	Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y solubilidad	61
4.5.5	Microestructura.....	62
4.5.6	Propiedades antimicrobianas.....	63
4.5.7	Propiedades antioxidantes.....	65
4.5.8	Ensayo de liberación.....	66
4.6	Aplicación de los <i>films</i> de PLA con aceite de yema de huevo como <i>packaging</i> primario.....	68
4.6.1	<i>Packaging</i> primario para resveratrol.....	68
4.6.2	<i>Packaging</i> primario para AOVE	69
5	CONCLUSIONES.....	71
6	ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	72
7	BIBLIOGRAFÍA.....	73

RESUMEN

El uso de carotenoides como colorantes naturales, antimicrobianos o antioxidantes, sobre todo en la industria alimentaria, cosmética o nutracéutica, es una alternativa prometedora frente a la utilización de compuestos químicos y sintéticos. En este trabajo, se estudió la extracción de carotenoides presentes en la yema de huevo y sus fracciones mediante el empleo de solventes respetuosos con el medio ambiente, como es el aceite de girasol, y alternativamente utilizando disolventes orgánicos. Las propiedades del aceite de girasol enriquecido en carotenoides fueron evaluadas, mientras que con el extracto obtenido con disolventes orgánicos se prepararon *films* de ácido poliláctico (*polylactic acid*, PLA) enriquecidos.

Los extractos de aceite de girasol enriquecidos con carotenoides mostraron una coloración claramente naranja, que evidencia su posible utilización como colorante natural; así mismo, este aceite enriquecido mostró una mayor estabilidad frente a la fotooxidación que el aceite de girasol normal, lo que demuestra el efecto antioxidante de los carotenoides presentes. En cuanto a los *films* de PLA enriquecidos con extracto de yema de huevo obtenido con solventes orgánicos, su transmitancia, transparencia, color, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad, microestructura y propiedades antioxidantes y antimicrobianas fueron evaluadas. Además, con el propósito de evidenciar sus propiedades antioxidantes y barrera frente a la luz solar, y su capacidad de actuar como *packaging* alimentario, se elaboraron bolsas de PLA con extracto de carotenoides con el objetivo de proteger resveratrol y aceite de oliva virgen extra (AOVE) frente a la isomerización y fotooxidación, respectivamente. Los resultados muestran que los *films* enriquecidos con carotenoides son capaces de proteger ligeramente a compuestos fotosensibles frente a la oxidación; lo cual es debido a que la incorporación del extracto de carotenoides a la matriz del PLA produce una disminución de la transmitancia y transparencia de las películas y un aumento de su capacidad antioxidante.

ABSTRACT

Extraction, purification and use of natural extracts rich in antioxidants and other bioactive compounds is a field of study that has gained much importance in recent years. The use of carotenoids as natural colorants, antimicrobials or antioxidants, especially in food, cosmetic or nutraceutical industry, is a promising alternative to chemical and synthetic compounds used so far. The aim of this study was to obtain extracts rich in carotenoids, xanthophylls and β -carotene, from egg yolk and analyze their potential applications as colorants or as packaging active additives in food industry.

Sunflower oil extracts enriched with carotenoids showed a clearly orange coloration, which proved its possible use as natural colorant; in addition, this enriched oil showed a greater stability against photooxidation than normal sunflower oil, which evidences the antioxidant effect of the carotenoids present in it. To study the application of these extracts rich in carotenoids in food packaging, polylactic acid (PLA) *films* containing carotenoids were produce, and the effects of increasing concentrations of extract on the transmittance, transparency, color, water vapor permeability, and solubility, microstructure and antioxidant and antimicrobial properties on PLA *films* were analyzed. Finally, in order to demonstrate its antioxidant and sunlight barrier properties, and its possible application as food packaging, PLA bags with carotenoid extract were made with the aim of protecting resveratrol and EVOO against isomerization and photooxidation, respectively. The results show a small protective effect, which could be increased by increasing *films'* carotenoids content.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estructura química básica de los carotenoides y de los grupos terminales (Maoka, 2020).</i>	12
<i>Figura 2: Estructuras químicas de los principales carotenos (A) y xantófilas (B) (Maoka, 2020).</i>	13
<i>Figura 3: Huevo y sus partes.</i>	17
<i>Figura 4: Muestras resultantes de la liofilización de: yema completa (izquierda), gránulos (centro) y plasma (derecha).</i>	18
<i>Figura 5: Fraccionamiento de la yema de huevo en gránulos y plasma, y la composición de estos.</i>	19
<i>Figura 6: Estructura química de la luteína (imagen superior) y la zeaxantina (imagen inferior) (Kovalcuks & Duma, 2017).</i>	20
<i>Figura 7: Estructura química del β-caroteno (Kovalcuks & Duma, 2017).</i>	21
<i>Figura 8: Compañías implicadas en la producción de bioplásticos con aplicaciones relacionadas con el packaging alimentario (Khalil et al., 2018).</i>	25
<i>Figura 9: Síntesis del PLA a partir del LA (Hagen, 2012).</i>	25
<i>Figura 10: Isómeros ópticamente activos del LA.</i>	26
<i>Figura 11: Gránulos y plasma de yema de huevo liofilizados.</i>	27
<i>Figura 12: Espectrofotómetro empleado para cuantificar la cantidad de carotenoides presentes en las muestras de aceite.</i>	28
<i>Figura 13: Equipos empleados para realizar las extracciones. (A) Baño de temperatura y vaso con recirculación de agua. (B) Homogeneizador Silent Crusher.</i>	29
<i>Figura 14: Restos de yema de huevo tras la extracción con acetona (izquierda) y yema liofilizada original (derecha).</i>	30
<i>Figura 15: Colorímetro utilizado para medir las propiedades colorimétricas de las muestras de aceite y de los films.</i>	32
<i>Figura 16: Texturometro con plataforma para colocar los fragmentos de film y la sonda P/5S utilizada para estudiar las propiedades mecánicas de los films.</i>	35
<i>Figura 17: Tapones sellados con trozos de film en el desecador para el estudio de la permeabilidad del material al vapor de agua</i>	36
<i>Figura 18: Placas de NB con E. coli (izquierda) y Baird-Parker con S. aureus (derecha) con los pocillos inoculados con agua destilada (1) y las soluciones de aceite de yema de huevo con diferentes concentraciones de carotenoides: 60, 30 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2, 3 y 4 respectivamente.</i>	38
<i>Figura 19: Botes con film y simulante alimentario (Ensayo de liberación).</i>	39

<i>Figura 20: AOVE envasado en bolsas de films de PLA normal (izquierda) y PLA con aceite de yema de huevo (derecha).</i>	40
<i>Figura 21: Bolsas de PLA con aceite de yema (arriba) y PLA control (abajo), conteniendo la solución de resveratrol.</i>	42
<i>Figura 22: Recta patrón de β-carotenos en aceite.</i>	43
<i>Figura 23: β-carotenos equivalentes extraídos de la yema en función del tiempo para cada una de las condiciones de extracción ensayadas.</i>	46
<i>Figura 24: β-carotenos equivalentes extraídos del plasma en función del tiempo para cada una de las condiciones de extracción ensayadas.</i>	49
<i>Figura 25: β-carotenos equivalentes extraídos del os gránulos en función del tiempo para cada una de las condiciones de extracción ensayadas</i>	51
<i>Figura 26: Curva de calibrado de la disolución de Fe (III) (izquierda) y patrones utilizados (derecha).</i>	53
<i>Figura 27: Evolución de los PV del aceite de girasol y el aceite enriquecido durante el tratamiento oxidativo. AG: Aceite de girasol. AG+carot: Aceite de girasol + carotenoides.</i>	54
<i>Figura 28: (A) Evolución del contenido de carotenoides de los aceites normal y enriquecido sometidos a las condiciones fotooxidantes (B) Aceite de girasol normal tratado (izquierda) y aceite de girasol enriquecido con carotenoides (derecha).</i>	55
<i>Figura 29: Aceite de yema de huevo</i>	57
<i>Figura 30: Films de PLA con aceite de yema de huevo: A1 (A), A2 (B), A3 (C); y film de PLA control (D). A1 (0,1 g aceite/g PLA), A2 (0,2 g/g) y A3 (0,3 g/g).</i>	58
<i>Figura 31: Micrografías de los films de PLA con aceite de yema de huevo. A) Film de PLA sin aceite. B) Films de PLA preparados a partir de la solución formadora de films con concentraciones de aceite de yema de huevo de 0,1g por g PLA (A1), C) 0,2 g/ g PLA (A2), D) 0,3 g/g PLA.</i>	63
<i>Figura 32: Ensayo en pocillos. Propiedades antimicrobianas del aceite de yema de huevo frente a E. coli (A) y S. aureus (B).</i>	65
<i>Figura 33: Evolución de la capacidad antioxidante de los films de PLA con aceite de yema de huevo.</i>	66
<i>Figura 34: Evolución de la liberación de carotenoides en el simulante lipídico (etanol 95%). A1 (0,1g/g PLA), A2 (0,2g/g PLA) y A3 (0,3g/g PLA).</i>	67
<i>Figura 35: Evolución del PV del AOVE libre (azul), en el film de PLA (naranja) y PLA con aceite de yema de huevo (gris) durante los 4 días de ensayo.</i>	69

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1: Extracción de carotenoides de la yema de huevo en diferentes condiciones de extracción.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 2: Extracción de carotenoides del plasma de la yema de huevo en diferentes condiciones de extracción.</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 3: Extracción de carotenoides de los gránulos de la yema de huevo en diferentes condiciones de extracción</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 4: Parámetros colorimétricos CIELab del aceite de girasol normal y del aceite de girasol enriquecido con carotenoides.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 5: Valores de transmitancia de los films de PLA con aceite de yema de huevo, A1 (0,3 g aceite/g PLA), A2 (0,2 g/g) y A3 (0,3 g/g), y el film de PLA control (C).....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 6: Transparencia y atributos de color de los films de PLA con aceite de yema de huevo, A1 (0,3 g aceite/g PLA), A2 (0,2 g/g) y A3 (0,3 g/g), y el film de PLA control (C).....</i>	<i>60</i>
<i>Tabla 7: Grosor, resistencia a la punción (PS) y deformación por punción (PD) de los films de PLA con diferentes concentraciones de aceite de yema de huevo: A1 (0,1g/g PLA), A2 (0,2g/g PLA) y A3 (0,3g/g PLA). Control (C) es un film de PLA normal.</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 8: Permeabilidad al vapor de agua (WVP), tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) y solubilidad de los films de PLA con diferentes concentraciones de aceite de yema de huevo: A1 (0,1g/g PLA), A2 (0,2g/g PLA) y A3 (0,3g/g PLA). Control es un film de PLA.</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 9: Ensayo en medio líquido. Propiedades antimicrobianas de los films de PLA con aceite de yema de huevo.</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 10: Capacidad antioxidante, captadora de radicales libres de DPPH, de los films de PLA con aceite de yema de huevo (A1, A2 y A3) respecto al control, film de PLA sin aceite. Siendo A1= 0,1g aceite/g PLA, A2=0,2g/g PLA y A3= 0,3g/g PLA.....</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Tabla 11: Protección de los films de PLA con aceite de yema de huevo frente a la Isomerización del resveratrol bajo condiciones fotooxidantes.....</i>	<i>68</i>

1 INTRODUCCIÓN

El huevo de gallina es un alimento ampliamente consumido y distribuido a nivel mundial. En España el consumo total de huevos en 2018 fue de 385,5 millones de kilogramos, lo cual representa un consumo per cápita de 134,3 unidades, de las cuales 131 unidades correspondían con huevos de gallina, 116,2 unidades de huevos no ecológicos y 19,4 de huevos ecológicos. En cuanto a la producción, España posee el 11% de las gallinas ponedoras de la Unión Europea, siendo las principales regiones productoras Castilla-La Mancha, Castilla y León, Aragón, Cataluña, Comunidad Valenciana y Galicia (Gil, 2020).

Desde un punto de vista nutricional, el huevo puede considerarse un alimento muy completo ya que posee prácticamente todos los nutrientes necesarios para el organismo. La proteína del huevo es la de mayor valor biológico y sirve de estándar para la comparación de la calidad proteica de otros alimentos (IEH, 2009). Además de su importancia como alimento por sus cualidades nutritivas, el huevo también posee un importante interés culinario y como fuente de compuestos bioactivos de interés farmacológico o en tecnología de los alimentos.

Su importancia en el ámbito de tecnología de los alimentos y en la industria alimentaria, no solo radica en las propiedades nutricionales y organolépticas del huevo, sino que también en sus propiedades funcionales, las cuales son necesarias en procesos de fabricación de gran cantidad de alimentos. Cobrando especial importancia la yema de huevo, por sus propiedades gelificantes, emulsionantes, colorantes, aromáticas y antioxidantes, en la elaboración de mayonesas, tartas, cremas, salsas, pastas, etc. (Anton, 2007).

Además de sus importantes propiedades fisicoquímicas, la yema de huevo es una importante fuente de compuestos bioactivos de gran interés en las industrias médica, farmacéutica, cosmética, nutracética y biotecnológica (Anton, 2007). Entre los compuestos bioactivos presentes en el huevo los de mayor interés industrial o biotecnológico son: lecitina, vitaminas (A, B₂, Biotina, B₁₂, D, E, K), biotina, riboflavina y carotenoides, luteína y zeaxantina (IEH, 2009).

El sector de la industria alimentaria y biotecnológica busca aprovechar estos componentes presentes en el huevo, extraerlos y poder emplearlos en otras industrias como la nutracética, cosmética o incluso para la elaboración de biomateriales.

En los últimos años, el interés en la extracción de carotenoides de diferentes fuentes y materias primas ha crecido. Estos compuestos son pigmentos naturales de colores llamativos, desde el amarillo hasta el rojo, los cuales no son sintetizados por el ser humano (Ellison, 2016). Dado el importante papel que juegan los carotenoides en la prevención de enfermedades humanas y en el mantenimiento de la salud, y el hecho de que solo pueden ser incorporados por la dieta hacen que la extracción de estos de fuentes ricas en ellos sea un importante punto de estudio. Las frutas y verduras son las principales

fuentes de estos compuestos bioactivos, sin embargo, la biodisponibilidad de estas moléculas en las matrices vegetales es pobre. La yema, además de ser una importante fuente de carotenoides como la luteína y la zeaxantina, permite un mayor aprovechamiento de estos compuestos, ya que el estado en el que estos se encuentran y las interacciones con los lípidos de la matriz del huevo hacen que la biodisponibilidad de estos pigmentos sea mayor que en las fuentes vegetales (Zaheer, 2017). El uso de solventes vegetales, como aceites, permite a su vez conseguir extractos enriquecidos en estos pigmentos que pueden tener interés nutricional y culinario.

Por otra parte, las propiedades antioxidantes, colorantes y, en altas concentraciones, antimicrobianas de estos compuestos hacen que sean un aditivo interesante para incorporar en biomateriales. En los últimos años, el creciente interés por la elaboración de *packaging* alimentario activo, ha hecho que se haya estudiado la incorporación de gran cantidad de compuestos naturales bioactivos, la mayoría de origen vegetal o bacteriano, en biopolímeros.

La finalidad del *packaging* activo es preservar la calidad, seguridad y propiedades sensoriales de los productos alimentarios que protegen. Así mismo, la incorporación compuestos bioactivos, como antioxidantes o antimicrobianos, en algunos tipos de biopolímeros va a permitir obtener materiales con liberación controlada de estas sustancias bioactivas en los alimentos que protegen (Barbosa-Pereira et al., 2014).

1.1 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo ha sido evaluar la extracción de carotenoides de la yema de huevo utilizando diferentes disolventes, en concreto aceite de girasol y una mezcla de dos disolventes orgánicos como son el 2-propanol y el hexano, y evaluar la posible utilidad para la industria alimentaria de los diferentes extractos obtenidos.

Así pues, los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

- Caracterización de la extracción de carotenoides de la yema de huevo y sus fracciones utilizando un disolvente amigable con el medio ambiente, en este caso se ensayará el aceite de girasol.
- Evaluación de algunas de las propiedades de interés para la industria alimentaria de los aceites enriquecidos.
- Extracción de los carotenoides de la yema de huevo utilizando disolventes orgánicos.
- Preparación y caracterización de biopelículas enriquecidas con este extracto. Evaluación de aplicaciones para los materiales de *packaging* preparados.

2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

2.1 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de pigmentos liposolubles, ampliamente distribuidos en la naturaleza. Aunque dichas moléculas únicamente son sintetizadas de manera primaria por plantas, algas, levaduras, hongos, bacterias y arqueas, se pueden encontrar presentes en el reino animal debido a la absorción selectiva en la cadena alimentaria (Ellison, 2016; Schieber & Weber, 2016).

Los carotenoides son reconocidos por sus colores amarillos, naranjas y rojos, los cuales se deben a la estructura química de las moléculas, las cuales consisten en una larga cadena de carbonos poliénicos, dobles enlaces carbono-carbono, que permiten la absorción de luz visible. La estructura general de los carotenoides consiste en un esqueleto de 40 átomos de carbono compuesto por 8 moléculas de isopreno y 2 grupos terminales (Figura 1); las variaciones y derivatizaciones en el esqueleto isoprenoide, mediante la ciclación y oxidación de grupos terminales, da lugar a cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas de las moléculas, generando la existencia de más de 850 carotenoides naturales diferentes (Ellison, 2016; Maoka, 2020; Schieber & Weber, 2016).

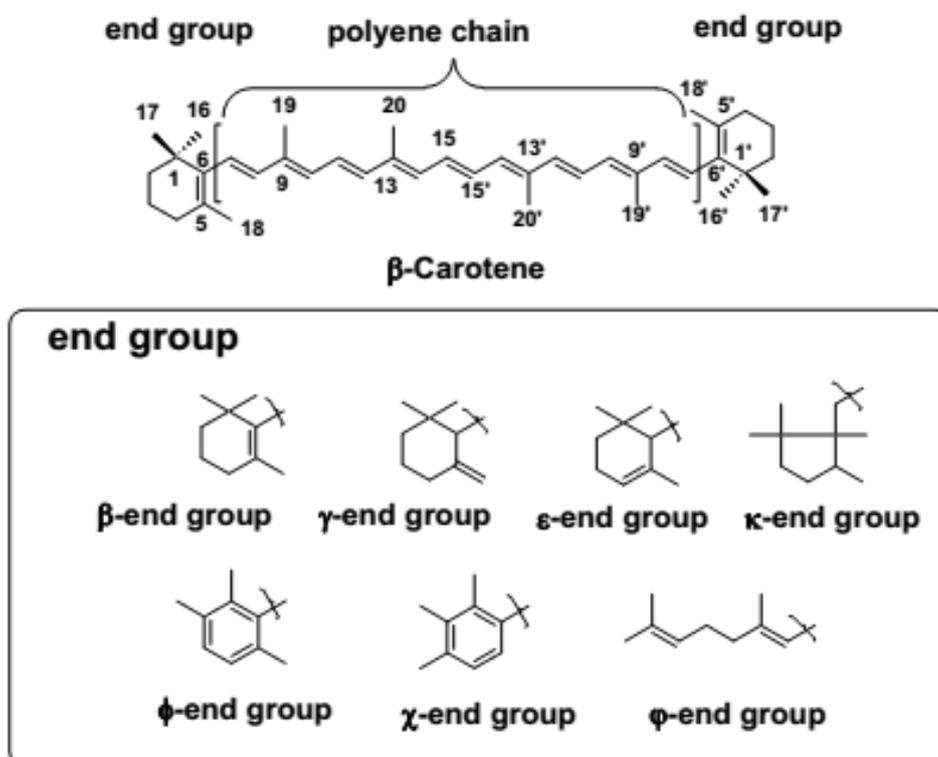


Figura 1: Estructura química básica de los carotenoides y de los grupos terminales (Maoka, 2020).

Según su estructura, los carotenoides se dividen en dos subgrupos: carotenos y xantófilas. Los carotenos, de los cuales se conocen hasta 50 tipos diferentes, son moléculas hidrocarbonadas, compuestas únicamente por átomos de carbono e hidrógeno, dentro de los cuales los más importantes son los β -carotenos, α -carotenos, γ -carotenos y licopeno (Figura 2.A). En cuanto a las xantófilas, como la β -criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina, fucoxantina o peridina (Figura 2.B), son carotenoides que además de carbono e hidrógeno contienen átomos de oxígeno como grupos hidroxilo, carbonilo, aldehído, carboxilo, epóxido o furanóxido; esta gran diversidad de estructuras da lugar a la existencia de más de 800 tipos diferentes de xantófilas (Maoka, 2020).

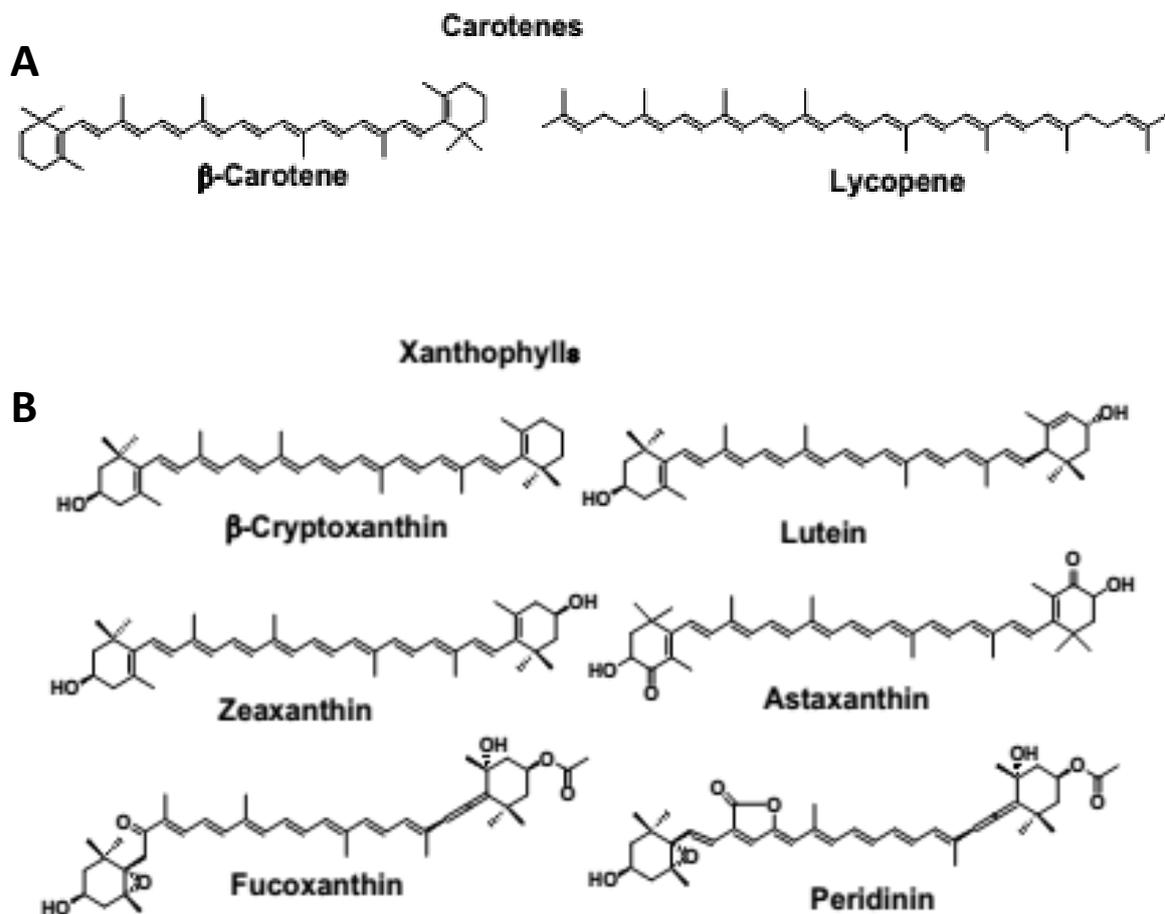


Figura 2: Estructuras químicas de los principales carotenos (A) y xantófilas (B) (Maoka, 2020).

2.2 Aplicaciones de los carotenoides

Como se comentó previamente, los carotenoides son moléculas presentes de manera natural en las plantas, principalmente frutas y vegetales, donde van a tener diferentes funciones entre las cuales destacan: fotoprotectora y de captación de luz, precursores de moléculas señal y hormonas, como el ácido abscísico o las estrigolactonas, y su función como atrayentes de pájaros e insectos que dispersan

el polen de las plantas (Ellison, 2016). Sin embargo, a pesar de ser moléculas esenciales, los animales no son capaces de sintetizar estas moléculas *de novo*, como hacen las plantas, y tienen que ingerirlas por medio de la dieta, siendo alrededor de 50 los diferentes tipos de carotenoides que se encuentran de manera habitual en los alimentos humanos más comunes, de los cuales 20 tipos se pueden detectar en la sangre tras la ingestión, es decir, son metabolizados. De estos últimos, β -carotenos, α -carotenos, licopeno, β -criptoxantina, luteína y zeaxantina, constituyen más del 90% del total de carotenoides ingeridos, los cuales se pueden separar en dos grupos: los precursores de la vitamina A, como los β -carotenos, los α -carotenos y la β -criptoxantina; y los no precursores de la vitamina A, como el licopeno, la luteína y la zeaxantina. Teniendo los primeros un rol esencial en la nutrición humana como fuente de provitamina A (Maoka, 2020).

Además de su función esencial como fuente de provitamina A, hoy día se conoce que los carotenoides tienen numerosos efectos beneficiosos en la salud de las personas. Se ha demostrado que tienen un importante peso en la prevención de enfermedades de la piel o de la vista, neurodegenerativas o cardiovasculares (Zia-UI-Haq et al., 2021). Además, actualmente se están realizando estudios que demuestran la capacidad de estas moléculas de actuar como anticancerígenos, disminuyendo el riesgo de la aparición de cánceres como el de próstata, ovarios, intestinal, etc. (Ellison, 2016).

