



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA.

EVALUACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS, ÓPTICAS,
ANTIOXIDANTES Y DE BARRERA DE PELÍCULAS COMESTIBLES
ELABORADAS CON EMULSIONES DOBLES $W_1/O/W_2$ ADICIONADAS CON
EXTRACTO DE TÉ VERDE (*Camellia sinensis*).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M en B. MARÍA MAGDALENA MURILLO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS

E. JAIME VERNON CARTER

CODIRECTORA

DRA. RUTH PEDROZA ISLAS

ASESORES

DRA. CONSUELO LOBATO CALLEROS

DR. ANTONIO MARTÍNEZ FEREZ

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**EVALUACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS, ÓPTICAS,
ANTIOXIDANTES Y DE BARRERA DE PELÍCULAS COMESTIBLES
ELABORADAS CON EMULSIONES DOBLES $W_1/O/W_2$ ADICIONADAS CON
EXTRACTO DE TÉ VERDE (*Camellia sinensis*).**

Que presentó

M. en B. María Magdalena Murillo Martínez

Director: Dr. E. Jaime Vernon Carter
Universidad Autónoma Metropolitana



Co-Directora: Dra. Ruth Pedroza Islas
Universidad Iberoamericana

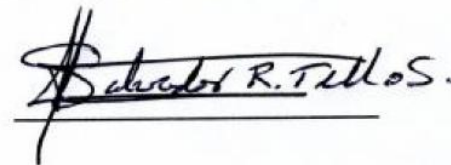


Jurado:

Dr. Francisco Cruz Sosa (Presidente)
Universidad Autónoma Metropolitana



Dr. Salvador R. Tello Solís (Secretario)
Universidad Autónoma Metropolitana



Dra. Consuelo Lobato Calleros (Vocal)
Universidad Autónoma de Chapingo



Dr. Jesús Alberto Quezada Gallo (Vocal)
Universidad Iberoamericana



El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACYT bajo el convenio 471-01 Doctorado en Biotecnología.

Dedicatorias

En memoria de dos seres humanos maravillosos,
Gaspar Vázquez M. y Rafael Murillo L., que con su amor me
enseñaron a tener siempre fe en la vida.

A mi familia, por siempre contar con su comprensión, amor y apoyo.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Jaime Vernon, por su apoyo para desarrollar este proyecto y por su paciencia para escucharme y resolver mis dudas.

También agradezco a la Dra. Ruth Pedroza Islas por su amistad, por la ayuda científica y personal, y por confiar en mí en todo momento.

Quiero agradecer al Dr. Salvador Tello S. por su amistad, y por sus interesantes y divertidas pláticas.

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Consuelo Lobato Calleros y al Dr. Antonio Martínez Ferez, mis asesores, por su apoyo y por sus aportaciones científicas a este proyecto.

A mis sinodales, Francisco Cruz Sosa y Jesús Alberto Quezada Gallo, por su tiempo y sus valiosas aportaciones para la mejora de esta tesis.

A W. Bonilla por ser mi confidente y por siempre estar conmigo.

A Polo por su agradable e inmejorable amistad.

A mis compañeros del T-166 por el apoyo y consejos brindados durante mi estancia en su laboratorio.

Agradezco el apoyo económico recibido durante mis estudios de posgrado al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, a través del convenio U-81157-Z.

RESUMEN

Las películas comestibles pueden extender la vida útil y mejorar la calidad de los alimentos actuando como una protección mecánica y una barrera selectiva a la transmisión de gases, vapores, olores, sabores y solutos. Actúan como soporte de acarreamiento de sustancias activas tales como: antimicrobianos, probióticos, antioxidantes, entre otros. Se ha sugerido la incorporación de materiales lipídicos para aumentar la hidrofobicidad y mejorar la permeabilidad al vapor de agua de las películas. Las películas compuestas son un tipo de películas que generalmente están constituidas por proteínas, polisacáridos (o una mezcla de ambos) y lípidos en la forma de bicapa, multicapa o emulsión. Las películas emulsionadas presentan propiedades similares a las de bicapa pero con la ventaja que su elaboración se lleva a cabo en un solo paso.

El objetivo del presente trabajo fue: (a) obtener emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ por dos diferentes complejos de proteína-polisacárido, (aislado de proteína de suero de leche (WPI)-Pectina de bajo metoxilo (LMP), y WPI- carboximetil celulosa (CMC)) y evaluar sus propiedades reológicas (estacionarias y dinámicas), medir el volumen superficial de tamaño de gota; (b) obtener películas comestibles por el vertido de las emulsiones dobles en placa y (c) estudiar el efecto del tiempo de

almacenamiento y de la adición del extracto hidrosoluble de té verde en las propiedades de las películas.

Las Emulsiones estabilizadas por los complejos PBM-WPI ($E_{\text{PBM-WPI}}$) y CMC-WPI ($E_{\text{CMC-WPI}}$) usadas para la fabricación de películas presentaron un tamaño de partícula de $2.47\mu\text{m}$ y $10.68\mu\text{m}$, respectivamente. El tamaño de partícula de las emulsiones dobles se incrementó con la adición del extracto de té verde siendo de $7.15\mu\text{m}$ para $E_{\text{LMP-WPI-TV}}$ y de $14.10\mu\text{m}$ para $E_{\text{CMC-WP-TV}}$.

La viscosidad en las emulsiones $E_{\text{PBM-WPI}}$ y $E_{\text{CMC-WPI}}$ exhibieron curvas de flujo correspondientes a materiales estructurados típicos que se caracterizan por presentar una viscosidad newtoniana a bajas tasas de corte, una región reoadelgazante en un intervalo de tasa de corte mayor. Este tipo de viscosidades son características de muchos fluidos no newtonianos. Los datos experimentales se ajustaron muy bien al modelo de Carreau modificado ($R^2 > 0.979$).

La emulsión doble $E_{\text{LMP-WPI}}$ mostró mayor módulo de pérdida (G'') que de almacenamiento (G') en el intervalo de frecuencia estudiado. Por otra parte, la emulsión $E_{\text{CMC-WPI}}$ exhibió valores más altos de G'' y G' a lo largo de todo el intervalo de frecuencia. Ambos módulos mostraron una dependencia significativa a la frecuencia, la cual se incrementó al aumentar dicho parámetro. Este comportamiento puede deberse a la diferencia de tamaño de las gotas de las emulsiones dobles. Mientras que el comportamiento general fue más líquido que sólido, dentro un intervalo de frecuencia en el que G' y G'' se superponen, lo que muestra que este comportamiento se relaciona más con una red embebida en una matriz suave y la rigidez en esas regiones se puede producir por entrecruzamiento químico o físico.

Las películas PBM-WPI ($P_{\text{PBM-WPI}}$) ó CMC-WPI ($P_{\text{CMC-WPI}}$) fueron secadas y obtenidas a 25°C . La microestructura de las películas $P_{\text{PBM-WPI}}$ y $P_{\text{CMC-WPI}}$

obtenidas, en general, se trataron de estructuras compactas, interrumpidas por pequeñas gotas de emulsión. Las películas que mostraron una microestructura más abierta fueron las películas $P_{\text{CMC-WPI}}$ que tuvieron un tamaño de gota mayor.

Las propiedades mecánicas fueron mayores para las películas $P_{\text{PBM-WPI}}$ con una resistencia a la tensión de 1.49 MPa y un modulo de Young de 119.74 MPa. Los valores de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas no fueron significativamente diferentes entre $P_{\text{LMP-WPI}}$ y $P_{\text{CMC-WPI}}$ con valores de 1.6-1.5 gmm/m² h kPa, respectivamente.

Las películas formadas con las emulsiones adicionadas con té verde ($P_{\text{PBM-WPI-TV}}$) ($P_{\text{CMC-WPI-TV}}$) favorecieron las propiedades de las películas debido a que presentaron mayor RT y MY que las $P_{\text{LMP-WPI}}$ y $P_{\text{CMC-WPI}}$. Por otro lado, el tiempo de almacenamiento disminuyó significativamente las propiedades mecánicas de las películas elaboradas con emulsiones dobles, al parecer durante el tiempo de almacenamiento de 15 días sucedió una deshidratación de las películas y/o cristalización de los plastificantes y tensoactivos provocando el cambio de las propiedades mecánicas, decreciendo la flexibilidad de la matriz de la película y aumentando la permeabilidad al vapor de agua

Las películas con y sin extracto de té verde mostraron porcentajes de transparencia bajos, pero las menos transparentes fueron las películas $P_{\text{CMC-WPI}}$ con un porcentaje de transparencia del 6.81%. El índice de color (IC) de las $P_{\text{CMC-WPI}}$ y $P_{\text{PBM-WPI}}$ se encontró dentro del intervalo de color de verde oscuro a verde amarillento; mientras que el índice de color de las películas con extracto de té verde se encontró en el intervalo de IC verde amarillento.

Las películas $P_{\text{CMC-WPI}}$ y $P_{\text{LMP-WPI}}$ no presentaron en ningún momento compuestos fenólicos ni propiedades antioxidantes. El valor más alto de fenoles totales presentado por las películas comestibles fue después de haber sido formadas (en

t=0), siendo significativamente mayor el contenido de fenoles en las películas $P_{LMP-WPI-TV}$ (8.10 mg AG/g de película) que en $P_{CMC-WPI-TV}$ (7.85 mg AG/g de película). Las propiedades antioxidantes y la cantidad de compuestos fenólicos totales de las $P_{LMP-WPI-TV}$ siempre fueron superiores, y el tamaño de partícula de estas emulsiones siempre fue inferior al de $P_{CMC-WPI-TV}$ lo cual podría indicar que el tamaño de partícula de las emulsiones dobles que forman la matriz de la película juega un papel muy importante en la protección y probablemente en la liberación de los compuestos fenólicos del té verde.

ABSTRACT

The edible films can extend life and improve food quality by acting as a mechanical protection and a selective barrier to the transmission of gases, fumes, smells, tastes and solutes. Act as a support for carrying active substances such as antibiotics, probiotics, antioxidants, and others. It has been suggested the incorporation of lipid materials to increase hydrophobicity and improve the water vapor permeability of films. The composite films usually consist of proteins, polysaccharides (or a mixture of both) and a lipid bilayer, or multilayer emulsion. Emulsified films have similar properties to the bilayer ones but with the advantage that its preparation is done in one step.

The aim of this study was: (a) obtain W1/O/W2 double emulsions by two different protein-polysaccharide complex (isolated whey protein (WPI)-low methoxyl pectin (LMP) and WPI- carboxymethyl cellulose (CMC)) and evaluate their rheological properties (fixed and dynamic), measure the volume of the droplet surface, (b) obtain edible films by pouring the double emulsion in a plate and (c) to study the effect of time storage and the addition of water soluble green tea extract on the properties of the films.

Emulsions stabilized by WPI-LMP-complex ($E_{LMP-WPI}$) and CMC-WPI ($E_{CMC-WPI}$) were used for the preparation of films which showed a particle size of $2.47\mu\text{m}$ and $10.68\mu\text{m}$ respectively. The particle size of double emulsions increased with the addition of green tea extract to be from 7.15 microns to $E_{LMP-WPI-GT}$ and 14.10 microns for $E_{CMC-WP-GT}$.

The viscosity in emulsions $E_{LMP-WPI}$ and $E_{CMC-WPI}$ exhibited flow curves for typical structural materials that are characterized by a Newtonian viscosity at low shear rates, a shear-thinning region in a range of higher shear rate. This kind of viscosity is characteristic of many non-Newtonian fluid, data were fitted well to the modified Carreau model ($R^2 > 0.979$).

The double emulsion $E_{LMP-WPI}$ showed greater loss modulus (G'') than storage modulus (G') in the frequency range studied. In addition, $E_{CMC-WPI}$ emulsion exhibited higher values of G' and G'' throughout the entire frequency range. Both modules showed a significant dependence on frequency which increased when this parameter was increased too. This behavior may be due to the difference in droplet size of double emulsions. While the general behavior was more liquid than solid, within a frequency range in which G' and G'' are superimposed, showing that this behavior is related more to a network embedded in a soft matrix and stiffness in those regions can be produced by chemical or physical cross-linking.

LMP-WPI films ($P_{LMP-WPI}$) or CMC-WPI ($P_{CMC-WPI}$) were dried at 25°C . The microstructure of $P_{LMP-WPI}$ and $P_{CMC-WPI}$ films are, in general, compact structures interrupted by small droplets of emulsion. The films that showed a more open microstructure were $P_{CMC-WPI}$ films that had a larger drop size.

The mechanical properties were higher for $P_{LMP-WPI}$ films with a tensile strength of 1.49 MPa and a Young's modulus of 119.74 MPa. The values of water vapor

permeability (WVP) of films were not significantly different between $P_{LMP-WPI}$ and $P_{CMC-WPI}$ valued 1.6-1.5 gmm/m² h kPa, respectively.

The films formed with emulsions with added green tea ($P_{LMP-WPI-GT}$ and $P_{CMC-WPI-GT}$) favored the properties of the films because they showed greater RT and MY than $P_{LMP-WPI}$ and $P_{CMC-WPI}$. On the other hand, the storage time significantly decreased the mechanical properties of films made with double emulsions, apparently during the storage period of 15 days followed by a dehydration of the films and / or crystallization of plasticizers and surfactants, causing change in mechanical properties, decreasing the flexibility of the film matrix and increasing the water vapor permeability.

Films with and without green tea extract showed lower percentages of transparency, but $P_{CMC-WPI}$ films were less transparent with a transparency percentage of 6.81%. Color index (CI) of the $P_{CMC-WPI}$ and $P_{LMP-WPI}$ was within the range of color from dark green to yellowish green, while the color index of the films with green tea extract was found in the CI interval yellowish green.

$P_{CMC-WPI}$ and $P_{LMP-WPI}$ films showed no phenolic compounds and antioxidant properties. The highest value of total phenols in edible films was after having been formed (at $t = 0$), significantly higher phenolic content in the films $P_{LMP-WPI-GT}$ (8.10 mg GA / g of film) than in $P_{CMC-WPI-GT}$ (7.85 mg GA / g of film). The antioxidant properties and the amount of total phenolic compounds of $P_{LMP-WPI-GT}$ were always higher, and the particle size of these emulsions was lower than that of $P_{CMC-WPI-GT}$ which could indicate that the particle size of double emulsions that form the matrix of the film plays an important role in protecting and probably in the release of green tea's phenolic compounds.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	v
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Películas y recubrimientos comestibles	5
2.1.1 Definición e historia	5
2.1.2 Función de las películas comestibles	7
2.1.3 Métodos de aplicación	8
2.1.4 Mecanismo de formación	9
2.1.5 Materiales formadores de películas	9
2.1.5.1 Agentes plastificantes	11
2.1.5.2 Tensoactivos	11
2.1.6 Películas de proteína	12
2.1.6.1 Generalidades y fabricación películas del aislado de proteína de suero de leche.	13
2.1.7 Películas comestibles de polisacáridos	17
2.1.7.1 Pectina	17
2.1.7.2 Carboximetilcelulosa	20

2.1.8 Películas con sustancias activas	21
2.1.8.1 Películas con antioxidantes	23
2.1.8.2 Té verde	23
2.1.9 Clasificación de películas comestibles	25
2.2 Emulsiones	28
2.2.1 Clasificación	28
2.2.2 Mecanismos generales de inestabilidad de las emulsiones	33
2.2.3 Emulsificantes	34
3. JUSTIFICACION	37
4. OBJETIVOS	38
5. HIPÓTESIS	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1 Materiales	40
6.2 Preparación de la emulsión	41
6.2.1 Condiciones principales para la formulación de las emulsiones dobles W1/O/W2	41
6.2.1.1 Potencial Z	41
6.2.1.2 Punto de equivalencia de las soluciones de biopolímeros	41
6.2.1.3 Formulación y preparación de las emulsiones dobles	42
6.3 Propiedades reológicas de las emulsiones dobles	43
6.4 Evaluación del tamaño de gota	44
6.5 Elaboración de las películas	45
6.6 Elaboración de películas con extracto de té verde.	45
6.7 Evaluación de fenoles totales de las películas	46
6.8 Actividad antioxidante de las películas	46
6.8.1 Método FRAP	47
6.8.2 Método DPPH	48
6.9 Evaluación del espesor	49

6.10 Propiedades mecánicas	49
6.11 Permeabilidad al vapor de agua	50
6.12 Ángulo de contacto	54
6.13 Propiedades ópticas de las películas	55
6.13.1 Índice de color	55
6.13.2 Transparencia	57
6.14 Microscopía electrónica de barrido	57
6.15 Análisis estadístico	58
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
7.1 Formulación de la emulsión doble	59
7.2 Tamaño de gota de la emulsión	60
7.3 Propiedades reológicas de las emulsiones dobles	61
7.3.1 Propiedades reológicas estacionarias	61
7.3.2 Propiedades reológicas dinámicas	64
7.3.3 Prueba de la regla de Cox-Merz	65
7.4 Apariencia de las películas	68
7.5 Propiedades ópticas	69
7.6. Ángulo de contacto	70
7.7 Propiedades mecánicas de las películas comestibles	71
7.8 Microestructura	75
7.9 Permeabilidad al vapor de agua	79
7.10 Fenoles totales y propiedades antioxidantes	80
8. CONCLUSIONES	84
9. PERSPECTIVAS	86
10. REFERENCIAS	87
11. ANEXOS	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Fuentes naturales de materiales formadores de películas comestibles	10
Figura 2.2. Estructura primaria de la β -lactoglobulina	14
Figura 2.3. Estructura primaria de la α -Lactoalbúmina	15
Figura 2.4. Estructura molecular de pectina de: (a) Bajo metoxilo, (b) Alto metoxilo	19
Figura 2.5. Estructura molecular de la carboximetilcelulosa	21
Figura 2.6. Estructura de las catequinas mayoritarias del té verde (<i>Camellia sinensis</i>)	24
Figura 2.7. Preparación en dos pasos de una emulsión doble del tipo W/O/W	31
Figura 2.8. Clasificación de las emulsiones dobles	32
Figura 2.9. Mecanismos que favorecen a la inestabilidad de las emulsiones	33
Figura 2.10. Estructura típica de un emulsificante	35
Figura 6.1. Imagen transversal y de la tapa de la celda de metacrilato para la medición de la transmisión al vapor de agua	50
Figura 6.2. celda para evaluar la permeabilidad al vapor de agua	53
Figura 6.3. representación del ángulo de contacto de una gota de agua en la superficie de una película	55

Figura 7.1. Cambios en la viscosidad aparente en función de la tasa de corte para las emulsiones dobles	63
Figura 7.2. Cambios en los modulo de almacenamiento (G') y de perdida (G'') durante el barrido de frecuencia de 0.5% de deformación para las emulsiones dobles	65
Figura 7.3. Prueba de la regla de Cox Merz para las emulsiones dobles	67
Figura 7.4. Películas elaboradas a partir de emulsiones dobles con y sin extracto de té verde	68
Figura 7.5. Micrografías SEM de la película comestible ($P_{CMC-WPI}$)	77
Figura 7.6. Micrografías SEM de la película comestible ($P_{LMP-WPI}$)	78
Figura A1. Cabina utilizada para mantener las condiciones de ensayo uniformes	101
Figura A2. Contactómetro de ángulo	102
Figura A3. Curva estándar para la determinación de fenoles totales	103
Figura A4. Curva de calibración de trolox para evaluación FRAP	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Función de las películas comestibles	7
Tabla 2.2. Sustancias activas incorporadas en matrices de películas comestibles	22
Tabla 2.3. Estudios reportados sobre películas comestibles emulsionadas	27
Tabla 7.1. Modelo reológico de Carreau Modificado para las emulsiones dobles	63
Tabla 7.2. Propiedades ópticas, % transparencia e índice de color, y espesor de las películas comestibles	70
Tabla 7.3. Ángulos de contacto de las películas de emulsiones dobles	71
Tabla 7.4. Propiedades mecánicas de las películas comestibles	73
Tabla 7.5. Permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles	80
Tabla 7.6. Fenoles totales y propiedades antioxidantes de las películas comestibles	82

1. INTRODUCCIÓN

Las películas y recubrimientos comestibles presentan numerosas ventajas sobre los empaques sintéticos, además de ser biodegradables, funcionan como un método de protección en productos alimentarios y en tabletas farmacéuticas (Gontard y col., 1993). Una película o recubrimiento comestible es una capa delgada elaborada a partir de materiales que pueden ser comidos por el consumidor. Es aplicada sobre los alimentos por medio de inmersión, aspersion o cepillado, funcionando como una protección mecánica y una barrera selectiva a la transmisión de gases, vapores, olores, sabores y solutos. (Gennadios y Weller, 1990; Gennadios y col., 1993; Miller y Krochta, 1997).

Las películas compuestas son un tipo de películas que generalmente están constituidas por proteínas, polisacáridos (o una mezcla de ambos) y lípidos en la forma de bicapa, multicapa o emulsión. Las películas en bicapa tienen mejores propiedades de barrera al vapor de agua que las películas emulsionadas pero su elaboración requiere de varios pasos, mientras que las películas emulsionadas tienen propiedades mecánicas casi similares y su preparación consiste un solo paso (Kester

y Fenema, 1989). En las películas emulsionadas, el tamaño de las partículas de lípidos tiene una gran influencia en la permeabilidad al vapor de agua (PVA). De acuerdo a Debeaufort y Voilley, (1995) y Perez-Gago y Krochta, (2001), la eficiencia de las propiedades de barrera aumenta cuando decrece el tamaño de glóbulo de lípido y cuando su distribución es homogénea. No obstante, la permeabilidad al vapor de agua frecuentemente también es asociada al tipo de proteína o polisacárido con el que se fabrica la película (Morillon y col., 2002).

Cada tipo de película es específica para su aplicación y tienen un gran potencial como soporte de acarreamiento de sustancias activas tales como: antioxidantes, sabores, nutrientes y compuestos antimicrobianos que pueden alargar la vida de anaquel de un producto (Delves-Broughton y col., 1998; Rojas-Graü y col., 2006; Quintero y col., 2006; Han y Krochta 2007; Tapia y col., 2007). En especial, la incorporación de sustancias naturales a películas comestibles con actividad antioxidante (extracto de borraja, ginseng, té verde, entre otros) se han convertido recientemente en una opción importante para la sustitución de antioxidantes sintéticos que a altas concentraciones podrían resultar un riesgo para la salud (Gómez-Estaca y col., 2009; Norajit y col., 2010; Siripatrawan y Harte, 2010).

Una de las fuentes de antioxidantes naturales más reconocida es el té verde (*Camellia sinensis*) por su contenido en polifenoles, siendo las catequinas los compuestos mayoritarios. Estudios han mostrado diversas propiedades farmacológicas de las catequinas en las que se incluyen: antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antiarterioescleróticas y efectos antibacteriales, por mencionar algunas. Sin embargo, estos polifenoles del té verde son compuestos

lábil y cambian durante el tiempo de almacenamiento, el periodo de calentamiento y con el pH (Zhu y col, 1997; Wang y col., 2000).

Se requiere de propuestas y estrategias para adicionar éste tipo de compuestos funcionales a los alimentos, que permitan mantener sus propiedades benéficas. Una posibilidad de gran potencial la constituye el uso de las emulsiones dobles agua-aceite-agua denominadas $W_1/O/W_2$ (por sus siglas en inglés: water-oil-water). Estas son sistemas complejos, denominados “emulsión de emulsiones”. Algunos ven las emulsiones múltiples como sistemas en los cuales dos líquidos están separados por un tercer líquido que es inmisible con cualquiera de los líquidos originales. Muy a menudo los dos líquidos separados son del mismo tipo. Las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ son sistemas de tres fases en los que gotitas de aceite (O) que contienen una fase acuosa interna (W_1) están dispersas en una fase acuosa externa (W_2) (Davis y Walker, 1987; Matsumoto y Kang, 1989).

Las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ presentan muchas posibilidades para la liberación controlada de sustancias activas hidrosolubles atrapadas en las gotas internas. Además, tienen grandes ventajas sobre las emulsiones convencionales, como la reducción del contenido de grasa, enmascaramiento de sabor y protección de ingredientes lábil y probióticos sensibles. (Rodríguez-Huezo y col., 2004; Lobato-Calleros y col., 2006), Sin embargo, las emulsiones dobles son termodinámicamente inestables debido a la coalescencia, floculación, al cremado y a la difusión de moléculas de agua de la fase acuosa interna hacia la fase acuosa externa o viceversa. Desde hace tiempo, diversas investigaciones se han enfocado en mejorar la estabilidad y la liberación de especies activas, pequeñas moléculas de surfactantes han sido progresivamente reemplazadas por mezcla de emulsificantes poliméricos que brindan estabilidad a la emulsión, y aseguran una mejor

encapsulación y liberación controlada de sustancias atrapadas en las gotas internas de los glóbulos de la emulsión doble. Por otra parte, el uso de complejos proteína-polisacárido estabiliza la emulsión doble.

