

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO



**RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE  
HIDROXIPROPIL METILCELULOSA:  
CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:

**Clara Pastor Navarro**

Dirigida por:

**Dra. Chelo González Martínez**

**Dra. Amparo Chiralt Boix**

**Valencia, 2010**





UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

D<sup>o</sup> Chelo González Martínez profesora Titular de Universidad y D<sup>o</sup> Amparo Chiralt Boix Catedrática de Universidad pertenecientes al Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia

CONSIDERAN: Que la memoria titulada **RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE HIDROXIPROPIL METILCELULOSA: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN** que presenta **D<sup>o</sup> Clara Pastor Navarro** para aspirar al grado de Doctora por la Universidad Politécnica de Valencia, reúne las condiciones adecuadas para constituir su tesis doctoral, por lo que **AUTORIZAN** a la interesada para su presentación.

Valencia, a 1 de julio de 2010

Fdo: Chelo González Martínez  
Directora de Tesis

Fdo: Amparo Chiralt Boix  
Directora de Tesis



## RESUMEN

Los films de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) son flexibles y transparentes sin olor ni sabor, con una permeabilidad selectiva a los gases que permiten, al aplicarlos a frutas, el retraso de la madurez al reducir la concentración interna de  $O_2$ , sin causar una acumulación excesiva de  $CO_2$ . Sin embargo, su alta permeabilidad al vapor de agua (PVA) hace necesaria la incorporación de lípidos (ácidos grasos, ceras, resinas y/o tensoactivos) en la matriz del hidrocoloide para mejorar esta propiedad. Por este motivo, en este trabajo se diseñaron y caracterizaron recubrimientos *composites* a base de HPMC y diferentes compuestos (ácido oleico (AO), tensoactivos, extracto etanólico de própolis (EEP)) y se evaluó el efecto de su aplicación en la calidad de fresas y uvas almacenadas en refrigeración.

Los resultados mostraron que las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) se vieron afectadas por la concentración del polímero y por el tipo de compuesto añadido (AO, tensoactivos, EEP), dando lugar a dispersiones con diferentes grados de estabilidad en términos de tamaño y carga de partícula, tensión superficial y viscosidad. De igual forma, las propiedades de los films también se vieron afectadas por la incorporación de los mismos componentes citados anteriormente.

La mayor reducción en la PVA se consiguió con el aumento de la concentración de HPMC, AO y EEP y entre éstos, en los films a base de 5% de HPMC y 1,5% de EEP, se obtuvo la máxima reducción en la PVA del orden del 88% con respecto a la PVA del film puro de HPMC. Las propiedades mecánicas y ópticas variaron en función del tipo de compuesto incorporado, siendo la incorporación de própolis la que causó un aumento de la resistencia mecánica y rigidez de los films y dio lugar a un menor brillo. Además, los films a base de própolis mostraron una notable actividad antifúngica contra *Penicillium italicum* y *Aspergillus niger*, pero sobre todo contra este último.

La aplicación de recubrimientos *composites* a base de HPMC y Sugin 471/PHK-40 en fresas (var. Ventana) dio lugar a ligeros cambios en la calidad fisicoquímica y sensorial. Las muestras recubiertas presentaron una mayor resistencia al vapor de agua y tasa respiratoria. La firmeza de las muestras aumentó y las coordenadas de color (luminosidad, croma y tono) disminuyeron a lo largo de los 9 días del almacenamiento a 5°C. En cuanto a la calidad sensorial, evaluada en términos de brillo, sabor, textura y olor, se vio modificada por el recubrimiento tanto más cuanto mayor fue la proporción de hidrocoloide en la formulación.

La aplicación de recubrimientos de HPMC en uvas (var. Moscatel) impidió la pérdida de peso y el pardeamiento, mejorando el brillo y la calidad microbiológica. La incorporación de EEP a los recubrimientos de HPMC aumentó la luminosidad, no presentando ningún efecto sobre el mantenimiento de la calidad de las uvas durante los 22 días del almacenamiento a 1-2°C y 85-90% de humedad relativa. De nuevo, las propiedades sensoriales de las uvas recubiertas se vieron afectadas por la composición de los films. Teniendo en cuenta las numerosas propiedades que posee el própolis, su incorporación en los recubrimientos de HPMC podría contribuir a enriquecer las características nutricionales de los productos recubiertos. En este sentido, estos recubrimientos *composites* pueden ser considerados como una alternativa eficaz para obtener frutas y hortalizas más saludables.



## RESUM

Els films d'hidroxiopropil metilcel·lulosa (HPMC) són flexibles i transparents sense olor ni sabor, amb una permeabilitat selectiva als gasos que permeten, a l'aplicar-los a fruites, l'endarreriment de la maduresa al reduir la concentració interna d'O<sub>2</sub>, sense causar una acumulació excessiva de CO<sub>2</sub>. Tanmateix, l'alta permeabilitat al vapor d'aigua (PVA) fa necessària la incorporació de lípids (àcids grassos, ceres, resines, i/o tensioactius) a la matriu de l'hidrocoloid per millorar aquesta propietat. Per aquest motiu, al treball es van dissenyar i caracteritzar recobriments *composites* a base d'HPMC i diferents compostos (àcid oleic (AO), tensioactius, extracte etanòlic de pròpolis (EEP)) i es va avaluar l'efecte de la seva aplicació a la qualitat de maduixes i raïm emmagatzemats en refrigeració.

Els resultats van mostrar que les propietats fisicoquímiques de les formulacions formadores de recobriment (FFRs) van ser afectades per la concentració del polímer i pel tipus de compost afegit (AO, tensioactius i EEP), produint dispersions amb diferents graus d'estabilitat en termes de grandària i càrrega, tensió superficial i viscositat. De la mateixa forma, les propietats dels films també es van veure afectades per la incorporació dels mateixos compostos citats anteriorment.

La major reducció en la PVA es va aconseguir amb l'augment de la concentració de HPMC, AO i EEP i entre aquests, als films a base de 5% d'HPMC i 1,5% de EEP, es va obtenir la mateixa reducció en la PVA de l'ordre del 88% respecte a la PVA del film pur de HPMC. Les propietats mecàniques i òptiques van variar en funció del tipus de compost incorporat, sent la incorporació de pròpolis la que va causar l'augment de la resistència mecànica i rigidesa dels films i va produir una menor lluentor. A més a més, els films a base de pròpolis van mostrar una notable activitat antifúngica contra *Penicillium italicum* i *Aspergillus niger*, però sobretot contra aquest últim.

L'aplicació dels recobriments d'HPMC i Sugin 471/PHK-40 a maduixes (var. Ventana) va produir lleugers canvis a la qualitat fisicoquímica i sensorial. Les mostres recobertes van presentar una major resistència al vapor d'aigua i taxa respiratòria. La fermesa de les mostres va augmentar i les coordenades de color (lluminositat, croma i to) van disminuir durant els 9 dies d'emmagatzemament a 5°C. Respecte a la qualitat sensorial, avaluada en termes de lluentor, sabor, textura i olor, es va veure modificada pel recobriment a mesura que augmentava la quantitat d'hidrocoloid a la formulació.

L'aplicació dels recobriments d'HPMC a raïm (var. Moscatell) va impedir la pèrdua de pes i l'enfosquiment, millorant la lluentor i la qualitat microbiològica. La incorporació d'EEP als recobriments d'HPMC va augmentar la lluminositat, no presentant ningun efecte sobre el manteniment de la qualitat del raïm durant els 22 dies d'emmagatzemament a 1-2°C i 85-90% d'humitat relativa. De nou, les propietats sensorials del raïm es van veure afectades per la composició dels films. Tenint en compte les nombroses propietats que té el pròpolis, la seva incorporació als recobriments d'HPMC podria contribuir a enriquir les característiques nutritives dels productes recoberts. En aquest sentit, estos recobriments *composites* poden ser considerats com una alternativa eficaç per obtenir fruites i hortalisses més saludables.





## Abstract

Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films are flexible, transparent, odorless, and tasteless, with a selective permeability to gases. However, its high water vapour permeability (WVP) makes necessary the addition of lipidic compounds (fatty acids, waxes, resins and/or surfactants) into the polymeric matrix to improve this property. Therefore, the aim of this work was to formulate and characterize *composites* coatings based on HPMC and different lipidic compounds (surfactants, oleic acid (OA) and ethanolic extract of propolis (EEP)). The effect of its application on the quality of strawberries and grapes throughout cold storage was also evaluated.

Results showed that the physicochemical properties of the film forming-dispersions (FFDs) were affected by the concentration of the polymer and by the added compounds (OA, surfactants, EEP), giving as a result dispersions with different particle size,  $\zeta$ -potential, superficial tension and rheological properties. Similarly, film properties were also affected by the incorporation of the previously cited compounds.

The greater WVP reduction was obtained increasing the HPMC, OA and EEP concentration. Among these formulations, the maximum WVP reduction was achieved by using 5% HPMC and 1.5% EEP in the film, WVP values being reduced around 88%, in comparison with pure HPMC film. Mechanical and optical properties of films changed as a function of the added compound. Incorporation of EEP into HPMC films led to an increment in the mechanical strength and stiffness of the films, which also became less glossy. Furthermore, films containing propolis showed a notable antifungal activity against the tested fungi, which was more intense against *Aspergillus niger* than against *Penicillium italicum*.

The application of *composite* coatings based on HPMC and Sugin 471/PHK-40 as a surfactant to strawberry fruit (cv. Ventana) slightly modified the fruit physicochemical and sensorial properties. Coated samples showed higher resistance to water vapour transmission and respiration rate. The firmness increased and the color coordinates (luminosity, croma and hue) of these coated samples decreased through 9 days of storage at 5°C. On the other hand, coatings caused significant changes in the sensory properties in terms of gloss, flavour, colour and firmness, more marked when using the highest hydrocolloid concentration.

The application of HPMC coatings to grapes (cv. Muscatel) reduced their weight loss and browning rates, while improving their gloss and microbial safety. The incorporation of EEP into pure HPMC films increased the luminosity of the samples, but no other significant effect on the preservation of grape quality through out 22 days of storage at 1-2°C and 85-90% relative humidity was observed. Again, the sensory properties of coated grapes were significantly affected by the film composition. Nevertheless, taking into account the properties of propolis, its incorporation into HPMC coatings could contribute to enhance the nutritional characteristics of the coated product. In this sense, these coatings can be considered as an efficient alternative to obtain healthier fruits.

# ÍNDICES





INTRODUCCIÓN	1
Recubrimientos comestibles	1
<i>Propiedades de los recubrimientos comestibles</i>	2
<i>Composición de los recubrimientos comestibles</i>	3
<i>Caracterización de las formulaciones formadoras de recubrimiento: factores que afectan a la estabilidad</i>	9
<i>Propiedades de los films: caracterización y factores que afectan a los mismos</i>	14
Aplicación de los recubrimientos comestibles a frutas y hortalizas	25
Recubrimientos comestibles bioactivos con incorporación de antimicrobianos naturales	28
El futuro de los recubrimientos comestibles	34
JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DEL ESTUDIO	37
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	41
PRESENTACIÓN DEL TRABAJO	45
CAPÍTULO I: RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE HPMC Y DIFERENTES TENSOACTIVOS. APLICACIÓN A FRESONES	47
I.1.- INTRODUCCIÓN	49
I.2.- MATERIALES Y MÉTODOS	52
<i>I.2.1.- Diseño y preparación de las formulaciones formadoras de recubrimiento</i>	52
<i>I.2.2.- Propiedades fisicoquímicas de las FFRs</i>	54
<i>I.2.2.1.- Densidad y tensión superficial</i>	54
<i>I.2.2.2.- Caracterización reológica</i>	54
<i>I.2.2.3.- Índice R y cinética de sedimentación</i>	55
<i>I.2.3.- Obtención de los films</i>	55
<i>I.2.4.- Caracterización de los films</i>	56

---

<i>1.2.4.1.- Isotermas de sorción de agua</i>	56
<i>1.2.4.2.- Permeabilidad al vapor de agua</i>	57
<b><i>1.2.5.- Aplicación a fresones (var. Ventana)</i></b>	57
<i>1.2.5.1.- Sólidos solubles totales y pH</i>	58
<i>1.2.5.2.- Densidad superficial de sólidos y resistencia a la transmisión de vapor de agua</i>	58
<i>1.2.5.3.- Propiedades mecánicas</i>	60
<i>1.2.5.4.- Propiedades ópticas</i>	61
<i>1.2.5.5.- Tasa respiratoria</i>	61
<i>1.2.5.6.- Evaluación organoléptica</i>	62
<b><i>1.2.6.- Análisis estadístico</i></b>	65
<b>I.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	66
<b><i>1.3.1.- Propiedades fisicoquímicas de las FFRs</i></b>	66
<i>1.3.1.1.- Densidad y tensión superficial</i>	67
<i>1.3.1.2.- Caracterización reológica</i>	70
<i>1.3.1.3.- Índice R y cinética de sedimentación</i>	73
<b><i>1.3.2.- Caracterización de los films</i></b>	77
<i>1.3.2.1.- Isotermas de sorción de agua</i>	77
<i>1.3.2.2.- Permeabilidad al vapor de agua</i>	85
<b><i>1.3.3.- Aplicación a fresones (var. Ventana)</i></b>	87
<i>1.3.3.1.- Sólidos solubles totales y pH</i>	88
<i>1.3.3.2.- Densidad superficial de sólidos y resistencia a la transmisión de vapor de agua</i>	90
<i>1.3.3.3.- Propiedades mecánicas</i>	91
<i>1.3.3.4.- Propiedades ópticas</i>	93
<i>1.3.3.5.- Tasa respiratoria</i>	96
<i>1.3.3.6.- Evaluación organoléptica</i>	98
<b>I.4.- CONCLUSIONES</b>	103

<b>CAPÍTULO II: RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE HPMC, ÁCIDO OLEICO Y DIFERENTES TENSOACTIVOS</b>	105
<b>II.1.- INTRODUCCIÓN</b>	107
<b>II.2.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	108
<i>II.2.1.- Diseño y preparación de formulaciones formadoras de recubrimientos</i>	108
<i>II.2.2.- Propiedades fisicoquímicas de las FFRs</i>	109
<i>II.2.2.1.- Densidad, pH, conductividad y tensión superficial</i>	109
<i>II.2.2.2.- Caracterización reológica</i>	110
<i>II.2.2.3.- Tamaño de partícula</i>	110
<i>II.2.2.4.- Potencial-<math>\zeta</math></i>	111
<i>II.2.3.- Obtención de los films</i>	111
<i>II.2.4.- Caracterización de los films</i>	112
<i>II.2.4.1.- Isotermas de sorción de agua</i>	112
<i>II.2.4.2.- Permeabilidad al vapor de agua</i>	112
<i>II.2.4.3.- Propiedades mecánicas</i>	113
<i>II.2.4.4.- Propiedades ópticas</i>	113
<i>II.2.5.- Análisis estadístico</i>	114
<b>II.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	114
<i>II.3.1.- Propiedades fisicoquímicas de las FFRs</i>	114
<i>II.3.1.1.- pH, conductividad, densidad y comportamiento reológico</i>	115
<i>II.3.1.2.- Tamaño de partícula, potencial-<math>\zeta</math> y tensión superficial</i>	117
<i>II.3.2.- Caracterización de los films</i>	122
<i>II.3.2.1.- Isotermas de sorción de agua</i>	122
<i>II.3.2.2.- Permeabilidad al vapor de agua</i>	125
<i>II.3.2.3.- Propiedades mecánicas</i>	128
<i>II.3.2.4.- Propiedades ópticas</i>	130
<b>II.4.- CONCLUSIONES</b>	133

<b>CAPÍTULO III: RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE HPMC Y PRÓPOLIS. APLICACIÓN A UVA.</b>	<b>135</b>
<b>III.1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>137</b>
<b>III.2.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>139</b>
<i>III.2.1.- Diseño y preparación de las formulaciones formadoras de recubrimiento</i>	139
<i>III.2.2.- Propiedades fisicoquímicas de las FFRs</i>	141
<i>III.2.2.1.- Densidad y pH</i>	141
<i>III.2.2.2.- Tamaño de partícula</i>	141
<i>III.2.2.3.- Potencial-<math>\zeta</math></i>	141
<i>III.2.2.4.- Caracterización reológica</i>	142
<b>III.2.3.- Obtención de los films</b>	142
<b>III.2.4.- Caracterización de los films</b>	143
<i>III.2.4.1.- Permeabilidad al vapor de agua</i>	143
<i>III.2.4.2.- Análisis microestructural</i>	143
<i>III.2.4.3.- Propiedades mecánicas</i>	143
<i>III.2.4.4.- Propiedades ópticas</i>	144
<i>III.2.4.5.- Análisis microbiológico</i>	145
<b>III.2.5.- Aplicación a uva (var. Moscatel)</b>	146
<i>III.2.5.1.- Pérdida de peso</i>	146
<i>III.2.5.2.- Sólidos solubles totales y pH</i>	147
<i>III.2.5.3.- Fenoles totales</i>	147
<i>III.2.5.4.- Actividad antioxidante</i>	148
<i>III.2.5.5.- Propiedades mecánicas</i>	148
<i>III.2.5.6.- Propiedades ópticas</i>	149
<i>III.2.5.7.- Tasa respiratoria</i>	149
<i>III.2.5.8.- Análisis microbiológico</i>	150
<i>III.2.5.9.- Evaluación organoléptica</i>	150

---

<i>III.2.6.- Análisis estadístico</i>	152
<b>III.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	152
<i>III.3.1.- Caracterización de las formulaciones formadoras de recubrimiento</i>	152
<i>III.3.1.1.- Densidad, pH, tamaño de partícula y potencial-<math>\zeta</math></i>	152
<i>III.3.1.2.- Caracterización reológica</i>	155
<b>III.3.2.- Caracterización de los films</b>	157
<i>III.3.2.1.- Permeabilidad al vapor de agua</i>	157
<i>III.3.2.2.- Análisis microestructural</i>	161
<i>III.3.2.3.- Propiedades mecánicas</i>	163
<i>III.3.2.4.- Propiedades ópticas</i>	165
<i>III.3.2.5.- Análisis microbiológico</i>	169
<b>III.3.3.- Aplicación a uva (var. Moscatel)</b>	171
<i>III.3.3.1.- Propiedades fisicoquímicas y pérdida de peso</i>	171
<i>III.3.3.2.- Propiedades mecánicas y ópticas</i>	175
<i>III.3.3.3.- Tasa respiratoria</i>	177
<i>III.3.3.4.- Análisis microbiológico</i>	179
<i>III.3.3.5.- Evaluación organoléptica</i>	181
<b>III.4.- CONCLUSIONES</b>	182
<b>IV.- CONCLUSIÓN FINAL</b>	185
<b>V.- BIBLIOGRAFIA</b>	187
<b>VI.- ANEXOS</b>	I-XV







<b>Tabla 1.-</b> Características de los principales polisacáridos utilizados en la formulación de los recubrimientos	4
<b>Tabla 2.-</b> Características de las principales proteínas y lípidos utilizados en la formulación de los recubrimientos	5
<b>Tabla 3.-</b> Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de algunos Films a base de biopolímeros	17
<b>Tabla 4.-</b> Algunos de los recubrimientos comerciales que se aplican en frutas y hortalizas frescas y enteras	26
<b>Tabla 1.1.-</b> Composición de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs)	53
<b>Tabla 1.2.-</b> Composición de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) (g/100 mL de disolución) y su correspondiente relación hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de los tensoactivos	67
<b>Tabla 1.3.-</b> Densidad ( $\rho$ ) y tensión superficial ( $\gamma$ ) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) a 25°C. Valores medios y desviaciones estándar	68
<b>Tabla 1.4.-</b> Parámetros del modelo de Ostwald de Waale ( $n$ y $K$ ), viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) a 25°C. Valores medios y desviaciones estándar	71
<b>Tabla 1.5.-</b> Índice R y porcentaje de reducción de la absorbancia de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) a 25°C. Valores medios y desviaciones estándar	75
<b>Tabla 1.6.-</b> Parámetros estimados de los modelos de BET y GAB para isoterma de sorción de agua de los films y componentes puros	83
<b>Tabla 1.7.-</b> Composición de los recubrimientos comestibles (g/100 mL de disolución) y su correspondiente relación hidrocoloide/tensoactivo	88

<b>Tabla I.8.-</b> Sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix) y pH de los fresones recubiertos y no recubiertos (C) durante el almacenamiento a 5°C. Valores medios y desviaciones estándar	89
<b>Tabla I.9.-</b> Tasa respiratoria de O <sub>2</sub> (mL O <sub>2</sub> /kg h) y CO <sub>2</sub> (mL CO <sub>2</sub> /kg h) de los fresones recubiertos y no recubiertos (C) a lo largo del tiempo de almacenamiento. Valores medios y desviaciones estándar	97
<b>Tabla I.10.-</b> Resultados de la primera prueba triangular	99
<b>Tabla I.11.-</b> Resultados de la segunda prueba triangular	100
<b>Tabla I.12.-</b> Resultados del primer y segundo ensayo de clasificación por ordenación de las muestras recubiertas y no recubiertas (C)	102
<b>Tabla II.1.-</b> Composición de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) (g/100 mL disolución), balance hidrófilo-lipófilo de la mezcla de lípidos (BHL <sub>M</sub> ) y de los tensoactivos (BHL <sub>T</sub> )	109
<b>Tabla II.2.-</b> pH, conductividad eléctrica ( $\sigma$ ), densidad ( $\rho$ ), parámetros del modelo de Ostwald de Waale (n y K), viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del ajuste. Valores medios y desviaciones estándar	116
<b>Tabla II.3.-</b> Tamaño de partícula ( $d_{43}$ y $d_{32}$ ), área media superficial ( $A_s$ ), número de partículas/m <sup>3</sup> (N), potencial- $\zeta$ y tensión superficial ( $\gamma$ ) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs). Valores medios y desviaciones estándar	119
<b>Tabla II.4.-</b> Parámetros de BET y GAB estimados para las isotermas de sorción de los films, junto con el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del ajuste	124
<b>Tabla II.5.-</b> Módulo de elasticidad (ME), esfuerzo de tracción en el momento de la rotura de los films ( $\sigma_F$ ) y porcentaje de elongación (E) de los films. Valores medios y desviaciones estándar	129

<b>Tabla II.6.-</b> Valores de brillo a 85°, transmitancia interna (Ti), coordenadas cromáticas ( $L^*$ , $C^*_{ab}$ y $h^*_{ab}$ ) e índice de blancura (IB) de los films. Valores medios y desviaciones estándar	131
<b>Tabla III.1.-</b> Composición de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs)	140
<b>Tabla III.2.-</b> Densidad, pH, tamaño de partícula ( $d_{43}$ y $d_{32}$ ) y potencial- $\zeta$ de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs). Valores medios y desviaciones estándar	153
<b>Tabla III.3.-</b> Parámetros del modelo de Ostwald de Waale ( $n$ y $K$ ), viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs). Valores medios y desviaciones estándar	155
<b>Tabla III.4.-</b> Efecto inhibitorio de los films a base de própolis sobre <i>Penicillium italicum</i> y <i>Aspergillus niger</i> inoculados en placas con Patata Dextrosa Agar (PDA) y almacenadas a 20°C durante 5 días. Valores medios y desviaciones estándar	170
<b>Tabla III.5.-</b> Valores del test de Dunnett de las muestras sin recubrir (C), recubiertas con HPMC (M) y con las diferentes cantidades de extracto etanólico de própolis (EEP)	181





<b>Figura 1.-</b> Modelos de resistencia a la transferencia de vapor de agua para recubrimientos laminados (a) y emulsionados (b)	8
<b>Figura I.1.-</b> Efecto del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de los distintos tensoactivos, de la proporción hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y de sus interacciones sobre la densidad (a) y tensión superficial (b) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs)	69
<b>Figura I.2.-</b> Reograma de la formulación formadora de recubrimiento (FFR) que contenía Sugín 471/PHK-40 (S) como tensoactivo a las distintas concentraciones de hidroxipropil metilcelulosa (M) a 25°C. Los datos experimentales están representados por símbolos y los predichos por líneas	72
<b>Figura I.3.-</b> Efecto del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de los distintos tensoactivos, de la proporción hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y de sus interacciones sobre la viscosidad (b) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs)	73
<b>Figura I.4.-</b> Efecto del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de los tensoactivos, de la proporción de hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y de sus interacciones sobre el índice R (a) y el porcentaje de reducción de la absorbancia (b) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs)	76
<b>Figura I.5.-</b> Isotermas de sorción de agua de los componentes puros (a) y de los films con un balance hidrófilo-lipófilo (BHL) bajo (b), medio (c) y alto (d). Datos experimentales (símbolos) y predichos por GAB (líneas)	78
<b>Figura I.6.-</b> Comparación de los valores de humedad de equilibrio ( $W_e$ ) de los datos experimentales con los predichos para los distintos balances hidrófilos-lipófilos (BHL): (a) BHL bajo, (b) BHL medio y (c) BHL alto	81



- Figura 1.7.-** Efecto del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) y de la proporción hidrocoloide/tensoactivo (H/T) sobre las constantes de la ecuación de BET 84
- Figura 1.8.-** Efecto del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de los tensoactivos, de la proporción de hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y de sus interacciones sobre la permeabilidad al vapor de agua de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs). Valores medios e intervalos LSD 85
- Figura 1.9.-** Relación entre el contenido de humedad de equilibrio ( $W_e$ ) en el film a  $a_w=0,875$  y su permeabilidad al vapor de agua (PVA) a  $5^\circ\text{C}$ . Los símbolos representan la proporción hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y los diferentes balances hidrófilos-lipófilos (BHL) están representados por colores: blanco: BHL bajo; gris: BHL medio; negro: BHL alto 87
- Figura 1.10.-** Densidad superficial de sólidos (DSS) (a) y resistencia al vapor de agua (RVA) (b) de los fresones recubiertos y no recubiertos (C). Valores medios e intervalos LSD 91
- Figura 1.11.-** Perfil de compresión típico de un fresón recubierto con 1,5M-S y almacenado a  $5^\circ\text{C}$  92
- Figura 1.12.-** Fuerza máxima (F) de los fresones recubiertos y no recubiertos (C) a lo largo del almacenamiento a  $5^\circ\text{C}$ . Valores medios e intervalos LSD 93
- Figura 1.13.-** Luminosidad ( $L^*$ ) (a), croma ( $C^*_{ab}$ ) (b) y tono ( $h^*_{ab}$ ) (c) de los fresones a cada tiempo del almacenamiento a  $5^\circ\text{C}$ . Valores medios e intervalos LSD 94
- Figura 1.14.-** Plano cromático de las muestras recubiertas y no recubiertas (C) para todos los tiempos de almacenamiento. Valores medios e intervalos LSD 95

- Figura I.15.-** Coeficiente respiratorio (CR) de los fresones recubiertos y no recubiertos (C) a lo largo del almacenamiento a 5°C. Valores medios e intervalos LSD 98
- Figura II.1.-** Distribución típica de tamaño de partícula de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) con un 1% de ácido oleico (AO) en función del: (a) volumen de las partículas (%) y (b) número de partículas (%) 118
- Figura II.2.-** Isotermas de sorción de los films a 5°C. Datos experimentales (símbolos) y predichos con el modelo de GAB (líneas) 123
- Figura II.3.-** Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de los diferentes films a 5°C y 59% de humedad relativa 127
- Figura II.4.-** Curvas típicas esfuerzo *versus* deformación de Henky obtenida en los ensayos mecánicos para el film puro (M) y los films con un 1% de ácido oleico (AO) 128
- Figura III.1.-** Distribución del tamaño medio de las partículas de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) en términos de porcentaje de volumen (a) y número de partículas (b) 154
- Figura III.2.-** Evolución de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de los films en función del contenido en extracto etanólico de própolis (EEP) equilibrados a diferentes condiciones. Datos experimentales (símbolos) y predichos (curvas).Valores medios e intervalos LSD 157
- Figura III.3.-** Contenido en humedad (%) de los films en función del contenido en extracto etanólico de própolis (EEP) equilibrados a diferentes condiciones. Valores medios e intervalos LSD 158
- Figura III.4.-** Micrografías obtenidas mediante SEM de los diferentes films: (a) M, b) M-0,125P, c) M-0,25P, d) M-0,5P, e) M-1P y f) M-1,5P 162
- Figura III.5.-** Esfuerzo de fractura (a), porcentaje de deformación (b) y módulo de elasticidad (c) de los films equilibrados a diferentes 164

- condiciones en función del contenido en extracto etanólico de própolis (EEP). Valores medios e intervalos LSD
- Figura III.6.-** Curvas de distribución espectral del parámetro  $T_i$  de los films equilibrados a 25°C y 53% de humedad relativa 166
- Figura III.7.-** Transparencia ( $T_i$ ) de los films a 530 nm y del brillo 60° en función del contenido en extracto etanólico de própolis (EEP). Valores medios e intervalos LSD para todos los films y condiciones de equilibrado 167
- Figura III.8.-** Índice de blancura (IB), luminosidad ( $L^*$ ), croma ( $C^*_{ab}$ ) y tono ( $h^*_{ab}$ ) en función del contenido en extracto etanólico de própolis (EEP) para todos los films y condiciones de equilibrado. Valores medios e intervalos LSD 168
- Figura III.9.-** Evolución de la pérdida de peso (%), contenido en sólidos solubles (°Brix), fenoles totales (mg/100 g) y actividad antioxidante (%) de las de las muestras sin recubrir (C), recubiertas con HPMC (M) y con las diferentes cantidades de extracto etanólico de própolis (EEP) durante el período de almacenamiento en refrigeración a 1-2°C y 85-90% de humedad relativa. Valores medios e intervalos LSD 172
- Figura III.10.-** Evolución de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h^*_{ab}$  de las muestras sin recubrir (C), recubiertas con HPMC (M) y con las diferentes cantidades de extracto etanólico de própolis (EEP) durante el período de almacenamiento en refrigeración a 1-2°C y 85-90% de humedad relativa. Valores medios e intervalos LSD 176
- Figura III.11.-** Evolución de la tasa respiratoria de oxígeno ( $TRO_2$ ) (a) de las muestras sin recubrir (C) y recubiertas y de la tasa respiratoria de dióxido de carbono ( $TRCO_2$ ) (b) de todas las muestras durante el período de almacenamiento en refrigeración a 1-2°C y 85-90% de humedad relativa. Valores medios e intervalos LSD 178

**Figura III.12.-** Recuento microbiológico (hongos, levaduras y 180 microorganismos mesófilos) de todas las muestras durante el período de almacenamiento en refrigeración a 1-2°C y 85-90% de humedad relativa (a) y para cada una de las muestras (b): sin recubrir (C), recubiertas con HPMC (M) y con las diferentes cantidades de extracto etanólico de própolis (EEP). Valores medios e intervalos LSD

**Figura III.13.-** Evaluación organoléptica de las muestras sin recubrir 182 (C), recubiertas con HPMC (M) y con las diferentes cantidades de extracto etanólico de própolis (EEP)





## ABREVIATURAS

AC	Atmósfera controlada
AEs	Aceites esenciales
AM	Atmósfera modificada
ANOVA	Análisis de la varianza
AO	Ácido oleico
ASTM	American Society for Testing Materials
BET	Brunauer, Emmett y Teller
BHL	Balance hidrófilo-lipófilo
BHL <sub>ML</sub>	Balance hidrófilo-lipófilo de la mezcla de lípidos
BHL <sub>T</sub>	Balance hidrófilo-lipófilo de los tensoactivos
CECT	Colección Española de Cultivos Tipos
CGA	Agar Cloramfenicol Glucosado
CIE	Commission International de L'Eclairage
CMC	Carboximetil celulosa
CMC	Concentración micelar crítica
CR	Coeficiente respiratorio
DSS	Densidad superficial de sólidos
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazil
DTA	Departamento Tecnología de Alimentos
EEP	Extracto etanólico de própolis
FDA	Food and Drug Administration
FFRs	Formulaciones formadoras de recubrimiento
GAB	Van den Berg y Bruin
GRAS	Generally Recognized as Safe
HPC	Hidroxipropil celulosa
HPMC	Hidroxipropil metilcelulosa

HR	Humedad relativa
H/T	Relación hidrocoloide-tensoactivo
IB	Índice de blancura
ISO	International Organization for Standardization
IUIAD	Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
LSD	Least Significant Difference
MC	Metilcelulosa
ME	Módulo de elasticidad
MP	Mínimamente procesado
PCA	Agar de Recuento en Placa
PDA	Patata Dextrosa Agar
PDB	Caldo Patata Dextrosa
POD	Peroxidasa
PPD	Polifenoloxidasa
PTFE	Politetrafluoretileno
PVA	Permeabilidad al vapor de agua
S	Sugin 471/PHK-40 en escamas
S20	Monolaurato de sorbitan o Sorbester 20
S80	Monooleato de sorbitan o Sorbester 80
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SMO	Sorbitan monooleato
T80	Tween 80 o Polioxietilen sorbitan monooleato
T85	Tween 85 o Polioxietilen sorbitan trioleato
UB	Unidad de brillo
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPV	Universidad Politécnica de Valencia
VTVA	Velocidad de transmisión de vapor de agua





# INTRODUCCIÓN

---

## Recubrimientos Comestibles

Según la Food and Drug Administration (FDA) de EEUU (FDA, 2006), los recubrimientos comestibles son aquellos formados a partir de formulaciones que contengan aditivos permitidos para su uso alimentario. Entre esos aditivos alimentarios, la Directiva 95/2/CE (1995) incluye los siguientes: goma arábiga, goma xantana, glicerina, pectinas, celulosa y sus derivados (metilcelulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, etc.). En 1998, esta directiva fue modificada por la Directiva 98/72/CE (1998) introduciendo nuevos aditivos tales como la lecitina, polisorbatos, ácidos grasos y sales de ácidos grasos.

Técnicamente, se habla de *recubrimiento* cuando una solución aplicada sobre un producto forma una película superficial al secarse, mientras que un *film* se forma con anterioridad y posteriormente se aplica sobre el producto (Guilbert, 1986). En la práctica, se habla indistintamente de film o recubrimiento,

haciendo referencia a una delgada capa de material que cubre la superficie del alimento, aplicada mediante inmersión, pulverización o pintado, o bien como una envoltura continua que separa distintos componentes alimenticios, que puede ser consumida como parte del producto (Guilbert, 1986; Gennadios y Weller, 1990).

### *Propiedades de los recubrimientos comestibles*

Según Kester y Fennema (1986) los recubrimientos comestibles deben presentar ciertos requerimientos funcionales que permitan controlar o aminorar las causas de alteración de los alimentos a recubrir. Algunos de estos requerimientos, dependientes de la naturaleza del producto alimenticio al cual se aplica y de su principal mecanismo de deterioro son:

- Propiedades sensoriales: deben ser transparentes, no otorgar sabor y olor diferente al alimento y no ser detectados durante su consumo.
- Propiedades barrera: presentar una adecuada permeabilidad al vapor de agua y solutos y una permeabilidad selectiva a gases y volátiles.
- Deben estar libres de tóxicos y ser seguros para la salud.
- Deben requerir una tecnología simple para su elaboración.
- Las materias primas y el coste de producción del recubrimiento deben ser de bajo costo.

Para que los recubrimientos comestibles sean funcionales y por tanto, óptimos, se deberá otorgar una especial importancia a la selección de los materiales que los forman, ya que sus propiedades están fuertemente afectadas por la naturaleza de sus componentes, composición y estructura final.

### *Composición de los recubrimientos comestibles*

Los recubrimientos comestibles pueden agruparse en tres categorías, dependiendo del tipo de compuesto que incluyen en su formulación:

Hidrocoloides: polisacáridos o proteínas que en general, forman recubrimientos con buenas propiedades mecánicas y son una buena barrera para los gases (oxígeno (O<sub>2</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)), pero no impiden suficientemente la transmisión de vapor de agua (Drake *et al.*, 1988).

Los *polisacáridos* son los hidrocoloides que más se utilizan como recubrimientos en frutas y hortalizas, ya que forman parte de la mayoría de las formulaciones que actualmente existen en el mercado. Los polisacáridos presentan buenas propiedades barrera a los gases y pueden adherirse a las superficies de frutas y hortalizas troceadas, pero son hidrofílicos y por lo tanto constituyen una pobre barrera a la pérdida de humedad (Kester y Fennema, 1986; Krochta y de Mulder-Johnston, 1997). La tabla 1 recoge los principales polisacáridos utilizados en la formulación de los recubrimientos y sus características más relevantes (Pastor *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2008a).

Las *proteínas* utilizadas en la formulación de recubrimientos comestibles pueden ser de origen animal (caseínas, proteínas del suero lácteo) o de origen vegetal (zeína de maíz, gluten de trigo, y proteína de soja, principalmente) y dependiendo de este origen muestran una amplia variedad de características moleculares. Así, las proteínas varían en su peso molecular, conformación, carga (dependiendo del pH), flexibilidad y estabilidad térmica y las diferencias en estas características moleculares determinarán su habilidad para formar recubrimientos así como las características de los recubrimientos formados. La

tabla 2 recoge las principales proteínas utilizadas en la formulación de los recubrimientos y sus características más relevantes (Pastor *et al.*, 2005 y Vargas *et al.*, 2008a).

**Tabla 1.-** Características de los principales polisacáridos utilizados en la formulación de los recubrimientos. Adaptado de Pastor *et al.*, 2005 y Vargas *et al.*, 2008a.