El creciente interés por estas moléculas está haciendo que numerosas empresas se centren en la extracción y purificación de carotenoides con fines nutracéuticos y cosméticos. Pero no solo están cobrando peso en estas industrias, en la industria alimentaria se están empezando a utilizar estos compuestos como antioxidantes y colorantes naturales (Zia-UI-Haq et al., 2021).

2.3 Extracción de carotenoides

La creciente demanda e interés por los carotenoides, su extracción, purificación y sus aplicaciones en la industria, ha ocasionado un aumento en las investigaciones en este campo, centradas, principalmente, en la optimización de los procesos de extracción de carotenoides.

Las fuentes de las cuales se pueden obtener carotenoides de interés industrial son muy variadas, y los procesos de extracción dependerán del tipo de materia prima de la cual se obtengan estos. Entre las fuentes más utilizadas destacan las frutas, verduras, hojas y algas o microalgas de origen marino; siendo estas últimas la mayor fuente de carotenoides, hasta el 14% de su peso seco (Galasso et al., 2017). Estos procesos de extracción y purificación de compuestos bioactivos no solo son importantes por la obtención de compuestos de interés industrial, farmacéutico o alimentario, sino que en muchos casos permiten revalorizar subproductos de determinadas industrias, al acumularse los carotenoides

en la biomasa descartada: piel de frutas y verduras en la industria alimentaria o exoesqueletos de determinados crustáceos, subproducto de la industria pesquera.

A la hora de extraer los carotenoides de la biomasa se han utilizado diferentes métodos, entre los que destacan:

- Extracción líquida a presión atmosférica por maceración. Se trata de una extracción sólido-líquido en la que se pone en contacto la biomasa que contiene los compuestos de interés, carotenoides, con el extractante, el cual suele ser un solvente orgánico permitido en la industria alimentaria. Durante el tiempo que la biomasa y el solvente están en contacto se produce la migración de los compuestos solubles desde la biomasa al extractante. Este proceso puede realizar en frío o con calor (Saini & Keum, 2018).
- Extracción por agitación. En este caso se pone en contacto la biomasa con el solvente y se mantienen un cierto tiempo bajo agitación a las rpm de interés y a la temperatura de interés, produciéndose la migración de los carotenoides de la biomasa al solvente.
- Método *Soxhlet*. Se trata de una extracción líquida a presión atmosférica, en la que se utilizan solventes a la temperatura de ebullición de los mismos para conseguir una extracción selectiva de los compuestos de interés (Saini & Keum, 2018).
- Extracción asistida con microondas. Este método consiste en una irradiación electromagnética de frecuencias entre 0,3 y 300 GHz, la cual produce la excitación de las moléculas presentes en el medio y una presión en el interior de la matriz biológica donde se encuentran los compuestos de interés, que genera la rotura de esta y la liberación de los compuestos de interés al solvente utilizado (Otálora-Orrego & Martin, 2021; Saini & Keum, 2018).
- Extracción asistida por ultrasonidos. En este caso la mezcla solvente/biomasa se irradia con ultrasonidos, los cuales al impactar con el medio líquido producen una cavitación acústica que genera la rotura de la matriz, facilitando la migración de los compuestos de interés hacia el extractante (Otálora-Orrego & Martin, 2021; Saini & Keum, 2018).
- Extracción líquida acelerada o presurizada. Este tipo de extracción líquida se realiza a altas presiones, lo cual mejora la permeabilidad celular y facilita la penetración de los solventes en la matriz celular y la extracción de los compuestos de interés (Saini & Keum, 2018).
- Extracción por pulso eléctrico. Este proceso, más conocido como electroporación, consiste en someter a la mezcla solvente/biomasa a pulsos eléctricos de alto voltaje durante periodos de tiempo muy cortos (segundos), lo que produce un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, facilitando la extracción de los compuestos de interés (Saini & Keum, 2018).

- Extracción por fluidos supercríticos. Este es uno de los métodos más eficientes para llevar a cabo la extracción de compuestos termolábiles, como los carotenoides, de matrices sólidas o líquidas. Se caracteriza por utilizar como extractante fluidos específicos en estado supercrítico, los cuales se pueden comportar como gas o como líquido según las condiciones de operación, facilitando así el proceso de extracción. Por lo general, se utiliza dióxido de carbono (CO₂) en estado supercrítico, el cual no genera residuos tóxicos y evita la degradación de los compuestos bioactivos, permitiendo su obtención en una elevada pureza (Otálora-Orrego & Martin, 2021; Saini & Keum, 2018).
- Extracción enzimática. En este caso se utilizan enzimas hidrolíticas, generalmente pectinasa y celulasa, que destruyen las paredes celulares, quedando expuesto al solvente o extractante el material intracelular donde se encuentran los compuestos bioactivos de interés, carotenoides. Implementar la hidrólisis enzimática permite disminuir la energía de activación de la reacción química, permitiendo llevar a cabo el proceso de extracciones en una condiciones de operación muy leves que no suponen un peligro para la estabilidad de estos compuestos bioactivos (Otálora-Orrego & Martin, 2021).
- Extracción mediante solventes verdes. Este tipo de extracción busca sustituir los solventes orgánicos utilizados normalmente, hexano, etanol, cloroformo o acetona, altamente tóxicos, inflamables y perjudiciales para el medio ambiente y la salud, por solventes verdes, los cuales suponen un menor riesgo para las personas y el medio ambiente (Otálora-Orrego & Martin, 2021).

Este último punto, *extracción mediante solventes verdes*, es un ámbito de especial importancia hoy día. Debido a las nuevas leyes y normas sobre el tratamiento de solventes, residuos, gases y subproductos tóxicos, inflamables o altamente contaminantes, así como los impuestos que recaen sobre estos, su compra o tratamiento, las industrias buscan reducir su consumo y sustituirlos por solventes verdes, de fuentes renovables y naturales, no tóxicos, ni contaminantes. Entre los solventes verdes utilizados para llevar a cabo la extracción de compuestos bioactivos destacan el alcohol isopropílico, acetato de etilo, ciclopentil etil éter o dimetil carbonato. Además de los solventes verdes de origen químico mencionados previamente, en los últimos años se han empezado a utilizar solventes naturales, como el pineno, limoneno y aceites vegetales de canola, girasol y oliva (Otálora-Orrego & Martin, 2021; Saini & Keum, 2018). El uso de estos solventes naturales permite obtener extractos que posean tanto las propiedades beneficiosas que estos aportan como las aportadas por los compuestos bioactivos que se logran extraer, y en algunos casos, permiten aumentar el rendimiento de extracción respecto a los solventes convencionales (Otálora-Orrego & Martin, 2021).

2.4 Huevo

El huevo y, en concreto, el huevo de gallina es uno de los alimentos más básicos y versátiles que existen, presente en la dieta de la mayoría de las familias y ampliamente utilizado en la industria alimentaria debido a sus múltiples propiedades emulsificantes, coagulantes, espumantes, etc. Sin embargo, durante los últimos 50 años, tanto la industria del huevo como la tecnología de procesamiento del huevo y sus derivados ha sufrido importantes cambios, siendo hoy día más del 30% del huevo consumido en forma de huevos procesados (Froning, 2008; Valverde et al., 2016).

Un huevo estándar contiene alrededor de un 65% de clara y un 35% de yema, siendo estas un 88% y un 48% agua, respectivamente (Kulinka et al., 2017). En la Figura 3 se pueden apreciar las diferentes partes del huevo: cáscara, clara y yema, separadas entre sí por medio de membranas. La industria del huevo permite utilizar, tanto de manera conjunta como por separado, todas las partes del huevo, incluso los subproductos de su tratamiento, como pueden ser la cáscara, permitiendo una revalorización completa de este producto.

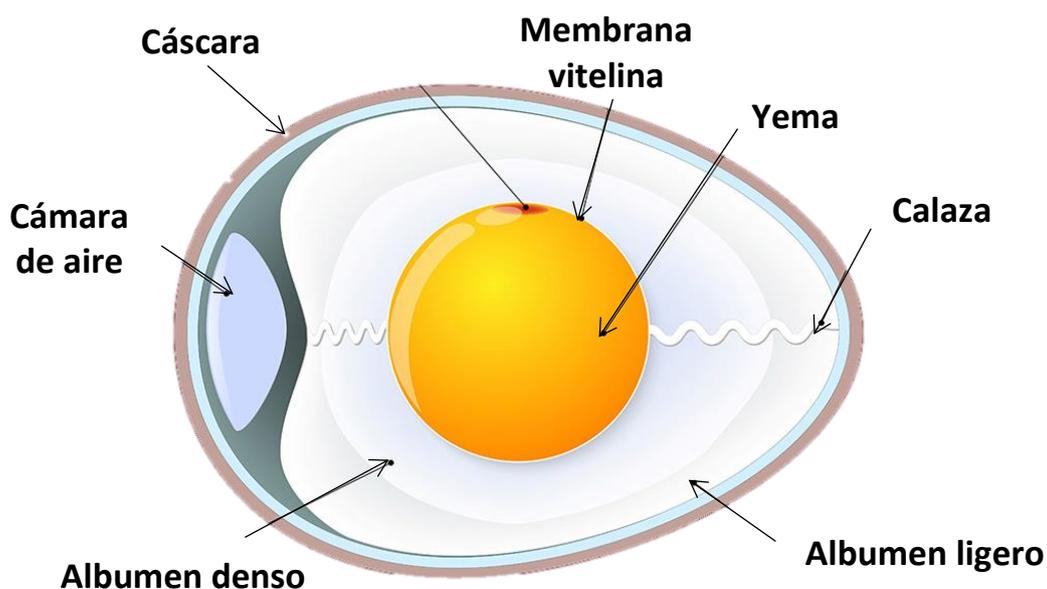


Figura 3: Huevo y sus partes (Imagen modificada obtenida de: dietadelhuevo.com).

En concreto, la yema de huevo es una de las partes más versátiles y funcionales del huevo, no solo en la industria alimentaria por sus cualidades nutricionales y organolépticas, sino que también es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica y cosmética, al ser una importante fuente de ingredientes activos (Laca et al., 2015). Se trata de una emulsión natural de aceite en agua con un 52% de materia seca, de la cual un 65% es grasa, un 31% proteínas y el 4% restante carbohidratos, vitaminas y minerales (Rodil et al., 2016).

Los lípidos de la yema, su componente mayoritario, se encuentran asociados a complejos de lipoproteínas y están constituidos por un 62% de triglicéridos, un 33% de fosfolípidos y menos de un 5% de colesterol. El perfil de ácidos grasos está sujeto a importantes variaciones de acuerdo con la alimentación de las gallinas, siendo la composición estándar un 30-35% de ácidos grasos saturados, un 40-45% de ácidos grasos monoinsaturados y un 20-25% de ácidos grasos poliinsaturados. Los carotenoides, los cuales dotan de color a la yema del huevo, constituyen menos del 1% del total de lípidos.

En cuanto a las proteínas, estas se pueden encontrar en forma de proteínas libres o como apoproteínas, proteínas que poseen lípidos unidos. Estas interacciones entre los lípidos y las proteínas resultan en la formación de lipoproteínas, de alta y baja densidad, que representan los principales constituyentes de la yema de huevo. Por lo tanto, la materia seca de la yema está constituida por 5 componentes mayoritarios: 68% de lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein*, LDL), 16% de lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoprotein*, HDL), 10% de proteínas globulares (livetina), 4% de fosfoproteínas (fosfovítina) y 2% de proteínas minoritarias (Anton, 2007).

Así mismo, la yema de huevo se puede separar por centrifugación en dos fracciones bien diferenciadas; los gránulos, que aparecen en el precipitado, y el plasma, que constituyen el sobrenadante (Figura 4); siendo esta, una línea de investigación bastante potente hoy día, con el objetivo de separar y extraer los compuestos bioactivos presentes en la yema y así explorar nuevas aplicaciones tecnológicas (Rodil et al., 2016). Ambas fracciones presentan diferente composición, estructura y sensibilidad a tratamientos mecánico-térmicos, por lo que trabajar con ellas por separado va a permitir un uso más eficiente de las mismas.



Figura 4: Muestras resultantes de la liofilización de: yema completa (izquierda), gránulos (centro) y plasma (derecha).

Los gránulos representan aproximadamente el 22% del total de materia seca de la yema de huevo, conteniendo sobre el 50% del total de proteínas de la yema y el 7% del total de los lípidos. El 78%

restante de materia seca está constituido por el plasma, que contiene entorno al 90% del total de los lípidos y al 50% del total de las proteínas (Valverde et al., 2016).

En cuanto a su composición (Figura 5), los gránulos consisten en complejos circulares de entre 0,3 y 2 μm de diámetro, los cuales están constituidos mayoritariamente por HDLs, y por fosfovitina, y en menor medida por LDLs, las cuales se encuentran incluidas en la estructura granular. Estos agregados de proteínas no solubles se encuentran en suspensión en un fluido más denso que es el plasma, el cual está constituido por LDLs y por glicoproteínas globulares, las livetinas (Rodil et al., 2016).

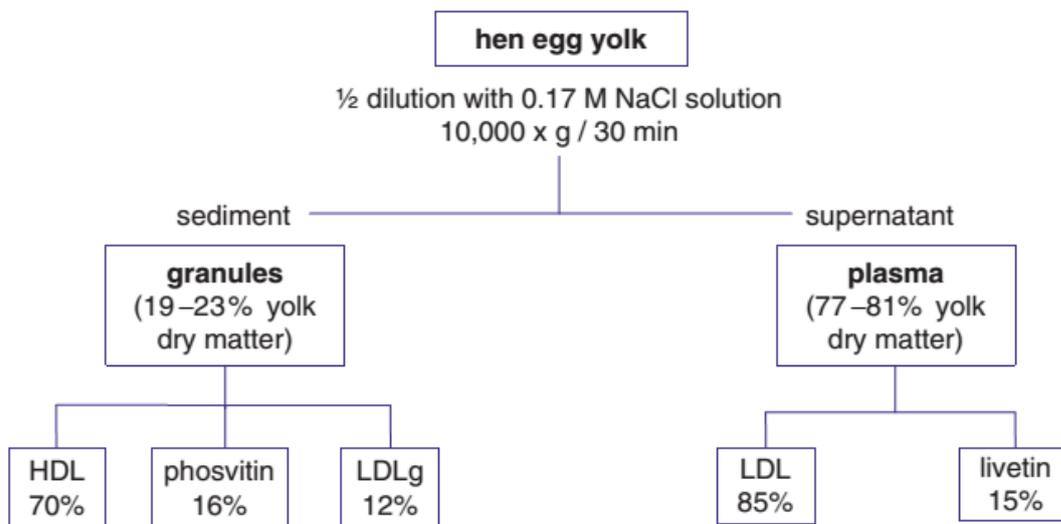


Figura 5: Fraccionamiento de la yema de huevo en gránulos y plasma, y la composición de estos (Anton, 2007).

Como se mencionó previamente, en la yema de huevo se encuentran la mayoría de los compuestos bioactivos de interés en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica. De entre estos, uno de los más importantes son los carotenoides, los cuales se encuentran principalmente en las LDLs, mayoritarias en las fracción plasmática.

2.5 Carotenoides en la yema de huevo

El perfil y la concentración de carotenoides en la yema de huevo depende ampliamente de la alimentación de las gallinas, siendo mayor la concentración cuanto más rica sea la dieta en vegetales ricos en dichos pigmentos (Zaheer, 2017). No obstante, independientemente de esto, los carotenoides van a ser responsables de la coloración naranja de la yema de huevo, pudiendo variar la intensidad de color o el brillo según el contenido de carotenoides, el cual va a ser menor del 1% del total de los lípidos presentes en la yema.

Los principales carotenoides presentes en la yema de huevo son luteína, zeaxantina y β -caroteno, aunque también se puede encontrar cantaxantina y criptoxantina en una menor medida (Anton, 2007; Kovalcuks & Duma, 2017). Una de las ventajas de los carotenoides presentes en la yema de huevo es su biodisponibilidad, la cual es bastante mayor que la de las fuentes vegetales (Zaheer, 2017).

Luteína y zeaxantina pertenecen al grupo de las xantófilas y se trata de los carotenoides más polares que se pueden encontrar en la yema de huevo, al poseer, ambos, grupos hidroxilo terminales en los extremos de sus estructuras. Además, su capacidad de encontrarse tanto libres como formando ésteres de ácidos grasos modifica tanto su polaridad como su solubilidad, influyendo en la biodisponibilidad de estos (Kovalcuks & Duma, 2017).

Se trata de poliisoprenoides que contienen 40 átomos de carbono y unas estructuras cíclicas al final de sus cadenas conjugadas (Figura 6). A pesar de poseer ambas la misma fórmula química no son estereoisómeros; siendo la única diferencia que existe entre ambas la localización del doble enlace en una de las estructuras cíclicas terminales, lo que dota a la luteína de tres centros quirales mientras que la zeaxantina solo posee dos (Figura 6) (Kovalcuks & Duma, 2017).

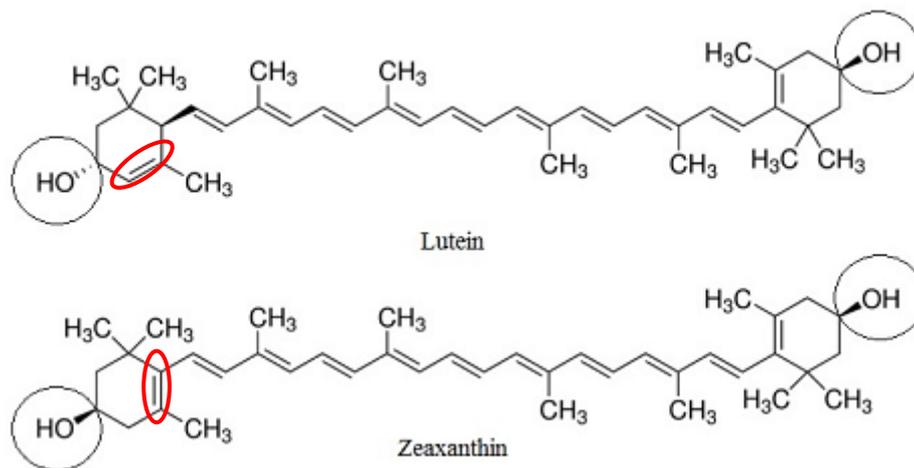


Figura 6: Estructura química de la luteína (imagen superior) y la zeaxantina (imagen inferior) (Kovalcuks & Duma, 2017).

El β -caroteno, el otro carotenoide de los tres mayoritarios en la yema de huevo, se trata de un carotenoide hidrocarbonado sin grupos funcionales, por lo que es un compuesto muy apolar y lipofílico, mucho más que la luteína y la zeaxantina. A diferencia de las xantofilas, el β -caroteno es uno de los principales precursores de vitamina A, lo cual le dota de una importancia adicional sobre el resto de los carotenoides presentes.

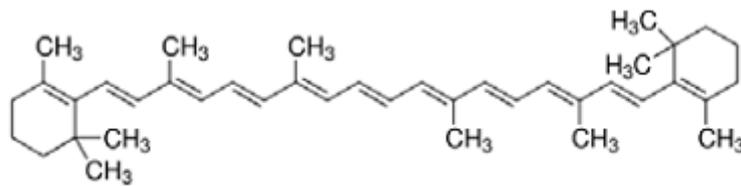


Figura 7: Estructura química del β -caroteno (Kovalcuks & Duma, 2017).

La presencia de estos carotenoides junto con la vitamina E, la vitamina A, el selenio y ciertas proteínas como la ovoalbúmina, la ovotransferrina, fosfovitina, y cierto lípidos, dota a los huevos de una importante capacidad antioxidante, la cual permite que estos sean considerados como uno de los principales alimentos antioxidantes de la dieta. La presencia de estos antioxidantes en el huevo, principalmente luteína, zeaxantina y β -caroteno, ha demostrado que los huevos son alimentos con numerosos efectos beneficiosos para la salud (Zaheer, 2017):

- La luteína y la zeaxantina son los principales componentes del pigmento macular del ojo, por lo que se considera que estos tienen un importante papel en la protección de los ojos frente a la degeneración macular relacionada con la edad. Propiedad que se relaciona con la capacidad captadora de radicales libres y de oxígeno singlete de estos carotenoides.
- Otro importante mecanismo de protección radica en su capacidad para captar luz azul antes de que esta dañe los fotorreceptores de las células, lo cual es considerada un mecanismo antioxidante pasivo.
- Son capaces de reducir el daño en el DNA y la oxidación lipídica, principalmente de LDL, eliminando o disminuyendo la cantidad de peroxinitrilo en las células.

No obstante, al igual que los vegetales, los huevos también se cocinan antes de ser consumidos; esto puede dar lugar a la degradación o isomerización de los carotenoides y otros de los componentes bioactivos presentes en el huevo. Mientras que la preparación doméstica de los huevos implica procesos de cocción o freído, la preparación industrial de la yema o el huevo implica secado por congelación, secado por *spray* o pasteurización. Estos tratamientos que implican altas temperaturas, freído, cocción o microondas, producen una pérdida de carotenoides de entre el 6 y el 18% del total. Por lo que, para evitar esto, se están empezando a aplicar tratamientos que no supongan un calentamiento en exceso de la materia prima, como pueden ser la irradiación con rayos γ o tratamientos a alta presión (Schieber & Weber, 2016).

Además, el almacenamiento de los huevos o los ovoproductos, tanto a temperatura ambiente como congelados, también resulta en una pérdida significativa de xantófilas, sobre todo a partir de las 4 semanas de almacenamiento; degradación que se debe principalmente a la oxidación de los lípidos del

huevo. Por lo que la capacidad antioxidante del huevo, la yema de huevo o los ovoproductos derivados va a depender de numerosos factores como el tratamiento de estos o su almacenamiento, donde van a tener un importante peso factores como la incidencia de luz o la temperatura a la que estos se mantengan (Schieber & Weber, 2016).

2.6 *Films* o biopelículas biodegradables

Durante muchos años, plásticos como el poliestireno (PS), polietileno (PE), polipropileno (PP) o tereftalato de polietileno (PET) han sido ampliamente empleados en la industria alimentaria y del envasado tanto por su facilidad de procesamiento, bajo precio y gran resistencia química y mecánica, como por su buena permeabilidad frente al oxígeno, dióxido de carbono y aromas (Khalil et al., 2018). Sin embargo, estos materiales, derivados del petróleo, requieren cientos de años para poder degradarse, siendo su acumulación un importante problema medioambiental; razón por la cual, en los últimos años, algunos países han restringido el uso de estos materiales plásticos derivados del petróleo (da Rocha et al., 2018).

Con el fin de reducir la cantidad de residuos plásticos que se envían a los vertederos y al medio ambiente, así como todos los problemas causados por estos, en los últimos años, las investigaciones en el campo de los biomateriales se han centrado en la obtención de materiales de envasado a partir de recursos renovables, ganando especial atención el empleo de biopolímeros.

Estos biopolímeros, cuyo empleo ha crecido notablemente en los últimos 20 años, resultan una buena opción para el envasado de frutas, verduras y otros productos frescos, debido a que son altamente seguros gracias a la ausencia de productos químicos dañinos y toxinas, y a su biodegradabilidad, degradándose en compuestos fácilmente absorbibles por la tierra (Khalil et al., 2018).

De acuerdo con su fuente, los biopolímeros se pueden dividir en tres clases: polímeros formados por procesos químicos a partir de monómeros renovables como precursores, como es el caso del PLA; polímeros como los polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos; y los polímeros obtenidos directamente de biomasa animal o vegetal, entre los que destacan lípidos, proteínas y polisacáridos. A pesar del gran número de biopolímeros existentes, el uso de muchos de ellos en *packaging* alimentario se ve limitado debido a sus, relativamente pobres, propiedades mecánicas y de barrera, en comparación con los materiales derivados del petróleo. Para solventar las limitaciones de estos materiales, se han propuesto diversos métodos de tratamientos químicos y físicos entre los que destacan: tratamientos térmicos, irradiación gamma, modificaciones químicas y la incorporación de aditivos, como compuestos bioactivos o plastificantes (Khalil et al., 2018).

Los *films* biodegradables pueden dividirse en tres categorías de acuerdo a sus componentes: hidrocoloides, lípidos y composites.

- Hidrocoloides. Son polímeros hidrofílicos, proteínas y polisacáridos, de origen natural o sintético, que son capaces de formar geles al entrar en contacto con agua gracias a la presencia de un gran número de grupos hidroxilo en su estructura (da Rocha et al., 2018).

En cuanto a los polisacáridos, estos son los biopolímeros más utilizados para la elaboración de *films* biodegradables debido a su baja toxicidad, buenas propiedades mecánicas y de barrera, y su alta degradabilidad. Estos polímeros poseen una estructura lineal compuesta por uno o más monosacáridos diferentes repetidos y carga neutra, positiva o negativa, dependiendo de los grupos funcionales presentes en los monómeros. Entre los más comunes destacan: almidón, celulosa y sus derivados, pectina, quitosano, alginato, agar, carragenato, PLA y policaprolactonas (Khalil et al., 2018; da Rocha et al., 2018).

Las proteínas son componentes estructurales y funcionales de plantas y animales, constituidos por cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Tanto las proteínas de origen animal como las de origen vegetal han sido ampliamente utilizadas para la elaboración de *films* biodegradables gracias a su relativa abundancia, habilidad para formar *films* y su calidad nutricional. Sin embargo, una desventaja de los *films* biodegradables de proteínas es que algunos de ellos, como los *films* de gluten o los de proteína de leche, pueden ocasionar reacciones alérgicas; algo que hay que tener en cuenta al utilizar este tipo de biomateriales como *packaging* alimentario (Khalil et al., 2018). Entre los tipos de proteína más utilizados para la elaboración de *films* biodegradables destacan: gelatina (tanto de origen marino como terrestre), proteínas miofibrilares de pescado, proteína de soja, proteína de maíz o zeína, caseína, proteína del suero, colágeno y proteína del gluten (da Rocha et al., 2018).