Jiménez–Alvarado y col., (2009) reportaron que la emulsión doble $W_1/O/W_2$ incorporando hierro bisglicinado en la fase acuosa interna y estabilizadas con complejos proteína-polisacárido (concentrado de proteína del suero de leche (WPC) –goma arábica de mezquite) presentaron buena estabilidad, eficiencia de encapsulación, protección contra la oxidación y una velocidad de liberación lenta. Los complejos proteína-polisacárido brindan resistencia a las emulsiones al estrés del entorno como pH, fuerza iónica y temperatura (McClements, 2005). Sin embargo, las características de adsorción de los complejos y la estructura de la mezcla de los biopolímeros en la interfase aun no han sido del todo entendidas. El control de interacciones de tipo proteína-polisacárido ayudan en el diseño de películas emulsionadas con propiedades comparables a aquellas películas en bicapa y, en este sentido, el análisis reológico puede proporcionar una información básica sobre la microestructura y las propiedades de barrera en relación a la composición de la emulsión doble. (Xu y col., 2006).

En objetivo del presente trabajo fue: (a) obtener emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ por dos diferentes complejos proteína-polisacárido, y evaluar sus propiedades reológicas (estacionarias y dinámicas), medir el volumen superficial de tamaño de gota; (b) obtener películas por vertido de las emulsiones dobles en placa y (c) estudiar el efecto del tiempo de almacenamiento y de la adición del extracto hidrosoluble de té verde en las propiedades de las películas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Películas y recubrimientos comestibles

2.1.1 Definición e historia

De acuerdo a lo reportado por McHugh (2000) un recubrimiento comestible es definido como una capa delgada que forma una cubierta sobre el alimento, y una película comestible es una capa preformada y delgada, la cual una vez elaborada puede ser colocada sobre el alimento.

El uso de películas y recubrimientos comestibles para extender la vida útil de los alimentos no son un nuevo concepto, sin embargo, han ganado importancia en la actualidad. En China durante los siglos XII y XIII se aplicaban recubrimientos elaborados a base de cera. Los chinos notaron que con éste método la pérdida de agua y la fermentación de los alimentos se llevaban a cabo más lentamente. En el

siglo XVI, se aplicaban recubrimientos de manteca en carne para evitar su desecación. (Kester y Fennema, 1986). En general, los recubrimientos mayormente utilizados durante esa época eran los elaborados a base de ceras, aceite y grasas y se usaban principalmente para la prevención del transporte de humedad y el oscurecimiento de alimentos; los recubrimientos de sacarosa eran empleados para la prevención de la rancidez en nueces, almendras y avellanas (Debeaufort y col., 1998). A principios de los años 30s Estados Unidos, la cera de parafina se aplicó como cubierta en frutas cítricas. En los años 50s la cera de carnauba en emulsión O/W (por sus siglas en inglés: oil-in-water) se utilizó como recubrimiento en frutas frescas vegetales (Kaplan, 1986). A finales de esa misma década, se comenzaron a tener los primeros reportes científicos y patentes sobre películas y recubrimientos comestibles hechos a base de una gran variedad de polisacáridos, proteínas y lípidos solos o mezclados (Kester y Fennema, 1986).

Gennadios y col. (1997) reportaron el potencial que tienen la aplicación películas y/o recubrimientos comestibles para mejorar la calidad de productos frescos, congelados y procesados de carne, aves y mariscos retardando la pérdida de humedad, reduciendo la oxidación de lípidos y decoloración, encerrando sabores volátiles, y funcionando como acarreadores de aditivos para alimentos como antimicrobianos y agentes antioxidantes. Recientemente, Rojas-Grau y col. (2009) remarcaron la importancia de un nuevo desarrollo de tecnología enfocado a la producción de película y recubrimientos comestibles con mejores propiedades. Hasta el momento, la mayoría de estudios sobre la aplicación de películas comestibles en alimentos sólo han sido conducidos a nivel laboratorio.

2.1.2 Función de las películas comestibles

De acuerdo con Kester y Fennema (1986), el diseño de películas comestibles no tiene como objetivo sustituir el uso de materiales sintéticos para la fabricación de empaques y películas. La finalidad del uso de películas comestibles es actuar como una barrera para mejorar la calidad de alimentos en general y extender su vida útil, además de llevar a cabo otras funciones importantes como se muestra en la **tabla 2.1** (Torres, 1994).

Tabla 2.1. Función de las películas comestibles

Controlar la pérdida de humedad
Controlar el intercambio de gases (O_2 , CO_2 , C_2H_4)
Controlar la pérdida de compuestos volátiles
Contener aditivos
Prevenir la pérdida de color
Controlar la pérdida o intercambio de sabor
Prevenir o controlar la fotodegradación-oxidación
Mejorar las propiedades mecánicas y de manejo de los alimentos

2.1.3 Métodos de aplicación

Existen varios métodos de aplicación de películas (casteo o vaciado) y recubrimientos (inmersión, aspersion, entre otros). Los más utilizados son explicados a continuación.

Inmersión

Este método se basa principalmente en la inmersión del alimento dentro de una solución formadora de películas (SFP) elaborada a base de materiales comestibles. Después de la inmersión, la solidificación del recubrimiento se lleva a cabo medio de la desecación del la SFP. La aplicación en alimentos es muy amplia debido a que se emplea tanto en superficies uniformes como irregulares. Ésta técnica ha sido utilizada para la aplicación de recubrimientos de monoglicéridos acetilados en carnes, pescado, y carne de aves, y para la aplicación de recubrimientos de cera en frutas y vegetales.

Aspersion

En este método la SFP se esparce en gotas pequeñas para la formación de cubierta uniforme sobre el alimento. Al contrario de la inmersión, la aspersion es más conveniente para la aplicación de una película sobre algún sitio específico del alimento. La aspersion es el método más empleado en la aplicación de recubrimientos para alimentos.

Casteo o vaciado

Esta técnica, es la más utilizada para la formación de películas, además de fácil. La fabricación de películas se lleva a cabo por medio del vaciado en placa de una SFP elaborada con materiales comestibles, la cual subsecuentemente es secada. Éste método permite tener control en el espesor de la película. Después del secado, la película comestible puede ser aplicada en un alimento.

2.1.4 Mecanismo de formación

El mecanismo de formación de la mayoría de películas se lleva a cabo por medio de evaporación de solvente. Cuando una solución de polímeros es aplicada en una superficie, se comienzan a formar enlaces entre las cadenas poliméricas, al mismo tiempo, el solvente se evapora lentamente para solidificación de la película (Banker, 1996).

2.1.5 Materiales formadores de películas

Existen varios materiales naturales formadores de películas y / o recubrimientos comestibles tal y como se muestra en la **figura 2.1**. Estos materiales se clasifican en tres tipos de biomoléculas: proteínas, polisacáridos y lípidos (Kester y Fennema, 1986). Los lípidos tienen propiedades emulsificantes y plastificantes que incrementan flexibilidad de las películas. Los lípidos, debido a su carácter hidrofóbico, brindan mejores propiedades de barrera al vapor de agua que las proteínas y polisacáridos,

pero tienen bajas propiedades de barrera a gases. Por otro lado, los polisacáridos y proteínas, forman películas con buenas propiedades de barrera al oxígeno y dióxido de carbono. Cada tipo de película o recubrimiento tiene sus propias características y es específica para su aplicación.

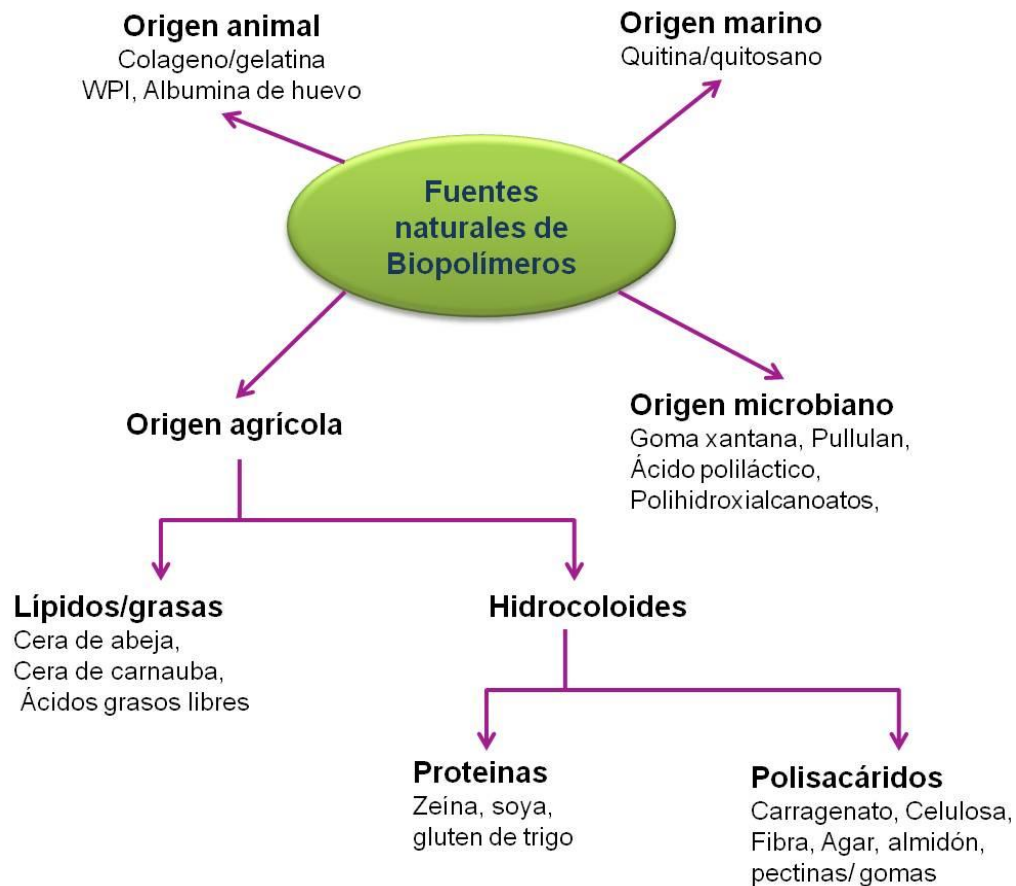


Figura 2.1. Fuentes naturales de materiales formadores de películas comestibles.

2.1.5.1 Agentes plastificantes

Las propiedades mecánicas de las películas comestibles en la mayoría de los casos son mejoradas empleando materiales plastificantes como: ácidos grasos y polioles entre los que se encuentran el sorbitol, glicerol, propilen glicol y polietilen glicol. Aunque no es muy común, los ácidos grasos también han sido utilizados como plastificantes en películas y recubrimientos. Sin embargo, el mejor plastificante hasta ahora es, por supuesto, el agua. En general los plastificantes son componentes de baja masa molecular que trabajan como espaciadores entre las cadenas poliméricas decreciendo las fuerzas intermoleculares; incrementando la flexibilidad de las cadenas y su extensibilidad (Cuq y col., 1995). El plastificante bajo condiciones normales de almacenamiento puede afectar la flexibilidad y las propiedades de barrera. Cuando los plastificantes se cristalizan pueden tener un efecto “antiplastificante”, decreciendo la flexibilidad de la matriz de la película, mientras aumenta la permeabilidad (Dangaran y Krochta, 2007).

2.1.5.2 Tensoactivos

Los tensoactivos son moléculas, que estabilizan la tensión superficial, están constituidos por dos fracciones diferentes: una parte polar que se solubiliza en agua, y otra no polar, que lo hace mejor en lípidos. Mezclados con soluciones acuosas de proteína-lípido o polisacárido-lípido producen películas compuestas. Los tensoactivos, también llamados emulsificantes, estabilizan las mezclas de los

líquidos inmiscibles, un ejemplo son las emulsiones. En las películas emulsionadas los tensoactivos juegan un papel muy importante para que la distribución del material oleoso sea homogénea en toda la superficie. También son usados para incrementar la adhesión entre la superficie de los alimentos y el recubrimiento, o entre dos capas de diferente polaridad dentro de una película multicapa.

De acuerdo a lo reportado por Gontard y col., (1994) y Fairley y col., (1996) los emulsificantes SDS o monoesteratos de glicerol pueden tener un efecto plastificante en las películas comestibles. Chien-Hsien y col., (2009) reportaron que a medida que aumenta el HLB (por sus siglas en inglés: Hydrophile-Lipophile Balance) y la concentración de los tensoactivos, la permeabilidad del vapor de agua y la resistencia a la tensión de las películas compuestas de almidón de tapioca-goma de hoja de hsian-tsoa decrecen. Por otra parte, una alta concentración de tensoactivos puede decrecer las propiedades ópticas de las películas comestibles (Trezza y Krochta, 2000; Villalobos y col., 2005).

2.1.6 Películas de proteína

Las proteínas provenientes de fuentes como: maíz, leche, trigo y soya son biomateriales empleados para la fabricación de películas. Cada tipo de proteína brinda distintas propiedades fisicoquímicas, de barrera y mecánicas a las películas comestibles. Las películas de proteína, al igual que las películas de polisacáridos, tienen una permeabilidad al vapor de agua relativamente alta de aproximadamente dos a cuatro órdenes de magnitud que las un empaque polimérico convencional de

polietileno, polipropileno y poliéster (Gennadios y col., 1993; McHugh, y Krochta, 1994). La resistencia de las películas de proteína a la difusión del vapor de agua es atribuida a la hidrofobicidad de las proteínas y a los niveles significativos de plastificantes, como glicerol y sorbitol, incorporados dentro de la película para impartir una flexibilidad adecuada. Por otra parte, se ha reportado que las películas de colágeno, gluten, zeína, proteína de soya y aislado de proteína tienen buenas propiedades de barrera al oxígeno en ambientes de baja humedad relativa.

2.1.6.1 Generalidades y fabricación películas del aislado de proteína de suero de leche.

El suero de leche es un subproducto proveniente de la manufactura de quesos. El aislado de proteína de suero de leche WPI (por sus siglas en inglés: whey protein isolated) contiene un 90% de proteína y un 10% de otros compuestos como lípidos, lactosa y minerales. Está integrado en su mayoría por cuatro tipos de proteínas: α -Lactoalbúminas (20%), β -lactoglobulinas (50%), albúminas (7%), inmunoglobulinas (10%) y polipéptidos (3%).

β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina contiene 162 residuos de aminoácidos en su estructura primaria, como se muestra en la **figura 2.2**.

La β -lactoglobulina en su estructura secundaria contiene un 10% de α -hélices, 43% láminas β antiparalelas y 47% de estructura desordenada. La presencia de dos enlaces disulfuro y de un grupo tiol libre, provoca una estructura espacial relativamente rígida, este grupo tiol libre puede variar entre los residuos de amino ácidos 119 y 121 (Cheftel y col., 1989). La proteína es de tipo globular con una masa molecular de 18,400 Da (Kontopidis y col., 2004). Las β -lactoglobulinas se pueden asociar según el pH del medio: se presenta como monómero arriba del pH 8, como dímero en un intervalo de pH entre 5 y 8 y se polimeriza en octámero cuando el pH varía de 3.5 a 5.2 (Gálvez y col., 2006). La interacción de grupos tioles e hidrofóbicos de las β -lactoglobulinas después de la termo-desnaturalización son los responsables primarios de la formación de películas (Maté y Krochta, 1996).

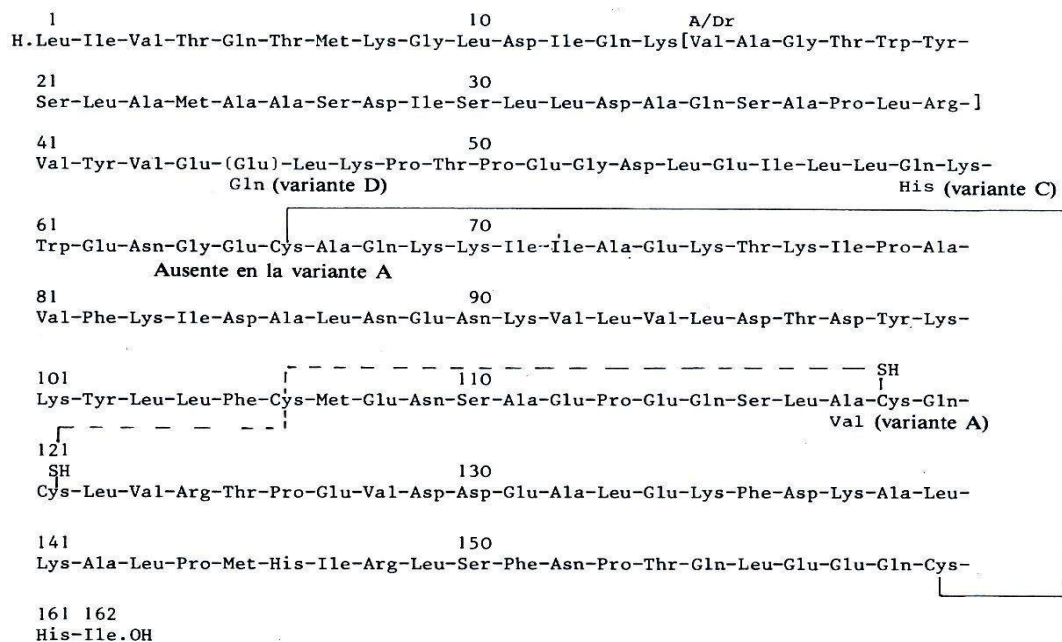


Figura 2.2. Estructura primaria de la β -lactoglobulina (Cheftel y col., 1989).

α -Lactoalbúmina

Es la segunda proteína en importancia del suero de la leche y al igual que la β -lactoglobulina es una proteína globular. Tiene actividad biológica ya que es parte constitutiva del sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa. La masa molecular reportada de la α -Lactoalbúmina varía entre 15 y 16 kDa; sin embargo, la masa calculada a partir de la composición de residuos de aminoácidos es de 14,437 Da (Ebner y Brodbeck, 1968). En la **figura 2.3** se puede observar que la α -Lactoalbúmina contiene residuos de ácido glutámico y leucina en posiciones terminales, también tiene un alto contenido de residuos de triptófano en toda su estructura y cuatro enlaces disulfuro. No presenta grupos sulfhidrilo libres a pesar de alto su contenido de cisteína. Al igual que la β -lactoglobulina, se puede cristalizar fácilmente y muestra fenómenos complejos de asociación-disociación dependientes del pH y de cambios conformacionales.

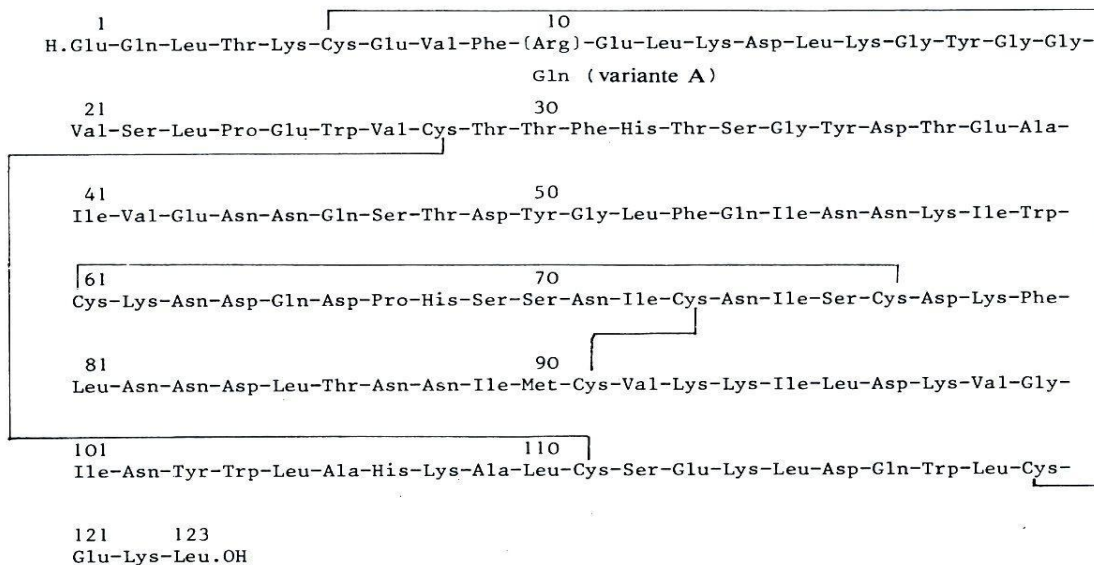


Figura 2.3. Estructura primaria de la α -Lactoalbúmina (Cheftel y col., 1989).

La capacidad de interacción de las proteínas del suero con moléculas de la misma o de otra especie, polisacáridos y/o lípidos, las convierte en un material versátil para su aplicación en productos alimenticios.

El aislado de proteína de suero de leche es un biomaterial de gran interés para la fabricación de películas transparentes, flexibles e inodoras (Gennadios y col., 1997; Miller y Krochta, 1997). Las condiciones de temperatura y pH influyen en gran medida en la formación de los enlaces que estabilizan la matriz de película y por ende las características mecánicas y funcionales. La carga neta de las proteínas está directamente relacionada con el pH de la solución proteica formadora de película, la variación del pH lleva, por lo tanto, a cambios en la estructura de la película. Por otra parte, las proteínas del aislado de suero de leche son desnaturalizadas por el efecto de la temperatura, debido a la ruptura y/o modificación de enlaces no covalentes que estabilizan las estructuras secundaria y terciaria. Cuando la estructura secundaria y terciaria se desdoblán es posible la formación de nuevos enlaces intra e intermoleculares, incluyendo enlaces disulfuro (S-S), interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que reducen el agua vinculante (Pelegri y Gasparetto, 2005).

Perez-Gago y col., (1999) mencionan que en un intervalo de pH de 4 a 8 se forman películas sin la aplicación de tratamiento térmico a las SFP de WPI. Ellos atribuyen la formación de la matriz de la película a la desnaturalización del WPI por el efecto del pH y a la formación de enlaces S-S.

2.1.7 Películas comestibles de polisacáridos

Los polisacáridos son moléculas solubles en agua y de masa molecular considerable. Nispero-Carriedo (1994) ha hecho una revisión sobre la formación y las propiedades de películas comestibles elaboradas con diferentes tipos de polisacáridos entre los que se encuentran: los almidones y derivados de almidones, los alginatos, los derivados de celulosa, las carrageninas, varias gomas producidas por microorganismos, el quitosano, y las pectinas. Generalmente en películas las propiedades funcionales de estos materiales hidrofílicos dependen directamente del contenido de agua y de la humedad relativa circundante. Las propiedades de barrera y mecánicas de las películas de polisacáridos están fuertemente relacionadas con el contenido de agentes plastificantes, agua y glicerol, dentro de sus matrices (Gontard y col., 1993). La aplicación de estas películas en frutas y vegetales han sido utilizadas principalmente para la modificación de atmósferas internas (Drake y col., 1987). Las películas de polisacáridos son flexibles, transparentes, inodoras y con baja permeabilidad al vapor de agua, debido a estas características, diversos trabajos de investigación relacionados con el tema han sido enfocados en su uso para la conservación de frutas y vegetales, principalmente (Diab y col., 2001; Durango y col., 2006; Tzoumaki y col., 2009).

2.1.7.1 Pectina

Las pectinas pertenecen a una familia compleja de polisacáridos. Son extraídas de la pared celular de las plantas y cítricos como lima, limón y naranja; o de manzana. Tienen una masa molecular que varía entre 50 y 100 kDa. Las pectinas son estables a

valores de pH bajos, entre 3 y 4.5 (May, 1990). En su estado nativo es un heteropolisacárido integrado por moléculas de ácido galacturónico, unidas por enlaces glucosídicos α -D-(1,4) los cuales son interrumpidos con un pequeño número de unidades de α -L-ramnosa enlazadas en posición 1-2. La estructura molecular de la pectina comprende regiones ramificadas con una cadena de ramno-galacturonano. Estas regiones altamente ramificadas también contienen otras unidades de carbohidratos unidas por enlaces glucosídicos a las unidades de α -L-ramnosa o de ácido galacturónico. Las cadenas largas de residuos de ácido galacturónico enlazados en α -D-(1,4) son comúnmente denominadas regiones “lisas” mientras que las regiones ramificadas son denominadas regiones “erizadas” (May, 1990).

