



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

FoodUPV
INSTITUTO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos
(FoodUPV)

Migración de hidroximetilfurfural (HMF) en films
biodegradables con extractos activos obtenidos por
extracción en agua subcrítica.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: Serrano Huesca, Esperanza

Tutor/a: Chiralt Boix, M^a Amparo

Cotutor/a: Vieira de Freitas, Pedro Augusto

Director/a Experimental: Moll Montaner, Eva

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

MIGRACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) EN FILMS BIODEGRADABLES CON EXTRACTOS ACTIVOS OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN EN AGUA SUBCRÍTICA.

Esperanza Serrano Huesca, Eva Moll, Laia Martín-Pérez; Amparo Chiralt.

RESUMEN

La creciente preocupación por la contaminación ambiental causada por los residuos plásticos ha llevado a la búsqueda de alternativas sostenibles como los bioplásticos biodegradables. Polímeros como el PHBV y el PLA destacan como alternativas de envasado por sus propiedades físicas y capacidad de degradación. Investigaciones recientes han estudiado la mezcla de estos biopolímeros con fracciones obtenidas de biomasa (extractos bioactivos de paja de arroz y las pieles de almendra) para obtener films activos. Estos extractos, obtenidos en agua subcrítica son ricos en polifenoles y carbohidratos y poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas, pero la alta temperatura de extracción fomenta la formación de HMF con potencial toxicidad. Este estudio cuantificó la formación de HMF durante la obtención de los extractos a diferentes temperaturas y analizó su migración en diferentes simulantes alimentarios, desde films de PHBV y PLA, obtenidos mediante termoprocesado, con 6 % de los extractos. La formación de HMF en los extractos fue mayor cuanto mayor fue la temperatura de extracción, para ambas matrices vegetales, y su migración desde los films dependió de la naturaleza del simulante. La migración de HMF fue menor en agua e isooctano, pero aumentó significativamente con etanol al 95 %. No obstante, las cantidades de HMF migradas fueron menores que las consideradas tóxicas, por lo que los envases se consideraron seguros.

PALABRAS CLAVE: PLA, PHBV, paja de arroz, piel de almendra, extracción en agua subcrítica, migración.

RESUM

La creixent preocupació per la contaminació ambiental causada pels residus plàstics ha portat a la cerca d'alternatives sostenibles com els bioplàstics biodegradables. Polímers com el PHBV i el PLA destaquen com materials alternatius d'envasament per les seues propietats físiques i capacitat de degradació. Investigacions recents han estudiat la mescla d'aquests biopolímers amb fraccions obtingudes de biomassa, (extractes bioactius de la palla d'arròs i

les pells d'ametla) per obtenir films actius. Estos extractes obtinguts amb aigua subcrítica són rics en polifenols i carbohidrats, però l'alta temperatura d'extracció afavorix la formació de HMF potencialment tòxic. Este estudi va quantificar la formació de HMF durant l'obtenció d'extractes a diferents temperatures i va analitzar la seua migració en diferents simulants alimentaris des de films PHBV i PLA amb 6% d'extractes, obtinguts mitjançant termoprocessat. La formació de HMF en els extractes va ser major com més gran va ser la temperatura d'extracció, per a totes dos matrius vegetals, i la seua migració des dels films va dependre de la naturalesa del simulant. La migració de HMF va ser menor en aigua i isooctà, però va augmentar significativament amb etanol al 95%. No obstant això, les quantitats de HMF migrades van ser menors que les considerades tòxiques, per la qual cosa els materials d'envasat es van considerar segurs.

PARAULES CLAU: PLA, PHBV, palla d'arròs. pell d'ametla, extracció amb aigua subcrítica, migració.

ABSTRACT

The increasing concern about environmental pollution caused by plastic waste has led to the search for sustainable alternatives such as biodegradable bioplastics. Polymers such as PHBV and PLA are prominent as packaging alternatives due to for their physical properties and ability to degrade. Recently the blending of these biopolymers with biomass fractions (bioactive extracts from rice straw and almond peels) to obtain active films. These extracts obtained in subcritical water are rich in polyphenols and carbohydrates and exhibit antioxidant and antimicrobial properties, but the high extraction temperature promotes formation of HMF, potentially toxic. This study quantified the formation of HMF in the extracts at different temperatures and analysed its migration into different food simulants from the PHBV and PLA films containing 6 % of the extracts, obtained by thermoprocessing. HMF formation in the extracts was higher at the highest the extraction temperature, for both plant matrices, and their migration from the films depended on the nature of the simulant. HMF migration was lower in water and isooctane, but significantly increased with 95 % ethanol. However, the amounts of HMF migrated were lower than those considered toxic, so the packaging materials were considered safe.

KEYWORDS: PLA, PHBV, rice straw, almond skin, subcritical water extraction, migration.

1. INTRODUCCIÓN

El envasado de los alimentos es necesario para garantizar la manipulación y distribución seguras de los productos alimenticios elaborados desde el lugar de producción hasta el consumidor (Thulasingh et al., 2022). Los envases alimentarios deben cumplir una serie de condiciones, como las establecidas en la legislación en relación con la seguridad alimentaria, así como otras relacionadas con la funcionalidad. Además, se requiere que sean innovadores, fáciles de usar y con un diseño atractivo. Una de las principales funciones del envasado en la industria alimentaria es proteger el producto del impacto químico, mecánico y microbiológico, manteniendo la frescura del producto y su valor nutricional. Por tanto, el envasado del alimento es una parte integral de la producción, la conservación, el almacenamiento y la distribución de los alimentos. Las propiedades del producto alimenticio sólo se pueden mantener con una selección adecuada del envase y con un proceso de envasado adecuado (Ivonkovic et al., 2017).

Los materiales plásticos de envasado cumplen estos criterios, y los basados en polietileno o copolímeros han sido muy utilizados por la industria alimentaria durante más de 50 años. Sin embargo, la contaminación ambiental causada por el desecho indiscriminado de residuos plásticos se ha convertido en un problema global significativo. Los envases de alimentos hechos de plástico, diseñados para un solo uso, se reciclan muy poco, lo que contribuye a la acumulación de desechos plásticos en el medio ambiente (Pedia, 2023; Segal & Segal, 2022)

Los plásticos convencionales sintéticos derivados del petróleo no son biodegradables y se han acumulan de forma perjudicial en el medio ambiente, debido a una mala gestión de los residuos. La solución a este problema es multidimensional, pero una de las alternativas para un envasado más sostenible es el uso de materiales reciclados y/o biodegradables. El mercado de bioplásticos (polímeros biodegradables o bio-basados o ambas cosas) y reciclados está creciendo en la actualidad en línea con la sensibilización de consumidores y las regulaciones que impulsan la demanda de envases respetuosos con el medio ambiente (Dukalska et al., 2008).