- Lípidos. Se trata de moléculas hidrofóbicas o anfifílicas que incluyen ceras, acilgliceroles y ácidos grasos. Los *films* lipídicos se usan principalmente por sus propiedades hidrofóbicas, constituyendo una buena barrera para evitar la pérdida de humedad. Sin embargo, debido a la falta de integridad estructural, los lípidos dan lugar a *films* frágiles y con unas propiedades mecánicas muy pobres. Una solución a estos problemas puede ser mezclar los lípidos con materiales hidrofílicos como los polisacáridos para formar emulsiones formadoras de *films* o *films* bicapa (Khalil et al., 2018).
- Composites. Los composites o resinas compuestas se elaboran a partir de dos o más constituyentes, proteínas, polisacáridos y/o lípidos, con el objetivo de conseguir una

amalgama con características mejoradas respecto a los componentes individuales que lo componen (Khalil et al., 2018).

Estas películas biodegradables se pueden preparar por tres métodos diferentes: la técnica de fundición o *casting*, se trata de la técnica más empleada a nivel de laboratorio, la cual consiste en verter la solución formadora de *films* sobre una placa de material adecuado; la técnica de fundición en cinta o *tape casting*, que consiste en verter la solución formadora de *films* sobre un soporte en movimiento continuo, lo cual permite controlar el grosor de la película formada; y la técnica de extrusión, esta técnica es la más utilizada a nivel industrial, que permite generar *films* a partir de *pellets* o barras del material de interés que se funden y se hacen pasar entre dos rodillos para obtener la película (da Rocha et al., 2018).

Hoy día, la seguridad y la calidad alimentaria son las principales preocupaciones en la industria alimentaria. Es por ello, que la elaboración de recubrimientos o películas bioactivas a partir de polímeros biodegradables combinados con compuestos antimicrobianos y/o antioxidantes es una de las estrategias más interesantes y prometedoras. En los últimos años, los investigadores que trabajan en el campo de los materiales y biomateriales se han centrado en la búsqueda de formas de envasado o materiales activos, *active packaging*, que permitan mantener la calidad de los alimentos, minimizar el crecimiento de microorganismos indeseables en la superficie de estos y ofrecer protección extra contra los agentes oxidativos, como el oxígeno o la luz solar (Shen & Kamdem, 2015). Las aplicaciones específicas de estos *films* bioactivos van a depender de las características de estos, las cuales en gran parte van a deberse a los aditivos incluidos: permeabilidad al vapor de agua, permeabilidad al oxígeno, resistencia a la rotura, elasticidad, solubilidad en agua o en lípidos, color, transmitancia y transparencia, propiedades antimicrobianas y poder antioxidante.

El principal cometido de estos *films* biodegradables en la industria de tecnología alimentaria es permitir prolongar la vida útil y mejorar la calidad de los alimentos frescos y los productos procesados. Durante los últimos años, un gran número de industrias han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de *packaging* alimentario sostenible y comercialmente viable a partir de biopolímeros. Algunas de estas empresas y los productos desarrollados por estas se muestran en la Figura 8, donde se puede observar la gran diversidad de aplicaciones como *packaging* alimentario de estos biomateriales y su reconocimiento a escala industrial como una forma de producción de materiales respetuosos con el medioambiente (Khalil et al., 2018).

Company	Biopolymer	Application
Bioenvelop	Starch	Moisture barrier coating films for food
EverCorn, Inc. (subsidiary of Japan Corn Starch Co., Ltd.)	Starch	Films for food wrapping
FKur Kunststoffe GmbH	Cellulose/polylactic acid	Composite film for food packaging applications
Metabolix	Polyhydroxyalkanoates	Utilized as cast film
NatureWorks LLC	Polylactic acid	Food wrapping
NODAX	Polyhydroxyalkanoates	Good odor and oxygen barrier properties, customizable mechanical properties, thus highly suitable for food packaging
Fresh Del Monte Produce Inc	Polylactic acid	Packaging of fresh-cut fruits
ILIP	Polylactic acid	Packaging of fresh-cut to fresh whole produce

Figura 8: Compañías implicadas en la producción de bioplásticos con aplicaciones relacionadas con el packaging alimentario (Khalil et al., 2018).

Como se puede observar en la Figura 8, el PLA es uno de los polímeros biodegradables y de origen bio más utilizados a nivel industrial y más prometedores, debido a su facilidad de procesado, buenas propiedades mecánicas y alta transparencia. Se trata de un poliéster alifático, biodegradable y sintético que se genera a partir de la unión de monómeros de ácido láctico (*lactic acid*, LA) (Figura 9), el cual se obtiene de recursos renovables como el almidón y azúcar de determinadas fuentes vegetales como el maíz, la tapioca, la caña de azúcar o la remolacha. Para las aplicaciones industriales, como fibras, *films* o botellas, la longitud de la cadena de monómeros, n , ha de ser entre 700 y 1400 unidades; un tamaño significativamente mayor que el de otros poliésteres parcialmente aromáticos como tereftalato de polietileno (PET) o tereftalato de polibutileno (PBT), cuya n varía entre 100 y 200 unidades (Hagen, 2012).

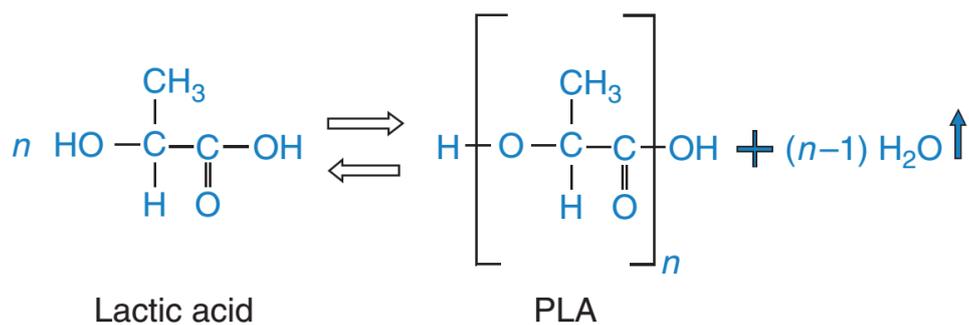


Figura 9: Síntesis del PLA a partir del LC (Hagen, 2012).

La síntesis de LA a partir de la correspondiente materia prima vegetal puede ser tanto por fermentación bacteriana como por ruta petroquímica. El LA se puede encontrar en forma de dos isómeros ópticamente activos, L- y D- (Figura 10); siendo el producido por síntesis petroquímica una mezcla 50/50 ópticamente inactiva de ambos isómeros, mientras que el LA generado por fermentación

existe casi exclusivamente en forma L- (99,5 % isómero L- y 0,5 % isómero D-) (Rasal et al., 2010). La polimerización del LA a PLA se puede conseguir por tres vías diferentes: polimerización de apertura del anillo de lactida (*ring-opening polymerization, ROP*), polimerización por condensación directa (*direct polycondensation, DP*), y polimerización por condensación azeotrópica directa (*azeotropic polycondensation, AP*) (Ibarra et al., 2016).

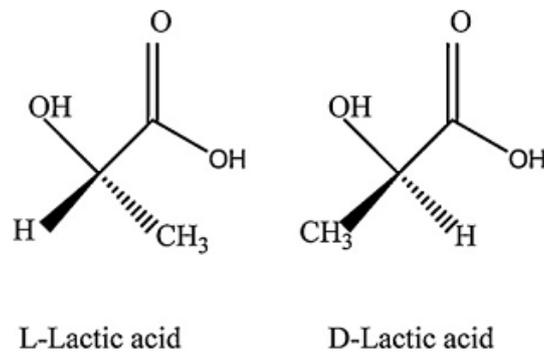


Figura 10: Isómeros ópticamente activos del LA.

En los últimos años, la producción, venta y empleo del PLA ha crecido notablemente, siendo Europa el principal mercado del producto, seguido de Japón, Estados Unidos y Corea del Sur (Hagen, 2012). Las principales aplicaciones de este biopolímero son como *packaging* alimentario debido a sus propiedades y características fisicoquímicas, la cuales son comparables y, en algunos casos, superiores a los polímeros derivados del petróleo (Ibarra et al., 2016).

El éxito de la implementación del PLA en aplicaciones biomédicas y de consumo depende no solo de las buenas propiedades mecánicas de este biopolímero, sino también de la capacidad de controlar y funcionalizar su superficie. Entre las ventajas del PLA frente a muchos plásticos derivados del petróleo y otros biomateriales destacan: la biodegradabilidad, reciclabilidad y compostabilidad del biopolímero; la biocompatibilidad, lo cual resulta un aspecto importante para las aplicaciones biomédicas; la procesabilidad, la cual es mucho mejor que la de otros biomateriales como los polihidroxialcanoatos o el polietilenglicol; y el ahorro de energía, la producción de PLA requiere un 25-55% menos de energía que otros polímeros derivados del petróleo. Este biopolímero también presenta ciertas limitaciones: poca resistencia mecánica, velocidad de degradación lenta, hidrofobicidad y la falta de grupos reactivos en la cadena (Rasal et al., 2010); las cuales se han ido solventando mediante modificaciones en la superficie del PLA o la incorporación de compuestos bioactivos, entre los que destacan extractos naturales, bacteriocinas, ácidos orgánicos, enzimas y metales (Ibarra et al., 2016).

3 METODOLOGÍA

3.1 Preparación de la yema de huevo y separación de sus fracciones

Tanto para obtener la yema de huevo limpia como las fracciones de esta por separado, en primer lugar, se separó la clara de la yema y esta se secó cuidadosamente con papel de meseta, evitando romper la membrana vitelina y mezclar la yema con la clara. A continuación, la membrana vitelina se rompió y se recogió la yema en un vaso de precipitado.

En el caso de la yema pura, esta se liofilizó sin tratamiento previo. Sin embargo, para obtener gránulos y plasma por separado, la yema líquida se mezcló con agua destilada en una proporción 1:1,5 (v/v) y, a continuación, la solución se ajustó a pH 7,0 con NaOH 0,1 M y se centrifugó a 10000g durante 45 minutos a 8 °C.

Tras la centrifugación, tanto el sedimento, los gránulos; como el sobrenadante, el plasma, se recogieron en recipientes separados y se sometieron a liofilización junto con la yema líquida pura. Una vez liofilizadas (Figura 11), todas las muestras (yema, plasma y gránulos) se trituraron hasta conseguir un polvo fino, el cual se almacenó en el congelador.



Figura 11: Gránulos y plasma de yema de huevo liofilizados.

3.2 Extracción de carotenoides con aceite de girasol

Para determinar en qué condiciones se obtiene una mejor extracción de los carotenoides tanto de la yema de huevo completa como de sus fracciones (plasma y gránulos), se llevó a cabo el proceso de extracción con aceite de girasol marca Alimerka (mercado local) con diferentes condiciones experimentales, variando parámetros como la velocidad de homogenización, la temperatura de extracción y el tiempo. Los carotenoides extraídos en cada una de las operaciones se cuantificaron mediante un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 150 Thermo Scientific (Thermo, Estados Unidos)

(Figura 12), midiendo a la longitud de onda de 450 nm (Islam & Schweigert, 2015; Schlatterer & Breithaupt, 2006).

A fin de cuantificar la concentración de carotenoides en cada extracto a partir de los valores de absorbancia obtenidos en la medida espectrofotométrica, se realizó una recta patrón de β -carotenos (Sigma Aldrich, 22040-1G-F) en aceite de girasol. Las concentraciones utilizadas fueron 20, 15, 10, 8, 6, 4, 2 y 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cuya absorbancia se midió a 450nm al igual que las muestras extraídas.



Figura 12: Espectrofotómetro empleado para cuantificar la cantidad de carotenoides presentes en las muestras de aceite.

El proceso de extracción de carotenoides se caracterizó en función de la velocidad de agitación y del tiempo y la temperatura de reacción. Los rangos de valores estudiados para cada una de estas variables que se detallan a continuación se determinaron de acuerdo con los resultados obtenidos en ensayos preliminares.

- *Tiempo de reacción.* Se hizo un seguimiento de cada proceso de extracción tomando muestras a los 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 10 y 15 minutos.
- *Temperatura de reacción.* Para ver la influencia de esta variable en el proceso, se realizó la extracción a 5 °C, 15 °C, 30 °C y 55 °C. Para lo cual se utilizó un baño y un vaso con entrada y salida de agua (Figura 9.A), que garantiza que el líquido contenido se encuentre a la temperatura establecida en el baño.

- *Velocidad de agitación.* Se empleó el homogeneizador Silent Crusher (Heidolph, Alemania) con el rotor 12 GM (Figura 9.B) y las extracciones se estudiaron a 5000 y 15000 rpm.

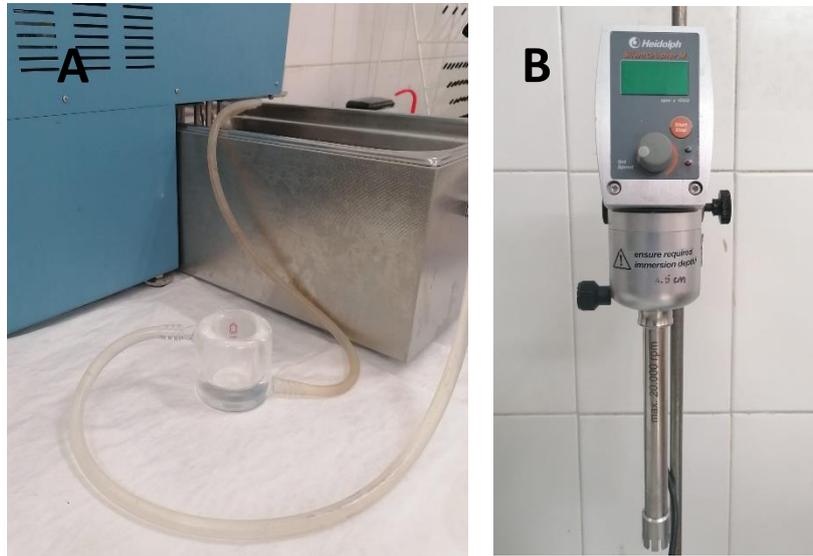


Figura 13: Equipos empleados para realizar las extracciones. (A) Baño de temperatura y vaso con recirculación de agua. (B) Homogeneizador Silent Crusher.

Para llevar a cabo el proceso de extracción, se pesaron 27 g de aceite de girasol y se vertieron en el vaso conectado al baño de agua; a la temperatura deseada para la extracción. Una vez que el aceite alcanzó la temperatura deseada, se pesaron 3 g de la muestra (yema, gránulos o plasma) y se añadieron al vaso que contenía el aceite.

En el momento en el que la muestra y el aceite entraron en contacto, se encendió el homogeneizador a la velocidad adecuada y durante los tiempos antes definidos.

A continuación, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 7 minutos, inmediatamente tras su extracción. Se descartó el precipitado y se recogió el sobrenadante, en el cual se encuentran los carotenoides; los cuales se cuantificaron midiendo la absorbancia de los sobrenadantes a 450 nm, tal y como se explicó anteriormente, utilizando como blanco aceite de girasol.

El proceso de extracción se repitió para todas las combinaciones de las variables a estudiar por duplicado, y para los tres tipos de muestra, yema completa, gránulos y plasma.

Para poder determinar el porcentaje de carotenoides extraídos tanto de la yema completa como de sus fracciones, es necesario conocer la cantidad total de carotenoides que hay en cada una de ellas. Para lo cual se llevó a cabo una extracción utilizando acetona como fracción líquida o extractante (Islam & Schweigert, 2015; AOAC, 1973).

De acuerdo con el método AOAC, se pesó 1 g de muestra liofilizada (yema, plasma o gránulos) y se mezcló con acetona en 2 pasos; primero se mezcló con 2 mL de acetona para conseguir una pasta espesa y, posteriormente, se enrasó hasta 50 mL. La mezcla se mantuvo en agitación 10 minutos y, a continuación, se filtró con papel de filtro Whatman N°4, limpiando bien el filtro con acetona para aclarar el precipitado retenido en el filtro (Figura 14). La disolución de acetona recuperada se diluyó hasta 100 mL y se midió la absorbancia a 450 nm.



Figura 14: Restos de yema de huevo tras la extracción con acetona (izquierda) y yema liofilizada original (derecha).

Para poder determinar la concentración de carotenoides totales extraídos a partir de los valores de absorbancia obtenidos, se realizó una recta patrón de β -carotenos (Sigma Aldrich, 22040-1G-F) en acetona. Las concentraciones utilizadas fueron 6, 4,5, 3,6, 2,7, 1,35, 0,675, 0,338, 0,169 y 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cuya absorbancia se midió a 450 nm al igual que las muestras extraídas. Sustituyendo el valor de la absorbancia en la ecuación obtenida del ajuste lineal y teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se calcularon los μg de carotenoides por gramo de muestra (yema, plasma o gránulos).

3.2.1 Evolución de la calidad del aceite de girasol enriquecido bajo condiciones fotooxidativas

La calidad de los aceites y grasas está estrechamente relacionada con la estabilidad oxidativa y la degradación de los componentes del producto (Stoll et al., 2017). Para determinar la estabilidad oxidativa del aceite de girasol enriquecido con carotenoides frente al normal se determinó la evolución de diferentes parámetros, como el valor peróxido (*peroxide value*, PV) y la concentración de carotenoides y clorofilas de ambos aceites, bajo condiciones de fotooxidación; para lo cual las muestras de aceite, aceite enriquecido con carotenoides y aceite de girasol sometido al mismo tratamiento, se mantuvieron 9 días en una placa abierta por la superficie y bajo la incidencia de la luz solar.

- **Valor peróxido (PV)**

El PV de las muestras se determinó de acuerdo con el método estándar ISO 3976 | IDF 74 (ISO, 2006). Se pesaron entre 10-15 mg de aceite y se disolvieron en 9,8 mL de una mezcla de cloroformo-metanol 7:3 (v/v); posteriormente, se añadieron 50 µL de tiocianato de amonio y 50 µL de solución de Fe (II). Las muestras se agitaron y se mantuvieron 10 minutos en oscuridad y, a continuación, se midió la absorbancia a 500 nm frente a un blanco. El banco contiene todos los reactivos anteriores excepto la muestra de aceite. El PV, expresado como mEq de O₂/Kg de aceite, se calculó con la siguiente fórmula (1):

$$(1) \quad PV = \frac{Abs}{55,84 \times w} \times \frac{1}{b} [mEq \ O_2/Kg \ aceite]$$

Donde w es el peso del aceite en g; Abs la absorbancia de la muestra; 55,84 el peso atómico del Fe (III); y b la pendiente de la curva de calibrado de Fe (III).

Para la curva de calibrado, se preparó una solución de 1 mg/mL de cloruro de hierro (III) en agua destilada, a partir de la cual se preparó una disolución stock de Fe (III) de 10 µg/mL en cloroformo-metanol. A partir de la solución stock de 10 µg/mL se prepararon estándares conteniendo 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg de Fe (III) a los cuales se añadió cloroformo-metanol (7:3) hasta un volumen de 9,8 mL; posteriormente, se añadieron 50 µL de tiocianato de amonio y se midió la absorbancia a 500 nm. La absorbancia de los estándares de 5 a 40 µg de Fe (III) se representó frente a su concentración. El resto de soluciones, la solución de Fe (II) y la de tiocianato de amonio, se prepararon de acuerdo con ISO (2006).

- **Carotenoides y clorofilas**

Para determinar el contenido en clorofilas y carotenoides de las muestras de aceite se pesó 1,5 g de cada muestra de aceite y se disolvió en 5 mL de ciclohexano. Las absorbancias correspondientes de cada muestra se midieron a 670 y 472 nm y la concentración de clorofilas y carotenoides en mg por Kg de aceite se calculó con las ecuaciones (2) y (3), respectivamente (Stoll et al., 2017):

$$(2) \quad [clorofilas] = (A_{670} \times 10^6) / (613 \times 100 \times densidad \ aceite)$$

$$(3) \quad [carotenoides] = (A_{472} \times 10^6) / (2000 \times 100 \times densidad \ aceite)$$

Siendo la densidad del aceite de girasol 0,85 mg/mL.

3.2.2 Colorimetría del aceite de girasol enriquecido

Para medir el color del aceite enriquecido y analizar sus propiedades colorimétricas se empleó el colorímetro espectral LC 100/ SV 100 (Lovibond, Reino Unido) (Figura 15), el cual permite obtener los

parámetros L^* , a^* y b^* de acuerdo con la escala CIELAB; siendo L^* la luminosidad, a^* las coordenadas rojo/verde y b^* las coordenadas amarillo/azul (Stoll et al., 2018).



Figura 15: Colorímetro utilizado para medir las propiedades colorimétricas de las muestras de aceite y de los films.

Para llevar a cabo el análisis se calibró el instrumento con un blanco estándar y se midieron las muestras de aceite en unas cubetas específicas del colorímetro. Las mediciones se realizaron por duplicado.

La diferencia total de color (ΔE^*) se calculó usando la ecuación (4), donde ΔL^* , Δa^* y Δb^* son los valores de las diferencias de los correspondientes parámetros de color entre las muestras de aceite enriquecido con carotenoides y el aceite de girasol tratado; y el *Chroma* o saturación se calculó con la ecuación (5) (Stoll et al., 2018).

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

$$(5) Chroma = \sqrt{a^2 + b^2}$$

3.3 Extracción de carotenoides de la yema de huevo utilizando disolventes orgánicos. Obtención de aceite de yema de huevo

Para la extracción total de los carotenoides contenidos en la yema de huevo se llevó a cabo una extracción con una mezcla de dos disolventes de diferentes polaridades, 2-propanol y hexano (Kovalcuks & Duma, 2014).

Para ello, se mezclaron los disolventes, 2-propanol (polar) y hexano (no polar), en una proporción 30/70 y a esta mezcla se añadió la yema de huevo liofilizada en un ratio 1:10, solvente: yema de huevo. La extracción se realizó agitando fuertemente durante 30 minutos a temperatura ambiente. El extracto se filtró utilizando una bomba de vacío para eliminar el precipitado, y los disolventes orgánicos se recuperaron mediante el uso de un rotavapor R-205 Büchi (Büchi Labortechnik AG, Suiza) a 60 °C. Al líquido viscoso resultante, que contiene los carotenoides de la yema de huevo así como la mayoría de los lípidos que la componen, se denominó “aceite de yema de huevo”.

La determinación de la cantidad de β -carotenos en el aceite de yema se realizó de acuerdo con el método estándar *UNE-EN ISO 17932:2012* (AENOR, 2012). Para lo cual se pesaron entre 100 y 500 mg de aceite de yema en un matraz aforado de 25 mL y se enrasó hasta ese volumen. Tras agitar vigorosamente, se midió la absorbancia de la mezcla a 446 nm, determinándose el contenido total de carotenoides en mg por kg de muestra usando la fórmula (6):

$$(6) \quad Wc = \frac{383 \cdot A}{l \cdot \rho}$$

Donde, $383 = 10^6 / 2610$, donde 2610 ($\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) es el coeficiente de extinción específico de una solución 1% de β -carotenos en isooctano a 446 nm; A , la absorbancia de la muestra a 446 nm; l , la longitud de la celda (1 cm); y ρ , la concentración de la muestra en gramos por 100 mL.

3.4 Elaboración de *films* de PLA con aceite de yema de huevo

La solución formadora de *films* se preparó disolviendo PLA en diclorometano al 5%, con agitación a temperatura ambiente durante una hora, y posteriormente se añadieron 0,1, 0,2 y 0,3 g de aceite de yema de huevo por gramo de PLA.

Para la elaboración de los *films*, se vertieron 5 mL de cada solución formadora de *films* en una placa de vidrio, de tal manera que se vertieron 0,1 mL de solución por cm^2 de la placa de vidrio. Los *films* se secaron a temperatura ambiente bajo campana de extracción durante 15 minutos, hasta que todo el disolvente se evaporó y, posteriormente, se despegaron de la placa y se estabilizaron en una cámara de humedad a 25 °C y 50% humedad durante 2 días.

3.4.1 Transmitancia y transparencia

Las propiedades barrera de los *films* ante la luz ultravioleta y la luz visible fueron evaluadas de acuerdo con la metodología seguida por Dick et al. (2015). Para ello, los *films* se cortaron en piezas rectangulares de 1 cm de ancho aproximadamente y se introdujeron en el interior de una celda de vidrio del espectrofotómetro.

El porcentaje de transmitancia de los *films* se estudió midiendo la transmitancia de las muestras tanto en el rango ultravioleta como en el de luz visible, desde 280 hasta 800 nm, mediante un espectrofotómetro UV-vis (Figura 12), utilizando la celda vacía como blanco.

Por otro lado, la transparencia de los *films* se calculó mediante la ecuación (7), donde A_{600} es la absorbancia de los *films* a 600 nm y x es el grosor de los *films* en mm.

$$(7) \quad \text{Transparencia} = \frac{A_{600}}{x}$$

El grosor de los *films* se midió utilizando un micrómetro digital (Mitutoyo C., Japón), con una precisión de $\pm 1 \mu\text{m}$. El grosor se midió en 10 puntos diferentes de cada *film* y, posteriormente, se realizó la media aritmética.

3.4.2 Colorimetría

Para medir el color de los *films* y analizar sus propiedades colorimétricas se empleó igualmente el colorímetro descrito en la sección 3.2.2.