Por convención, la pectina está clasificada por el grado de esterificación. De acuerdo a esto, una pectina de alto éster o de alto metoxilo HM (por sus siglas en inglés: high methoxyl) indica que su grado: esterificación es mayor al 50%, mientras que si es menor al 50%, la pectina es llamada de bajo éster o de bajo metoxilo LM (por sus siglas en inglés: low methoxyl), como se muestra en la **figura 2.4**.

La viscosidad de sus dispersiones, al igual que la de otros polisacáridos, se incrementa a medida que aumenta la masa molecular; en el caso de las pectinas, la viscosidad es mayor cuanto más se incrementa el grado de esterificación. Las pectinas de LM pueden formar geles en presencia de cationes calcio. Por otra parte, las pectinas de HM forman geles a valores bajos de pH y en presencia de sacarosa a altas concentraciones. Las propiedades reológicas de los geles de pectina, color y

aparición están influenciadas por su grado de polimerización y metoxilación (May, 1990; Tang y col., 2001).

Fishman y col., (2004) señalan la importancia que tienen la proporción y la concentración de los polisacáridos: pectina y de quitosano mezclados con plastificante para la formación de películas con buenas propiedades de barrera y mecánicas.

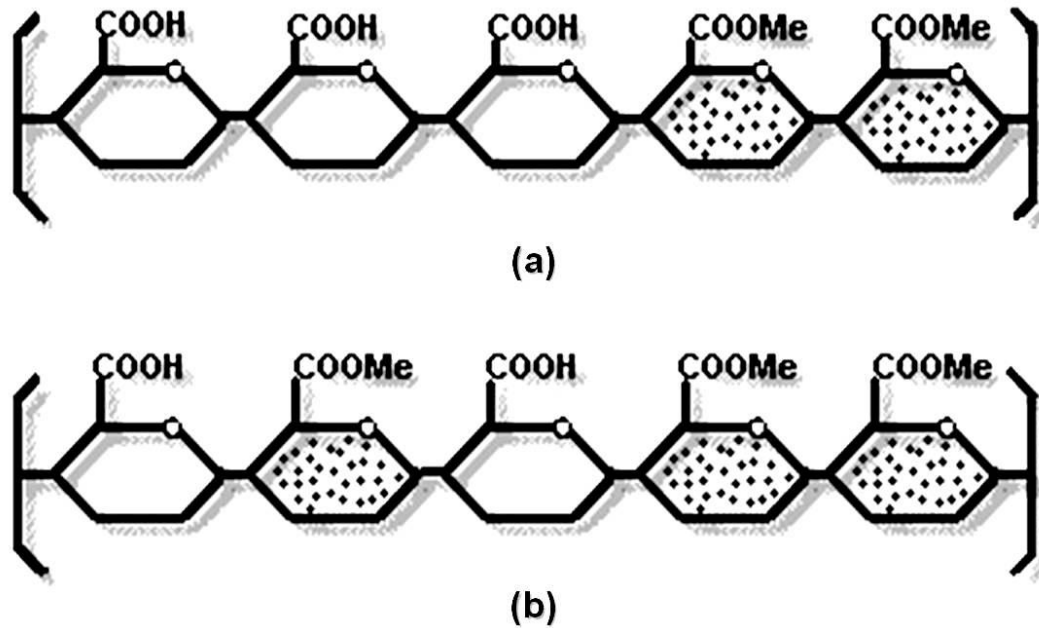


Figura 2.4. Estructura molecular de pectina de: (a) Bajo metoxilo, (b) Alto metoxilo.

2.1.7.2 Carboximetilcelulosa

La carboximetilcelulosa (CMC) es el derivado más importante derivado de la celulosa, y principalmente ha sido usada en aplicaciones alimentarias como estabilizante debido a sus propiedades de viscosidad y de retención de agua.

En la **figura 2.5** se muestra la estructura molecular de CMC correspondiente a un polímero aniónico con estructura lineal en donde los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo de la celulosa son reemplazados por sustituyentes carboximetil, $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ (Baar y col., 1994; Heinze, 1998). Las cadenas de glucopiranososa se unen mediante enlaces β (1-4). La CMC contiene polisacáridos hidrofóbicos y muchos grupos hidrofílicos carboxilo, y por lo tanto tiene características hidrofílicas. Es un polisacárido soluble en agua o en soluciones agua-etanol y compatible con surfactantes.

La CMC produce películas solubles en agua, resistentes a grasas y aceites (Gennadios y col., 1997). Las películas elaboradas con CMC han sido aplicadas en frutas y vegetales actuando como una barrera al oxígeno, aceite o humedad (Krumel y Lindsay 1976; Tzoumaki y col., 2009).

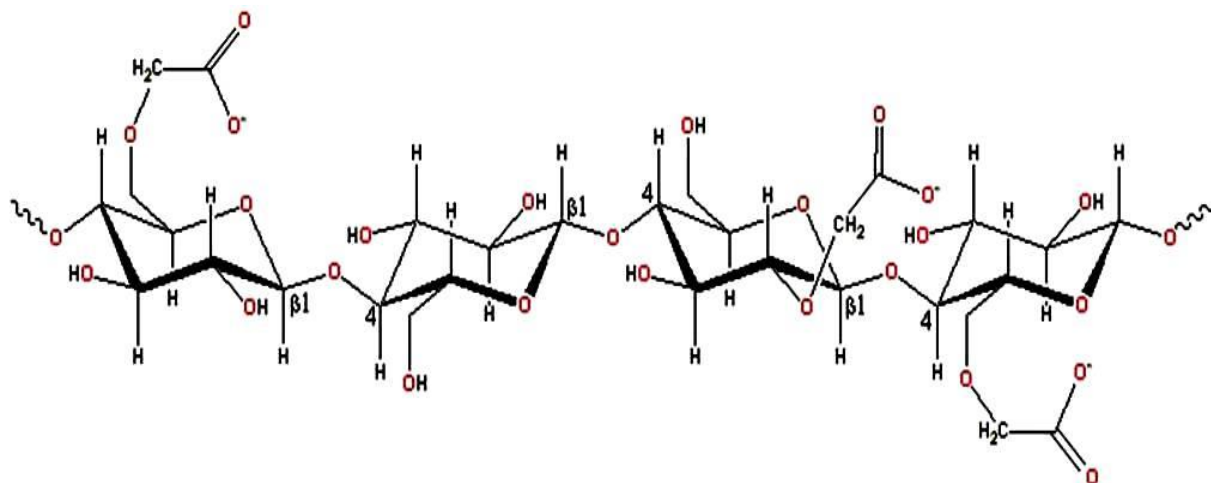


Figura 2.5. Estructura molecular de la carboximetilcelulosa.

2.1.8 Películas con sustancias activas

Las películas comestibles elaboradas a partir de biomateriales funcionan como un soporte de acarreamiento de sustancias activas tales como: agentes para evitar el oscurecimiento, antimicrobianos, colorantes, sabores y nutrientes (Rojas-Graü y col., 2006; Han y Krochta 2007; Tapia y col., 2007). Además de contener y proteger al alimento, las películas comestibles pueden llevar a cabo una función específica dependiendo del compuesto activo incorporado dentro de su matriz. Una de las grandes ventajas que presenta el uso de películas adicionadas con compuestos funcionales es la liberación gradual de éstos hacia la superficie del alimento aplicado. En la **tabla 2.2** se reportan algunos ejemplos de películas adicionadas con sustancias activas.

Tabla 2.2. Sustancias activas incorporadas en matrices de películas comestibles.

Biomaterial	Sustancia activa	Función	Referencia
Proteína de soya	Nisina y/o extracto de semilla de uva o té verde.	<i>Antimicrobiana</i>	Theivendran y col., (2006)
Aislado de proteína del suero de la leche	Aceites esenciales de orégano y pimienta	<i>Antimicrobiana y antioxidante</i>	Oussalah y col., (2004)
	Aceites esenciales de orégano, romero y ajo	<i>Antimicrobiana</i>	Seydim y Sarikus, (2006)
	α -tocoferol y ascorbil palmitato	<i>Antimicrobiana y antioxidante</i>	Han y Krochta, (2007)
Zeína	Lizosima, albumina y EDTA	<i>Antimicrobiana y antioxidante</i>	Gucbilmez y col., (2007)
Almidón de tapioca	Extracto de té verde	<i>Antimicrobiana</i>	Po-En y Lih-Shiuh, (2010)
Goma gelana	<i>Bifidobacterium lactis Bb 12</i>	<i>Probiótica</i>	Tapia y col., (2007)
Quitosano	Aceite de ajo, sorbato de potasio o nisina.	<i>Antimicrobiana</i>	Pranoto y col., (2005)
	Extracto de té verde	<i>Antioxidante</i>	Siripatrawan y Harte, (2010)

Evaluación de propiedades mecánicas, ópticas, antioxidantes y de barrera de películas comestibles elaboradas con emulsiones dobles $w_1/o/w_2$ adicionadas con extracto de té verde (*Camellia sinensis*).

2.1.8.1 Películas con antioxidantes

La incorporación de ascorbil palmitato, α -tocoferol y aceites esenciales dentro de películas o recubrimientos, puede evitar la oxidación de los ácidos grasos en alimentos (Tovar col., 2005; Salmieri y Lacroix, 2006; Han y Krochta, 2007; Po-En y Lih-Shiuh, 2010). Las películas elaboradas a partir de las proteínas y/o polisacáridos adicionadas con extractos naturales y aceites esenciales tales como orégano, salvia, té verde, romero, ajo y pimiento morrón tienen efectos antimicrobianos y antioxidantes, pueden ser útiles en la industria alimentaria para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas o causantes de la descomposición de alimentos como *Salmonella* y *Pseudomonas*. Además, pueden ser aplicadas en productos derivados de carnes rojas, aves y mariscos (Oussalah y col., 2004).

2.1.8.2 Té verde

El té verde, es nativo de China, y al igual que el té negro se obtiene de la misma especie de planta, *Camellia sinensis*. El té verde es preparado por medio de un proceso no fermentado donde es secado con vapor de agua para inactivar a la enzima polifenol oxidasa y con esto, evitar la oxidación. Los componentes del té verde incluyen a los polifenoles (catequinas y flavonoides), alcaloides (cafeína, teobromina, teofilina, etc), aceites volátiles, polisacáridos, aminoácidos libres, lípidos, vitaminas (por ejemplo, vitamina C), elementos inorgánicos (aluminio y manganeso), etc. Los polifenoles del té, anteriormente llamados taninos del té, también son conocidos como flavonoides del té. Las catequinas son la forma más predominante de polifenoles en el té verde. De hecho, las catequinas son los antioxidantes más poderosos conocidos entre los fenoles de las plantas. En hojas frescas, las

catequinas principales son (-)-epicatequina (EC), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epicatequina galate (ECG), (-)-epigalocatequina galate (EGCG), catequina (C), y galocatequina (GC). La (-)-epigalocatequina galate (EGCG) es la más abundante de las catequinas, seguida por EGC, ECG y EC. Estas estructuras son mostradas en la **figura 2.6**.

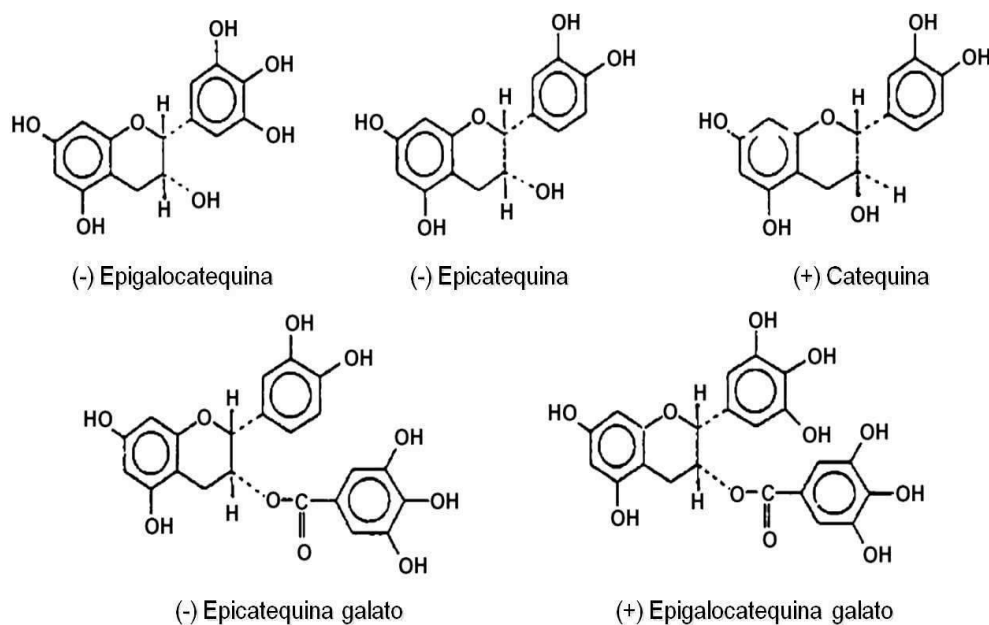


Figura 2.6 Estructura de las catequinas mayoritarias del té verde (*Camellia sinensis*).

Las catequinas han recibido una gran atención por sus grandes actividades biológicas como antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antiartrítico, antimutagénicas, antimicrobianas, antialérgicas, quemador de grasa, entre otras (Frei y Higdon, 2003; Gramza y Korczak, 2005; Nihal y col., 2005; Zaveri, 2006). Sin embargo, Se ha reportado que sus propiedades funcionales se pierden gradualmente debido a que son compuestos lábiles que cambian durante el tiempo de almacenamiento, el periodo de calentamiento y con el pH (Zhu y col, 1997; Wang y

col., 2000; Stach y Schmitz, 2001; Muzolf y col., 2008). Estudios clínicos recientes han determinado en pacientes enfermos de cáncer que la dosis máxima de extracto de té verde tolerada es de 4.2 g en una dosis ó 1.0 g tres veces por día. Estos estudios demostraron que el extracto de té verde es tolerado por el organismo y relativamente no toxico en dosis de hasta 4 g por día (Pisters y col., 2001; Chow y col., 2005).

El extracto de té verde tiene una gran potencial en la aplicación en el diseño de nuevos alimentos funcionales gracias a su actividad antioxidante y a todos los beneficios que posee sobre la salud humana. En alimentos, el extracto de té verde ha sido aplicado, en su mayoría, en bebidas (Wang y col., 2000). Recientemente, se han hecho estudios de películas y recubrimientos comestibles adicionados con extracto de té verde con función antioxidante y/o antimicrobiana para la conservación de ensaladas de frutas, lechuga romana y carne de cerdo (Po-En y Lih-Shiuh 2010; Siripatrawan y Harte, 2010).

2.1.9 Clasificación de películas comestibles

Películas simples

Las películas simples se caracterizan por tener solo un material formador de película (proteína, polisacárido o lípido), en algunos casos es usado algún tipo de agente plastificante para mejorar las propiedades mecánicas. Su formación es por medio de

casteo o vaciado en placa. Hasta ahora las películas simples han sido las más estudiadas para ser aplicadas en alimentos (Genadios y col, 1997).

Películas compuestas

Una película compuesta consiste en la combinación de uno o varios biopolímeros (proteína o polisacáridos) con algún lípido (cera o aceite). Pueden aplicarse como emulsión o como una película en bicapa. La finalidad del uso de varios materiales para la formación de una película compuesta es mejorar la adherencia al producto y las propiedades mecánicas y de barrera (Baldwin y col., 1995). Las películas emulsionadas son menos eficientes contra la transferencia de vapor de agua que las películas en bicapa debido a que en estas últimas la distribución de lípidos no es homogénea. Sin embargo, tienen la ventaja de presentar buena resistencia mecánica y requiere de un paso simple para su elaboración al igual que su aplicación. Las películas emulsionadas con tamaño de glóbulo de lípido más pequeño tienen mejores propiedades de barrera contra el vapor de agua. (Debeaufort y Voilley, 1995; Perez-Gago y Krochta, 2001). No obstante, la

permeabilidad al vapor de agua continuamente es muy parecida a las películas elaborada con proteína o polisacáridos (Morillon y col., 2002). Se ha encontrado que la permeabilidad al vapor de agua de una película emulsionada es 40 veces más grande que en una película en bicapa compuesta de hidroxipropilmetil celulosa y de ácido esteárico y palmítico (Kamper y Fennema, 1984). La mayoría de investigaciones sobre películas emulsionadas se han enfocado en emulsiones sencillas de tipo O/W. Murillo y col., (2010) han hecho los primeros estudios sobre películas comestibles elaboradas a base de emulsiones dobles de tipo $W_1/O/W_2$ para posibles aplicaciones futuras en alimentos. En la **tabla 2.3** se mencionan algunos reportes en la literatura sobre películas emulsionadas.

Tabla 2.3. Estudios reportados sobre películas comestibles emulsionadas

Tipo de emulsión	Fase acuosa	Fase oleosa	Referencia
$W_1/O/W_2$	WPI: Pectina o WPI: CMC	aceite mineral, Panodan SDK, Grindsted PGPR 90	Murillo y col., (2010)
O/W	Carragenina y glicerol	Grindsted-2000 y glicerol monoesterato	Karbowiak y col., (2007)
O/W	Metilcelulosa	Aceite y cera de parafina, trioleina, y aceite de palma hidrogenado	Quezada-Gallo y col., (2000)
O/W	Goma de mezquite	Aceite mineral, ácido oleico, cera de candelilla y/o cera de abeja	Bosquez-Molina y col., (2003)
O/W	Pectina y sorbitol	Cera de abeja	Maftoonazad y col., (2007)
O/W	Agar, almidón de yuca y glicerol	Grasa vegetal hidrogenada y sucroester SP40	Phan y col., (2009)
O/W	Almidón de tapioca/ goma de hoja de hsian- tsao	Sucrosa esteres y cera de abeja	Chien-Hsien y col.,(2009)
O/W	Almidón de chícharo y glicerol	Cera de abeja	Han y col., (2006)
O/W	Harina de amaranto y glicerol	Ácido esteárico	Colla y col., (2006)

Evaluación de propiedades mecánicas, ópticas, antioxidantes y de barrera de películas comestibles elaboradas con emulsiones dobles $w_1/o/w_2$ adicionadas con extracto de té verde (*Camellia sinensis*).

2.2 Emulsiones

Las emulsiones son sistemas dispersos, termodinámicamente inestables, de un líquido (fase interna o dispersa) dentro de otro (fase externa o continua), ambos líquidos mutuamente inmiscibles. La fase dispersa está presente en forma de gotas pequeñas suspendidas en una fase continua. Dependiendo del proceso de emulsificación, el diámetro de la gota puede variar entre 0.1 μm y 0.1 mm. El comportamiento de las emulsiones está determinado por las tres fases existentes en el sistema: la fase oleosa, la fase acuosa y la interfase. La fase oleosa puede ser parcial o totalmente cristalizada dependiendo de la temperatura. La fase acuosa puede contener iones, biomoléculas tales como polisacáridos y/o proteínas, etc. las cuales pueden tener un efecto estabilizante o desestabilizante. La interfase puede estar constituida de proteínas o de pequeños emulsificantes como monoglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos o alguna mezcla de ellos. Aunque las emulsiones se traten de dispersiones termodinámicamente inestables, se pueden convertir en cinéticamente estables gracias a la presencia de agentes tensoactivos o emulsionantes que tienen la capacidad de adsorción en la superficie de las gotas. Los tensoactivos se adsorben en la interfase formando una película densa alrededor de las gotas. Esta película previene la coalescencia de las gotas.

2.2.1 Clasificación

Existen dos tipos importantes de emulsiones, simples y múltiples o dobles, las cuales son ampliamente usadas tanto en aplicaciones prácticas como en productos industriales, preparaciones farmacéuticas, cosméticos, alimentos, entre otros.

Emulsiones simples

Las emulsiones simples se clasifican en dos tipos: 1) Emulsión aceite en agua (O/W, por sus siglas en inglés: oil-in-water) en éste tipo de emulsión las gotas de aceite son suspendidas en una fase acuosa continua. Estas emulsiones son las más versátiles, y se pueden encontrar en diversos tipos de alimentos (mayonesas, cremas de licores, helados, cremas batidas). 2) En las emulsiones agua en aceite (W/O, por sus siglas en inglés: water-in-oil) las gotas pequeñas de la fase dispersa son de agua y la fase continua son de aceite, algunos ejemplos característicos de alimentos elaborados con este tipo de emulsiones son la mantequilla, la margarina y en general todos los productos untables elaborados a base de grasas.

El tipo de emulsiones que se tiende a formar depende del balance entre las propiedades hidrofílicas e hidrófobas del agente emulsificante. Generalmente se suele cumplir la regla de Bancroft: la fase continua es aquella que solubiliza al agente emulsificante.

Emulsiones dobles

Las emulsiones dobles son también llamadas emulsiones múltiples o emulsión de emulsiones, en las cuales las gotas de la fase dispersa contienen dentro de ellas mismas pequeñas gotas dispersas. Cada glóbulo en la emulsión múltiple está separado de la fase acuosa por una capa de la fase oleosa. Las emulsiones se clasifican como: emulsión agua en aceite en agua (W/O/W, por sus siglas en inglés: water-in-oil-in-water), en la cual una emulsión O/W es dispersada en forma de gotas

dentro de una fase acuosa, y como emulsión aceite en agua en aceite (O/W/O, por sus siglas en inglés: oil-in-water-in-oil), en la cual una emulsión O/W es dispersada en una fase oleosa. Debido a que la fase interna y externa de las emulsiones múltiples están separadas por una capa líquida inmiscible son conocidas también como “membranas líquidas”. Las emulsiones W/O/W son las más comunes pero para algunas aplicaciones específicas las emulsiones O/W/O pueden también ser preparadas.

Preparación de las emulsiones dobles

En la mayoría de los casos las emulsiones dobles son preparadas en dos pasos, como se muestra en la **figura 2.7**, utilizando dos surfactantes; uno hidrofóbico designado para estabilizar la interfase de la emulsión interna W/O y uno hidrofílico para la interfase interna de los glóbulos de grasa (para una emulsión W/O/W). La emulsión primaria W/O es preparada dentro condiciones de homogenización altas para la obtención de gotas pequeñas mientras que la emulsión secundaria es llevada a cabo con condiciones menores de homogenización para evitar la ruptura de las gotas internas. El tamaño de gota de una emulsión doble puede variar entre 10 a 50 μm (Garti, 1998).

Las emulsiones dobles pueden tener numerosas aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética debido a capacidad que presentan para encapsular, proteger y liberar gradualmente compuestos activos, lábiles y volátiles. Las emulsiones dobles también son usadas en la fabricación de alimentos bajos en

grasa o aceite (Pays y col., 2002; Rodríguez-Huezo y col., 2004; Muschiolik, 2007; Jiménez-Alvarado y col., 2009).