Los bioplásticos son polímeros biodegradables u obtenidos de fuentes renovables o ambas cosas. Los biodegradables son sensibles a la acción enzimática de microorganismos y se degradan en entornos naturales o en compost, incorporándose al ciclo de la materia orgánica. Se dividen en 3 subgrupos, según el proceso de obtención: los obtenidos directamente de biomasa como el almidón, los obtenidos por microorganismos (fermentación) y los sintetizados a partir de monómeros procedentes de biomasa. Entre los obtenidos por fermentación, los polihidroxialcanoatos (PHA), como el poli(3-hidroxiбутirato) (PHB), son poliésteres alifáticos semicristalinos que se

biodegradan rápidamente en instalaciones de compostaje e incluso en el medio ambiente. El PHB es un homopolíéster que muestra propiedades físicas similares a las del polipropileno (PP) y el tereftalato de polietileno (PET). Tiene alta cristalinidad y baja estabilidad térmica, produciendo materiales rígidos y quebradizos, lo que limita su uso en aplicaciones de envasado de alimentos. Sin embargo, el copolímero de 3-hidroxi-butirato (3HB) con 3-hidroxi-valerato (3HV), es decir, poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV), muestra una mayor ductilidad y una cristalinidad reducida, ofreciendo nuevas posibilidades en el envasado de alimentos (Hernández-García et al., 2023). Entre los polímeros sintéticos bio-basados y biodegradables, están los poliláctidos como el ácido poliláctico (PLA), que es uno de los materiales termoplásticos biodegradables más prometedores, a partir del ácido L-láctico (LA) obtenido de la fermentación del almidón de maíz y otras fuentes de polisacáridos. El PLA tiene un potencial significativo para la industria del embalaje porque produce películas rígidas de alta transparencia y se puede procesar utilizando tecnologías de producción fácilmente disponibles (Bonilla et al., 2013).

Las mezclas de biopolímeros con fracciones obtenidas de biomasa se están investigando actualmente porque constituyen una alternativa innovadora para el aprovechamiento de la materia orgánica descartada en diversas actividades, como la producción agroalimentaria. Esta estrategia permite capitalizar los beneficios de los compuestos bioactivos o las fracciones celulósicas presentes en los diferentes residuos orgánicos, contribuyendo al aprovechamiento de los residuos, con la obtención de productos de valor, y favoreciendo la economía circular, con un enfoque más sostenible para el desarrollo de envases. La incorporación de compuestos bioactivos obtenidos de biomasa en los materiales de envasado biodegradables permite la obtención de materiales activos de envasado con beneficios importantes en la prolongación de la vida útil de los alimentos, manteniendo su calidad y seguridad durante más tiempo. Esto contribuye, además, a reducir el desperdicio alimentario. Los envases activos permiten reducir la oxidación, atenuar la maduración o impedir la proliferación bacteriana, lo que facilita la distribución alimentaria y permite llegar a destinos más lejanos para la comercialización. El envase activo libera dosis mínimas de conservantes de manera gradual y controlada, lo que reduce el requerimiento de aditivos en el alimento (Amor, 2023).

Muchos de los residuos agroalimentarios poseen altas cantidades de compuestos bioactivos, muchos de naturaleza fenólica, que pueden utilizarse en el desarrollo de envases activos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Así, pueden permitir la inhibición de la acción de los microorganismos alterantes o patógenos y/o retardar y prevenir la acción de radicales libres en el alimento, actuando contra las reacciones de deterioro oxidativo, alargando la vida útil de los productos envasados.

Uno de los residuos agroalimentarios estudiados para la obtención de envases activos es la paja de arroz, ya que, a nivel mundial, la paja de arroz es el mayor residuo de cultivo (Freitas et al., 2022). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, la producción mundial anual de arroz en 2017 se estimó en 770 millones de toneladas, con China e India juntas representando casi el 50% del mercado mundial y una producción de 2,98 millones de toneladas solo en Europa. Después de la cosecha, la paja de arroz suele trillarse y quemarse, lo que provoca una pérdida de nutrientes valiosos, contribuyendo en gran medida a la contaminación del aire. Se calcula que la cantidad de residuos de cultivos de arroz quemados es de 87 millones de toneladas a nivel mundial y dentro de Europa alrededor de 0,3 millones de toneladas. Por lo tanto, se necesitan nuevas alternativas viables para utilizar este residuo de cultivo. Por ejemplo, se ha demostrado que la paja de arroz es una valiosa fuente de compuestos bioactivos, como el ácido ferúlico, gálico, el ácido cafeico, el pirogalol y muchos flavonoides (Menzel et al., 2020).

Otro de los residuos de interés por las propiedades beneficiosas que podría aportar a los envases biodegradables son las pieles de almendras. Las almendras son un cultivo muy importante en todas las regiones templadas del mundo, con una producción mundial de almendras de 4,6 Mt en 2021, siendo EE.UU. el primer productor con alrededor de 2,0 Mt al año (*International Nuts and Dried Fruits Statistical Yearbook*). Los subproductos del procesamiento representan más del 50% del peso seco de los frutos de almendra, que se han utilizado como alimento para animales o se quemado para la producción de energía. En el pelado industrial de la almendra, se elimina la piel marrón mediante escaldado, generando este subproducto en grandes cantidades, que también se ha utilizado como alimento para animales o quemado como combustible. Sin embargo, la piel de almendra tiene beneficios nutricionales y para la salud debido a su alto contenido de polifenoles y fibra dietética. Estos compuestos pueden ayudar a prevenir la oxidación lipídica, actuando como antioxidantes, el deterioro microbiano, como se ha demostrado en estudios previos (Freitas et al., 2023a).