Para llevar a cabo el análisis, los *films* se colocaron sobre una hoja blanca (L^* , 98,3; a^* , -0,9; b^* , 0,9), la cual se utilizó como estándar. El análisis se realizó por triplicado tanto para el *film* control (PLA solo), como para los *films* con diferentes cantidades de aceite (0,1, 0,2 y 0,3 g).

La diferencia total de color (ΔE^*) se calculó usando la ecuación (4), donde ΔL^* , Δa^* y Δb^* son los valores de las diferencias de los correspondientes parámetros de color entre los *films* con aceite de yema de huevo y *film* control sin aceite de yema de huevo. El índice de blancura (*White Index*, WI) de los *films* se calculó mediante la ecuación (8), y el *Chroma* o saturación se calculó con la ecuación (5) (Asadi & Pirsá, 2020; Stoll et al., 2018).

$$(8) \quad WI = 100 - \sqrt{(100 - L)^2 + a^2 + b^2}$$

3.4.3 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los *films* de PLA con diferentes concentraciones de aceite de yema de huevo fueron analizadas mediante una prueba de punción usando un texturometro TA.XT.Plus Texture Analyser (Stable Microsystems, UK), equipado con una celda de carga de 5 kg y una sonda de 5 mm de diámetro (P/5S) (Figura 16).



Figura 16: Texturometro con plataforma para colocar los fragmentos de film y la sonda P/5S utilizada para estudiar las propiedades mecánicas de los films.

Para llevar a cabo el análisis, los *films* se cortaron en 4 trozos cuadrados de igual tamaño y se colocaron en el texturometro entre dos placas, asegurándose que el *film* estuviera bien tenso y sujeto, sin arrugas. Las placas utilizadas tienen un agujero que permite el contacto del *film* con la sonda, la cual lo va a presionar hasta hacerlo romper. En este caso, la velocidad de retorno de la sonda fue 10 mm/s, la fuerza de contacto 1g y la distancia de retorno 30 mm. Los valores de resistencia a la punción (*PS*) y deformación por punción (*PD*) fueron calculados mediante las ecuaciones (9) y (10), respectivamente:

$$(9) \quad PS = F_m / Th$$

$$(10) \quad PD = (\sqrt{D^2 + R^2} - R) / R$$

Donde F_m (N/mm²) es la fuerza máxima aplicada por la sonda antes de la rotura del *film*, Th es el grosor del *film*, D es la distancia recorrida por la sonda desde que entra en contacto con el *film* hasta que este rompe, y R es el radio del orificio de rotura del *film* (Weng et al., 2021).

3.4.4 Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Para estudiar la permeabilidad al vapor de agua de los *films*, se siguió la metodología empleada por Weng et al. (2021). Se llenaron tapones de cloruro de polivinilo 1,6 cm de altura y 2,1 cm de diámetro con 1 mL de agua destilada y se sellaron con trozos circulares de los *films* del mismo diámetro que la boca de los tapones, procurando que no quedase ningún poro sin pegar entre el tapón y el trozo de *film*, el cual debía estar intacto.

Los tapones con agua y sellados fueron pesados al comienzo de la prueba y se colocaron en un desecador de sílica gel (Figura 17), y los pesos de cada uno de los tapones fueron tomados cada hora durante 7 horas, obteniendo un total de 8 medidas. La pérdida de peso de los tapones se representó frente al tiempo, y el ratio de transmisión de vapor de agua (*water vapor transmission rate*, WVTR) se calculó de acuerdo con la ecuación (11):

$$(11) WVTR = \frac{G}{t \times A}$$

Donde G/t es el cambio de peso del tapón por unidad de tiempo (g/h), es decir, la pendiente de la representación gráfica, y A (m²) es el área del tapón cubierta por el *film*.

Los valores de WVTR obtenidos fueron usados para calcular la permeabilidad al vapor de agua de los *films* (*water vapor permeability*, WVP) por medio de la ecuación (12):

$$(12) WVP = \frac{WVTR \times Th}{\Delta P}$$

Donde Th (mm) es el grosor del *film* y ΔP (kPa) es la diferencia de presiones parciales entre las dos caras del *film*, es decir, la presión de vapor del agua a temperatura ambiente.



Figura 17: Tapones sellados con trozos de *film* en el desecador para el estudio de la permeabilidad del material al vapor de agua

3.4.5 Solubilidad

La solubilidad en agua de los *films* de PLA se midió de acuerdo con la metodología seguida por Weng et al. (2021). Para ello los *films* de PLA con diferentes concentraciones de aceite se cortaron en círculos de 2 cm de diámetro y se secaron en un horno a 90 °C durante 24 h para conocer su peso seco.

Otros fragmentos de *film* intactos se sumergieron en una disolución tampón de Trizma 0,1 M pH 7,0 a temperatura ambiente durante 24 h. Los trozos de *film* no disueltos se recuperaron utilizando unas pinzas y un filtro, se secaron a 90 °C durante 24 h y se pesaron. La siguiente ecuación (13) se utilizó para calcular el porcentaje de *film* disuelto, es decir, la solubilidad de los *films* de PLA con diferentes concentraciones de aceite de yema de huevo.

$$(13) S(\%) = \frac{m1 - m2}{m1} \times 100$$

Donde $S(\%)$ es el porcentaje de solubilidad del *film*, $m1$ es el peso seco inicial del *film* y $m2$ es el peso seco de los restos de *film* que no se han disuelto en gramos.

3.4.6 Microestructura

Las micrografías de los *films* se tomaron con un microscopio electrónico de barrido JSM-6610LV (JEOL, Estados Unidos), con el objetivo de estudiar la microestructura de la sección transversal de los *films* de PLA con diferentes concentraciones de aceite de yema de huevo, y así ver cómo afecta la adición del aceite a la formación y estructura de los *films*.

Para ello, los *films* se cortaron en piezas cuadradas de aproximadamente 1 x 1 cm con un bisturí quirúrgico. Los fragmentos se fijaron a unas bases metálicas mediante una tira de carbono adhesiva por ambas caras, de modo que por una cara la tira se une al soporte y por la otra al fragmento del *film*, y, a continuación, los *films* se recubrieron de oro mediante pulverización catódica durante 5 minutos bajo una atmósfera de argón. Las micrografías fueron tomadas con aumentos entre x2000 y x3000, y el voltaje se fijó en 20 kV.

3.4.7 Propiedades antimicrobianas

Para determinar si los *films* con aceite de yema de huevo o el propio aceite poseían propiedades antimicrobianas, se llevaron a cabo dos ensayos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* CECT 101 y *Escherichia coli* CECT 240 (Asadi & Pirsá, 2020).

El primero de ellos se realizó en medio líquido, *Nutrient Broth* (NB) para *E. coli* y *Tryptone Soy Broth* (TSB) para *S. aureus*. Para ello, los *films* de PLA y de PLA con 0.3g de aceite de yema se cortaron en

tiras y se sumergieron completamente en tubos Falcon con 25 mL de medio de cultivo con 1.15×10^4 UFC/mL de *S. aureus* y 4.4×10^4 UFC/mL de *E. coli*. Además, se realizó un control positivo sin *film*, para estudiar si el PLA pudiese interferir en el crecimiento de los microorganismos. Los tubos se incubaron 24 horas a 37 °C y con una agitación orbital de 200 rpm. A continuación, se midió la densidad óptica de las muestras y de los controles para determinar si el *film* poseía propiedades antimicrobianas frente a *S. aureus* y/o *E. coli*.

Para determinar las propiedades antimicrobianas del propio aceite de yema de huevo, se llevó a cabo un ensayo de inhibición en placa. Para ello se prepararon placas con 35 mL de medio de cultivo (más gruesas de lo común), NB para *E. coli* y Baird-Parker enriquecido con una emulsión de telurito de yema de huevo para *S. aureus* (Kim & Oh, 2010; Neder et al., 2015), en las cuales se sembraron en sábana 200 μ L de ambas bacterias, para conseguir una concentración final 10^4 UFC/mL en la placa. A continuación, en cada placa se hicieron 4 pocillos y se introdujeron 90 μ L de agua destilada y de aceite con diferentes concentraciones de carotenoides: 60, 30 y 15 μ g/mL de carotenoides (Figura 18). Tras 24 horas de incubación a 37 °C, se observó si se producía halo de inhibición alrededor de los pocillos con aceite.

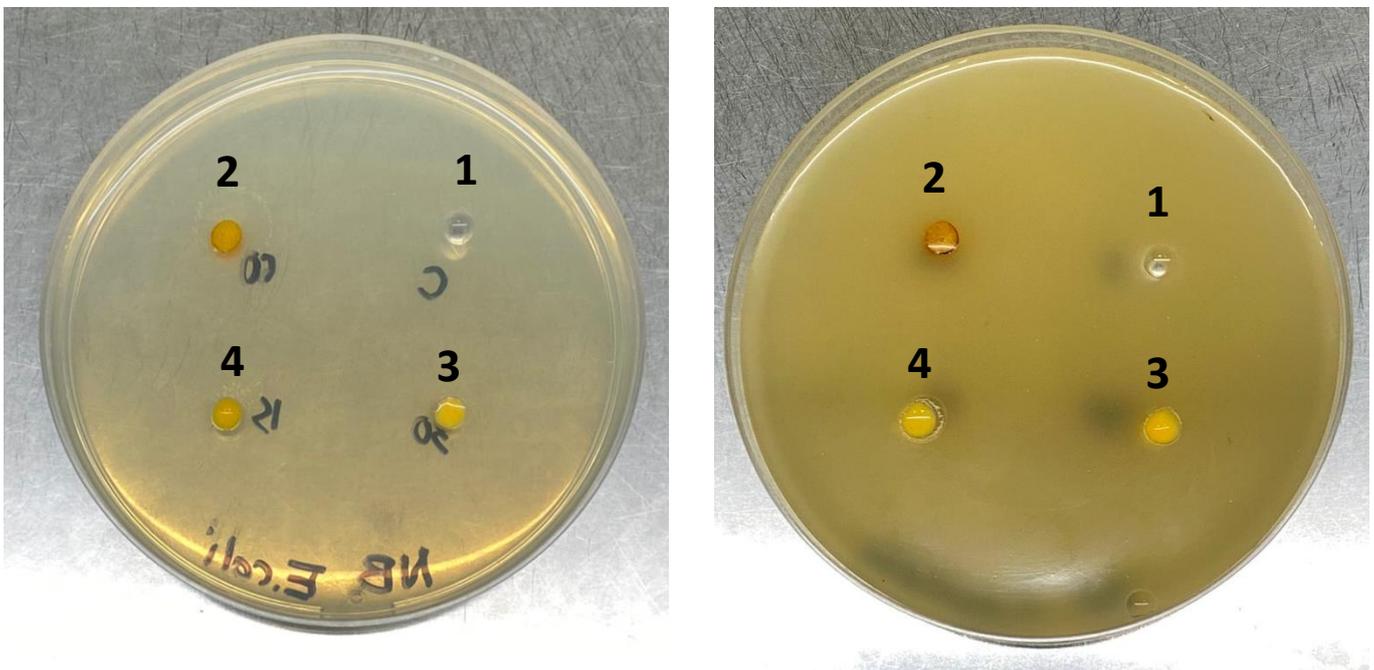


Figura 18: Placas de NB con *E. coli* (izquierda) y Baird-Parker con *S. aureus* (derecha) con los pocillos inoculados con agua destilada (1) y las soluciones de aceite de yema de huevo con diferentes concentraciones de carotenoides: 60, 30 y 15 μ g/mL, 2, 3 y 4 respectivamente.

3.4.8 Propiedades antioxidantes

Para determinar la capacidad antioxidante de los *films* con diferentes cantidades de aceite de yema de huevo se utilizó el método del radical libre 2,2-difenil-1-1-picrilhidracilo (DPPH). Para ello se preparó una solución stock de DPPH en isopropanol/hexano (30/70), mezclando 16 mg de DPPH (Cayman Chemical Company, 14805) con 40 mL de la mezcla de disolventes. A continuación, los *films* se cortaron en tiras y se metieron en unos botes de cristal a los cuales se añadieron 15 mL de isopropanol/hexano y 1 mL de la solución stock de DPPH preparada. Los botes se almacenaron en la oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm del líquido cada 24 horas, utilizando como blanco isopropanol/hexano. Tras cada medida, el líquido extraído para medir la absorbancia se devolvió a los botes. La capacidad antioxidante de los *films* de PLA con aceite se calculó según la fórmula (14):

$$(14) \text{ Capacidad antioxidante (\%)} = \frac{Abs_c - Abs_s}{Abs_c} \times 100$$

Donde Abs_c es la absorbancia a 517 nm del control, el *film* de PLA; y Abs_s es la absorbancia a 517 nm de la muestra, los *films* de PLA con aceite de yema de huevo (Asadi & Pirsá, 2020).

3.4.9 Ensayo de liberación

Para estudiar la liberación de los carotenoides en un alimento graso, se utilizó una solución de etanol al 96% (v/v) como simulante alimentario (Stoll et al., 2019). Para llevar a cabo el ensayo, los *films* se cortaron en tiras y se introdujeron en unos frascos a los cuales se añadieron 20 mL de simulante alimentario, de modo que todo el *film* quedara bien cubierto por la solución (Figura 19). Los frascos se taparon y se almacenaron a 40 °C durante 7 días. La liberación de carotenoides en el simulante se midió cada 24 horas mediante la medida de la absorbancia de la solución del frasco a 450 nm, tras cada medida el volumen utilizado se introdujo de nuevo al frasco.



Figura 19: Botes con *film* y simulante alimentario (Ensayo de liberación).

3.5 Aplicación de los *films* de PLA con aceite de yema de huevo como *packaging* primario

Tras estudiar las propiedades físicas y antioxidantes de los *films*, se planteó la posibilidad de utilizar estos *films* PLA con aceite de yema de huevo como *packaging* primario en alimentación. Para lo cual se estudiaron dos posibles aplicaciones.

3.5.1 *Packaging* primario para AOVE

En primer lugar, se analizó la capacidad de los *films* para proteger el AOVE frente a la fotooxidación. Se prefirió realizar el ensayo con aceite de oliva (AO) en vez de girasol debido a que el perfil lipídico de este último es mucho más rico en ácidos grasos poliinsaturados y más pobre en fenoles que el AO, por lo que se oxida mucho más rápido, y en este caso, se buscaba ver una oxidación paulatina del aceite para poder estudiar el efecto de los *films* en este fenómeno, siendo el AOVE la mejor opción. Para ello 7 mL del AOVE se contuvieron en bolsas preparadas con los *films* de PLA con 0.3 g aceite de yema de huevo por g de PLA (A3), usando como control bolsas preparadas con *films* de PLA solo. Los envases se elaboraron con una selladora de plástico convencional, sellando los *films* de tal manera que quedarán bolsas de estructura rectangular (Figura 20). Las bolsas con el AOVE se sometieron a condiciones fotooxidantes durante 5 días, para lo cual se mantuvieron sobre la meseta del laboratorio expuestas directamente a la luz ambiental; utilizando como control positivo 7 mL de AOVE sobre una placa abierta, sometido a las mismas condiciones oxidativas que las bolsas de PLA. Para determinar evolución de la oxidación del AOVE de cada una de las muestras, se estudió la evolución del valor peróxido (PV), tal y como se realizó en el apartado 3.2.1.

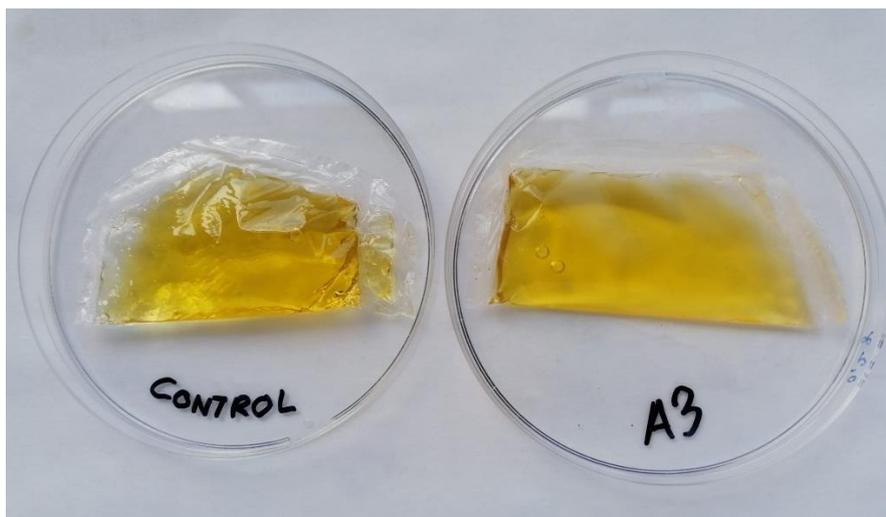


Figura 20: AOVE envasado en bolsas de *films* de PLA normal (izquierda) y PLA con aceite de yema de huevo (derecha).

3.5.2 *Packaging* primario para resveratrol

Además del ensayo con AOVE, se estudió la capacidad de protección de los *films* frente a la fotooxidación de compuestos fotosensibles, como el resveratrol. Para ello se preparó una disolución stock de resveratrol, disolviendo 15 mg de resveratrol (TCI, 501-36-0, R0071) en 500 mL de agua destilada; la mezcla se dejó en agitación 24 horas, protegida completamente de la luz solar, para lograr la total disolución del resveratrol en el agua.

Para determinar si las propiedades barrera de los *films* eran suficientes para proteger a la disolución de resveratrol frente a la luz solar, se prepararon unas bolsas con los *films* en las cuales se introdujeron 4 mL de la solución de resveratrol y se sellaron con calor para evitar la pérdida de líquido (Figura 21). Las bolsas de PLA y PLA con aceite de yema se pusieron sobre la meseta del laboratorio, de manera que les incidiese directamente la luz solar, y se midió la absorbancia de la solución que contenían a 304 nm y a 286 nm cada 24 horas. Se utilizó como control positivo una placa de vidrio con 10 mL de solución de resveratrol sin tapar, la cual se colocó en la encimera junto con las bolsas de PLA. Para calcular las concentraciones de *cis*-resveratrol y *trans*-resveratrol en las soluciones y su variación a lo largo del tiempo, se utilizaron las ecuaciones (15) y (16):

$$(15) \quad C_{trans} = \frac{A_2 - (\epsilon_{2cis}/\epsilon_{1cis}) \cdot A_1}{l \cdot (\epsilon_{2trans} - (\epsilon_{2cis}/\epsilon_{1cis}) \cdot \epsilon_{1trans})}$$

$$(16) \quad C_{cis} = \frac{A_2 - (\epsilon_{2trans}/\epsilon_{1trans}) \cdot A_1}{l \cdot (\epsilon_{2cis} - (\epsilon_{2trans}/\epsilon_{1trans}) \cdot \epsilon_{1cis})}$$

Donde A_1 y A_2 son las absorbancia de la solución de resveratrol a 304 y 286 nm, respectivamente; ϵ_{1trans} y ϵ_{2trans} son los coeficientes de extinción molar del *trans*-resveratrol a 304 y 286 nm, respectivamente; y ϵ_{1cis} y ϵ_{2cis} son los coeficientes de extinción molar del *cis*-resveratrol a 304 y 286 nm, respectivamente. Teniendo en cuenta que los coeficientes de extinción molar del *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol son 30335 y 9515 $M^{-1}cm^{-1}$ para una longitud de onda de 304 nm y 23400 y 14986 $M^{-1}cm^{-1}$ para 286 nm, respectivamente.



Figura 21: Bolsas de PLA con aceite de yema (arriba) y PLA control (abajo), conteniendo la solución de resveratrol.

3.6 Análisis estadístico

Cada uno de los diferentes ensayos se realizó por duplicado, representándose en cada caso el promedio y la correspondiente desviación estándar de los resultados obtenidos. Los resultados de algunos de los ensayos realizados fueron tratados estadísticamente para identificar valores significativamente diferentes de otros mediante un análisis de varianza (ANOVA) simple con un nivel de confianza del 95%. El programa estadístico empleado fue Statgraphics Centurion XVI.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de carotenoides con aceite de girasol

La extracción de carotenoides se realizó tanto de la yema completa como de sus fracciones, gránulos y plasma, por separado. En todos los casos, para poder conocer la concentración de β -carotenos equivalentes en las muestras de cada una de las extracciones, se realizó una recta patrón a partir de concentraciones conocidas de β -carotenos (Figura 22).

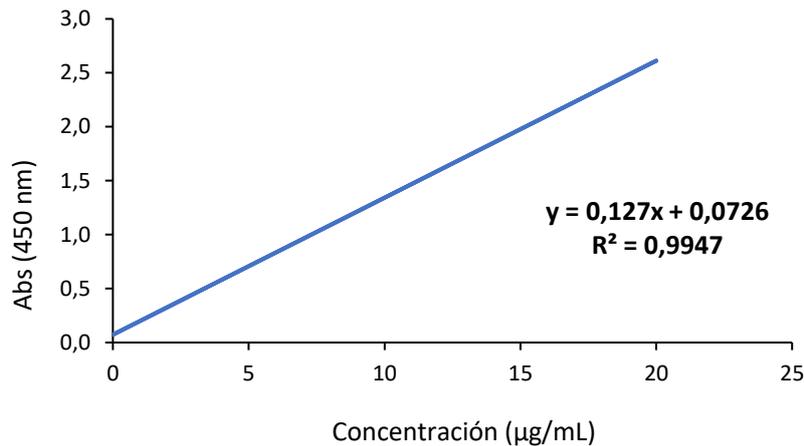


Figura 22: Recta patrón de β -carotenos en aceite.

La ecuación obtenida de la recta patrón permite convertir los valores de absorbancia obtenidos experimentalmente en concentraciones de β -carotenos equivalentes, que son los que se han empleado para modelizar el proceso.

Las extracciones se llevaron a cabo, tal y como se mencionó en la sección 3.2, por duplicado y ensayando diferentes condiciones de temperatura, tiempo y agitación. En el caso de la temperatura, se ensayaron temperaturas desde los 5 °C hasta los 55 °C para poder conocer el comportamiento del proceso frente a valores diferentes y poder estudiar el peso de la variable, se eligió como temperatura máxima 55 °C, ya que hay estudios que demuestran que todas las formas de carotenoides son estables a 60 °C (Tsiaka et al., 2018). En cuanto al tiempo, se ensayaron tiempos desde 30 segundos hasta 15 minutos, ya que se observó que la mayoría de los carotenoides se extraían durante los primeros minutos del proceso y luego la variable iba tomando menos peso. Finalmente, en cuanto a la velocidad de agitación se ensayaron dos velocidades, 5000 rpm y 15000 rpm, los valores mínimo y máximo permitidos por el homogeneizador para la mezcla utilizada.

4.1.1 Extracción de carotenoides de la yema de huevo

Tal y cómo se señaló en el apartado de material y métodos, cada extracción a una condiciones dadas se realizó por duplicado para minimizar los errores experimentales. En el caso de las extracciones de carotenoides de la yema de huevo completa, se obtuvieron los resultados expuestos en la Tabla 1.

Al analizar los valores que se muestran en la Tabla 1, se puede ver la influencia de cada una de las variables del proceso de extracción, temperatura, velocidad de giro y tiempo, en el propio proceso. Se puede observar que al aumentar la temperatura aumenta la cantidad de β -carotenos que se consiguen extraer en el proceso. Si se analizan los valores extremos ensayados, 5 °C y 55 °C, para un tiempo

medio de extracción de 6 minutos, se puede observar que el porcentaje de extracción aumenta un 47,13% para una velocidad de giro de 5000 rpm y un 36,11% para una velocidad de giro de 15000 rpm. Esto refleja el efecto positivo del aumento de la temperatura en el proceso de extracción; sin embargo, se observa que el efecto de la variable es mucho más acusado a velocidades de giro bajas que a altas velocidades.

Tabla 1: Extracción de carotenoides de la yema de huevo en diferentes condiciones de extracción.

Velocidad de giro (rpm)	Tiempo (min)	β-carotenos equivalentes (μg/mL)			
		5 °C	15 °C	30 °C	55 °C
5000	0.5	3,39 ± 0,09	4,31 ± 0,05	4,85 ± 0,17	5,45 ± 0,21
	1	3,56 ± 0,07	4,40 ± 0,02	4,97 ± 0,04	5,75 ± 0,11
	1.5	3,40 ± 0,07	4,48 ± 0,06	5,26 ± 0,21	6,01 ± 0,26
	2	3,38 ± 0,21	4,53 ± 0,09	5,44 ± 0,19	6,21 ± 0,24
	4	4,19 ± 0,17	5,29 ± 0,00	6,35 ± 0,40	6,85 ± 0,43
	6	4,39 ± 0,14	5,48 ± 0,04	6,65 ± 0,29	7,31 ± 0,30
	10	4,15 ± 0,16	5,82 ± 0,00	6,65 ± 0,16	7,53 ± 0,10
	15	4,63 ± 0,06	5,92 ± 0,03	7,10 ± 0,12	7,89 ± 0,21
15000	0.5	3,80 ± 0,07	4,83 ± 0,09	5,77 ± 0,09	6,03 ± 0,18
	1	4,20 ± 0,29	5,22 ± 0,08	6,29 ± 0,09	6,34 ± 0,29
	1.5	4,35 ± 0,07	5,47 ± 0,16	6,66 ± 0,19	6,40 ± 0,53
	2	4,44 ± 0,14	5,74 ± 0,38	6,86 ± 0,44	6,49 ± 0,56
	4	5,07 ± 0,08	6,14 ± 0,24	6,99 ± 0,23	7,53 ± 0,27
	6	5,00 ± 0,02	6,19 ± 0,25	7,20 ± 0,21	7,60 ± 0,46
	10	5,15 ± 0,19	6,36 ± 0,39	7,42 ± 0,14	7,78 ± 0,40
	15	5,18 ± 0,15	6,35 ± 0,54	7,38 ± 0,03	8,05 ± 0,31

Por otro lado, la velocidad de giro utilizada en el proceso también tiene un importante peso en el proceso de extracción, es decir, en la cantidad de β-carotenos que se logran extraer, siendo esta mayor a medida que aumenta la velocidad de giro aplicada. Si se comparan los valores obtenidos a 5000 rpm y 15000 rpm a las diferentes temperaturas ensayadas y para un tiempo medio de 6 minutos de

extracción, se puede observar un aumento de la cantidad de carotenoides extraídos del 12,20% para 5 °C, del 11,42% para 15 °C, del 8,08% para 30 °C y del 2,95% para 55 °C. En este caso y de manera recíproca a como se observó anteriormente, se observa que cuanto menor es la temperatura a la que se realiza la extracción mayor es la influencia de la velocidad de giro en el proceso de extracción.