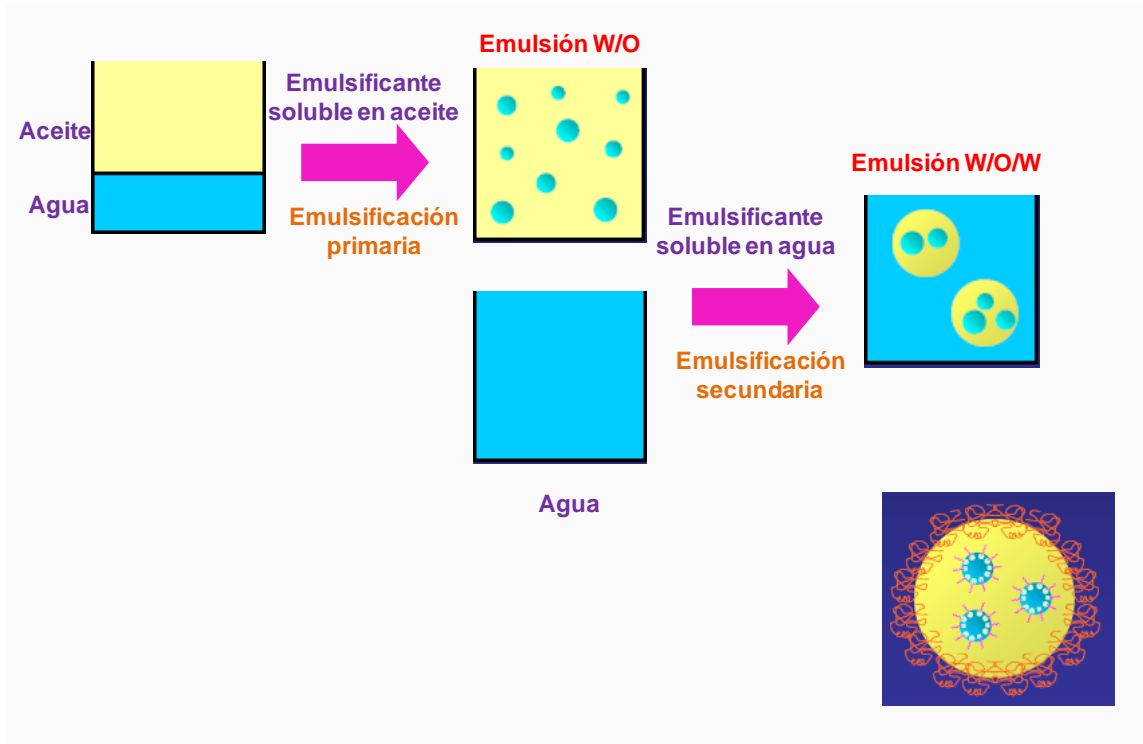


Figura 2.7. Preparación en dos pasos de una emulsión doble del tipo W/O/W

Morfología de las emulsiones doble

Las emulsiones múltiples se clasifican como tipo A, B y C. Esta clasificación es de acuerdo a la distribución y tamaño de gota presentes dentro de la emulsión. Como se representa en la **figura 2.8**, las emulsiones múltiples de tipo A contienen una sola

gota grande dentro de la fase interna, mientras que, las del tipo B contienen algunas gotas en la fase interna, y en las de tipo C su fase interna contiene una gran cantidad de gotas.

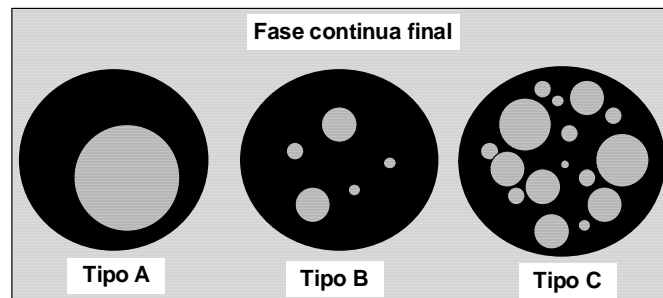


Figura 2.8. Clasificación de las emulsiones dobles

Mecanismos de inestabilidad en emulsiones dobles

Existen cuatro mecanismos posibles de desestabilización para las emulsiones múltiples W/O/W. Estos cuatro mecanismos son: (1) la coalescencia de las gotas de agua internas; (2) coalescencia de las gotas de aceite; (3) ruptura de la película de aceite resultando la pérdida interna de las gotas agua. (4) intercambio o difusión, de agua (y materiales solubles en agua). Florence y Whitehill, (1985) mencionaron que este tipo de fenómenos en las emulsiones múltiples pueden ser controlados con: (a) el uso de un aceite altamente viscoso para prevenir la difusión de agua y los materiales solubles en agua entre la fase acuosa interna y externa. (b) La

polimerización de las moléculas de surfactantes adsorbidas interfacialmente. (c) La gelación del aceite o de la fase acuosa de la emulsión.

2.2.2 Mecanismos generales de inestabilidad de las emulsiones

Una emulsión puede perder su estabilidad por los mecanismos que se muestran en la **figura 2.9**.

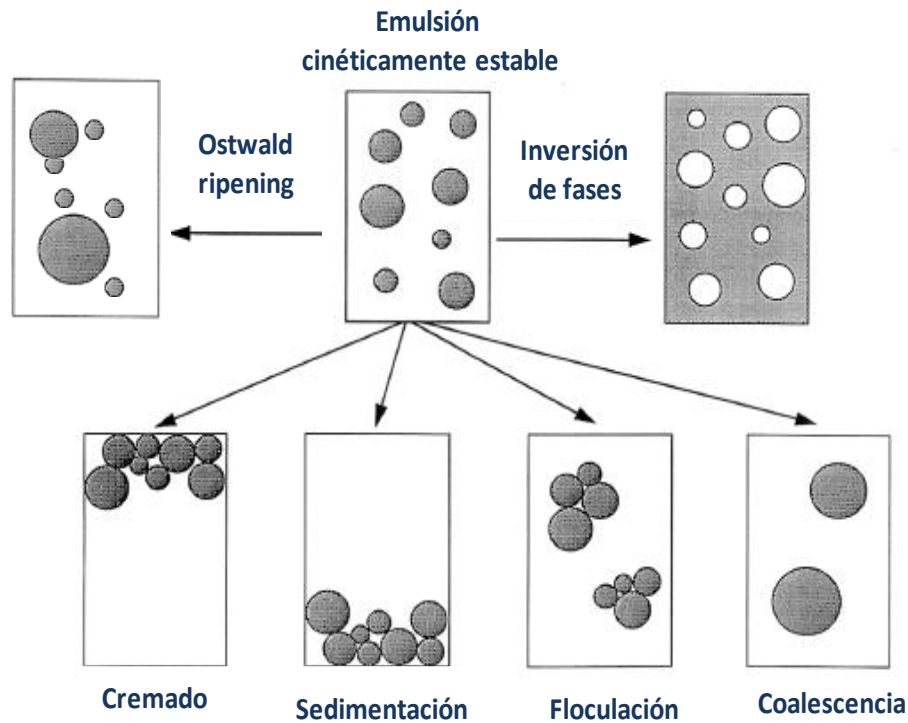


Figura 2.9. Mecanismos que favorecen a la inestabilidad de las emulsiones (McClements, 2005)

- ✓ **Cremado/sedimentación** ambas son formas gravitatorias de separación. Ambos procesos producen un gradiente vertical de concentración de gotas sin variar el tamaño de distribución de las mismas. El cremado describe el movimiento ascendente de las gotas debido a la diferencia de densidades de las fases.
- ✓ **Floculación** Es la adhesión de las gotas sin fusionarse y sin la variación en la distribución del tamaño de gotas. Este proceso está por el equilibrio entre las fuerzas de atracción electrostáticas de van der Waals y repulsiva de tipo estéricas.
- ✓ **Coalescencia.** Al igual que la floculación, la coalescencia es un proceso de agregación. La coalescencia es el proceso donde dos o más gotas se fusionan para formar una gota más grande con la eliminación de la interfase líquido/líquido.
- ✓ **Ostwald ripening** (engrosamiento de gota) Este proceso se debe al crecimiento de las gotas más grandes a costa de las gotas más pequeñas.
- ✓ **Inversión de fases.** Es el proceso en el cual una emulsión de tipo O/W se convierte en una emulsión W/O, o viceversa.

2.2.3 Emulsificantes

La gran tensión interfacial entre el agua y el aceite junto con una gran área interfacial implica que la emulsión tiene una energía de Gibbs alta en comparación con la de las fases por separado. La adición de un agente tensoactivo o emulsificante, disminuye

de forma considerable la tensión interfacial. De este modo puede disminuirse el requerimiento de energía de Gibbs para la formación de la emulsión. La tensión interfacial disminuye debido a la adsorción en la interfase del agente emulsificante, con el extremo polar en el agua y el extremo hidrocarbonado en el aceite.

Los emulsificantes son compuestos anfifílicos (del griego *amphi*, de ambos lados) Estas moléculas están constituidas por dos partes de naturaleza opuesta, hidrofílica (polar) e hidrofóbica (no polar). La parte polar o hidrófila es la que lleva la carga positiva o negativa, y esta parte define al agente emulsificante como catiónico o aniónico. Los agentes tensoactivos sin carga iónica son conocidos como no-iónicos (McClements, 2005). Cada material puede tener su balance hidrofílico-lipofílico (HLB). Los valores del HLB están asociados con la solubilidad que tiene el emulsificante, a valores menores de 8 es soluble en aceite, por otra parte, a valores de 10 ó más grandes es soluble en agua. Como una regla general, los emulsificantes de bajo y alto HLB son usados para formar emulsiones de tipo W/O y O/W, respectivamente (Becher, 2001). **En la figura 2.10** se muestra la estructura característica de un agente emulsificante.

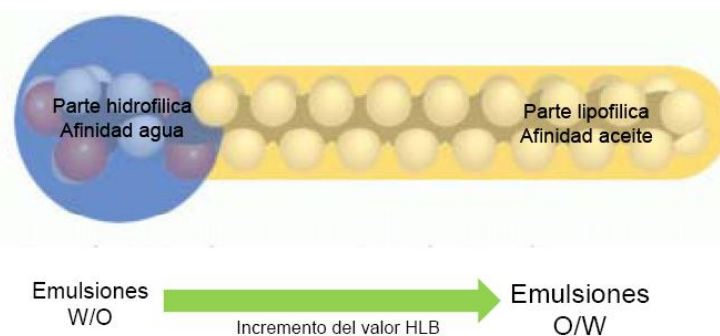


Figura 2.10. Estructura típica de un emulsificante

Biopolímeros como agentes emulsificantes

Los biopolímeros, proteínas y polisacáridos, juegan un papel importante como emulsificantes macromoleculares en las emulsiones. Las propiedades funcionales de las proteínas y los polisacáridos están determinadas por sus características moleculares, tales como su peso molecular, conformación, flexibilidad, polaridad e interacciones. Las proteínas y los polisacáridos son ampliamente usados en la industria alimentaria debido a sus propiedades funcionales. Existen varios estudios reportados en la literatura sobre emulsiones estabilizadas con polisacáridos como pectina, goma arábica, entre otros (Garti y Reichman, 1993; Huang y col., 2001). Las proteínas derivadas de la leche y el huevo son las más comúnmente usadas como agentes emulsificantes (Dickinson, 2009). Las proteínas pueden ser superficies activas debido a la existencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos en su estructura tales como el triptófano, la fenilalanina, leucina e isoleucina. Los grupos hidrofóbicos de las superficies de las proteínas penetran dentro de la gota de aceite mientras que la porción hidrofílica de la cadena se extiende dentro de la fase acuosa. La carga de las proteínas puede estabilizar las emulsiones debido a la repulsión entre las gotas cargadas. Mientras que las proteínas pueden estabilizar a las emulsiones O/W, por otra parte, desestabilizan a las de tipo W/O tales como las margarinas reducidas en grasa, causando una inversión de la emulsión.

Las proteínas y los polisacáridos forman complejos electrostáticos dentro de condiciones donde pueden tener cargas eléctricas opuestas. Las cargas eléctricas en las moléculas de proteínas cambian de carga positiva a negativa cuando el pH del medio es alterado por abajo y encima de su punto isoelectrico

3. JUSTIFICACION

La principal prioridad de los empaques bioactivos comestibles es la de mantener la integridad física de los alimentos, protegerlos contra factores fisicoquímicos deteriorativos, evitar su contaminación microbiológica, regular su tasa de respiración para prolongar su vida de anaquel, ser capaces de liberar controladamente compuestos y/o microorganismos bioactivos específicos, y no ser tóxicos al consumidor. A la fecha, no existe un solo bio-empaque en el mercado que logre reunir todas las características deseables mencionadas arriba. El uso de las emulsiones dobles abre la posibilidad de lograr que los bio-empaques comestibles sean capaces de reunir todas las propiedades funcionales mencionadas arriba, siempre y que en su diseño se utilicen materiales apropiados para lograrlo, que estén disponibles y sean relativamente baratos. En este trabajo, se evaluó el uso de distintos coacervados complejos de biopolímeros naturales para estabilizar las emulsiones dobles, y el efecto que tuvieron sobre las propiedades funcionales de los bio-empaques. En este estudio se estableció que el uso de emulsiones dobles estabilizadas por coacervados complejos de biopolímeros nos permite diseñar películas comestibles de nueva generación con propiedades funcionales expandidas y mejoradas.

4.OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar las propiedades mecánicas, ópticas, antioxidantes y de barrera al vapor de agua de películas comestibles elaboradas a partir emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ estabilizados con complejos proteína-polisacárido incorporando extracto de té verde (*Camellia sinensis*)

Objetivos particulares

1. Formulación de emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ estabilizadas con complejos proteína: polisacárido e incorporando extractos de té verde.
2. Evaluación de las propiedades reológicas de las emulsiones.
3. Obtención de películas comestibles a partir del vertido en placa de las emulsiones dobles.
4. Evaluación de las propiedades ópticas, antioxidantes, mecánicas y de barrera al vapor de agua de las películas elaboradas, y cambio en estas propiedades con el tiempo de almacenamiento.
5. Estudio de la topología de las películas por microscopía electrónica de barrido.

5. HIPÓTESIS

La formación de películas comestibles a partir de emulsiones dobles, permite mejorar las propiedades mecánicas, de barrera y de liberación controlada de sustancias activas, a través del diseño de las dos membranas interfaciales de estos sistemas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

El aceite mineral (AM; NF-85 grado alimenticio) fue comprado en materiales y abastos especializados, S.A. de C.V. (México, D.F., México). El emulsificante hidrosoluble (EHS; Panodan SDK ésteres, de mono glicéridos y di glicéridos de diacetil ácido tartárico) y el emulsificante liposoluble (ELS; Grindsted PGPR 90, ésteres de poliglicerol y poliricinolato de ácidos grasos) fueron comprados en Danisco México, S.A. de C.V (México, D.F., México). El aislado de proteína de suero de leche (WPI, Bipro[®]) con un contenido 90% de proteína de materia seca, fue donado por Davisco Foods International (Le Sueur, MN., E.U.A). Pectina de bajo metóxilo (LMP, Low-methoxyl pectin; Grindsted LC-950) fue de Dannova Química, S.A. de C.V (México, D.F., México). Carboximetil celulosa de sodio (CMC, Blanose[®], goma de celulosa 7LF-pH) por Acualon, una división de Hércules Inc. (Widnes, Cheshire,UK). El glicerol, el ácido clorhídrico (HCl) e Hidróxido de Sodio (NaOH) fueron de J. T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México); se usó agua deionizada en todos los experimentos, y el reactivo azida de sodio (Hycel de Mexico, S.A. de C.V., México, D.F., México) fue usado como conservador.

6.2 Preparación de la emulsión

6.2.1 Condiciones principales para la formulación de las emulsiones dobles W1/O/W2

6.2.1.1 Potencial Z

Se utilizó el método reportado por Jiménez-Alvarado y col., (2009). Brevemente, cada uno de los biopolímeros se disolvió en agua desionizada a las concentraciones de: 0.3%: CMC, 0.7%: LMP y 5%: WPI, porcentajes p/p. Las soluciones fueron preparadas y almacenadas a 4°C durante 24 h para su hidratación. El potencial Z de las soluciones acuosas de biopolímeros a diferentes valores de pH se evaluó usando el equipo zetasizer nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). El pH de las soluciones de biopolímeros se ajustó adicionando HCl 0.1 N y/o NaOH 0.1N. Se encontró el pH de mayor diferencia estequiométrica entre las cargas electrostáticas de la proteína (Pr) y los polisacáridos (Ps).

6.2.1.2 Punto de equivalencia de las soluciones de biopolímeros

El punto de equivalencia de las soluciones acuosas de biopolímeros (0.3%: CMC, 0.7%: LMP y 5%: WPI) fue determinado de las curvas de titulación, usando soluciones estandarizadas de HCl 0.1N ó NaOH 0.1N. Cada titulación fue

monitoreada con un potenciómetro vernier pH-BTA (Beaverton, OR, EUA) a una temperatura de 25° C (Espinosa-Andrews y col., 2010).

6.2.1.3 Formulación y preparación de las emulsiones dobles

Las emulsiones dobles fueron preparadas a temperatura ambiente usando dos etapas de emulsificación (Rodríguez-Huezo y col., 2004). En la primera etapa, 0.5 de la fracción de masa de la fase dispersa ($\Phi W_1/O$) agua en aceite W_1/O , de la emulsión primaria fueron preparadas empleando una concentración total de surfactantes ELS: EHS del 10% p/p en la proporción de 6:4, de acuerdo a lo reportado por Jiménez-Alvarado y col., (2009). La fase acuosa interna (agua desionizada + EHS) fue adicionada lentamente a la fase oleosa (O) (AM + ELS) homogenizando con un equipo Ultra Turrax (modelo T50basic, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) a 7600 rpm por un tiempo de 15 min. En la segunda etapa, la emulsión primaria W_1/O fue reemulsificada a 4000 rpm por 5 min usando el homogenizador Ultra Turrax dentro de la solución acuosa de CMC + WPI o LMP + WPI, con las proporciones de biopolímeros establecidas basadas en el punto de equivalencia. Inmediatamente después de la formación de la emulsión, el pH de la emulsión doble fue ajustado a los pHs, donde la formación máxima del complejo Pr:Ps determinada por la medición del potencial zeta, usando HCl 0.1 N ó NaOH 0.1 N para permitir la formación de los complejos de biopolímeros en la interfase externa aceite-agua. La fracción de fase dispersa en masa ($\Phi W_1/O/W_2$) en la emulsión ($W_1/O/W_2$) fue de 0.2. Las emulsiones $W_1/O/W_2 E_{CMC-WPI}$ y $E_{LMP-WPI}$, fueron elaboradas por triplicado.

6.3 Propiedades reológicas de las emulsiones dobles

Se empleó un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania), con una geometría cono-plato, diámetro de cono de 50 mm y con ángulo de cono de 2°, para la evaluación de todas las mediciones reológicas. La temperatura fue controlada con el equipo Physica TEK 150P. Las muestras de las emulsiones dobles fueron colocadas cuidadosamente dentro del sistema de medición, y se dejaron reposar por una hora para la recuperación de la estructura y para equilibrar la temperatura. Se utilizó una trampa de solvente para evitar la deshidratación de la muestra. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25° C. Para la caracterización reológica de las muestras se realizaron pruebas de flujo estacionarias y oscilatorias. En las pruebas de flujo, el intervalo de la tasa de corte fue de 0.001 a 100 s⁻¹ y la viscosidad aparente se registro como la tasa de corte. La determinación de la curva de viscosidad en un amplio intervalo de valores de tasa de corte fue esencial para resolución de la ecuación de flujo. Esto se hace usualmente para ajustar los puntos de los datos a uno de los modelos de viscosidad. Nuestros datos experimentales obtenidos mostraron que la curva de viscosidad contra tasa de corte tiene una región de viscosidad constante, seguida por un comportamiento de una alta tasa de corte, pero sin alcanzar los valores límite de viscosidad. Se usó el modelo de Carreau modificado en el cual la viscosidad infinita fue considerada despreciable para modelar las curvas de viscosidad contra tasa de corte (Chen y col., 2009):

$$\eta = \eta_0 [1 + (\lambda \dot{\gamma})^2]^{\frac{(n-1)}{2}} \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde η es la viscosidad aparente (Pa s), $\dot{\gamma}$ es la tasa de corte (S^{-1}), η_0 (Pa s) es la viscosidad a baja tasa de corte, λ (s) es una constante de tiempo característica relacionada con el tiempo de relajación de una emulsión doble floculada, y n (adimensional) es el índice de comportamiento en la ley de potencia.

Se llevaron a cabo barridos dinámicos de amplitud (0.01-100% deformación) bajo una frecuencia constante (1 rad s^{-1}) con la intención de determinar el intervalo viscoelástico lineal, en el que las propiedades reológicas no dependen del esfuerzo ni de la deformación. Del intervalo viscoelástico lineal se eligió un nivel de deformación del 0.5% para realizar los barridos de frecuencia a $0.1-100 \text{ rad s}^{-1}$. El módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G'') y la viscosidad compleja (η^*) fueron considerados como función de la frecuencia (Steffe, 1996). En todos los casos, se analizaron los datos utilizando el software del equipo Rheoplus/32 V2.62. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

6.4 Evaluación del tamaño de gota

El diámetro superficial volumétrico (d_{32}) de la emulsión doble fue medido con un analizador de tamaño y distribución de partícula Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK). Todas las emulsiones fueron analizadas por triplicado.

6.5 Elaboración de las películas

Con 6 h de preparación, cada emulsión doble fue vertida en placas de vidrio con ayuda de un aplicador de película (Paul N. Gardner Company, Inc., Pompano Beach, FL, EUA). Las emulsiones dobles fueron secadas en un horno convectivo a 25 ± 1 °C (Felisa, modelo FE, México D. F., México) por 5 h para la obtención de las películas comestibles $F_{LMP-WPI}$ y $F_{CMC-WPI}$. Las películas fueron removidas de la superficie de vidrio con una espátula delgada. Cada película fue cortada en círculo y en rectángulo para la evaluación de la permeabilidad al vapor de agua y de las propiedades mecánicas, respectivamente (Bósquez-Molina y col., 2003).

- La evaluación de todas las propiedades de las películas se realizaron una vez obtenidas después del secado en placa (t_0) y después de 15 días de almacenamiento (t_{15}) dentro de una cámara a una HR del 50% a temperatura ambiente.

6.6 Elaboración de películas con extracto de té verde.

0.75 g de extracto de té verde (Gencor Pacific, China) fueron adicionados en la fase acuosa interna de la emulsión primaria W_1/O . La elaboración de la emulsión doble $W_1/O/W_2$ se realizó acorde a lo reportado en la **sección 6.2.1.3**. Para fabricación de las películas se siguió el mismo método de la sección **6.5**.

6.7 Evaluación de fenoles totales de las películas

Se colocaron 0.1 g de películas en 10 mL de metanol y se almacenaron en la oscuridad por 20 h a temperatura ambiente. La evaluación de fenoles totales de las películas se realizó por medio del método de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Alícuotas de 0.5 mL de las soluciones donde fueron solubilizadas las películas se mezclaron con 2.4 mL de agua desionizada, 2 mL de una solución de carbonato de sodio (NaCO_3) al 2%, y 0.1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Alemania). Después se incubaron por 1 h a temperatura ambiente; la absorbencia de las mezclas se midió en un espectrofotómetro a 750 nm utilizando como blanco agua desionizada. La concentración de compuestos fenólicos totales en las muestras son expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG), los cuales reflejan el contenido de compuestos fenólicos como la cantidad de ácido gálico en mg por gramo de masa seca de la muestra. Para la realización de los cálculos utilizó la ecuación obtenida de la curva de calibración ($R^2 = 0.9995$), previamente elaborada.

$$Abs_{750} = 0.041 \text{ mg de ácido gálico} + 0.022 \dots\dots \text{Ecuación (2)}$$

6.8 Actividad antioxidante de las películas

Se colocaron 0.1 g de cada una de las películas en 10 mL de metanol, las muestras fueron almacenadas en la oscuridad por un tiempo 20 h a temperatura ambiente. La evaluación de la actividad antioxidante de las películas se llevó a cabo empleando

dos métodos espectrofotométricos. El espectrofotómetro Varian Cary, modelo 50 Bio (Varian, Sprinvale, Australia) fue utilizado para la lectura de absorbencia. En ambas técnicas cada muestra fue evaluada por triplicado.

6.8.1 Método FRAP

El ensayo FRAP (por sus siglas en inglés: Ferric Reducing/Antioxidant Power) evalúa la capacidad antioxidante de la muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el Fe^{+3} presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), que presenta un máximo de absorbencia a una longitud de onda entre 590 y 595 nm (Benzie y Strain, 1996). El ensayo FRAP se llevó a cabo utilizando el método reportado por Othman y col., (2007), con ligeras modificaciones. El reactivo FRAP fue preparado mezclando buffer de acetatos (246.1 mg de acetato de sodio en 10 mL de una solución acuosa de ácido acético al 10 % (v/v)), con la solución de TPTZ (Sigma-Aldrich, Alemania) (31.23 mg de TPTZ y 37 % de ácido clorhídrico en 10 mL de agua destilada), y la solución de FeCl_3 (54.06 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de agua destilada) en proporciones de volumen de 10:1:1. Todas las soluciones fueron usadas el mismo día de su preparación. El reactivo FRAP (0.5 mL), agua destilada (0.05 mL) y 0.016 mL de cada una de las soluciones donde se disolvieron las películas fueron mezclados dentro de viales e incubados en la oscuridad por 30 min a temperatura ambiente, y posteriormente se midió la absorbencia a 593 nm. Durante éste experimento se utilizó agua destilada como blanco. Previamente se hizo una curva de calibración con trolox (Sigma Aldrich,

Alemania). La capacidad antioxidante fue reportada en equivalentes de trolox: μmol de trolox/g de muestra.