Tipo	Compuesto	Permeabilidad		Otros	Citas
		al vapor de agua/gases	NP		
Polisacárido	MC, CMC, HPC, HPMC	Baja/Alta	Si	GRAS Flexible	[1-3]
	Dextrina	Alta/Moderada	-	Secado lento	[1], [3]
	Alginato	Baja/Moderada	Si	Frágil	[1], [3-4]
	Quitosano	Moderada/Alta	No	GRAS Antimicrobiano	[5-7]
	Pectina	Baja/Alta	-	GRAS	[8]
	Carragenato	Baja/Moderada	-	Frágil	[1], [3]
	Goma arábiga	Baja/Moderada	-	Buena adhesión	[1], [3]
	Goma guar	Baja/Moderada	-	Firmeza	[1], [3]
	Goma Santana	Baja/Moderada	-	Buena adhesión	[1], [3]

NP: Necesita Plastificante

MC: Metilcelulosa; CMC: Carboximetilcelulosa

HPC: Hidroxipropil celulosa; HPMC: Hidroxipropil metilcelulosa

[1] Greener y Fennema, 1994; [2] Hernández, 1994; [3] Kester y Fennema, 1986; [4] Glicksman, 1983; [5] Tharanathan y Kittur, 2003; [6] Wong *et al.*, 1992; [7] Hadwiger y Beckman, 1980; [8] Liu *et al.*, 2006.

**Tabla 2.-** Características de las principales proteínas y lípidos utilizados en la formulación de los recubrimientos. Adaptado de Pastor *et al.*, 2005 y Vargas *et al.*, 2008a.

Tipo	Compuesto	Permeabilidad al			
		vapor de agua/gases	NP	Otros	Citas
Proteína	Zeína	Baja/Alta	Si	GRAS	[1], [2]
	Gluten	Dependiente del pH y del disolvente/Alta	Si	Frágil	[2-4]
	Proteína de soja	Baja/Baja	-	Flexible	[5-8]
	Proteína de suero lácteo	Moderada/Alta	Si	Flexible	[9-10]
	Caseína	Moderada/Baja	-	Frágil	[11-12]
	Colágeno	Baja/Alta	-	Duro	[13-15]
	Gelatina	Alta/Alta	-	Flexible y fuerte	[2]
Lípido	Cera de abeja	Alta/Baja	Si	GRAS	[16]
	Cera candelilla	Alta/Baja	Si	GRAS	[16]
	Cera carnauba	Alta/Baja	Si	GRAS	[17]
	Ácidos grasos	Según tipo/Baja	-	GRAS	[17-18]

NP: Necesita Plastificante

[1] Koelsch, 1994; [2] Gennadios y Weller, 1990; [3] Gontard *et al.*, 1992, 1993; [4] Guilbert, 2000; [5] Cho y Rhee, 2004; [6] Guilbert *et al.*, 1996; [7] Gennadios y Weller, 1991; [8] Guilbert, 1986; [9] Maté *et al.*, 1996; [10] McHugh *et al.*, 1994; [11] Dangaran *et al.*, 2006; [12] Khwaldia *et al.*, 2004; [13] Hood, 1987; [14] Krochta, 1997b; [15] Rice, 1994; [16] Hagenmaier y Baker, 1997; [17] Martín-Polo *et al.*, 1992a, 1992b; [18] Shellhammer y Krochta, 1997.

Lípidos: formados por compuestos hidrofóbicos y no poliméricos (Krochta, 1997b) con buenas propiedades barrera al vapor de agua y a los gases, pero con poca capacidad para formar recubrimientos (Shellhammer y Krochta, 1997). Reducen la transpiración, la deshidratación, la abrasión en la manipulación posterior (Hernández, 1994) y pueden mejorar el brillo (Nisperos-Carriedo *et al.*, 1992). Sin embargo, los recubrimientos basados en lípidos presentan una superficie grasienta y propiedades organolépticas no deseadas como un sabor a cera y cierta rancidez (Guilbert, 1986).

Los *lípidos* se utilizan en la formulación de recubrimientos con el objetivo de mejorar la propiedad barrera al vapor de agua. Entre los lípidos comestibles que pueden ser incorporados en la formulación de recubrimientos comestibles se encuentran las ceras (cera de abeja, cera candelilla y cera carnauba), la goma laca, la goma xantana y los ácidos grasos tales como el ácido esteárico, palmítico, láurico y oleico, entre otros (ver Tabla 2). Estos últimos requieren de una matriz estructural de proteínas o polisacáridos ya que carecen de integridad estructural y durabilidad en su forma libre.

Composites o compuestos: formulaciones mixtas de hidrocoloides y lípidos que aprovechan las ventajas de cada grupo y disminuyen sus inconvenientes (Greener y Fennema, 1994). En general, los lípidos aportan resistencia al vapor de agua y los hidrocoloides, permeabilidad selectiva al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, durabilidad, buena cohesión estructural o integridad.

Los *composites* pueden ser de capas separadas, llamados multilaminados o bicapas, o formados por una única capa. Los bicapa se forman en dos etapas: en la primera se forma la base de polisacárido o proteína y en la segunda, se aplica el lípido sobre la base previamente formada. En los films en monocapa,

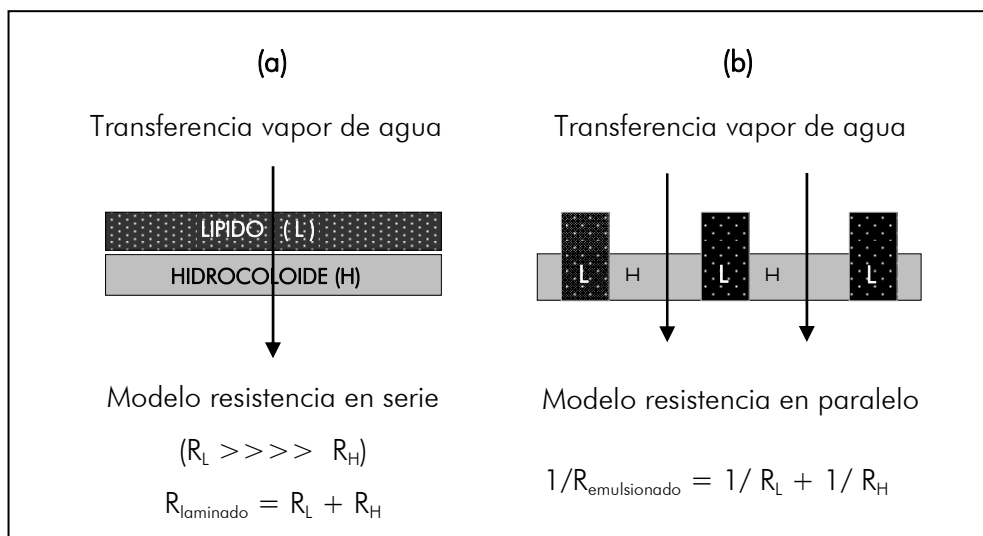
es necesaria la dispersión o emulsión del lípido en la fase hidrofílica que contiene la disolución de hidrocoloide y su posterior extensión y secado (Shellhammer y Krochta, 1997). Cuando se preparan films mediante esta técnica de emulsión, durante la etapa de secado es posible que se produzca un proceso de cremado de los lípidos hacia la superficie, debido a su baja densidad y a la baja capacidad emulsionante del polímero que actúa como matriz soporte (Kemper y Fennema, 1984a, 1984b; Vojdani y Torres, 1989; Park *et al.*, 1994). No obstante, aunque se produce una cierta separación de fases, normalmente no logra formarse una verdadera bicapa, quedando partículas de lípidos distribuidos en la matriz soporte (McHugh, 1996). Martín-Polo *et al.* (1992a, 1992b) estudiaron el efecto de la estructura del film sobre la propiedad barrera al vapor de agua, proponiendo un modelo de resistencias en serie para los films bicapa (Figura 1a) y un modelo de resistencias en paralelo para los films procedentes de una emulsión (Figura 1b), en el que la transferencia de vapor de agua se realiza mayoritariamente a través de la fase hidrocoloide.

Desde el punto de vista de la transferencia de masa, los recubrimientos bicapa son los más eficaces como barrera al vapor de agua. Sin embargo, debido a que el proceso de preparación incluye etapas de laminado y de secado en las que es necesario el uso de disolventes y altas temperaturas, su producción resulta más costosa y menos segura que la de los recubrimientos emulsionados. Además, también es posible que con el tiempo las láminas se separen. Este problema podría ser soslayado formando la bicapa por separación de fases en la emulsión, una vez ésta ha sido aplicada sobre la superficie del alimento (McHugh, 1996).

La efectividad de los films *composites* de hidrocoloides y lípidos depende, entre otros factores, de la concentración relativa de ambos, del estado físico del lípido, de la longitud, grado de insaturación y ramificación de la cadena



hidrocarbonada, así como de la distribución que alcancen los componentes lipídicos en la estructura final: tamaño de los glóbulos grasos y nivel de agregación (Baldwin *et al.*, 1997; Morillon *et al.*, 2002). Además, la forma de preparación y la composición de la emulsión de partida influye en gran medida en el tamaño y distribución de tamaños de gotas y por tanto, también en las propiedades finales del film (Martín-Polo *et al.*, 1992a).



**Figura 1.-** Modelos de resistencia a la transferencia de vapor de agua para recubrimientos laminados (a) y emulsionados (b). Adaptado de Wu *et al.* (2002).

Como se puede observar en las tablas 1 y 2, algunos de los recubrimientos requieren la incorporación de agentes plastificantes, compuestos que se adicionan con el fin de impartir una mayor flexibilidad y resistencia al recubrimiento y reducir el quebrantamiento (Gennadios y Weller, 1990). Estos compuestos disminuyen las fuerzas intermoleculares en las cadenas del polímero produciendo un descenso en las fuerzas de cohesión y por tanto,

imparten movilidad molecular a la matriz, plastificándola. Entre los plastificantes más utilizados se encuentran mono-, di- y oligosacáridos (jarabes de glucosa y fructosa, miel) y polioles (sorbitol, glicerol, derivados de la glicerina y polietilenglicol) en concentraciones del orden del 10 al 60% de base seca (b.s.), dependiendo de la rigidez del recubrimiento y del polímero (Guilbert, 1986).

La incorporación de lípidos y derivados (ácidos grasos, monoglicéridos, ésteres, fosfolípidos y tensoactivos) también ejerce un efecto plastificante que es atribuible fundamentalmente a las discontinuidades en la matriz polimérica que supone su dispersión. Otros de los compuestos que forman parte de las disoluciones formadoras de recubrimientos *composites* son los ***tensoactivos***. Estos se utilizan para favorecer la formación de la emulsión y su estabilización por acción interfacial, debido a que poseen una parte polar y otra apolar, y se adsorben en la interfase aceite-agua como una monocapa orientada, disminuyendo así la tensión interfacial (Sharma, 1981).

***Caracterización de las formulaciones formadoras de recubrimiento: factores que afectan a la estabilidad.***

El desarrollo de recubrimientos comestibles en los que un componente hidrófobo se encuentra disperso en un medio hidrófilo continuo, requiere el estudio de la estabilidad de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs), ya que algunas de las propiedades de los films secos (propiedades barrera, ópticas, mecánicas, etc.) están directamente relacionadas con la microestructura desarrollada en los mismos y ésta a su vez, por la estructura y estabilidad de dichas dispersiones.

La estabilidad de estas FFRs está relacionada con las características de la fase dispersa, siendo las más relevantes, el tamaño de partícula del componente disperso, la carga superficial de las mismas y la existencia de fuerzas atractivo-repulsivas entre las partículas de tipo van der Waals, electrostáticas, estéricas y de hidratación (Dickinson, 1992).

La determinación del **tamaño de partícula** se puede realizar mediante tecnología de difracción láser, basada en la medida de la cantidad de luz dispersada por las partículas cuando un haz de luz láser incide sobre ellas. La interacción de una onda electromagnética con las partículas se caracteriza por un patrón de dispersión característico. El tamaño de partícula se determina aplicando un modelo teórico a dicho patrón. Entre los diferentes modelos, la teoría Mie es la que mejor interpreta los patrones de dispersión de emulsiones diluidas que contengan gotas esféricas de cualquier tamaño y por tanto, es la que se aplica en la mayoría de equipos comerciales disponibles. Es importante señalar que la teoría Mie asume que las ondas de luz son dispersadas por una única partícula y por tanto, estrictamente sólo puede ser aplicada a sistemas muy diluidos. Por esta razón, las FFRs deben ser diluidas antes de realizar los análisis hasta una concentración en la que los efectos de dispersión múltiples sean despreciables (McClements, 2007). Para expresar el tamaño medio de las partículas existen varios parámetros. Uno de los más utilizados es el diámetro promedio expresado en área-volumen ( $d_{32}$ ), el cual está relacionado con el área media superficial ( $A_N$ ) de las gotas expuestas en la fase continua por unidad de volumen de la emulsión, siendo  $A_N = 6\phi/d_{32}$  y  $\phi$  la fracción volumétrica de la fase dispersa. Otro parámetro comúnmente utilizado es el diámetro promedio expresado en volumen-longitud ( $d_{43}$ ), que es la suma de los volúmenes de las gotas de cada distribución de tamaño de partícula

multiplicado por el diámetro promedio de cada clase de tamaño. De los dos parámetros, el  $d_{43}$  es más sensible a la presencia de partículas grandes y el  $d_{32}$  más sensible a los fenómenos de floculación (McClements, 2005).

Por otra parte, la medida del **potencial- $\zeta$**  de las partículas da una idea de la estabilidad del sistema coloidal puesto que está relacionada con la carga superficial de las partículas que inhibe la coalescencia y potencia la estabilidad del sistema (Sejersen *et al.*, 2007). En general, cuando las partículas presentan un potencial- $\zeta$  más positivo o negativo que  $\pm 30$  mV se considera que las fuerzas de repulsión electrostáticas exceden a las atractivas, con lo que las partículas del sistema se encuentran dispersas y no se produce floculación (Roland *et al.*, 2003; Kumar, 2006).

La medida del potencial- $\zeta$  de las partículas se realiza a través de la determinación de su movilidad electroforética (velocidad de las partículas del sistema en un campo eléctrico). La movilidad electroforética (UE) depende de la intensidad del campo eléctrico o voltaje aplicado y se puede calcular mediante la ecuación de Henry (Ec. 1).

$$U_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot \zeta \cdot f(Ka)}{3 \cdot \eta} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde,

$\varepsilon$ , constante dieléctrica del medio

$\eta$ , viscosidad

$\zeta$ , potencial- $\zeta$

$f(Ka)$ , función de Henry, que para el caso de medios acuosos y con concentración de electrolitos baja toma valores de 1,5 según la aproximación de Smoluchowski.

La determinación de las **propiedades reológicas** de las FFRs es también relevante en el estudio de la estabilidad de las mismas y además, presenta un especial interés a la hora de seleccionar la técnica de aplicación a emplear, ya que ésta dependerá del nivel de viscosidad desarrollado a un gradiente de velocidad determinado (Fellows, 1990). La caracterización reológica de las FFRs se obtiene a partir de las curvas de flujo, curvas que relacionan el esfuerzo cortante ( $\sigma$ ) desarrollado en el seno del fluido en función del gradiente de velocidad ( $\dot{\gamma}$ ). Estas curvas se pueden ajustar a diferentes modelos como el de La Ley de la Potencia (Ec. 2), que determina cómo varía el esfuerzo con el gradiente de velocidad del fluido en función de dos parámetros, el índice de comportamiento al flujo ( $n$ ) y el índice de consistencia ( $K$ ) de las FFRs.

$$\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Ec. 2})$$

Finalmente, para evaluar la extensibilidad de los recubrimientos sobre las frutas y por tanto, la eficacia del recubrimiento es importante determinar la **tensión superficial** de la formulación ( $\gamma$ ) y el **ángulo de contacto** entre el líquido y la superficie del alimento ( $\theta$ ) mediante un goniómetro a temperatura controlada. Una adecuada FFR debe presentar un valor bajo de tensión superficial y un ángulo de contacto lo más bajo posible para que la extensibilidad sea máxima. Si el ángulo de contacto es menor a  $90^\circ$ , el mojado será espontáneo (Moules, 1995). Por ejemplo, según Hagenmaier y Baker (1993) para un recubrimiento céreo, un valor de tensión superficial de 29,2 mN/m fue lo suficientemente bajo como para mojar la superficie de la uva. En algunos casos, se incorporan tensoactivos a las FFRs para reducir su tensión superficial y mejorar así la extensibilidad y adhesividad del film (Hiemenz y Rajagopalan, 1997).

Para la determinación de la tensión superficial de las FFRs se puede utilizar el “método de la gota suspendida” (Wu, 1974). Este método se basa en el análisis del perfil de una gota suspendida que se encuentra en equilibrio hidrodinámico e interfacial, gobernado por la ecuación de Bashforth y Adams (Ec. 3), que permite la obtención de la tensión superficial del líquido ( $\gamma$ ).

$$\gamma = \frac{g \cdot \Delta\rho \cdot (d_e)^2}{H} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde,

$g$ , aceleración de gravedad

$\Delta\rho$ , diferencia de densidad entre las dos fases (la gota y el aire)

$d_e$ , diámetro ecuatorial de la gota

$d_s$ , diámetro horizontal, en un plano medido a una distancia  $d_e$  desde la base de la gota

$H$ , factor de corrección

El factor de corrección  $H$ , se obtiene por solución numérica de ecuaciones diferenciales y sus valores se encuentran tabulados en forma de  $1/H$  *versus* el parámetro  $s$ , calculado a partir de la ecuación 4.

$$s = \frac{d_s}{d_e} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde,

$d_e$ , diámetro ecuatorial de la gota

$d_s$ , diámetro horizontal, en un plano medido a una distancia de desde la base de la gota

*Propiedades de los films: caracterización y factores que afectan a los mismos.*

Las propiedades de los recubrimientos comestibles (permeabilidad al vapor de agua y a los gases, solubilidad en agua o lípidos, capacidad de adsorción de agua, color, transparencia, brillo, respuesta mecánica, etc.), dependen del tipo de material utilizado, de las condiciones de formación del film, del tipo de plastificante, de la naturaleza del disolvente, de la velocidad de evaporación del disolvente, y de su espesor, entre otras (Guilbert, 1986). En la mayoría de los casos, la efectividad del recubrimiento cuando se aplica a frutas y hortalizas depende fundamentalmente de un control efectivo de la permeabilidad al vapor de agua y a los gases con unas adecuadas propiedades mecánicas.

La **permeabilidad al vapor de agua** (PVA) es una medida de la facilidad con la que el vapor de agua puede penetrar en un material. Para el estudio de la permeabilidad de un componente en estado estacionario a través de una barrera no porosa y sin imperfecciones se utiliza una combinación de la Ley de Fick para la difusión, y la Ley de Henry para la solubilidad (McHugh y Krochta, 1994d). La primera Ley de Fick (Ec. 5) asume que el flujo del componente ( $J$ ), depende de la difusividad del permeante ( $D$ ), de la concentración diferencial ( $dC$ ) en el film, y del diferencial de espesor ( $dX$ ). El signo negativo indica que la migración se produce hacia la menor concentración.

$$J = -\frac{D \cdot dC}{dX} \quad (\text{Ec. 5})$$

A partir de la pendiente de la curva peso *versus* tiempo (J) se calcula la velocidad de transmisión de vapor de agua, VTVA, (Ec. 6) y teniendo en cuenta las presiones parciales de vapor de agua en ambas caras del film y el espesor del film se calcula la PVA (Ec. 7).

$$VTVA = \frac{J}{t \cdot A} \quad (\text{Ec. 6})$$

$$PVA = \frac{VTVA}{P_{W1} - P_{W2}} \cdot L \quad (\text{Ec. 7})$$

donde,

VTVA, velocidad de transmisión de vapor de agua,  $\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$

J, pendiente de la curva de pérdida de peso en el tramo lineal,  $\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$

A, área efectiva para la transmisión de vapor de agua,  $\text{m}^2$

$P_{W1}$ , presión parcial de vapor de agua en la superficie del film en la cara orientada hacia el interior de la celda, Pa.

$P_{W2}$ , presión parcial de vapor de agua en la superficie del film en la cara orientada hacia el exterior de la celda, Pa.

L, espesor del film, m

La American Society for Testing and Materials (ASTM) define la PVA como la velocidad de transmisión de vapor de agua por una unidad de superficie de un área plana y por unidad de espesor, inducida por una unidad de diferencia de presión de vapor entre dos superficies, y bajo unas condiciones particulares de temperatura y humedad relativa (ASTM, 1995). La permeabilidad es un proceso de disolución y difusión en el que el vapor se disuelve en un lado del film y



entonces se difunde a través del otro lado. No se debe confundir con el transporte a través de poros.

Con respecto a los recubrimientos comestibles, los cuales tienen la tendencia a interactuar fuertemente con vapor de agua, la permeabilidad puede ser definida como una propiedad del complejo film-permeante, bajo condiciones específicas de temperatura y actividad de agua. Aparentemente, las diferentes características inherentes a los recubrimientos comestibles juegan el papel principal en el proceso de transferencia de materia debido a la influencia de la difusividad y solubilidad de permeantes como el agua y el  $O_2$ ,  $CO_2$  y otros gases. La estructura química, polaridad relativa, grado de cristalinidad, densidad, orientación molecular, grado de uniones cruzadas entre moléculas, peso molecular y polimerización y la presencia de plastificantes y aditivos, influyen directamente sobre las propiedades barrera al vapor de agua de los recubrimientos comestibles (Wu *et al.*, 2002). El efecto de los plastificantes ha sido ampliamente estudiado (Gontard *et al.*, 1993; Gaudin *et al.*, 1999; Myllarinen *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2006). Su presencia disminuye las fuerzas intermoleculares en las cadenas del polímero y por tanto, le confiere una mayor movilidad molecular, aumentando su permeabilidad al agua, gases o aromas. La intensidad de estos efectos depende del tipo, cantidad y peso molecular de los agentes plastificantes utilizados (Gontard *et al.*, 1993). Normalmente, el agua también actúa como plastificante y en general, los films más hidrofílicos presentan mayores valores de PVA.

Las propiedades barrera al vapor de agua de recubrimientos multicomponentes formulados a partir de hidrocoloides y lípidos están determinadas generalmente por el potencial de cada uno de sus componentes (Guilbert *et al.*, 1995). La tabla 3 muestra valores de permeabilidad al vapor de agua de algunos films formulados a base de biopolímeros.

**Tabla 3.-** Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de algunos films a base de biopolímeros. Adaptado de Vargas *et al.* (2008b).

Film	PVA x 10 <sup>11</sup> (g m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> Pa <sup>-1</sup> )	T (°C)	ΔHR (%)	Citas
MC	7,55	25	0/75	[1-4]
HPC	11	-	-	[1-2], [5-6]
HPMC	10,5	27	0/85	[6-7]
Almidón	217	23	74/50	[8-10]
Alginato	390	20	100/50	[5], [10]
Quitosano	360	25	100/50	[11]
Carragenato	190	25	100/50	[11-12]
Zeína de maíz	8,9-13,2	21	0/85	[1], [13-14]
Gluten de trigo	4,3	23	0/50	[15-17]
Soja	354	25	100/50	[18-20]
PSL	417	25	100/55	[7], [21-23]
Caseínato sódico	42,5	25	0/81	[24-25]
Cera de abeja	0,058	25	0/100	[26]
Cera candelilla	0,017	25	0/100	[5], [26-27]
Cera carnauba	0,033	25	0/100	[5], [14],[28]
Ácidos grasos	0,22-3,47	23	12/56	[28-30]

MC: Metilcelulosa; HPC: Hidroxipropilcelulosa; HPMC: Hidroxipropilmetilcelulosa; PSL: Proteínas de suero lácteo

[1]Park, 1999; [2]Kester y Fennema, 1986; [3]García *et al.*, 2004; [4]Pinotti *et al.*, 2007; [5]Guilbert, 2000; [6]Hagenmaier y Shaw, 1990; [7]Krochta y de Mulder-Johnston, 1997; [8]Peterson y Stading, 2005; [9]García *et al.*, 2000; [10]Glicksman, 1983; [11]Park *et al.*, 2001; [12]Ribeiro *et al.*, 2007; [13]Gennadios y Weller, 1990; [14]Bai *et al.*, 2003a; [15]Gontard *et al.*, 1996; [16]Guilbert *et al.*, 1996; [17]Hernández-Muñoz *et al.*, 2004; [18]Gennadios y Weller, 1991; [19]Cho y Rhee, 2004; [20]Cho *et al.*, 2007; [21]McHugh y Krochta, 1994a, 1994b, 1994c; [22]Maté *et al.*, 1996; [23]Mei y Zhao, 2003; [24]Khwaldia *et al.*, 2004; [25]Dangaran *et al.*, 2006; [26]Hagenmaier y Baker, 1997; [27]Bai *et al.*, 2003b; [28]Martín-Polo *et al.*, 1992a, 1992b; [29]Morillon *et al.*, 2002; [30]Shellhammer y Krochta, 1997.

La determinación de la PVA en recubrimientos comestibles se puede realizar con los mismos equipos y técnicas utilizadas para films poliméricos sintéticos. Entre los equipos que pueden ser utilizados se encuentra el Permatran, serie W de Mocon (Modern Controls Inc., Minneapolis, MN, EEUU) basado en sensores infrarrojos. Sin embargo, el método más empleado por los investigadores que trabajan en recubrimientos comestibles está basado en una modificación de la técnica gravimétrica ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993). El método ASTM establece que la resistencia al transporte de agua, a través del espacio de aire entre la superficie del agua y el film es despreciable ( $P_{w0} = P_{w1}$ ). Sin embargo, para films hidrofílicos, esto no se cumple y puede inducir a importantes errores en la permeabilidad calculada. Así, para considerar el efecto de la capa estanca de aire en las medidas de PVA, los valores de  $P_{w1}$  tendrán que ser calculados a partir de las ecuaciones 8-11 (Gennadios *et al.*, 1994).

$$P_{w1} = P_t - (P_t - P_{w0}) \cdot e^{-\frac{N_w h_i}{cD}} \quad (\text{Ec. 8})$$

$$NW = 6,43 \cdot 10^{-11} \cdot VTVA \quad (\text{Ec. 9})$$

$$c = \frac{P_t}{R \cdot T} \quad (\text{Ec. 10})$$

$$D = 0,26 \left( \frac{T}{298} \right)^{1,8} \quad (\text{Ec. 11})$$

donde,

$P_t$ , presión total del sistema, Pa

$P_{w0}$ , presión de vapor saturado del agua a la temperatura de trabajo, Pa

$N_w$ , flujo de agua en el film,  $\text{g}\cdot\text{mol}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$

$h_i$ , distancia entre el agua desionizada y el film, m

$c$ , concentración molar total de aire y vapor de agua,  $\text{g}\cdot\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$

$D$ , difusividad del vapor de agua en el aire,  $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$

$T$ , temperatura de trabajo, K

$R$ , constante universal de los gases,  $\text{Pa}\cdot\text{cm}^3\cdot\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$

Este método consiste en utilizar agua destilada en una cara del film, la que estuvo en contacto con la placa durante el secado, para conseguir una humedad relativa del 100% ( $P_{w0}$ ) y una disolución saturada de humedad relativa conocida en la otra cara del film ( $P_{w2}$ ). En la parte superior de la copa se coloca un ventilador para eliminar el vapor de agua que atraviesa el film. Las medidas de la VTVA se realizan a temperatura controlada y el peso de las copas se determina a intervalos de 2 horas durante un periodo de al menos 10 horas. La pendiente de la curva peso *versus* tiempo (J) se utiliza para calcular la VTVA.

La **permeabilidad a los gases**, en especial al  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ , es otro factor a tener en cuenta ya que puede influir en gran medida en la estabilidad de los alimentos sensibles a la oxidación de lípidos, vitaminas y pigmentos y en la vida útil del producto recubierto, si limita la disponibilidad de dichos gases. La medición de la permeabilidad al  $\text{O}_2$  se puede realizar mediante un analizador de  $\text{O}_2$  mientras que la del  $\text{CO}_2$  o la de cualquier otro gas sólo se pueden realizar a través de un cromatógrafo de gases.

Un recubrimiento comestible con muy buenas propiedades barrera al vapor de agua podría llegar a ser ineficiente si sus **propiedades mecánicas** no permiten mantener la integridad del film durante su manejo, envasado y transporte

(Rowe, 1978). Los recubrimientos deben ser resistentes a la rotura y la abrasión (para reforzar la estructura del alimento y facilitar su manipulación) y flexibles, con la suficiente plasticidad para adaptarse a posibles deformaciones del producto sin romperse. Por esta razón, la resistencia mecánica y deformabilidad deben ser determinadas. Entre las propiedades comúnmente evaluadas en films comestibles se encuentran el módulo de elasticidad, la elongación y el esfuerzo de fractura (McHugh y Krochta, 1994b; Greener y Fennema, 1994; Park *et al.*, 1994). Algunos de los equipos utilizados para evaluar estas propiedades, son la prensa universal de ensayos mecánicos tipo Instron (Instron Engin. Corp., Canton, MA, EEUU) o tipo TAXT2 de Aname (Aname, Surrey, Reino Unido). Las curvas fuerza *versus* distancia obtenidas de los ensayos mecánicos se transforman en curvas esfuerzo *versus* deformación de Hencky (Peleg, 1979), utilizando las ecuaciones 12 y 13.

$$\sigma = \frac{F \cdot (L_0 + L_t)}{A_0 \cdot L_0} \quad (\text{Ec. 12})$$

$$\varepsilon_H = Ln \frac{L_0 + L_t}{L_0} \quad (\text{Ec. 13})$$

donde,

$\sigma$ , esfuerzo, Pa

F, fuerza, N

$L_t$ , longitud del film a tiempo t, m

$L_0$ , longitud inicial del film, m

$A_0$ , área transversal inicial del film, m<sup>2</sup>

$\varepsilon_H$ , deformación de Hencky

La tensión de fractura nos da una idea de la resistencia a la fractura del film, el módulo de elasticidad, de la firmeza y el porcentaje de elongación, de la flexibilidad del film.

Por otra parte, las propiedades mecánicas de los recubrimientos comestibles dependen de la cohesión estructural del material a partir del que se obtienen. La cohesión es el resultado de la capacidad de los polímeros de formar fuertes y/o numerosas uniones moleculares entre cadenas poliméricas, dificultando así la separación de las cadenas. Esta capacidad depende de la estructura del polímero y su fuerza molecular, geometría, distribución de peso molecular y tipo y posición de los grupos laterales (Guilbert *et al.*, 1995). Las propiedades mecánicas también están ligadas a las condiciones de formación del recubrimiento (tipo de proceso y solvente, velocidad de enfriamiento o de evaporación, técnica de aplicación, etc.). La incorporación de una fase dispersa (lípidos) o la adición de un agente plastificante ocasionan normalmente una debilitación de la red polimérica, dando lugar a matrices más flexibles y más elásticas (Gontard *et al.*, 1993).

Otras características de los recubrimientos que normalmente se investigan con el fin de esclarecer los mecanismos que regulan sus propiedades mecánicas y de barrera son las **isotermas de sorción de agua** y la **microestructura**. La mayoría de los films son sensibles a la humedad ya que sus componentes ligan agua en mayor o menor medida dependiendo de su naturaleza, de las interacciones entre componentes, de la humedad relativa que les rodea y de la temperatura, entre otros factores. A partir de la determinación de las isotermas de sorción de agua de los films podemos llegar a conocer el grado de interacción del agua con los componentes del film y analizar cómo cambian sus propiedades en función de su contenido en humedad. Los modelos más utilizados para el estudio de las isotermas son los de Brunauer, Emmett y Teller (BET) y Van den Berg y Bruin (GAB) (Ec. 14 y 15, respectivamente). El modelo

de BET es un modelo físico que se ajusta hasta valores de  $a_w$  menores de 0,5, mientras que el de GAB es un modelo semiempírico que suele dar buenos resultados en todo el intervalo de  $a_w$  (0,11 a 0,85).

$$\frac{a_w}{(1-a_w) \cdot W_e} = \frac{1}{W_0 \cdot C} + \frac{(C-1)}{W_0 \cdot C} \cdot a_w \quad (\text{Ec. 14})$$

$$\frac{a_w}{W_e} = \frac{1}{W_0 \cdot C \cdot K} + \frac{C-2}{W_0 \cdot C} \cdot a_w + \frac{K \cdot (1-C)}{W_0 \cdot C} \cdot a_w^2 \quad (\text{Ec. 15})$$

donde,

$W_e$ , humedad de equilibrio (g agua/g film seco),

$W_0$ , humedad de la monocapa (g agua/g film seco)

$C$ , constante relacionada con el calor de sorción de la monocapa

$K$ , factor relacionado con el calor total de sorción de la multicapa

$a_w$ , actividad de agua

Los estudios de **microscopía** permiten analizar cómo la estructura de los films afecta a sus propiedades físicas, a través del estudio de las interacciones entre componentes y de la estructura y distribución de estos en la matriz polimérica.

La **apariencia** o **aspecto** es otro de los factores de calidad decisivo para la aceptación de un producto por parte del consumidor, por lo que el color, la translucidez y el brillo, también han sido objeto de recientes estudios en recubrimientos y films comestibles (Cuq *et al.*, 1996; Nussinovitch *et al.*, 1996; Ward y Nussinovitch, 1996; Trezza y Krochta, 2000a, 2000b).

La **transparencia** de los films se determina aplicando la teoría de Kubelka-Munk (Hutchings, 1999) a los espectros de reflexión de las muestras obtenidos

mediante un espectrocolorímetro. La luz que pasa a través de la muestra se ve afectada por el coeficiente de absorción ( $K$ ) y el coeficiente de dispersión ( $S$ ) (Ec. 16). En esta ecuación,  $R_{\infty}$  es la reflectancia de la muestra con un espesor infinito, determinada a través de las ecuaciones 17-19 en función de la reflectancia de la muestra ( $R$ ), medida sobre un fondo negro de reflectancia conocida ( $R_g$ ) y  $R_o$  es la reflectancia de la muestra sobre un negro ideal. La translucidez se define a través de  $T_i$  según la ecuación 20. Valores bajos de  $K/S$  y  $T_i$ , se asocian con estructuras cerradas y materiales opacos, mientras que valores altos se relacionan con estructuras abiertas y materiales transparentes.

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2 \cdot R_{\infty}} \quad (\text{Ec. 16})$$

$$R_{\infty} = a - b \quad (\text{Ec. 17})$$

$$a = \frac{1}{2} \left( R + \frac{R_o - R + R_g}{R_o R_g} \right) \quad (\text{Ec. 18})$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (\text{Ec. 19})$$

$$T_i^2 = (a - R_o)^2 - b^2 \quad (\text{Ec. 20})$$

A partir del espectro de reflexión, se obtienen las coordenadas CIEL\*a\*b\* (Ec. 21 a 23) utilizando como sistema de referencia el iluminante D65/observador 10° (Anexo I). Y a partir de las coordenadas L\*a\*b\* se calcula el tono (Ec. 24), croma (Ec. 25) e índice de blancura (IB) (Ec. 26).



$$L^* = 116 \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16 \quad (\text{Ec. 21})$$

$$a^* = 500 \left[ \left( \frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right] \quad (\text{Ec. 22})$$

$$b^* = 200 \left[ \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left( \frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right] \quad (\text{Ec. 23})$$

$$h^*_{ab} = \tan^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{Ec. 24})$$

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Ec. 25})$$

$$/B = 100 - \sqrt{(100 - L)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Ec. 26})$$

El **brillo** de los films se puede medir con un brillómetro en unidades de brillo (UB). Las medidas a ángulos próximos a 45° son adecuadas para muestras de brillo medio, a ángulos bajos pueden diferenciarse mejor las muestras de brillo alto y a ángulos altos las muestras de brillo bajo, lo cual es debido a la potenciación de la reflexión especular a medida que aumenta el ángulo de incidencia (Hutchings, 1999). Normalmente, las superficies lisas y homogéneas, sin presencia de irregularidades, presentan mayores valores de brillo (Ward y Nussinovtch, 1996). En este sentido, todas aquellas prácticas que aumenten la rugosidad superficial del film, contribuirán a una reducción del mismo. La

rugosidad superficial del film puede ser evaluada a través del estudio de la topografía superficial del film mediante microscopía de fuerza atómica (Villalobos *et al.*, 2005; Fabra *et al.*, 2009b).

### **Aplicación de los recubrimientos comestibles a frutas y hortalizas**

La aplicación de recubrimientos comestibles supone una alternativa de futuro para la conservación de la calidad de frutas y hortalizas. Su aplicación permite alargar la vida útil durante el almacenamiento al reducir las pérdidas de humedad y ralentizar la maduración de los frutos, ya que actúan como barrera al intercambio gaseoso. También se utilizan para mejorar su integridad mecánica o su protección frente a la manipulación posterior (Krochta, 1997a) y para aportar brillo a la fruta, confiriéndole un aspecto más apetecible en el punto de venta. Los recubrimientos más comunes son aquellos que se aplican a las frutas para sustituir la cera natural que se ha eliminado durante el lavado y cepillado de las mismas, procesos realizados con el fin de eliminar el polvo, la suciedad, las esporas de hongos y los pesticidas usados en el campo (Shellhammer y Krochta, 1997). En la bibliografía se pueden encontrar numerosos estudios de ejemplos de aplicación de films comestibles a frutas y hortalizas tales como aguacate, espárrago, fresa, mango, manzana, pera, zanahoria, entre otros (Han *et al.*, 2004; Fayaz *et al.*, 2009; Saucedo-Pompa *et al.*, 2009; Tzoumaki *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos se consigue una reducción importante en la pérdida de peso de las muestras recubiertas (Han *et al.*, 2004; Fayaz *et al.*, 2009; Tzoumaki *et al.*, 2009), un mejor mantenimiento de vitaminas (Navarro, 2009; Brito, 2009) antocianos (Vargas *et al.*, 2006) y en general, una vida útil mayor.

En la tabla 4 se muestran algunos de los recubrimientos comerciales que se aplican a frutas y hortalizas frescas y enteras. Cabe destacar el uso de

derivados de celulosa y ésteres de sacarosa que han sido incorporados en la mayoría de las formulaciones comerciales.

**Tabla 4.-** Algunos de los recubrimientos comerciales que se aplican en frutas y hortalizas frescas y enteras. Adaptado de Pastor *et al.*, 2005 y Vargas *et al.*, 2008a, 2008b.