Por último, cabe destacar la influencia de la variable tiempo en el proceso de extracción y en la cantidad de carotenoides extraídos. Si se comparan la cantidad de β -carotenos equivalentes extraídos cuando la extracción se realiza durante 30 segundos, tiempo mínimo ensayado, frente a los 15 minutos máximos ensayados, fijando la temperatura de extracción en 15 °C (temperatura ambiente), se puede observar un aumento en la cantidad de carotenos extraídos del 27,2% para una velocidad de giro de 5000 rpm y del 23,9% para 15000 rpm. Si en vez de fijar la temperatura se fija la velocidad de giro en 5000 rpm y se compara el aumento en la cantidad de carotenoides extraídos entre 30 segundos y 15 minutos para cada una de las temperaturas ensayadas, se puede observar un aumento de la extracción del 26,8% para 5 °C, del 27,2% para 15 °C, del 31,6% para 30 °C y del 28,0% para 55 °C. Esto demuestra que la variable tiempo pierde peso al aumentar la velocidad de giro del homogeneizador, pero no al aumentar la temperatura, donde aumenta la extracción a medida que aumenta la temperatura salvo para los 55 °C, donde el aumento en la concentración de carotenoides extraídos es menor que con 30 °C.

Al contemplar de manera global los resultados (Tabla 1 y Figura 23), se puede ver que las tres variables estudiadas (tiempo, temperatura y velocidad de giro) afectan al proceso de extracción de carotenoides de la yema de huevo; siendo la temperatura la variable con mayor peso y la velocidad de giro la de menor efecto sobre el proceso. Si se observa la Figura 23, se puede observar cómo avanza el proceso de extracción para cada una de las condiciones ensayadas; en todos los casos, se observa un rápido aumento de la cantidad de carotenoides extraídos durante los primeros minutos de la extracción, mientras que a partir de los 6 minutos la extracción alcanza una tendencia más o menos plana en la que la cantidad de carotenoides extraídos por unidad de tiempo es muy pequeña. Todas la extracciones avanzan con una tendencia similar, obteniéndose los mejores resultados para una extracción a 55 °C y 15000 rpm, para tiempos de entre 6 y 15 minutos.

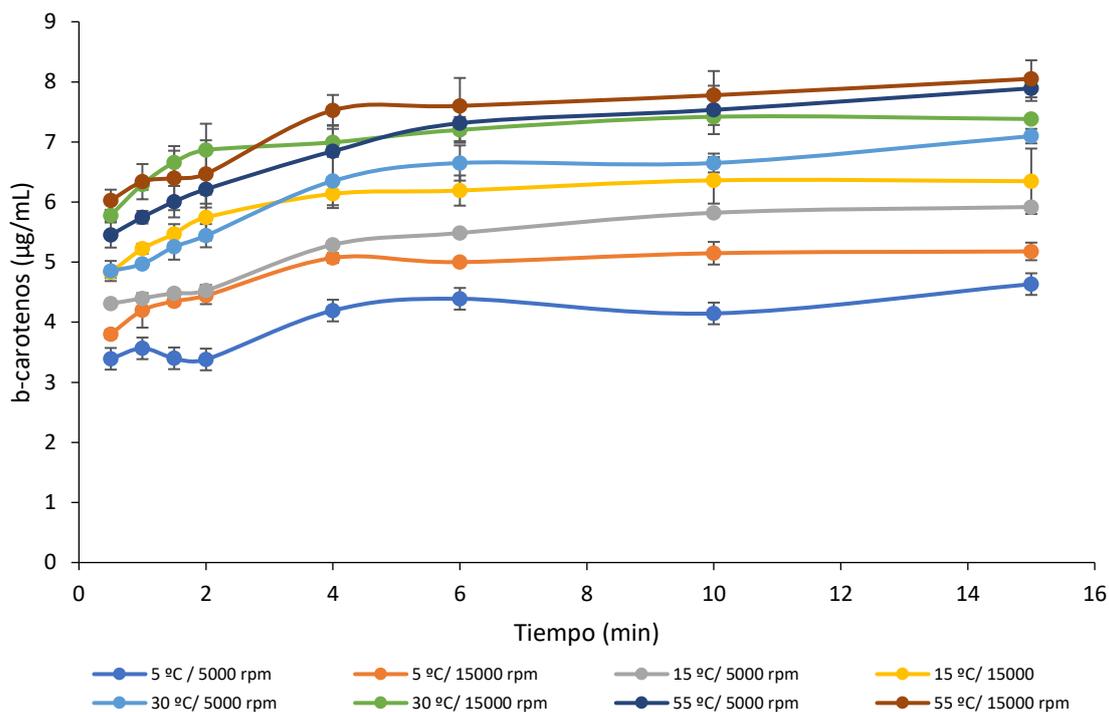


Figura 23: β -carotenos equivalentes extraídos de la yema en función del tiempo para cada una de las condiciones de extracción ensayadas.

4.1.2 Extracción de carotenoides del plasma

Al igual que para la yema, las extracciones de carotenoides de la fracción del plasma se realizaron por duplicado y se ensayaron las mismas condiciones de extracción, obteniéndose los resultados de la Tabla 2.

Al igual que con la yema completa, al realizar las extracciones con la fracción de plasma únicamente también se observa como a medida que se trabaja con mayor tiempo y velocidad de agitación aumenta la concentración de carotenoides en los extractos. Sin embargo, esto sucede en proporciones mucho menos significativas que con la yema, y en el caso de la temperatura, que antes tenía un peso muy importante, aquí se puede observar una influencia prácticamente nula al mantenerse la cantidad de carotenoides extraídos prácticamente constante entre las diferentes temperaturas ensayadas (Tabla 2).

Al observar los datos de la Tabla 2, se puede observar cómo al aumentar la temperatura a la que se realizan las extracciones la cantidad de β -carotenos equivalentes extraídos se mantiene prácticamente constante. Si se analizan los valores extremos ensayados, 5 °C y 55 °C, para un tiempo medio de extracción de 6 minutos se puede observar que para una velocidad de agitación de 5000 rpm la tasa de extracción solo aumenta un 0,14%, y para una velocidad de giro de 15000 rpm el porcentaje de

extracción aumenta un 1,1 % al aumentar la temperatura. Si tenemos en cuenta las desviaciones estándar, podemos ver que la influencia de esta variable sería nula, ya que no hay diferencias en la concentración de carotenoides extraídos entre las temperaturas ensayadas

Tabla 2: Extracción de carotenoides del plasma de la yema de huevo en diferentes condiciones de extracción.

Velocidad de giro (rpm)	Tiempo (min)	β-carotenos equivalentes (µg/mL)			
		5 °C	15 °C	30 °C	55 °C
5000	0.5	4,68 ± 0,22	4,72 ± 0,21	4,70 ± 0,21	4,80 ± 0,13
	1	4,87 ± 0,12	4,77 ± 0,15	4,91 ± 0,03	4,95 ± 0,26
	1.5	4,73 ± 0,05	4,79 ± 0,32	4,93 ± 0,06	4,91 ± 0,34
	2	5,03 ± 0,05	4,88 ± 0,18	4,98 ± 0,02	4,86 ± 0,07
	4	4,97 ± 0,04	5,15 ± 0,02	5,15 ± 0,09	4,85 ± 0,07
	6	4,94 ± 0,15	5,18 ± 0,12	5,10 ± 0,09	4,95 ± 0,15
	10	5,24 ± 0,05	5,28 ± 0,26	5,22 ± 0,19	5,04 ± 0,37
	15	5,25 ± 0,07	5,19 ± 0,10	5,19 ± 0,03	5,14 ± 0,19
15000	0.5	4,65 ± 0,06	5,13 ± 0,03	4,80 ± 0,37	4,96 ± 0,20
	1	4,93 ± 0,05	5,19 ± 0,06	4,95 ± 0,16	5,20 ± 0,15
	1.5	4,98 ± 0,23	5,13 ± 0,07	4,91 ± 0,20	5,10 ± 0,04
	2	5,03 ± 0,13	5,23 ± 0,11	4,86 ± 0,17	5,13 ± 0,00
	4	5,19 ± 0,26	5,26 ± 0,04	4,85 ± 0,30	5,34 ± 0,18
	6	5,32 ± 0,08	5,36 ± 0,06	4,95 ± 0,33	5,38 ± 0,12
	10	5,48 ± 0,14	5,44 ± 0,14	5,04 ± 0,03	5,44 ± 0,02
	15	5,34 ± 0,14	5,38 ± 0,03	5,14 ± 0,12	5,66 ± 0,27

Por otro lado, se puede observar que la velocidad de giro utilizada en el proceso también influye en la cantidad de carotenoides que se logran extraer del plasma, pero en este caso la influencia es mucho menor que con la yema completa. Si se comparan los valores obtenidos a 5000 rpm y 15000 rpm a las diferentes temperaturas ensayadas y para un tiempo medio de 6 minutos de extracción, se puede observar un aumento de la cantidad de carotenoides extraídos del 7,2% para 5 °C, del 3,3% para 15 °C y del 8,1% para 55 °C, mientras que para la extracción a 30 °C la cantidad de carotenoides extraídos

no solo no aumenta, sino que disminuye en un 3,1%. En este caso, teniendo en cuenta las desviaciones estándar se puede observar que hay una mínima influencia, casi despreciable, de la variable velocidad de giro en el proceso.

Por último, cabe destacar la influencia de la variable tiempo en el proceso de extracción y en la cantidad de carotenoides extraídos. Si se comparan la cantidad de β -carotenos equivalentes extraídos cuando la extracción se realiza durante 30 segundos, tiempo mínimo ensayado, frente a los 15 minutos máximos ensayados, fijando la temperatura de extracción en 15 °C (temperatura ambiente), se puede observar un aumento en la cantidad de carotenos extraídos del 9,06% para una velocidad de giro de 5000 rpm y del 4,6% para 15000 rpm. Si en vez de fijar la temperatura se fija la velocidad de giro en 5000 rpm y se compara el aumento en la cantidad de carotenoides extraídos entre 30 segundos y 15 minutos para cada una de las temperaturas ensayadas, se puede observar un aumento de la extracción del 10,84% para 5 °C, del 9,06% para 15 °C, del 9,48% para 30 °C y del 6.62% para 55 °C. Esto demuestra que la variable tiempo pierde peso al aumentar la velocidad de giro del homogeneizador y al aumentar la temperatura a la que se realiza el proceso de extracción.

Al contemplar de manera global los resultados (Tabla 2 y Figura 24), se puede ver cómo afectan las tres variables estudiadas (temperatura, tiempo y velocidad de giro) al proceso de extracción de β -carotenos del plasma. Como se analizó previamente, no hay ninguna variable que muestre un peso superior en la extracción, ni ninguna tendencia destacable; ya que como se puede observar, el patrón seguido es prácticamente el mismo en todas las condiciones ensayadas. Se puede apreciar, que el proceso de extracción de carotenoides de la fracción del plasma de yema de huevo es bastante independiente de las variables ensayadas, lo que puede deberse a que los carotenoides de esta fracción se extraen muy fácilmente y no se necesitan tratamientos adicionales, solo el contacto entre el plasma liofilizado y el aceite de girasol. Esto puede ser debido a que el tratamiento seguido para separar el plasma y los gránulos haya desestabilizado las LDLs, en concreto, la monocapa de fosfolípidos y proteínas que rodean al *core* interno donde se encuentra la matriz lipídica con los carotenoides, permitiendo que estos se liberen con más facilidad durante la extracción (Anton, 2007). No obstante, los mejores resultados se obtienen con una temperatura de extracción de 55°C y una velocidad de giro de 15000 rpm.

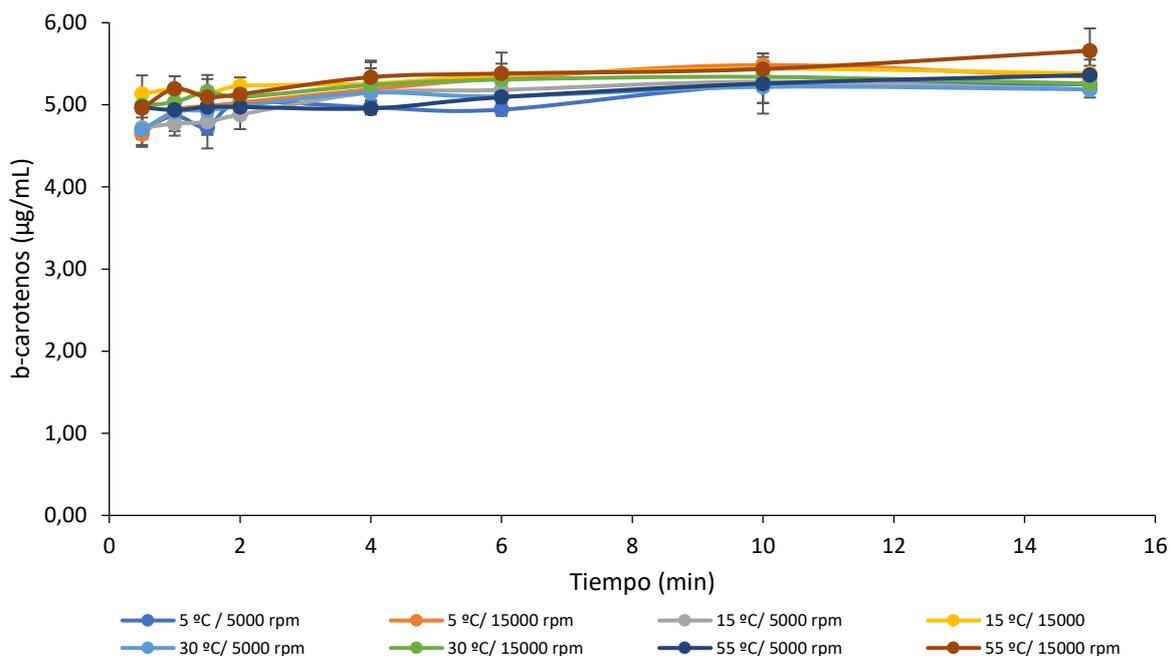


Figura 24: β -carotenos equivalentes extraídos del plasma en función del tiempo para cada una de las condiciones de extracción ensayadas.

4.1.3 Extracción de carotenoides de los gránulos

Tras la extracción de carotenoides de la yema de huevo completa y del plasma, se realizó la extracción de la fracción de gránulos del huevo, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3. Los valores obtenidos reflejan la influencia de cada una de las variables del proceso de extracción, temperatura, velocidad de giro y tiempo, en la cantidad de carotenoides extraídos.

Se puede observar que al aumentar la temperatura a la que se realiza la extracción, aumenta la cantidad de β -carotenos que se consiguen extraer en el proceso. Si se analizan los resultados obtenidos para la menor y la mayor temperatura ensayadas, 5 °C y 55 °C, para un tiempo medio de extracción de 6 minutos se puede observar que el porcentaje de carotenoides extraídos aumenta un 44,5% para una velocidad de giro de 5000 rpm y un 39,9% para una velocidad de giro de 15000 rpm. Esto refleja el efecto positivo del aumento de la temperatura en el proceso de extracción, el cual es mayor a bajas velocidades de giro que a altas.

La velocidad de giro utilizada en el proceso también tiene una clara influencia en el proceso de extracción, es decir, en la cantidad de β -carotenos equivalentes que se logran extraer, siendo esta mayor a medida que aumenta la velocidad de giro aplicada. Si se comparan los valores obtenidos a 5000 rpm y 15000 rpm a las diferentes temperaturas ensayadas y para un tiempo medio de 6 minutos de extracción, se puede observar un aumento de la cantidad de carotenoides extraídos del 21,4% para

5 °C, del 30,7% para 15 °C y del 14,9% para 55 °C, mientras que para 30 °C la tasa de extracción disminuye un 2,3%. Se observa que la velocidad de giro tiene un mayor peso en la extracción a bajas temperaturas que a altas, lo que se puede deber a que a altas temperaturas los carotenoides se extraigan más fácilmente y no necesiten tanto movimiento mecánico.

Tabla 3: Extracción de carotenoides de los gránulos de la yema de huevo en diferentes condiciones de extracción

Velocidad de giro (rpm)	Tiempo (min)	β-carotenos equivalentes (μg/mL)			
		5 °C	15 °C	30 °C	55 °C
5000	0.5	2,93 ± 0,24	2,33 ± 0,05	3,31 ± 0,29	4,59 ± 0,33
	1	3,10 ± 0,54	2,36 ± 0,06	3,66 ± 0,35	4,88 ± 0,41
	1.5	2,95 ± 0,43	2,33 ± 0,08	3,79 ± 0,29	4,80 ± 0,29
	2	2,94 ± 0,29	2,29 ± 0,01	3,86 ± 0,38	4,77 ± 0,34
	4	2,97 ± 0,23	2,50 ± 0,12	4,37 ± 0,57	4,77 ± 0,02
	6	2,99 ± 0,35	2,60 ± 0,05	4,60 ± 0,58	5,38 ± 0,20
	10	3,22 ± 0,35	2,63 ± 0,14	4,79 ± 0,92	5,97 ± 0,57
	15	3,12 ± 0,07	2,74 ± 0,27	4,85 ± 0,77	6,86 ± 0,95
15000	0.5	2,73 ± 0,10	2,44 ± 0,21	3,42 ± 0,21	4,44 ± 0,43
	1	2,96 ± 0,26	2,68 ± 0,10	3,68 ± 0,33	4,95 ± 0,11
	1.5	3,70 ± 0,62	2,72 ± 0,08	3,69 ± 0,17	5,25 ± 0,28
	2	3,28 ± 0,31	2,91 ± 0,06	3,91 ± 0,30	5,39 ± 0,22
	4	3,98 ± 0,02	3,58 ± 0,19	4,10 ± 0,48	5,76 ± 0,60
	6	3,80 ± 0,02	3,75 ± 0,07	4,50 ± 0,53	6,32 ± 0,16
	10	4,22 ± 0,02	3,91 ± 0,04	4,55 ± 0,50	6,22 ± 0,17
	15	4,56 ± 0,19	3,81 ± 0,09	4,86 ± 0,31	6,83 ± 0,23

En cuanto a la variable tiempo, si se comparan la cantidad de β-carotenos equivalentes extraídos cuando la extracción se realiza durante 30 segundos, tiempo mínimo ensayado, frente a los 15 minutos máximos ensayados, fijando la temperatura de extracción en 15 °C (temperatura ambiente), se puede observar un aumento en la cantidad de carotenos extraídos del 15,2% para una velocidad de giro de 5000 rpm y del 35,9% para 15000 rpm. Si en vez de fijar la temperatura se fija la velocidad de giro en 5000 rpm y se compara el aumento en la cantidad de carotenoides extraídos entre 30 segundos y 15

minutos para cada una de las temperaturas ensayadas, se puede observar un aumento de la extracción del 6,0% para 5 °C, del 15,2% para 15 °C, del 26,6% para 30 °C y del 33,1% para 55 °C. Esto demuestra que la variable tiempo, al contrario de como sucedía con la yema completa, gana peso al aumentar la velocidad de giro del homogeneizador y también, al aumentar la temperatura a la que se realiza la extracción. Esto se puede deber a que los carotenoides presentes en los gránulos sean de difícil liberación debido a que se encuentran en el interior de las HDLs y estas al tener una estructura mayoritariamente proteica sean difíciles de desestabilizar y permitir la liberación de los compuestos bioactivos en el interior o unidos a su estructura pseudomolecular (Anton, 2007). Por ello, al aumentar la temperatura y la velocidad de giro del homogeneizador va aumentando la cantidad de carotenoides que se liberan.

Al contemplar de manera global los resultados (Tabla 3 y Figura 25), se puede ver cómo afectan al proceso de extracción de carotenoides de los gránulos de la yema de huevo las tres variables estudiadas (tiempo, temperatura y velocidad de giro); siendo la temperatura la variable con mayor peso sobre el proceso de extracción. Si se observa la Figura 25 se puede observar que los mejores resultados se obtienen con una temperatura de extracción de 55 °C y tiempo de extracción largos de entre 6 y 15 minutos. A diferencia de como ocurre con el plasma, en este caso se puede observar como para condición ensayada, temperatura y velocidad de giro, se consiguen extraer diferentes concentraciones de carotenoides, las cuales aumentan con la temperatura y con el movimiento mecánico, lo cual puede sugerir la liberación de carotenoides de difícil acceso al aumentar la intensidad del tratamiento.

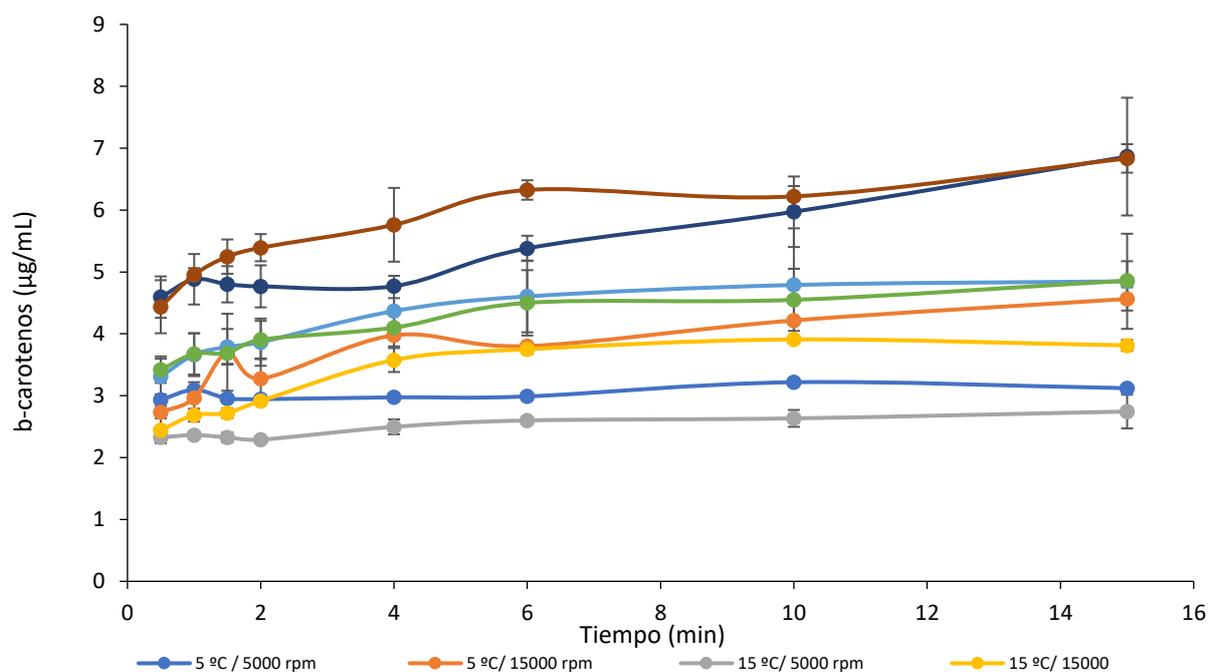


Figura 25: β -carotenos equivalentes extraídos de los gránulos en función del tiempo para cada una de las condiciones de extracción ensayadas

4.1.4 Discusión extracción carotenoides

Como muestran los resultados obtenidos, las variables ensayadas en el proceso de extracción de carotenoides juegan diferente papel y tienen diferente peso en el proceso dependiendo de la muestra utilizada para llevar a cabo la extracción, yema completa, plasma o gránulos.

Para las extracciones realizadas con yema completa y gránulos, se observa una clara influencia de las variables temperatura, velocidad de agitación y tiempo; observándose un aumento en la cantidad de carotenoides extraídos a medida que aumenta la temperatura o las rpm del homogeneizador, como norma general. Sin embargo, en el caso del plasma, no se aprecia una clara influencia de las variables, siendo los resultados obtenidos similares para todas las condiciones ensayadas. Estos resultados pueden deberse a la diferente composición de la yema completa y de cada una de las fracciones de esta, así como a la distribución de los carotenoides en estas.