La obtención de compuestos bioactivos a partir de residuos agroalimentarios exige su extracción de la matriz vegetal por métodos sostenibles y ecológicos. La extracción con solventes orgánicos como el metanol, etanol o acetona es eficaz para la obtención de los compuestos activos, pero tiene grandes problemas para su aplicación industrial debido a la toxicidad de los solventes y la dificultad de su manejo y eliminación. Por el contrario, la extracción acuosa presenta la ventaja de utilizar un disolvente limpio, pero una menor selectividad para extracción de los compuestos activos. La utilización de agua en condiciones subcríticas (alta temperatura y presión, por debajo del punto crítico) permite una extracción más selectiva de los compuestos apolares, dependiendo de la temperatura, debido al cambio en las propiedades del agua (constante dieléctrica, viscosidad, tensión

superficial) en función de la temperatura (More et al., 2022). El uso del agua en condiciones subcríticas tiene numerosas ventajas ya que es escalable, utiliza disolventes no tóxicos, no requiere tratamientos previos y es rápido. En condiciones subcríticas, las propiedades del disolvente acuoso son similares a las de los disolventes orgánicos, pudiendo disolver diferentes componentes de polaridad media y baja. (Freitas et al., 2023b; 2024). En los extractos obtenidos en agua subcrítica de diferentes residuos agroalimentarios, como la paja de arroz o la piel de almendra, se obtienen una alta proporción de fenoles, con capacidad antioxidante y antimicrobiana, pero también son ricos en carbohidratos con diferente nivel de hidrólisis (Munir et al., 2018; Guthrie et al., 2020; Benito-Román et al., 2020), y se forman nuevos compuestos a la alta temperatura de extracción, derivados de la caramelización de azúcares y reacciones de Maillard (Plaza et al. 2010 a, b). Por tanto, a parte de los beneficios que pueden aportar al envase los compuestos activos, hay que controlar la existencia de otros compuestos que puedan afectar a la seguridad del alimento envasado.

El 5-hidroximetilfurfural (HMF) es un compuesto formado en la ruta de las reacciones de pardeamiento no enzimático y, por tanto, se forma en diferentes proporciones durante los procesos de extracción en agua subcrítica de los residuos agroalimentarios con alto contenido en azúcares. De hecho, la cuantificación de este compuesto en alimentos se utiliza como indicador del progreso de estos procesos de pardeamiento. El HMF es de naturaleza tóxica y se encuentra presente en diferentes productos alimenticios. (Anese & Suman, 2013), dependiendo del tipo de procesado. Un aumento en la concentración de HMF en alimentos indica además la degradación de nutrientes esenciales. En cuanto a su estructura molecular (Figura 1), es un aldehído cíclico producido por la degradación del azúcar a través de la reacción de Maillard. En muchos alimentos, como la miel, el HMF se utiliza para controlar la calidad, ya que es un indicador reconocido de pardeamiento no enzimático, y se usa como un índice de los cambios deteriorativos que tienen lugar durante el calentamiento y/o almacenamiento de los alimentos (Kus et al., 2005).

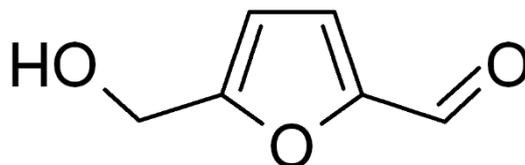


FIGURA 1. Estructura molecular del HMF.

El HMF está casi omnipresente, en diferentes concentraciones, en alimentos de consumo diario procesados térmicamente, desde los cereales del desayuno, panes, productos lácteos o jugos de frutas. Muchos estudios han demostrado sus efectos negativos en la salud humana, como citotoxicidad en las membranas mucosas, la piel y el tracto respiratorio superior, mutagenicidad, aberraciones cromosómicas, y carcinogenicidad en humanos y animales (Shapla et al., 2018). No obstante, estudios más recientes han demostrado que el HMF tiene una amplia gama de efectos positivos, como efectos antioxidantes, antialérgicos, antiinflamatorios, antihipóxicos, antifalciformes, antihiperuricémicos. (Shapla et al., 2018). Estos efectos beneficiosos o perjudiciales dependen de su concentración. Los seres humanos pueden consumir entre 30 y 150 mg de HMF al día a través de varios alimentos, pero los niveles seguros de ingesta no están claramente definidos. Esto se debe a que la eliminación del HMF del cuerpo depende de la función orgánica de cada individuo (Ulbricht et al. 1984). Dependiendo del alimento, la Comisión Estándar del Codex Alimentarius establece un límite máximo de HMF para que pueda considerarse seguro para el consumo.

El presente trabajo tiene por objetivo cuantificar la formación de HMF durante la obtención de extractos activos de la paja de arroz y de las pieles de almendra procedentes del pelado industrial, mediante la extracción en agua subcrítica diferentes temperaturas. Además, se pretende analizar la migración del HMF en diferentes simulantes alimentarios desde films activos de PHBV y PLA con extractos incorporados, obtenidos por mezclado en fundido y moldeo por compresión. De esta forma se pretende conocer el posible potencial tóxico de los materiales activos con estos extractos y garantizar la seguridad alimentaria de los productos envasados. El estudio es de gran importancia ya permitirá dilucidar la adecuación de los materiales para uso alimentario, evaluando su seguridad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Materiales.

Para la preparación de los films se utilizó el Poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), (PHBV) (Enmat Y1000P) con una fracción de hidroxivalerato del 2% molar, suministrado en forma de granza por TianAn Biologic Material (Ningbo, China). También se utilizó Ácido poliláctico (PLA) amorfo 4060D (peso molecular promedio de 106.226 D y densidad de 1,24 g/cm³), suministrado por Natureworks (U.S.A).

La paja de arroz (var. J. Sendra) fue suministrada por el Banco de Paja (GVA) procedente del arrozal de L'Albufera. La piel de almendras (*Prunus dulcis*, Nonpareil var. de California) procedente del proceso industrial de pelado de la almendra fue suministrada por Importaco S.A (Valencia, España).

Los disolventes utilizados para la formulación de los simulantes alimentarios fueron: etanol de grado UV (99,9% de pureza) e iso-octano (99,9% de pureza) obtenidos de Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania). El ácido acético glacial (99,9% de pureza) fue obtenido de PanReac Química SLU (Castellar del Vallés, Barcelona, España).