Recubrimiento	Composición	Frutas y Hortalizas (Aplicación)	Citas
Nature Seal® 1000	Celulosa	Banana, mango, tomate, papaya (Spray)	[1]
Nature Shine 9000	Ceras naturales	Cítricos, mango, Manzana (Pulverización)	[2]
Food Coat	Ácidos grasos y polisacáridos	Cereza	[3]
Pro-Long	Sucroésteres de ácidos grasos y CMC	Banana, manzana, mango, patata, tomate (Inmersión)	[4-6]
Semperfreh™	Ésteres de sacarosa, mono y diglicéridos, sal sódica de CMC y caseinato cálcico	Banana, calabacín, cereza, cítricos, manzana (Cepillo, inmersión)	[7-11]
Tropical Fruit Coating 213	Cera carnauba y ácidos grasos	Mango (Esponja)	[12]

CMC: Carboximetilcelulosa

[1] Nisperos-Carriedo *et al.*, 1992; [2] [www.interamsa.com](http://www.interamsa.com) (29/07/04); [3] Alonso y Alique, 2004; [4] Dhalla y Hanson, 1988; [5] Banks, 1985; [6] Banks, 1984; [7] Avena-Bustillos *et al.*, 1994; [8] Curtis, 1988; [9] Drake *et al.*, 1988; [10] Drake *et al.*, 1987; [11] Banks, 1983; [12] Baldwin *et al.*, 1999.

Por otra parte, los recubrimientos comestibles también pueden ser utilizados como vehículo para la incorporación de aditivos con el fin de modificar las condiciones superficiales del alimento y añadir otras funcionalidades al film resultante. Entre los aditivos comúnmente utilizados se encuentran: antioxidantes, antimicrobianos, vitaminas, colorantes, saborizantes o la inclusión de microorganismos para un control biológico (Guilbert, 1988; Baldwin *et al.*, 1996; McHugh y Senesi, 2000; Appendinni y Hotchkings, 2002; Lee *et al.*, 2003; Cha y Chinnan, 2004; Pérez-Gago *et al.*, 2006; Valencia-Chamorro *et al.*, 2008; Rojas-Graü *et al.*, 2009). En ese sentido, Oms-Oliu *et al.* (2008) observaron una disminución del pardeamiento enzimático y del crecimiento microbiano en peras cortadas recubiertas con films a base de polisacáridos y agentes antipardeantes. Valencia-Chamorro *et al.* (2009) estudiaron el efecto de films compuestos de HPMC-lípido y aditivos antifúngicos sobre naranjas y obtuvieron una reducción significativa de *Penicillium digitatum* e *italicum*. Vargas *et al.* (2006) utilizaron recubrimientos a base de quitosano para reducir el deterioro microbiológico y alargar la vida útil de fresas.

Una aplicación potencial de los recubrimientos comestibles es a productos mínimamente procesadas (MP), entendiéndose por producto MP aquel que ha recibido uno o varios tratamientos suaves en su acondicionamiento y preparación para el consumo y que mantiene una apariencia y calidad próximas al producto fresco, donde el hecho diferenciador clave reside en que el tejido permanece vivo (Pérez, 2003). Las frutas y hortalizas MP presentan una vida útil muy corta, entre 5-7 días, debido a limitaciones microbiológicas, sensoriales y nutricionales. En este caso, las investigaciones que se están desarrollando actualmente se centran en incluir en las formulaciones la utilización de conservantes para retardar el crecimiento de levaduras, mohos, y bacterias durante su almacenamiento y distribución, contribuyendo así a aumentar su vida útil.

### **Recubrimientos comestibles bioactivos con incorporación de antimicrobianos naturales.**

Como se ha comentado anteriormente, la funcionalidad de los recubrimientos comestibles puede ser mejorada incorporando por ejemplo, agentes antimicrobianos. Una de las tendencias actuales en la industria alimentaria, como respuesta a la demanda de consumidores cada vez más concienciados por la salud y el medio ambiente, consiste en sustituir los aditivos químicos por sustancias naturales, especialmente si se usan para la conservación de alimentos. Por ello, el desarrollo de films comestibles bioactivos a partir de compuestos naturales (polímeros, antimicrobianos o antioxidantes o cualquier otro tipo de compuesto) ha recibido recientemente un interés creciente (Vargas *et al.*, 2007b; Du *et al.*, 2009a, 2009b; Sánchez-González *et al.*, 2009; Valencia-Chamorro *et al.*, 2009).

Entre los compuestos naturales con actividad antimicrobiana, los que han suscitado mayor interés para su aplicación a alimentos son: quitosano, aceites esenciales, polipéptidos antimicrobianos, bacteriocinas, ciertos enzimas como el sistema lactoperoxidasa y la lisozima, ácidos grasos y orgánicos, propóleo, entre otros.

El *quitosano*, polímero obtenido por desacetilación alcalina de la quitina proveniente de crustáceos, tiene la capacidad de formar films y se utiliza ampliamente en la formulación de recubrimientos (Zhang y Quantick, 1998; Jiang y Li, 2001; Vargas, 2008). Este tipo de recubrimiento es efectivo en prolongar la vida útil y mejorar la calidad de frutas enteras y cortadas ya que presenta una alta permeabilidad selectiva frente a los gases, una moderada resistencia al vapor de agua (Tharanathan y Kittur, 2003), además de poseer propiedades antimicrobianas (Cuero, 1999), antifúngicas (Krochta y de Mulder-

Johnston, 1997) y antibacterianas (Muzzarelli y Muzzarelli, 2003). El potencial de aplicación del quitosano a alimentos es enorme y ha dado lugar a la aparición de diversas patentes para su aplicación a alimentos (Vargas y González-Martínez, 2010). Existen en la bibliografía numerosos estudios de aplicación de films de quitosano a diferentes alimentos, desde frutas y hortalizas enteras o mínimamente procesadas a carnes y derivados y productos de la pesca (Jeon *et al.*, 2002; Ouattara *et al.*, 2002; Sagoo *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2006; Chien *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2009b; Duan *et al.*, 2010).

Los *aceites esenciales* (AEs) son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Son intensamente aromáticos, no grasos, volátiles y livianos. Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire (Mihaliak *et al.*, 1991). La actividad antifúngica y antibacteriana de los AEs ha sido ampliamente documentada por distintos autores en aplicación *in vitro* e *in vivo* (Reuveni *et al.*, 1984; Deans y Ritchie, 1987; Alankararao *et al.*, 1991; Baruah *et al.*, 1996; Gogoi *et al.*, 1997; Pitarokili *et al.*, 1999; Meepagala *et al.*, 2002; Pranoto *et al.*, 2005; Chi *et al.*, 2006; Seydim *et al.*, 2006; Rojas-Graü *et al.*, 2007a; Sánchez-González *et al.*, 2009, 2010) y existen numerosos trabajos donde se incorporan en recubrimientos para su aplicación a diferentes tipos de alimentos como carne (Goswami *et al.*, 2009; Zinoviadou *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2010), pescados (Gómez-Estaca *et al.*, 2007, 2009), frutas y hortalizas (Rojas-Graü *et al.*, 2007b; Du *et al.*, 2009a, 2009b; Gamage *et al.*, 2009), entre otros. En general, los AEs suelen ser más efectivos contra bacterias Gram positivas que contra las Gram negativas (Marino *et al.*, 2001; Chorianopoulos *et al.*, 2004;

Gutiérrez *et al.*, 2008), aunque los AEs de orégano, clavo, canela y citral son efectivos contra ambos grupos (Sivropoulou *et al.*, 1996; Skandamis *et al.*, 2002; Kim y Fung, 2004). Los principales componentes de los AEs con actividad antimicrobiana son compuestos fenólicos como terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonas (López-Malo *et al.*, 2005; Chorianopoulos *et al.*, 2008). En general, la eficiencia antimicrobiana de los AEs depende de la estructura química de sus componentes y de su concentración. Así, los AEs con una alta concentración en eugenol (como es el caso del aceite de clavo, perejil y canela), en cinamaldehído (AE de canela) y en citral (AE de limón y lima) son potentes antimicrobianos (Lis-Balchin *et al.*, 1998; Davidson y Naidu, 2000). El AE de tomillo posee fenoles monoterpénicos con probada actividad antiviral (Wild, 1994), antibacteriana (Cosentino *et al.*, 1999; Essawi y Srour, 2000) y antifúngica (Karaman *et al.*, 2001; Pina-Vaz *et al.*, 2004). Por otra parte, se han encontrado estudios que utilizan compuestos puros (carvacrol, eugenol, etc.) procedentes de AEs con actividad antimicrobiana, pero en la mayoría de los casos, la actividad antimicrobiana del AE suele ser mayor que la del compuesto puro debido a la gran complejidad de sustancias que lo componen, seguramente con efecto sinérgico (Gutiérrez *et al.*, 2008).

La *lisozima* es una enzima que rompe las paredes celulares de las bacterias catalizando la hidrólisis de las uniones  $\beta$  1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano. La lisozima es muy abundante en la clara del huevo, de donde se extrae para su uso industrial, en particular para el control de las bacterias lácticas en los vinos. Es estable a altas temperaturas (100°C) y a pH menor a 5,3 pero se inactiva a bajas temperaturas cuando el pH aumenta (Smolelis y Hartsell, 1952). La

lisozima es más efectiva contra las bacterias Gram-positivas (Cagri *et al.*, 2004).

El sistema *lactoperoxidasa* se produce de forma natural en la leche, y cuando se combina con  $H_2O_2$  para oxidar al ion  $SCN^-$  da lugar a varios compuestos intermedios como el hipotiocianato, ácido cianosulfuroso y ácido cianosulfúrico los cuales presentan actividad antimicrobiana (Beuchat y Golden, 1989; Joerger, 2007). La lactoperoxidasa ha demostrado inhibir el crecimiento de gran variedad de bacterias, especialmente las Gram negativas, y de hongos (Tiwari *et al.*, 2009). En este sentido, Yener *et al.* (2009) en un estudio con films a base de alginato y lactoperoxidasa, concluyeron que este tipo de films son efectivos contra *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Pseudomonas fluorescens*. Por otra parte, Min y Krochta (2005) estudiaron la efectividad de films a base de proteínas y lactoperoxidasa contra el *Penicillium commune*. En la actualidad, no se han encontrado estudios sobre films de lactoperoxidasa aplicados a alimentos.

Los *ácidos grasos* y sus *ésteres* también son considerados agentes antimicrobianos cuando se utilizan a bajas concentraciones y con un número de carbonos en la cadena entre 12 y 18. Son más efectivos contra las bacterias Gram-positivas y las levaduras (Kabara y Eklund, 1991), aunque la longitud de la cadena, el grado de insaturación y la configuración geométrica determinan su toxicidad. Los ácidos mirístico y palmítico son más efectivos contra las bacterias Gram positivas, el cáprico contra las levaduras y el ácido láurico es efectivo tanto contra las bacterias Gram positivas como contra las levaduras (Kabara, 1983). La fracción no disociada de la molécula del ácido graso es la responsable de su actividad antimicrobiana y esta actividad viene determinada por el pH. Por tanto, son más efectivos a pH bajos, normalmente menores a 5 (Cagri *et al.*, 2004).



En cuanto a los ésteres, el glicerol monolaurato es el más activo contra las bacterias Gram positivas y hongos como *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger* y *Candida utilis*, a pH ente 5 y 8 (Cagri *et al.*, 2004). En cambio, el glicerol del ácido cáprico y láurico, es más eficaz contra las bacterias Gram negativas (Beuchat y Golden, 1989).

Entre los ácidos grasos poliinsaturados, el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico, procedentes de la serie omega-3, han mostrado ser eficaces frente a algunas bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* (Shin *et al.*, 2007). No se han encontrado estudios donde se incorporen como aditivos en films comestibles para su posterior aplicación en alimentos.

Entre los *ácidos orgánicos* más utilizados como conservantes y antimicrobianos se encuentran el ácido cítrico, málico, tartárico, láctico, benzoico y propiónico (Eklund, 1985; Beuchat y Golden, 1989; Davidson y Branen, 1993). Su efectividad depende del pK del ácido ya que la forma activa es la no disociada. Como la mayoría de los valores de pK<sub>a</sub> de estos ácidos están entre 3 y 5, su capacidad antimicrobiana es mayor a bajos valores de pH (Beuchat y Golden, 1989).

El *propóleo o própolis* es una resina cérea natural, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales. Su composición difiere en función de la variedad de las abejas, el clima, la flora, la época de recolección y la situación geográfica (Farré *et al.*, 2004). Los principales componentes son resinas y bálsamos (50%), compuestas por flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, ceras (30%), aceites

esenciales (10%), polen (5%) y compuestos orgánicos (5%) (Juliano *et al.*, 2007). El própolis es un producto de extraordinario interés en el campo de la medicina y la industria farmacéutica debido a sus numerosas propiedades tales como, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales y antifúngicas entre otras (Krell, 1996; Durk, 1997; Choi *et al.*, 1999; Scheller *et al.*, 1999; Bankova, 2000). En bibliografía no se han encontrado estudios donde se incorpore propolis a films comestibles para su posterior aplicación a alimentos.

Por último, existe una gran variedad de polipéptidos procedentes de bacterias, plantas, insectos, anfibios, crustáceos y organismos marinos que tienen una aplicación potencial como antimicrobianos. El primer polipéptido que se aisló fue la nisina, y a partir de ahí la lista de estos polipéptidos antimicrobianos ha ido creciendo constantemente, sobre todo en las dos últimas décadas (Tiwari *et al.*, 2009).

La *nisina*, la cual procede de las bacterias lácticas, es una de las bacteriocinas más utilizadas para la conservación de alimentos. Las bacteriocinas son péptidos catiónicos de origen bacteriano con propiedades hidrofóbicas o anfífilas, que normalmente actúan a nivel de la membrana de las bacterias (Tiwari *et al.*, 2009). Se obtiene como subproducto durante el proceso de fermentación de algunas cepas de *Streptococcus lactis* y *Lactococcus lactis*. Se trata por tanto de un conservante natural, permitido por la Unión Europea según la Directiva 95/2/CE, que posee una acción inhibitoria en ciertas especies y en general sobre las bacterias Gram-positivas. No tiene gran influencia sobre las bacterias Gram-negativas y ninguna acción sobre hongos y levaduras. La nisina es soluble en medio acuoso y muy estable en medio ácido (3,5-8,0). La actividad antimicrobiana de la nisina ha sido documentada por varios autores (Sebti *et al.*, 2003; Sanjurjo *et al.*, 2006; Guiga *et al.*, 2009; Pintado *et al.*, 2009; Rossi-Márquez *et al.*, 2009; Pintado *et al.*, 2010). En este

sentido, Martins *et al.* (2010) observaron que el queso Ricotta recubierto con un film que contenía nisina presentó buenos resultados contra el ataque de *L. monocytogenes*. Gadang *et al.* (2008) estudiaron el efecto de films a base de proteína, nisina, ácidos orgánicos y otros compuestos sobre salchichas Frankfurt de pavo y corroboraron que estos films fueron efectivos contra *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *E. coli*.

La *pediocina* es otra bacteriocina que se ha usado ampliamente en alimentos como antimicrobiano. Está producida por las cepas de *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus* y también está considerada como GRAS. Otras bacteriocinas de interés son la reuterina, acidolfina, bulgaricina, helveticina, lactacina, plantaricina y diplocina producidas por los microorganismos *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgari*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus cremoris*, respectivamente) (Tiwari *et al.*, 2009).

### **El futuro de los recubrimientos comestibles**

En el futuro, la aplicación de recubrimientos comestibles será uno de los métodos más efectivos para alargar la vida útil de las frutas y hortalizas. En la actualidad aunque la aplicación de la tecnología no está muy extendida, se espera que se extienda a toda clase de productos, tanto frescos como tratados (secos, rehidratados, etc.). Su aplicación permitirá, en algunos casos, la eliminación de los envases tradicionales y por tanto, mejorará el impacto medioambiental al generar menos materiales de deshecho. La tendencia se centrará en el desarrollo de recubrimientos con componentes bioactivos que permitan alargar la vida útil y mejorar la calidad de los productos. Estos recubrimientos podrían actuar ralentizando la degradación de los compuestos funcionales tales como, vitaminas, enzimas pro o prebióticos en la matriz del

alimento a través del tiempo. Inicialmente, estos compuestos actuarían en la superficie del producto pero a medida que transcurriera el tiempo entrarían en la matriz del producto por difusión. Teniendo en cuenta las preferencias de los consumidores por productos frescos y sin aditivos, estos componentes bioactivos deberán ser preferiblemente componentes naturales (Vargas *et al.*, 2008a).

Estudios recientes apuestan por la aplicación de micro y nanotecnologías para desarrollar recubrimientos comestibles en los que se puedan incorporar compuestos en forma de micro o nano encapsulados que permitan controlar el pH, temperatura o presión del medio. La encapsulación protegerá a los componentes bioactivos de forma que estos sean biológicamente activos en el momento de ser consumidos (Weiss *et al.*, 2006). Otra futura aplicación consiste en la aplicación de recubrimientos multicomponentes mediante la deposición de nanocompuestos que permitan mejorar sus propiedades (Vargas *et al.*, 2007a, 2008b).

En definitiva, la aplicación de recubrimientos comestibles supone una alternativa de futuro para la conservación de la calidad de frutas y hortalizas. Las investigaciones deben ir dirigidas hacia la obtención de recubrimientos adecuados para cada tipo de producto, de modo que se consiga un control óptimo de la permeabilidad a los gases, de los cambios de color y de textura y en la calidad nutricional de los mismos.



## JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DEL ESTUDIO

---

La aplicación de recubrimientos comestibles parece ser una tecnología prometedora para la mejora de la calidad y conservación de los alimentos durante el procesado y almacenamiento. En frutas y hortalizas, por ejemplo, se aplican para alargar la vida útil durante su almacenamiento, reducir las pérdidas de humedad y ralentizar los procesos de maduración de los frutos ya que actúan como barrera al intercambio gaseoso. También se utilizan para mejorar su integridad mecánica o su protección frente a la manipulación posterior (Krochta y de Mulder-Johnston, 1997) y para aportar brillo al producto, confiriéndole un aspecto más apetecible en el punto de venta. Por otra parte, los recubrimientos y films comestibles también pueden ser utilizados como vehículo para la incorporación de antimicrobianos, antifúngicos y antioxidantes, entre otros (Cha y Chinnan, 2004).

Los recubrimientos comestibles pueden utilizarse donde los plásticos no pueden usarse. Son recubrimientos “inteligentes” puesto que son activos y selectivos con

un uso potencial prácticamente infinito. Las materias primas empleadas en su formulación son de origen natural y son perfectamente biodegradables y por tanto seguros para el entorno. Si bien su costo es más elevado que el de los films de polietileno o polipropileno, son del mismo orden que los recubrimientos multicapa o los envases activos. Sin embargo, su coste no puede ser un inconveniente importante puesto que se aplican en muy pequeñas dosis y aumentan notablemente el valor añadido del producto.

En la actualidad, la nueva tendencia hacia el uso de materiales biodegradables en el sector del envase ha impulsado el desarrollo de recubrimientos y films comestibles a base de polisacáridos solubles en agua. En este sentido, las soluciones de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) son compatibles con otros polisacáridos solubles en agua, con sales y con tensoactivos (Nisperos-Carriedo, 1994). Forman films resistentes a aceites y grasas, flexibles, transparentes, sin olor y sabor. Su permeabilidad selectiva a gases permite el retraso de la madurez en las frutas al reducir la concentración interna de oxígeno ( $O_2$ ), sin causar una acumulación excesiva de dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Sin embargo, su alta permeabilidad al vapor de agua hace necesaria la incorporación de compuestos lipídicos como sucroésteres de ácidos grasos y tensoactivos entre otros (Hernández, 1994; Debeaufort y Voilley, 1995) para mejorar esta propiedad (Greener y Fennema, 1994). De ahí que, en este trabajo se hayan desarrollado recubrimientos comestibles a base de HPMC con diferentes tipos de materiales lipídicos que permitan una adecuada optimización de las propiedades funcionales del film.

Los films *composites* ofrecen grandes ventajas en cuanto a la posibilidad de modificación y adecuación, a determinados usos, de las propiedades funcionales. Sin embargo, existen pocos estudios sistemáticos en los que se correlacionen las características de la emulsión de partida y las propiedades finales del film formado. En este trabajo, se pretende analizar dicha relación

para establecer criterios de formulación de recubrimientos que permitan su adecuación a diferentes usos en productos alimentarios como frutas y hortalizas enteras y cortadas, productos cárnicos, frutos secos, congelados, etc.





## OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

---

El **objetivo general** del trabajo consiste en desarrollar y caracterizar recubrimientos comestibles para su uso en diferentes sistemas alimentarios, mediante el uso de mezclas de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) y lípidos en emulsión, que permitan una adecuada optimización de las propiedades funcionales del film. También se pretende evaluar cómo la incorporación de própolis en la matriz polimérica del film afecta a sus propiedades fisicoquímicas y de barrera y a su efectividad como agente antifúngico.

Los **objetivos específicos** son:

- Diseño de formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) a base de HPMC puro y mezclas de HPMC con diferentes lípidos y própolis.
- Caracterización de las FFRs, mediante el estudio de las propiedades fisicoquímicas más relevantes.
- Caracterización de los denominados films (recubrimientos secos y aislados), mediante el estudio de diferentes propiedades fisicoquímicas y del análisis microestructural de los mismos.
- Estudio de la influencia de la aplicación de los recubrimientos en fresas y uvas, durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración, a través de la determinación de los parámetros más relevantes desde un punto de vista de la calidad del fruto, así como el análisis del impacto del recubrimiento sobre las características sensoriales de las muestras recubiertas.

Para la consecución de los mencionados objetivos se planteó el siguiente **Plan de Trabajo**:

- Puesta a punto de la metodología para el diseño y preparación de las FFRs.
- Caracterización de las FFRs: determinación del comportamiento reológico, densidad, tensión superficial, tamaño de partícula, y potencial- $\zeta$ .
- Evaluación de los films secos: obtención de las isothermas de sorción y determinación de la permeabilidad al vapor de agua, brillo, translucidez, color y propiedades mecánicas y microestructura y propiedades antifúngicas, en el caso de los films a base de própolis.
- Aplicación de las FFRs en fresones y uva: determinación de la densidad superficial de sólidos y de la resistencia a la transmisión de vapor de agua. Estudio de la evolución del color, propiedades mecánicas y tasa respiratoria de las muestras durante el almacenamiento, de la microestructura de las muestras recubiertas y análisis del impacto del recubrimiento sobre las características sensoriales de las muestras recubiertas.



# PRESENTACIÓN DEL TRABAJO

---

Con el fin de organizar y ofrecer una mayor fluidez en la presentación de los resultados, el estudio se compone de una introducción general y tres capítulos:

- I.- Recubrimientos comestibles a base de HPMC y diferentes tensoactivos. Aplicación a fresas.
- II.- Recubrimientos comestibles a base de HPMC, ácido oleico y diferentes tensoactivos.
- III.- Recubrimientos comestibles a base de HPMC y própolis. Aplicación a uva.



## CAPÍTULO I

---

RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE  
HPMC Y DIFERENTES TENSOACTIVOS.  
APLICACIÓN A FRESONES.





## I.1.- INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el interés por conseguir que las frutas y hortalizas conserven durante un tiempo más largo sus características sensoriales, nutricionales y microbiológicas, que es lo que determina su calidad y vida útil. Estas características se suelen ver afectadas durante el proceso de postcosecha, almacenamiento y comercialización y aunque hay procesos físicos y químicos que permiten estabilizar y preservar la calidad de los alimentos, normalmente se hace necesario el uso de un envase adecuado para su distribución y almacenamiento que proporcione una adecuada permeabilidad al vapor de agua y a los gases, así como una cierta protección mecánica (Debeaufort *et al.*, 1998). La permeabilidad de estos envases junto a la concentración gaseosa en su interior marcará la pauta respiratoria en los productos de origen vegetal. El empleo de atmósferas modificadas (AM) o controladas (AC) en el interior del envase suponen la reducción de la concentración de oxígeno ( $O_2$ ) y/o elevación del dióxido de carbono ( $CO_2$ ), con la consecuente disminución en la tasa respiratoria y su aplicación reduce la emisión de etileno, retrasa la maduración y el ablandamiento, mitiga los desordenes fisiológicos y los daños por frío, frena el ataque fúngico y mantiene mejor la calidad organoléptica, nutritiva y sensorial de los alimentos. Sin embargo, aunque el envasado en atmósferas modificadas ha demostrado ser útil para mantener las cualidades sensoriales de los alimentos, su efecto sobre el crecimiento microbiano es limitado.

Una alternativa para alargar la vida útil de las frutas y hortalizas durante su distribución y almacenamiento y que además permita la incorporación de antimicrobianos naturales es el empleo de recubrimientos comestibles. Estos recubrimientos permiten alargar la vida útil de las frutas al actuar como barrera frente al transporte de gases (vapor de agua y  $O_2$ ), pudiendo tener un efecto

similar al conseguido por el del empleo de AM o AC (Park, 1999; Vargas *et al.*, 2008a, 2008b). Además, como los recubrimientos se producen a partir de compuestos naturales biodegradables, cumplen con las exigencias solicitadas por los consumidores, cada vez más preocupados por su salud y el medio ambiente, inclinándose más hacia la compra de productos libres de químicos de síntesis.

En este sentido, al ser la fresa una fruta muy perecedera y muy sensible a los daños mecánicos y al deterioro fúngico, la aplicación de recubrimientos comestibles podría ser de interés para mantener sus atributos de calidad durante más tiempo y poder alargar su vida útil.

Los términos fresa y fresón, engloban especies de la familia de las Rosáceas pertenecientes al género *Fragaria* y a los fresones (*Fragaria x ananassa* Duch.) también se les suele designar con el nombre común de fresa (Namesny, 1999). El fresón es un producto muy apreciado por los consumidores, sobre todo por su contenido nutricional ya que, en comparación con el resto de frutas, contiene una cantidad moderada de hidratos de carbono y su valor calórico es bajo. Además, destaca por su aporte de vitamina C, de sustancias de acción antioxidante y su alto contenido de ácidos orgánicos, entre ellos, el cítrico, el málico, el oxálico y el salicílico. El fresón es un fruto no-climatérico y por tanto, debe ser recolectado listo para el consumo. Esto implica que hay un período muy corto en el que el producto presenta una calidad óptima. En ese sentido, cualquier tecnología que permita alargar su vida útil (preservando su calidad), presenta un gran interés para el sector de la alimentación.

Entre los principales factores, limitantes de la vida postcosecha de las fresas, se encuentran los daños mecánicos y la contaminación por hongos. Durante la conservación, manipulación y distribución, la composición química del fruto se modifica con el tiempo provocando un descenso de su valor nutritivo y calidad global. Para limitar estos cambios es indispensable controlar los procesos

respiratorios y enzimáticos así como los daños mecánicos, responsables de las lesiones producidas en los tejidos y como consecuencia de ello, de la pérdida de turgencia. Estos cambios aumentan la producción de etileno y de metabolitos secundarios así como la tasa respiratoria, la cual es un indicador excelente de la actividad metabólica del fruto y un factor importante para determinar el tiempo de conservación. Sin embargo, la causa más importante del deterioro postcosecha de las fresas es la infección fúngica, producida principalmente por *Botrytis cinerea* y *Rhizopus* sp. (Maas, 1981).

En la bibliografía se pueden encontrar diversos trabajos de aplicación de recubrimientos comestibles a fresa y la mayoría suelen combinar diferentes compuestos para conseguir una mayor funcionalidad en el recubrimiento. Así, Fan *et al.* (2009) aplicaron recubrimientos a base de alginato y ácido palmítico y observaron que la aplicación no modificó el color externo de las fresas ni tampoco afectó al contenido en antocianinas durante el almacenamiento. En cambio, sí redujo el crecimiento microbiano, la pérdida de peso y además mantuvo la firmeza de las fresas. Resultados similares se obtuvieron también por Ribeiro *et al.* (2007) cuando aplicaron recubrimientos a base de almidón, carragenato y quitosano sobre fresa. Vargas *et al.* (2006) observaron que las fresas recubiertas a base de quitosano y ácido oleico mantuvieron mejor sus propiedades mecánicas y ópticas que las no recubiertas a lo largo del almacenamiento. Además, el ácido oleico redujo el deterioro fúngico de las mismas aunque produjo ciertos cambios a nivel sensorial. Sin embargo, Han *et al.* (2005) comprobaron que el sabor de las fresas no se vio afectado cuando el recubierto contenía quitosano y ácido acético o láctico, pero sí cuando se le incorporó además una pequeña cantidad de vitamina E al compuesto por quitosano y ácido láctico.

Como ya se ha explicado en la introducción, la hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) es uno de los polímeros más utilizados en recubrimientos comestibles

por presentar buenas propiedades mecánicas, barrera a los gases y un alto brillo (Krochta y de Mulder-Johnston, 1997; Sánchez-González *et al.*, 2009) aunque su mayor limitación es su alta permeabilidad al vapor de agua (PVA). Para mejorar esta propiedad, normalmente se utilizan compuestos de naturaleza hidrófoba como pueden ser los lípidos y los tensoactivos (Kester y Fenema, 1986; Baldwin *et al.*, 1997; Vargas *et al.*, 2009a).

El *objetivo* de este capítulo consiste en llevar a cabo una caracterización fisicoquímica de formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) a base de HPMC y tensoactivos con diferentes balances hidrófilo-lipófilo (BHL) y de los films resultantes, en términos de sus propiedades reológicas, de estabilidad y de tensión superficial, propiedades de sorción y permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas y ópticas. Además, se pretende evaluar el efecto de la aplicación de estos recubrimientos a fresas recubiertas y almacenadas en refrigeración, a partir de la evolución de la calidad fisicoquímica y sensorial de los mismos.

## I.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

### *1.2.1.- Diseño y preparación de las formulaciones formadoras de recubrimiento*

Para la obtención de las FFRs se utilizó como matriz soporte HPMC (Methocel® E-15) de bajo peso molecular y de viscosidad 15 cPoise al 2% a 20°C suministrado por la empresa The Dow Chemical Company (Midlan, USA) y como tensoactivos no-iónicos se utilizaron Sorbester 80 (Monooleato de Sorbitan, S80), Sorbester 20 (Monolaurato de Sorbitan, S20) y Sugina 471/PHK-40 en escamas (Mono-diglicéridos de ácidos grasos, S), suministrados por la empresa Cargill Texturizing Solutions S.L. (Barcelona, España). La elección de

tres tensoactivos distintos fue para estudiar la estabilidad de las formulaciones formadoras de recubrimiento en función de su BHL.

La metodología de preparación de las FFRs fue estandarizada y consistió en dispersar y disolver 1,5, 3 y 4,5% (p/v) de hidroxipropil metilcelulosa (M) en agua bidestilada a 80°C durante 2 horas y manteniendo una agitación constante. A continuación, a cada formulación se le añadió un 3% (p/v) del tensoactivo correspondiente, tal y como se muestra en la tabla I.1.

**Tabla I.1.-** Composición de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs).

FFR	M (% p/v)	S80 (% p/v)	S20 (% p/v)	S (% p/v)
1,5M-S80	1,5	3	0	0
3M-S80	3	3	0	0
4,5M-S80	4,5	3	0	0
1,5M-S20	1,5	0	3	0
3M-S20	3	0	3	0
4,5M-S20	4,5	0	3	0
1,5M-S	1,5	0	0	3
3M-S	3	0	0	3
4,5M-S	4,5	0	0	3

En las formulaciones en las que se añadió Sorbester 80 y 20, estos fueron previamente fundidos a 40°C en 50 mL de agua bidestilada y en aquellas en las que se utilizó Sugin 471/PHK-40 escamas, éste se adicionó una vez fundido a 65°C en 50 mL de agua bidestilada. Una vez añadido el tensoactivo correspondiente, la mezcla se siguió agitando hasta alcanzar los 80°C y a

continuación, todas las FFRs se homogeneizaron en un equipo ultraturax (T25, IKA®, Alemania) a 12500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, a cada formulación se le adicionó el agua restante para completar su volumen y fue enfriada hasta temperatura ambiente manteniendo una suave agitación para favorecer la disolución del hidrocoloide. Para evitar una separación de las fases se procedió, una vez fría la formulación, a calentarla nuevamente, a 60°C, y realizar una nueva homogeneización en el ultraturax durante 10 minutos.

### ***1.2.2.- Propiedades fisicoquímicas de las FFRs***

#### *1.2.2.1.- Densidad y tensión superficial*

La densidad y tensión superficial de las FFRs fue determinada a 25°C mediante un densímetro (DA-110M, Mettler Toledo, España) y un goniómetro (OCA20, DataPhysics Instruments GmbH, Alemania), respectivamente.

Para obtener los valores de tensión superficial se seleccionó el método de Laplace-Young (Karbowski *et al.*, 2006) y los ajustes de la imagen de la gota se realizaron mediante el programa SCA20. En las mediciones se utilizaron agujas Hamilton 19, de diámetro interior de 0,69 mm y exterior de 1,07 mm. Para cada FFR se realizaron 9 determinaciones.

#### *1.2.2.2.- Caracterización reológica*

La caracterización reológica de las FFRs fue realizada utilizando un viscosímetro (Rheolab MC1, Paar Physica, Alemania) de cilindros concéntricos con un sensor del tipo Z1 DIN para las formulaciones más viscosas (3M-S80, 4,5M-S80; 3M-S20, 4,5M-S20; 3M-S, 4,5-S) y un sensor del tipo Z2 DIN para las formulaciones menos viscosas (1,5M-S80; 1,5M-S20; 1,5M-S). Las mediciones

se realizaron por triplicado para cada muestra a una temperatura de 25°C, tras un período de reposo de 20 minutos. Las curvas de flujo (esfuerzo vs. gradiente) fueron obtenidas en un intervalo de gradientes de velocidad de 0 a 100 s<sup>-1</sup>. Éstas se ajustaron a la Ley de Potencia, para obtener los parámetros reológicos del modelo: K (índice de consistencia) y n (índice de comportamiento al flujo). Las viscosidades aparentes fueron calculadas a un gradiente de 100 s<sup>-1</sup>.

#### *1.2.2.3.- Índice R y cinética de sedimentación*

Uno de los métodos tradicionales más usados para estudiar la estabilidad de una emulsión/dispersión, es el índice de estabilidad "R", el cual está relacionado con la distribución del tamaño de la gota en la emulsión. El valor de este índice, se obtiene como el cociente entre la absorbancia de la emulsión medida a 800 y 400 nm (Kaufman y Garti, 1981). Las lecturas de absorbancia a 400 nm y 800 nm de cada formulación, diluida 200 veces, fueron obtenidas en un espectrofotómetro (Cecil 2021, Cecil Instruments, Reino Unido). Todas las medidas se realizaron por triplicado a 25°C.

La cinética de sedimentación de cada FFR, fue analizada mediante medidas de absorbancia a una longitud de onda de 400 nm cada 5 segundos por un periodo de 20 minutos. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado.

#### *1.2.3.- Obtención de los films*

Las FFRs fueron vertidas en placas niveladas de politetrafluoretileno (PTFE) de 15 cm de diámetro, y se secaron a temperatura ambiente durante 48 horas. El espesor de los films se controló siguiendo el procedimiento descrito por Park y Zhao (2004) y ajustando a una misma densidad de sólidos para todos los films de 56 g/m<sup>2</sup> ya que el espesor de los films hidrofílicos es un factor a tener en



cuenta para su caracterización (McHugh *et al.*, 1993; Hagenmaier y Shaw, 1990). El espesor de los films fue medido por quintuplicado utilizando un micrómetro digital (Palmer - Comecta, España,  $\pm 0,001$  mm).

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua (PVA) los films secos fueron equilibrados durante 2 semanas en desecadores a  $5^{\circ}\text{C}$  y 76% humedad relativa (conseguida mediante una disolución saturada de NaCl).

Para determinar las isotermas de sorción de agua los films secos se equilibraron durante 2 semanas en desecadores con  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

#### ***1.2.4.- Caracterización de los films***

##### *1.2.4.1.- Isotermas de sorción de agua*

Para la determinación de las isotermas de sorción, los films secos ( $\phi = 3$  cm) y previamente equilibrados durante 2 semanas en desecadores con  $\text{P}_2\text{O}_5$ , fueron colocados, por triplicado, en desecadores que contenían sales saturadas de: LiCl,  $\text{CH}_3\text{COOK}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , NaCl y KCl, las cuales se mantuvieron a  $5^{\circ}\text{C}$  en un incubador (Hot-Cold B, J.P.-Selecta, España), para mantener unas humedades relativas de 11,3%, 29,2%, 33,6%, 43,1%, 58,9%, 75,6% y 87,7%, respectivamente (Labuza *et al.*, 1985; ASTM, 1996). Los films fueron pesados periódicamente ( $\pm 0,00001$  g) hasta que alcanzaron peso constante ( $\Delta M \approx 0,0005$  g), asumiendo que habían alcanzado el equilibrio (Spiess y Wolf, 1983). Finalmente, la humedad de equilibrio de las muestras ( $W_e$ ) se determinó utilizando una estufa de vacío (Vaciotem-T, J.P. Selecta, España) a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Los datos experimentales ( $W_e$  (b.s.) *versus* actividad de agua ( $a_w$ )) fueron ajustados al modelo de BET y de GAB según las ecuaciones 14 y 15 citadas en la introducción.

#### *1.2.4.2.- Permeabilidad al vapor de agua*

La PVA fue medida según una modificación de la técnica gravimétrica ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993), usando copas de aluminio (fabricadas por Monje Hnos. S.L., Valencia, España) y considerando la corrección al método sugerida por Gennadios *et al.*, (1994). La metodología llevada a cabo así cómo la obtención de los resultados fueron los mismos que se explican en la introducción.