6.8.2 Método DPPH

La actividad antioxidante de las muestras de las películas fueron evaluadas utilizando el método DPPH (por sus siglas en inglés: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), reportado por Brand-Williams y col., (1995), con algunas modificaciones. Brevemente, 0.1 mL de cada una de las soluciones donde fueron disueltas las películas se mezclaron con 3.9 mL de la solución metanólica 100 μM de DPPH (Fluka Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), y se almacenaron en la oscuridad por 30 min. La absorbencia de las muestras fue medida a 515 nm, en celdas de cuarzo. Para cada muestra se calculó el porcentaje de inhibición del radical por medio de la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_{DPPH} - Abs_{muestra}}{Abs_{DPPH}} \times 100 \dots \dots \dots \text{Ecuación (3)}$$

Donde Abs_{DPPH} es la absorbencia a 515 nm de la solución metanólica de DPPH y $Abs_{muestra}$ es la absorbencia a 515 nm de cada una de las soluciones de las películas junto con el radical.

6.9 Evaluación del espesor

Se midió el espesor en cinco zonas diferentes de las películas ($P_{LMP-WPI}$ y $P_{CMC-WPI}$) con ayuda de un micrómetro digital (Mitutoyo, Tokyo, Japan). Cada película fue puesta dentro de los sujetadores del micrómetro y posteriormente se ajustó con el tambor del mismo micrómetro para medir el espesor. Las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua fueron calculadas usando el promedio del espesor de cada película (Villagómez-Zavala y col., 2008).

6.10 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas fueron evaluadas acorde a la norma ASTM D882 (ASTM, 2000), para ello se utilizó un analizador de textura TA, XT2 (Technologies Corp., Scarsdale, NY, EUA). Antes de la prueba, las películas fueron cortadas en secciones rectangulares de 80 mm de largo y 25 mm de ancho, y almacenadas dentro de una cámara con una solución saturada de bromuro de sodio a 25°C (Phan y col., 2009). La separación inicial de agarre y la velocidad de extensión fueron fijadas a 50 mm y 0.8 mm min⁻¹, respectivamente (Osés y col., 2009). Las propiedades mecánicas de las películas evaluadas fueron: el porcentaje de elongación (% E), la resistencia a la tensión (RT) y el Módulo de Young (MY). Se utilizaron 10 películas de cada formulación para esta evaluación.

6.11 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua se evaluó de acuerdo la norma ASTM E96-80 (1980), con algunas modificaciones hechas por McHugh y col., (1993). La permeabilidad se midió utilizando un gradiente de humedad de 0-100% de HR a 25°C.

Para la realización se utilizaron celdas circulares de metacrilato, con un diámetro interno de 5.08 cm y 1.1 cm de profundidad (**Figura 6.1**) En su interior se colocaron 6 mL de agua destilada y posteriormente se fijaron las películas a evaluar entre la superficie y la tapa de la celda, siempre dejando un espacio de aire por debajo de la película.

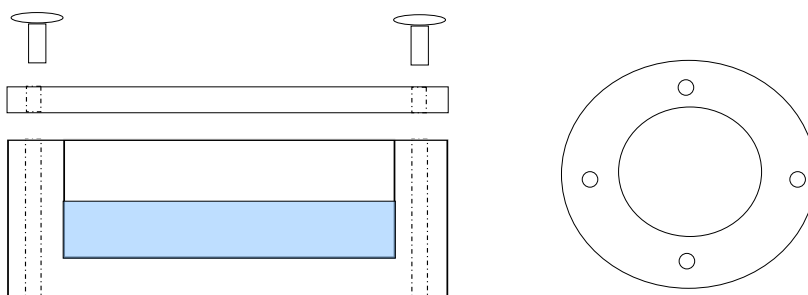
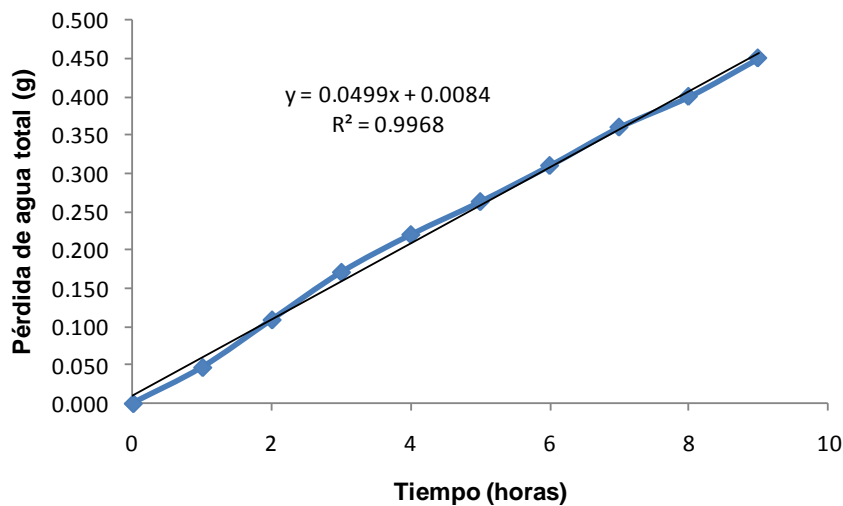


Figura 6.1. Imagen transversal y de la tapa de la celda de metacrilato para la medición de la transmisión al vapor de agua.

De esta forma la cara de la película fue expuesta a una humedad relativa cercana al 100%. Las películas se sellaron a las celdas con la ayuda de 4 tornillos simétricamente localizados alrededor de la circunferencia de las mismas.

Después de haber colocado las películas en las celdas, se introdujeron en una cabina desecante (Sanplatec Corp., Japón) que contenía un absorbente de humedad (sílica gel) para asegurar una humedad del 0% en su interior (**Anexo A**). En la parte superior de la cabina se utilizó un ventilador Elco (Milano, Italia) que genera una corriente de aire a una velocidad de 150 m/min para mantener las condiciones de ensayo uniformes en todos los puntos evitando la acumulación del vapor de agua que sale de las celdas (McHugh y col., 1993; Osés y col., 2009).

La permeabilidad al vapor de agua (WVTR, por sus siglas en inglés: water vapour transmission) se calcula como el cociente entre la pendiente de la curva de pérdida de agua vs tiempo y el área de la película expuesta. Se evalúa en condiciones conocidas de espesor, temperatura y gradiente de presión.



$$WVTR = \frac{\text{Pérdida de agua}}{\text{Tiempo} \times \text{Área}} \equiv \frac{g}{h \times m^2} \dots\dots\dots \text{Ecuación (4)}$$

Si éste valor de WVTR lo dividimos entre las presiones parciales de vapor de agua de las dos caras de la película ensayada obtenemos la permeación.

$$\text{Permeación} = \frac{WVTR}{P_{A1} - P_{A2}} \equiv \frac{g}{h \times m^2 \times KPa} \dots\dots\dots \text{Ecuación (5)}$$

La presión parcial del vapor de agua por encima de la película (P_{A2}) se considera cero, por la presencia de las sales desecantes y la intensidad de la renovación del aire mediante el ventilador. Por debajo de la película la norma asume que $P_{A1} = P_{A0}$ (presión de vapor saturado) para películas con muy baja permeabilidad. Sin embargo, McHugh y col., (1993) encontraron que esta igualdad no es correcta para películas hidrofílicas que impiden que se alcance el equilibrio de humedad. Por lo tanto, para conocer P_{A1} debemos de conocer la humedad relativa exacta debajo de la película y para ello usamos la corrección propuesta por McHugh y col., (1993).

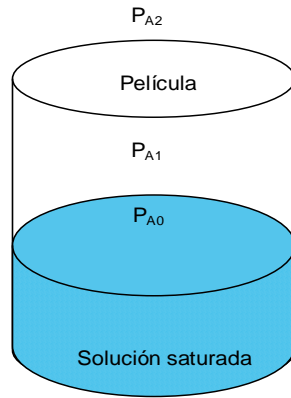


Figura 6.2. Celda para evaluar la permeabilidad al vapor de agua

$$P_{A1} = (P - P_{A0}) e^{\frac{WVTR \times R \times T \times Z}{P \times D}} \dots\dots\dots \text{Ecuación (6)}$$

Donde:

- ✓ P_{A1} : presión en la superficie interior de la película
- ✓ P : presión atmosférica (Pa)
- ✓ P_{A0} : presión en la superficie del agua o presión de vapor saturado (Pa)

$$P_{A0} = 4.84 T^2 - 52.24 T + 1449.63 \text{ (T en } ^\circ\text{C)}$$

- ✓ WVTR: flujo de agua en la capa de aire (moles/m² s)
- ✓ R : constante universal de los gases (8.314 J/K mol)

- ✓ T: temperatura (en K)
- ✓ Z: altura de la capa de aire (m)
- ✓ D: difusividad (en m²/s) del agua en aire

$$D = 22.441 \times 10^{-13} T^{2.8696} \text{ (T en K)}$$

Finalmente, la permeabilidad al vapor de agua (WVP, por sus siglas en inglés: water vapour permeability) de cada una de las películas fue calculada mediante la relación:

$$WVP = \text{permeación} \times \text{espesor} \dots \dots \dots \text{Ecuación (7)}$$

Por lo tanto, la permeabilidad de una película se expresa en:

$$WVP = \frac{g \times mm}{kPa \times h \times m^2}$$

6.12 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto de las gotas de agua con la superficie de la película fue medido usando un contactómetro de ángulo (TANTEC, Schaumburg, IL, EUA)

(Anexo A). Se colocó una gota de agua con una jeringa (~ 0.033 mL) en la superficie de la película. El ángulo de contacto entre la línea base de la gota y la tangente al límite (**figura 6.3**) se midió por medio de la proyección del perfil de la gota en una pantalla y con ayuda de un transportador acoplado al equipo. Las mediciones fueron tomadas en la orilla y en el centro de la superficie de las película, inmediatamente y después de 3 min de haber puesto la gota en la superficie de la película.

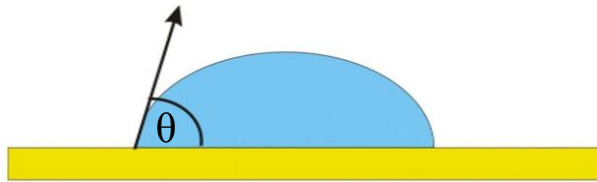


Figura 6.3. Representación del ángulo de contacto de una gota de agua en la superficie de una película.

6.13 Propiedades ópticas de las películas

6.13.1 Índice de color

El índice de color (IC^*) de las películas fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$IC^* = \frac{(a^* 1000)}{L^* b^*} \dots\dots\dots \text{Ecuación (8)}$$

Algunas secciones de las películas fueron colocadas en la placa estándar para la evaluación de los parámetros de color en la escala CIELab. El parámetro L^* proporciona un valor de brillo o luminancia de la película. El parámetro a^* indica la zona de variación entre el rojo y el verde. El parámetro b^* se refiere a la variación entre el amarillo y el azul. Los parámetros de color fueron medidos en cinco zonas diferentes de las películas con tres repeticiones para cada película, usando un colorímetro CM 2500d (Minolta Camera Co., Ltd, Osaka, Japan).

Los cambios de color de la muestra de acuerdo a los valores IC^* son los siguientes (Vignoni y col., 2006):

- (a) Si IC^* es negativo (-40 a -20), el color de la muestra se encuentra en el intervalo de color del azul-violeta al verde oscuro.
- (b) Si IC^* es negativo (-20 a -2), el color de la muestra se encuentra en el intervalo de color del verde oscuro al verde amarillento.
- (c) Si IC^* está entre -2 a +2, representa el amarillo verdoso.
- (d) Si IC^* es positivo (+2 a +20), el color de la muestra se encuentra en el intervalo de color del amarillento pálido al naranja intenso.
- (e) Si IC^* es positivo (+20 a +40), el color de la muestra se encuentra en el intervalo de color del naranja intenso al rojo profundo.

6.13.2 Transparencia

La transparencia de las películas fue determinada acorde a la norma ASTM D1746 (ASTM, 1997). Secciones de películas de 2 mm x 40 mm fueron colocadas en un espectrofotómetro DU 650 (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA) donde se midió su absorbencia a 560 nm. Cada medición se realizó por triplicado. La evaluación se llevó a cabo a la temperatura de $20 \pm 2^\circ \text{C}$ y a una HR del $50 \pm 5\%$. El porcentaje de transparencia se calculó por medio de la siguiente expresión:

$$TR = \frac{I_r}{I_0} \times 100 \dots\dots\dots \text{Ecuación (9)}$$

Donde I_r es la intensidad del haz de luz emitida por el equipo con la muestra, y I_0 es la intensidad del haz luz emitida por el equipo sin la muestra a 560 nm.

6.14 Microscopía electrónica de barrido

La microestructura de las películas comestibles fue determinada utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL-JSM-6390LV (Jeol, Ltd., Akishima, Japón), operado a 20KV. Las películas fueron cubiertas con una capa fina de oro con un sistema de vacío LLC1259 (Moorestown, NJ, EUA). Finalmente, se fijaron con cinta adhesiva horizontalmente y a 90° en la superficie de un soporte.

6.15 Análisis estadístico

Para el análisis de resultados se hizo un análisis de varianza (ANOVA), con tres replicas y con un nivel de significancia del 5%. Se utilizó el método de Duncan para la comparación de medias entre tratamientos para ello se empleó el *software* estadístico SPSS versión 12.0 para Windows (Chicago, IL, EUA).

7.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Formulación de la emulsión doble

Las medidas de movilidad electroforética de cada una de las soluciones acuosas de biopolímeros indicaron que la densidad de carga negativa de 0.7 % p/p de la solución de LMP fue siempre más grande que la solución de CMC al 0.3 % p/p, independientemente del pH. La diferencia máxima electroforética de las cargas electrostáticas entre las proteínas y polisacáridos ($|\Delta|_{MV}$) fue de 53.7 mV a pH 3.5 para LMP:WPI y de 38.3 mV a pH 4.0 para CMC:WPI. El punto de equivalencia de las muestras de biopolímeros fue determinado mediante el punto de inflexión de las curvas de titulación. Se encontró que para las muestras de biopolímero de WPI (5%), CMC (0.3 %) y LMP (0.7 %), hay 0.90, 1.05 y 1.00 miliequivalentes de NaOH, respectivamente, los niveles relativos entre los biopolímero utilizados para la estabilización de la emulsión doble fueron 14.3:1 para CMC:WPI y 6.4:1 para LMP:WPI. La concentración total más adecuada de las mezclas de biopolímeros utilizados en la fase acuosa externa (W_2) para la formación de la emulsión doble fue de 7.5 %, esta concentración permitió obtener películas comestibles que ha

concentraciones de biopolímeros inferiores (donde la emulsión era muy fluida) o superiores (donde la emulsión era muy viscosa).

7.2 Tamaño de gota de la emulsión

Ambas emulsiones dobles fueron compuestas por gotas esféricas de aceite que contenían dentro de su interior un gran número de gotas de agua, de modo que las emulsiones dobles presentaron morfologías de tipo C (Lobato-Calleros y col., 2008). Las mezclas de biopolímeros utilizadas como estabilizantes en la fase acuosa externa afectaron el diámetro superficial volumétrico (d_{32}) que fue de $2.47 \pm 0.04 \mu\text{m}$ para la emulsión estabilizada por el complejo LMP:WPI ($E_{\text{LMP-WPI}}$) y de $10.68 \pm 0.28 \mu\text{m}$ para la emulsión estabilizada por CMC:WPI ($E_{\text{CMC-WPI}}$). En ambas mezclas de biopolímeros los niveles de polisacáridos predominaron sobre los niveles de proteína, de tal modo que al ser mezclados vigorosamente, ambos polisacáridos, fueran difundidos para llegar a la interface de la gota aceite-agua de recién formada (Bergenståhl, 1995). El concentrado de proteína y el aislado son buenos materiales formadores de emulsiones y brindan estabilidad a corto plazo, ya que tienen la capacidad de adsorberse y desdoblarse rápidamente en la interfase aceite-agua (Euston y Hirst, 2000). La acción de la CMC fue la de un agente estabilizador en lugar de un agente emulsificante, actuando como un agente espesante macromolecular, incrementando la viscosidad de la fase acuosa y modificando su reología (Coffey y col., 1995). Al parecer una combinación de mecanismos de estabilización se llevó a cabo en la emulsión doble $E_{\text{CMC-WPI}}$. Por un lado, se llevó a cabo la adsorción de las moléculas de WPI en la superficie de la gota, pero no lo suficiente para cubrir por completo las superficies de las gotas, de modo que cuando

se terminó de mezclar ocurrió la incipiente coalescencia de las gotas, con un tamaño de gota de aceite cada vez mayor (Jayasundera y col., 2009) calculando la concentración de la capa mononuclear de β -lactoglobulina en una gota de $0.75 \mu\text{m}$ de grasa a 2.27 mg por m^2 asumiendo el 100% de la superficie cubierta y 1.95 mg por m^2 suponiendo un 86% cubierto. Del mismo modo, se llevó a cabo la formación de una capa de macromoléculas hidratadas de CMC alrededor de cada gota de la emulsión, pero la viscosidad aparente de la capa macromolecular alrededor de las gotas de aceite que estaban en su mínimo debido al comportamiento de adelgazamiento de CMC. Al final de la agitación, aumentó la viscosidad retardando la colisión y la agregación de las gotas.

Leroux y col., (2003) reportaron que la pectina posee propiedades de superficie activa atribuida a los residuos de proteínas presentes dentro de las moléculas de pectina. Así, en el caso de la emulsión $E_{\text{LMP-WPI}}$, algunas moléculas de LMP también se adsorbieron en las superficies de las gotas de aceite junto con las moléculas de WPI, previniendo en mayor medida una incipiente coalescencia, resultando un menor promedio de d_{32} que en el caso de la emulsión $E_{\text{CMC-WPI}}$.

7.3 Propiedades reológicas de las emulsiones dobles

7.3.1 Propiedades reológicas estacionarias

La **figura 7.1** muestra la gráfica de la viscosidad aparente contra la tasa de corte para las emulsiones $E_{\text{LMP-WPI}}$ y $E_{\text{CMC-WPI}}$. El comportamiento de corte constante de

ambas emulsiones dobles indicó que se comportaron como materiales estructurales típicos, mostrando una región newtoniana a una tasa de corte baja y una región reoadelgazante en un intervalo de tasa de corte mayor. Estas características de viscosidad que son típicas de muchos fluidos no newtonianos (fluidos poliméricos, dispersiones floculadas, coloides) se deban probablemente a una “estructura” que se forma en el reposo o en el estado de equilibrio. Cuando se aplica un esfuerzo de corte se provoca una ruptura de la estructura del material, lo que provoca que dicho material tenga un comportamiento dependiente del corte (Darby, 1996). El dato experimental de la **figura 7.1** se ajustó muy bien al modelo de Carreau modificado ($R^2 > 0.979$) y los valores para los parámetros reológicos η_0 , λ y n de las emulsiones dobles se resumen en la **tabla 7.1**. La emulsión $E_{LMP-WPI}$ mostró un valor significativamente alto de η_0 pero no un valor significativamente bajo de λ y n , comparado con la emulsión $E_{CMC-WPI}$. Los valores altos de η_0 sugieren que las interacciones más fuertes posiblemente ocurren entre los complejos adsorbidos de biopolímeros entre gotas de aceite vecinas para la emulsión $E_{LMP-WPI}$ que para $E_{CMC-WPI}$.

En la segunda emulsión, el número de gotas por unidad de volumen es sustancialmente más bajo que para la $E_{LMP-WPI}$, lo cual requirió que fuese aplicado un esfuerzo de corte más alto para que ocurriera una ruptura del material (Chen y col., 2009) y un tiempo más bajo (λ más bajo) para recuperar la estructura.

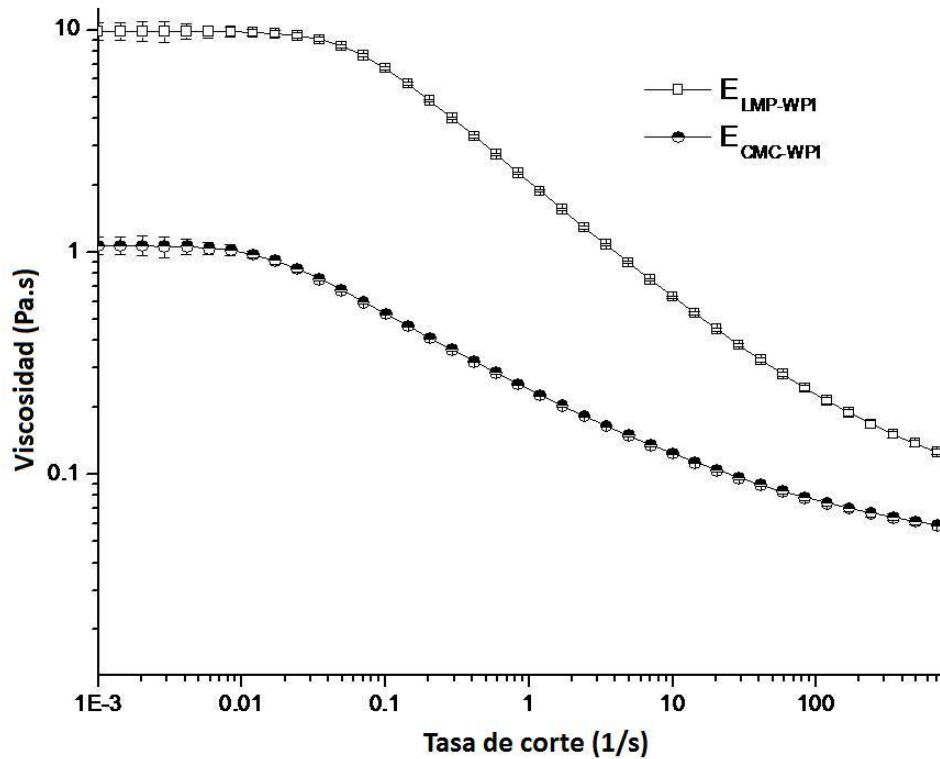


Figura 7.1. Cambios en la viscosidad aparente en función de la tasa de corte para las emulsiones dobles

Tabla 7.1. Modelo reológico de Carreau Modificado para las emulsiones dobles

Emulsión doble	R ²	n (adimensional)	λ (s)	η ₀ (Pa s)
E _{LMP-WPI}	0.99	0.44 ^a	17.5 ^a	9.9 ^a
E _{CMC-WPI}	0.97	0.65 ^b	67.6 ^b	0.8 ^b

Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$); n=3 para todos los tratamientos.

7.3.2 Propiedades reológicas dinámicas

Los cambios en G' y G'' como función de la frecuencia de la emulsión doble se muestran en la **figura 7.2**. La emulsión $E_{LMP-WPI}$ exhibe valores más altos de G'' que de G' a bajas ($\sim < \text{rad s}^{-1}$) y altas ($\sim 6 \text{ rad s}^{-1}$) frecuencias, pero valores similares en frecuencias entre 1 y 5 rad s^{-1} . La emulsión $E_{CMC-WPI}$ exhibe valores más altos de G'' y G' a lo largo de todo el intervalo de frecuencia. Ambos módulos mostraron una dependencia significativa a la frecuencia, la cual se incrementó al aumentar dicho parámetro. Las variaciones de G' junto con el incremento de oscilación y amplitud se relacionan más con el comportamiento de las interacciones topológicas débiles de las cadenas poliméricas, que de geles normales. G' no supera a G'' a frecuencias altas, como se esperaría de un sistema de redes complejas. (Peressini y col., 2003). Mientras que la emulsión $E_{CMC-WPI}$ mostró un comportamiento más parecido al de un líquido en el intervalo de frecuencia ensayado, la emulsión $E_{LMP-WPI}$ mostró un comportamiento más complejo que la previa. Este comportamiento puede deberse a la diferencia de tamaño de las gotas de las emulsiones dobles. Mientras que el comportamiento general fue más líquido que sólido, muestra un intervalo de frecuencia en el que G' y G'' se superponen, lo que muestra que este comportamiento se relaciona más con una red embebida en una matriz suave y la rigidez en esas regiones se puede producir por entrecruzamiento químico o físico (Rodríguez-González y col., 2004).