Para el análisis cromatográfico del HMF se utilizó acetonitrilo suministrado por T. Baker (Deventer, Netherlands) y agua Milli-Q fue preparada en un equipo Millipore (USA). El patrón de 5-(Hydroxymethyl) furfural con 99% de pureza fue comprado en Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA).

2.2. Obtención del extracto.

La preparación de los extractos se llevó a cabo por el procedimiento previamente descrito para la paja de arroz (Freitas et al. 2023a) y la piel de almendra (Freitas et al. 2023b). Ambas, la paja de arroz y la piel de almendras se lavaron con agua corriente, se secaron en estufa a 40 °C y, finalmente, se molieron y tamizaron a un tamaño de partícula inferior de 600 µm. Se almacenan hasta su uso en frascos de vidrio herméticos, para evitar su hidratación a 20 °C. Las muestras en polvo se sometieron a extracción con agua subcrítica en un Reactor de Presión (Modelo 1-T-A-P-CE, 5 L de capacidad, Amar Equipment PVT. LTD, Mumbai, India), con una proporción de sólidos-agua de 1:10 para la paja de arroz y 1:6 para la piel de almendra (previamente desengrasada con éter de petróleo (40-60 °C p.e.). Se utilizaron dos temperaturas de extracción en ambos casos: 160 °C (a 7.1 bar) y 180 °C (11 bar), con una agitación de 150 rpm, durante 30 minutos. La fase acuosa con los sólidos extraídos se separó del residuo sólido por filtración a vacío (Filterlab, Barcelona, España, tamaño de poro < 0,5 mm) y se liofilizó a -60 °C, 0,8 mbar durante 72 h, para obtener el extracto sólido, que se utilizó para la elaboración de los films. Los extractos obtenidos se denominaron RS-160, RS-180 para la paja de arroz y AS-160 y AS-180, para la piel de almendra.

2.3. Elaboración de los films.

Los extractos obtenidos se incorporaron al 6% en peso en dos poliésteres biodegradables para la obtención de films activos para el envasado de alimentos. Por un lado, los de piel de almendra (AS-160 y AS-180) se incorporaron en PLA y, por otro lado, los de paja de arroz (RS-160 y RS-180) se incorporaron en PHBV. La incorporación se realizó mediante mezclado en fundido en un mezclador interno (Haake PolyLab QC, Thermo Fisher Scientific, Alemania) a 50 rpm y 160 °C para el PLA o 170 °C para el PHBV, con un tiempo de mezclado de 7 y 5 minutos, respectivamente. Las mezclas resultantes se molieron en frío (con

nitrógeno líquido) en un molino IKA M20 (Staufen, Alemania) en 3 ciclos 90 segundos cada uno. El polvo obtenido se mantuvo en un desecador con P_2O_5 a temperatura ambiente hasta su uso para la formación de los films por termocompresión, utilizando una prensa hidráulica de placas calientes (Modelo LP20, Labtech Engineering, Tailandia). Para los films de PLA se utilizaron 3 g por film y para los PHBV 3,5 g por film. El polvo se colocó sobre lámina de teflón en la prensa y se sometió a una etapa de precalentamiento (1 min a 160 °C para el PLA y 5 min a 175 °C para el PHBV), seguida de la termocompresión (3 min a 160 °C y 100 bar para el PLA y 4 min a 175 °C y 100 bar para el PHBV) y, finalmente, el enfriamiento a 70 °C durante 3 min.

2.4. Ensayos de migración del HMF en simulantes alimentarios

Los ensayos de migración de HMF se realizaron en diferentes simulantes alimentarios, según la norma UNE EN 1186-1 para migración de sustancias de materiales plásticos en contacto con alimentos. La realización de ensayos supuso la inmersión total de las muestras de films en cada simulante con una relación superficie-volumen de 1 dm² del área del film por 100 ml del simulante alimentario. El contacto film-simulante se llevó a cabo durante 10 días a 40 °C, tal como establece la Norma UNE EN 1186-1, excepto para el iso-octano en que la norma establece 2 días a 20 °C. Los simulantes utilizados fueron: A: agua destilada, B: ácido acético 3% (m/V) y C: etanol 10% (V/V) para emular los alimentos acuosos, y etanol 95% (V/V) e iso-octano para simular los alimentos grasos. El ensayo se realizó por triplicado para cada film y simulante.

Transcurrido este tiempo, se procedió a la separación del film de la fase líquida que se filtró con un tamaño de poro de 0.45 µm para el análisis cromatográfico HPLC del HMF (dos alícuotas por muestra).

2.5. Análisis de HMF en los extractos y cantidad liberada en los simulantes.

Se cuantificó el contenido en HMF de los extractos obtenidos, así como la cantidad liberada de los films correspondientes en los diferentes simulantes. Para la cuantificación de los extractos sólidos, se preparó una disolución acuosa de los mismos con 100 mg de extracto en 5 ml de agua destilada, que se diluyó a partir de una alícuota de 50 mL en 550 mL de solvente, para ajustar la respuesta del detector a la curva de calibrado. Esta se obtuvo con disoluciones de concentración conocida de HMF patrón. La cuantificación se llevó a cabo en un equipo HPLC-UV (Agilent Compact 1200) equipado con una columna Kinetex XB-C18 de dimensiones 4,6 x 150 mm, con tamaño de partícula de 3,5 µm, (Agilent Technologies, USA). La temperatura de la columna fue de 35 °C. Se utilizó un

detector UV a 285 nm y un software para procesar los datos (ChemStation, Agilent Technologies, Alemania). Se utilizó una disolución agua:acetonitrilo (80:20) para la fase móvil, en modo isocrático, con un flujo de 1.0 mL/min.

2.6. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando Statgraphics Centurion XVIII. Se utilizó la diferencia mínima significativa de Fisher con un nivel de confianza del 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Contenido de HMF en los extractos.

En estudios previos sobre la extracción de compuestos bioactivos de la paja de arroz y la piel de almendras se ha observado que la eficiencia de la extracción de compuestos fenólicos con agua subcrítica aumenta con la temperatura (Tabla 1). En concreto, a 180 °C se logra una mayor extracción de estos compuestos, pero también afecta a la formación de HMF, tal como han observado otros autores para diferentes disoluciones modelo (Plaza et al., 2010a, b). Este se forma a temperaturas superiores a 150 °C, debido a la termo-oxidación o reacciones de Maillard que ocurren a altas temperaturas. La formación de HMF a estas temperaturas se atribuye a la descomposición de azúcares monoméricos, derivados de la hidrólisis de polisacáridos como las hemicelulosas, promovida por la extracción con agua subcrítica.