#### *1.2.5.- Aplicación a fresones (var. Ventana)*

La materia prima utilizada fueron fresones de la variedad Ventana procedentes de Palos de la Frontera (Huelva, España), adquiridos en un mercado local de Valencia (España) el mismo día en que fueron procesados. En cada una de las experiencias, se utilizaron fresones de un mismo lote, que fueron seleccionados en base a un color y tamaño uniforme, ausencia de daños mecánicos y/o signos visibles de ataque fúngico. Antes de aplicar los distintos tratamientos los fresones fueron lavados con una disolución de hipoclorito sódico (10 mL/L) y se dejaron secar a temperatura ambiente.

La aplicación a fresones sólo se realizó con las FFRs que contenían Sugin 471/PHK-40 escamas (S) en su composición. Para ello, los fresones fueron sumergidos en las distintas FFRs durante 1 minuto y secados en una estufa (Hot-Cold M, J.P. Selecta, España) durante 1 hora aproximadamente a 25°C. Una vez secos, los fresones se introdujeron en envases de 900 mL de capacidad (8 fresones/envase), compuestos por una bandeja de poliestireno y una tapa transparente de polietileno. La elección de los materiales de los envases se realizó en función de la permeabilidad al agua y a los gases ya que los fresones necesitan una permeabilidad selectiva a los gases y una humedad relativa del

90 al 95%. De los materiales poliméricos accesibles en el mercado, el poliestireno es el que mayor permeabilidad al agua ( $60-150 \text{ g}\cdot 25\mu\text{m}/\text{m}^2\cdot 24\text{h}$ ) y a los gases ( $6000 \text{ cm}^3\cdot 25\mu\text{m}/\text{m}^2\cdot 24\text{h}\cdot \text{bar}$  para el  $\text{O}_2$  y  $18000 \text{ cm}^3\cdot 25\mu\text{m}/\text{m}^2\cdot 24\text{h}\cdot \text{bar}$  para el  $\text{CO}_2$ ) presenta. Los envases se mantuvieron cerrados en una cámara de temperatura controlada a  $5^\circ\text{C}$  (AL265, Aqualytic GmbH & Co., Alemania) hasta cada uno de los tiempos de almacenamiento ensayados (0, 3, 6 y 9 días). A cada tiempo, se analizó el pH, sólidos solubles, pérdida de peso, propiedades mecánicas y ópticas y tasa respiratoria de las muestras recubiertas y no recubiertas. Para realizar todos los análisis periódicos por triplicado se utilizaron tres envases por tiempo y formulación más tres envases por tiempo con fruta sin recubrir (fruta control).

#### *1.2.5.1.- Sólidos solubles totales y pH*

Para la determinación de los sólidos solubles y pH, cada una de las muestras se trituró con un ultraturrax (T25, IKA®, Alemania) durante 1 minuto a 8500 rpm. Los sólidos solubles totales se determinaron mediante un refractómetro (3T ABBE, ATAGO Co. Ltd., Japón) termostataado a  $20^\circ\text{C}$ . La medida del pH se realizó con un pH-métro (C830, Consort, Bélgica). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### *1.2.5.2.- Densidad superficial de sólidos y resistencia a la transmisión de vapor de agua.*

La densidad superficial de sólidos (DSS), como indicador del espesor medio del recubrimiento, se determinó mediante la ecuación I.1.

$$DSS = \frac{M_{FA} X_S^F}{A_S} \quad (\text{Ec. I.1})$$

donde,

DSS, densidad superficial de sólidos, g/m<sup>2</sup>

M<sub>FA</sub>, masa de disolución adherida en la superficie de la muestra, g

X<sub>S</sub><sup>F</sup>, fracción másica de sólidos en la formulación

A<sub>S</sub>, área superficial inicial de la muestra, m<sup>2</sup>

El área de la muestra se estimó a partir de la medida del volumen de cada fresón, calculado mediante picnometría, y asimilando la geometría de las muestras a un cono de altura conocida (medida mediante un pie de rey).

Para determinar la resistencia a la transmisión de vapor de agua (RVA) las muestras recubiertas y no recubiertas fueron colocadas en un desecador a una humedad relativa del 76% generada por una disolución saturada de NaCl. Los desecadores fueron introducidos en una cámara de temperatura controlada (Hot-Cold M, J.P. Selecta, España) a 5°C. Se realizaron 5 repeticiones para cada tratamiento.

A intervalos de 2 horas se realizó el control de peso de cada muestra, con una precisión de 0,0001 g. La resistencia a la transmisión de vapor de agua fue estimada mediante la ecuación de la primera Ley de Fick modificada (Ec. I.2) tal y como ha sido descrito por Avena-Bustillos *et al.* (1994).

$$RVA = \left[ \frac{\left( a_w - \frac{\%HR}{100} \right) P_{VS}}{RT} \right] \left( \frac{A}{J} \right) \quad (\text{Ec. I.2})$$

donde,

RVA, resistencia a la transmisión de vapor de agua, s/cm

$a_w$ , actividad de agua de la muestra

HR, humedad relativa en el interior del desecador, %

$P_{vs}$ , presión de vapor saturado a la temperatura de la cámara, mmHg

R, constante universal de los gases, 3464,629 mmHg·cm<sup>3</sup>/g·K

T, temperatura de la cámara de almacenamiento, K

A, área de la superficie de la muestra, cm<sup>2</sup>

J, pendiente de la curva de pérdida de peso, en condiciones estacionarias, g/s

La  $a_w$  de las muestras fue determinada mediante un higrómetro de punto de rocío (Aqua Lab CX-3, Decagon Devices Inc., EEUU) a 25°C, calibrado con una disolución sobresaturada de dicromato potásico.

#### *1.2.5.3.- Propiedades mecánicas*

Las propiedades mecánicas de los fresones se determinaron mediante un analizador de textura (TA-XT-plus, Stable Micro Systems, Reino Unido) con una célula de carga de 50 kg y una sonda cilíndrica de 10 mm de diámetro. Los fresones se cortaron en dos mitades longitudinalmente y se comprimieron a una velocidad de 0,2 mm/s hasta una deformación máxima del 95%. Como parámetros mecánicos, se utilizó la fuerza y la distancia en el momento de la ruptura de la muestra. El ensayo se realizó por quintuplicado para cada tiempo, tanto en fresones recubiertos como no recubiertos.

Los parámetros mecánicos fueron calculados según las ecuaciones 12 y 13 citadas en la introducción.

#### *1.2.5.4.- Propiedades ópticas*

El color de los fresones se midió por reflexión mediante un espectrocolorímetro (CM-3600d, Minolta Co., Japón), previa calibración, con una ventana de medición de 10mm, utilizando como sistema de referencia el iluminante D65/observador 10°. Las medidas se efectuaron en una zona previamente delimitada, antes y después de la aplicación de las FFRs y a cada tiempo de almacenamiento por quintuplicado.

Las coordenadas de color fueron determinadas aplicando la teoría de Kubelka-Munk (Hutchings, 1999) según las ecuaciones 21-25 citadas en la introducción.

#### *1.2.5.5.- Tasa respiratoria*

La tasa respiratoria de las muestras se determinó utilizando un sistema cerrado (Castelló *et al.*, 2006). A cada tiempo de almacenamiento, las muestras (aproximadamente 150 g) se introdujeron en recipientes herméticos de vidrio de 0,847 L con un septum en la tapa para efectuar la medida de concentración de gases en el espacio de cabeza a diferentes tiempos. Los recipientes se almacenaron en una cámara de temperatura controlada (Hot-Cold M, J.P. Selecta, España) a 5°C. La medida de la concentración de gases se efectuó cada 30 minutos por medio de una aguja conectada a un analizador de gases (CheckMate 9900, PBI Dansensor, Dinamarca). Este analizador de gases está equipado con un sensor electroquímico para medir la concentración de O<sub>2</sub> y un miniespectrofotómetro de infrarrojos para detectar el contenido en CO<sub>2</sub> (Rocculi *et al.*, 2005). Se efectuaron tres repeticiones para cada uno de los tratamientos. Se consideraron los puntos experimentales en el intervalo de tiempo donde se observó una relación lineal entre la concentración de gases y el tiempo, para

asegurar que no se produjeron cambios en la pauta respiratoria de las muestras y que los cambios en la composición del espacio de cabeza no produjeron alteraciones importantes en su metabolismo. La tasa respiratoria ( $TR_i$ ,  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) de las muestras en términos de generación de  $\text{CO}_2$  y consumo de  $\text{O}_2$  se determinó a partir de la pendiente de la ecuación lineal del ajuste concentración de gases frente al tiempo), donde  $y_t^i$  es la concentración de gases ( $\%\text{O}_2$ ,  $\%\text{CO}_2$ ) a tiempo  $t$ ,  $i$  siendo  $\text{O}_2$  (Ec. 1.3) o  $\text{CO}_2$  (Ec. 1.4),  $M$  es la masa de muestra (kg) y  $V$  el volumen del espacio de cabeza (mL) (Fonseca *et al.*, 2002). A partir de la tasa respiratoria de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  se determina el coeficiente respiratorio (CR) según la ecuación (Ec. 1.5).

$$TR_{\text{O}_2} = \frac{(y_{t_0}^{\text{O}_2} - y_{t_1}^{\text{O}_2}) \cdot V}{100 \cdot M \cdot t} \quad (\text{Ec. 1.3})$$

$$TR_{\text{CO}_2} = \frac{(y_{t_0}^{\text{CO}_2} - y_{t_1}^{\text{CO}_2}) \cdot V}{100 \cdot M \cdot t} \quad (\text{Ec. 1.4})$$

$$\text{CR} = \frac{TR_{\text{CO}_2}}{TR_{\text{O}_2}} \quad (\text{Ec. 1.5})$$

#### 1.2.5.6.- Evaluación organoléptica

La evaluación organoléptica (Anexo II) de los fresones recubiertos y no recubiertos se realizó a través de una prueba triangular (UNE 87-006-92, 1997) y de un ensayo de clasificación por ordenación (UNE 87-023-95, 1997). Ambas pruebas se realizaron en la sala de cata del Departamento de Tecnología de Alimentos (DTA) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) la cual cumplía con las normas UNE 87-004-79 (1997).

### Prueba triangular

La prueba triangular permite distinguir entre muestras sin características sensoriales específicas y además, detectar mejor pequeñas diferencias cuando se trabaja con catadores no entrenados (Lawless y Heymann, 1998). Esta prueba exige que el número de catadores (jueces) sea múltiplo de seis. Por ello, el análisis sensorial de los fresones se llevó a cabo por 12 jueces (catadores).

Para la realización de la prueba triangular fue necesario disponer de la cantidad suficiente de todas las muestras para poder preparar series de tres muestras codificadas con tres dígitos tomados al azar. Además, todas las series se prepararon de idéntica manera: utilizando recipientes y utensilios iguales, colocando la misma cantidad de producto y en la misma disposición (en triángulo), etc.

En cuanto a los jueces, estos examinaron las muestras de cada serie en un orden fijado de antemano y siempre el mismo, es decir, empezaron la cata siempre por la muestra de la izquierda, siguieron por la del centro y terminaron por la muestra situada a la derecha. A todos los jueces se les informó de la finalidad de la prueba y se les comunicó previamente las normas a seguir (UNE 87-008-92, 1997) (Anexo III).

La interpretación de los resultados se realizó sumando el número de respuestas correctas y se comparó con el dato correspondiente de la tabla del anexo IV (UNE 87-006-92, 1997) para determinar si existían diferencias significativas entre las muestras.

### Ensayo de clasificación por ordenación

El ensayo de clasificación por ordenación consistió en ordenar cuatro fresones (3 recubiertos y el control), seleccionados al azar de cada tratamiento, en orden



decreciente de brillo y en evaluar el aspecto del film (homogeneidad, manchas, etc.) en una escala del 1 al 3, siendo 1: malo; 2: aceptable y 3: bueno (Anexo II).

Para interpretar estadísticamente los resultados se recomienda la prueba de Friedman (Ec. 1.6), aplicable cuando el objetivo es establecer la significación de las diferencias detectadas por los jueces entre las muestras (Meilgaard *et al.*, 1991) y es la recomendada por la norma UNE 87-023-95 (1997).

$$F = \frac{12}{J \cdot P \cdot (P + 1)} (R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_p^2) - 3 \cdot J \cdot (P + 1) \quad (\text{Ec. 1.6})$$

donde:

J, número de jueces

P, número de muestras

$R_1, R_2, \dots, R_p$ , sumas de las ordenaciones atribuidas al conjunto P de muestras para los J jueces

Sin embargo, cuando uno o más jueces asignan a dos o más muestras el mismo número de orden en lugar del valor F se debe utilizar el valor F' (Ec. 1.7).

$$F' = \frac{F}{1 - \left( \frac{E}{J \cdot P \cdot (P^2 - 1)} \right)} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

donde E se obtiene de la siguiente forma:

$$E = (n_1^3 - n_1) + (n_2^3 - n_2) + \dots + (n_k^3 - n_k)$$

Siendo  $n_1, n_2, \dots, n_k$  el número de muestras con el mismo número de ordenación en la evaluación de distintos jueces (1, 2, ..., k).

Una vez calculado el valor de  $F'$  se compara con los valores críticos de la tabla del anexo V para determinar si existen o no diferencias significativas entre las muestras. En el caso que se demuestre estadísticamente que existen diferencias entre muestras, se pueden identificar los pares de muestras que difieren significativamente entre sí, a partir de los valores de sus sumas de ordenaciones, utilizando un análogo de prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher. Siendo  $i$  y  $j$  dos muestras y  $R_i$  y  $R_j$  sus sumas de ordenaciones y, utilizando una aproximación normal las dos muestras serán diferentes si (Ec. 1.8).

Nivel significación 0,05, siendo  $1,960 = t_{0,025}$

$$|R_i - R_j| \geq 1,960 \sqrt{\frac{J \cdot P \cdot (P + 1)}{6}} \quad (\text{Ec. 1.8})$$

### ***1.2.6.- Análisis estadístico***

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significación del 95% y utilizando para las comparaciones múltiples el test Least Significant Difference (LSD). Los cálculos se realizaron con el Software Statgraphics Plus® 5.1.

### I.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### *I.3.1.- Propiedades fisicoquímicas de las FFRs*

Para la obtención de las FFRs se utilizó hidroxipropil metilcelulosa (M) como matriz soporte de los tensoactivos, dada su capacidad de formar films transparentes, fuertes y flexibles y por presentar propiedades sensoriales neutras (Kester y Fennema, 1985). Sin embargo, su alta permeabilidad al vapor de agua hace necesaria la incorporación de compuestos lipídicos como sucroésteres de ácidos grasos y tensoactivos entre otros (Hernández, 1994; Debeaufort y Voilley, 1995) para mejorar esta propiedad (Greener y Fennema, 1994). Puesto que este hidrocoloide es soluble en solventes polares, posee un carácter anfifílico y favorece la emulsificación de muchos aditivos hidrófobos y/o plastificantes, se añadieron tres tensoactivos no iónicos comúnmente empleados en alimentos para potenciar la propiedad barrera al vapor de agua (Roth y Loncin, 1984) y la adhesividad de los recubrimientos en la superficie de productos hidrófilos (Gontard y Guilbert, 1994). Además, se prepararon distintas proporciones de hidrocoloide/tensoactivo para obtener recubrimientos con diferente carácter hidrófilo-lipófilo y así estudiar sus propiedades funcionales.

De acuerdo al diseño planteado para el estudio se obtuvieron nueve formulaciones. En cada grupo de formulaciones se varió el contenido del hidrocoloide (M) en tres niveles para una concentración constante de tensoactivo y por otro lado, se utilizaron tres tensoactivos distintos para obtener diferentes niveles de BHL (Tabla I.2).

Para analizar el efecto de las variables: proporción hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y el BHL de los tensoactivos sobre todas las propiedades analizadas se

realizó un ANOVA multifactor y las diferencias entre medias fueron analizadas por el método LSD.

**Tabla 1.2.-** Composición de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) (g/100 mL de disolución) y su correspondiente relación hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de los tensoactivos.

FFR	M (% p)	S80 (% p)	S20 (% p)	S (% p)	H/T	BHL
1,5M-S80	1,5	3	0	0	0,5	4,3
3M-S80	3	3	0	0	1	4,3
4,5M-S80	4,5	3	0	0	1,5	4,3
1,5M-S20	1,5	0	3	0	0,5	8,6
3M-S20	3	0	3	0	1	8,6
4,5M-S20	4,5	0	3	0	1,5	8,6
1,5M-S	1,5	0	0	3	0,5	10-12
3M-S	3	0	0	3	1	10-12
4,5M-S	4,5	0	0	3	1,5	10-12

### *1.3.1.1.- Densidad y tensión superficial*

La tabla 1.3 muestra los valores de densidad y tensión superficial de las FFRs, junto con los resultados del análisis estadístico (ANOVA), donde se observa que existieron diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a los valores de tensión superficial, todas las formulaciones estudiadas presentaron valores inferiores a los del agua pura (72,8 mN/m), siendo esta disminución causada por la adición de los tensoactivos y por el

carácter anfifílico de los hidrocoloides que componen las formulaciones (Hayakawa *et al.*, 1997). Los valores de tensión superficial fueron inferiores a los obtenidos por Ribeiro *et al.* (2007) y Villalobos (2003) para formulaciones de carragenato con Tween 80 y HPMC con otros tensoactivos, respectivamente. Como se puede observar, el análisis estadístico mostró que ambos factores (BHL y H/T) y sus interacciones presentaron un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la densidad. Sin embargo, para la tensión superficial, este efecto estuvo más influenciado por el BHL que por la proporción hidrocoloide/tensoactivo.

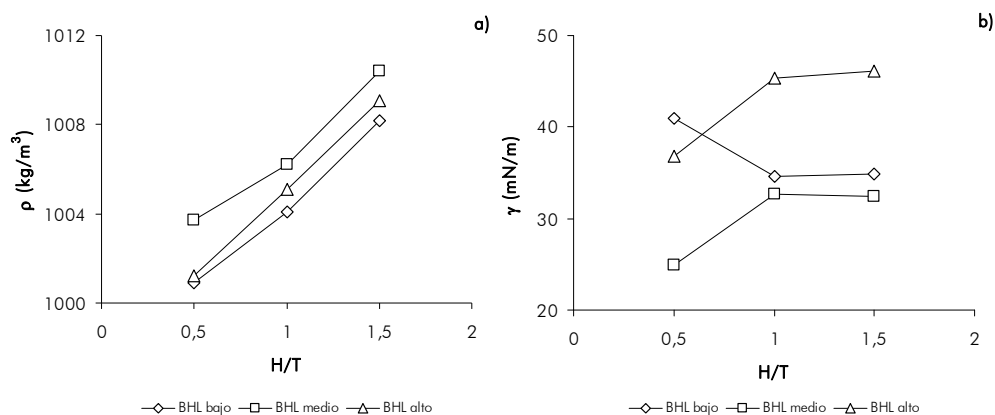
**Tabla 1.3.-** Densidad ( $\rho$ ) y tensión superficial ( $\gamma$ ) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) a 25°C. Valores medios y desviaciones estándar.

FFR	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$\gamma$ (mN/m)
1,5M-S80	1000,93 (0,21) <sup>a, x</sup>	41 (1) <sup>a, y</sup>
3M-S80	1004,07 (0,12) <sup>b, x</sup>	35 (2) <sup>b, y</sup>
4,5M-S80	1008,17 (0,12) <sup>c, x</sup>	35 (1) <sup>b, y</sup>
1,5M-S20	1003,73 (0,12) <sup>a, z</sup>	24,95 (0,14) <sup>a, x</sup>
3M-S20	1006,23 (0,15) <sup>b, z</sup>	32,7 (0,6) <sup>b, x</sup>
4,5M-S20	1010,40 (0,10) <sup>c, z</sup>	32,4 (0,4) <sup>b, x</sup>
1,5M-S	1001,17 (0,21) <sup>a, y</sup>	36,8 (0,6) <sup>a, z</sup>
3M-S	1005,07 (0,40) <sup>b, y</sup>	45,3 (0,4) <sup>b, z</sup>
4,5M-S	1009,13 (0,21) <sup>c, y</sup>	46,1 (0,5) <sup>b, z</sup>

a,b,c: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre concentraciones del hidrocoloide para un nivel de confianza del 95%.

x,y,z: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre tensoactivos para un nivel de confianza del 95%.

La figura I.1 muestra el efecto del BHL de los tensoactivos, de la proporción hidrocoloide/tensoactivo y de sus interacciones sobre la densidad y tensión superficial de las FFRs.



**Figura I.1.-** Efecto del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de los distintos tensoactivos, de la proporción hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y de sus interacciones sobre la densidad (a) y tensión superficial (b) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs).

En la figura I.1a se observa que la densidad aumentó exponencialmente con el incremento de la concentración de hidrocoloide, estando dicho aumento más afectado por la proporción de hidrocoloide/tensoactivo que por el BHL de los tensoactivos. Además, este efecto fue más notorio para las formulaciones con un BHL bajo. Las formulaciones que presentaron los mayores valores de densidad fueron las de BHL medio, seguidas por las de BHL alto y las de bajo, respectivamente. En la figura I.1b se observa que los mayores valores de tensión superficial se obtuvieron en las formulaciones con BHL alto y los menores en las formulaciones con BHL medio. En las formulaciones con BHL alto y medio se observó un aumento significativo de la tensión al aumentar la

concentración de hidrocoloide de 1,5% a 3%, siendo dicho aumento menos acusado cuando la proporción H/T aumentó a 1,5. En cambio, en las formulaciones con BHL bajo hubo una disminución muy acusada de la tensión superficial al aumentar la concentración de hidrocoloide/tensoactivo de 0,5 al 1, manteniéndose prácticamente constante a partir de un ratio de 1. De la figura 1.1b se deduce que el BHL ejerce una mayor influencia en aquellas formulaciones donde la proporción hidrocoloide/tensoactivo es baja. Para concentraciones mayores, los menores valores de tensión superficial se obtienen en formulaciones con BHL de bajo a intermedio.

#### *1.3.1.2.- Caracterización reológica*

La tabla 1.4 muestra los valores de viscosidad aparente calculada a  $100 \text{ s}^{-1}$  y los parámetros reológicos obtenidos al ajustar los datos de las curvas de flujo al modelo de la Ley de la Potencia, junto con el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del ajuste y los resultados del ANOVA, donde se observa que existieron diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

Estos valores son del orden de los encontrados por Villalobos (2003) para formulaciones de HPMC y otros tensoactivos. Como se puede observar, las FFRs presentaron un ligero comportamiento pseudoplástico, llegando a ser newtoniano en algunos casos, sobre todo a bajas concentraciones de hidrocoloide.

Por otro lado, es esperable que el comportamiento reológico de las formulaciones esté influenciado por las propiedades de flujo de la fase continua y por las interacciones que se produzcan entre ésta y los demás componentes dispersos (Ma y Barbosa-Cánovas, 1993). En este caso, la fase continua está constituida por una disolución del hidrocoloide HPMC que por debajo de su temperatura de gelificación, presenta un comportamiento reológico

pseudoplástico, tal y como se observa en la figura I.2, que muestra, a modo de ejemplo, un reograma típico de una formulación a las distintas concentraciones de hidroxipropil metilcelulosa (M).

**Tabla I.4.-** Parámetros del modelo de Ostwald de Waale ( $n$  y  $K$ ), viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) a 25°C. Valores medios y desviaciones estándar.

FFR	$n$	$K$ (Pa s) <sup>n</sup>	$r^2$	$\eta_{ap}$ (Pa s) <sup>*</sup>
1,5M-S80	0,81 (0,07) <sup>a, x</sup>	0,03 (0,14) <sup>a, x</sup>	0,864	0,01 <sup>a, x</sup>
3M-S80	0,96 (0,04) <sup>b, x</sup>	0,05 (0,15) <sup>b, x</sup>	0,905	0,04 <sup>b, x</sup>
4,5M-S80	0,97 (0,02) <sup>ab, x</sup>	0,13 (0,06) <sup>c, x</sup>	0,983	0,12 <sup>c, x</sup>
1,5M-S20	1,10 (0,03) <sup>a, y</sup>	0,01 (0,02) <sup>a, x</sup>	0,961	0,01 <sup>a, y</sup>
3M-S20	0,82 (0,05) <sup>b, y</sup>	0,08 (0,12) <sup>b, x</sup>	0,847	0,03 <sup>b, y</sup>
4,5M-S20	0,97 (0,02) <sup>ab, y</sup>	0,13 (0,05) <sup>c, x</sup>	0,986	0,12 <sup>c, y</sup>
1,5M-S	0,96 (0,02) <sup>a, y</sup>	0,02 (0,06) <sup>a, y</sup>	0,985	0,01 <sup>a, z</sup>
3M-S	1,00 (0,02) <sup>b, y</sup>	0,05 (0,09) <sup>b, y</sup>	0,966	0,05 <sup>b, z</sup>
4,5M-S	0,88 (0,02) <sup>ab, y</sup>	0,26 (0,03) <sup>c, y</sup>	0,995	0,15 <sup>c, z</sup>

<sup>\*</sup> $\eta_{ap}$  calculada para un gradiente ( $\dot{\gamma}$ ) de 100 s<sup>-1</sup>

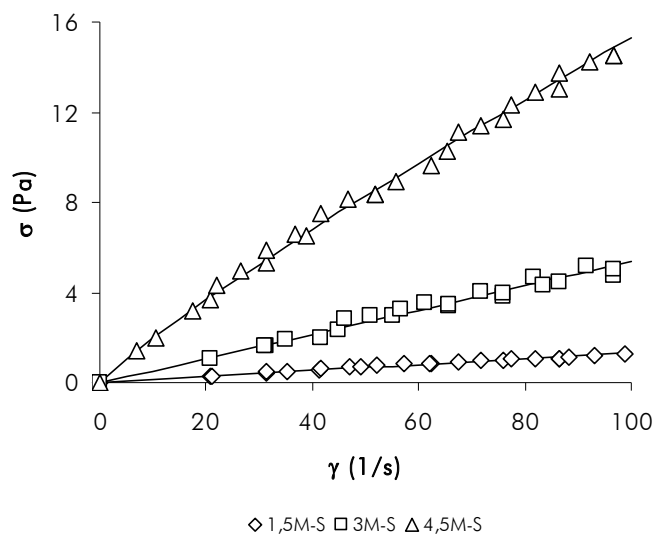
a,b,c: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre concentraciones del hidrocoloide para un nivel de confianza del 95%.

x,y,z: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre tensoactivos para un nivel de confianza del 95%.

Este comportamiento prácticamente newtoniano suele ser habitual en disoluciones diluidas de hidrocoloideos a niveles de gradiente de velocidad bajos, donde la orientación de las moléculas asimétricas o la forma de las moléculas flexibles no se ven afectadas aún por el gradiente de velocidad, y también en disoluciones concentradas, donde el gradiente de velocidad no ha



alcanzado el nivel suficiente para afectar a las interacciones intercadena del hidrocoloide (Mitchell, 1979). La bondad del modelo de la Ley de la Potencia para modelizar el comportamiento al flujo de las formulaciones queda reflejado en los altos valores de coeficiente de determinación obtenidos (Tabla I.4).

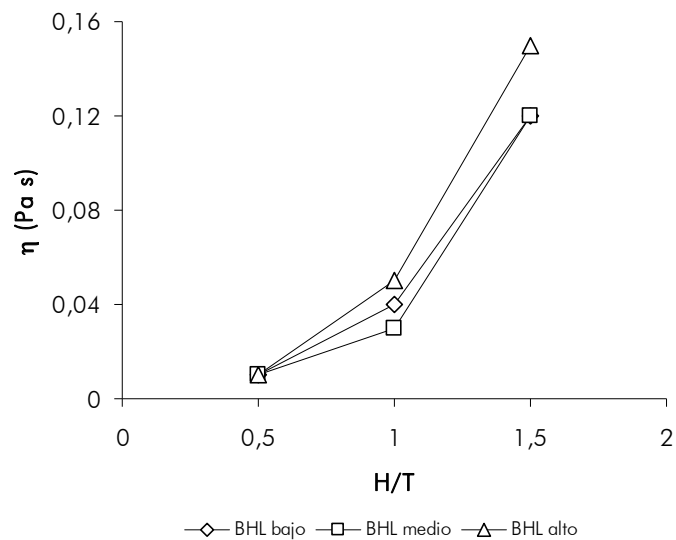


**Figura I.2.-** Reograma de la formulación formadora de recubrimiento (FFR) que contenía Sugina 471/PHK-40 (S) como tensoactivo a las distintas concentraciones de hidroxipropil metilcelulosa (M) a 25°C. Los datos experimentales están representados por símbolos y los predichos por líneas.

Los resultados del ANOVA mostraron que todas las variables y sus interacciones presentaron un efecto significativo sobre la viscosidad ( $p < 0,05$ ), tal y como se observa en la figura I.3.

La figura I.2 y la figura I.3 muestran un comportamiento reológico característico de disoluciones isotrópicas de polímeros o polímeros cristalinos líquidos, donde la adición de partículas produce un aumento de su viscosidad (Ohl y Gleissle,

1993; Hartmann *et al.*, 2000). De los tres tensoactivos utilizados, el que produce formulaciones más viscosas es el de mayor BHL (Sugin 471/PHK-40 escamas), seguido por el Sorbester 80 (BHL bajo) y el Sorbester 20 (BHL medio), aunque los valores de viscosidad que presentan estos dos últimos tensoactivos son muy similares, existen diferencias significativas entre los tres tensoactivos.



**Figura I.3.-** Efecto del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de los distintos tensoactivos, de la proporción hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y de sus interacciones sobre la viscosidad (b) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs).

### 1.3.1.3.- Índice R y cinética de sedimentación

El índice R corresponde a un índice entre absorbancias, que se correlaciona bien con el tamaño de partícula de un sistema disperso, pero sólo cuando el

tamaño es relativamente pequeño, ya que a medida que aumenta el tamaño promedio, el método pierde sensibilidad para apreciar diferencias (Kaufman y Garti, 1981). Este índice permite establecer la estabilidad de una emulsión en base al tamaño medio de las gotas y está dado por el cociente entre la lectura de absorbancia a 800 nm y su valor a 400 nm. La lectura de absorbancia es tanto mayor cuanto mayor es la cantidad de luz dispersada a una determinada longitud de onda. A su vez, ésta es función del tamaño de las partículas dispersas y de la longitud de onda, de tal manera que cuanto menor sea el diámetro de las gotas, la cantidad de luz difundida será mayor, siendo el efecto más acusado cuanto menor es la longitud de onda. Por tanto, la densidad óptica a 400 nm es mayor que a 800 nm, siendo el cociente R tanto menor cuanto menor es el tamaño medio de las gotas. Atendiendo a la relación existente entre el diámetro de las gotas y la estabilidad, las emulsiones serán más estables cuanto menores sean los valores de R.

Adicionalmente al índice R se analizó el comportamiento de floculación-sedimentación de las partículas en las formulaciones estudiadas, ya que éste también depende del tamaño de partícula. Para ello se analizó la evolución de las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 400 nm durante 20 minutos. La disminución de la absorbancia en el tiempo de la mayoría de las formulaciones se puede relacionar con la velocidad de floculación-sedimentación, aunque también está fuertemente afectada por la viscosidad del medio. Para poder comparar el comportamiento de las distintas formulaciones, se cuantificó el porcentaje relativo (al valor inicial) de la disminución de la absorbancia a los 20 minutos. Estos valores porcentuales pueden considerarse como un índice cinético de floculación-sedimentación, ya que a mayor reducción relativa de absorbancia mayor formación de partículas grandes o desaparición de las mismas en el medio dispersante al sedimentar.

En la tabla I.5 se presentan los valores obtenidos para el índice R y el índice cinético de floculación-sedimentación para las diferentes formulaciones junto con los resultados del ANOVA, donde se observa que existieron diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

**Tabla I.5.-** Índice R y porcentaje de reducción de la absorbancia de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) a 25°C. Valores medios y desviaciones estándar.

FFR	Índice R	Reducción de la Absorbancia (%)
1,5M-S80	0,286 (0,002) <sup>a, x</sup>	- 2,0 (0,3) <sup>a, x</sup>
3M-S80	0,38 (0,07) <sup>b, x</sup>	- 1,34 (0,08) <sup>ab, x</sup>
4,5M-S80	0,365 (0,003) <sup>b, x</sup>	- 1,6 (0,6) <sup>b, x</sup>
1,5M-S20	0,360 (0,002) <sup>a, y</sup>	- 2,76 (0,17) <sup>a, y</sup>
3M-S20	0,172 (0,005) <sup>b, y</sup>	- 2,5 (0,5) <sup>ab, y</sup>
4,5M-S20	0,144 (0,002) <sup>b, y</sup>	- 1,53 (0,02) <sup>b, y</sup>
1,5M-S	0,21 (0,02) <sup>a, z</sup>	- 4 (1) <sup>a, z</sup>
3M-S	0,174 (0,005) <sup>b, z</sup>	- 3,4 (0,7) <sup>ab, z</sup>
4,5M-S	0,18 (0,03) <sup>b, z</sup>	- 3,11 (0,03) <sup>b, z</sup>

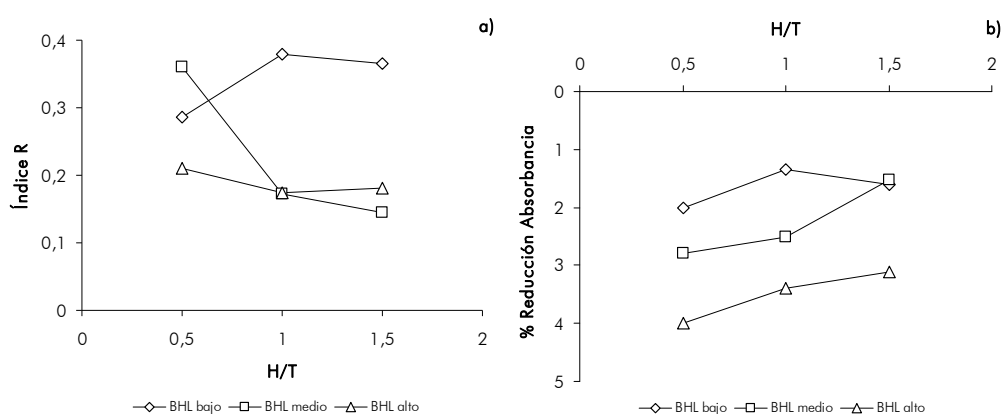
a,b: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre concentraciones del hidrocoloide para un nivel de confianza del 95%.

x,y,z: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre tensoactivos para un nivel de confianza del 95%.

Como se puede observar, el análisis estadístico mostró que, de nuevo, todos los factores y sus interacciones presentaron un efecto significativo ( $p < 0,05$ )

sobre las variables estudiadas, estando dicho efecto más influenciado por el BHL que por la proporción hidrocoloide/tensoactivo.

La figura I.4 muestra el tipo de influencia de estas variables sobre los parámetros de estabilidad de las FFRs.



**Figura I.4.-** Efecto del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de los tensoactivos, de la proporción de hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y de sus interacciones sobre el índice R (a) y el porcentaje de reducción de la absorbancia (b) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs).

En la figura I.4a se observa que cuando se utilizan tensoactivos con un valor de BHL intermedio a alto, el tamaño de partícula (índice R) disminuye cuando aumenta la relación H/T. Sin embargo, cuando el BHL del tensoactivo es bajo, el índice R aumenta cuando la relación H/T está comprendida entre 0,5 y 1. De la figura I.4a se deduce que las formulaciones que presentan los menores índices R son las que incorporan tensoactivos de BHL intermedio a alto y con una relación hidrocoloide/tensoactivo de 1 a 1,5. En algunas formulaciones de

HPMC y otros tensoactivos, Villalobos (2003) obtuvo valores de índice R del orden y en otras, algo superiores.

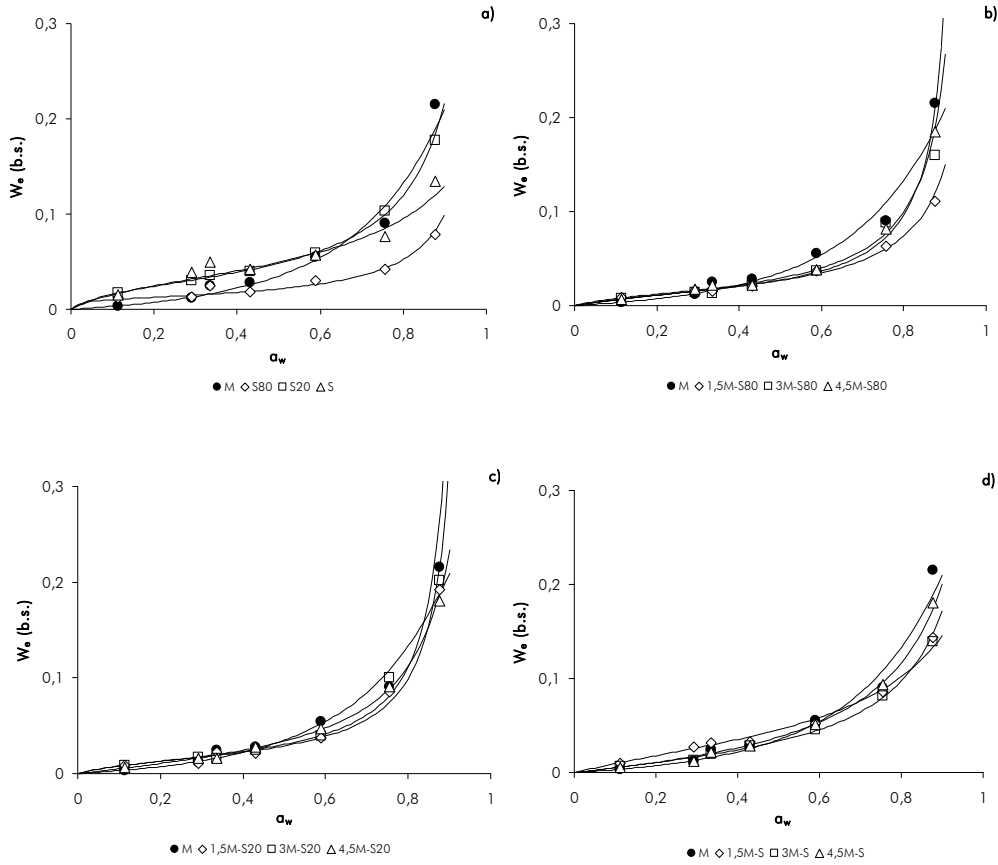
Con respecto a los datos de cinética de floculación, en la figura I.4b se observa que para todos los niveles de BHL, la estabilidad aumentó cuanto mayor fue la proporción de hidrocoloide, probablemente debido al efecto viscoso que limita la movilidad de las partículas y la cinética de todos los procesos controlados por difusión. Este aumento fue más acusado para las formulaciones que presentaron un BHL intermedio. Las formulaciones que presentan mayor estabilidad cinética son las que tienen un BHL bajo, seguidas de la formulación de BHL medio con la mayor concentración de hidrocoloide.