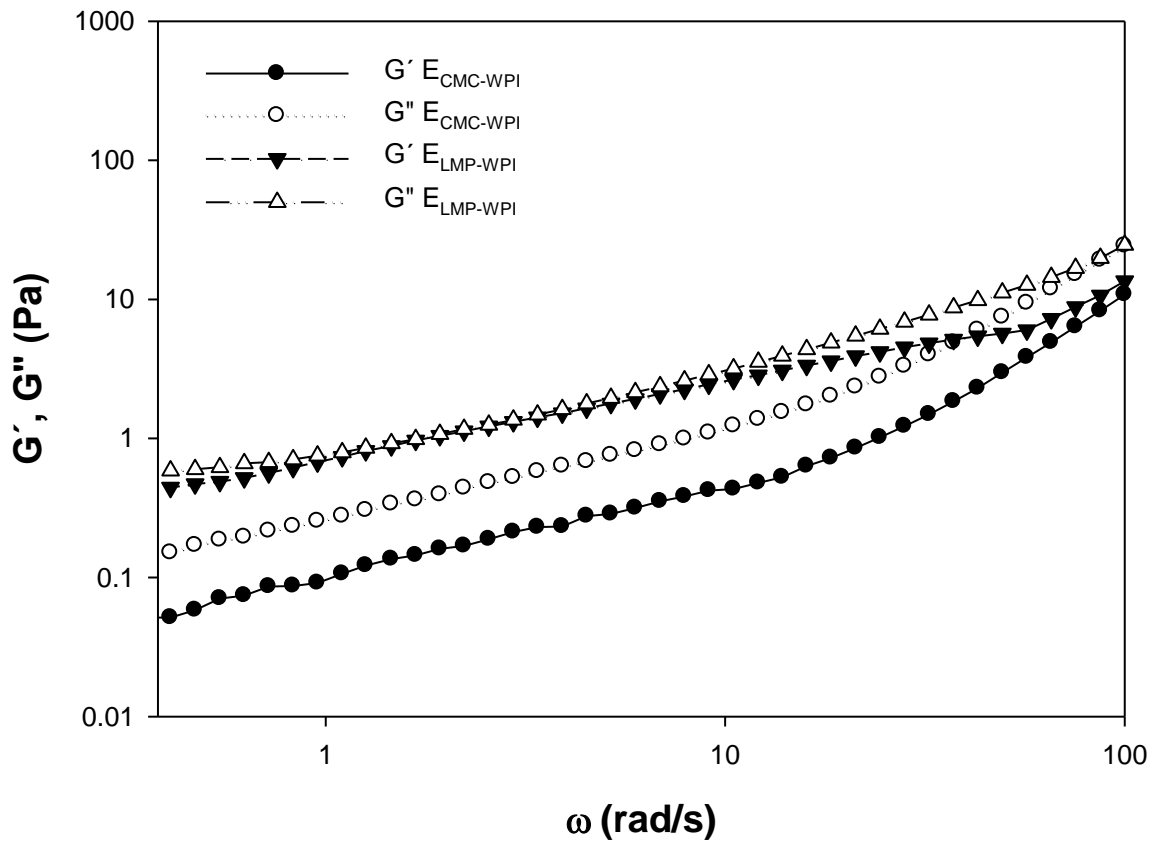


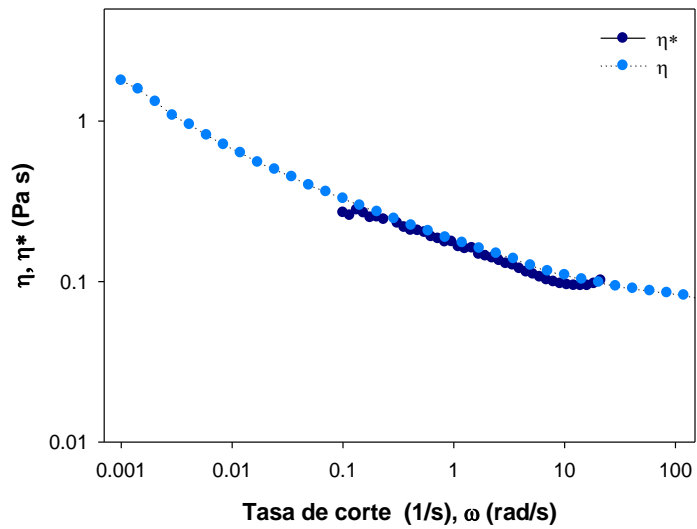
Figura 7.2. Cambios en los modulo de almacenamiento (G') y de perdida (G'') durante el barrido de frecuencia de 0.5% de deformación para las emulsiones dobles.

7.3.3 Prueba de la regla de Cox-Merz

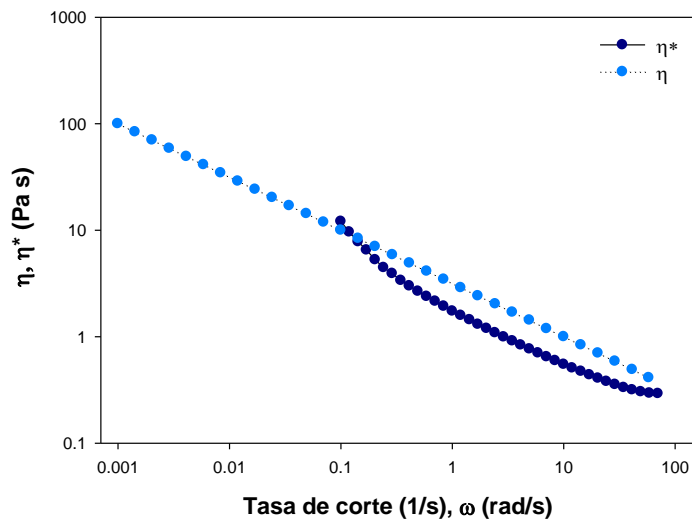
Una regla empírica muy conocida respecto a las mezclas de biopolímeros es la de Cox y Merz (1958), lo que indica simplemente que la magnitud de la viscosidad

compleja (η^*) es igual al de la viscosidad de corte (η) a valores iguales de frecuencia radial (ω) y de tasa de corte (γ). La aplicación de la regla tiene un gran valor en la reología de polímeros, así como ayuda a predecir $\eta(\gamma)$ de mediciones oscilatorias ó $|\eta^*(\omega)|$ de los datos de viscosidad en estado estacionario. Se puede aprender mucho de la microestructura de los materiales según el grado al que se apeguen a la regla. La **figura 7.3** muestra las gráficas de Cox-Merz para las emulsiones $E_{LMP-WPI}$ y $E_{CMC-WPI}$. La superposición de las viscosidades dinámicas y de estado estacionario ocurre en un intervalo amplio de ω y γ para la emulsión $E_{LMP-WPI}$ (fig. 7.3a), pero no para la $E_{CMC-WPI}$. La superposición Cox- Merz de curvas en mediciones de viscosidad en corte estacionario y de viscosidad dinámica es consistente con las interacciones del tipo de formación de complejos de las especies individuales (Haque y Morris, 1993).

Aunque las correlaciones de las propiedades reológicas y estructurales son en general complejas, y están fuera del alcance de este trabajo, la asociación de una pequeña deformación y las mediciones reológicas en estado estacionario combinada con otros métodos, así como con técnicas de microscopía, pueden brindar pistas valiosas para establecer condiciones adecuadas para la fabricación de emulsiones dobles para la obtener películas comestibles para aplicaciones específicas.



(a)



(b)

Figura 7.3. Prueba de la regla de Cox Merz para las emulsiones dobles: (a) estabilizada por el complejo pectina de bajo metoxilo-aislado de proteína de suero de leche, y (b) estabilizada por el complejo carboximetilcelulosa-aislado de proteína de suero de leche

7.4 Apariencia de las películas

Aparentemente las películas fueron homogéneas y flexibles. A simple vista sus superficies fueron lisas, sin poros y con algunas grietas. Las películas obtenidas a partir de las emulsiones $E_{LMP-WPI}$ y $E_{CMC-WPI}$ fueron muy distintas en color a las obtenidas de las emulsiones con té verde $E_{LMP-WPI-TV}$ y $E_{CMC-WPI-TV}$, estas últimas presentaron un tono café debido a la adición del extracto de té verde (**figura 7.4**). La flexibilidad de las películas elaboradas con las emulsiones dobles estabilizadas por el complejo CMC:WPI ($P_{CMC-WPI}$) siempre fue mayor que las películas elaboradas con la emulsión estabilizada por LMP:WPI ($P_{LMP-WPI}$), por otra parte, la adición de extracto de té verde les brindo flexibilidad. En general, todas las películas resultaron ser opacas e inodoras.

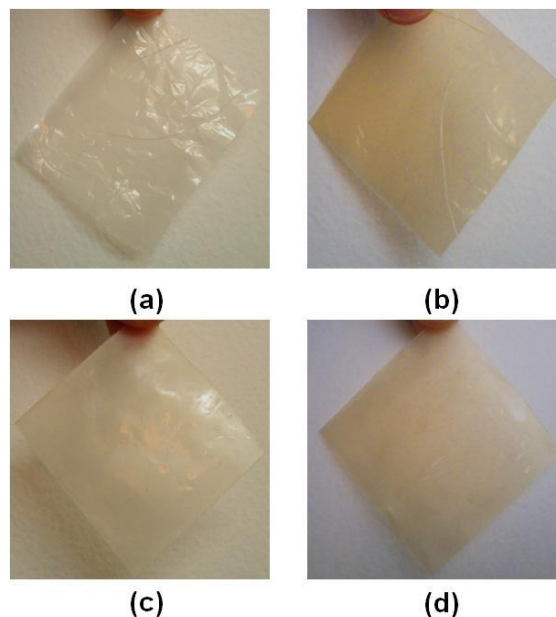


Figura 7.4. Películas elaboradas a partir de emulsiones dobles con y sin extracto de té verde: (a) $P_{CMC-WPI}$, (b) $P_{CMC-WPI-TV}$, (c) $P_{LMP-WPI}$, y (d) $P_{LMP-WPI-TV}$.

7.5 Propiedades ópticas

La diferencia de los espesores de las películas fue insignificante oscilando entre 183 y 203 μm (**tabla 7.2**). Las películas se desprendieron fácilmente de la placa de vidrio donde fueron elaboradas. El porcentaje de transparencia de todas las películas de emulsiones dobles disminuyó significativamente con el tiempo de almacenamiento, las películas que presentaron más cambios fueron las películas $P_{\text{CMC-WPI}}$ y $P_{\text{CMC-WPI-TV}}$ variando entre un 13.36 y 13.87 % de su transparencia inicial ($t=0$), respectivamente.

La transparencia de las películas con y sin extracto de té verde fue baja (**Tabla 7.2**), pero fue significativamente más alta para las películas $P_{\text{LMP-WPI}}$ y $P_{\text{LMP-WPI-TV}}$ que para las películas $P_{\text{CMC-WPI}}$ y $P_{\text{CMC-WPI-TV}}$. Esta transparencia baja probablemente se debió a la morfología de las emulsiones dobles, cuyos tamaños de gotas de aceite eran relativamente grandes, las cuales en su interior contenían múltiples gotas de agua dispersas, provocando un alto grado de desviación del haz de luz del espectrofotómetro. Los valores de porcentaje de transparencia que presentaron las películas elaboradas a base de emulsiones dobles, en general, fueron inferiores a los reportados por Ozdemir y Floros (2008) para películas de WPI adicionadas con sorbitol y sorbato de potasio, pero para las películas $P_{\text{LMP-WPI}}$ y $P_{\text{LMP-WPI-TV}}$ los porcentajes de transparencia fueron muy parecidos a los de películas de WPI con cera de abeja al y sorbitol.

Los índices de color de las películas (**tabla 7.2**) indican que sus valores se encuentran en un intervalo de color de verde oscuro (-20) y amarillo verdoso (-2)

(Vignoni y col., 2006), y que la película $P_{LMP-WPI}$ tiene un componente amarillo significativamente superior que la $P_{CMC-WPI}$. Por otra parte, la adición de extracto de té verde les dio un IC a las películas $P_{CMC-WPI-TV}$ y $P_{LMP-WPI-TV}$ de verde amarillento (-2) a (2). En éste mismo intervalo de color se encontraron las películas $P_{CMC-WPI}$, $P_{CMC-WPI-TV}$, $P_{LMP-WPI}$ y $P_{LMP-WPI-TV}$ que se vieron afectadas significativamente por el tiempo de almacenamiento de 15 días.

Tabla 7.2 Propiedades ópticas, % transparencia e índice de color, y Espesor de las películas comestibles.

Película	Espesor (mm)	Transparencia (%)		Índice de color	
		t=0	t=15	t=0	t=15
$P_{CMC-WPI}$	0.185 ± 0.006^a	6.81 ± 0.92^{Ac}	5.90 ± 0.47^{Bc}	-4.62 ± 0.04^{Ad}	-1.37 ± 0.13^{Bc}
$P_{CMC-WPI-TV}$	0.183 ± 0.009^a	6.20 ± 0.63^{Ac}	5.34 ± 0.06^{Bc}	2.05 ± 0.31^{Aa}	1.11 ± 0.10^{Ba}
$P_{LMP-WPI}$	0.200 ± 0.010^a	16.39 ± 0.85^{Aa}	15.46 ± 0.54^{Ba}	-2.98 ± 0.34^{Ac}	-0.94 ± 0.04^{Bb}
$P_{LMP-WPI-TV}$	0.203 ± 0.005^a	15.02 ± 0.79^{Aa}	14.97 ± 0.66^{Ba}	1.63 ± 0.03^{Ab}	0.93 ± 0.04^{Ba}

Letras mayúsculas A-B Indica que hay diferencia significativa entre el tiempo de almacenamiento. Letras minúsculas a-d Indica hay diferencia significativa entre las formulaciones de las película. Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$); $n=3$ para todos los tratamientos.

7.6. Ángulo de contacto

En la **tabla 7.3** se muestran los ángulos de contactos obtenidos para las películas de inmediato y después de 3 min de depositar la gota de agua en la superficie. El ángulo de contacto inicial ($\theta_{t=0}$) y después de 3 min. ($\theta_{t=3}$) fueron significativamente mayores para la película $P_{LMP-WPI}$ y $P_{LMP-WPI-TV}$ que para la $P_{CMC-WPI}$ y $P_{CMC-WPI-TV}$, y fueron significativamente más altos en el centro que en borde. La diferencia en los valores

de θ a $t = 0$ y a $t = 3$ min fueron menores para la película $P_{LMP-WPI}$ y $P_{LMP-WPI-TV}$ que para la $P_{CMC-WPI}$ y $P_{CMC-WPI-TV}$. Estas películas poseen superficies hidrofílicas, ya que exhiben ángulos de contacto $\theta < 65$ en todo momento (Hambleton y col., 2009a). Los ángulos de $\theta_{t=0}$ y $\theta_{t=3}$ mostrados por las películas pueden ser atribuidos probablemente a la modificación de sus superficies, debido a la solvatación, hidratación o al engrosamiento, que a su vez podría haber causado un reordenamiento espacial y la coalescencia de las gotas (internas y externas) de la emulsión doble. Estos fenómenos por lo general alcanzan un equilibrio metaestable durante los primeros 20 o 30 s (Hambleton y col., 2009b).

Tabla 7.3. Ángulos de contacto de las películas de emulsiones dobles

Película	Ángulo de contacto			
	Centro (t=0 min)	Centro (t=3 min)	Orilla (t=0 min)	Orilla (t=3 min)
$P_{CMC-WPI}$	50.0 ± 0.0^{Ab}	27.5 ± 0.7^{Bc}	42.0 ± 0.0^{Ab}	30.5 ± 0.7^{Bc}
$P_{CMC-WPI-TV}$	37.0 ± 1.4^{Ad}	20.5 ± 0.7^{Bcd}	32.5 ± 0.7^{Ad}	23.0 ± 1.4^{Bd}
$P_{LMP-WPI}$	52.5 ± 0.7^{Aa}	50.0 ± 0.0^{Ba}	48.0 ± 0.0^{Aa}	36.5 ± 0.7^{Ba}
$P_{LMP-WPI-TV}$	40.5 ± 0.7^{Ac}	37.5 ± 0.7^{Bb}	36 ± 1.4^{Ac}	34.0 ± 0.0^{Bb}

Letras mayúsculas A-B Indica que hay diferencia significativa entre el tiempo de almacenamiento.
 Letras minúsculas a-d Indica hay diferencia significativa entre las formulaciones de las película.
 Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$);
 $n=3$ para todos los tratamientos.

7.7 Propiedades mecánicas de las películas comestibles

Las películas elaboradas a base de complejos biopoliméricos son materiales viscoelásticos que poseen características tanto de sólidos como de líquidos. Una matriz tridimensional, construida por la interacción entre los biopolímeros que forman el complejo, es probablemente la estructura de soporte que determina las

propiedades mecánicas de las películas. Las interacciones entre los biopolímeros, el disolvente, el plastificantes, los lípidos y otros aditivos dispersos en los espacios de la matriz, también contribuyen en las propiedades mecánicas de las películas (Chen, 1995).

Las propiedades mecánicas son importantes para las películas comestibles, ya que una resistencia mecánica adecuada asegura la integridad de las películas y la ausencia de defectos menores, tales como perforaciones ó poros.

La información cuantitativa de los parámetros mecánicos de las películas comestibles es esencial para su diseño. La resistencia a la tensión (o más adecuadamente, resistencia máxima a la tensión) es la resistencia máxima a la tensión que las películas pueden soportar. La elongación es usualmente tomada en el punto de rompimiento y es expresada como el porcentaje de variación de la longitud inicial de la muestra. El módulo de elasticidad, o módulo de Young es la relación entre el estrés de la tensión en la región lineal y las medidas de rigidez intrínsecas de la película.

En la **tabla 7.4** se muestran los valores de las propiedades mecánicas de las películas comestibles obtenidas a partir de emulsiones dobles. Se observaron diferencias entre las propiedades mecánicas de las películas $P_{LMP-WPI}$ y $P_{CMC-WPI}$, las cuales pueden ser atribuidas al efecto de los biopolímeros en el tamaño de las gotas de la emulsión y a las interacciones entre las moléculas de biopolímeros que forman la estructura principal de la película. De esta manera, la película $P_{LMP-WPI}$ formada por gotas de la emulsión relativamente pequeñas y con un gran entrecruzamiento

principal de biopolímeros (**Figura 7.6**) mostró una mayor resistencia a la tensión y modulo de Young, pero con un porcentaje menor de elongación que los observados para la película P_{CMC-WPI}. Esta última tenía una estructura formada por gotas de la emulsión relativamente grandes inmersas principalmente en biopolímeros relajados y ordenados (**Figura 7.5**).

Tabla 7.4. Propiedades mecánicas de las películas comestibles.

Película	Resistencia a la tensión (MPa)		% Elongación		Módulo de Young (MPa)	
	t=0	t=15	t=0	t=15	t=0	t=15
P _{CMC-WPI}	0.93 ± 0.11 ^{Ac}	0.82 ± 0.10 ^{Bc}	6.11 ± 0.87 ^{Ab}	4.9 ± 2.4 ^{Bb}	48.76 ± 4.90 ^{Ac}	39.1 ± 5.3 ^{Bd}
P _{CMC-WPI-TV}	1.66 ± 0.18 ^{Aab}	1.31 ± 0.11 ^{Bab}	10.63 ± 1.44 ^{Aa}	7.71 ± 0.76 ^{Ba}	88.19 ± 8.41 ^{Ab}	53.60 ± 6.71 ^{Bc}
P _{LMP-WPI}	1.49 ± 0.17 ^{Ab}	1.24 ± 0.10 ^{Bb}	2.15 ± 0.43 ^{Ac}	1.67 ± 0.17 ^{Bc}	119.74 ± 48.61 ^{Aa}	89.78 ± 10.63 ^{Bb}
P _{LMP-WPI-TV}	1.80 ± 0.32 ^{Aa}	1.47 ± 0.28 ^{Ba}	2.83 ± 0.67 ^{Ac}	1.34 ± 0.24 ^{Bc}	142.95 ± 32.74 ^{Aa}	102.75 ± 7.43 ^{Ba}

Letras mayúsculas A-B Indica que hay diferencia significativa entre el tiempo de almacenamiento.

Letras minúsculas a-d Indica hay diferencia significativa entre las formulaciones de las película.

Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes (p < 0.05); n=3 para todos los tratamientos.

El tamaño de partícula de las emulsiones dobles incrementó con la adición del extracto de té verde siendo de 7.15 µm para E_{LMP-WPI-TV} y de 14.10 µm para E_{CMC-WPI-TV}. Las películas formadas con estas emulsiones presentaron mayor RT y MY que las P_{LMP-WPI} y P_{CMC-WPI}. No se observó diferencia en los % E de las películas P_{LMP-WPI-TV} y P_{CMC-WPI-TV}. El tiempo de almacenamiento disminuyó significativamente las propiedades mecánicas de las películas elaboradas con emulsiones dobles, al parecer durante el tiempo de almacenamiento de 15 días sucedió una deshidratación de las películas y/o cristalización de los plastificantes y tensoactivos provocando el

cambio de las propiedades mecánicas, decreciendo la flexibilidad de la matriz de la película y aumentando la permeabilidad al vapor de agua (Dangaran y Krochta, 2007; Chien-Hsien y col., 2009).

Los resultados de la resistencia a la tensión están estrechamente relacionados con los resultados reológicos (estacionarios y dinámicos) Los valores de RT y %E exhibidos por las películas comestibles fueron del mismo orden que los indicados para las películas elaboradas a base de concentrado de proteína de suero de leche o las de caseinato de calcio adicionadas con diferentes plastificantes, fases lipídicas o nutraceuticos (Chen, 1995; Mei y Zhao, 2003; Villagómez-Zavala y col., 2008). Sin embargo, RT y %E fueron mucho menores (uno o dos órdenes de magnitud inferiores) a los valores correspondientes de las películas elaboradas con polímeros sintéticos (polietileno de baja y alta densidad) (Chen, 1995).

Los materiales muestran diferentes patrones de resistencia a la tensión. Por ejemplo, las películas de metilcelulosa tienen alta resistencia a la tensión y baja elongación, y las películas de proteína tienen una resistencia a la tensión moderada y elongación alta. Las películas de metilcelulosa son duras y frágiles, y las películas de proteína son resistentes y suaves. Estas diferencias pueden ser atribuidas a las diferentes estructuras moleculares. Las proteínas generalmente son de configuración sofisticada por sus complejas interacciones intra e intermoleculares y por la gran variedad de grupos de sus cadenas laterales. La estructura principal de los polisacáridos generalmente es lineal (Chen, 1995).

El módulo de Young para la película $P_{LMP-WPI}$ fue aproximadamente la mitad, y el de la película $P_{CMC-WPI}$, fue aproximadamente una cuarta parte de los de los valores de este parámetro para películas obtenidas a partir de mezclas binarias de hidrocoloides (goma de mezquite-concentrado de proteína de leche; alginato de sodio-kappa carragenina; concentrado de proteína de leche-alginato de sodio; concentrado de proteína de leche-kappa carragenina) adicionadas con glicerol. Las películas, $P_{LMP-WPI}$, $P_{LMP-WPI-TV}$, $P_{CMC-WPI}$ y $P_{CMC-WPI-TV}$, tendieron a mostrar propiedades mecánicas más parecidas a las de las películas elaboradas a base de proteína que a las de polisacáridos, a pesar de que en la proporción de polisacárido: proteína fue mayor en el lado de los polisacáridos. Estos resultados confirman que el WPI fue el biopolímero que más fuertemente se absorbió en la interfase aceite-agua responsable en mayor medida de las propiedades impartidas por la emulsión doble.