Los principales carotenoides presentes en la yema de huevo son luteína, zeaxantina, cantaxantina y β -carotenos (Kovalcuks & Duma, 2017). La luteína y zeaxantina al pertenecer al grupo de las xantófilas, a pesar de ser compuestos apolares, son carotenoides más polares que el resto debido a su contenido en grupos hidroxilo y a que se pueden encontrar libres o formando ésteres de ácidos grasos, lo cual afecta a su polaridad y solubilidad (Nimalaratne et al., 2013). A la hora del fraccionamiento de la yema de huevo, las interacciones de estas moléculas hace que los carotenoides se repartan entre las dos fracciones; siendo la fracción plasmática la más rica en carotenoides con 45,65 $\mu\text{g/g}$ frente a 25,78 $\mu\text{g/g}$ de la fracción granular, lo cual se debe a que la fracción plasmática es la más rica en lípidos y por lo tanto la que más carotenoides posee. El plasma está compuesto principalmente por LDLs las cuales son un 11-17% proteínas y un 83-89% lípidos, mientras que los gránulos están compuestos principalmente por HDLs, que son un 75-80% proteínas y un 20-25% lípidos, por lo que poseen menor cantidad de carotenoides que la fracción plasmática. Estos resultados no concuerdan con lo observado en las extracciones a 50 °C, donde se extraen más carotenoides de los gránulos que del plasma. Esto puede deberse a que en el fraccionamiento el plasma quede cargado con más carotenoides relativamente polares que los gránulos y, por lo tanto, al extraer con aceite de girasol, un disolvente no polar y lipídico, la extracción de carotenoides del plasma sea solo parcial mientras que en los gránulos sea una liberación total o prácticamente total y sostenida, ya que se van liberando poco a poco los carotenoides menos polares que estaban interaccionando o quedaron retenidos por alguno de los componentes de los gránulos, los cuales se van desestructurando con el calor y permitiendo esta liberación. El plasma al ser en gran parte lípidos, en cuanto se pone en contacto el plasma con el aceite estos se solubilizan instantáneamente junto con los carotenoides más lipofílicos.

Otra posible explicación de estos resultados puede ser que, en el caso del plasma, al poner en contacto el aceite con la muestra liofilizada la difusión de los carotenoides sea tan rápida de una fase a otra que salgan todos durante los primeros minutos del proceso y, por lo tanto, al aumentar la temperatura o la agitación la concentración se mantenga prácticamente constante ya que no hay más pigmentos que se puedan liberar. En el caso de los gránulos, al ser carotenoides de más difícil liberación, la concentración de ellos va aumentando al aumentar el efecto de las variables en el proceso, lo que permite obtener extractos más concentrados con el paso del tiempo.

4.2 Evolución de la calidad del aceite de girasol enriquecido bajo condiciones fotooxidantes

El efecto protector de la presencia de los carotenoides en el aceite de girasol frente a la fotooxidación se evaluó mediante el estudio de la evolución del PV y de la concentración de clorofilas y carotenoides en el aceite sometido a las condiciones de luz ambientales del propio laboratorio. En la Figura 26 se puede apreciar la curva de calibrado y los patrones de Fe (III) utilizados.

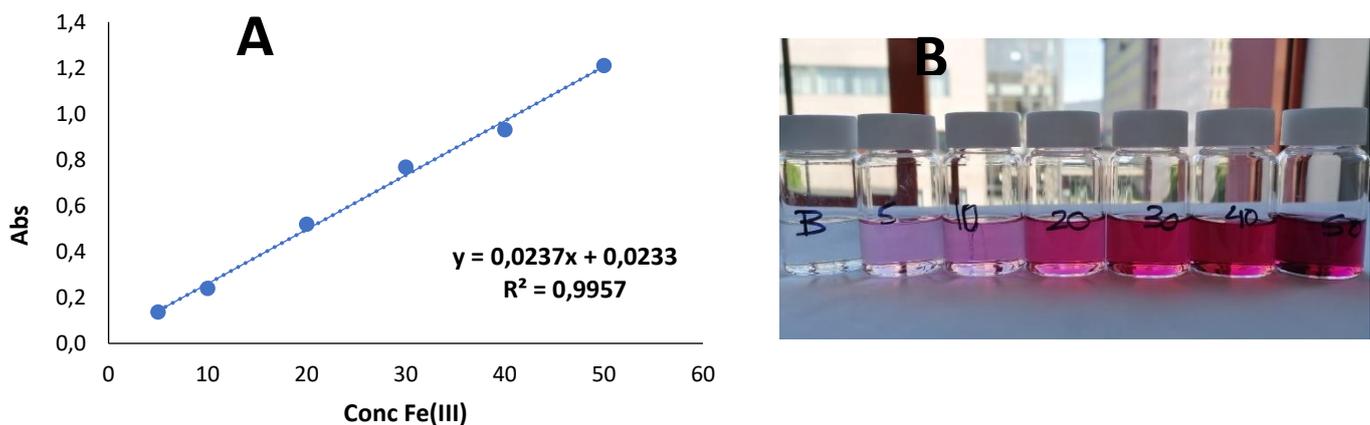


Figura 26: Curva de calibrado de la disolución de Fe (III) (izquierda) y patrones utilizados (derecha).

Para llevar a cabo este ensayo se trabajó con un aceite de girasol enriquecido con carotenoides y un aceite de girasol tratado. Como aceite de girasol enriquecido con carotenoides se seleccionó el resultante de la extracción de carotenoides de la yema de huevo a 30 °C y 15000 rpm durante 15 minutos, ya que a esta temperatura nos aseguramos de que los carotenoides se mantienen activos y la oxidación térmica del aceite de girasol es menor que a 55 °C, lo que en este caso resulta preferible ya que se va a estudiar la fotooxidación del aceite. En cuanto al aceite de girasol tratado, este se obtuvo sometiendo al aceite de girasol a las mismas condiciones y tratamientos que el enriquecido, pero sin la adición de yema de huevo.

En la Figura 27 se puede observar la evolución de los PV del aceite de girasol tratado y del aceite de girasol enriquecido bajo las condiciones fotooxidantes. Se puede observar que los valores iniciales de PV, indicador del estado de oxidación y deterioro del aceite, ya se encuentran por encima de lo establecido en la legislación, que sería un máximo de 10 mEq de O₂ activo por Kg de aceite (*Real Decreto 308/1983, 1983*). Sin embargo, el PV del aceite enriquecido y del aceite de girasol son bastante menores que el aceite de girasol sometido al mismo tratamiento que el enriquecido, 33,94 y 32,45 mEq O₂/Kg frente a 38,16 mEq O₂/Kg, respectivamente; lo que demuestra que las condiciones a las cuales se realiza la extracción son oxidantes para el aceite, produciendo un aumento en la producción de hidroperóxidos y en el enranciamiento de este. Se puede apreciar que el aceite enriquecido posee un PV una unidad y media menor que el aceite de girasol normal, lo cual se puede deber a que la extracción de carotenoides puede producir una pequeña dilución del aceite de girasol, y por lo tanto de los mEq de oxígeno libre. Por otro lado, también se podría considerar que esta disminución es debida al poder antioxidante de los carotenoides, que destruyen o estabilizan las especies reactivas de oxígeno que generan los hidroperóxidos (Luna-Guevara & Delgado-Alvarado, 2014; Meléndez-Martínez et al., 2004). No obstante, para evitar una sobreestimación de la actividad antioxidante de los carotenoides y teniendo en cuenta la cantidad de aceite de yema extraído, se corrigieron los PV del aceite enriquecido aumentando el valor de estos una unidad y media (Figura 27)

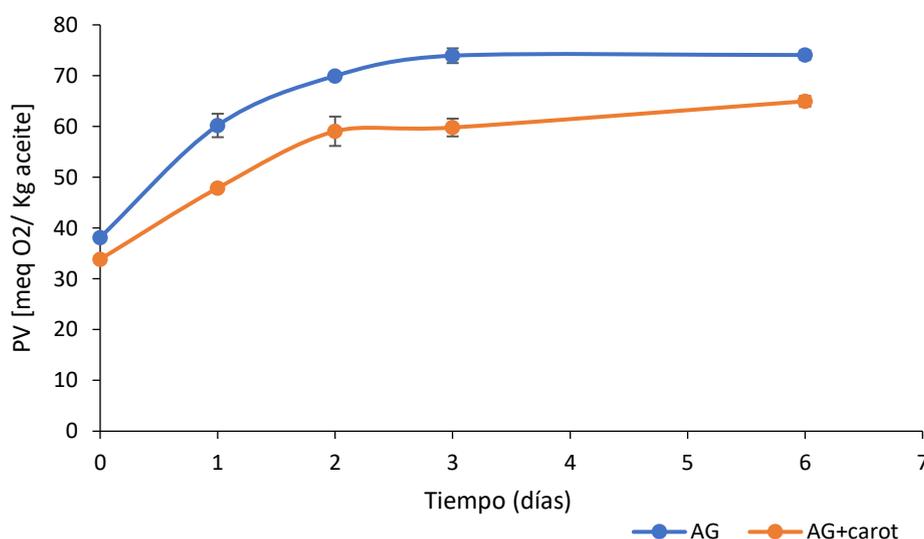


Figura 27: Evolución de los PV del aceite de girasol y el aceite enriquecido durante el tratamiento oxidativo. AG: Aceite de girasol. AG+carot: Aceite de girasol + carotenoides.

Durante las primeras 24 horas bajo condiciones fotooxidantes se observa una mayor oxidación o enranciamiento del aceite de girasol que del aceite enriquecido con carotenoides, observándose un aumento de 22 valores peróxido del aceite de girasol frente a un aumento de 14 unidades en el aceite enriquecido. Una tendencia que se mantiene constante hasta el día 3, a partir del cual la oxidación del

aceite de girasol normal sufre un estancamiento mientras que la oxidación del aceite enriquecido sigue subiendo muy poco a poco hasta el séptimo día. Esta diferencia en la oxidación de los lípidos se debe a la presencia de carotenoides en el aceite enriquecido, principalmente β -caroteno y luteína, los cuales se ha demostrado que muestran actividad antioxidante frente a la oxidación de compuestos fotosensibles (Viljanen et al., 2002). Los carotenoides presentes en el aceite enriquecido van a reaccionar con los radicales libres desactivándolos, evitando la oxidación de las grasas del aceite (Stahl & Sies, 1993). Esta capacidad antioxidante va a depender de la concentración de antioxidantes en el extracto, ya que se van consumiendo durante la fotooxidación (Viljanen et al., 2002). A medida que los carotenoides absorben luz, propiedad que viene determinada por la presencia de dobles enlaces en su estructura, se van consumiendo y descomponiendo, lo cual concuerda con los resultados que se muestran en Figura 28.A, donde se puede observar que tras 9 días de exposición al sol la concentración de carotenoides en el aceite enriquecido disminuyó un 17%, y con los resultados de la Figura 27 donde se observa un estancamiento de la capacidad antioxidante de los mismos. En el caso del aceite de girasol tratado se puede observar que la cantidad de carotenoides que se descomponen es prácticamente la misma que en el aceite enriquecido, lo que sugiere que esa es la cantidad de carotenoides que se consumen bajo las condiciones oxidativas a las cuales se sometieron los aceites. La diferencia de carotenoides entre el aceite de girasol y el aceite enriquecido con carotenoides se puede observar a simple vista (Figura 28.B), ya que estos actúan como colorante dotando al aceite de un color naranja. Más allá del aspecto visual, la diferente concentración de carotenoides se comprobó experimentalmente, siendo la del aceite enriquecido 4,289 mg/Kg mientras que la del aceite de girasol tratado 1,113 mg/Kg.

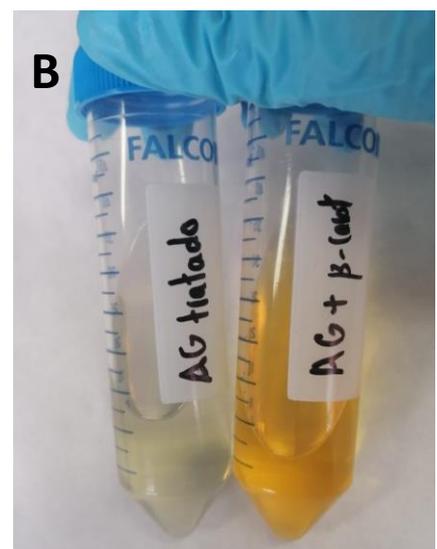
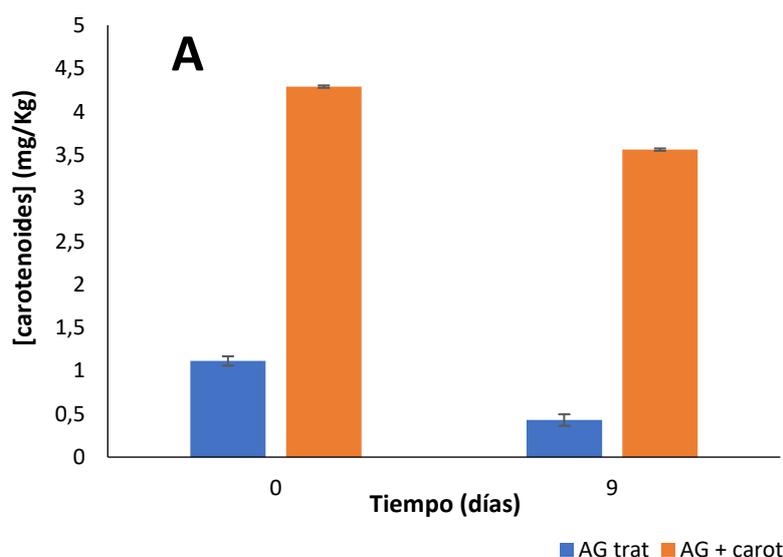


Figura 28: (A) Evolución del contenido de carotenoides de los aceites normal y enriquecido sometidos a las condiciones fotooxidantes (B) Aceite de girasol normal tratado (izquierda) y aceite de girasol enriquecido con carotenoides (derecha).

4.3 Propiedades colorimétricas del aceite de girasol enriquecido

En cuanto a las propiedades colorimétricas del aceite, la presencia de los carotenoides tiene una clara influencia en el color del aceite, sobre todo en los valores de b^* (coordenadas amarillo/azul) (Tabla 4). Se puede observar que los valores de b^* para el aceite enriquecido son mucho mayores que los del aceite normal, lo que significa que hay un aumento en el color amarillento del aceite, el cual se puede observar a simple vista (Figura 28.B). Así mismo, hay una disminución del valor de L^* , disminuye la luminosidad del aceite, y aumenta a^* (coordenadas rojo/verde), lo que supone un aumento en la tonalidad roja del extracto respecto al aceite normal.

Tabla 4: Parámetros colorimétricos CIELab del aceite de girasol normal y del aceite de girasol enriquecido con carotenoides.

	L^*	a^*	b^*	ΔE^*	WI	Chroma
AG tratado	64,95 ± 0,49 ^a	2,05 ± 0,07 ^b	11,45 ± 0,07 ^b	-	63,07 ± 0,49 ^a	11,63 ± 0,06 ^b
AG+carot	60,90 ± 0,00 ^b	16,55 ± 0,21 ^a	81,10 ± 0,28 ^a	71,43 ± 0,24	8,46 ± 0,29 ^b	82,77 ± 0,32 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Respecto a la diferencia total de color (ΔE^*) entre ambos aceites, tratado y con carotenoides, se puede observar que esta es de 71,43 unidades, lo que demuestra que hay una diferencia significativa de color entre ambos. Los valores de ΔE^* concuerdan con los valores obtenidos para la intensidad de color de cada uno de los aceites, observándose un claro aumento del *chroma* del aceite enriquecido con carotenoides respecto al aceite de girasol normal. Esto demuestra la capacidad de estos extracto enriquecidos de actuar como colorantes, siendo sustitutos potenciales de colorantes artificiales a la hora de elaborar margarinas, mayonesas o sustitutivos grasos (Wrolstad & Culver, 2012), mejorando su estabilidad por la presencia de los antioxidantes en el aceite (Kaur et al, 2011).

4.4 Extracción de carotenoides de la yema de huevo utilizando disolventes orgánicos.

Obtención de aceite de yema de huevo.

A pesar de conseguir extracciones de un 70% de los carotenoides totales presentes en la yema mediante el empleo del aceite de girasol como extractante, la concentración más alta conseguida en el aceite fue de 8,6 $\mu\text{g/mL}$. Al ver que la concentración de carotenoides en el aceite de girasol después de la extracción podría considerarse como baja, en este trabajo también se exploró la recuperación de carotenoides de la yema de huevo utilizando disolventes orgánicos, con el objetivo de obtener extracciones con una mayor concentración de carotenoides para su posterior uso en otras aplicaciones, entre ellas la elaboración de biomateriales de PLA. Los ensayos realizados hasta el momento muestran que, mediante el empleo de disolventes orgánicos, se ha conseguido obtener

extractos con hasta 80 mg de carotenoides por Kg de aceite, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, extractos hasta 10 veces más concentrados que el aceite de girasol enriquecido conseguido previamente (Kovalcuks, 2014; Kovalcuks & Duma, 2014).

Como resultado de la extracción de carotenoides de la yema de huevo mediante disolventes orgánicos, se obtuvo una solución oleosa bastante densa, de color naranja intenso, a la cual se denominó aceite de yema de huevo (Figura 29). Con este aceite de yema lo primero que se realizó fue la cuantificación de los carotenoides extraídos de acuerdo con el método estándar *UNE-EN ISO 17932:2012* (AENOR, 2012); siendo la concentración de carotenos presentes en el aceite de 59,59 \pm 0,85 μg carotenoides/g de yema liofilizada, lo cual concuerda con los resultados de otros estudios realizados hasta el momento (Kovalcuks, 2014, 2015). Este extracto se empleó para la elaboración de los *films* de PLA con aceite de yema de huevo, los cuales al contener una cantidad significativa de carotenoides podrían emplearse como *packaging* alimentario con propiedades antioxidantes.



Figura 29: Aceite de yema de huevo

4.5 Elaboración de *films* de PLA con aceite de yema de huevo

4.5.1 Transmitancia y transparencia

Los *films* de PLA con diferentes concentraciones de aceite de yema de huevo, 0,1 g/g PLA (A1), 0,2 g/g PLA (A2) y 0,3 g/g PLA (A3), se despegaron de la placa de vidrio con ayuda de una punta, separando la película de *film* de la superficie de la placa sin dañarlos. Obteniéndose unos *films* con aspecto homogéneo, bastante más opacos que el de PLA normal y con una ligera coloración naranja (Figura 30).

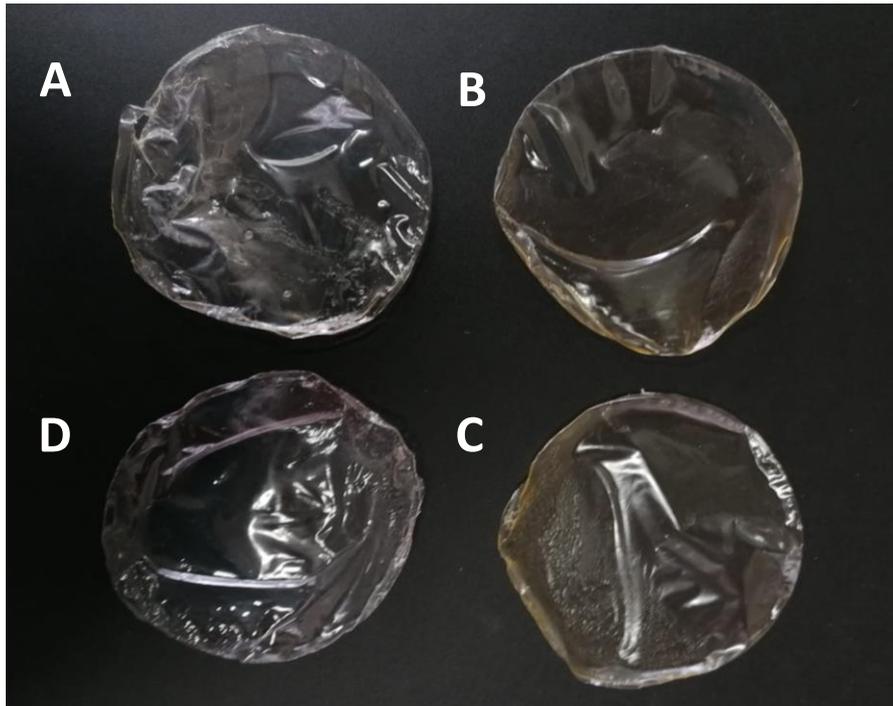


Figura 30: Films de PLA con aceite de yema de huevo: A1 (A), A2 (B), A3 (C); y film de PLA control (D). A1 (0,1 g aceite/g PLA), A2 (0,2 g/g) y A3 (0,3 g/g).

Las propiedades de transmisión de luz de los *films* se evaluaron en longitudes desde los 200 hasta los 800 nm y se registró el porcentaje de transmitancia de luz (Tabla 5). Tanto la luz solar como la radiación UV son potentes agentes oxidantes de lípidos y otros compuestos fotosensibles presentes en los alimentos, cosméticos y otros materiales, por lo que lo que se busca en estos materiales barrera es un bajo porcentaje de transmitancia. Los *films* elaborados con PLA y aceite muestran un porcentaje de transmitancia de luz UV/Vis menor que los *films* de PLA normales, esto sugiere que el aceite de yema de huevo rico en carotenoides dota a los *films* de la capacidad de actuar como una barrera contra la luz ultravioleta (200-300 nm) y contra la luz visible (300-800 nm). Esta propiedad de los *films* con el extracto de aceite de yema de huevo, seguramente se deba a la alta concentración de carotenoides presentes en este, los cuales se ha demostrado que pueden actuar como barrera contra la luz UV/Vis (Stoll et al., 2019).

Al igual que con la transmitancia, la adición de aceite de yema de huevo también afectó a la transparencia de los *films*, la cual disminuyó a medida que se aumentó la cantidad de extracto de aceite añadido. Los valores de transparencia (Tabla 6), se muestran como un número que correlaciona la absorbancia del *film* con su grosor, cuanto más luz absorba un *film* menor es la transmitancia y por lo tanto la transparencia; por lo que cuanto mayores sean las relaciones A_{600}/x , menor va a ser la transparencia de los *films*. De acuerdo con lo expuesto previamente, al aumentar la cantidad de aceite en el *film* aumenta la relación A_{600}/x y por lo tanto disminuye la transparencia de los *films*, aumentando

las propiedades de barrera de estos como se había predicho con anterioridad. Estudios demuestran que estas propiedades de barrera de los *films* pueden variar, viéndose disminuidas tras periodos de almacenamiento en los que los *films* son expuestos a la luz solar, debido a la foto degradación de los pigmentos (Stoll et al., 2019).

Tabla 5: Valores de transmitancia de los *films* de PLA con aceite de yema de huevo, A1 (0,3 g aceite/g PLA), A2 (0,2 g/g) y A3 (0,3 g/g), y el *film* de PLA control (C).

Film	Transmitancia (%)							
	200 nm	280 nm	350 nm	400 nm	500 nm	600 nm	700 nm	800 nm
C	1,29 ± 0,12	84,60 ± 0,42	87,75 ± 0,78	88,60 ± 0,71	89,50 ± 0,85	90,10 ± 0,85	90,55 ± 0,92	90,35 ± 1,48
A1	0,04 ± 0,00	47,40 ± 1,98	62,80 ± 3,96	67,85 ± 4,03	73,30 ± 4,67	78,85 ± 3,89	82,00 ± 3,11	84,20 ± 2,55
A2	0,03 ± 0,01	42,65 ± 7,35	62,15 ± 4,60	67,45 ± 3,89	72,75 ± 3,32	77,30 ± 2,83	79,60 ± 2,55	81,40 ± 2,40
A3	0,03 ± 0,00	41,10 ± 4,67	58,25 ± 2,19	63,10 ± 1,56	68,30 ± 0,85	72,85 ± 0,21	75,15 ± 0,07	76,95 ± 0,21

4.5.2 Colorimetría

En cuanto a las propiedades colorimétricas de los *films* (Tabla 6), al incorporar el aceite de yema de huevo a los *films* de PLA se puede observar que aumentaron principalmente los valores de b^* , lo que significa que los materiales preparados adquirieron una coloración amarillenta. Además, los valores de L^* disminuyeron, debido a que al añadir el aceite de yema de huevo el *film* adquirió una apariencia más oscura y opaca, que hizo que la luminosidad de estos disminuyera. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos por Rawdkuen et al. (2020) en los cuales se describe un aumento del valor de a^* (coordenadas rojo/verde) al aumentar la cantidad de pigmento, en este caso antocianina, añadido a los *films*, al añadir el aceite se ve que con pequeñas cantidades los valores de a^* se encuentran por debajo del *films* control y solo con la mayor cantidad añadida supera mínimamente al *films* de PLA solo. Estos resultados, los cuales concuerdan con los obtenidos por Stoll et al. (2018), donde para los *films* de PLA con β -carotenos muestran valores de a^* negativos y los *films* con extractos de bixina o licopeno muestran valores muy altos de esta coordenada; se pueden deber a que los β -carotenos, los carotenoides mayoritarios en el aceite de yema de huevo, presentan un color amarillo-anaranjado a diferencia de los otros mencionados los cuales son rojos, por lo cual estos tendrán mucho más peso en la coordenada b^* que en la a^* .

Respecto a la diferencia total de color (ΔE^*) de los *films* con aceite de yema de huevo (A1, A2, A3) frente *film* de PLA normal (control), se puede observar que hay una pequeña diferencia de color, la cual aumenta a medida que se incrementa el contenido de aceite de los *films*. Estos resultados de ΔE^* concuerdan con los valores de *chroma*, cantidad total de color, los cuales aumentan junto con las

concentraciones de pigmento. Sin embargo, los valores de WI disminuyen al aumentar la cantidad de aceite añadida, ya que los grupos cromóforos presentes en los carotenoides del extracto de aceite disminuyen la blancura del aceite y por lo tanto, la de los *films* elaborados (Asadi & Pirsá, 2020).

Tabla 6: Transparencia y atributos de color de los *films* de PLA con aceite de yema de huevo, A1 (0,3 g aceite/g PLA), A2 (0,2 g/g) y A3 (0,3 g/g), y el *film* de PLA control (C).