El que los valores porcentuales de absorbancia sean negativos implica que a medida que transcurre el tiempo las partículas crecen y sedimentan, mientras que valores positivos indican que las partículas crecen sin llegar a sedimentar. Por tanto, la emulsión será más estable cuanto mayor sea el índice de floculación-sedimentación. La velocidad de floculación-sedimentación aumentó con el tamaño de la partícula deducido a través del índice R y disminuyó con el aumento de viscosidad del medio continuo según los modelos cinéticos que rigen estos fenómenos (Dickinson, 1992).

### ***1.3.2.- Caracterización de los films***

#### ***1.3.2.1.- Isotermas de sorción de agua***

La figura I.5 muestra las isotermas de sorción de agua de los componentes puros y de los films. Según esta figura, los recubrimientos y los componentes puros presentaron isotermas de adsorción de tipo II, con una convexidad casi imperceptible a bajas  $a_w$  (Brunauer *et al.*, 1940).



**Figura 1.5.-** Isothermas de sorción de agua de los componentes puros (a) y de los films con un balance hidrófilo-lipófilo (BHL) bajo (b), medio (c) y alto (d). Datos experimentales (símbolos) y predichos por GAB (líneas).

De los cuatro componentes puros (Figura 1.5a), la hidroxipropil metilcelulosa (M) presentó una mayor afinidad por el agua, debido al mayor número de grupos hidroxilos en su estructura que lo hace más higroscópico. La  $W_e$  de la hidroxipropil metilcelulosa aumentó lentamente en el intervalo de  $a_w$  de 0 a 0,59 y a partir de este último nivel se produjo un ascenso rápido e importante que puede asociarse a un cambio en el tipo de interacciones agua sustrato, las

cuales pasan a ser más características de sistemas soluto-solvente. La curva de la isoterma obtenida para M fue muy similar a la encontrada por otros autores en films de metilcelulosa, hidroxipropil celulosa e hidroxipropil metilcelulosa sin plastificantes (Chinnan y Park, 1995; Sebti *et al.*, 2002; Villalobos *et al.*, 2006; Sebti *et al.*, 2007; Sánchez-González *et al.*, 2009). La capacidad de sorción de agua de estos compuestos estructurados como films es menor que la obtenida para los productos en polvo (Spiess y Wolf, 1983) debido a la menor superficie específica del film comparada con el lecho poroso de partículas.

Por otro lado, los tensoactivos Sugin 471/PHK-40 escamas y Sorbester 80 presentaron isotermas más suaves que la hidroxipropil metilcelulosa y el Sorbester 20, sin ascensos abruptos en todo el intervalo de  $a_w$  analizado y con  $W_e$  menores. A baja  $a_w$ , parece ser que el Sugin 471/PHK-40 escamas es el que presenta mayor capacidad de adsorción de agua pero, en la medida que la  $a_w$  aumentó se puso de manifiesto la mayor capacidad de M. De los tres tensoactivos, el que presentó la menor  $W_e$  fue el Sorbester 80 y el que presentó un comportamiento más similar a la hidroxipropil metilcelulosa fue el Sorbester 20.

En las figuras I.5b-d se muestran también las isotermas de adsorción de agua de todos los recubrimientos dispuestos en grupos con un BHL ascendente. Se observa que en la medida que la proporción de hidrocoloide aumenta en los recubrimientos su capacidad de retención de agua es mayor, especialmente a  $a_w$  mayores de 0,59. A partir de este nivel de  $a_w$  a todos los recubrimientos mostraron un incremento significativo en la capacidad de adsorción lo cual se justifica por la contribución de las interacciones de tipo soluto-solvente en la retención de agua. Este efecto fue mayor en los recubrimientos con mayor proporción H/T.



Para analizar las posibles interacciones entre los componentes del film, se compararon los valores experimentales de las  $W_e$  a cada nivel de  $a_w$  con los valores obtenidos mediante la ecuación 1.9. En esta ecuación se ha considerado la contribución de cada componente a la capacidad de retención de agua global, asumiendo que no hay interacciones entre ellos y por tanto que la capacidad de retención de agua de cada uno de ellos es la misma que cuando están puros.

$$W_{est|a_w} = x \cdot a + y \cdot b \quad (\text{Ec. 1.9})$$

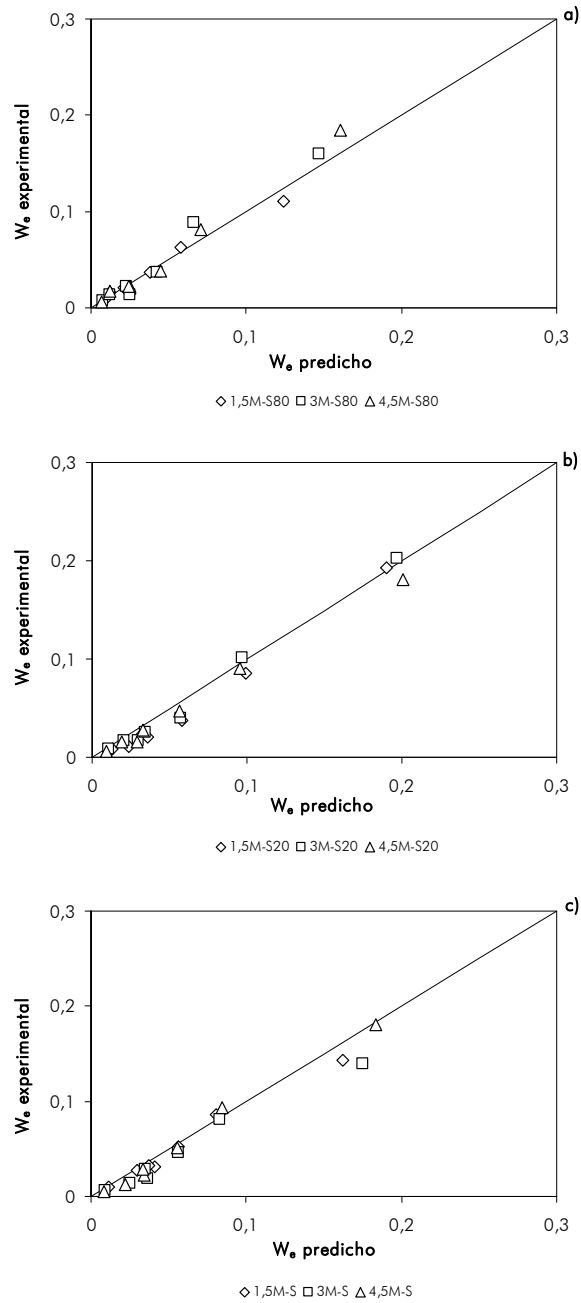
donde,

$W_{est|a_w}$ : humedad de equilibrio del film, estimada a una  $a_w$  constante

$x, y$ : fracción másica de M, S80, S20 y S en el film seco

$a, b$ : humedad de equilibrio de M, S80, S20 y S a una  $a_w$  constante

En la figura 1.6 se presentan las gráficas de las  $W_e$  experimentales *versus* las  $W_e$  predichas, para los nueve recubrimientos, agrupados de acuerdo a su BHL. En cada grupo de films se observa que los valores de la  $W_e$  se alinean sobre la diagonal, especialmente para valores bajos de la humedad, lo cual indica una escasa interacción entre los componentes. Este hecho pone de manifiesto que los componentes se encuentran en el film en gran proporción en fases separadas. Este fenómeno también ha sido observado por Debeaufort y Voilley (1995) y McHugh (1996). Estos autores señalan que esta separación, determinada por la inmiscibilidad de los componentes, se produce fundamentalmente durante el proceso de secado del film debido a la diferencia de densidad entre los componentes, la temperatura y la velocidad del proceso de secado.



**Figura I.6.-** Comparación de los valores de humedad de equilibrio ( $W_e$ ) de los datos experimentales con los predichos para los distintos balances hidrófilos-lipófilos (BHL): (a) BHL bajo, (b) BHL medio y (c) BHL alto.

A altos niveles de  $a_w$ , se aprecia que la  $W_e$  sufre una mayor dispersión sobre la diagonal, lo que sugiere que a partir de un determinado nivel de hidratación, las moléculas de agua imparten movilidad al sistema y promueven las interacciones posiblemente entre grupos polares del film. Este comportamiento concuerda con el señalado por Seo y Kumacheva, (2002) para films de hidroxipropil celulosa (HPC). Estos autores encontraron que las interacciones agua-polímero a humedades relativas crecientes producían modificaciones en la estructura supramolecular que pueden inducir cambios significativos en la interacción entre componentes y en el comportamiento de sorción. Los mecanismos de sorción propuestos contemplan que a bajas humedades relativas, las capas de fibra de HPC adsorben humedad mediante un proceso de condensación capilar, en los grupos  $-OH$  y  $-C=O$  de las unidades de glucosa en la superficie de las fibras. A medida que la humedad relativa aumenta, el agua penetra en las fibras de HPC y disuelve parcialmente su superficie formando un gel. Esto da lugar a un incremento en el volumen libre de las cadenas del polímero. En este estado de gel generado por el proceso de adsorción de humedad, puede darse un mayor nivel de interacción de las cadenas polímero-polímero así como polímero-tensoactivos u otros componentes presentes.

La ecuación de BET y GAB (ecuaciones 14 y 15) fueron utilizadas para ajustar los datos de adsorción de agua de los films y de los componentes puros. Las constantes de la ecuación de GAB fueron obtenidas considerando todo el intervalo de  $a_w$  y las de la ecuación de BET sólo hasta una  $a_w$  de 0,59. La tabla I.6 muestra los valores de las constantes obtenidas en cada caso.

El procedimiento de ajuste utilizado para la ecuación de GAB consideró la ecuación transformada en un polinomio de segundo grado realizando una regresión múltiple para ajustar un polinomio de orden dos. Esta transformación comporta cierta imprecisión en las constantes obtenidas, porque lleva a una

ponderación incorrecta de los datos; por otro lado, las constantes se encuentran correlacionadas entre sí (Schär y Rüegg, 1985). Por este motivo, el análisis de los valores de los parámetros de GAB debe hacerse con cautela, aunque la ecuación permite una excelente predicción en los datos experimentales en todo el intervalo de  $a_w$ , tal como se muestra en la figura I.5.

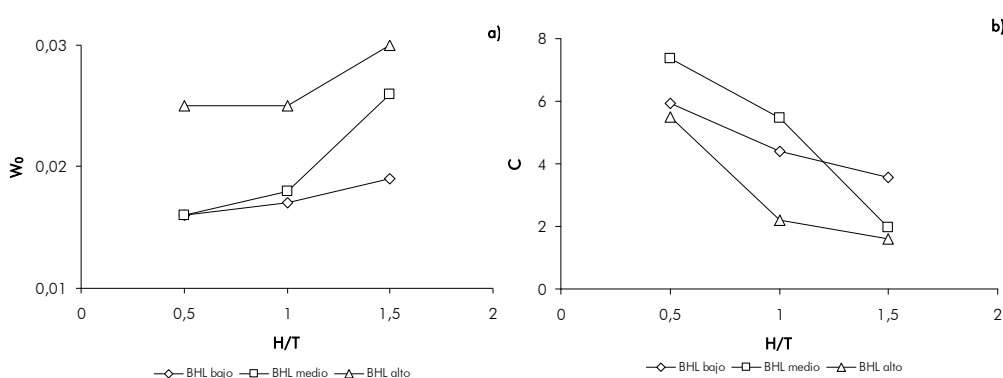
**Tabla I.6.-** Parámetros estimados de los modelos de BET y GAB para isothermas de sorción de agua de los films y componentes puros.

Film	BET			GAB			
	$W_0$	C	$r^2$	$W_0$	C	K	$r^2$
1,5M-S80	0,016	5,95	0,953	0,015	7,04	1,00	0,950
3M-S80	0,017	4,39	0,946	0,015	5,41	1,06	0,946
4,5M-S80	0,019	3,56	0,945	0,018	3,61	1,04	0,969
1,5M-S20	0,016	7,36	0,891	0,015	7,45	1,06	0,884
3M-S20	0,018	5,47	0,984	0,016	6,38	1,07	0,965
4,5M-S20	0,026	1,95	0,974	0,026	2,02	1,00	0,993
1,5M-S	0,025	5,49	0,906	0,037	3,23	0,85	0,883
3M-S	0,025	2,20	0,963	0,027	2,03	0,95	0,955
4,5M-S	0,030	1,58	0,823	0,038	1,31	0,93	0,991
M	0,062	0,42	0,814	-	-	-	-
S80	0,012	34,59	0,837	0,011	44,40	0,99	0,885
S20	0,026	11,85	0,993	0,027	10,23	0,97	0,981
S	0,026	13,97	0,939	0,034	7,60	0,83	0,657

Por otro lado, las constantes de la ecuación de BET, que están menos afectadas por los problemas de cálculo, fueron usadas para interpretar las diferencias de comportamiento entre los films debido al diferente BHL de la formulación. Los

valores obtenidos para la humedad de la monocapa fueron similares a los encontrados por otros autores en estudios con HPMC (Villalobos *et al.*, 2006; Sebti *et al.*, 2007).

En la figura I.7 se muestran los valores de los parámetros de BET en función de los niveles de las variables de formulación.



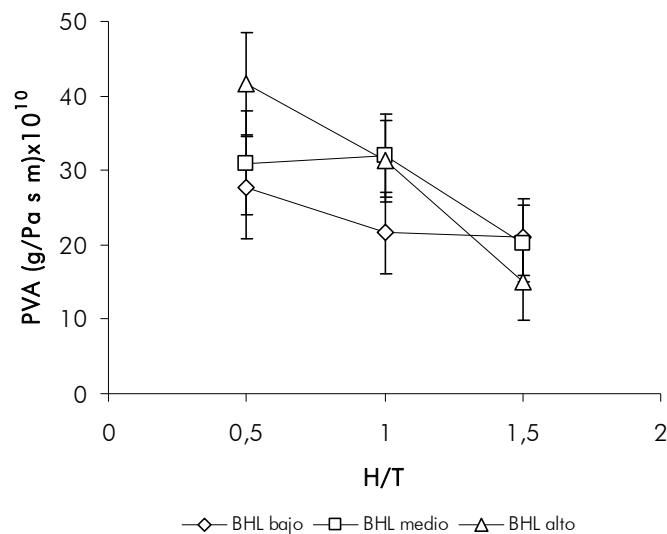
**Figura I.7.-** Efecto del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) y de la proporción hidrocoloide/tensoactivo (H/T) sobre las constantes de la ecuación de BET.

El contenido de humedad de la monocapa ( $W_0$ ) y la constante ( $C$ ), relacionada con el calor de sorción o fuerza de enlace de las moléculas de agua a los grupos activos del film, muestran un efecto relevante del BHL y de la relación H/T. La  $W_0$  fue mayor a mayor ratio H/T, coherentemente con una mayor proporción del polímero hidrofílico en el medio. Este efecto fue más acusado para las formulaciones con el BHL más alto, posiblemente asociado a su mayor carácter hidrofílico, comparado con el resto de los tensoactivos utilizados. El parámetro  $C$  disminuyó con el aumento del polímero en la formulación y al utilizar el tensoactivo con mayor BHL (S). Este hecho parece indicar que a

medida que el film se vuelve más hidrofílico, las moléculas de agua son absorbidas con menos energía en los sitios activos del sustrato. Resultados similares han sido descritos por Villalobos *et al.* (2006) y Sánchez-González *et al.* (2009) en films a base de HPMC y diferentes compuestos hidrofóbicos.

### 1.3.2.2.- Permeabilidad al vapor de agua

Para analizar el efecto de las variables (BHL, H/T, y de sus interacciones) sobre la permeabilidad de las FFRs se realizó un ANOVA multifactor, no mostrando en este caso efecto significativo para el BHL pero sí para la relación H/T tal y como se observa en la figura 1.8.

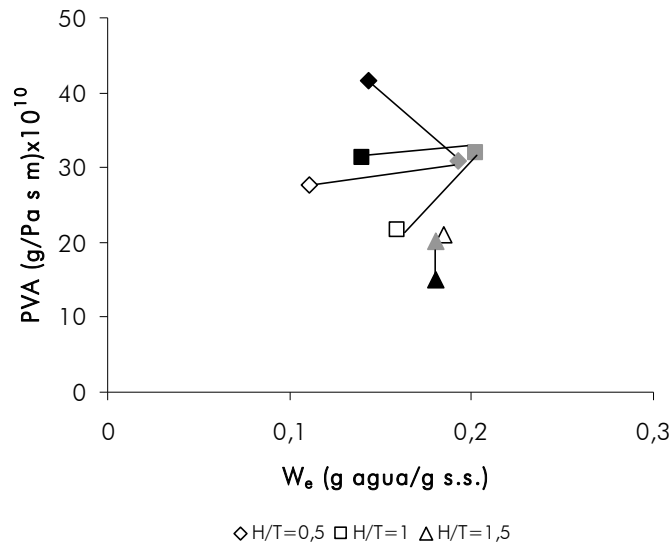


**Figura 1.8.-** Efecto del balance hidrófilo-lipófilo (BHL) de los tensoactivos, de la proporción de hidrocoloide/tensoactivo (H/T) y de sus interacciones sobre la permeabilidad al vapor de agua de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs). Valores medios e intervalos LSD.

Como se observa en la figura I.8 los menores valores de PVA se obtuvieron con la mayor proporción de polímero en el film (1,5 H/T). Parece ser que, para los tensoactivos y la cantidad utilizada (3%), se necesite una concentración crítica de polímero para tener una mejora significativa en la resistencia a la transferencia del vapor de agua. Rodríguez *et al.* (2006) en films a base de almidón, glicerol y diferentes concentraciones de tensoactivos (0,5% y 5%), tampoco obtuvieron una mejora en los valores de la permeabilidad al disminuir el ratio H/T (aumentar la concentración de tensoactivos) en la formulación.

Por otro lado, para un mismo ratio H/T, los films que presentaron los menores valores de PVA fueron los de menor BHL (Sorbester 80), aunque este efecto sólo fue notable cuando se utilizaron ratios H/T bajos o medios (0,5-1). El mayor carácter hidrófobo de este tensoactivo podría explicar la tendencia observada. Rodríguez *et al.*, (2006) mostraron tendencias similares, siendo en este caso significativas.

La figura I.9 muestra la relación entre PVA y la humedad de equilibrio de los films a una  $a_w$  de 0,875, considerada como el valor medio del gradiente de  $a_w$  del film utilizado para las mediciones experimentales de la permeabilidad. Como puede observarse, las diferencias en los valores de PVA parecen estar relacionadas con el valor crítico del ratio H/T más que con el diferente contenido en humedad de los films, en el rango estudiado.



**Figura I.9.-** Relación entre el contenido de humedad de equilibrio ( $W_e$ ) en el film a  $a_w=0,875$  y su permeabilidad al vapor de agua (PVA) a  $5^\circ\text{C}$ . Los símbolos representan la proporción hidrocoloide/tensioactivo (H/T) y los diferentes balances hidrófilos-lipófilos (BHL) están representados por colores: blanco: BHL bajo; gris: BHL medio; negro: BHL alto.

### *1.3.3.- Aplicación a fresas (var. Ventana)*

La aplicación se llevó a cabo con fresas de la variedad Ventana comprados en un mercado local de Valencia el mismo día en que fueron procesados. Todos los fresas presentaron un tamaño, color y grado de madurez similares con el objeto de conseguir la mayor homogeneidad posible de las muestras de partida y reducir de este modo la heterogeneidad en los resultados. Para la aplicación, sólo se utilizaron los recubrimientos comestibles que contenían Sugin 471 PHK-40 escamas (S) como tensioactivo porque eran los únicos que no impartían sabores extraños a la fruta y porque desde el punto de vista de la



estabilidad eran unos de los más estables al contener partículas de menor tamaño.

De acuerdo al diseño planteado para el estudio los fresones se recubrieron con tres formulaciones distintas y como control se utilizaron fresones sin recubrir (Tabla 1.7). Con este diseño es posible obtener cuatro niveles de proporción hidrocoloide/tensoactivo que junto con el período de almacenamiento, serán las variables experimentales que se utilizarán para el estudio.

**Tabla 1.7.-** Composición de los recubrimientos comestibles (g/100 mL de disolución) y su correspondiente relación hidrocoloide/tensoactivo (H/T).

Muestra	M (% p/v)	S (% p/v)	H/T
C	0	0	0
1,5M-S	1,5	3	0,5
3M-S	3	3	1
4,5M-S	4,5	3	1,5

### 1.3.3.1.- Sólidos solubles totales y pH

La tabla 1.8 muestra los valores medios de los sólidos solubles y pH de las muestras recubiertas y no recubiertas en función del tiempo de almacenamiento. Los valores medios obtenidos para los sólidos solubles oscilaron entre el 5-6°Brix, un poco por debajo del valor óptimo para su consumo (7°Brix) mientras que el pH osciló entre 3,28-3,58, siendo del orden de los encontrados en la bibliografía para otras variedades como la Camarosa (Castro *et al.*, 2002; Cordenunsi *et al.*, 2003).

**Tabla 1.8.-** Sólidos solubles (°Brix) y pH de los fresones recubiertos y no recubiertos (C) durante el almacenamiento a 5°C. Valores medios y desviaciones estándar.

Parámetro	t (días)	C	1,5M-S	3M-S	4,5M-S	
°Brix	0	5,10	5,43	5,0	5,3	
		(0,12)	(0,06)	(0,2)	(0,2)	
	3	5,42	5,63	5,03	5,43	
		(0,08)	(0,12)	(0,06)	(0,06)	
	6	5,63	5,23	5,3	4,53	
		(0,06)	(0,06)	(0,2)	(0,12)	
	9	5,50	5,07	5,08	6,17	
		(0,02)	(0,06)	(0,08)	(0,12)	
	pH	0	3,40	3,44	3,37	3,43
			(0,03) <sup>y</sup>	(0,09) <sup>x</sup>	(0,02) <sup>z</sup>	(0,02) <sup>y</sup>
		3	3,38	3,41	3,46	3,44
			(0,02) <sup>y</sup>	(0,02) <sup>z</sup>	(0,09) <sup>x</sup>	(0,02) <sup>y</sup>
6		3,58	3,40	3,39	3,53	
		(0,02) <sup>x</sup>	(0,06) <sup>z</sup>	(0,09) <sup>y</sup>	(0,03) <sup>x</sup>	
9		3,28	3,42	3,38	3,39	
		(0,09) <sup>z</sup>	(0,02) <sup>y</sup>	(0,09) <sup>y</sup>	(0,03) <sup>z</sup>	

x,y,z: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre tiempos de almacenamiento para una misma muestra y para un nivel de confianza del 95%.

Para analizar el efecto de los factores estudiados (muestra, período de almacenamiento y de su interacción) sobre los sólidos solubles y el pH de los fresones se realizó un ANOVA multifactor. Los resultados del ANOVA mostraron que los factores y la interacción doble no fueron significativos. Sólo en el caso del pH, el factor tiempo fue significativo (Tabla 1.8). Como se puede observar,

el contenido en sólidos solubles prácticamente no varió a lo largo del período de almacenamiento o bien aumentó ligeramente como consecuencia del avance de la maduración. El pH tampoco presentó cambios notables, disminuyendo ligeramente ( $p < 0,05$ ) en el último día de almacenamiento.

La poca variación obtenida en estos parámetros está en concordancia con los encontrado por otros autores (Cordenunsi *et al.*, 2003; Pelayo *et al.*, 2003). Vargas *et al.* (2006) tampoco encontraron variaciones significativas en estas variables a lo largo del tiempo ni por efecto del recubrimiento sobre fresones recubiertos con quitosano y ácido oleico.

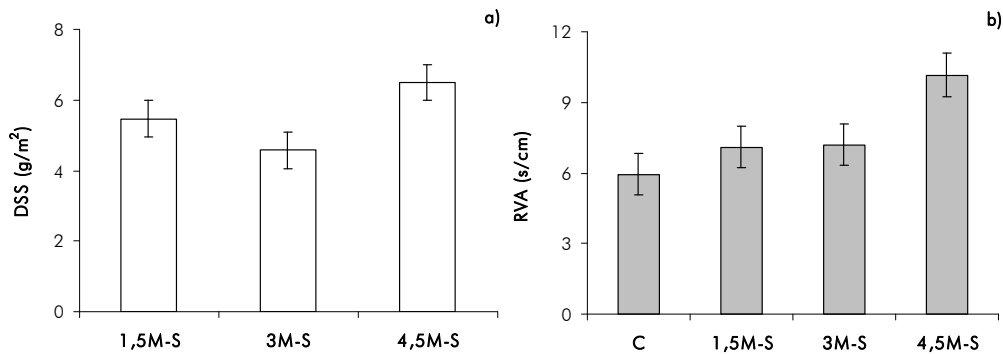
#### *1.3.3.2.- Densidad superficial de sólidos y resistencia a la transmisión de vapor de agua*

La figura I.10 muestra la densidad superficial de sólidos (DSS) (a) y la resistencia al vapor de agua (RVA) (b) de los fresones recubiertos y no recubiertos.

Como cabía esperar, la DSS (Figura I.10a) aumentó con la concentración de sólidos de las FFRs, aunque en las muestras recubiertas con 3M-S existió cierta disminución, seguramente debido a la desviación que presentaron sus valores y al propio error experimental de la metodología.

En la figura I.10b se observa que la aplicación de los recubrimientos sobre los fresones aumentó la RVA tanto más cuanto mayor fue la proporción de hidrocoloide utilizado. Este efecto sólo fue significativo ( $p < 0,05$ ) para las muestras recubiertas con 4,5M-S lo que parece indicar que dicho recubrimiento sí mejora la propiedad barrera al vapor de agua. Este efecto barrera podría estar atribuido al aumento del espesor como consecuencia del aumento de la densidad de sólidos que presenta dicha formulación. Por otro lado, los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos para la PVA de los

recubrimientos aislados para un gradiente de humedad relativa de 76/100, donde la formulación que presentó los menores valores de PVA fue precisamente la 4,5M-S.



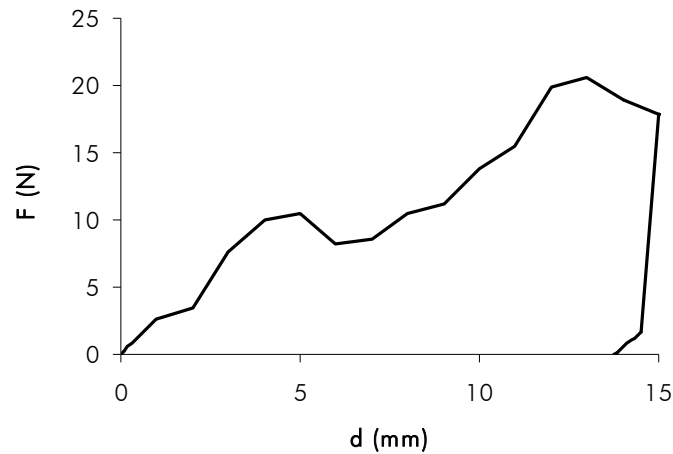
**Figura I.10.-** Densidad superficial de sólidos (DSS) (a) y resistencia al vapor de agua (RVA) (b) de los fresones recubiertos y no recubiertos (C). Valores medios e intervalos LSD.

### 1.3.3.3.- Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las muestras se evaluaron a partir de la fuerza máxima registrada en el ensayo de compresión antes de la rotura ya que dicho parámetro está relacionado con la firmeza de las muestras.

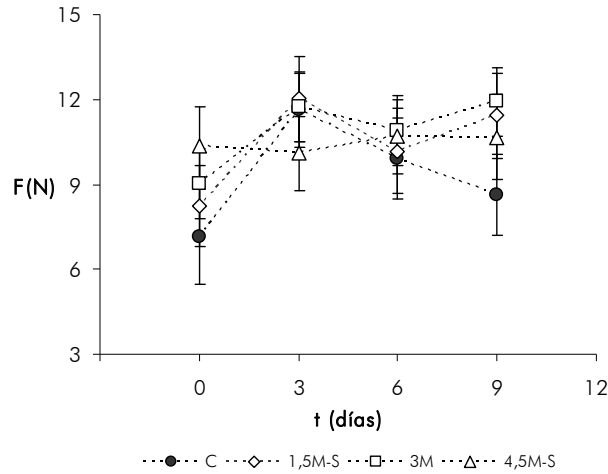
La figura I.11 muestra, a modo de ejemplo, el perfil de compresión típico de un fresón recubierto almacenado a 5°C.

Para analizar el efecto de los factores (muestra, período de almacenamiento y de sus interacciones) sobre la firmeza de los fresones se realizó un ANOVA multifactor. Los resultados mostraron que la aplicación de los recubrimientos no provocó cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en la respuesta mecánica, pero sí el factor tiempo de almacenamiento ( $p < 0,05$ ).



**Figura I.11.-** Perfil de compresión típico de un fresón recubierto con 1,5M-S y almacenado a 5°C.

En la figura I.12 se observa que las muestras recubiertas presentaron mayor firmeza que el resto de las muestras no recubiertas aunque, como se ha comentado anteriormente, el efecto no fue significativo. En cuanto al periodo de almacenamiento, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las muestras almacenadas a los diferentes tiempos pero sí entre éstas y las muestras a tiempo 0. El que las muestras presenten una mayor firmeza a lo largo del almacenamiento en refrigeración ha sido observado también por otros autores en fresas de la variedad Selva y Diamante (Pelayo *et al.*, 2003) y podría ser debido a un ligero secado superficial.

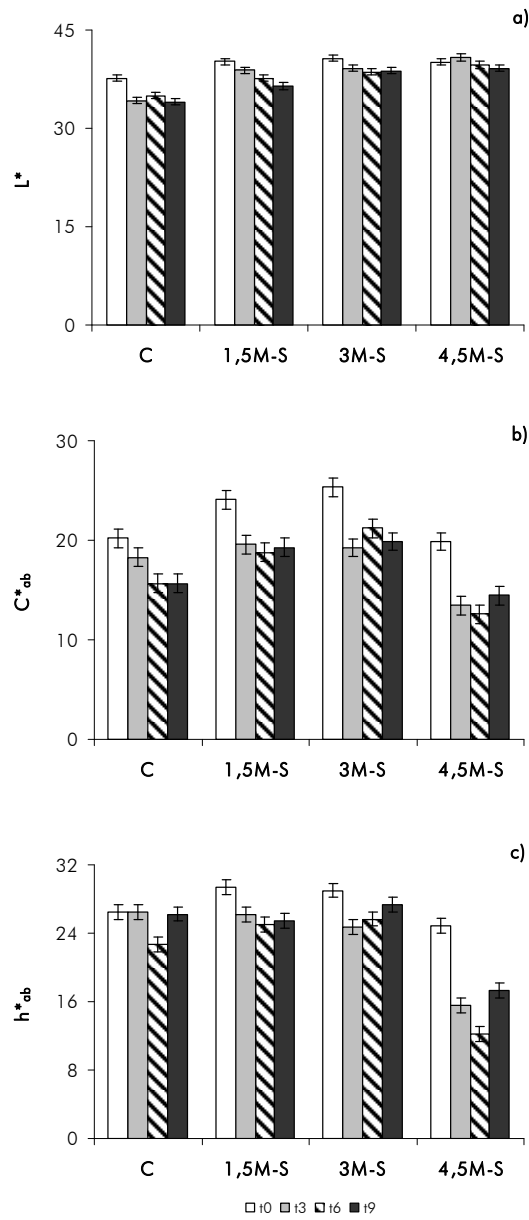


**Figura I.12.-** Fuerza máxima (F) de los fresones recubiertos y no recubiertos (C) a lo largo del almacenamiento a 5°C. Valores medios e intervalos LSD.

#### 1.3.3.4.- Propiedades ópticas

A partir del espectro de reflexión de las muestras, se obtuvieron las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  (Ec. 21, 22 y 23) del espacio CIE  $L^*a^*b^*$  y a partir de estas coordenadas se calculó el tono (Ec. 24) y croma (Ec. 25).

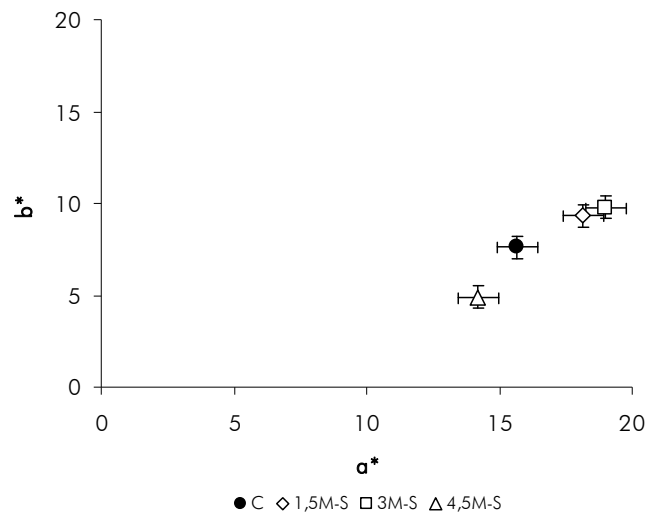
La figura I.13 muestra los valores de luminosidad ( $L^*$ ), croma ( $C^*_{ab}$ ) y tono ( $h^*_{ab}$ ) de los fresones a cada tiempo de almacenamiento a 5°C. El análisis estadístico mostró diferencias significativas tanto para el factor muestra como para el tiempo pero no para la interacción. En ella se observa cómo los valores de  $L^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h^*_{ab}$  disminuyeron ( $p < 0,05$ ) desde el inicio hasta aproximadamente el sexto día del almacenamiento y prácticamente se mantuvieron constantes en los últimos días, dando lugar a muestras más oscuras, con una coloración rojiza menos viva. Otros autores (Pelayo *et al.*, 2003; Ayala-Zavala *et al.*, 2004) también obtuvieron las mismas tendencias en fresas almacenadas en refrigeración.



**Figura 1.13.-** Luminosidad ( $L^*$ ) (a), croma ( $C^*_{ab}$ ) (b) y tono ( $h^*_{ab}$ ) (c) de los fresones a cada tiempo del almacenamiento a  $5^\circ\text{C}$ . Valores medios e intervalos LSD.

Las muestras recubiertas presentaron mayor luminosidad que las no recubiertas ( $p < 0,05$ ), tanto mayor cuanto mayor fue la proporción de hidrocoloide en la formulación. Esto puede ser debido a un menor secado superficial de estas muestras y al ligero aspecto blanquecino aportado por el recubrimiento. En cuanto al croma y el tono también aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) con el aumento del hidrocoloide, excepto en las muestras que contenían la mayor proporción de hidrocoloide (4,5M-S) que disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) debido al mayor color blanquecino del recubrimiento.

La figura I.14 muestra el plano cromático de las muestras recubiertas y no recubiertas para todos los tiempos de almacenamiento.



**Figura I.14.-** Plano cromático de las muestras recubiertas y no recubiertas (C) para todos los tiempos de almacenamiento. Valores medios e intervalos LSD.

En ella se observa que las muestras recubiertas sufrieron un cambio en las coordenadas como consecuencia de la aplicación del recubrimiento. Además, se pueden observar tres grupos más o menos diferenciados que estarían



formados por un lado, por las muestras sin recubrir (C) por otro, por las muestras recubiertas con un contenido bajo-medio en hidrocoloide (1,5M-S y 3M-S) y un tercero, formado por las muestras con mayor contenido en hidrocoloide (4,5M-S). La disminución de  $a^*$  (pérdida de la tonalidad roja) y de  $b^*$  (pérdida de la tonalidad amarilla) de las muestras recubiertas con la mayor proporción de hidrocoloide (4,5M-S) se traduce en el plano cromático en una pérdida de pureza de color ( $C^*_{ab}$ ) y una disminución del tono ( $h^*_{ab}$ ).

#### *1.3.3.5.- Tasa respiratoria*

Con el objetivo de determinar los cambios en la actividad metabólica de los fresones como consecuencia de las condiciones de almacenamiento, se cuantificó la tasa respiratoria de la fruta mediante un método estático. Para ello, en períodos de tiempo prefijados, se sacó la fruta del envase y se colocó en un recipiente de vidrio hermético, analizándose el cambio en la composición del espacio de cabeza.

Los valores de la tasa respiratoria,  $TRO_2$  (mL  $O_2$ /kg h) y  $TRCO_2$  (mL  $CO_2$ /kg h), de los fresones recubiertos y no recubiertos almacenados junto con los resultados del análisis estadístico se muestran en la tabla 1.9.

La tasa respiratoria de  $O_2$ , es decir, el consumo de oxígeno por parte de las muestras aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) a partir del tercer día de almacenamiento, siendo este aumento menor en las muestras recubiertas. En cuanto a la tasa respiratoria de  $CO_2$ , entendida como la velocidad de emisión del gas, ésta se mantiene prácticamente constante durante los 6 primeros días de almacenamiento en todos los casos, observándose sólo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la emisión de  $CO_2$  en el último día analizado. Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores durante el

almacenamiento de fresas en refrigeración (El Gaouth *et al.*, 1991; Wszelaki *et al.*, 2000).