TABLA 1. Rendimiento de los extractos (g de extracto seco/100 g residuo) de paja de arroz y piel de almendra y su contenido (g /100 g de extracto seco) en lignina, proteínas y fenoles totales (Acido gálico equivalente: GAE). Datos de Ivars, 2023 y Freitas et al., 2023 a, b.

Extracto	T(°C)	Rendimiento	Lignina	Proteína	Fenoles (GAE)
Paja de arroz	160	23	22,9±0,7	10,0±2,0	5,1 ± 0,2
	180	23	23,3±0,1	9,1±0,1	8,3 ± 0,3
Piel de almendra	160	29	-	13,6 ± 0,4	10,1 ± 0,1
	180	21	-	24,1 ± 0,3	16,1 ± 0,4

Además del rendimiento de las extracciones con agua subcrítica, la tabla 1 también detalla las concentraciones de lignina, proteína y fenoles totales presentes en los diferentes extractos obtenidos en estudios previos (Ivars, 2023;

Freitas et al., 2023a). Todos los extractos presentan también alta proporción de azúcares resultantes de la hidrólisis de la hemicelulosa y otros polisacáridos (Freitas et al, 2024). Estos componentes, azúcares y proteína son responsables de la formación de HMF a través de las reacciones de Maillard y caramelización.

Se debe destacar que, tanto los extractos obtenidos de la piel de almendra como en la paja de arroz, presentaron una alta actividad antioxidante y antibacteriana atribuible a la abundancia de compuestos fenólicos (Freitas et al, 2023 a,b). Estos compuestos permiten la inhibición de la oxidación lipídica y el control del crecimiento bacteriano, prolongando así la vida útil de los productos alimentarios. Por esta razón, estos materiales tienen un alto potencial para ser utilizados como antioxidantes naturales en la industria alimentaria, así como para la obtención de materiales activos para el envasado de alimentos, al incorporarlos en polímeros biodegradables.

En el presente estudio se cuantificó la concentración de HMF en cada uno de los extractos (AS y RS) obtenidos a 160 y 180 °C y los resultados se dan en la Tabla 2. Puede observarse que tanto la temperatura de extracción como y el tipo de materia prima afectaron al contenido de HMF formado. A medida que aumentó la temperatura, se formó una mayor cantidad de HMF debido al mayor progreso de las reacciones de Maillard y los procesos de caramelización de los azúcares presentes, tal como han observado otros autores con disoluciones modelo de azúcares y aminoácidos (Plaza et al., 2010a, b). Además, se observa que la piel de almendra da lugar a una mayor cantidad de HMF, probablemente debido a la mayor concentración de proteína y azúcares libres en el extracto.

TABLA 2. Contenido de HMF (g/100 g de extracto seco) en los extractos obtenidos con agua en condiciones subcríticas, de la paja de arroz (RS) y piel de almendra (AS) a 160 y 180 °C

Extracto	160 °C	180 °C
RS	0,058±0,007	0,171±0,007
AS	0,168±0,001	0,394±0,014

De manera similar a la formación de HMF durante el tratamiento térmico de la extracción, esta sustancia también se forma en otros productos alimentarios, sobre todo cuando han sido sometidos a tratamiento térmico y tienen alto contenido en azúcares. En la Tabla 3 se dan, a modo de ejemplo, los contenidos encontrados en algunos alimentos comunes, destacando el amplio intervalo de valores y permitiendo la comparación entre productos. Los valores reflejan que, además de la miel donde su formación está relacionada con la calidad, una serie

de productos alimenticios ricos en frutas y/o azúcares, contienen cantidades considerables de HMF.

TABLA 3. Contenido de HMF (mg/kg) en algunos productos alimentarios.

Producto	HMF	Fuente
Copos de maíz con miel y cacahuetes	8,3	(Mańkowska et al., 2017)
Cereales con chocolate negro	66,9	(Mańkowska et al., 2017)
Copos fitness con yogurt	22,0	(Mańkowska et al., 2017)
Café soluble	2480	(Arribas-Lorenzo & Morales, 2010)
Café mezcla (natural y torrefacto)	1734	(Arribas-Lorenzo & Morales, 2010)
Zumo de uva procesado	158	(Kus et al., 2005)
Zumo de granada procesado	3500	(Kus et al., 2005)
Miel	20-929	(Jalili & Ansari, 2015)
Tortas de frutas	172	(Jalili & Ansari, 2015)
Mermeladas	49-246	(Jalili & Ansari, 2015)
Ketchup	33-79	(Jalili & Ansari, 2015)
Fruta en conserva	16-44	(Jalili & Ansari, 2025)

3.2. Migración de HMF desde films de PLA y PHBV

Las Tablas 4 y 5 muestran los resultados obtenidos en los ensayos de migración en los distintos simulantes alimentarios para el HMF, desde los films de PHBV con extractos de la paja de arroz (RSE160 y RSE180) y desde los films de PLA con extractos de la piel de almendra desengrasada (ASE160 y ASE180), cuyos contenidos en HMF se dan en la Tabla 2. En las Tablas 4 y 5 se dan los valores de HMF migrados desde el film en las unidades habituales de los ensayos de migración (mg/dm² de film en contacto con el simulante), el porcentaje migrado de HMF respecto al contenido teórico en el film (% de HMF liberado) y la cantidad migrada estimada para 1 kg de producto (con densidad de 1 kg/dm³) envasado en un envase cúbico de 1 dm de lado. Este valor se obtiene multiplicando por 6 (6 caras del cubo) los valores de HMF migrado en mg/dm² de film. Para la estimación del porcentaje de HMF liberado, se determinó el contenido total en el film procedente del extracto incorporado a partir de la

fracción másica del extracto en el film (0,06) y la respectiva fracción másica de HFM en cada extracto (valores de la tabla 2 divididos por 100).