Film	Transparencia	L*	a*	b*	ΔE*	WI	Chroma
C	1,118 ± 0,060 ^c	94,00 ± 1,34 ^a	0,00 ± 0,42 ^a	1,10 ± 0,42 ^c	-	94,70 ± 1,22 ^a	1,14 ± 0,41 ^b
A1	1,629 ± 0,323 ^b	96,60 ± 1,56 ^a	-0,70 ± 0,42 ^b	2,40 ± 0,99 ^b	2,30 ± 0,48 ^b	95,59 ± 0,59 ^a	2,50 ± 1,07 ^b
A2	2,113 ± 0,006 ^b	96,35 ± 0,21 ^a	-0,30 ± 0,99 ^a	4,40 ± 1,13 ^b	3,78 ± 0,21 ^a	94,20 ± 0,78 ^a	4,46 ± 1,18 ^b
A3	3,650 ± 0,399 ^a	95,27 ± 0,87 ^a	0,70 ± 0,70 ^a	7,27 ± 2,11 ^a	7,24 ± 2,18 ^a	90,24 ± 1,99 ^b	8,32 ± 1,82 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).

4.5.3 Propiedades mecánicas

La adición de aceite de yema de huevo a los *films* de PLA tuvo un ligero efecto sobre las propiedades mecánicas de los *films* (Tabla 7). En cuanto al grosor de los *films*, se puede apreciar una tendencia a aumentar el grosor de los *films* a medida que aumenta la cantidad de aceite de yema que se añade. A pesar de ser cambios muy pequeños, estos pueden ser debidos a que la incorporación del aceite afecte a la microestructura del *film*, desestructurándola, descompactándola o, simplemente, alterándola al acomodarse el aceite a la microestructura del material, aumentando esto el grosor de los *films*. La interacción entre la microestructura del material y el aceite de yema de huevo se estudió, como se muestra posteriormente, mediante microscopía electrónica.

La adición del aceite de yema de huevo también afectó otros parámetros mecánicos como la resistencia a la punción (*PS*) y deformación por punción (*PD*) de los *films* (Tabla 7). Se puede observar que a medida que aumenta la cantidad de aceite en los *films*, su *PD* disminuye, es decir, los *films* pierden elasticidad a medida que aumenta la presencia de aceite en ellos. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Stoll et al. (2018), donde se observa que al añadir pequeñas cantidades de carotenoides a los *films* de PLA la elasticidad de los mismos aumenta, aunque en su caso el grosor de estos se ve inalterado, lo cual se puede deber a que los extractos utilizados en su caso eran más concentrados, consiguiendo incorporar hasta 100 μg carotenoides/g de PLA. En cuanto al parámetro *PD*, que se refiere a la cantidad de energía que se necesita para romper un *film* de un determinado grosor, este disminuye a medida que aumenta la cantidad de aceite que se añade a los *films*.

Estos resultados reflejan que la adición de aceite de yema de huevo a la solución formadora de *films* tiene una clara influencia en las propiedades mecánicas de los *films*, al aumentar su grosor y disminuir

su flexibilidad y resistencia mecánica. Esto puede deberse a que la acomodación del aceite de yema de huevo a la matriz del *film* cambie sus propiedades mecánicas, lo cual debería de quedar reflejado en la microestructura como se verá más adelante mediante un análisis por microscopía electrónica. Se puede concluir que la adición de este extracto a los *films* de PLA, no solventa las limitaciones del PLA como son la poca resistencia al impacto y la fragilidad (Su et al., 2017).

Tabla 7: Grosor, resistencia a la punción (PS) y deformación por punción (PD) de los *films* de PLA con diferentes concentraciones de aceite de yema de huevo: A1 (0,1g/g PLA), A2 (0,2g/g PLA) y A3 (0,3g/g PLA). Control (C) es un *film* de PLA normal.

Film	Grosor (mm)	PS (N/mm)	PD (%)
Control	0,037 ± 0,003 ^b	41555,74 ± 6721,61 ^a	183,19 ± 33,13 ^a
A1	0,040 ± 0,008 ^a	321113,21 ± 2733,49 ^b	161,36 ± 29,74 ^a
A2	0,046 ± 0,008 ^a	25668,57 ± 3327,35 ^c	139,24 ± 33,07 ^b
A3	0,050 ± 0,013 ^a	16489,40 ± 2200,84 ^d	98,97 ± 12,20 ^c

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias

4.5.4 Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y solubilidad

Algunas de las propiedades más importantes de los polímeros utilizados para el empaquetado de alimentos son la permeabilidad o barrera de estos frente al vapor de agua, los gases o las moléculas de aroma (Farah et al., 2016). La WVP de *films* basados en biopolímeros depende de factores como el tipo y la concentración del biopolímero utilizado, el tipo y cantidad de plastificador utilizado, y la cantidad y tipo de aditivos añadidos a la solución formadora del *films*, en este caso el aceite de yema de huevo, siendo una propiedad estrechamente relacionada con la microestructura de los *films* (Weng et al., 2021).

Los resultados del ensayo (Tabla 8) muestran que la incorporación de aceite de yema de huevo a la matriz de los *films* de PLA produce un aumento de la permeabilidad de los mismos cuando se trabaja con concentraciones de aceite altas. Como se muestra en la tabla, al añadir 0,1 y 0,2 g de aceite/g PLA se genera un descenso de la WVP de los *films* del 44,8 y 14,5 %, respetivamente, respecto al *film* de PLA normal; lo que sugiere que el aceite en estas cantidades actúa como un plastificador, tapando los poros de las películas y disminuyendo su permeabilidad o mejorando la estructura y uniones de la matriz del *film*. Sin embargo, con una concentración de 0,3 g aceite/ g PLA se produce un aumento de la WVP de los *films* del 22,1%, esto puede deberse a que al aumentar tanto la cantidad de aceite y, por lo tanto, moléculas lipídicas en la matriz del *film* se produzca una desestabilización de esta. Estos resultados concuerdan con los de Stoll et al. (2018), en donde se observa que al aumentar la

concentración de carotenoides en los *films* de PLA se produce un aumento de la permeabilidad al vapor. Sin embargo, hay estudios en los que se demuestra que al añadir compuestos hidrofóbicos a la matriz de los *films* de PLA se disminuye la permeabilidad de este; como es el caso del estudio llevado a cabo por Asadi & Pirsá (2020) donde se observa una disminución de la WVP al añadir licopeno a los *films* de PLA. Se puede concluir que el efecto de los aditivos añadidos en la permeabilidad de los *films* va a depender de estos compuestos añadidos, su estructura y naturaleza, y la forma en que estos interactúen con la matriz del *film*.

Tabla 8: Permeabilidad al vapor de agua (WVP), tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) y solubilidad de los *films* de PLA con diferentes concentraciones de aceite de yema de huevo: A1 (0,1g/g PLA), A2 (0,2g/g PLA) y A3 (0,3g/g PLA). Control es un *film* de PLA.

Film	WVTR (g/h x m²)	WVP (g x mm/m² x h x kPa)	Solubilidad (%)
Control	6,633 ± 2,243 ^a	0,145 ± 0,063 ^b	0
A1	5,970 ± 1,219 ^a	0,080 ± 0,013 ^a	0
A2	7,297 ± 1,599 ^a	0,124 ± 0,025 ^a	0
A3	8,209 ± 1,927 ^a	0,177 ± 0,051 ^a	0

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).

En cuanto a la solubilidad de los *films* de PLA con aceite de yema de huevo, como se puede ver en la Tabla 8, la adición de diferentes concentraciones de aceite al PLA no afectó a la solubilidad de los *films*, la cual se mantiene en todos los casos entorno a valores del 0%. Lo cual concuerda con lo esperado, ya que el PLA es un polímero soluble en disolventes orgánicos como el cloroformo, acetonitrilo o diclorometano y, por lo tanto, la solubilidad en disolventes polares como el agua o alcoholes, como etanol o metanol, es nula o insignificante (Farah et al., 2016; Erdohan et al., 2013).

4.5.5 Microestructura

Las micrografías de la Figura 31 muestran la microestructura de la sección transversal de los *films* de PLA sin y con la incorporación de diferentes concentraciones de aceite de yema de huevo. Como se había previsto de acuerdo con los ensayos mecánicos, así como de permeabilidad realizados previamente, la adición del aceite tiene un claro efecto en la estructura interna de los *films*. Los resultados obtenidos muestran que el *film* de PLA presenta una matriz homogénea, compacta, continúa y lisa, sin poros ni burbujas, perfectamente estructurada; sin embargo, a medida que aumenta la cantidad de aceite en los *films* se aprecia un aumento en el número de poros o burbujas en la matriz del *film*, lo que hace que esta sea menos compacta. Se puede ver que el *film* con menor cantidad de aceite (A1, Figura 22.B) presenta algunos poros pequeños distribuidos homogéneamente

en la sección, mientras que los que tienen mayor cantidad de aceite (A2 y A3, Figura 22.C y D) muestran mayor número de poros y oquedades y de mayor tamaño; en el caso de A3, además de poros, se pueden observar unos gránulos o burbujas que revelan la existencia de dos fases o lo que se conoce como morfología *island-and-sea* en la cual el extracto se encuentra disperso en gotas de, aproximadamente, 5 μm en la matriz de PLA (Radusin et al., 2019).

Esta morfología *island-and-sea*, puede ser la responsable de que la permeabilidad al vapor de agua del *film* A3 sea mayor que el de resto de los materiales ensayados, ya que estos gránulos y poros presentes en la matriz del PLA pueden favorecer la difusión de gases a través de esta. En cuanto a las propiedades mecánicas, la aparición de poros en la matriz del *film* al añadir el aceite podría explicar que estos posean una menor resistencia a la rotura y elasticidad que los *films* de PLA normales, lo cual concuerda con los resultados obtenidos previamente.

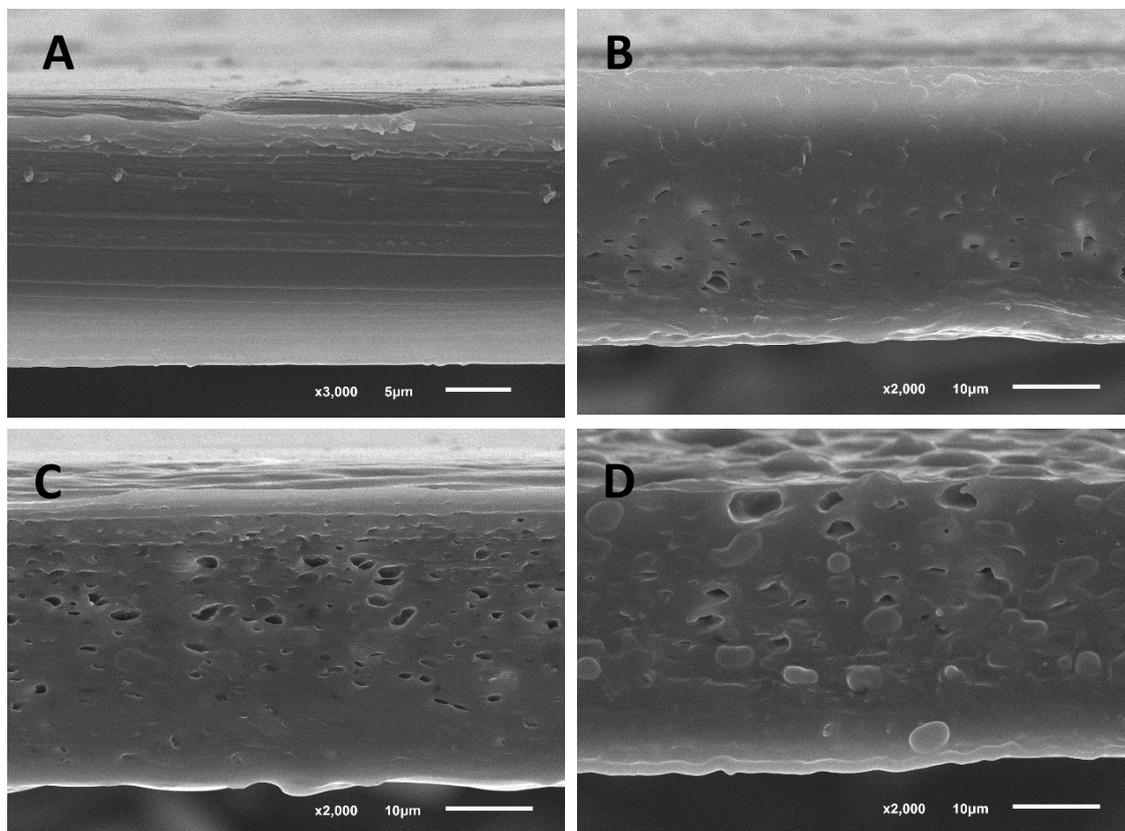


Figura 31: Micrografías de los films de PLA con aceite de yema de huevo. A) Film de PLA sin aceite. B) Films de PLA preparados a partir de la solución formadora de films con concentraciones de aceite de yema de huevo de 0,1g por g PLA (A1), C) 0,2 g/g PLA (A2), D) 0,3 g/g PLA.

4.5.6 Propiedades antimicrobianas

Las propiedades antimicrobianas de los materiales preparados fueron ensayadas frente a *E. coli* y *S. aureus*, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Ensayo en medio líquido. Propiedades antimicrobianas de los films de PLA con aceite de yema de huevo.

Film	<i>S. aureus</i> (UFC/mL)	<i>E. coli</i> (UFC/mL)
Control positivo	$8,29 \times 10^8 \pm 0,00 \times 10^7$ ^a	$4,63 \times 10^8 \pm 0,00 \times 10^7$ ^a
Film aceite (A3)	$7,99 \times 10^8 \pm 4,34 \times 10^7$ ^a	$5,06 \times 10^8 \pm 6,11 \times 10^7$ ^a
Film control	$8,14 \times 10^8 \pm 2,17 \times 10^7$ ^a	$4,85 \times 10^8 \pm 1,31 \times 10^7$ ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0,05).

Los resultados del ensayo en medio líquido frente a *E. coli* y *S. aureus* muestran que los *films* de PLA con aceite de yema de huevo no poseen propiedades antimicrobianas. Como se puede observar en la Tabla 9, los resultados del ensayo en medio líquido con *S. aureus* muestran que hay un poco menos de crecimiento en los tubos con el *film* de PLA control y el *film* con aceite (A3) que en el control positivo (tubo sin *film*); sin embargo, esos resultados no son significativamente diferentes, por lo que no permiten afirmar que dicho descenso en el crecimiento se deba a la presencia de los *films* en el medio. En cuanto al ensayo con *E. coli*, los resultados que se presentan en la Tabla 9 muestran que hay menos crecimiento microbiano en el control positivo que en los tubos conteniendo los *films* de PLA control y los de aceite, lo cual es lo contrario a lo esperado; por lo que, los *films* de PLA con aceite de yema de huevo no inhiben el crecimiento de *E. coli*. Como se puede observar, los *films* de PLA con aceite de yema de huevo, en las concentraciones ensayadas, no tienen efecto antibacteriano, ya que no inhiben el crecimiento de bacterias Gran-positivas o Gran-negativas tan comunes como *S. aureus* o *E. coli*, respectivamente. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Asadi & Pirsá (2020), donde se puede observar que los *films* modificados con extracto de licopeno no presentan efecto antimicrobiano frente *E. coli* y *S. aureus*; solo mostraron efecto inhibitorio aquellos a los que se les incorporaron las nanopartículas de dióxido de titanio.

Tras ver que los *films* con aceite de yema de huevo carecían de propiedades antimicrobianas, se procedió a ensayar el aceite de yema de huevo directamente. Los resultados del ensayo en medio sólido frente a *E. coli* (Figura 32.A) y *S. aureus* (Figura 32.B), muestran que la actividad antimicrobiana del aceite es nula, no se observa halo de inhibición alrededor de los pocillos en los cuales se introdujo el extracto. Estos resultados demuestran que, a diferencia de lo que se puede ver en otros estudios (Asadi & Pirsá, 2020; Tao et al., 2010), los carotenoides presentes en el aceite de yema de huevo no tienen efecto antimicrobiano. Esta discrepancia se podría atribuir a que la concentración de carotenoides presentes en el aceite de yema no es suficiente para producir inhibición de las bacterias ensayadas, *S. aureus* y *E.coli*. Sin embargo, los estudios realizados por Tao et al. (2010) con carotenoides extraídos de la piel del pomelo, muestran que la concentración mínima inhibitoria de carotenoides para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis* es de 35,0, 18,75 y 70,0 $\mu\text{g/mL}$;

por lo que la concentración presente en el aceite de yema de huevo, 60,0 $\mu\text{g/g}$ de aceite de yema de huevo, debería ser suficiente para causar la inhibición de *S. aureus* y *E. coli*. Esto puede ser debido a que los carotenoides de mayor concentración en el aceite de yema de huevo, luteína y zeaxantina no poseen el mismo poder antimicrobiano que los presentes en la piel del pomelo Shaitan o se han visto afectados por el tratamiento seguido para su extracción, perdiendo parte de sus propiedades. Teniendo en cuenta los resultados de Ernawita et al. (2016) sobre las propiedades antimicrobianas de extractos ricos en luteína y zeaxantina, que obtuvo de la piel y la pulpa de diferentes tipos de cítricos, las concentraciones de estos carotenoides presentes en el aceite de yema, aproximadamente 6 mg/100g, no son suficientes para inhibir el crecimiento de las bacterias de manera significativa, ya que el coeficiente IC_{50} para *S. aureus* varía entre 6 y 13 mg/mL según la concentración de carotenoides en cada extracto, pulpa y piel respectivamente.

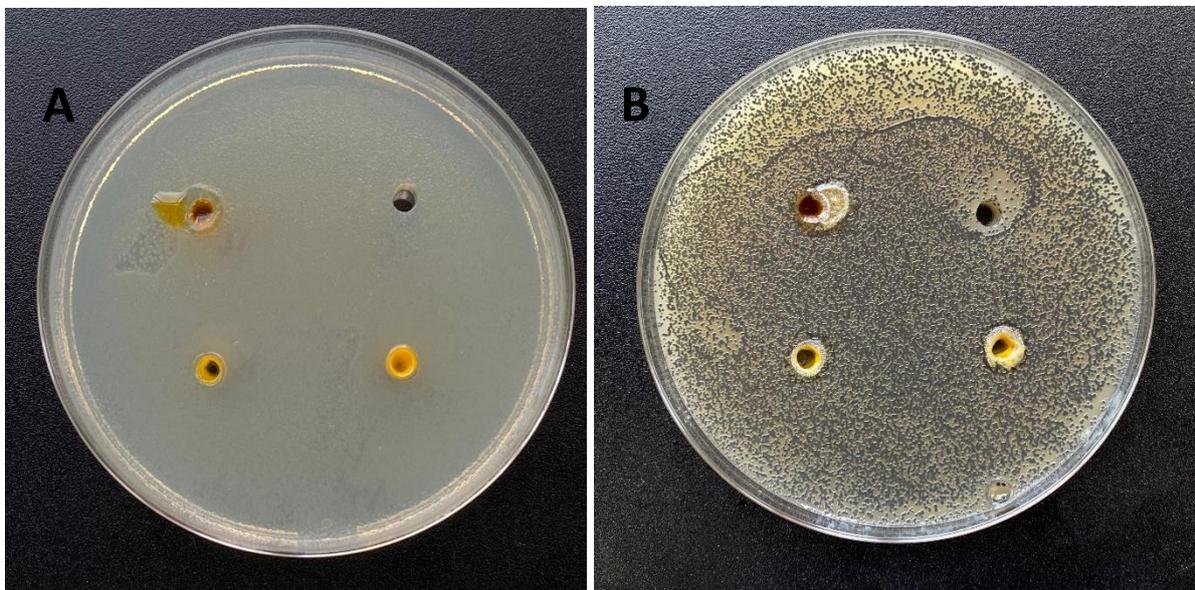


Figura 32: Ensayo en pocillos. Propiedades antimicrobianas del aceite de yema de huevo frente a *E. coli* (A) y *S. aureus* (B).

Los resultados de ambos ensayos muestran que el aceite de yema de huevo no presenta propiedades antibacterianas. Esto seguramente se deba, teniendo en cuenta los resultados de otros estudios realizados previamente, a que los carotenoides presentes en el aceite no se encuentran en las concentraciones suficientes para generar un efecto inhibitorio sobre las bacterias ensayadas.

4.5.7 Propiedades antioxidantes

En la Figura 33 se puede apreciar el efecto del aceite de yema de huevo en la capacidad antioxidante de los *films* de PLA. Los resultados muestran que la actividad antioxidante de los *films* aumenta al aumentar la concentración de aceite de yema de huevo y con el paso de los días. Se puede observar que los *films* A3, que poseen una concentración de 0,3 g de aceite de yema de huevo por gramo de

PLA, poseen un 20% más de capacidad antioxidante que los *films* con 0,2 g aceite/g PLA (A2), llegando a alcanzar una capacidad antioxidante del 54,3%. Esta capacidad antioxidante del aceite de yema de huevo se debe al alto contenido de carotenoides como el luteína y zeaxantina (Ellison, 2016; Zaheer, 2017). La capacidad antioxidante de estos carotenoides se debe principalmente a que son moléculas ricas en enlaces dobles conjugados, los cuales reaccionan fácilmente con los radicales libres de oxígeno eliminándolos; desde este punto de vista, se atribuye mayor capacidad antioxidante a la zeaxantina ya que posee un doble enlace más que la luteína, lo que hace que posea un mejor efecto fotoprotector y sea más eficiente eliminando radicales libres de oxígeno y disminuyendo el daño oxidativo (Murillo et al., 2019).

En cuanto al aumento de la capacidad antioxidante, como se puede apreciar en la Figura 33, esta va incrementándose de manera constante a medida que pasan los días hasta que se alcanza el día 9, a partir del cual se observa un estancamiento en el aumento de la actividad antioxidante. Este aumento progresivo de la capacidad antioxidante sugiere que los carotenoides retenidos en el *film* de PLA se van liberando poco a poco a medida que pasa el tiempo, hasta alcanzar un máximo de liberación entre los días 9 y 10, a partir de los cuales se observa una disminución de la capacidad antioxidante, lo cual se puede deber a la propia oxidación de los carotenoides liberados.

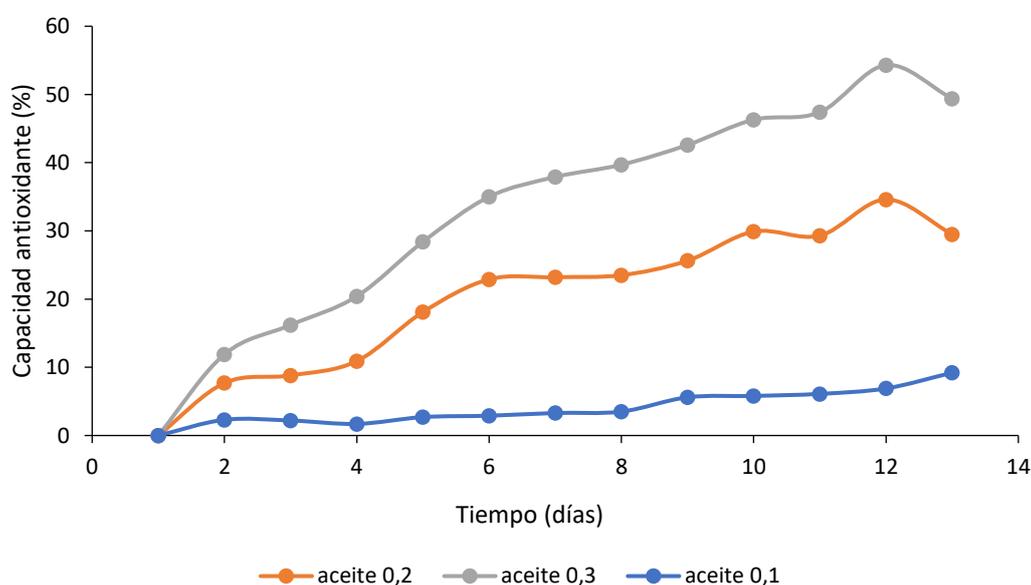


Figura 33: Evolución de la capacidad antioxidante de los *films* de PLA con aceite de yema de huevo.

4.5.8 Ensayo de liberación

Los resultados del ensayo de liberación de los carotenoides retenidos en los *films* de PLA inmersos en un simulante lipídico a 40 °C (Figura 34), muestran que en las primeras 24 horas en las que están en contacto los *films* con la solución de etanol 96% se liberan todos los carotenoides retenidos en el *film*,

obteniéndose la máxima absorbancia a 450 nm. Se puede observar que a medida que aumenta la concentración de carotenoides en el *film* aumenta la absorbancia a 450 nm del líquido simulante, lo que quiere decir que hay una mayor cantidad de carotenoides liberados. En todos los casos, A1, A2 y A3, la máxima liberación es tras 24 horas de ensayo, donde se observa un pico, mientras que a partir de ese punto la absorbancia va disminuyendo, lo que se puede deber a una degradación de los carotenoides liberados en el simulante.

Teniendo en cuenta que la liberación de los carotenoides retenidos en los *films* a 40 °C, temperatura que se había seleccionado de acuerdo a estudios previos para facilitar la monitorización del ensayo, es casi instantánea; para poder determinar el modelo matemático que explique la liberación de los carotenoides en el simulante alimentario, tal y como hacen Stoll et al. (2019), habría que variar las condiciones de trabajo, determinando la absorbancia a 450 nm del simulante cada hora durante las primeras 24 horas o realizando el ensayo a temperatura ambiente lo que retardaría la liberación. De este modo se podría ver si el fenómeno de liberación ocurre según la segunda ley de Fick y determinar los coeficientes de transferencia o partición, los cuales permiten determinar el nivel de interacción entre los carotenoides y el simulante o la matriz de PLA (Stoll et al., 2019).