**Tabla I.9.-** Tasa respiratoria de O<sub>2</sub> (mL O<sub>2</sub>/kg h) y CO<sub>2</sub> (mL CO<sub>2</sub>/kg h) de los fresones recubiertos y no recubiertos (C) a lo largo del tiempo de almacenamiento. Valores medios y desviaciones estándar.

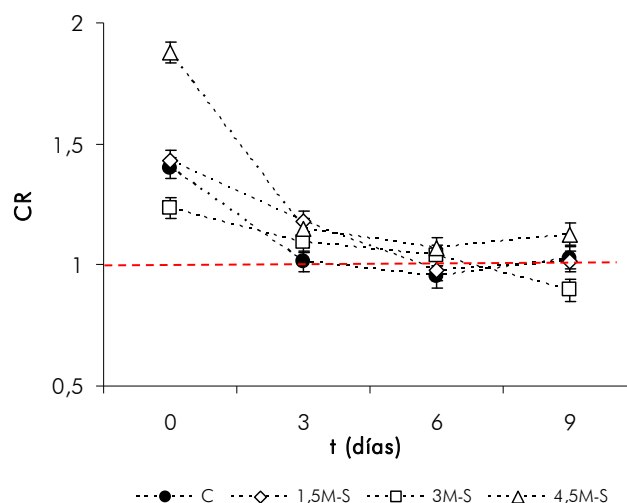
Muestra	0 días		3 días		6 días		9 días	
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
C	6,6	9,3	9,1	9,2	10,5	10,0	13,4	14
	(0,7) <sup>ab,x</sup>	(0,8) <sup>x</sup>	(0,4) <sup>b,y</sup>	(0,6) <sup>b,x</sup>	(0,5) <sup>b,z</sup>	(0,9) <sup>x</sup>	(0,6) <sup>w</sup>	(2) <sup>y</sup>
1,5M-S	7	9,7	6,6	8,0	10	10	10	10
	(1) <sup>b,x</sup>	(0,9)	(0,7) <sup>a,xy</sup>	(0,6) <sup>b</sup>	(1) <sup>b,y</sup>	(2)	(3) <sup>y</sup>	(2)
3M-S	7,1	8,8	6,6	7,4	8,8	9,1	12	10,5
	(0,4) <sup>b,x</sup>	(0,8) <sup>x</sup>	(0,7) <sup>a,x</sup>	(0,3) <sup>a,x</sup>	(0,9) <sup>a,x</sup>	(0,5) <sup>x</sup>	(2) <sup>y</sup>	(0,9) <sup>y</sup>
4,5M-S	5,4	10,0	6,6	7,5	8,7	9,20	11	13
	(0,3) <sup>a,x</sup>	(0,9) <sup>x</sup>	(0,7) <sup>a,y</sup>	(0,4) <sup>ab,x</sup>	(0,7) <sup>a,y</sup>	(0,20) <sup>x</sup>	(1) <sup>z</sup>	(2) <sup>y</sup>

a,b,c: Diferentes superíndices en una columna implican diferencias significativas entre muestras para un nivel de confianza del 95%.

x,y,z,w: Diferentes superíndices en una fila implican diferencias significativas entre tiempos para un nivel de confianza del 95%.

En general, las muestras recubiertas presentaron niveles de tasa respiratoria ligeramente menores ( $p < 0,05$ ) a las no recubiertas. Este efecto también fue observado por El Gaouth *et al.* (1991) y Vargas *et al.* (2006) en fresas recubiertas con quitosano debido a la posible modificación de la atmósfera interna de las fresas por la aplicación del recubrimiento. Cabe destacar, que en ningún caso se observaron diferencias significativas por efecto de la composición del recubrimiento.

La figura 1.15 muestra el coeficiente respiratorio (CR) de las muestras recubiertas y no recubiertas en función del período de almacenamiento. Como se puede observar, durante los primeros días del almacenamiento el CR es mayor que la unidad ya que el sistema en el envase se encuentra en estado no estacionario, tendiendo al equilibrio cuando se iguala la tasa respiratoria del producto con la permeabilidad del material polimérico del envase. Después de este período, el CR se mantuvo cercano a la unidad, poniendo de manifiesto la ausencia de cambios en las rutas metabólicas de las muestras por efecto del recubrimiento.



**Figura 1.15.-** Coeficiente respiratorio (CR) de los fresones recubiertos y no recubiertos (C) a lo largo del almacenamiento a 5°C. Valores medios e intervalos LSD.

#### 1.3.3.6.- Evaluación organoléptica

Como se ha comentado en materiales y métodos, en este trabajo se realizaron dos sesiones de catas compuestas cada una de ellas por una prueba triangular y un ensayo de clasificación por ordenación.

La *prueba triangular* se trata de una prueba de diferenciación en la que se presentan simultáneamente tres muestras, dos de las cuales son iguales, con el fin de que el juez identifique cual es la muestra desaparejada. Esta prueba es especialmente indicada cuando se dispone de pocos jueces y se puede utilizar para la selección y entrenamiento de los jueces y para controlar el grado de eficacia de sus respuestas. En esta prueba se evaluó si la muestra desaparejada difería de las otras dos en cuanto a sabor, textura y olor.

En la primera prueba triangular todos los jueces evaluaron 4 series distintas (C/1,5M-S, 1,5M-S/3M-S, 1,5M-S/4,5M-S y 3M-S/4,5M-S) presentadas por duplicado con diferente codificación para asegurar la validez de los resultados. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla I.10. Puesto que el número de respuestas máximas que se podrían haber obtenido habría sido de 24, el número mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación de 0,05 fue de 13 (Anexo IV). Por lo tanto, se puede decir que existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la evaluación gustativa (sabor, textura y olor) para todas las series a excepción de la serie 3M-S/4,5M-S.

**Tabla I.10.-** Resultados de la primera prueba triangular.

Serie	Nº Aciertos	p-value
C/1,5M-S	14	$p < 0,05$
1,5M-S/3M-S	13	$p < 0,05$
1,5M-S/4,5M-S	13	$p < 0,05$
3M-S/4,5M-S	5	$p > 0,05$

De este primer ensayo se dedujo que los jueces fueron capaces de discriminar las muestras recubiertas de las que no y, además diferenciar entre algunas de ellas por su composición, aunque el aumento en la proporción del hidrocoloide dificultó la discriminación entre pares con una composición muy próxima. De todas las muestras, la que proporcionó una mayor semejanza con la fruta fresca (control) fue la recubierta con 1,5M-S.

En la segunda prueba triangular todos los jueces evaluaron de nuevo la serie C/1,5M-S para corroborar la existencia o no de diferencias significativas entre muestras (Tabla I.11). En este caso, como los jueces obtuvieron 10 respuestas de las 24 posibles (Anexo IV) se puede decir que no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las muestras.

**Tabla I.11.-** Resultados de la segunda prueba triangular.

Serie	Nº Aciertos	p-value
C/1,5M-S	11	$p > 0,05$

El *ensayo de clasificación por ordenación* permite apreciar diferencias entre varias muestras basándose en la intensidad relativa de un determinado atributo, característica o impresión global. Está especialmente recomendado para realizar una primera selección de las muestras antes de ser evaluadas con otras pruebas o cuando los jueces disponibles no son capaces de realizar otras pruebas de forma fiable. También es útil para determinar la influencia de diferentes materias primas, de los tratamientos, del envasado y del almacenamiento y para seleccionar y entrenar jueces.

En el primer ensayo de clasificación por ordenación, los jueces ordenaron de mayor a menor brillo 4 muestras correspondientes a cada uno de los tratamientos. Los resultados de la primera evaluación se muestran en la tabla

I.12. De acuerdo con el apartado *1.2.5.6. Evaluación organoléptica* (Materiales y métodos) y puesto que hubo más de un juez que asignó a dos o más muestras el mismo número de orden, se calculó el valor de  $F'$  (Ec. I.7). Para un nivel de significación de 0,05 y al comparar 4 muestras, el valor crítico de distribución de  $\chi^2$  que se obtiene del anexo V es de 7,81. Al comparar el valor de  $F'$  (23,90) con el valor crítico de distribución de  $\chi^2$  (7,81) se demostró que existían diferencias significativas entre las muestras. Para identificar qué pares de muestras fueron las que diferían significativamente entre sí, se calculó  $|R_i - R_j|$  a partir de los valores de sus sumas de ordenaciones y se observó que existían diferencias significativas entre las series 4,5M-S/C, 4,5M-S/1,5M-S y 4,5M-S/3M-S puesto que los valores obtenidos fueron mayores a 12,40 (Ec. I.8). Estos resultados parecen indicar que la diferencia de brillo en las muestras por efecto de la aplicación de los recubrimientos estudiados, sólo fue perceptible por los catadores cuando la proporción de hidrocoloide fue elevada.

En el segundo ensayo de clasificación por ordenación, los jueces ordenaron de mayor a menor brillo las dos muestras elegidas (C y 1,5M-S). Los resultados de la segunda evaluación se muestran en la tabla I.12. En este caso, como ningún juez asignó el mismo número de orden a las muestras, se calculó el valor de  $F$  (Ec. I.6) teniendo en cuenta que se trataba de una prueba de comparación por parejas '*modelo bilateral*' (UNE 87-005-92, 1997). Para un modelo bilateral con 12 jueces, el número mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación de  $p < 0,05$  (Anexo VI) es de 10. Puesto que el valor de  $F$  (12) es mayor al número mínimo de respuestas necesarias, se puede decir que sí que existen diferencias significativas entre las muestras recubiertas con 1,5M-S y las no recubiertas (C).

En conclusión, los jueces consideraron que no existieron diferencias apreciables en cuanto a sabor, textura y olor (evaluación gustativa) entre los fresones recubiertos con 1,5M-S y los no recubiertos (C). Sin embargo, los jueces

prefirieron el aspecto de las frutas sin recubrir que el de las frutas recubiertas con 1,5M-S debido a la presencia de una ligera capa blanquecina en la superficie como consecuencia de la aplicación del recubrimiento. En este caso, los jueces sí encontraron diferencias significativas entre las muestras.

**Tabla 1.12.-** Resultados del primer y segundo ensayo de clasificación por ordenación de las muestras recubiertas y no recubiertas (C).

J	P					
	1 <sup>er</sup> Ensayo				2 <sup>o</sup> Ensayo	
	4,5M-S	3M-S	1,5M-S	C	1,5M-S	C
1	4	3	1	2	1	2
2	4	3	1,5	1,5	1	2
3	4	3	1	2	1	2
4	4	3	2	1	1	2
5	4	3	1,5	1,5	1	2
6	4	3	1,5	1,5	1	2
7	4	1	3	2	1	2
8	4	2	2	2	1	2
9	4	2	1	3	1	2
10	4	3	1	2	1	2
11	4	1	3	2	1	2
12	4	1	2,5	2,5	1	2
<b>R</b>	<b>48</b>	<b>28</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>12</b>	<b>24</b>

#### I.4.- CONCLUSIONES

En general, las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones formadoras de recubrimiento se vieron afectadas significativamente tanto por la concentración de hidrocoloide empleada como por el BHL de los tensoactivos. La densidad y la tensión superficial de las formulaciones osciló entre 1001 y 1010 kg/m<sup>3</sup> y entre 24,95 y 46,1 mN/m, respectivamente. La densidad aumentó a medida que aumentó la concentración de hidrocoloide estando dicho aumento más afectado por la proporción de hidrocoloide/tensoactivo que por el BHL de los tensoactivos. Sin embargo, para la tensión superficial, este efecto estuvo más influenciado por el BHL que por la proporción hidrocoloide/tensoactivo. Las FFRs presentaron un ligero comportamiento pseudoplástico, llegando a ser newtoniano en algunos casos, sobre todo a bajas concentraciones de hidrocoloide. De los tres tensoactivos utilizados, el que presentó formulaciones más viscosas fue el de mayor BHL (S), seguido por el S80 (BHL bajo) y el S20 (BHL medio). Desde el punto de vista de la estabilidad de las dispersiones, las formulaciones que presentaron mayor estabilidad cinética fueron las de BHL bajo, seguidas de la formulación de BHL medio con la mayor concentración de hidrocoloide (4,5M-S20).

Las propiedades de los films también se vieron afectadas tanto por la proporción hidrocoloide-tensoactivo como por el BHL de los tensoactivos. En los films secos, las humedades de equilibrio pudieron predecirse del comportamiento de sorción de los componentes puros, cuando se trabajó a bajas humedades. Al incrementar de forma importante el nivel de humedad (para  $a_w > 0,59$ ) la mayor movilidad molecular en el sistema parece potenciar las interacciones entre componentes, lo que afectó al comportamiento de sorción. A partir de este nivel de  $a_w$  todos los recubrimientos mostraron un



incremento significativo en la capacidad de adsorción, lo cual se justifica por la contribución de las interacciones de tipo soluto-solvente en la retención de agua. Este efecto fue mayor en los films con mayor carácter hidrofílico, es decir, mayor H/T y/o mayor BHL. La PVA de los films osciló entre  $15 \times 10^{10}$  y  $42 \times 10^{10}$  g/Pa.s.m. Los menores valores de PVA se obtuvieron con la mayor proporción de polímero en el film (4,5%) y los menores valores de BHL (S80). Parece ser que, para los tensoactivos y la cantidad utilizada (3%), se necesite una concentración crítica de polímero para tener una mejora significativa en la resistencia a la transferencia del vapor de agua.

La aplicación de los recubrimientos comestibles dio lugar a ligeros cambios en la calidad fisicoquímica y sensorial. Por un lado, las muestras recubiertas presentaron mayor RVA y menor TR, seguramente debido a una modificación de la atmósfera interna de las fresas por la aplicación del recubrimiento. El almacenamiento de las fresas (recubiertas y no recubiertas) en refrigeración provocó un aumento de la firmeza, una disminución de los valores de las coordenadas de color ( $L^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h^*_{ab}$ ) y un aumento de la TR. Por otro lado, la calidad sensorial evaluada en términos de brillo, sabor, textura y olor se vieron modificados en las muestras recubiertas, tanto más cuanto mayor fue la proporción de hidrocoloide en la formulación.

## CAPÍTULO II

---

RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE  
HPMC, ÁCIDO OLEICO Y DIFERENTES  
TENSOACTIVOS



## II.1.- INTRODUCCIÓN

Actualmente, el creciente interés por aplicar recubrimientos comestibles a frutas y hortalizas para alargar su vida útil ha impulsado el desarrollo de films y recubrimientos comestibles. Entre ellos, destacan en la bibliografía los films a base de metilcelulosa (MC) e hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), por sus excelentes propiedades (Wu *et al.*, 2002). Como se ha comentado anteriormente, las disoluciones de HPMC forman films flexibles y transparentes, sin olor ni sabor. Además, su permeabilidad selectiva a los gases permite el retraso de la madurez en las frutas al reducir la concentración interna de  $O_2$ , sin causar una acumulación excesiva de  $CO_2$ . Sin embargo, su alta permeabilidad al vapor de agua hace necesaria la incorporación de lípidos (ácidos grasos, ceras, resinas y/o tensoactivos) en la matriz del hidrocoloide para mejorar esta propiedad (Kester y Fennema, 1986; Hernández, 1994; Debeaufort y Voilley, 1995; Baldwin *et al.*, 1997). Por tanto, el desarrollo de formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs), en las que un componente hidrófobo se encuentra disperso en un medio hidrófilo continuo, requiere el estudio de la estabilidad de las FFRs, que se encuentra directamente relacionada con la existencia de fuerzas atractivo/repulsivas de tipo van der Waals, electrostáticas, estéricas y de hidratación entre las partículas dispersas (Dickinson, 1992). Para promover la formación de la emulsión y estabilización por acción interfacial, se puede adicionar una pequeña cantidad de un tensoactivo. Los tensoactivos poseen una parte polar y otra apolar, por lo que se adsorben en la interfase aceite-agua como una monocapa orientada disminuyendo así, la tensión interfacial. En este sentido, el HPMC puede contribuir a la formación y estabilización de las FFRs por el aumento de la viscosidad de la fase continua (Wollenweber *et al.*, 2000).

El *objetivo* de este capítulo consiste en estudiar las propiedades fisicoquímicas de FFRs a base de HPMC, ácido oleico y diferentes tensoactivos, y en analizar en que medida éstas afectan a las propiedades fisicoquímicas de los films secos resultantes.

## II.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

### *II.2.1.- Diseño y preparación de formulaciones formadoras de recubrimiento*

Para la obtención de las FFRs se utilizó hidroxipropil metilcelulosa (Methocel® E-15) de bajo peso molecular y de viscosidad 15 cPoise al 2% a 20°C suministrado por la empresa The Dow Chemical Company (Midlan, USA), ácido oleico (AO) y tres tensoactivos de distinto balance hidrófilo-lipófilo (BHL): Sorbitan monooleato (SMO), Polioxietilen sorbitan monooleato o Tween 80 (T80) y Polioxietilen sorbitan trioleato o Tween 85 (T85). Todos ellos fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España) excepto el T85 que fue suministrado por Fluka (Buchs SG, Schweiz).

La metodología de preparación de las FFRs fue estandarizada y consistió en dispersar y disolver 5% (p/p) de hidroxipropil metilcelulosa (M) en agua bidestilada a 80°C durante 2 horas, manteniendo una agitación constante. A continuación, se le añadió el AO hasta obtener una concentración final de 0, 1 y 2% (v/p) y después a cada formulación se le adicionó un 0,1% (v/p) del tensoactivo correspondiente tal y como se muestra en la tabla II.1. Todas las FFRs se homogeneizaron a temperatura ambiente en un equipo ultraturrax (DI25 Yellow Line, IKA®, Alemania) a 13500 rpm durante 4 minutos.

**Tabla II.1.-** Composición de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) (g/100 mL disolución), balance hidrófilo-lipófilo de la mezcla de lípidos ( $BHL_{ML}$ ) y de los tensoactivos ( $BHL_T$ ).

FFR	M (% p/p)	AO (% v/p)	SMO (% v/p)	T85 (% v/p)	T80 (% v/p)	$BHL_T$	$BHL_{ML}$
M	5	0	0	0	0	0	0
M-1OA	5	1	0	0	0	1,0	1,0
M-2OA	5	2	0	0	0	1,0	1,0
M-1OA-SMO	5	1	0,1	0	0	4,3	1,3
M-2OA-SMO	5	2	0,1	0	0	4,3	1,2
M-1OA-T85	5	1	0	0,1	0	11,0	1,9
M-2OA-T85	5	2	0	0,1	0	11,0	1,5
M-1OA-T80	5	1	0	0	0,1	15,0	2,3
M-2OA-T80	5	2	0	0	0,1	15,0	1,7

### II.2.2.- Propiedades fisicoquímicas de las FFRs

#### II.2.2.1.- Densidad, pH, conductividad y tensión superficial

La densidad, el pH y la conductividad de las FFRs fueron determinadas a 25°C por triplicado mediante un densímetro (DA-110M, Mettler Toledo, España) y un analizador multiparámetro (C831, Consort, Bélgica), respectivamente.

Para la determinación de la tensión superficial de las FFRs se utilizó un goniómetro (OCA20, DataPhysics Instruments GmbH, Alemania) a 25°C y para obtener los valores de tensión superficial se seleccionó el método de Laplace-Young (Karbowski *et al.*, 2006). Los ajustes de la imagen de la gota se realizaron mediante el programa SCA20. En las mediciones se utilizaron agujas

Hamilton 19, con diámetro interior de 0,69 mm y exterior de 1,07 mm. Para cada FFR se realizaron 9 determinaciones.

#### *II.2.2.2.- Caracterización reológica*

El comportamiento reológico de las FFRs se analizó a 25°C por triplicado usando un reómetro rotatorio de cilindros concéntricos con un sensor del tipo Z34DIN Ti (HAAKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Alemania). Se midió el esfuerzo cortante ( $\sigma$ ) en función del gradiente de velocidad ( $\dot{\gamma}$ ) desde 0 a 512 s<sup>-1</sup> de la siguiente manera: 5 minutos hasta alcanzar el gradiente de velocidad máximo y 5 minutos hasta descender a 0. Las curvas de flujo obtenidas se ajustaron a La Ley de la Potencia para determinar el índice de comportamiento al flujo (n) y el índice de consistencia (K) de las FFRs. La viscosidad aparente fue calculada a 100 s<sup>-1</sup>.

#### *II.2.2.3.- Tamaño de partícula*

El tamaño de partícula de las FFRs se determinó a 25°C por triplicado usando un difractómetro láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Reino Unido). Las muestras fueron dispersadas en agua bidestilada a 2000 rpm hasta que se obtuvo un nivel de obscuración del 10-12%. Para aplicar la teoría Mie, se consideró un índice de refracción de 1,46 y una absorción de 0 para las partículas dispersas. El tamaño medio de partícula fue caracterizado a partir de los parámetros  $d_{32}$  y  $d_{43}$  tal y como se explica en la introducción.

#### *II.2.2.4.- Potencial- $\zeta$*

El potencial- $\zeta$  de las FFRs fue obtenido a partir de la determinación de la movilidad electroforética de las partículas realizada en un equipo Zetasizer (Nano-Z, Malvern Instruments, Reino Unido). Para transformar las medidas de movilidad electroforética en valores de potencial- $\zeta$ , se utilizó el modelo matemático de Smoluchowsky. Las FFRs fueron medidas por triplicado a una concentración de ácido oleico de 0,02%, diluyendo cada una de las formulaciones con agua bidestilada antes de cada análisis.

#### *II.2.3.- Obtención de los films*

Las FFRs fueron vertidas en placas niveladas de politetrafluoretileno (PTFE) de 15 cm de diámetro, y se secaron a temperatura ambiente durante 48 horas. El espesor de los films se controló siguiendo el procedimiento descrito por Park y Zhao (2004), y ajustando una misma densidad de sólidos para todos los films de 56 g/m<sup>2</sup> ya que el espesor de los films hidrofílicos es un factor a tener en cuenta para su caracterización (McHugh *et al.*, 1993; Hagenmaier y Shaw, 1990). El espesor de los films fue medido por quintuplicado utilizando un micrómetro digital (Palmer-Comecta, España,  $\pm 0,001$  mm).

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua, las propiedades mecánicas y ópticas, los films secos fueron previamente equilibrados durante 2 semanas en desecadores a 5°C y 59% humedad relativa (conseguida mediante una disolución saturada de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).



### ***II.2.4.- Caracterización de los films***

#### *II.2.4.1.- Isotermas de sorción de agua*

Para la determinación de las isotermas de sorción los films secos ( $\phi = 3$  cm), previamente equilibrados durante 2 semanas en desecadores con  $P_2O_5$ , fueron colocados, por triplicado, en desecadores que contenían diferentes sales saturadas de: LiCl,  $MgCl_2$ ,  $K_2CO_3$ ,  $Mg(NO_3)_2$ , NaBr, NaCl, KCl, las cuales se mantuvieron a 5°C en un incubador (Hot-Cold B, J.P.-Selecta, España), para mantener unas humedades relativas de 11,3%, 33,6%, 43,1%, 58,9%, 63,5%, 75,6%, 87,7%, respectivamente (ASTM, 1996). Los films fueron pesados periódicamente ( $\pm 0,00001$  g) hasta que alcanzaron peso constante ( $\Delta M \approx 0,0005$  g), asumiendo que han alcanzado el equilibrio (Spiess y Wolf, 1983). Finalmente, la humedad de equilibrio de las muestras ( $W_e$ ) se determinó utilizando una estufa de vacío (Vaciotem-T, J.P. Selecta, España) a 60°C durante 48 horas. Los datos experimentales ( $W_e$  (b.s.) *versus* actividad de agua ( $a_w$ )) fueron ajustados al modelo de BET y de GAB según las ecuaciones 14 y 15 citadas en la introducción.

#### *II.2.4.2.- Permeabilidad al vapor de agua*

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) fue medida según una modificación de la técnica gravimétrica ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993), usando copas de aluminio (fabricadas por Monje Hnos. S.L., Valencia, España) y considerando la corrección al método sugerida por Gennadios *et al.* (1994). La metodología llevada a cabo así como la obtención de los resultados fueron los mismos que se explican en la introducción.

#### *II.2.4.3.- Propiedades mecánicas*

Los ensayos mecánicos se realizaron con una prensa mecánica (TA-XT-plus, Stable Micro Systems, Reino Unido), con una célula de carga de 50 kg y pinzas de tensión (A/TG). Las muestras (25,4 x 100 mm) fueron colocadas dejando una separación entre las pinzas de 50 mm y el ensayo se realizó a una velocidad de 50 mm/min (ASTM, 2001). El esfuerzo de fractura ( $\sigma_f$ ), el porcentaje de deformación en el momento de la rotura (% E) así como el módulo de elasticidad (ME) de los films fueron evaluados por quintuplicado. Los parámetros mecánicos fueron calculados según las ecuaciones 12 y 13 citadas en la introducción.

#### *II.2.4.4.- Propiedades ópticas*

##### *Translucidez y color*

Las determinaciones de transparencia y color se realizaron por quintuplicado a través del espectro de reflexión de las muestras obtenido con un espectrocolorímetro (CM-3600d, Minolta Co., Japón), previa calibración, con una ventana de medición de 10mm, utilizando como sistema de referencia el iluminante D65/observador 10°. Las medidas se efectuaron en el centro de cada film, sobre un fondo blanco y un fondo negro.

La transparencia (evaluada a través de la transmitancia interna,  $T_i$ ), las coordenadas de color y el índice de blancura (IB) fueron determinadas aplicando la teoría de Kubelka-Munk (Hutchings, 1999) según las ecuaciones 16-26 citadas en la introducción.

### Brillo

El brillo de las muestras fue determinado por quintuplicado usando un brillómetro plano (Multi-Gloss 268, Minolta Co., Japón) a un ángulo de incidencia de 85° perpendicularmente a la superficie del film, de acuerdo con el estándar D523 de la American Society for Testing and Materials (ASTM, 1999). Para llevar a cabo las determinaciones, los films fueron colocados sobre una cartulina negra mate. Los resultados fueron expresados en unidades de brillo, relativas a una superficie estándar negra altamente pulida con un valor de brillo cercano a 100.

#### ***II.2.5.- Análisis estadístico***

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA con un nivel de significación del 95% y utilizando para las comparaciones múltiples el test Least Significant Difference (LSD). Los cálculos se realizaron con el Software Statgraphics Plus® 5.1.

### **II.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### ***II.3.1.- Propiedades fisicoquímicas de las FFRs***

De acuerdo con los resultados obtenidos en el Capítulo I, las FFRs se caracterizaron con un 5% (p/p) de hidroxipropil metilcelulosa (M) debido al efecto espesante y estabilizante que ejercen los hidrocoloides al aumentar su concentración (Wollenweber *et al.*, 2000; Dalglish, 2006; Sovilj y Petrovic, 2006). Para mejorar la propiedad barrera al vapor de agua del hidrocoloide se incorporó una mezcla de lípidos formada por ácido oleico y un tensoactivo. En

las formulaciones basadas en mezclas de hidrocoloides y lípidos, los tensoactivos se utilizan para promover la formación de la emulsión y la estabilización interfacial (Vargas *et al.*, 2009a).

De acuerdo al diseño planteado para el estudio se obtuvieron nueve formulaciones. En cada grupo de formulaciones se varió el contenido de AO y el tensoactivo para obtener diferentes niveles de BHL (ver Tabla II.1), ya que al aumentar el ratio de AO disminuyó el BHL de las formulaciones.

### *II.3.1.1.- pH, conductividad, densidad y comportamiento reológico*

La tabla II.2 presenta los resultados obtenidos de pH, conductividad eléctrica, densidad y propiedades reológicas de todas las FFRs, junto con los resultados del análisis estadístico (ANOVA simple), donde se observa que existieron diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

Las FFRs presentaron pH neutro, baja conductividad y densidad ligeramente superior a la del agua pura ( $998,2 \text{ kg/m}^3$  a  $20^\circ\text{C}$ ). Todas las FFRs presentaron un comportamiento pseudoplástico ( $n < 1$ ), típico de hidrocoloides (HPMC) (Al-Sabagh, 2002; Rahate y Nagarkar, 2007).

Para analizar el efecto de las variables: concentración de AO y tipo de tensoactivo se realizó un análisis de la varianza multifactorial (ANOVA). Este análisis mostró que tanto los efectos simples (concentración de AO y tipo de tensoactivo) como su interacción doble fueron significativos al 95%.

La incorporación de AO disminuyó ligeramente la densidad, el índice de flujo ( $n$ ) y el pH, debido a la naturaleza ácida de éste ( $pK_a = 4,8$ ). Por otro lado, su adición aumentó el índice de consistencia al flujo ( $K$ ) y la viscosidad aparente de las FFRs. El aumento de la viscosidad aparente está relacionado con la aparición de una nueva fase (fase dispersa) en el medio. Este efecto fue mayor cuando aumentó la fracción volumétrica de la fase dispersa (AO), como ha

sido observado por otros autores en emulsiones concentradas (Campanella *et al.*, 1995; Walstra *et al.*, 1999). La adición de los diferentes tensoactivos no supuso cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en los parámetros comentados.

**Tabla II.2.-** pH, conductividad eléctrica ( $\sigma$ ), densidad ( $\rho$ ), parámetros del modelo de Ostwald de Waale ( $n$  y  $K$ ), viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del ajuste. Valores medios y desviaciones estándar.

FFR	pH	$\sigma$ (S/m)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$n$	$K$ (Pa s) <sup>n</sup>	$r^2$	$\eta_{ap}$ (Pa s)*
M	6,47	0,031	1010,70 (0,10) <sup>f</sup>	0,988 (0,004) <sup>f</sup>	0,128 (0,002) <sup>a</sup>	0,999	0,121 <sup>a</sup>
M-1OA	6,78	0,029	1009,40 (0,10) <sup>d</sup>	0,985 (0,005) <sup>de</sup>	0,136 (0,003) <sup>b</sup>	0,999	0,127 <sup>b</sup>
M-2OA	6,26	0,028	1008,20 (0,10) <sup>a</sup>	0,983 (0,005) <sup>bc</sup>	0,145 (0,003) <sup>e</sup>	0,999	0,134 <sup>e</sup>
M-1OA- SMO	6,90	0,026	1009,73 (0,06) <sup>e</sup>	0,984 (0,005) <sup>cd</sup>	0,138 (0,003) <sup>c</sup>	0,999	0,128 <sup>c</sup>
M-2OA- SMO	6,62	0,025	1008,83 (0,21) <sup>c</sup>	0,982 (0,006) <sup>a</sup>	0,148 (0,003) <sup>f</sup>	0,999	0,136 <sup>f</sup>
M-1OA- T85	6,64	0,027	1009,33 (0,06) <sup>d</sup>	0,984 (0,005) <sup>cd</sup>	0,140 (0,003) <sup>d</sup>	0,999	0,130 <sup>d</sup>
M-2OA- T85	6,38	0,026	1008,57 (0,12) <sup>b</sup>	0,981 (0,005) <sup>a</sup>	0,150 (0,003) <sup>g</sup>	0,999	0,137 <sup>g</sup>
M-1OA- T80	6,54	0,027	1009,83 (0,06) <sup>e</sup>	0,986 (0,006) <sup>e</sup>	0,137 (0,003) <sup>bc</sup>	0,999	0,128 <sup>c</sup>
M-2OA- T80	6,40	0,026	1008,33 (0,21) <sup>a</sup>	0,982 (0,006) <sup>ab</sup>	0,151 (0,003) <sup>g</sup>	0,999	0,139 <sup>h</sup>

\*calculada para un gradiente ( $\dot{\gamma}$ ) de 100 s<sup>-1</sup>

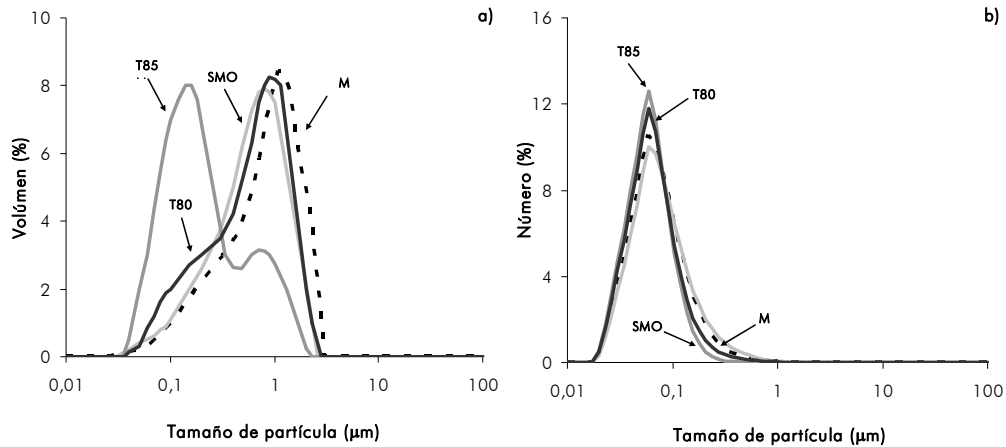
a-h: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre FFRs para un nivel de confianza del 95%.

La adición de AO a las FFRs disminuyó la conductividad con respecto a la formulación control (M) debido a la formación de micelas que retienen los iones y por tanto, quedan menos disponibles en la fase acuosa. Esta disminución fue mayor cuando aumentó la concentración de AO por la formación de un mayor número de micelas. La adición de tensoactivos también disminuyó la conductividad debido a la mayor retención de iones al aumentar la polaridad.

### *II.3.1.2.- Tamaño de partícula, potencial- $\zeta$ y tensión superficial*

La determinación del tamaño de partícula y del potencial- $\zeta$  de las FFRs juega un papel fundamental en la estabilidad de las emulsiones. El tamaño de partícula permite analizar si existe interacción entre los distintos componentes de las formulaciones (HPMC, AO y tensoactivo) o si bien, se estructuran como partículas individuales y el potencial- $\zeta$  si dichas partículas/distribuciones de partículas son estables o no, desde un punto de vista de la carga superficial.

La figura II.1 muestra una distribución típica de tamaño medio de partícula para las FFRs que contenían un 1% de AO, con y sin tensoactivos. Para las formulaciones del 2% se obtuvieron resultados similares. En la figura II.1a la distribución de tamaño de partícula está en términos de porcentaje de volumen de las partículas y en ella se observan tanto distribuciones monomodales como bimodales, con tamaños medios entre 0,01 y 1  $\mu\text{m}$ , similares a los obtenidos por Schulz y Daniels (2000) en emulsiones a base de hidroxipropil metilcelulosa y triglicéridos. Sin embargo, las distribuciones fueron aparentemente monomodales en términos de porcentaje de número de partículas (Figura II.1b), lo cual indica que hay un número muy pequeño de partículas de gran tamaño.



**Figura II.1.-** Distribución típica de tamaño de partícula de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) con un 1% de ácido oleico (AO) en función del: (a) volumen de las partículas (%) y (b) número de partículas (%).

La presencia de distribuciones polidispersas se pueden detectar también a través de las diferencias observadas entre los parámetros  $d_{43}$  y  $d_{32}$ , tal y como se observa en la tabla II.3. Según McClements (2005), las distribuciones polidispersas aparecen cuando las partículas grandes flocculan o cuando no existe suficiente tensoactivo para estabilizar la emulsión durante la homogeneización. Estos resultados apuntan a la presencia de dos tipos de partículas: micelas de ácido oleico y micelas de ácido oleico-tensoactivo, ya que, en general, la existencia de interacciones entre un polímero y un tensoactivo no iónico no se dan o son muy escasas (Taylor *et al.*, 2007; Sovilj y Petrovic, 2006). Vargas *et al.* (2009a) encontraron estructuras similares en sistemas con un 1% AO y 0,1% Tween 80, con tamaños de partículas parecidos a los encontrados en este trabajo.

La tabla II.3 presenta los resultados obtenidos de tensión superficial, tamaño de partícula y potencial- $\zeta$  de todas las FFRs, junto con los resultados del análisis

estadístico (ANOVA simple), donde se observa que existieron diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

**Tabla II.3.-** Tamaño de partícula ( $d_{43}$  y  $d_{32}$ ), área media superficial ( $A_s$ ), número de partículas/ $m^3$  (N), potencial- $\zeta$  y tensión superficial ( $\gamma$ ) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs). Valores medios y desviaciones estándar.

FFR	$d_{43}$ ( $\mu m$ )	$d_{32}$ ( $\mu m$ )	$A_s$ $\times 10^5$ ( $m^2$ )	N/ $m^3$ $\times 10^{17}$	Potencial- $\zeta$ (mV)	$\gamma$ (mN/m)
M-1OA	0,934 (0,012) <sup>f</sup>	0,43 (0,02) <sup>de</sup>	1,57 (0,07) <sup>a</sup>	2,7 (0,4) <sup>a</sup>	-7,03 (0,15) <sup>d</sup>	41,57 (0,12) <sup>b</sup>
M-2OA	0,967 (0,012) <sup>g</sup>	0,46 (0,03) <sup>e</sup>	2,95 (0,21) <sup>c</sup>	4 (1) <sup>ab</sup>	-4,3 (0,7) <sup>e</sup>	39,57 (0,23) <sup>a</sup>
M-1OA- SMO	0,925 (0,008) <sup>f</sup>	0,41 (0,02) <sup>d</sup>	1,66 (0,08) <sup>a</sup>	3,2 (0,4) <sup>a</sup>	-8,3 (0,6) <sup>d</sup>	42 (2) <sup>bc</sup>
M-2OA- SMO	0,823 (0,012) <sup>e</sup>	0,44 (0,03) <sup>de</sup>	3,09 (0,20) <sup>c</sup>	5 (1) <sup>ab</sup>	-11,0 (0,8) <sup>bc</sup>	42 (2) <sup>bc</sup>
M-1OA- T85	0,327 (0,004) <sup>a</sup>	0,147 (0,002) <sup>a</sup>	4,62 (0,03) <sup>e</sup>	68 (1) <sup>d</sup>	-12 (1) <sup>b</sup>	40,8 (0,7) <sup>ab</sup>
M-2OA- T85	0,521 (0,007) <sup>b</sup>	0,187 (0,003) <sup>b</sup>	7,25 (0,12) <sup>f</sup>	66 (3) <sup>d</sup>	-12 (1) <sup>b</sup>	41,2 (0,3) <sup>b</sup>
M-1OA- T80	0,72 (0,02) <sup>c</sup>	0,33 (0,02) <sup>c</sup>	2,09 (0,13) <sup>b</sup>	6 (1) <sup>b</sup>	-14,7 (0,5) <sup>a</sup>	43 (1) <sup>c</sup>
M-2OA- T80	0,76 (0,02) <sup>d</sup>	0,36 (0,03) <sup>c</sup>	3,8 (0,3) <sup>d</sup>	10 (2) <sup>c</sup>	-10,2 (0,8) <sup>c</sup>	42 (2) <sup>bc</sup>

a-g: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre FFRs para un nivel de confianza del 95%.