Para un mismo simulante, las cantidades migradas desde los films de PLA con extractos de piel de almendra fueron mayores que en los films de PHBV con extractos de paja de arroz. Así mismo, se observó una mayor migración de los films con los extractos obtenidos a 180 °C que con los obtenidos a 160 °C. Esto es coherente con el diferente contenido de HMF incorporado a los films con los extractos. A mayor contenido de HMF presente en el film, mayor fue la migración. Por otro lado, la migración fue muy dependiente del tipo de simulante. El simulante agua (que emula a los alimentos con alta humedad y escaso contenido en grasa), la migración fue mucho menor que en el simulante ácido y en los simulantes con etanol (que emulan alimentos ácidos y con cierto contenido en grasa, respectivamente). Específicamente, en el simulante con 95 % de etanol, que emula a alimentos con alto contenido graso, los valores de migración de HMF fueron mucho mayores que en el resto. En el isooctano, simulante de alimentos grasos, no se produjo migración cuantitativa de HMF en prácticamente ningún caso.

Las cantidades migradas de HMF desde los films de PHBV en los diferentes simulantes fueron coherentes con la migración total de los films y la migración de compuestos fenólicos, determinadas en un estudio previo (Merino, 2023). La interacción del film polimérico con el simulante, con el respectivo hinchamiento y relajación de la matriz, determina en gran medida la liberación de los compuestos no poliméricos de la matriz. Al tratarse de polímeros hidrofóbicos, en contacto con agua, la relajación de la matriz polimérica fue muy escasa y los compuestos no poliméricos no difunden al medio líquido en cantidad notable. Sin embargo, al aumentar el contenido en etanol en el simulante, este penetra en el film, provocando el hinchamiento y relajación de la matriz y facilitando la difusión y liberación de las moléculas atrapadas en la misma. Algunos autores (Jamshidian et al., 2012, a, b) incluso reportan degradación parcial de los poliésteres biodegradables, como el PLA y PHBV, potenciando esto la liberación de los compuestos de la matriz en el medio líquido de contacto.

TABLA 4. Resultados de la migración de HMF desde films de PHBV y extractos de paja de arroz obtenidos a 160 °C (RSE160) y 180 °C (RSE180).

Film	HMF migrado (mg/dm ²)		% HMF Liberado		HMF migrado (mg/kg) (asumiendo envase cúbico de 1 dm de lado)	
	RSE160	RSE180	RSE160	RSE180	RSE160	RSE180
Agua	0,0017	0,008	12	17	0,0103	0,047
	±0,0001 ^{d,2}	±0,002 ^{d,1}	±1 ^{d,2}	±4 ^{c,1}	±0,0004 ^{d,2}	±0,012 ^{d,1}
Ac. acét.3%	0,0123	0,056	82	127	0,074	0,334
	±0,0110 ^{c,2}	±0,003 ^{b,1}	±8 ^{c,2}	±13 ^{a,1}	±0,006 ^{c,2}	±0,016 ^{b,1}
Etanol 10%	0,0151	0,043	94	91	0,090	0,256
	±0,0014 ^{b,2}	±0,003 ^{c,1}	±9 ^{b,1}	±11 ^{b,1}	±0,008 ^{b,2}	±0,017 ^{c,1}
Etanol 95%	0,0178	0,061	119	150	0,107	0,360
	±0,0018 ^{a,2}	±0,008 ^{a,1}	±6 ^{,1}	±40 ^{,1}	±0,011 ^{a,2}	±0,040 ^{a,1}
Isoctano	n.d.	0,0001	n.d.	0,4	n.d.	0,0009
		±0,0000 ^e		±0,1 ^c		±0,0002 ^e

Distintas letras (a,b,c) indican diferencias significativas entre simulantes para la misma formulación, mientras que números distintos (1,2,3) indican diferencias entre formulaciones, para un mismo simulante.

TABLA 5. Resultados de la migración de HMF desde films de PLA y extractos de piel de almendra obtenidos a 160 (ASE160) y 180 (ASE180) °C.

Film	HMF migrado (mg/dm ²)		% HMF liberado		HMF migrado (mg/kg) (asumiendo envase cubico de 1 dm de lado)	
	ASE160	ASE180	ASE160	ASE180	ASE160	ASE180
Agua	0,0053	0,023	48	97,7	0,032	0,141
	±0,0013 ^{d,2}	±0,001 ^{d,1}	±18 ^{d,2}	±0,6 ^{c,1}	±0,008 ^{d,2}	±0,001 ^{d,1}
Ac. acét. 3%	0,0184	0,026	150	74,0	0,110	0,154
	±0,0017 ^{b,2}	±0,001 ^{c,1}	±30 ^{b,1}	±2,0 ^{d,2}	±0,010 ^{b,2}	±0,009 ^{c,1}

	HMF migrado (mg/dm ²)		% HMF liberado		HMF migrado (mg/kg) (asumiendo envase cubico de 1 dm de lado)	
Etanol 10%	0,0156 ±0,0019 ^{c,2}	0,0350 ±0,0070 ^{b,1}	115 ±14 ^{c,1}	102 ±10 ^{b,2}	0,094 ±0,009 ^{c,2}	0,211 ±0,030 ^{b,1}
Etanol 95%	0,0580 ±0,0060 ^{a,2}	0,079 ±0,004 ^{a,1}	547 ±50 ^{a,1}	326 ±40 ^{a,2}	0,350 ±0,040 ^{a,2}	0,474 ±0,002 ^{a,1}
Isoctano	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Distintas letras (a,b,c) indican diferencias significativas entre simulantes para la misma formulación, mientras que números distintos (1,2,3) indican diferencias entre formulaciones, para un mismo simulante.