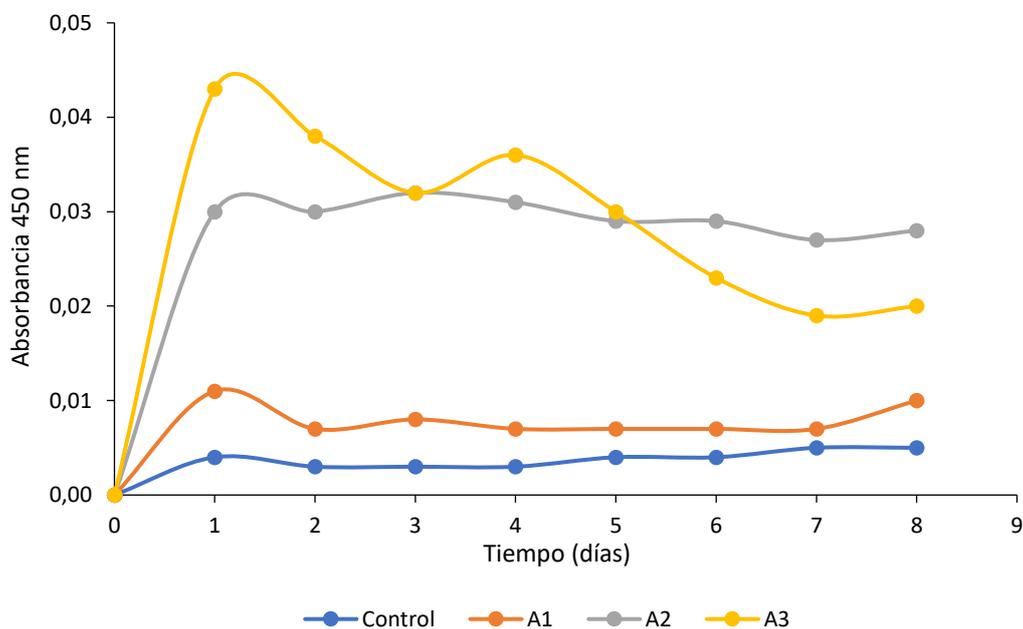


Figura 34: Evolución de la liberación de carotenoides en el simulante lipídico (etanol 95%). A1 (0,1g/g PLA), A2 (0,2g/g PLA) y A3 (0,3g/g PLA).

4.6 Aplicación de los *films* de PLA con aceite de yema de huevo como *packaging* primario

4.6.1 *Packaging* primario para resveratrol

Las propiedades antioxidantes de los *films* previamente evaluadas, así como los resultados obtenidos en cuanto a la transmitancia y transparencia de los materiales preparados, sugieren que estos *films* podrían actuar como una buena barrera frente al efecto fotooxidativo de las radiaciones de luz UV/Vis. Para estudiar estas propiedades barrera frente a las radiaciones, se prepararon pequeñas bolsas de PLA con 0,3 g de aceite de yema de huevo por gramo de PLA (A3) cargadas con una disolución acuosa de resveratrol, un conocido antioxidante alimentario que pierde actividad al ser expuesto a la luz ambiental, y se estudió la isomerización del *trans*-resveratrol a *cis*-resveratrol al incidir la luz solar sobre las pequeñas bolsas de PLA cargadas con la solución.

Los resultados obtenidos tras 48 horas de ensayo se muestran en la Tabla 10.:

Tabla 10: Protección de los *films* de PLA con aceite de yema de huevo frente a la Isomerización del resveratrol bajo condiciones fotooxidantes.

	<i>trans</i>-Resveratrol (%)	<i>cis</i>-Resveratrol (%)
Solución t=0	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Control 24 h	11,75 ± 0,04	88,25 ± 0,04
Film PLA 24 h	14,71 ± 0,40	85,29 ± 0,40
Film A3 24 h	22,30 ± 0,82	77,70 ± 0,82
Control 48 h	4,84 ± 0,02	95,16 ± 0,02
Film PLA 48 h	13,41 ± 0,22	86,59 ± 0,22
Film A3 48 h	16,43 ± 0,07	83,57 ± 0,07

Partiendo de una disolución inicial de resveratrol que posee un 100% de *trans*-resveratrol, se puede observar que tras 24 horas de exposición a la luz solar la solución de resveratrol que actúa como control positivo alcanza un 88,25% de isomerización (*cis*-resveratrol) y las soluciones de resveratrol protegidas por los *films* alcanzan una isomerización del 85,29% y del 77,70% para el *film* de PLA y el de PLA con aceite, respectivamente. Estos resultados demuestran que los *films* son capaces de proteger al resveratrol de la isomerización por la luz solar; se puede observar que el propio PLA tiene efecto barrera frente a las radiaciones, pero la adición del aceite de yema de huevo aumenta el efecto fotoprotector, lográndose hasta un 10,55% de protección adicional en las primeras 24 horas. Tras 48 horas de ensayo, la solución control alcanza una isomerización del 95,16% y las solución en el *film* de PLA con aceite un 11,60% menos. Estos resultados muestran que en el periodo de tiempo ensayado los *films* con aceite de yema de huevo son capaces de mantener sus propiedades de barrera, las cuales

se deben principalmente a los cambios visibles en el aspecto y transparencia de los *films* al añadir el extracto de aceite de yema de huevo. Sin embargo, aunque los resultados son significativos, el efecto fotoprotector es bastante menor de lo esperado y de los resultados obtenidos en otros estudios donde se encapsula el resveratrol en nanopartículas o vesículas para aumentar su estabilidad. En el caso de Machado et al. (2021), la encapsulación del resveratrol en niosomas consiguió disminuir el porcentaje de isomerización del *trans*-resveratrol a *cis*-resveratrol de un 42% a un 13%, tras 15 minutos de irradiación con luz UV de alta energía. Resultados similares fueron obtenidos por Koga et al. (2016), los cuales tras encapsular el *trans*-resveratrol en micropartículas de caseinato de sodio lograron aumentar la estabilidad del resveratrol frente a la isomerización por luz UV a 356 nm durante 1 hora.

4.6.2 *Packaging* primario para AOVE

Teniendo en cuenta que, como se puede ver con el resveratrol, los *films* son capaces de mostrar un pequeño efecto barrera frente a la radiación UV/Vis y, como se observó con el ensayo de DPPH, también poseen propiedades antioxidantes; podrían resultar un *packaging* primario biodegradable interesante para proteger al AOVE frente a la oxidación lipídica que produce su enranciamiento.

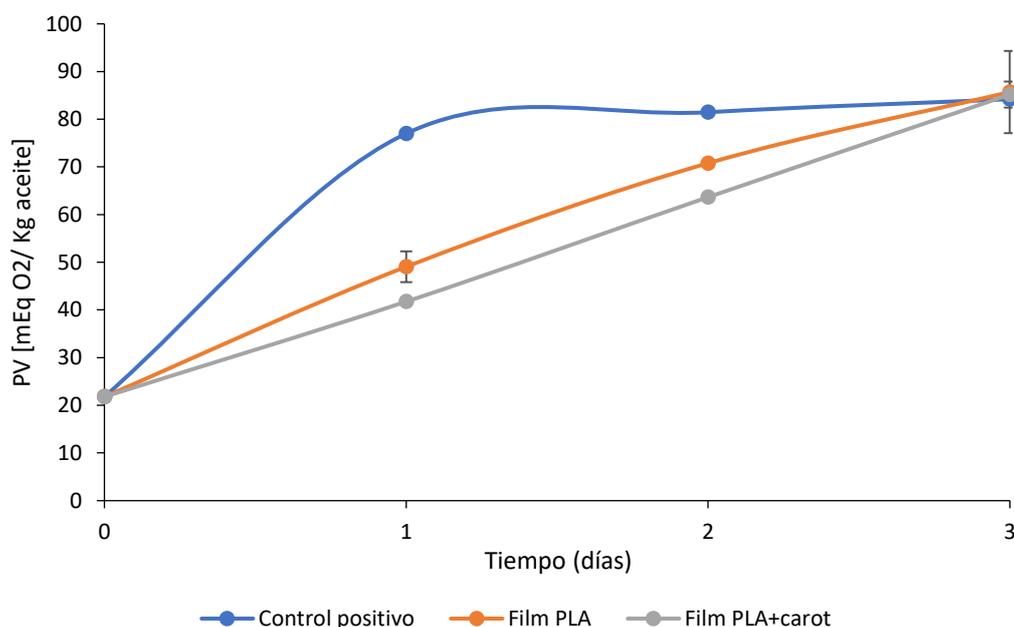


Figura 35: Evolución del PV del AOVE libre (azul), en el *film* de PLA (naranja) y PLA con aceite de yema de huevo (gris) durante los 4 días de ensayo.

Los resultados del ensayo (Figura 35) muestran la evolución de los PV del AOVE libre (control positivo), empaquetado en un *film* de PLA y empaquetado en un *film* de PLA con aceite de yema de huevo, sometidos a condiciones fotooxidantes. El PV es uno de los indicadores más utilizados para estudiar la calidad y el estado de deterioro de lípidos y grasas; se trata de un biomarcador que permite ver el

estado de oxidación de los lípidos, ya que cuantifica los hidroperóxidos presentes en el aceite, resultado de la oxidación primaria de los lípidos, en forma de mEq de O₂ por Kg de aceite. Se puede observar que se parte de PV de AOVE un poco por encima de lo establecido legalmente, que sería un máximo de 20 mEq de O₂ activo por Kg de aceite (*Real Decreto 308/1983, 1983*), lo que quiere decir que el aceite ya está bastante oxidado antes de empezar el ensayo. Se puede observar que el aceite libre (control positivo) sufre una oxidación mucho más rápida, llegando al máximo de oxidación durante las primeras 24 horas de ensayo, que el AOVE contenido en los *films* de PLA, el cual va oxidándose poco a poco hasta alcanzar los mismos valores máximos que el control positivo tras 72 horas. Esta diferencia entre el control positivo y el AOVE protegido por los *films* de PLA seguramente se debe a que los *films* protegen al aceite del contacto con el oxígeno atmosférico, evitando así la formación de oxígenos singletes reactivos al interaccionar la radiación solar con el oxígeno atmosférico en presencia de fotosensibilizadores como la clorofila y otros pigmentos presentes en el AOVE (Frankel, 2012). En cuanto a la ligera diferencia existente entre los *films* de PLA normales y los *films* de PLA con aceite de yema de huevo, esta seguramente se deba a la liberación de los carotenoides retenidos en el *film*, los cuales tienen efecto antioxidante protegiendo al AOVE frente a la autooxidación de las grasas y a la fotooxidación. Como se mencionó previamente los carotenoides van a evitar esta autooxidación o fotooxidación del aceite, captando los radicales libres o actuando como *quenchers*, desactivando los oxígenos singletes excitados resultado de la radiación solar (Psomiadou & Tsimidou, 2002; Stahl & Sies, 1993).

5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido extraer de la yema de huevo carotenoides y emplear estos extractos para la elaboración de biomateriales. De manera individualizada, las conclusiones obtenidas durante el estudio son las siguientes:

- A la hora de extraer carotenoides de la yema de huevo con aceite de girasol, se obtienen extractos con mayor concentración del pigmento cuando se utiliza como fuente o materia prima la yema completa.
- La temperatura, la velocidad de agitación y el tiempo, son factores que tienen un importante peso en el proceso de extracción de carotenoides, siendo mayor la concentración de carotenoides extraídos al aumentar el valor de cada uno de estos parámetros.
- El aceite de girasol enriquecido con carotenoides resultante del proceso de extracción ha demostrado ser más estable frente a la fotooxidación que el aceite de girasol normal, y posee unas características colorimétricas que hacen posible utilizarlo como colorante natural.
- La extracción de carotenoides de la yema de huevo mediante disolventes orgánicos permite obtener un aceite de yema de huevo con una concentración de carotenoides 10 veces superior a la presente en aceite de girasol enriquecido.
- La adición de aceite de yema de huevo a la solución formadora de *films* de PLA no solucionó las limitaciones mecánicas de los *films* de PLA normales, pero sí les dotó de capacidad antioxidante y de mejores propiedades barrera, menor transmitancia y transparencia.
- La utilización de los *films* de PLA con aceite de yema de huevo como *packaging* alimentario mostró que estos *films* son capaces de ofrecer una ligera protección a compuestos fotosensibles, como el resveratrol o el AOVE, frente a la isomerización o la oxidación lipídica, respectivamente.

6 ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza (<i>Analysis of variance</i>)
AO	Aceite de oliva
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
DPPH	2,2-difenil-1-1-picrilhidracilo
HDLs	Lipoproteínas de alta densidad (<i>high density lipoproteins</i>)
LA	Ácido láctico (<i>lactic acid</i>)
LDLs	Lipoproteínas de baja densidad (<i>low density lipoproteins</i>)
NB	<i>Nutrient Broth</i>
PD	Deformación por punción
PLA	Ácido poliláctico (<i>polylactic acid</i>)
PS	Resistencia a la punción
PV	Valor peróxido (<i>peroxide value</i>)
TSB	<i>Tryptone Soy Broth</i>
UV	Luz ultravioleta (Ultraviolet)
WI	Índice de blancura (<i>White index</i>)
WVP	Permeabilidad al vapor de agua (<i>Water Vapor Permeability</i>)
WVTR	Tasa de transmisión de vapor de agua (<i>Water Vapor Transmission Rate</i>)

7 BIBLIOGRAFÍA

- Asociación Española de Certificación y Normalización [AENOR] (2011). *Aceite de palma. Determinación del deterioro del índice de blanqueamiento y el contenido de caroteno* (UNE-EN ISO 17932). Recuperado 22 de mayo de 2021, de <https://www.en.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma/?c=N0048777>
- Anton, M. (2007). Composition and Structure of Hen Egg Yolk. En R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, & R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds* (pp. 1-6). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3_1
- Anton, M. (2007). High-density Lipoproteins (HDL) or Lipovitellin Fraction. En R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, & R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds* (pp. 13-16). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3_3
- Anton, M. (2007). Low-density Lipoproteins (LDL) or Lipovitellenin Fraction. En R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, & R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds* (pp. 7-12). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3_2
- Asadi, S., & Pirsá, S. (2020). Production of Biodegradable *Film* Based on Polylactic Acid, Modified with Lycopene Pigment and TiO₂ and Studying Its Physicochemical Properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(2), 433-444. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01618-5>
- Barbosa-Pereira, L., Angulo, I., Lagarón, J. M., Paseiro-Losada, P., & Cruz, J. M. (2014). Development of new active packaging *films* containing bioactive nanocomposites. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.06.002>
- Dick, M., Costa, T. M. H., Gomaa, A., Subirade, M., Rios, A. de O., & Flôres, S. H. (2015). Edible *film* production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 130, 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.040>
- Ellison, S. L. (2016). Carotenoids: Physiology. En B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 670-675). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00120-3>
- Ernawita Z., Wahyuono, R. A., Hesse, J., Hipler, U.-C., Elsner, P., & Böhm, V. (2016). Carotenoids of indigenous citrus species from Aceh and its in vitro antioxidant, antidiabetic and antibacterial activities. *European Food Research and Technology*, 242(11), 1869-1881. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2686-0>

- Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 367-392. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>
- Frankel, E. N. (2012). Chapter 3—Photooxidation of unsaturated fats. En E. N. Frankel (Ed.), *Lipid Oxidation (Second Edition)* (pp. 51-66). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857097927.51>
- Froning, G. W. (2008). Egg Products Industry and Future Perspectives. En Y. Mine (Ed.), *Egg Bioscience and Biotechnology* (pp. 307-325). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470181249.ch8>
- Galasso, C., Corinaldesi, C., & Sansone, C. (2017). Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. *Antioxidants*, 6(4), 96. <https://doi.org/10.3390/antiox6040096>
- Gil, M., (2020) El estado de alarma hace crecer el consumo de huevo en los hogares. *Financial Food*, (379), 1-40. <https://financialefood.es/revista-2020>
- Ibarra, V. G., Sendón, R., & Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A. (2016). Antimicrobial Food Packaging Based on Biodegradable Materials. En *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 363-384). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00029-2>
- Hagen, R. (2012). 10.12—Polylactic Acid. En K. Matyjaszewski & M. Möller (Eds.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (pp. 231-236). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00269-7>
- Instituto de Estudios del Huevo [IEH] (2009). *El gran libro del huevo*. Everest.
- International Organization for Standardization [ISO] (2006). *Milk fat - Determination of peroxide value (ISO 3976)*. Recuperado 8 de junio de 2021, de <https://www.iso.org/standard/38685.html>
- Islam, K. M. S., & Schweigert, F. J. (2015). Comparison of three spectrophotometric methods for analysis of egg yolk carotenoids. *Food Chemistry*, 172, 233-237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.045>
- Kaur, D., Wani, A. A., Singh, D. P., & Sogi, D. S. (2011). Shelf Life Enhancement of Butter, Ice-Cream, and Mayonnaise by Addition of Lycopene. *International Journal of Food Properties*, 14(6), 1217-1231. <https://doi.org/10.1080/10942911003637335>
- Khalil, H. P. S. A., Banerjee, A., Saurabh, C. K., Tye, Y. Y., Suriani, A. B., Mohamed, A., Karim, A. A., Rizal, S., & Paridah, M. T. (2018). Biodegradable *Films* for Fruits and Vegetables Packaging Application:

- Preparation and Properties. *Food Engineering Reviews*, 10(3), 139-153.
<https://doi.org/10.1007/s12393-018-9180-3>
- Kim, H.-J., & Oh, S.-W. (2010). Performance comparison of 5 selective media used to detect *Staphylococcus aureus* in foods. *Food Science and Biotechnology*, 19(4), 1097-1101.
<https://doi.org/10.1007/s10068-010-0155-2>
- Koga, C. C., Andrade, J. E., Ferruzzi, M. G., & Lee, Y. (2016). Stability of Trans-Resveratrol Encapsulated in a Protein Matrix Produced Using Spray Drying to UV Light Stress and Simulated Gastro-Intestinal Digestion. *Journal of Food Science*, 81(2), C292-C300. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13176>
- Kovalcuks, A. (2014). Purification of egg yolk oil obtained by solvent extraction from liquid egg yolk. *Research for Rural Development*, 1, 142-147.
- Kovalcuks, A. (2015). Comparison of Bioactive Compound Content in Egg Yolk Oil Extracted from Eggs Obtained from Different Laying Hen Housing Systems. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 9(6), 589-593. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1105227>
- Kovalcuks, A., & Duma, M. (2014). Solvent extraction of egg oil from liquid egg yolk. *9th Baltic Conference on Food Science and Technology «Food for Consumer Well-Being» FOODBALT 2014: Jelgava, Latvia, 8-9 May, 2014*; 253-256.
- Kovalcuks, A., & Duma, M. (2017). Distribution of Phospholipids, Cholesterol and Carotenoids in Two-Solvent System during Egg Yolk Oil Solvent Extraction. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 10(5), 323-328. <http://doi.org/10.5281/zenodo.1339630>
- Kulinka, M., Marquez, P., Porcel, N., & Rodriguez Lombroni, R. (2017). *Capacidad antioxidante y contenido de carotenoides y tocoferoles totales en huevos de campo e industriales*. [Trabajo de Investigación para Licenciatura, Universidad Nacional de Córdoba]. Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/5619>
- Laca, A., Paredes, B., Rendueles, M., & Díaz, M. (2015). Egg yolk plasma: Separation, characteristics and future prospects. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 7-10.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.048>
- Luna-Guevara, M. L., & Delgado-Alvarado, A. (2014). Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Avances en Investigación Agropecuaria*, 18(1), 51-66.
- Machado, N. D., Gutiérrez, G., Matos, M., & Fernández, M. A. (2021). Preservation of the Antioxidant Capacity of Resveratrol via Encapsulation in Niosomes. *Foods*, 10(5), 988.
<https://doi.org/10.3390/foods10050988>

- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 209-215.
- Da Rocha, M., de Souza, M. M., & Prentice, C. (2018). Chapter 9 - Biodegradable Films: An Alternative Food Packaging. En A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Food Packaging and Preservation* (pp. 307-342). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811516-9.00009-9>
- Murillo, A. G., Hu, S., & Fernandez, M. L. (2019). Zeaxanthin: Metabolism, Properties, and Antioxidant Protection of Eyes, Heart, Liver, and Skin. *Antioxidants*, 8(9), 390. <https://doi.org/10.3390/antiox8090390>
- Neder, V., Signorini, M., Cuatrin, A., Gianre, V., & Calvino, L. (2015). Prevalencia de bacterias patógenas de mastitis bovina en leche de tanque de frío y evaluación de medios de cultivo para el recuento y la identificación de *Staphylococcus aureus*. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 13(1-2), 20-27. <https://doi.org/10.14409/favecv.v13i1/2.4972>
- Nimalaratne, C., Wu, J., & Schieber, A. (2013). Egg Yolk Carotenoids: Composition, Analysis, and Effects of Processing on Their Stability. En *ACS Symposium Series* (Vol. 1134, pp. 219-225). <https://doi.org/10.1021/bk-2013-1134.ch018>
- Otálora-Orrego, D., & Martin, D. (2021). Técnicas emergentes de extracción de β -caroteno para la valorización de subproductos agroindustriales de la zanahoria (*Daucus carota* L.): Una revisión. *Informador Técnico*, 85(1), 20-43. <https://doi.org/10.23850/22565035.2857>
- Erdohan, Z. Ö., Çam, B., & Turhan, K. N. (2013). Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 308-315. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.043>
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002). Stability of Virgin Olive Oil. 1. Autoxidation Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 716-721. <https://doi.org/10.1021/jf0108462>
- Radusin, T., Torres-Giner, S., Stupar, A., Ristić, I., Miletić, A., Novaković, A., & Lagaron, J. M. (2019). Preparation, characterization and antimicrobial properties of electrospun polylactide films containing *Allium ursinum* L. extract. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100357. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100357>
- Rasal, R. M., Janorkar, A. V., & Hirt, D. E. (2010). Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*, 35(3), 338-356. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003>

- Rawdkuen, S., Faseha, A., Benjakul, S., & Kaewprachu, P. (2020). Application of anthocyanin as a color indicator in gelatin films. *Food Bioscience*, 36, 100603. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100603>
- Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles*. BOE núm. 44, Presidencia del Gobierno, Madrid, España, 21 de febrero de 1983.
- Rodil, A., Laca, A., Paredes, B., Rendueles, M., Meana, Á., & Díaz, M. (2016). Gels prepared from egg yolk and its fractions for tissue engineering. *Biotechnology Progress*, 32(6), 1577-1583. <https://doi.org/10.1002/btpr.2364>
- Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Schieber, A., & Weber, F. (2016). 5. Carotenoids. En R. Carle & R. M. Schweiggert, R. (Eds.), *Handbook on natural pigments in food and beverages: Industrial applications for improving food color* (pp. 101-123). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00005-1>
- Schlatterer, J., & Breithaupt, D. E. (2006). Xanthophylls in Commercial Egg Yolks: Quantification and Identification by HPLC and LC-(APCI)MS Using a C30 Phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2267-2273. <https://doi.org/10.1021/jf053204d>
- Shen, Z., & Kamdem, D. P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.046>
- Stahl, W., & Sies, H. (1993). Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 691(1), 10-19. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb26153.x>
- Stoll, L., da Silva, A. M., Iahnke, A., Costa, T., Flôres, S., & Rios, A. (2017). Active biodegradable film with encapsulated anthocyanins: Effect on the quality attributes of extra-virgin olive oil during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6), e13218. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13218>
- Stoll, L., Rech, R., Flôres, S. H., Nachtigall, S. M. B., & de Oliveira Rios, A. (2019). Poly(acid lactic) films with carotenoids extracts: Release study and effect on sunflower oil preservation. *Food Chemistry*, 281, 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.100>
- Stoll, L., Rech, R., Flôres, S. H., Nachtigall, S. M. B., & Rios, A. de O. (2018). Carotenoids extracts as natural colorants in poly(lactic acid) films. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(33), 46585. <https://doi.org/10.1002/app.46585>

- Su, L., Zou, J., Dong, S., Hao, N., & Xu, H. (2017). Influence of different β -nucleation agents on poly(l-lactic acid): Structure, morphology, and dynamic mechanical behavior. *RSC Advances*, 7(87), 55364-55370. <https://doi.org/10.1039/C7RA10550A>
- Tao, N., Yumei, G., YueJin, L., & Fei, G. (2010). Carotenoids from the peel of Shatian pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its antimicrobial activity. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 7(1), 110-115.
- Tsiaka, T., Lantzouraki, D. Z., Siapi, E., Sinanoglou, V. J., Heropoulos, G. A., Calokerinos, A. C., & Zoumpoulakis, P. (2018). Macular carotenoids in lipid food matrices: DOE-based high energy extraction of egg yolk xanthophylls and quantification through a validated APCI(+) LC-MS/MS method. *Journal of Chromatography B*, 1096, 160-171. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.08.010>
- Valverde, D., Laca, A., Estrada, L. N., Paredes, B., Rendueles, M., & Díaz, M. (2016). Egg yolk and egg yolk fractions as key ingredient for the development of a new type of gels. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 3, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2016.02.001>
- Viljanen, K., Sundberg, S., Ohshima, T., & Heinonen, M. (2002). Carotenoids as antioxidants to prevent photooxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(6), 353-359. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200206\)104:6<353::AID-EJLT353>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200206)104:6<353::AID-EJLT353>3.0.CO;2-5)
- Weng, S., López, A., Sáez-Orviz, S., Marcet, I., García, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2021). Effectiveness of bacteriophages incorporated in gelatine films against *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 121, 107666. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107666>
- Wrolstad, R. E., & Culver, C. A. (2012). Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 59-77. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101118>
- Zaheer, K. (2017). Hen egg carotenoids (lutein and zeaxanthin) and nutritional impacts on human health: A review. *CyTA - Journal of Food*, 15(3), 474-487. <https://doi.org/10.1080/19476337.2016.1266033>
- Zia-Ul-Haq, M., Dewanjee, S., & Riaz, M. (Eds.). (2021). *Carotenoids: Structure and Function in the Human Body*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2>