Para analizar qué efectos fueron significativos (concentración de AO, tipo de tensoactivo y la interacción doble), se realizó un análisis de la varianza multifactor. Los resultados mostraron que, en general, todos los efectos simples y la interacción doble resultaron significativos al 95%.

Como se puede observar en la tabla II.3, el aumento de la concentración de AO incrementó el tamaño medio de las partículas, aunque este efecto sólo fue significativo ( $p < 0,05$ ) en las FFRs con Tween 85. Además, el área media superficial ( $A_s$ ) y el número de partículas/ $m^3$  aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) con el contenido en AO. Por el contrario, la incorporación de los tensoactivos supuso una reducción ( $p < 0,05$ ) del tamaño medio de las partículas, por la formación de una membrana interfacial que impidió la agregación de las partículas.

El tamaño de partícula obtenido dependió del tipo de tensoactivo utilizado, aunque todas presentaron tamaños de partículas bastante pequeños, menores de  $1 \mu m$ . Así, las FFRs que presentaron una mayor estabilidad, en términos de tamaño de partícula, fueron las que contenían como tensoactivo Tween 85 (BHL=11), presentando los menores tamaños de partícula (entre  $0,15-0,52 \mu m$ ). Normalmente, la máxima estabilidad de una emulsión aceite en agua (O/W) se obtiene incorporando tensoactivos con BHL de 10-12, aunque a menudo depende del tipo de aceite (McClements, 2005).

Todas las FFRs presentaron valores de potencial- $\zeta$  (Tabla II.3) negativos debido a que el grupo carboxilo del ácido oleico ( $pK_a$  COOH/COO<sup>-</sup> = 4,8) se encuentra cargado negativamente al pH de las FFRs (Ham-Pichavant *et al.*, 2005). La carga superficial de las FFRs se volvió más negativa ( $p < 0,05$ ) cuando se incorporaron los tensoactivos. Este efecto fue más marcado ( $p < 0,05$ ) a medida que aumentó la polaridad del tensoactivo, debido a una mayor absorción de iones del medio. Por tanto, la incorporación del tensoactivo dio lugar a partículas de menor tamaño con mayor carga neta

superficial. Cuando se utilizan tensoactivos no-iónicos, como es este el caso, es normal que las partículas de aceite presenten una notable carga superficial. Este fenómeno ha sido atribuido a la preferencia que tienen los iones  $\text{OH}^-$  por ser absorbidos por los grupos hidrofílicos del tensoactivo (Hsu y Nacu, 2003; McClements, 2005). Estos tensoactivos no iónicos siguen una tendencia similar a las gotas sin recubrir (sin tensoactivo) pero tienden a presentar un mayor número de cargas negativas al mismo pH. Resultados similares han sido observados por Sánchez-González *et al.* (2009) con dispersiones de HPMC, aceite de árbol de té y Tween 85.

La incorporación de AO aumentó la carga neta superficial de las partículas sólo en las FFRs que contenían SMO como tensoactivo. En las demás FFRs disminuyó, posiblemente por una insuficiente cantidad de iones para la gran cantidad de micelas presentes en el medio.

Los bajos valores de potencial- $\zeta$  obtenidos (menores a 30 mV, en valor absoluto) no fueron suficientes para asegurar la estabilidad termodinámica del sistema.

Los valores de tensión superficial de las FFRs se detallan en la tabla II.3. Todas las FFRs presentaron valores de tensión superficial significativamente menores a los del solvente utilizado (agua pura, 78 mN/m). La hidroxipropil metilcelulosa es una celulosa modificada con sustituciones metil, que dan lugar a zonas hidrofóbicas a lo largo de la cadena de celulosa, mientras que los grupos hidroxipropil son hidrofílicos. Estos grupos hidrofílicos permiten al HPMC comportarse como tensoactivo (Sarkar y Walker, 1995; Ochoa-Machiste y Buckton, 1996) de ahí que, las dispersiones puras de HPMC presentaron valores entre  $48,2 \pm 0,5$  mN/m.

La incorporación de AO provocó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la tensión superficial ( $46,4 \pm 0,4$  mN/m) de la dispersión de hidroxipropil metilcelulosa (M). Por otro lado, para las formulaciones *composites*, la tensión

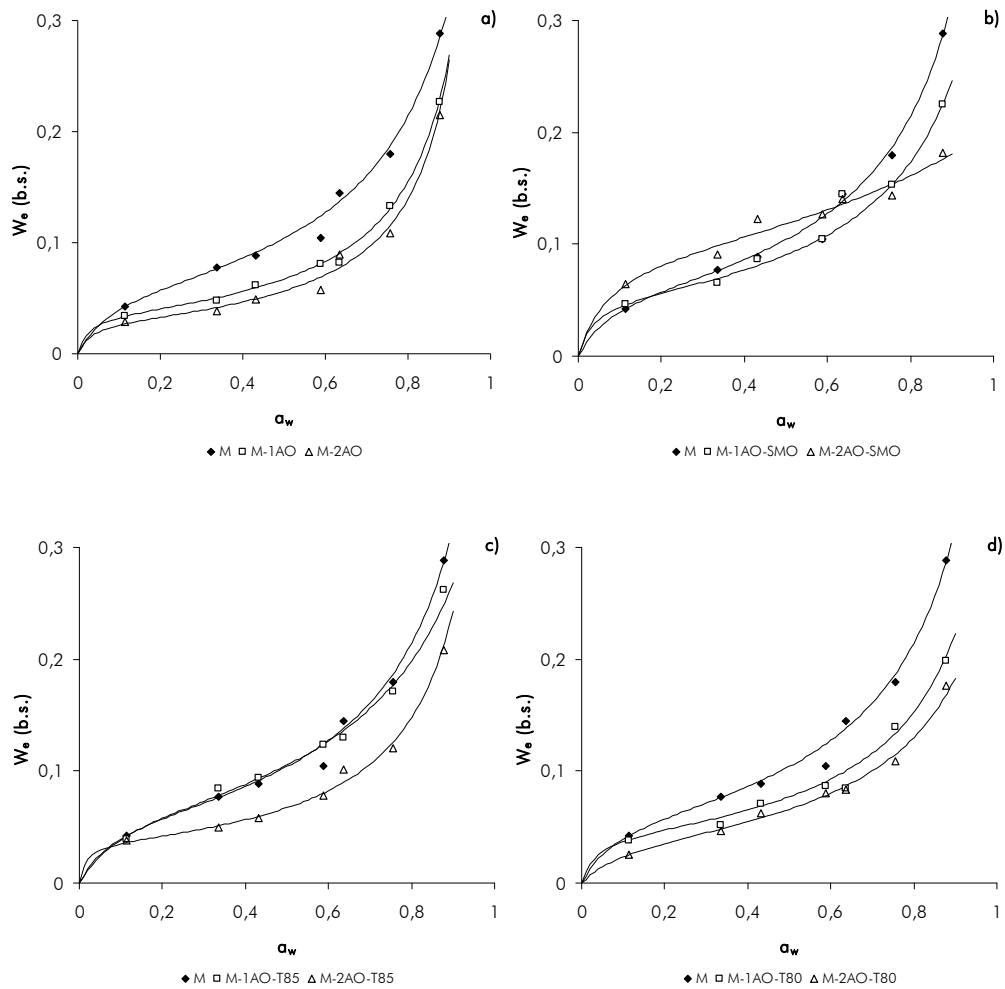
superficial no se vio afectada ( $p > 0,05$ ) por el aumento de la concentración de AO y muy poco por la presencia de tensoactivos, sin presentar ninguna tendencia clara. La concentración de AO utilizada (1%AO, 32mM) fue mucho mayor que la Concentración Micelar Crítica (CMC) del mismo (3,1mM) (Murakami *et al.*, 1986) y por tanto, concentraciones mayores a la CMC no afectan a los valores de tensión superficial de la dispersión. De igual modo, la pequeña cantidad de tensoactivo añadida, en comparación con la del AO, no produjo cambios en la misma.

### ***II.3.2.- Caracterización de los films***

#### ***II.3.2.1.- Isotermas de sorción de agua***

La figura II.2 muestra las isotermas de sorción de agua del film puro (M), con ácido oleico a diferentes concentraciones (M-1AO, M-2AO) y con mezclas de ácido oleico y diferentes tensoactivos (M-1AO-SMO, M-2AO-SMO, M-1AO-T85, M-2AO-T85, M-1AO-T80, M-2AO-T80) obtenidas a 5°C.

Como se observa en la figura II.2, las isotermas de sorción de todos los films presentan una forma sigmoïdal, típica de una isoterma de tipo II, con un aumento progresivo en la  $W_e$  hasta una  $a_w$  de 0,6, a partir de la cual se produce un aumento brusco en la  $W_e$  que puede asociarse a un cambio en el tipo de interacciones agua sustrato (tipo soluto-solvente predominantemente).



**Figura II.2.-** Isothermas de sorción de los films a 5°C. Datos experimentales (símbolos) y predichos con el modelo de GAB (líneas).

De todos los films, el que presentó una mayor afinidad por el agua fue el film puro (M) debido al gran número de grupos hidroxilos en su estructura que lo hace más higroscópico. Este comportamiento también ha sido observado por otros autores con films a base de HPMC (Villalobos *et al.*, 2006; Sebti *et al.*, 2007; Sánchez-González *et al.*, 2009). Para los polímeros sin carga, como es

el caso de la hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), normalmente el agua es adsorbida como agua no congelable a lo largo de todo el intervalo de humedades relativas (Berthold *et al.*, 1994), de modo que puede ser considerada como agua fuertemente ligada.

En general, todos los films mostraron unas isothermas menos abruptas que la obtenida para el film puro (M) en todo el rango de actividades de agua, mostrando la menor capacidad de ligar agua de los films *composites* a medida que aumentaba la concentración de AO.

Para modelizar la adsorción del agua de los films se utilizaron los modelos de BET y de GAB. Las constantes de la ecuación de GAB fueron obtenidas considerando todo el intervalo de actividad de agua y las de la ecuación de BET sólo hasta una actividad de agua de 0,59. Los valores obtenidos para las constantes de ambos modelos se muestran en la tabla II.4.

**Tabla II.4.-** Parámetros de BET y GAB estimados para las isothermas de sorción de los films, junto con el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del ajuste.

Film	BET			GAB			
	$W_0$	C	$r^2$	$W_0$	C	K	$r^2$
M	0,049	45,96	0,941	0,063	13,46	0,895	0,971
M-1OA	0,034	67,75	0,994	0,036	41,51	0,964	0,985
M-2OA	0,028	34,64	0,888	0,030	32,84	0,988	0,919
M-1OA-SMO	0,049	30,28	0,947	0,053	32,08	0,874	0,970
M-2OA-SMO	0,070	24,60	0,973	0,094	25,11	0,554	0,946
M-1OA-T85	0,051	58,93	0,968	0,069	11,56	0,833	0,935
M-2OA-T85	0,035	54,84	0,975	0,036	70,85	0,947	0,943
M-1OA-T80	0,040	30,66	0,971	0,044	32,90	0,892	0,979
M-2OA-T80	0,033	26,08	0,969	0,042	10,91	0,863	0,924

Para realizar el ajuste de los datos experimentales al modelo de GAB, se utilizó una ecuación polinómica de segundo orden. Debido al alto grado de correlación entre los tres parámetros del modelo de GAB (Schär y Rüegg, 1985) su significado físico no se tuvo en cuenta, pero sí que se utilizó para poder predecir las isothermas en todo el rango de actividades de agua considerado. El contenido de humedad de la monocapa ( $W_0$ ) del film puro estuvo alrededor de 4,9-6,3 g agua/100 g sólido seco (s.s.). Estos valores fueron del orden de los obtenidos para otros componentes hidrofílicos de los alimentos (entre 5,0-8,0 g agua/100 g sólido seco) (Fontan *et al.*, 1982).

En general, se observó un descenso tanto de la humedad de la monocapa ( $W_0$ ) como de la constante  $C$ , con la incorporación y el aumento de la proporción de ácido oleico. Para polímeros altamente hidrofílicos, las interacciones tienen lugar entre las moléculas de agua y los grupos hidroxílicos activos para la adsorción, donde cada grupo hidroxilo liga una molécula de agua (Berthold *et al.*, 1994). Por tanto, la menor capacidad de ligar agua de los films *composites* podría explicarse por la menor disponibilidad de puntos activos para la adsorción de agua en la matriz polimérica debido a la presencia de cadenas hidrofóbicas procedentes del ácido graso.

Los cambios en los valores de  $C$  parecen indicar que la energía requerida para ligar moléculas de agua en los puntos activos disminuye con el aumento del contenido en AO.

#### *II.3.2.2. - Permeabilidad al vapor de agua*

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de los films fue medida a un gradiente de humedad relativa de 59/100 y a una temperatura de 5°C, tratando de reproducir las posibles condiciones en las que se encontrarían los

films si fueran aplicados como recubrimiento para frutas durante el almacenamiento en refrigeración. El espesor medio de todos los films fue de  $50 \pm 7 \mu\text{m}$ .

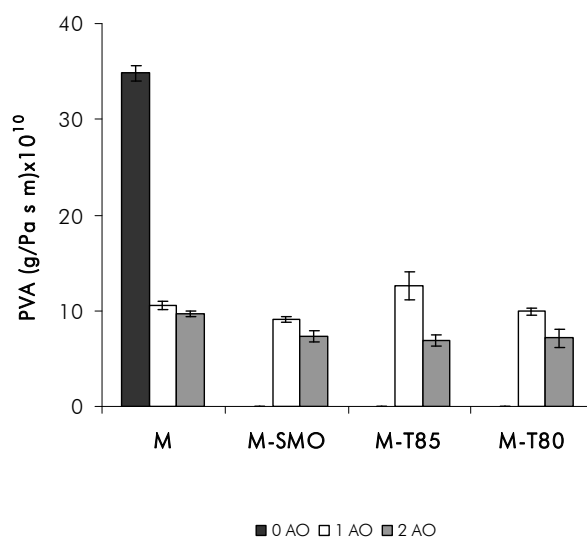
Para obtener los valores de PVA, los datos fueron corregidos según el modelo descrito por Gennadios *et al.* (1994). El film de HPMC (M) presentó una PVA de  $34,8 \times 10^{10} \pm 0,8 \text{ g/Pa s m}$ , del orden del encontrado por Villalobos *et al.* (2006) para dispersiones de HPMC con diferentes mezclas de tensoactivos. El análisis estadístico puso de manifiesto el efecto significativo ( $p < 0,05$ ) del AO, pero no el del tipo de tensoactivo o de la interacción doble ( $p > 0,05$ ).

La figura II.3 muestra la permeabilidad al vapor de agua de los diferentes films. Como cabría esperar, la PVA del film de HPMC (M) disminuyó notablemente ( $p < 0,05$ ) cuando se incorporó ácido oleico (entre un 70-72%) debido a la naturaleza apolar del AO que disminuye la afinidad de los films por el agua. Además, según varios autores (McHugh y Krochta, 1994d; Debeaufort y Voilley, 1995; Koelsch y Labuza, 1992; Sapru y Labuza, 1994), el aumento de la concentración de sustancias hidrofóbicas es un factor esencial para mejorar las propiedades barrera al vapor de agua de los films. En ese sentido, el aumento de la concentración de ácido oleico en los films mejoró la PVA (valores más bajos) debido al mayor número de gotas dispersas que aumentaron la tortuosidad de la matriz polimérica dificultando la movilidad del agua por la misma, ya que la distancia a recorrer por las moléculas es mayor (Pérez-Gago y Krochta, 2001).

Como se ha comentado anteriormente, a una concentración de AO dada, la incorporación de los diferentes tensoactivos dio lugar a variaciones en el tamaño medio de las gotas de las FFRs. McHugh y Krochta (1994d) observaron

una correlación positiva entre la PVA y el tamaño medio de las gotas (con un tamaño entre  $0,88-1,9 \mu\text{m}$ ) para una cantidad de lípido dada. Sin embargo, este efecto no fue observado en nuestro caso, seguramente debido al menor tamaño de partícula obtenido en las FFRs ( $\sim 0,3-0,9 \mu\text{m}$ ). Con tamaños de partículas mayores, los fenómenos de floculación y coagulación entre gotas de aceite se ven favorecidos en mayor medida durante el secado de los films, dando lugar a mayores diferencias en los valores de permeabilidad al vapor agua que los obtenidos en este trabajo, donde el tamaño inicial de la fase lipídica dispersa era mucho menor.

Por tanto, podemos concluir que, en el intervalo de tamaño considerado, los valores de PVA de los films *composites* fueron independientes del tamaño de las gotas de las FFRs.

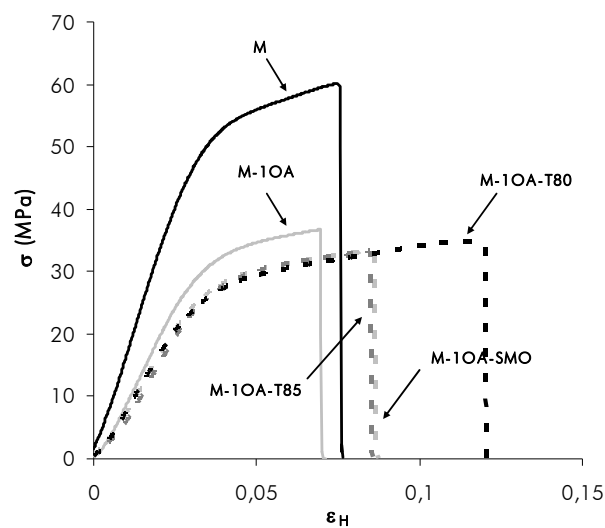


**Figura II.3.-** Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de los diferentes films a  $5^{\circ}\text{C}$  y 59% de humedad relativa.



### II.3.2.3.- Propiedades mecánicas

Las curvas típicas de esfuerzo ( $\sigma$ ) frente a deformación de Henky ( $\epsilon_H$ ) obtenida a partir de los datos fuerza-distancia del film de HPMC (M) y de los films con un 1% de AO se muestran, a modo de ejemplo en la figura II.4.



**Figura II.4.-** Curvas típicas esfuerzo *versus* deformación de Henky obtenida en los ensayos mecánicos para el film puro (M) y los films con un 1% de ácido oleico (AO).

Como se puede observar, la incorporación de AO cambió de forma notable la respuesta mecánica de los film de HPMC (M), dando lugar a films menos rígidos, menos firmes y en general, más extensibles.

La tabla II.5 presenta los resultados obtenidos para el módulo de elasticidad (ME), el esfuerzo en el momento de la rotura ( $\sigma_F$ ) y el porcentaje de elongación (E) de los films equilibrados a una humedad relativa del 59% y una temperatura

de 5°C, junto con los resultados del análisis estadístico (ANOVA simple), donde se observa que existieron diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

Para analizar qué efectos fueron significativos (concentración de AO, tipo de tensoactivo y/o sus interacciones), se realizó un análisis de la varianza multifactor. Los resultados mostraron que el único efecto significativo ( $p < 0,05$ ) fue la concentración de AO.

**Tabla II.5.-** Módulo de elasticidad (ME), esfuerzo de tracción en el momento de la rotura de los films ( $\sigma_F$ ) y porcentaje de elongación (E) de los films. Valores medios y desviaciones estándar.

Film	ME (MPa)	$\sigma_F$ (MPa)	E (%)
M	1673 (57) <sup>d</sup>	70 (13) <sup>e</sup>	12 (6) <sup>abc</sup>
M-1OA	1080 (28) <sup>c</sup>	39 (6) <sup>d</sup>	13 (7) <sup>abc</sup>
M-2OA	637 (44) <sup>a</sup>	28 (1) <sup>abc</sup>	16 (1) <sup>bc</sup>
M-1OA-SMO	903 (53) <sup>b</sup>	36 (7) <sup>cd</sup>	11 (5) <sup>abc</sup>
M-2OA-SMO	601 (111) <sup>a</sup>	25 (2) <sup>ab</sup>	14 (7) <sup>abc</sup>
M-1OA-T85	952 (40) <sup>b</sup>	36 (4) <sup>cd</sup>	10 (2) <sup>ab</sup>
M-2OA-T85	653 (54) <sup>a</sup>	23 (4) <sup>a</sup>	8 (3) <sup>a</sup>
M-1OA-T80	881 (40) <sup>b</sup>	33 (5) <sup>bcd</sup>	10 (3) <sup>a</sup>
M-2OA-T80	579 (42) <sup>a</sup>	29 (6) <sup>abc</sup>	17 (5) <sup>c</sup>

a-d: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre films para un nivel de confianza del 95%.

Como cabría esperar, la incorporación de AO supuso un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en los parámetros de carga (ME y  $\sigma_F$ ) y un aumento ( $p < 0,05$ ) en la flexibilidad del film (mayor E%). Este efecto se puede explicar por la presencia

de partículas dispersas que interrumpen la matriz continua del polímero, provocando una mayor fragilidad en la estructura del film (de Moura *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2009a). Al mismo tiempo, la adición de AO ejerció un efecto plastificante sobre los films, efecto también observado por otros autores (Debeaufort y Voilley, 1997; Baldwin *et al.*, 1997; Srinivasa *et al.*, 2007; Monedero *et al.*, 2009; Vargas *et al.* 2009a).

#### *II.3.2.4.- Propiedades ópticas*

Las propiedades ópticas más importantes de los films son la transparencia y el brillo debido al impacto directo que tienen sobre la apreciación del color y apariencia del producto recubierto (Hutchings, 1999).

En la tabla II.6 se presentan los valores de brillo a 85°, transmitancia interna (Ti) obtenida a una longitud de onda de 420 nm, coordenadas cromáticas ( $L^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h^*_{ab}$ ) e índice de blancura (IB) de los films, junto con los resultados del análisis estadístico (ANOVA simple), donde se observa que existieron algunas diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

Para analizar qué efectos fueron significativos (concentración de AO, tipo de tensoactivo y su interacción) se realizó un análisis de la varianza multifactor. Los resultados del análisis mostraron como significativo ( $p < 0,05$ ) la concentración de AO para las variables brillo y transparencia. Para el resto de las variables ( $L^*$ ,  $C^*_{ab}$ ,  $h^*_{ab}$ , IB), sólo la incorporación de AO fue significativa ( $p < 0,05$ ) pero no la concentración (1% o 2%) o el tipo de tensoactivo utilizado ni su interacción.

Como se puede observar en la tabla II.6, el film de HPMC (M) presentó los mayores valores de brillo, en concordancia con otros autores (Villalobos *et al.*, 2005; Vargas, 2008; Sánchez-González *et al.*, 2009).

**Tabla II.6.-** Valores de brillo a 85°, transmitancia interna (Ti), coordenadas cromáticas ( $L^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h^*_{ab}$ ) e índice de blancura (IB) de los films. Valores medios y desviaciones estándar.

Film	Brillo 85° (UB)	Ti	$L^*$	$C^*_{ab}$	$h^*_{ab}$	IB
M	27 (8) <sup>c</sup>	0,840 (0,003) <sup>e</sup>	83,9 (0,8) <sup>a</sup>	7,9 (0,4) <sup>b</sup>	90,50 (0,19) <sup>a</sup>	82,1 (0,8) <sup>a</sup>
M-1OA	9 (2) <sup>a</sup>	0,801 (0,008) <sup>c</sup>	86 (2) <sup>b</sup>	7,5 (0,6) <sup>b</sup>	95 (2) <sup>bc</sup>	84 (1) <sup>b</sup>
M-2OA	14 (5) <sup>ab</sup>	0,784 (0,006) <sup>ab</sup>	86,2 (0,9) <sup>b</sup>	7,9 (0,8) <sup>b</sup>	97 (1) <sup>e</sup>	84,1 (0,7) <sup>b</sup>
M-1OA-SMO	8,8 (0,4) <sup>a</sup>	0,805 (0,009) <sup>c</sup>	85,7 (0,5) <sup>b</sup>	7,3 (0,3) <sup>ab</sup>	95,3 (0,7) <sup>cd</sup>	83,9 (0,4) <sup>b</sup>
M-2OA-SMO	15 (4) <sup>ab</sup>	0,790 (0,005) <sup>b</sup>	86,6 (0,8) <sup>b</sup>	7,8 (0,3) <sup>b</sup>	96,0 (0,9) <sup>de</sup>	84,5 (0,7) <sup>b</sup>
M-1OA-T85	11 (4) <sup>a</sup>	0,804 (0,012) <sup>c</sup>	86,0 (0,6) <sup>b</sup>	7 (1) <sup>b</sup>	95 (3) <sup>b</sup>	84,2 (0,6) <sup>b</sup>
M-2OA-T85	19 (6) <sup>b</sup>	0,784 (0,002) <sup>ab</sup>	86,0 (0,6) <sup>b</sup>	8 (1) <sup>b</sup>	96 (2) <sup>cde</sup>	83,9 (0,9) <sup>b</sup>
M-1OA-T80	12,9 (0,4) <sup>ab</sup>	0,816 (0,012) <sup>d</sup>	86 (1) <sup>b</sup>	6,5 (0,6) <sup>a</sup>	97 (2) <sup>cde</sup>	84 (1) <sup>b</sup>
M-2OA-T80	19 (1) <sup>b</sup>	0,777 (0,003) <sup>a</sup>	85,6 (0,8) <sup>b</sup>	8 (1) <sup>b</sup>	95 (2) <sup>de</sup>	83 (1) <sup>b</sup>

a-d: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre films para un nivel de confianza del 95%.

El brillo del film puro (M) disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) cuando se le incorporó AO, debido a la aparición de una nueva fase dispersa en el medio,

que dio lugar a una superficie menos homogénea durante el secado del film. El brillo de los films está relacionado con la morfología superficial desarrollada durante el secado y en general, cuanto mayor es la rugosidad de los films menor es el brillo (Ward y Nussinovich, 1996). Vargas *et al.* (2009a) encontraron resultados similares en films a base de quitosano y AO.

Sin embargo, a medida que aumentó la concentración de AO el brillo de los films aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ), seguramente debido a una disminución de la rugosidad superficial y un aumento en la reflexión especular en la interfase aire-film, ya que el AO puede rellenar los pequeños huecos superficiales generados durante la formación del film.

No se encontró ningún tipo de correlación entre el brillo y el tamaño de partícula de la dispersión, en el intervalo de tamaño considerado, tal y como ha sido observado por otros autores (Trezza y Krochta, 2000b) en dispersiones con ceras. El estado físico del lípido empleado (en nuestro caso, líquido a temperatura ambiente) podría estar condicionando los resultados.

La incorporación de tensoactivos no provocó cambios significativos ( $p > 0,05$ ) en el brillo.

La transparencia de los films, evaluada a través de la transmitancia interna ( $T_i$ ), aumenta cuando  $T_i$  aumenta ya que el film presenta una menor opacidad. De todos los films, el que presentó una mayor transparencia ( $p < 0,05$ ) fue el film de HPMC (M). La incorporación de AO provocó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de la transparencia de los films puros debido a una mayor dispersión de la luz provocada por la presencia de la fase dispersa con distinto índice de refracción, tal y como observaron otros autores (Fabra *et al.*, 2010). Este efecto fue mayor al aumentar la concentración de AO. Sin embargo, el análisis estadístico mostró que ni el tipo de tensoactivo ni el contenido en AO afectó ( $p > 0,05$ ) a la transparencia de los films, seguramente debido a las pocas diferencias observadas en el tamaño de partícula de la fase dispersa. Así, la

estructura interna de los films desarrollada durante el secado debe ser muy similar entre los diferentes films, dando lugar a escasas diferencias en los valores de la transmitancia interna.

Como se puede observar en la tabla II.6, el tono, el índice de blancura y la luminosidad o claridad aumentaron ligeramente ( $p < 0,05$ ) con la aparición de la nueva fase lipídica dispersa. El aumento de la concentración de AO o el tipo de tensoactivo no dio lugar a cambios significativos. El croma no presentó variaciones significativas por efecto de la incorporación de AO ni del tipo de tensoactivo.

#### II.4.- CONCLUSIONES

Las propiedades fisicoquímicas de las FFRs se vieron afectadas por la incorporación de AO, su concentración y el tipo de tensoactivo utilizado, dando lugar a dispersiones con diferentes grados de estabilidad en términos de tamaño y carga de partícula, tensión superficial y viscosidad. Los resultados apuntaron a la presencia de dos tipos de partículas en el sistema: micelas de AO y micelas de AO-tensoactivo, ya que en general, la existencia de interacciones entre un polímero y un tensoactivo no iónico no se dan o son muy escasas.

Teniendo en cuenta los parámetros analizados, las dispersiones más estables fueron las que contenían como tensoactivo T85 (menor tamaño de partícula, alta carga y viscosidad).

De igual forma, las propiedades de los films secos de HPMC también se vieron mayormente afectadas por la incorporación de AO y la concentración empleada, más que por el tipo de tensoactivo utilizado.

Los films *composites* mostraron una menor capacidad de ligar agua, fueron menos transparentes y brillantes y mecánicamente menos rígidos, menos firmes y en general más extensibles.

Por otro lado, la PVA disminuyó a medida que aumentó la concentración de AO y fue independiente del tamaño de partícula desarrollado en los films, en el intervalo de tamaño considerado.

El aumento de la concentración de AO no afectó a la transparencia, seguramente debido a la similitud en la estructura interna de los films desarrollada durante el secado que dio lugar a escasas diferencias en los valores de la transmitancia interna.

Por otro lado, el brillo de los films fue mayor cuando se utilizó la mayor proporción de AO, probablemente por la disminución de la rugosidad superficial de los mismos al rellenar el AO los pequeños huecos superficiales generados durante la formación del film.

## CAPÍTULO III

---

RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE  
HPMC Y PRÓPOLIS. APLICACIÓN A UVA.





### III.1.- INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de la aplicación de films comestibles es reducir las pérdidas de humedad y daños mecánicos, mejorar la apariencia de los productos y actuar como matriz para incorporar diferentes ingredientes alimentarios, tales como colorantes, aromas o nutrientes (Franssen y Krochta, 2003). Su funcionalidad puede ser ampliada con la incorporación de antimicrobianos que protejan los alimentos de la alteración microbiana, aumentando así su vida útil y mejorando su seguridad (Franssen y Krochta, 2003; Cagri *et al.*, 2004; Oussalah *et al.*, 2006; Rojas-Graü *et al.*, 2007a). La tendencia actual de los mercados está orientada hacia el uso de compuestos naturales (Beuchat y Golden, 1989; Sánchez-González *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2009) y por ello, la búsqueda de nuevos antimicrobianos naturales está recibiendo cada vez mayor atención. Entre estos compuestos, los más ampliamente estudiados han sido diversos tipos de enzimas, nisina, ácidos orgánicos y aceites esenciales (AEs), entre otros (Padgett *et al.*, 1998; Cagri *et al.*, 2004; Eswaranandam *et al.*, 2004; Pranoto *et al.*, 2005; Oussalah *et al.*, 2006; Rojas-Graü *et al.*, 2006). El própolis ha sido aplicado en medicina y cosméticos, y más recientemente, a productos alimentarios, debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (Ghisalberti *et al.*, 1979; Tosi *et al.*, 1996; Burdock, 1998).

El própolis es una resina cérea, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de las yemas, brotes y peciolos de las hojas de diferentes vegetales. En general, contiene resinas (50%), compuestas de flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, ceras (30%), aceites esenciales (10%), polen (5%) y varios compuestos orgánicos (5%) como Fe y Zn, vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> y B<sub>6</sub>), ácido benzoico, ácidos grasos, ésteres, cetonas, lactonas, quinonas, esteroides, azúcares y también, pigmentos

naturales como clorofila y carotenoides (Farré *et al.*, 2004; Juliano *et al.*, 2007; Cavaco *et al.*, 2008). Su color varía del amarillo verdoso al marrón oscuro, dependiendo de su origen y antigüedad (Burdock, 1998).

Sus propiedades antibacterianas y antifúngicas han sido ampliamente investigadas y parte de su actividad antimicrobiana se debe específicamente a la fracción de flavonoides. Se ha comprobado que el própolis y sus extractos (acuosos o etanólicos) poseen actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *Salmonella*, *P. digitatum* (Soylu *et al.*, 2008) y otros hongos como el *A. niger*, *Candida albicans* y *Botrytis cinerea* (Mirzoeva *et al.*, 1997; Ozcan, 1999; Scazzocchio *et al.*, 2006; Kalogeropoulos *et al.*, 2009), entre otros. Además, el própolis es una fuente natural de antioxidantes y por ejemplo, ha demostrado proteger a aceites y a lipoproteínas séricas de la oxidación (Krell, 1996; Isla *et al.*, 2001).

En la actualidad, existen muy pocos estudios sobre la incorporación de própolis a recubrimientos y si existen, no están aplicados a alimentos. Así, Juliano *et al.* (2007) caracterizaron films a base de própolis para uso bucal. Basándose en los resultados obtenidos, los autores recomendaron la aplicación de estos films no sólo en el sector farmacéutico, sino también en la agricultura y la industria alimentaria. Por otra parte, Budija *et al.* (2008) estudiaron la aplicación de films a base de extractos etanólicos como componentes adicionales en el acabado de las maderas debido a su composición rica en resinas, ceras y aceites.

En la industria alimentaria, sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas pueden ofrecer una gran variedad de aplicaciones, con la ventaja de que, además, su ingesta puede ser beneficiosa para la salud humana (Farré *et al.*, 2004). En este sentido, la incorporación de própolis a recubrimientos comestibles podría resultar de interés. Además, debido a que el própolis posee un color, olor y sabor fuerte, lo cual provoca que no pueda administrarse en su

forma cruda, hace necesario incorporarlo a films sin color, olor y sabor tales como los de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC). De esta manera, mejorarían estas propiedades y además, su coste final sería menor al incorporarlo en los films en pequeñas cantidades. Por otra parte, la formulación de films a base de própolis podría mejorar algunos aspectos de calidad de frutas y hortalizas al aplicarlos como recubrimiento comestible. En este sentido, su aplicación a uvas de mesa, que presentan algunos problemas durante la postcosecha tales como, la pérdida de peso, de firmeza, los cambios de color y los ataques fúngicos causados principalmente por *B. cinerea*, podría ser beneficioso.

El *objetivo* de este capítulo consiste en analizar el efecto de la incorporación de un extracto etanólico de própolis (EEP) en dispersiones de HPMC en términos de sus propiedades fisicoquímicas y de estabilidad y caracterizar los films secos resultantes, de acuerdo a su permeabilidad al vapor de agua, microestructura, propiedades mecánicas, ópticas y microbiológicas. Además, se pretende analizar el efecto de la aplicación de estos recubrimientos a uvas de la variedad Moscatel sobre la calidad física, microbiológica y sensorial de las mismas.

## III.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

### *III.2.1.- Diseño y preparación de las formulaciones formadoras de recubrimiento*

Las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) se prepararon utilizando como matriz soporte hidroxipropil metilcelulosa (Methocel® E-15) de bajo peso molecular y de viscosidad 15 cPoise al 2% a 20°C suministrado por la empresa The Dow Chemical Company (Midlan, USA) y un EEP. El EEP se obtuvo a partir de 10 g de própolis crudo (Bonamel Organic S.L., Alquería de Aznar, España) y

100 mL de etanol 96°. La mezcla se maceró en un lugar oscuro durante 7 días a temperatura ambiente aplicándole una agitación manual cada día. Transcurrido dicho tiempo, el EEP se filtró a vacío con papel de filtro (Whatman n°1).

La metodología de preparación de las FFRs fue estandarizada y consistió en dispersar y disolver 5% (p/p) de hidroxipropil metilcelulosa (M) en agua bidestilada a 80°C durante 2 horas y manteniendo una agitación constante. A continuación, se le añadió el EEP hasta obtener una concentración final de 0%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1% y 1,5% (v/p) tal y como se muestra en la tabla III.1. Así, la fracción másica del EEP en los films secos fue de 0,024, 0,048, 0,091, 0,167 y 0,231 g de extracto de própolis seco/g sólido seco, respectivamente. Todas las FFRs se homogeneizaron a temperatura ambiente en un equipo ultraturrax (DI25 Yellow Line, IKA®, Alemania) a 13500 rpm durante 4 minutos y posteriormente fueron desgasificadas mediante un desecador a vacío.

**Tabla III.1.-** Composición de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs).

FFR	M (% p/p)	EEP (% v/p)
M	5	0
M-0,125P	5	0,125
M-0,25P	5	0,25
M-0,5P	5	0,5
M-1P	5	1
M-1,5P	5	1,5

### *III.2.2.- Propiedades fisicoquímicas de las FFRs*

#### *III.2.2.1.- Densidad y pH*

La densidad y el pH de las FFRs fueron determinadas por triplicado a 25°C mediante un densímetro (DA-110M, Mettler Toledo, España) y un pH-méetro (GLP21+, Crison Instruments, España), respectivamente.