7.8 Microestructura

La sección transversal de las películas $P_{CMC-WPI}$ y de $P_{LMP-WPI}$ se observó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), lo cual reveló una microestructura que consistía en gotas de una emulsión doble elongadas y distribuidas de una manera bastante compacta en un marco de biopolímeros. La distorsión progresiva de las gotas de aceite en la emulsión se ha asociado con la evaporación de la fase continua acuosa. La evaporación de la fase continua acuosa causó compresión de la emulsión con una distorsión progresiva y adelgazamiento de las capas de agua que las separan (Aranberry y col., 2004). Aunque las películas $P_{CMC-WPI}$ y $P_{LMP-WPI}$ presentaron las mismas características estructurales principales, mostraban diferencias en las características estructurales de los marcos de biopolímeros y en el tamaño y distribución espacial de las gotas de emulsión. EL marco de la película

$P_{\text{CMC-WPI}}$ (**Figura. 7. 5a**) mostró una microestructura orientada, que consiste principalmente en estructuras de apariencia fibrosa atribuidas a agregados de los biopolímeros que lo conforman, rodeando las gotas de emulsión (puestas en evidencia por los espacios vacíos que originalmente son ocupados por las gotas de tamaño relativamente grande que corresponden a la emulsión de $E_{\text{CMC-WPI}}$. En contraste, el marco de la $P_{\text{LMP-WPI}}$ (**Figura. 7. 6a**) fue más compacto y menos ordenado que el de la película de $P_{\text{CMC-WPI}}$ (Fig. 7.5a) y fue interrumpido por gotas de emulsión más pequeñas que corresponden a la emulsión de $E_{\text{LMP-WPI}}$ que las que se observaron para la película de $P_{\text{CMC-WPI}}$. La apariencia suave de los marcos de las películas y las diferencias en el tamaño y la distribución espacial de las gotas de la emulsión fueron más evidentes cuando se observaron en las micrografías del MEB a alta magnificación (figuras. 7.5b y 7.6b). Parece que a un alto grado de entrecruzamiento ocurrido entre los biopolímeros adsorbidos en la interface cuando las gotas de emulsión son más pequeñas, resultan en un marco más cerrado en la película (en la de $P_{\text{LMP-WPI}}$).

Las superficies de las películas, en términos generales, tuvieron una apariencia homogénea y suave (Figs. 7.5c y 7.6c). Sin embargo, algunas partículas con forma granular fueron observadas en la superficie de las películas. La pérdida de agua debida a la evaporación de la superficie de la emulsión durante la formación de la película pudo haber permitido un gradiente en la concentración del agua, causando insolubilidad del conjunto de polímeros en solución, resultando en los depósitos superficiales observados.

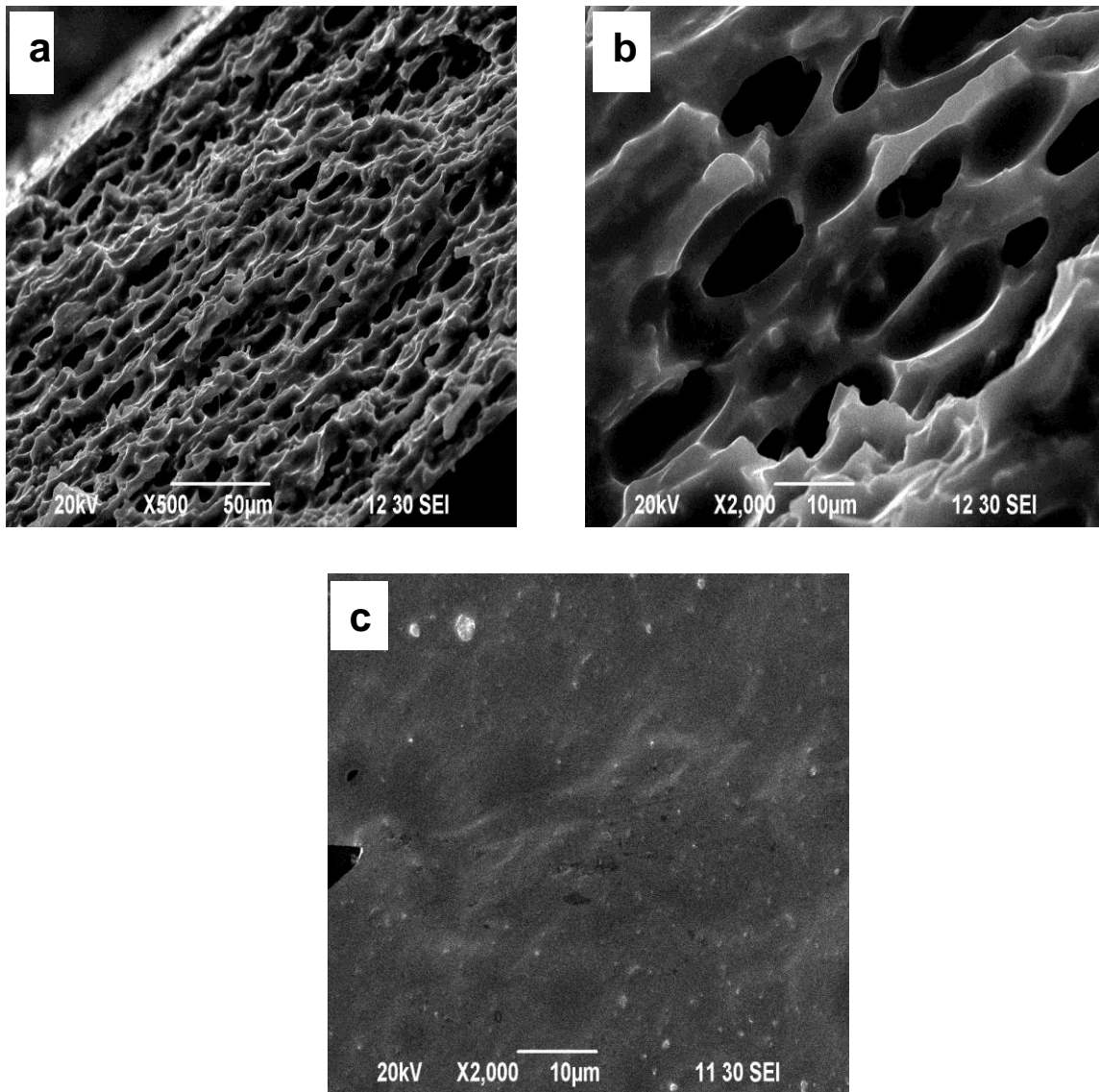


Figura 7.5. Micrografías SEM de la película comestible ($P_{\text{CMC-WPI}}$) obtenida a partir de la emulsión doble estabilizada con el complejo carboximetilcelulosa (CMC)-aislado de proteína de suero de leche (WPI): (a) y (b) sección transversal de la película con un aumento de 500X y 2000X, respectivamente, y (c) superficie de la película

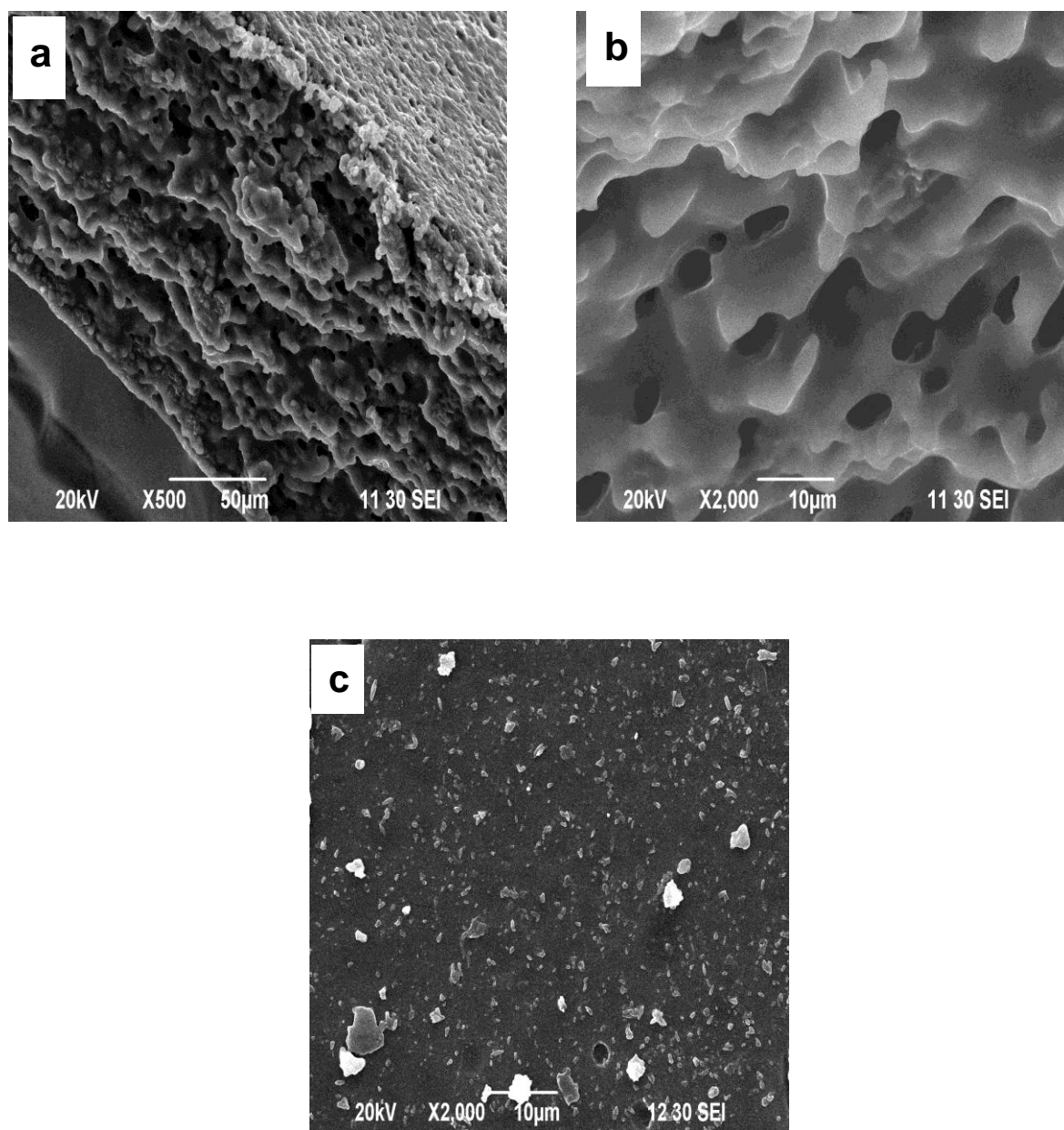


Figura 7.6. Micrografías SEM de la película comestible ($P_{LMP-WPI}$) obtenida a partir de la emulsión doble estabilizada con el complejo pectina de bajo metoxilo (LMP)-aislado de proteína de suero de leche (WPI): (a) y (b) sección transversal de la película con un aumento de 500X y 2000X, respectivamente, y (c) superficie de la película.

7.9 Permeabilidad al vapor de agua

Los valores de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de las películas no fueron significativamente diferentes entre las películas $P_{LMP-WPI}$ y $P_{CMC-WPI}$ como se muestra en la **tabla 7.5**. Estos resultados indican que la estructura de la capa adsorbida de complejos de biopolímeros alrededor de la emulsión doble no afectó finalmente la WVP de las películas.

De acuerdo a los valores de WVP de las películas $P_{LMP-WPI-TV}$ y $P_{CMC-WPI-TV}$ la adición de extracto de té verde disminuyó significativamente la permeabilidad de las películas comestibles. La WVP de las películas $P_{CMC-WPI-TV}$ fue 6% menor a las $P_{CMC-WPI}$, mientras que la de las $P_{LMP-WPI-TV}$ fue 8.7 % inferior que las $P_{LMP-WPI}$. Esto indicaría posiblemente que cierta cantidad de compuestos fenólicos del extracto de té verde no quedaron dentro de la emulsión W_1/O y que probablemente, establecieron interacciones de tipo puente de hidrógeno y covalentes con los polisacáridos y/o hidrofóbicas con las proteínas de la capa de complejos poliméricos de la emulsión doble.

Las películas elaboradas con emulsiones dobles con y sin extracto de té verde tuvieron valores de permeabilidad de $(1.41-1.61 \text{ g mm m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ kPa}^{-1})$ menores a los de otras películas elaboradas con WPI y adicionadas con diferentes compuestos (mezclas de lactato-gluconato de calcio, acetato de α -tocoferol, sorbitol, cera de abeja o sorbato de potasio) (Mei y Zhao, 2003; Ozdemir y Floros, 2008), o fabricadas con WPI con y sin aplicación de un tratamiento térmico (Guckian y col, 2006).

Tabla 7.5. Permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles.

Película	WVP (gmm/m ² h KPa)	
	t=0	t=15
P _{CMC-WPI}	1.50 ± 0.20 ^{Aa}	1.55 ± 0.10 ^{Ba}
P _{CMC-WPI-TV}	1.41 ± 0.01 ^{Ab}	1.43 ± 0.01 ^{Bb}
P _{LMP-WPI}	1.61 ± 0.10 ^{Aa}	1.63 ± 0.08 ^{Ba}
P _{LMP-WPI-TV}	1.45 ± 0.05 ^{Ab}	1.46 ± 0.03 ^{Bb}

Letras mayúsculas A-B Indica que hay diferencia significativa entre el tiempo.
 Letras minúsculas a-b Indica hay diferencia significativa entre las formulaciones de las película.
 Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$);
 $n=3$ para todos los tratamientos.

El aumento WPV durante el tiempo de almacenamiento (t=0 y t=15) de las películas P_{CMC-WPI} y P_{LMP-WPI} fue de 3.22 y 1.23%, y para las películas P_{CMC-WPI-TV} y P_{LMP-WPI-TV} de 1.40 y 0.68%, respectivamente. Estos resultados indican que la adición de extracto de té verde a las emulsiones dobles formadoras de películas disminuyó notablemente la WVP de las películas una vez formadas (t=0) y después de 15 días de haber sido almacenadas.

7.10 Fenoles totales y propiedades antioxidantes

Las propiedades antioxidantes evaluadas por los métodos DPPH y FRAP y la cantidad total de fenoles de las películas elaboradas con emulsiones dobles con y sin

extracto de té verde se encuentran reportadas en la **tabla 7.6**. Las películas $P_{\text{CMC-WPI}}$ y $P_{\text{LMP-WPI}}$ no presentaron en ningún momento compuestos fenólicos ni propiedades antioxidantes. El valor más alto de fenoles totales que presentaron las películas comestibles fue después de haber sido formadas (en $t=0$), siendo significativamente mayor el contenido en las películas $P_{\text{LMP-WPI-TV}}$ (8.10 mg AG/g de película) que en $P_{\text{CMC-WPI-TV}}$ (7.85 mg AG/g de película).

Con el tiempo de almacenamiento ($t=15$) la cantidad de fenoles encontrada en las películas disminuyó de manera significativa ($p \leq 0.05$) para ambas películas. La cantidad de fenoles en las películas $P_{\text{CMC-WPI-TV}}$ y $P_{\text{LMP-WPI-TV}}$ con 0.75% en masa de té verde, en $t=0$ y $t=15$, fue similar a la reportada por Siripatrawan y Harte (2010) para películas de quitosano adicionadas con 2% extracto de té verde pero inferiores a las de películas de proteína de leche con aceite esencial de pimiento (Oussalah y col., 2004).

El fundamento del método DPPH se basa en determinar la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical libre DPPH \cdot y reducirlo. El DPPH es un radical libre estable en solución acuosa o de etanol y acepta un electrón o un radical hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable (Soares y col., 1997).

Los resultados muestran que las películas $P_{\text{CMC-WPI-TV}}$ y $P_{\text{LMP-WPI-TV}}$, presentaron actividad antirradical para DPPH. El % de inhibición de DPPH de la $P_{\text{CMC-WPI-TV}}$ fue

inferior que la $P_{LMP-WPI-TV}$. Los porcentajes de inhibición del radical DPPH presentados por las películas de emulsiones dobles con té verde fueron mayores en $t=0$ que en $t=15$, lo que indica que el tiempo de almacenamiento afectó significativamente la inhibición del radical ($p \leq 0.05$). Los valores de % de inhibición al radical DPPH de las películas $P_{CMC-WPI-TV}$ y $P_{LMP-WPI-TV}$ con 0.75% de extracto de té verde fueron similares a los de películas de quitosano con 2% de extracto de té verde Siripatrawan y Harte (2010).

El método FRAP que ocurre por reducción directa, consiste en la formación de un complejo férrico con el reactivo TPTZ, el cual en presencia de antioxidantes forma un complejo azul de absorción máxima entre 590 y 595 nm (Benzie y Strin, 1996). Las películas $P_{LMP-WPI-TV}$ (13.25 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de película) tuvieron valores superiores de actividad antioxidante por el método FRAP y fueron significativamente superiores a los de $P_{CMC-WPI-TV}$ (13.08 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de película) (tabla 7.6). La actividad antioxidante de las películas fue significativamente inferior en $t=15$ que en $t=0$. La disminución de la capacidad antioxidante con el tiempo de almacenamiento fue del 12% para las películas $P_{CMC-WPI-TV}$ de 5.6% para $P_{LMP-WPI-TV}$.

Tabla 7.6. Fenoles totales y propiedades antioxidantes de las películas comestibles

Película	Fenoles totales (mg AG/g de película)		DPPH % Inhibición		FRAP ($\mu\text{mol Trolox/g}$ de película)	
	t=0	t=15	t=0	t=15	t=0	t=15
	$P_{CMC-WPI}$	NE	NE	NE	NE	NE
$P_{CMC-WPI-TV}$	7.85 ± 0.14^{Ab}	7.50 ± 0.30^{Bb}	35.60 ± 0.50^{Ab}	32.35 ± 0.40^{Bb}	13.08 ± 1.65^{Ab}	11.50 ± 3.3^{Bb}
$P_{LMP-WPI}$	NE	NE	NE	NE	NE	NE
$P_{LMP-WPI-TV}$	8.10 ± 0.04^{Aa}	7.82 ± 1.29^{Ba}	47.12 ± 5.39^{Aa}	39.12 ± 0.45^{Ba}	13.25 ± 0.41^{Aa}	12.51 ± 0.86^{Ba}

NE: No encontrado

Letras mayúsculas A-B Indica que hay diferencia significativa entre el tiempo.

Letras minúsculas a-b Indica hay diferencia significativa entre las formulaciones de las película.

Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$); $n=3$ para todos los tratamientos.

Las propiedades antioxidantes y la cantidad de compuestos fenólicos totales de las películas $P_{LMP-WPI-TV}$ siempre fueron superiores, y el tamaño de partícula de estas emulsiones siempre fue inferior al de $P_{CMC-WPI-TV}$ lo cual indica que el tamaño de partícula de las emulsiones dobles que forman la matriz de la película juega un papel muy importante en la protección y probablemente en la liberación de los compuestos fenólicos del té verde.

Las películas con extracto de té verde además de haber presentado actividad antioxidante también presentaron mejores propiedades mecánicas y de barrera contra el vapor de agua, lo que las hace interesantes para posibles aplicaciones en alimentos.

8. CONCLUSIONES

1. Las emulsiones múltiples estabilizadas por complejos proteína-polisacárido pueden producir películas comestibles con propiedades mecánicas comparables con las películas hidrofílicas, pero con una permeabilidad al vapor de agua comparable con las películas hidrofóbicas.
2. La emulsión doble $W_1/O/W_2$ estabilizada con el complejo LMP:WPI formó películas más rígidas con mayor resistencia a la tensión y Modulo de Young pero con menor tamaño de partícula y transparencia que aquella elaboradas a partir de CMC:WPI
3. Las emulsiones múltiples estabilizadas por complejos proteína-polisacárido pueden producir películas comestibles con propiedades mecánicas comparables con las películas hidrofílicas, pero con una permeabilidad al vapor de agua comparable con las películas hidrofóbicas.
4. La incorporación de extracto de té verde en las películas elaboradas a base de emulsiones dobles mejora la permeabilidad al vapor de agua y las propiedades mecánicas, RT, % E y MY, de las películas.

5. En general las propiedades de antioxidantes, de barrera y mecánicas de las películas comestibles disminuyeron con el tiempo de almacenamiento de 15 días.
6. La fabricación de películas comestibles de emulsión doble ofrecen la posibilidad de la incorporación de compuestos bioactivos hidro y/o liposolubles, proporcionando la base para diseñar una nueva generación de películas comestibles.

9. PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentadas en esta tesis Doctoral, las perspectivas se orientan en tres direcciones.

En primer lugar estaría el estudio de la aplicación de las películas comestibles con extracto de té verde en alimentos con una baja actividad de agua. En concreto, se podría estudiar el efecto antioxidante y antimicrobiano de las películas comestibles en alimentos como cacahuates, galletas, quesos maduros, entre otros.

También sería interesante realizar un estudio de la liberación del extracto de verde de la matriz de la película. Así como también, estudiar la protección del extracto de té verde dentro de las películas elaboradas a partir de emulsiones dobles estabilizadas con los complejos proteína: polisacárido estudiados en este proyecto.

En tercer plano, se encontrarían los estudios sobre la mejora de las propiedades mecánicas y de barrera de las películas comestibles elaboradas a partir emulsiones dobles estabilizadas con nuevos complejos proteína: polisacárido.

10. REFERENCIAS

1. Aranberri, I., Binks, B.P., Clint, J.H., & Fletcher, P.D.I. 2004. Evaporation rates of water from concentrated oil-in-water emulsions. *Langmuir*. 20:2069-2074.
2. [ASTM] American Society for Testing and Materials. 1980. E-96-80. *Standard methods of test for water vapor transmission of materials in sheet form*. West Conshohocken, PA: ASTM International.
3. [ASTM] American Society for Testing and Materials. 1997. D1746 Standard test method for transparency of plastic sheeting. West Conshohocken, PA: ASTM International.
4. [ASTM] American Society for Testing and Materials. 2000. D882 *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*. West Conshohocken, PA: ASTM International.
5. Baldwin, E.A., Nisperos, N.O. y Baker, R.A. 1995. Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 35:509–524.
6. Baar, A., Kulicke, W.M., Szablikowski, K., y Kiesewetter, R. 1994. Nuclear-magnetic-resonance spectroscopic characterization of carboxymethylcellulose. *Macromol Chem Phys*.195:1483–1492.
7. Banker, G.S. 1996. Film coating theory and practice. *J Pharm Sci*. 55:81-89.

8. Becher, P. 2001. Emulsions: Theory and Practice, 3rd edition. Washington: American Chemical Society.
9. Benzie I.F.F. y Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *J Anal Biochem.* 239:70-76.
10. Bergenståhl, B. 1995. Emulsions. En S.T. Beckett (Ed.), Physico-chemical aspects of food processing. pp. 49-64. London: Blackie Academic & Professional.
11. Bósquez-Molina, E., Guerrero-Legarreta, I., y Vernon-Carter, E.J. 2003. Moisture barrier properties of mesquite gum-candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Res Int.* 36:885-893.
12. Brand-Williams, W., Cuvelier, M., y Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technol.* 28. 25-30.
13. Cheftel, J.C., Cuq, J.L. y Lorient, D. 1989. Proteínas alimentarias. Acribia, S.A., Zaragoza, España. pp. 179-199.
14. Chen, H. 1995. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *J Dairy Sci.* 78:2563-2583.
15. Chen, C. H., Kuo, W. S., & Lai, L. S. 2009. Rheological and physical characterization of film-forming solutions and edible films from tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum. *Food Hydrocolloids.* 23:2132-2140.
16. Chien-Hsien C., Wen-Shiuh K., y Lih-Shiuh, L. 2009. Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films. *Food Hydrocolloids.* 23:714–721
17. Chow, H.-H.S., Hakim, I.A., Vining, D.R., Crowell, J.A., Ranger-Moore, J., Chew, W.M., Celaya, C. A., Rodney, S. R., Hara, Y., y Alberts, D.S. 2005. Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res.* 11:4627–33.

18. Coffey, D.G., Bell, D.A., y Henderson, A. 1995. Cellulose and cellulose derivatives. En A.M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides and their applications*, pp. 123-153. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
19. Colla, E., Sobral, P.J.A., y Menegalli, F.C. 2006. Amaranthus cruentus flour edible films: influence of stearic acid addition, plasticizer concentration, and emulsion stirring speed on water vapor permeability and mechanical properties. *J Agric Food Chem.* 54:6645–6653.
20. Cox, W.P., y Merz, E.H. 1958. Correlation of dynamic and steady flow viscosities. *J Polymer Sci.* 28:619-622.
21. Cuq, B., Gontard, N., y Guilbert, S. 1995. Edible films and coatings. En Rooney, N.L. (Ed), *Active food packaging*; Blackie Academic and Professional, London, UK, pp 111-142.
22. Danganan, K.L. y J.M. Krochta. 2007. Preventing the loss of tensile, barrier and appearance properties caused by plasticiser crystallization in whey protein films. *Int J Food Sci Technol.* 42: 1094-1100.
23. Darby, R. 1996. *Chemical engineering fluid mechanics*. New York: Marcel Dekker, Inc.
24. Davis, S.S., y Walker, I.M. 1987. Multiple emulsions as targetable delivery systems. *Methods Enzymol.* 149:51–64.
25. Delves-Broughton, J., Blackburn, R.J., Evans, P., y Hugenholtz, J. 1998. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes*. *Scott A J Appl Microbiol.* 85:657-63.
26. Debeaufort, E., y Voilley, A. 1995. Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films. *Int J Food Sci Technol.* 30:183-190.
27. Debeaufort, F., Quezada-Gallo J.A., Voilley G. 1998. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Crit Rev Food Sci.* 38: 299-313.