Además del contenido de HMF incorporado al film con el extracto, se puede formar una cantidad adicional de HMF durante el termoprocesado del film con el extracto, tanto en la etapa de mezclado en fundido con el polímero, como en la etapa de termocompresión para la formación del film. Esto se refleja en los valores del porcentaje de HMF liberado (respecto al incorporado en el film) que se dan en las tablas 4 y 5 para las diferentes muestras. La cantidad adicional de HMF formado durante el termoprocesado no es detectable en los simulantes donde la liberación es baja, como el simulante acuoso. Sin embargo, se detecta especialmente en el simulante con 95 % de etanol, con valores de liberación superiores al 100 % del inicialmente incorporado. En este simulante, los porcentajes de liberación de HMF fueron superiores a 100 para todas las muestras, llegando a valores mayores del 500 % en los films de PLA con el extracto de piel de almendra obtenido a 160 °C. Esto indica, por tanto, una gran formación de HMF durante el termoprocesado de los films, que fue mayor para las muestras con extracto de piel de almendra obtenido a 160 °C (ASE160), pero también muy notable para los films de PLA con el extracto obtenido a 180 °C. Para los films de PLA, se obtuvieron también valores de liberación de HMF superiores al 100 % en los simulantes ácido y con 10 % de etanol, siendo siempre mayores para los films con el extracto obtenido a 160 °C. En los films de PHBV con extractos de paja de arroz, los porcentajes de HFM liberados no superaron el 150 % y el valor máximo fue para los films con el extracto de la paja obtenido a 180 °C. Con este extracto, se obtuvieron también valores de 127 % con el simulante ácido donde la liberación de HMF fue también muy alta. Estos resultados indican que hay una formación notable de HMF durante el termoprocesado de los films,

especialmente con los extractos de piel de almendra. Cabe destacar que, mientras esta formación fue mayor en los extractos obtenidos a 160 °C para la piel de almendra, ocurre lo contrario para los obtenidos de paja de arroz donde se aprecia una mayor formación de HMF en los films con extractos obtenidos a 180 °C. La diferente composición de los extractos en cuanto a contenido en azúcares y proteínas puede justificar este comportamiento.

Finalmente, es de interés en términos de la seguridad alimentaria de los materiales de envase analizados, la comparación de las cantidades migradas de HMF por kg de producto envasado, dependiendo del tipo de alimento (o simulante). El mayor valor obtenido para los films con extractos de paja de arroz fue de $0,36 \pm 0,004$ mg/kg para el simulante etanol al 95 %, similar al $0,334 \pm 0,016$ mg/kg obtenido en el simulante ácido, ambos para los films con extracto obtenido a 180 °C. No obstante, estos valores están por muy debajo de los encontrados en muchos alimentos de gran consumo (Tabla 1). Para los films de PLA con extractos de piel de almendra el valor máximo fue de 0.474 ± 0.002 , obtenido en el simulante etanol al 95 % para los films con extractos obtenidos a 180 °C. Este valor fue del mismo orden que los anteriores y mucho menor que los niveles encontrados en alimentos de gran consumo.

Por tanto, desde el punto de vista del contenido en HMF potencialmente migrado en los alimentos, se puede concluir que los films de PLA o PHBV con extractos activos obtenidos en agua subcrítica a 160 °C y 180 °C son seguros. Esto, a pesar de que se forma una cantidad notable de HMF durante la extracción y posteriormente durante el termoprocesado de los films. Solo en alimentos con alto contenido graso (simulados por el etanol al 95 %) podría esperarse una migración más notable de HMF, pero con niveles muy bajos comparados con los presentes en algunos alimentos. El simulante de la grasa (isooctano) no liberó cantidades apreciables de HMF de los films.

Por otro lado, dentro de la Unión Europea, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés), es el órgano responsable de establecer los principios generales de seguridad alimentaria para los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos, conforme al Reglamento (CE) nº 1935/2004. Por lo tanto, antes de que cualquier sustancia se utilice en la fabricación de estos materiales, debe ser evaluada por la EFSA para asegurar que no ponga en riesgo la salud humana.

4. CONCLUSIONES

La temperatura de extracción y el sustrato vegetal afectaron en gran medida a la formación de HMF en los extractos obtenidos por SWE. La piel de almendra desengrasada dio lugar a mayor formación de HMF que la paja de arroz durante

la extracción en agua subcrítica a 160 y 180 °C. A mayor temperatura de extracción, se formó una mayor cantidad de HMF en ambos tipos de extractos. En consecuencia, los films de PLA con extracto de piel de almendra liberaron mayor cantidad de HMF durante los ensayos de migración que los de PHBV con extractos de la paja de arroz, y esta liberación siempre fue mayor cuando los extractos fueron obtenidos a mayor temperatura de extracción.

La migración de HMF de los films estuvo muy afectada por el tipo de simulante. La menor migración se produjo en agua e isooctano, siendo prácticamente indetectable en este último. La migración aumentó considerablemente cuando aumentó el porcentaje de etanol en el simulante, siendo las cantidades migradas muy superiores en etanol al 95 % en todos los casos.

Los valores de porcentaje de HMF migrados respecto a la cantidad incorporada en los films fueron superiores al 100 % en todos los casos con el simulante etanol al 95%. Esto refleja la formación de HMF durante el termoprocesado de los films, adicional al incorporado con el extracto. Esta formación fue mayor en los films con extractos de piel de almendra, sobre todo, con el obtenido a 160 °C. En los films con extracto de paja, se formó una menor cantidad de HMF, que fue superior para el extracto obtenido a 180 °C.

Sin embargo, las cantidades máximas migradas por kg de producto, que se obtienen para el simulante etanol al 95 %, fueron muy inferiores a los valores encontrados en alimentos de alto consumo. Por tanto, desde el punto de vista de la migración de HMF, los materiales de envase biodegradables y activos estudiados pueden considerarse seguros.

5. REFERENCIAS.

- Amor, C. 2023, 30 noviembre. Envases activos: Tipos, beneficios y aplicaciones. Knauf Industries. <<https://knauf-industries.es/envases-activos-tipos-beneficios-y-aplicaciones/>> [Consulta: 7 agost 2024]
- Anese, M., & Suman, M. 2013. Mitigation strategies of furan and 5-hydroxymethylfurfural in food. *Food Research International*, 51(1), 257–264. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.12.024
- Arribas-Lorenzo, G., & Morales, F. J. 2010. Estimation of dietary intake of 5-hydroxymethylfurfural and related substances from coffee to Spanish population. *Food And Chemical Toxicology*, 48(2), 644-649. DOI: 10.1016/j.fct.2009.11.046
- Benito-Román, Ó., Blanco, B., Sanz, M. T., & Beltrán, S. 2020b. Subcritical Water Extraction of Phenolic Compounds from Onion Skin Wastes (*Allium cepa* cv. Horcal): Effect of Temperature and Solvent Properties. *Antioxidants*, 9(12), 1233. DOI: 10.3390/antiox9121233.
- Bonilla, J., Fortunati, E., Vargas, M., Chiralt, A., & Kenny, J. M. 2013. Effects of chitosan on the physicochemical and antimicrobial properties of PLA films. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 236–243. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.05.026
- Dukalska, L., Muizniece-Brasava, S., Kampuse, S., Seglina, D., Straumite, E., Galoburda, R., &