-
28. Diab, T., Biliaderis, C.G., Gerasopoulos, D., Sfakiotakis, E. 2001. Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. *J Sci Food Agric.* 81(10):988-1000.
 29. Dickinson, E. 2009. Hydrocolloids as emulsifier and emulsion stabilizer. *Food Hydrocolloids.* 23:1473-1482.
 30. Drake, S.R., Fellman, J.K., y Nelson, J.W. 1987. Postharvest use of sucrose polyesters for extending the shelf-life of stored 'Golden Delicious' apples. *J Food Sci* 52:685–90.
 31. Durango, A., Soares, N., y Andrade, N. 2006. Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control.* 17(5):336-341.
 32. Ebner, K.E., y Brodbeck, U. 1968. Biological Role of α -Lactalbumin: a review. *J Dairy Sci.* 51:317-322.
 33. Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez, H., Vernon-Carter, E. J., y Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic-chitosan interactions by fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers.* 79:541-546.
 34. Euston, S.R., y Hirst, R.L. 2000. The emulsifying properties of commercial milk protein products in simple oil-in-water emulsions and in a model food system. *J Food Sci.* 65:934-940.
 35. Fairley, P., Monahan F.J., German, J.B., y Krochta J.M. 1996. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and sodium dodecyl sulfate. *J Agric Food Chem.* 44(2): 438-443.
 36. Fishman, M., Coffin, D., Onwulata, C. y Konstance, R. 2004. Extrusion of pectin and glycerol with various combinations of orange albedo and starch. *Carbohydrate Polymer.* 47:125-129.
 37. Florence, A.T., y Whitehill, D. 1985. Macro- and Microemulsions: Theory and Applications. ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington.

-
38. Frei, B., y Higdon, J. V. 2003. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. *J Nutrition*.133 (10):3275S–3284S.
 39. Gálvez, M.A., Flores, A.I. y Farrés-Gonzales S. A. 2006. Proteínas. En: Badui D.S (Ed), *Química de los alimentos*, cuarta edición. Pearson educación, México DF., pp. 161-164.
 40. Garti, N., y Reichman, D. 1993. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Structure*. 12:411-426.
 41. Garti, N. 1998. New trends in double emulsions for controlled release. *Progr Colloid Polym Sci*. 108:83-92.
 42. Gennadios, A., y Weller, C.L. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technol*. 44(10):63-69.
 43. Gennadios, A., Brandenburg, A.H., Weller, C.L., y Testing, R.F 1993. Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolated film. *J. Agric. Food Chem*. 41:1835-1839.
 44. Gennadios, A., Milford, A.H., y Lyndon, B.K. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *Lebens Wiss Technol*. 30:337-350.
 45. Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P., y Gómez-Guillén M.C. 2009. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *J Food Eng*. 92:78-85.
 46. Gontard, N., Guilbert, S., y Cuq, J. 1993. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *J Food Sci*. 58(1):206-211.
 47. Gontard, N., Duchez, C., Cuq, B., y Guilbert S. 1994. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *Int J Food Sci Technol*. 44:1064-1069.

-
48. Gramza, A., y Korczak, J. 2005. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends Food Sci Technol.* 16(8):351–358.
 49. Gucbilmez, C.M., Yemenicioglu, A., y Arslanoglu, A. 2007. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Res Int.* 40 (1):80-91.
 50. Guckian, S., Dwyer, C., O'Sullivan, M., O'Riordan, E.D., y Monahan, F.J. 2006. Properties of and mechanisms of protein interactions in films formed from different proportions of heated and unheated whey protein solutions. *European Food Research and Technol.* 223:91-95.
 51. Hambleton, A., Debeaufort, F., Bonnote, A., y Voilley, A. 2009a. Influence of alginate emulsion-based films structure on its barrier properties and on the protection of microencapsulated aroma compounds. *Food Hydrocolloids.* 23:2116-2124.
 52. Hambleton, A., Fabra, M.J., Debeaufort, F., Dury-Brun, C., y Voilley, A. 2009b. Interface and aroma barrier properties of iota-carrageenan emulsion-based films used for encapsulation of active food compounds. *J Food Engineer.* 93:80-88
 53. Han, J.H., Seo, G.H., Park, I.M., Kim, G.N., y Lee D.S. 2006. Physical and mechanical properties of pea starch edible films containing beeswax emulsions. *J Food Sci.* 71(6):E290-E296.
 54. Han, J.H., y Krochta, J.M. 2007. Physical properties of whey protein coating solutions and films containing antioxidants. *J Food Sci.* 72(5):E308-E314.
 55. Hasenhuettl, L.G., y Hartel, W.R. 2008. Food emulsifiers and their applications (2nd Ed.). New York, NY: Springer.
 56. Haque, A., y Morris, E.R. 1993. Thermogelation of methylcellulose. Part 1: molecular structures and processes. *Carbohydrate Polymers.* 22:161-173.
 57. Heinze, T., 1998. New ionic polymers by cellulose functionalization. *Macromol Chem Phys.* 199:2341–2364.

-
58. Huang, X., Kakuda, Y., y Cui, W. 2001. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*. 15, 533–542.
 59. Jayasundera, M., Adhikari, B., Aldred, P., & Ghandi, A. (2009). Surface modification of spray dried food and emulsion powders with surface-active protein: a review. *J Food Engineer*. 93:266-277.
 60. Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C.I., Medina-Torres, L., Roman-Guerrero, A., y Vernon-Carter, E.J. 2009. Ferrous bisglycinate content and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complex. *Food Hydrocolloids*. 23:2425-2433.
 61. Kamper, S.L., y Fennema, O. 1984. Water vapor permeability of an edible, fatty acid, bilayer film. *J Food Sci*. 49:1482–1485.
 62. Kaplan, H. J. 1986. Washing, waxing and color adding. En Wardowdki, S. Nagy y W. Grierson, (Eds), *Fresh citrus fruit*, W.F., Westport, CT: AVI Publishing Co, pp 379.
 63. Karbowiak, T., Debeaufort, F., y Voilley., A. 2007. Influence of thermal process on structure and functional properties of emulsion-based edible films. *Food Hydrocolloids*. 21:879–888.
 64. Kester, J.J., y Fennema, O. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technol*. 40(12):47-49.
 65. Kester, J.J., y Fennema, O. 1989. Resistance of lipid films to water vapor transmission. *J Am Oil Chem Soc*. 66:1139-1146.
 66. Kontopidis, G., Holt, C. y Sawyer L. 2004. Invited review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, structure, and function. *J Dairy Sci.*, 87:785-796.
 67. Krumel, K.L., y Lindsay, T.A. 1976. Nonionic cellulose ethers. *Food Technol* 30(4):36–43.
 68. Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., y Mazoyer, J. 2003. Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*. 17:455-462.

-
69. Lobato-Calleros, C., Rodriguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E.J., y Alvarez-Ramirez, J. 2006. Reduce-fat White fresh cheese-like products obtained from $W_1/O/W_2$ multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Res Int.* 39:678-685.
 70. Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., y Vernon-Carter, E.J. 2008. Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from $W_1/O/W_2$ emulsions and skim milk. *LWT Food Sci. Technol.* 41:1847-1856.
 71. Maftoonazad, N., Ramaswamy, H.S., Moalemiyan, M., y Kushalappa, A.C. 2007. Effect of pectin based edible emulsion coating on changes in quality of avocado exposed to *Lasiodiplodia theobromae* infection. *Carbohydrate Polymers.* 68:341–349
 72. Mei, Y., y Zhao, Y. 2003. Barrier and mechanical properties of milk protein-based edible films containing nutraceuticals. *J Agric Food Chem.* 51:1914-1918.
 73. Mate, J.I., y Krochta J.M.1996. Comparison of oxygen and water vapor permeabilities of whey protein isolate and lactoglobulin edible films. *J Agric Food Chem.* 44:3001-3004.
 74. Matsumoto, S., y Kang, W.W. 1989. Formulation and applications of multiple emulsions. *J Disp Sc. Tech.* 10:455-482.
 75. May, C.D. 1990. Industrial pectins: sources. Production and Application. *Carbohydrate Polymers.* 12:79–99.
 76. McClements, D.J. 2005. Food Emulsion: Principles, practices, and techniques (2nd Ed.). Boca de Raton, FL: CRC Press.
 77. McHugh, T.H., y Krochta, J.M. 1994. Permeability properties of edible films. En: Krochta, J.M., Baldwin, E.A., y Nisperos-Carriedo, M. (Eds), Edible coatings and film to improve food Quality. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, Inc., pp.139-187.

-
78. McHugh, T.H. 2000. Protein-lipid interactions in edible films and coatings. *Nahrung*. 44:148-151.
79. McHugh, T.H., Avena-Bustillos, R., y Krochta, J.M. 1993. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *J Food Sci*. 58:899-903.
80. Miller, K.S., y Krochta, J.M. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends Food Sci Technol*. 8:228-237.
81. Morillon, V., Debeaufort, F., Bond, G., Capelle, M., y Voilley, A. 2002. Factors affecting the moisture permeability of lipid –based edible films: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42(1):67–89.
82. Murillo-Martínez M.M., Pedroza-Islas R., Lobato-Calleros C., Martínez-Ferez A., y Vernon-Carter E.J. 2010. Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*. (2010), doi:10.1016/j.foodhyd.2010.06.015.
83. Muschollik, G. 2007. Multiple emulsions for food use. *Current Opinion Colloid Interf Sci*. 12:213-220.
84. Muzolf, M., Szymusiak, H., Gliszczynska-swiglo, A., Rietjens, M.C.M., y Tyrakowska, B. 2008. pH-Dependent radical scavenging capacity of green tea catechins. *J Agric Food Chem*. 56:816-823.
85. Nihal, M., Ahmad, N., Mukhtar, H., y Wood, G. S. 2005. Antiproliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: Possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int J Cancer*. 114(4):513–521.
86. Nisperos-Carriedo, M.O. 1994. Edible films and coatings based on polysaccharides. En: Krochta, J.M., Baldwin., E.A., y Nisperos-Carriedo, M.O., (Eds). *Edible coatings and films to improve food quality*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, Inc., pp. 305–35.

-
87. Norajit, K., Kim, K.M., y Ryu, G.H. 2010. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract *J Food Eng.* 98:377-384.
 88. Osés, J., Fabregat-Vázquez, M., Pedroza-Islas, R., Tomás, S. A., Cruz-Orea, A., y Maté, J. I. 2009. Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. *J Food Engineer.* 92:56-62.
 89. Othman, A., Ismail, A., Ghani, N.A., y Adenan, I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* 100:1523-1530.
 90. Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, L.S., y Lacroix, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J Agric Food Chem.* 52:5598-5604.
 91. Ozdemir, M., y Floros, J.D. 2008. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics. *J Food Engineer.* 86:215-224.
 92. Pays, K., Giermanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J., y Leal-Calderon, F. 2002. Double emulsions: how does release occur?. *J Con Rel.* 79:193–205
 93. Pelegrine, D.H.G., y Gasparetto, C.A. 2005. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Lebensm Wiss Technol.* 38:77–80.
 94. Peressini, D., Bravin, B., Lapasin, R., Rizzotti, C., y Sensidoni, A. 2003. Starchmethylcellulose based films: rheological properties of film forming dispersions. *J Food Engineer.* 59:25-32.
 95. Perez-Gago, M.B., Nadaud, P., y Krochta, J.M. 1999. Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *J Food Sci.* 64:1034-1037.

-
96. Perez-Gago, M.B., y Krochta, J. 2001. Lipid particle size effect on the water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *J Agric Food Chem.* 49:996-1002.
 97. Phan The, D., Debeaufort, F., Voilley, A., y Luu, D. 2009. Influence of hydrocolloid nature on the structure and functional properties of emulsified edible films. *Food Hydrocolloids.* 23:691-699.
 98. Pisters, K.M.W., Newman, R.A., Coldman, B., Shin, D.M., Khuri, F.R., Hong, W.K., Glisson, B.S., y Lee, J.S. 2001. Phase I trial of oral green tea extract in adult patients with solid tumors. *J Clin Oncol.* 19:1830-1838.
 99. Po-En, C., y Lih-Shiuh L. 2010. Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum coatings containing green tea extracts in fruit-based salads, romaine hearts and pork slices. *Int J Food Microbiol.* 139:23-30.
 100. Pranoto, Y., Rakshit, S.K., y Salokhe V.M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Food Sci Tech.* 38:859-865.
 101. Quezada-Gallo, J.A., Debeaufort, F., Callegarin, F., y Voilley, A. 2000. Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. *J Mem Sci.* 180:37-46.
 102. Quintero, S.B., Vernon-Carter, E.J., Guerrero-Legarreta, I., y Ponce-Alquicira, E. 2006. Incorporation of antilisterial bacteriocin-like inhibitory substance from *Pediococcus parvulus VKMX133* into film-forming protein matrices with different hydrofobicity. *J Food Sci.* 70:M398-M403.
 103. Rodriguez-Gonzalez, F.J., Ramsay, B.A., y Favis, B.D. 2004. Rheological and thermal properties of thermoplastic starch with high glycerol content. *Carbohydrate Polymers.* 58:139-147.

-
104. Rodríguez-Huezo, M.E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L.A., Beristain, C.I., y Vernon-Carter E.J. 2004. Microencapsulation by spray drying of multiple emulsion containing carotenoids. *J Food Sci.* 69(7):E351-E359.
 105. Rojas-Graü, M.A., Avena –Bustillos, J., Friedman, M., Henika, P.R., Martín-Belloso, O., y McHugh T.H. 2006. Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *J Agric Food Chem.* 54:9262-9267.
 106. Rojas-Grau, M.A. Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. 2009. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends Food Sci Technol.* 20:438-447.
 107. Salmieri, S., y Lacroix., M. 2006. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. *J Agric Food Chem.* 54:10205-10214.
 108. Seydim, A.C., y Sariktus. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int.* 39:639-644.
 109. Singleton, V.L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology.* 299:152-178.
 110. Siripatrawan, U., y Harte, B.R. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids.* 24:770-775.
 111. Soares, J.R., Dinis, T.C.P., Cunha, .AP., y Ameida, L.M. 1997. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Rad Res.* 26: 469-478.
 112. Stach, D., y Schmitz, O.J. 2001. Decrease in concentration of free catechins in tea over time determined by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatography.* 924:519–522.

-
113. Steffe, J. F. 1996. Rheological methods in food process engineering (2nd ed.). East Lansing, MI: Freeman Press.
 114. Tang, J., Mao, R., Tung, M. A., y Swanson, B.G. 2001. Gelling temperature, gel clarity and texture of gellan gels containing fructose and sucrose. *Carbohydrate Polymers*. 44:197–209.
 115. Tapia, M.S., Rojas-Graü, M.A., Rodríguez, F.J., Ramírez, J., Carmona, A., y Martín-Belloso O. 2007. Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coating on fresh-cut fruits. *J Food Sci*. 72:E190-E196.
 116. Theivendran, S., Hettiarachchy, S., Johnson, G. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters. *J. Food Sci*. 71:M39-M44.
 117. Torres, J.A. 1994. Edible films and coatings from proteins. En: Hettiarachchy, N.S., y Ziegler, G.R. (Eds). Protein functionality in food systems. Institute of Food Technologists. Chicago, Illinois, E.U., pp. 485-487.
 118. Tovar, L., Salafranca, J., Sánchez, C., y Nerín C. 2005. Migration studies to assess the safety in use of a new antioxidant active packaging. *J Agric Food Chem*. 53: 5270 - 5275.
 119. Trezza, T.A., y Krochta, J.M. 2000. The gloss of edible coatings as affected by surfactants, lipids, relative humidity and time. *J Food Sci*. 65(4):658-662.
 120. Tzoumaki, M.V., Biliaderis, C.G., y Vasilakakis, M. 2009. Impact of edible coatings and packaging on quality of white asparagus (*Asparagus officinalis*, L.) during cold storage. *Food Chem*. 117:55-63.
 121. Villagómez-Zavala, D. L., Gómez-Corona, C., San Martín-Martínez, E., Pérez- Orozco, J. P., Vernon-Carter, E. J., y Pedroza-Islas, R. 2008. Comparative study of the mechanical properties of edible films made from single and blended hydrophilic biopolymer matrices. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 7:263-273.

-
122. Villalobos, R., Chanona, J., Hernández, P., Gutiérrez, G., y Chiralt, A. (2005). Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*. 19:53-61.
 123. Vignoni, L. A., Césari, R. M., Forte, M., y Mirábile, M. L. 2006. Determinación de índice de color en ajo picado. *Información Tecnológica*: 17(6):63-67.
 124. Wang, L.F., Kim, D.M., y Lee, C.Y. 2000. Effects of heat processing and storage on flavonols and sensory qualities of green tea beverage. *J Agric Food Chem*. 48:4227-4232.
 125. Xu, X., Liu, W., y Zhang, L. 2006. Rheological behavior of Aeromonas gum in aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*. 20:723-729.
 126. Zaveri, N.T. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci*. 78:2073–80.
 127. Zhu, Q.Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y., y Chen, Z.Y. 1997. Stability of green tea catechins. *J Agric Food Chem*. 45:4624-4628.

11. ANEXOS

Anexo A

Permeabilidad al vapor de agua

En la **figura A1** se muestra la cabina utilizada para la evaluación de permeabilidad al vapor de agua

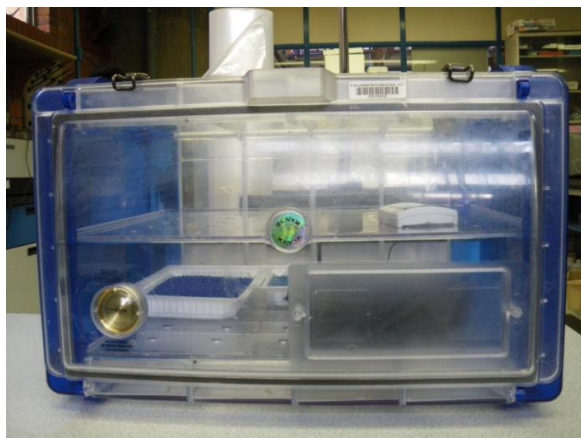


Figura A1. Cabina utilizada para mantener las condiciones de ensayo uniformes

En esta cabina se colocó silica gel en recipientes en la parte inferior de la cabina, permitiendo la total circulación del aire. En la parte superior de la cabina se utilizó un ventilador Elco (Milano, Italia) que genera una corriente de aire a una velocidad de 150 m/min para mantener las condiciones de ensayo uniformes en todos los puntos evitando la acumulación del vapor de agua que sale de las celdas (McHugh y col., 1993).

Ángulo de contacto

En la figura **A2** se muestra el equipo utilizado para la evaluación del ángulo de contacto de las películas comestibles elaboradas a base de emulsiones dobles.



Figura A2. Contactómetro de ángulo

El ángulo de contacto generado por la gota de agua en la superficie de la película es medido por la proyección de la gota en una pantalla que contiene un transportador.

Anexo B

Curvas de calibración

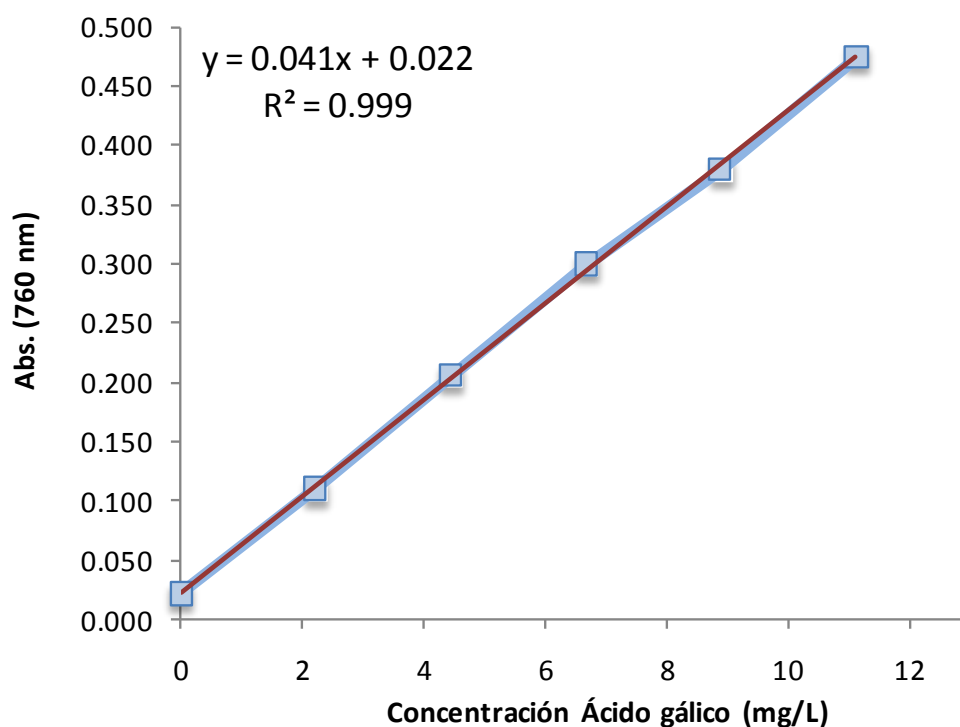


Figura A3. Curva estándar de ácido gálico para la determinación de fenoles totales

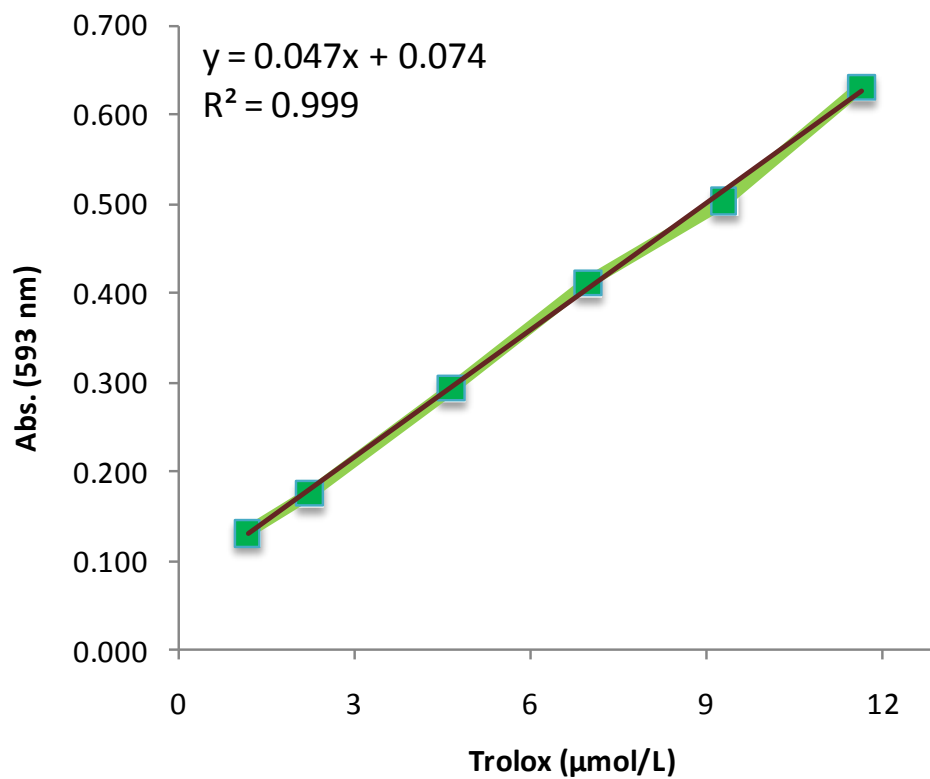


Figura A4. Curva de calibración de trolox para evaluación FRAP.