- Levkane, V. (2008). Studies of Biodegradable Polymer Material Suitability for Food Packaging Applications. 64–68. <<http://www.hycail.com/pages/engels/nieuwsen.html>>
- Freitas, P. A., Gil, N. J. B., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2022). Antioxidant poly (lactic acid) films with rice straw extract for food packaging applications. *Food Packaging And Shelf Life*, 34, 101003. DOI: 10.1016/j.fpsl.2022.101003
- Freitas, P. A. V., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2023a). Active Poly (Lactic Acid) Films with Rice Straw Aqueous Extracts for Meat Preservation Purposes. *Food And Bioprocess Technology*, 16(11), 2635-2650. DOI: 10.1007/s11947-023-03081-6
- Freitas, P. A. V., Martín-Pérez, L., Gil-Guillén, I., González-Martínez, C., & Chiralt, A. (2023b). Subcritical Water Extraction for Valorisation of Almond Skin from Almond Industrial Processing. *Foods*, 12(20). DOI: 10.3390/foods12203759
- Freitas, P. A. V., Meyer, S., Hernández-García, E., Rebaque, D., Vilaplana, F., & Chiralt, A. (2024). Antioxidant and antimicrobial extracts from grape stalks obtained with subcritical water. Potential use in active food packaging development. *Food Chemistry*, 451(April). DOI: 10.1016/j.foodchem.2024.139526
- Guthrie, F., Wang, Y., Neeve, N., Quek, S. Y., Mohammadi, K., & Baroutian, S. (2020). Recovery of phenolic antioxidants from green kiwifruit peel using subcritical water extraction. *Food And Bioproducts Processing*, 122, 136-144. DOI: 10.1016/j.fbp.2020.05.002
- Hernández-García, E., Chiralt, A., Vargas, M., & Torres-Giner, S. (2023). Lid Films of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Microfibrillated Cellulose Composites for Fatty Food Preservation. *Foods*, 12(2). DOI: 10.3390/foods12020375
- Ivars, L. (2023). Aplicación de ultrasonidos y extracción subcrítica para la obtención de extractos acuosos activos de la paja de arroz. Tesis de Master. Universitat Politècnica de València.
- Ivonkovic, A., Zeljko, K., Talic, S., & Lasic, M. (2017). Biodegradable packaging in the food industry. *J. Food Saf. Food Qual*, 68(2), 26-38. DOI: 10.2376/0003-925X-68-26
- Jalili, M., & Ansari, F. (2015). Identification and quantification of 5-hydroxymethylfurfural in food products. *Nutrition and Food Sciences Research*, 1, 47-53
- Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Akhtar, M. J., Cleymand, F., & Desobry, S. (2012a). Structural, mechanical and barrier properties of active PLA–antioxidant films. *Journal Of Food Engineering*, 110(3), 380-389. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2011.12.034
- Jamshidian, M., Tehrany, E. A., & Desobry, S. (2012b). Release of synthetic phenolic antioxidants from extruded poly lactic acid (PLA) film. *Food Control*, 28(2), 445-455. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.05.005
- Kus, S., Gogus, F., & Eren, S. (2005). Hydroxymethyl furfural content of concentrated food products. *International Journal of Food Properties*, 8(2), 367–375. DOI: 10.1081/JFP-200060257
- Mańkowska, D., Majak, I., Bartos, A., Słowianek, M., Łacka, A., & Leszczyńska, J. (2017). 5-hydroxymethylfurfural content in selected gluten- and gluten-free cereal food products. *Biotechnology and Food Science*, 81(1), 11–21. DOI: 10.34658/bfs.2017.81.1.11-21
- Menzel, C., González-Martínez, C., Vilaplana, F., Diretto, G., & Chiralt, A. (2020). Incorporation of natural antioxidants from rice straw into renewable starch films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 976–986. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.222
- Merino, T. (2023). Migración global y específica en films activos de PHBV con ácidos fenólicos y extractos activos de la paja de arroz. Tesis de Master. Universitat Politècnica de València

- More, P. R., Jambrak, A. R., & Arya, S. S. (2022). Green, environment-friendly and sustainable techniques for extraction of food bioactive compounds and waste valorization. *Trends In Food Science & Technology*, 128, 296-315. DOI: 10.1016/j.tifs.2022.08.016
- Munir, M., Kheirkhah, H., Baroutian, S., Quek, S. Y., & Young, B. R. (2018). Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion skin. *Journal Of Cleaner Production*, 183, 487-494. DOI: 10.1016/j.jclepro.2018.02.166
- Official Journal of the European Union and European Food Safety Authority; "Commission Regulation (EC) No 1935/2004 of 27 October 2004 on Materials and Articles Intended to Come into Contact with Food", October 2004, Brussels, Belgium. Dirección URL: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R1935>> [Consulta: 19 de agosto de 2024]
- Pedia, I. (2023, 18 noviembre). Fabricación de Plástico: Un enfoque en la industria y los desafíos medioambientales. *ingenieriapedia.com*. <<https://ingenieriapedia.com/fabricacion-de-plastico/>>
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010a). Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, 43(10), 2341–2348. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.07.036
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2010b). Neof ormation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions. *Food Research International*, 43, 1123–1129. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.02.005
- Segal, & Segal. (2022, 5 julio). PLÁSTICO ALIMENTARIO: El envase seguro - SEGAL Food Safety. SEGAL Food Safety -. <<https://segalfoods.com/blog/plastico-alimentario/>>
- Shapla, U. M., Solayman, M., Alam, N., Khalil, M. I., & Gan, S. H. (2018). 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1–18. DOI: 10.1186/s13065-018-0408-3
- Thulasingh, A., Kumar, K., Yamunadevi, B., Poojitha, N., SuhailMadharHanif, S., & Kannaiyan, S. (2022). Biodegradable packaging materials. *Polymer Bulletin*, 79(7), 4467–4496. DOI: 10.1007/s00289-021-03767-x
- Ulbricht, R. J., Northup, S. J., & Thomas, J. A. (1984). A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental And Applied Toxicology*, 4(5), 843-853. DOI: 10.1016/0272-0590(84)90106-4