#### *III.2.2.2.- Tamaño de partícula*

El tamaño de partícula de las FFRs se determinó por triplicado a 25°C usando un difractómetro láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Reino Unido). Las muestras fueron dispersadas en agua bidestilada a 2000 rpm hasta que se obtuvo un nivel de obscuración del 10-12%. Para aplicar la teoría Mie, se consideró un índice de refracción de 1,50 y una absorción de 0,01 para las partículas dispersas. El tamaño medio de partícula fue caracterizado a partir de los parámetros  $d_{32}$  y  $d_{43}$  tal y como se explica en la introducción.

#### *III.2.2.3.- Potencial- $\zeta$*

El potencial- $\zeta$  de las FFRs fue obtenido a partir de la determinación de la movilidad electroforética de las partículas realizada en un equipo Zetasizer (Nano-Z, Malvern Instruments, Reino Unido). Para transformar las medidas de movilidad electroforética en valores de potencial- $\zeta$ , se utilizó el modelo matemático de Smoluchowsky. Las FFRs fueron medidas a una concentración de extracto etanólico de própolis de 0,02%, diluyendo cada una de las formulaciones con agua bidestilada antes de cada análisis.

#### *III.2.2.4.- Caracterización reológica*

El comportamiento reológico de las FFRs se analizó, por triplicado a 25°C, usando un reómetro rotatorio con un sensor del tipo Z34DIN Ti (HAAKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Alemania). Se midió el esfuerzo cortante ( $\sigma$ ) en función del gradiente de velocidad ( $\dot{\gamma}$ ) desde 0 a 512 s<sup>-1</sup> de la siguiente manera: 5 minutos hasta alcanzar el gradiente de velocidad máximo y 5 minutos hasta descender a 0. Las curvas de flujo obtenidas se ajustaron a La Ley de la Potencia para determinar el índice de comportamiento al flujo (n) y el índice de consistencia (K) de las FFRs. La viscosidad aparente fue calculada a 100 s<sup>-1</sup>.

#### *III.2.3.- Obtención de los films*

Las formulaciones formadoras de recubrimiento fueron vertidas en placas niveladas de politetrafluoretileno (PTFE) de 15 cm de diámetro, y se secaron a temperatura ambiente durante 48 horas. El espesor de los films se controló siguiendo el procedimiento descrito por Park y Zhao (2004) y ajustando una misma densidad de sólidos para todos los films de 56 g/m<sup>2</sup> ya que el espesor de los films hidrofílicos es un factor a tener en cuenta para su caracterización (McHugh *et al.*, 1993; Hagenmaier y Shaw, 1990). El espesor de los films fue medido por quintuplicado utilizando un micrómetro digital (Palmer-Comecta, España,  $\pm 0,001$  mm).

Los films secos fueron equilibrados a dos temperaturas en desecadores con disoluciones saturadas de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o NaCl) para conseguir cuatro condiciones de equilibrado: 5°C-59%, 25°C-53%, 5°C-76% y 25°C-75%. La humedad de los films fue determinada tras el equilibrado. La temperatura de 5°C fue elegida

para simular las condiciones de equilibrado de un producto recubierto refrigerado y la de 25°C, para simular las condiciones ambientales.

### ***III.2.4.- Caracterización de los films***

#### *III.2.4.1.- Permeabilidad al vapor de agua*

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) fue medida según una modificación de la técnica gravimétrica ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993), usando copas de aluminio (fabricadas por Monje Hnos. S.L., Valencia, España) y considerando la corrección al método sugerida por Gennadios *et al.* (1994). La metodología llevada a cabo así como la obtención de los resultados fueron los mismos que se explican en la introducción.

#### *III.2.4.2.- Análisis microestructural*

El análisis microestructural de la superficie de los films se realizó utilizando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5410, Oxford Instruments, Reino Unido) dotado de un sistema de observación de muestras criofijadas (CT1500C) del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Para ello, se prepararon muestras de 5 x 1 mm y se colocaron sobre portaobjetos de cobre. Las muestras fueron metalizadas con oro y observadas a 20 kV.

#### *III.2.4.3.- Propiedades mecánicas*

Los ensayos mecánicos se realizaron mediante una prensa mecánica (TA-XT-plus, Stable Micro Systems, Reino Unido), con una célula de carga de 50 kg y



pinzas de tensión (A/TG). Las muestras (25,4 x 100 mm) fueron colocadas dejando una separación entre las pinzas de 50 mm y el ensayo se realizó a una velocidad de 50 mm/min (ASTM, 2001). El esfuerzo de fractura ( $\sigma_F$ ), el porcentaje de deformación en el momento de la rotura (%E) así como el módulo de elasticidad (ME) de los films fueron evaluados por quintuplicado. Los parámetros mecánicos obtenidos fueron el esfuerzo en el punto de fractura ( $\sigma_F$ ), el porcentaje de elongación (%E) y el módulo de elasticidad (ME), calculados según las ecuaciones 12 y 13 citadas en la introducción.

#### *III.2.4.4.- Propiedades ópticas*

##### *Translucidez y color*

Las determinaciones de transparencia y color se realizaron por quintuplicado a través del espectro de reflexión de las muestras mediante un espectrocolorímetro (CM-3600d, Minolta Co., Japón) con un área de medida de 10 mm. Las medidas se efectuaron en el centro de cada film, sobre un fondo blanco y negro.

La transparencia (evaluada a través de la transmitancia interna,  $T_i$ ), las coordenadas de color y el índice de blancura (IB) fueron determinadas aplicando la teoría de Kubelka-Munk (Hutchings, 1999) según las ecuaciones 16-26 citadas en la introducción.

##### *Brillo*

El brillo de las muestras fue determinado por quintuplicado usando un brillómetro plano (Multi-Gloss 268, Minolta Co., Japón) a 20 y 60° de ángulo de incidencia perpendicularmente a la superficie del film, de acuerdo con el

estándar D523 de la ASTM (ASTM, 1999). Para llevar a cabo las determinaciones, los films fueron colocados sobre una cartulina negra mate. Los resultados fueron expresados en unidades de brillo, relativas a una superficie estándar negra altamente pulida con un valor de brillo cercano a 100.

#### *III.2.4.5.- Análisis microbiológico*

Para el análisis microbiológico se utilizaron 2 cepas: *Penicillium italicum* (CECT 2294) y *A. niger* (CECT 2574), suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipos (CECT, Valencia, España). Estas cepas se almacenaron a -25°C en Caldo Patata Dextrosa (PDB, Scharlab, España) enriquecido con un 30% de glicerol (Panreac, España). A continuación, se inocularon los hongos en Patata Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a 25°C. Las esporas fueron resuspendidas en agua fisiológica con Tween 80 (0,1%). El recuento de las esporas se realizó mediante una placa Thoma y se ajustó el número de esporas a 10<sup>5</sup>/mL. A continuación, se vertieron alícuotas de PDA (20 g) en placas Petri y una vez el medio se solidificó, se inoculó en la superficie 0,1 mL de la dilución de esporas preparada anteriormente y se colocó sobre ella el film correspondiente, del mismo tamaño que la placa (adaptado de Kristo *et al.*, 2008). Como control se utilizaron placas Petri con PDA inoculadas pero sin film. Las placas se sellaron con parafilm para evitar la deshidratación y se almacenaron en una estufa bacteriológica (Incudigit, J.P. Selecta, España) a 20°C durante 5 días. El recuento microbiológico de las placas Petri se realizó inmediatamente después de la inoculación de las esporas y al final del período del almacenamiento. Para realizar dicho recuento, el agar fue introducido dentro de unas bolsas de plástico estériles junto con 100 mL de agua de triptona fosfato tamponada (Scharlab, España) y se homogeneizó durante 2 minutos en

un homogeneizador (Bag Mixer 400, InterScience, Francia). A continuación, se realizaron una serie de diluciones decimales y se sembraron en PDA. Las placas fueron incubadas durante 5 días a 25°C. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### *III.2.5.- Aplicación a uva (var. Moscatel)*

La materia prima utilizada fue uva de la variedad Moscatel procedente de Pinos (Alicante, España), adquirida el mismo día en que fue procesada. La uva fue seleccionada en base a un color y tamaño uniforme, ausencia de daños mecánicos y/o signos visibles de ataque fúngico. Antes de aplicar las FFRs la uva fue lavada con una disolución de hipoclorito sódico (10 mL/L) y secada a temperatura ambiente durante unas horas.

La aplicación de la uva fue realizada con las siguientes FFRs: M, M-0,5P, M-1P y M-1,5P, las cuales contenían 0%, 0,5%, 1% y 1,5% de EEP, respectivamente. Los racimos de uva (12-15 granos de uva) se sumergieron en las FFRs durante 1 minuto y se secaron a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Una vez seco el film, los racimos se almacenaron en una cámara a temperatura y humedad relativa (HR) controladas (EC-1400-HR, Radiber S.A., España) a 1-2°C y 85-90% HR a diferentes tiempos (3, 5, 8, 12 y 22 días), más 2 días a temperatura ambiente para simular la operación de mercado.

#### *III.2.5.1.- Pérdida de peso*

La pérdida de peso se determinó por triplicado pesando los racimos de uva antes y después de la aplicación y a cada tiempo de almacenamiento. Los resultados se expresaron en porcentaje respecto al peso inicial de los racimos.

### *III.2.5.2.- Sólidos solubles totales y pH*

Para la determinación de los sólidos solubles (°Brix) y pH, cada una de las muestras se trituró con un ultraturrax (DI25 Yellow Line, IKA®, Alemania) durante 1 minuto a 13500 rpm. Los sólidos solubles totales se determinaron mediante un refractómetro (3T, ATAGO Co. Ltd., Japón) termostatado a 20°C. La medida del pH se realizó con un pH-métro (GLP21+, Crison Instruments, España). Ambas determinaciones se realizaron por triplicado.

### *III.2.5.3.- Fenoles totales*

Los fenoles totales se determinaron por triplicado de acuerdo con el método descrito por Tomás-Barberán *et al.* (2001). 35 g de uva (sin pepitas) se homogeneizaron en un ultraturrax (DI25 Yellow Line, IKA®, Alemania) a 9500 rpm durante 5 minutos junto con 40 mL de metanol, 10 mL de HCl 6N y 4,2 mg de NaF para inactivar la polifenoloxidasas y prevenir la degradación fenólica. A continuación, el homogeneizado se centrifugó en una centrífuga (Medifriger-BL, J.P.Selecta, España) a 10000 rpm, 4°C y 10 minutos para obtener un sobrenadante. Los fenoles totales se cuantificaron usando el método descrito por Selvendran y Ryden, (1990) y Benzie y Strain, (1999) basado en el método de Folin-Ciocalteu. Este método consiste en mezclar 250 µL del sobrenadante en un aforado de 25 mL junto con 15 mL de agua Mili-Q y 1,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Alemania) y dejar reposar durante 8 minutos. A continuación, se añaden 3,75 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5%), se enrasa con agua Mili-Q y el aforado se almacena en un lugar oscuro a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido dicho período de tiempo, se mide la absorbancia a 765 nm con un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido). El contenido total fue expresado

como mg de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemania) por gramo de muestra usando como recta de calibrado la obtenida por el rango de 0-800 mg de ácido gálico/mL.

#### *III.2.5.4.- Actividad antioxidante*

La actividad antioxidante se determinó por triplicado de acuerdo al método descrito por Sánchez-Moreno *et al.*, (2003). 10 g de uva (sin pepita) se homogeneizaron en un ultraturrax (DI25 Yellow Line, IKA®, Alemania) a 9500 rpm durante 5 minutos junto con 10 mL de metanol (Panreac, España). El homogeneizado se centrifugó en una centrífuga (Medifriger-BL, J.P.Selecta, España) a 10000 rpm, 4°C y 10 minutos para obtener un sobrenadante. De ese sobrenadante, se pipeteó 0,1 mL y se introdujo en una cubeta a la que se le añadió 3,9 mL de la solución de DPPH (0,03 g de DPPH/L metanol; DPPH, 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil, suministrado por Sigma-Aldrich (Alemania). La absorbancia fue medida a 515 nm usando un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) a intervalos de 10 segundos hasta que la reacción se completó.

#### *III.2.5.5.- Propiedades mecánicas*

Las propiedades mecánicas se determinaron en los granos de uva mediante una prensa mecánica (TA-XT-plus, Stable Micro Systems, Reino Unido) con una célula de carga de 50 kg y una sonda cilíndrica de 75 mm de diámetro. El grano de uva, con rabito, se colocó longitudinalmente y se comprimió a una velocidad de 2 mm/s hasta una deformación máxima del 50%. Como parámetros mecánicos, se utilizó la fuerza y la distancia en el momento de la

ruptura de la muestra. El ensayo se realizó sobre quince granos de uva para cada tiempo, tanto en uvas recubiertas como no recubiertas.

#### *III.2.5.6.- Propiedades ópticas*

El color de los granos de uva se midió por reflexión mediante un espectrocolorímetro (CM-3600d, Minolta Co., Japón), previa calibración, con una ventana de medición de 10mm, utilizando como sistema de referencia el iluminante D65/observador 10°. Las medidas se efectuaron en una zona previamente delimitada sobre quince granos de uva para cada uno de los distintos tratamientos y tiempos de almacenamiento.

Las coordenadas de color y el índice de blancura fueron determinadas aplicando la teoría de Kubelka-Munk (Hutchings, 1999) según las ecuaciones 21-26 citadas en la introducción.

#### *III.2.5.7.- Tasa respiratoria*

La tasa respiratoria de las muestras se determinó utilizando un sistema cerrado (Castelló *et al.*, 2006). Para cada tiempo de almacenamiento se colocó un racimo de uva de unos 150-200 g en un frasco de vidrio hermético de 0,655L con un septum en la tapa para efectuar la medida de concentración de gases en el espacio de cabeza a diferentes tiempos. La medida de la concentración de gases se efectuó a temperatura ambiente cada 30 minutos por medio de una aguja conectada a un analizador de gases (CheckMate 9900, PBI Dansensor, Dinamarca). Este analizador de gases está equipado con un sensor electroquímico para medir la concentración de O<sub>2</sub> y un miniespectrofotómetro de infrarrojos para detectar el contenido en CO<sub>2</sub> (Rocculi *et al.*, 2005). Se efectuaron tres repeticiones para cada uno de los tratamientos.

La tasa y el coeficiente respiratorio de las muestras se determinaron según las ecuaciones I.3-I.5 citadas en el capítulo I (aparatado I.2.5.5).

#### *III.2.5.8.- Análisis microbiológico*

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras se evaluó periódicamente a lo largo del tiempo de almacenamiento. Para ello, se homogeneizaron 10 g de uva (sin pepita) con 90 mL de agua de triptona fosfato tamponada (Scharlab, Spain) en un homogeneizador (Bag Mixer 400, InterScience, Francia) durante 2 minutos. A continuación, se realizaron una serie de diluciones decimales y se sembraron en profundidad con Agar de Recuento en Placa (PCA, Scharlab, España) para determinar el número de aerobios mesófilos según la International Organization for Standardization (ISO) (ISO 4833, 2003) y con Agar Cloramfenicol Glucosado (CGA, Scharlab, España) para obtener el de mohos y levaduras (ISO 7954, 1987). Las placas Petri con PCA se incubaron a 30°C durante 48 horas y las de CGA a 25°C durante cinco días. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

#### *III.2.5.9.- Evaluación organoléptica*

El análisis organoléptico de los granos de uva recubiertos y no recubiertos fue evaluado mediante el *Test de Diferenciación del Control* (Anexo VII), apropiado para evaluar muestras con cierta variabilidad asociada a la propia materia prima (Aust *et al.*, 1985), como es nuestro caso. Su objetivo consiste en determinar si existen diferencias entre todas las muestras y una muestra control, señalando el grado de diferencia: ninguna diferencia, una ligera diferencia, una pequeña diferencia, diferente, bastante diferente, una gran diferencia y muy diferente (Meilgaard *et al.*, 1991). Además, también se puede marcar con

un + o un – si las muestras difieren por tener más o menos brillo, olor, textura y sabor. Para la realización de este test se recomienda entre 20-50 catadores (Thompson, 1999).

Durante la prueba se utilizó como muestra control el tratamiento sin recubrir y se comparó con 5 tratamientos, los cuales incluían de nuevo la misma muestra control. La comparación del tratamiento control consigo mismo permitió estimar la variabilidad de la medida. Para la corrección de la prueba la escala se transformó en valores 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 para cada graduación de diferencia.

Para la realización de la prueba, las muestras se presentaron en vasitos, cada uno de ellos con 2 granos a excepción de la muestra a comparar en los que se pusieron 6 granos. Las muestras se ordenaron de manera aleatoria y se codificaron con un número de 3 dígitos determinado al azar. El panel de catadores estuvo formado por personal y estudiantes de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) que en todo momento siguieron las normas dadas para la evaluación sensorial (Anexo III).

Todos los análisis se realizaron bajo las mismas condiciones ambientales de temperatura y luminosidad en la sala de catas del Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD) de la UPV, la cual cumple con todos los requisitos exigidos por la norma UNE 87-004-79 (1997). Antes de empezar la sesión se les proporcionó a los catadores la información necesaria sobre la fruta para que la evaluaran correctamente. También se les comentó el tipo de prueba, los atributos a valorar y la escala a utilizar.



### ***III.2.6.- Análisis estadístico***

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significación del 95% y utilizando para las comparaciones múltiples el test Least Significant Difference (LSD). Los cálculos se realizaron con el Software Statgraphics Plus® 5.1.

En la prueba sensorial, para analizar la prueba de diferenciación del control se realizó un ANOVA para cada uno de los atributos valorados y para aquellos tratamientos en los que existieron diferencias se realizó el test de Dunnett (O'Mahony, 1986; Anexo VIII) para determinar qué tratamientos diferían del control con un nivel de significación del 95%.

## **III.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***III.3.1.- Caracterización de las formulaciones formadoras de recubrimiento***

#### ***III.3.1.1.- Densidad, pH, tamaño de partícula y potencial- $\zeta$***

En la tabla III.2 se muestran las medias y desviaciones estándar de la densidad, pH, tamaño de partícula ( $d_{43}$  y  $d_{32}$ ) y potencial- $\zeta$  de las FFRs, junto con los resultados del análisis estadístico (ANOVA), donde se observa que existieron diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

Como se puede observar, la incorporación de EEP provocó una ligera disminución en la densidad y pH de las FFRs. El descenso del pH es debido a la disociación en la disolución acuosa de algunos compuestos del própolis de naturaleza ácida.

**Tabla III.2.-** Densidad, pH, tamaño de partícula ( $d_{43}$  y  $d_{32}$ ) y potencial- $\zeta$  de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs). Valores medios y desviaciones estándar.

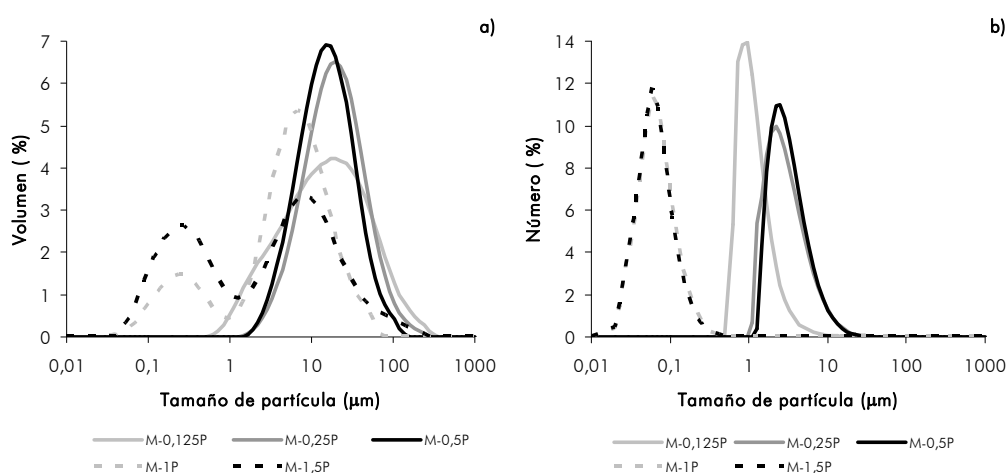
FFR	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	pH	$d_{43}$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{32}$ ( $\mu\text{m}$ )	Potencial- $\zeta$ (mV)
M	1011,1 (0,6) <sup>d</sup>	6,47	-	-	-
M-0,125P	1011,0 (0,5) <sup>d</sup>	6,33	25 (1) <sup>b</sup>	6,46 (0,07) <sup>a</sup>	-1,2 (0,4) <sup>c</sup>
M-0,25P	1008,2 (0,6) <sup>c</sup>	5,10	27 (2) <sup>c</sup>	11,6 (0,6) <sup>c</sup>	-1,35 (0,19) <sup>c</sup>
M-0,5P	1007,6 (0,5) <sup>c</sup>	4,59	19,4 (0,9) <sup>a</sup>	10,26 (0,19) <sup>b</sup>	-1,7 (0,5) <sup>bc</sup>
M-1P	996,0 (0,4) <sup>b</sup>	4,39	9 (1) <sup>*</sup>	0,81 (0,05) <sup>*</sup>	-2,16 (0,23) <sup>b</sup>
M-1,5P	993,5 (0,3) <sup>a</sup>	4,32	11 (1) <sup>*</sup>	0,44 (0,02) <sup>*</sup>	-3,0 (0,9) <sup>a</sup>

a-d: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre FFRs para un nivel de confianza del 95%.

\*Estos valores no son representativos puesto que las muestras mostraron una distribución bimodal. Para ambas muestras (M-1P y M-1,5P), se obtuvo un valor de moda de 0,2 y 0,6  $\mu\text{m}$ , respectivamente. El rango del tamaño de partícula para cada una de las muestras estuvo entre 0,02-50  $\mu\text{m}$  y 0,03-200  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

La figura III.1 muestra una distribución del tamaño de partícula típica para cada una de las FFRs analizadas. En la figura III.1a se observa que las FFRs con un contenido en própolis igual o inferior a 0,5% presentaron una distribución monomodal. A altos contenidos en EEP, las FFRs presentaron una distribución bimodal en términos de porcentaje de volumen, pero aparentemente monomodal en términos de número de partículas (Figura III.1b). Esto indica que, al aumentar el ratio de EEP en las dispersiones, aparece una cantidad muy pequeña de partículas grandes, aunque el tamaño de la mayoría de las partículas tiende a ser menor. Esto se refleja también en la tabla III.2, donde se observa la disminución ( $p < 0,05$ ) de los dos diámetros ( $d_{43}$  y  $d_{32}$ ) y de la diferencia entre ambos, al aumentar el contenido en EEP. La disminución en el

tamaño medio de las partículas con el aumento del EEP podría ser debida a la presencia de compuestos anfífilicos en el extracto, como los ácidos grasos, los cuales actúan como emulsificantes cuando superan una concentración crítica en el sistema.



**Figura III.1.-** Distribución del tamaño medio de las partículas de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs) en términos de porcentaje de volumen (a) y número de partículas (b).

Las partículas dispersas mostraron una carga ligeramente negativa (entre -1,2 y -3 mV), tal y como se observa en la tabla III.2. Las partículas de las FFRs con un contenido en própolis igual ó superior a 0,5% presentaron mayores valores de carga (más negativas), poniendo de manifiesto una reordenación de los compuestos a medida que aumentaba el ratio de EEP en el sistema. La mayor cantidad de compuestos con carácter tensoactivo adsorbidos en la superficie de los agregados orgánicos formados (del EEP) parece promover la dispersión de compuestos no polares, que dirigen sus grupos ionizables/polares hacia la fase acuosa.

### III.3.1.2.- Caracterización reológica

Las curvas de flujo obtenidas fueron ajustadas al modelo de Ostwald de Waale y los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.3 junto al coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del ajuste, la viscosidad aparente calculada a  $100 \text{ s}^{-1}$  y los resultados del análisis estadístico (ANOVA), donde se observa que existieron diferencias significativas entre formulaciones ( $p < 0,05$ ).

**Tabla III.3.-** Parámetros del modelo de Ostwald de Waale ( $n$  y  $K$ ), viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de las formulaciones formadoras de recubrimiento (FFRs). Valores medios y desviaciones estándar.

FFR	$n$	$K$ (Pa s) <sup>a</sup>	$r^2$	$\eta_{ap}$ (Pa s) <sup>*</sup>
M	0,986 (0,004) <sup>f</sup>	0,129 (0,002) <sup>b</sup>	0,999	0,122 <sup>b</sup>
M-0,125P	0,985 (0,012) <sup>e</sup>	0,158 (0,005) <sup>d</sup>	0,999	0,147 <sup>d</sup>
M-0,25P	0,979 (0,007) <sup>d</sup>	0,162 (0,004) <sup>e</sup>	0,999	0,147 <sup>d</sup>
M-0,5P	0,968 (0,008) <sup>b</sup>	0,168 (0,004) <sup>f</sup>	0,999	0,145 <sup>d</sup>
M-1P	0,963 (0,006) <sup>a</sup>	0,148 (0,003) <sup>c</sup>	0,999	0,125 <sup>c</sup>
M-1,5P	0,970 (0,005) <sup>c</sup>	0,093 (0,003) <sup>a</sup>	0,999	0,081 <sup>a</sup>

\*calculada para un gradiente ( $\dot{\gamma}$ ) de  $100 \text{ s}^{-1}$

a-f: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre FFRs ( $p < 0,05$ )

Todas las FFRs presentaron un comportamiento ligeramente pseudoplástico, con valores de  $n$  alrededor de 0,97, no observándose ningún efecto tixotrópico en las curvas durante el ensayo de subida y bajada. La incorporación de EEP (<1%) a la dispersión pura de hidroxipropil metilcelulosa (M) dio lugar a cambios en el comportamiento reológico de las FFRs, las cuales tuvieron un

carácter pseudoplástico más marcado y más consistente (mayores valores de  $K$ ). La viscosidad aparente de las mezclas aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) en comparación con la viscosidad de la formulación de HPMC (M), debido a la aparición de una nueva fase dispersa en el sistema. Sin embargo, la viscosidad disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) cuando el EEP superó el 1%, coincidiendo con la disminución del tamaño medio de partícula, con la presencia de una pequeña cantidad de partículas grandes (distribución bimodal en términos de volumen) y con el aumento de la carga superficial de las partículas en dichas formulaciones.

La viscosidad de una dispersión puede ser explicada en términos del tamaño, forma y distribución del tamaño de las partículas, así como por las interacciones entre componentes que dan lugar a diferentes grados de inmovilización del solvente (Barreto *et al.*, 2003). Estas interacciones son mayores cuando la superficie interfacial aumenta (mayor número de partículas pequeñas). En este sentido, la menor viscosidad de las FFRs con un contenido en própolis del 1 y 1,5% podría ser explicado por el aumento de las interacciones entre los componentes del EEP y el polímero (HPMC), al adsorberse el HPMC en la superficie más hidrofílica de los nuevos agregados lipídicos.

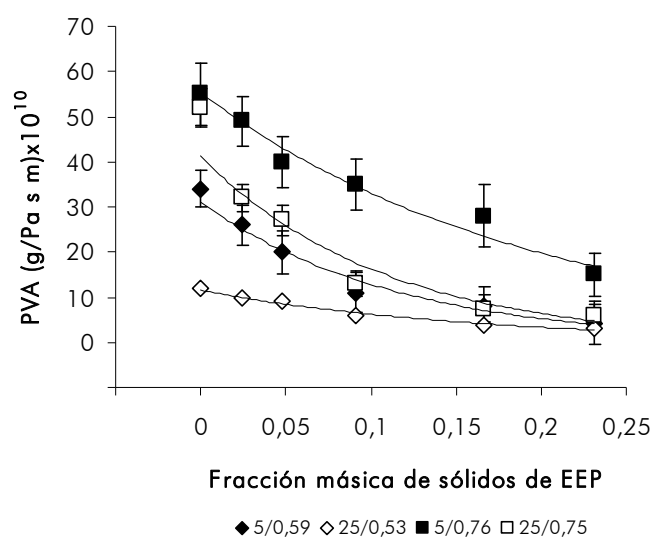
De los resultados obtenidos se deduce que a partir de una concentración crítica de EEP, existe una suficiente cantidad de tensoactivos en el medio para favorecer la dispersión de los componentes del extracto, donde estos tensoactivos polares se localizan en la interfase de los agregados orgánicos formados.

### III.3.2.- Caracterización de los films

#### III.3.2.1.- Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de los films fue medida a dos gradientes de HR y a dos temperaturas (5°C-59%, 25°C-53%, 5°C-76% y 25°C-75%) tratando de reproducir las posibles condiciones en las que se encontrarían los films si fueran aplicados como recubrimiento para frutas y hortalizas. El espesor medio de todos los films fue de  $50 \pm 2 \mu\text{m}$ .

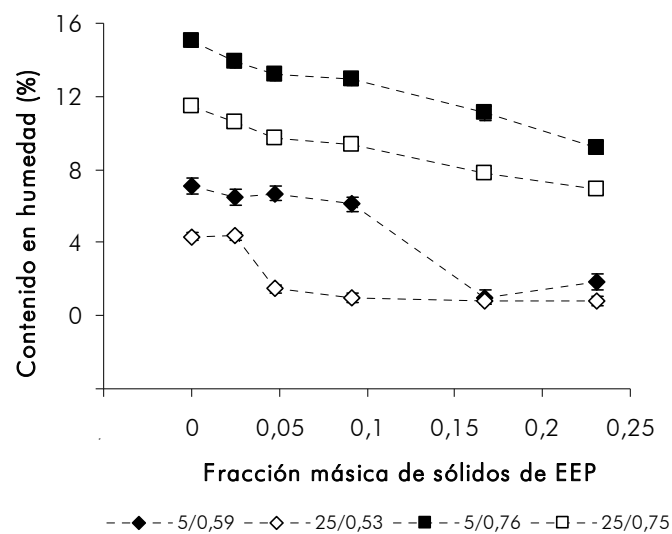
La figura III.2 muestra los valores de la PVA en función del contenido en EEP para las diferentes condiciones de equilibrado.



**Figura III.2.-** Evolución de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de los films en función del contenido en extracto etanólico de própolis (EEP) equilibrados a diferentes condiciones. Datos experimentales (símbolos) y predichos (curvas). Valores medios e intervalos LSD.

Los valores de PVA obtenidos para los films de HPMC (M) fueron del orden de los publicados por otros autores (Sánchez-González *et al.*, 2009) en condiciones experimentales similares. Como era de esperar, presentaron una pobre barrera al vapor de agua y fueron dependientes ( $p < 0,05$ ) tanto del gradiente de HR como de la temperatura utilizada. La incorporación de EEP disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) la PVA, aunque también estuvo influenciada por la HR y la temperatura.

La figura III.3 muestra el contenido en humedad de los films equilibrados en función del contenido en EEP, donde se observa cómo el contenido en agua disminuye a medida que aumenta el contenido en EEP, para todas las condiciones de equilibrado.



**Figura III.3.-** Contenido en humedad (%) de los films en función del contenido en extracto etanólico de própolis (EEP) equilibrados a diferentes condiciones. Valores medios e intervalos LSD.

Sin embargo, cuando el contenido en humedad fue expresado en base del polímero (g agua/g HPMC), no hubo un cambio significativo en el contenido en agua hasta que los films alcanzaron un contenido en sólidos secos en el extracto del 0,091g, mientras que sí hubo una disminución similar y significativa para las formulaciones con un contenido de própolis mayor (0,167 y 0,231 g de sólidos de EEP). Esta disminución fue mayor en los films equilibrados a bajas humedades relativas (74% para ambas temperaturas) que a altas (12-14% para ambas temperaturas). Estos resultados parecen indicar que, mientras a bajos contenidos de EEP la matriz polimérica es la principal responsable de la adsorción de agua y apenas existen interacciones entre componentes, a altos ratios del extracto, estos compuestos del EEP modifican la relación agua-HPMC, reduciendo la capacidad de las cadenas poliméricas para ligar moléculas de agua. Este hecho coincide con el diferente comportamiento observado para las FFRs con un mayor contenido en própolis y apunta al establecimiento de interacciones entre las cadenas de HPMC con los componentes del EEP, limitando así su capacidad para ligar agua.

El grado de interacción con el polímero fue mayor a bajos contenidos de humedad en los films y se redujo con la ganancia de agua en la matriz polimérica. En este sentido, es importante remarcar que el efecto de la temperatura en la sorción de agua, relacionada con la entalpía de sorción, fue muy similar a altos contenidos en agua (muestras equilibradas a 75 y 76% HR) para todas las muestras con diferentes contenidos en EEP. Sin embargo, se redujo drásticamente a bajos contenidos en humedad (muestras equilibradas a 53 y 59% HR) para los films que contenían altas cantidades de própolis. El gran descenso en la entalpía de sorción de agua de estas muestras apunta a un mayor grado de hidrofobicidad de la matriz, que está asociado con el mencionado aumento en el grado de interacción entre el HPMC y los



componentes del EEP, que bloquea los puntos activos del HPMC para la adsorción de agua.

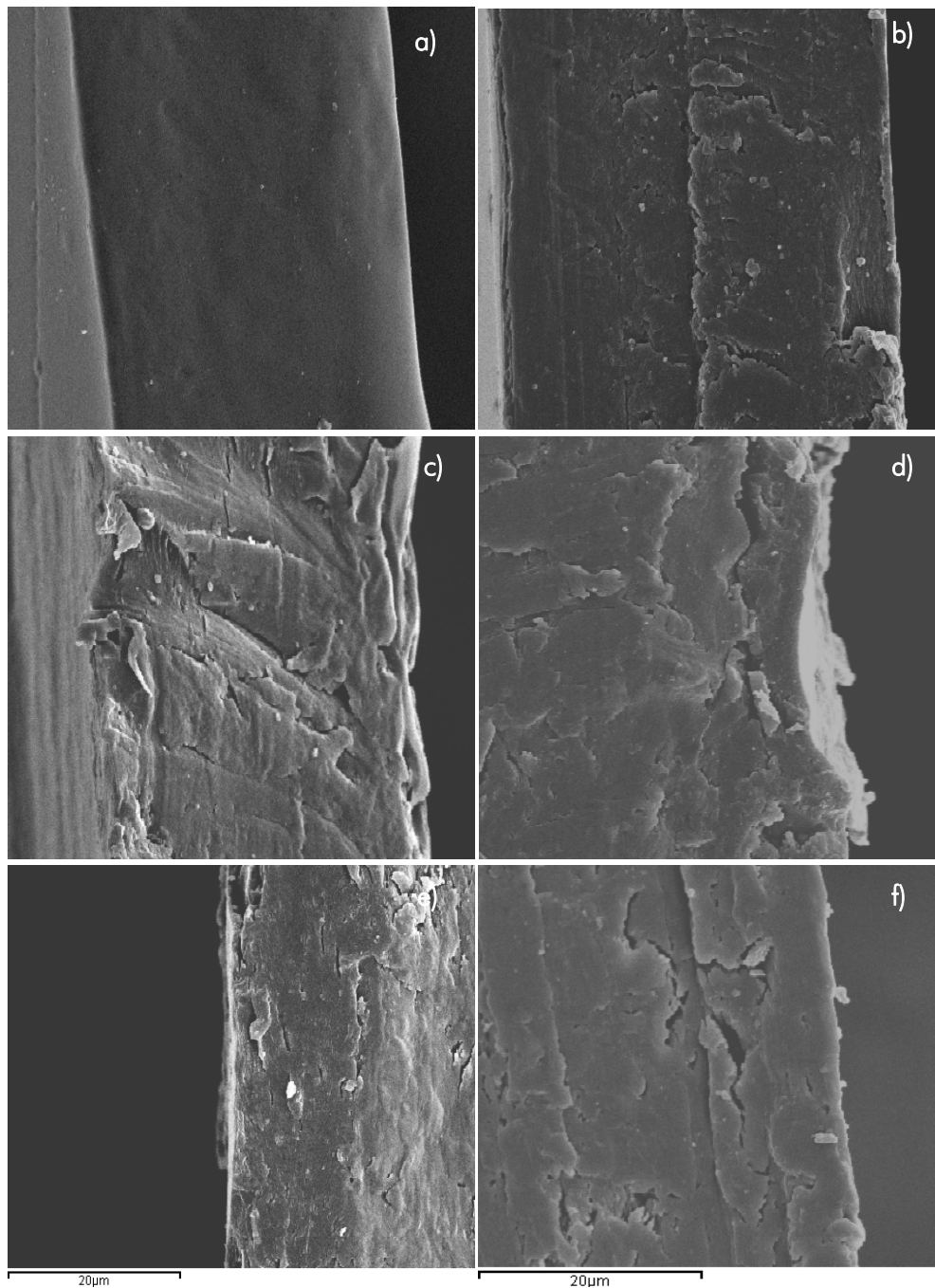
Un aumento en el contenido de humedad provocó un aumento en la PVA del film tal y como puede verse claramente en la figura III.2 y III.3. En films hidrofílicos, la permeabilidad aumenta a altos contenidos de humedad debido a la hidratación y plastificación de la matriz polimérica, causadas por la adsorción de agua, lo que induce a la formación de una estructura menos densa en donde los extremos de las cadenas son más móviles y la difusión y permeación de agua se ve potenciada (Morillon *et al.*, 2002). La transferencia de agua a través del film tiene lugar en tres etapas: primero, el vapor de agua condensa y se disuelve en la cara del film con la mayor concentración de agua; segundo, las moléculas de agua se mueven a través del film debido a un gradiente de concentración o de actividad de agua; tercero, el agua se evapora en la otra cara del film (Miller y Krochta, 1997). Por tanto, la afinidad entre el agua y el material del film y la resistencia al movimiento del agua en la matriz polimérica son factores que determinarán la permeabilidad del agua en el film (Larotonda *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2008; Muller *et al.*, 2009). En la determinación experimental de la PVA, el gradiente de humedad establecido en los films fue más abrupto a bajas humedades relativas (53/59-100% HR), aunque en este caso, el contenido medio de humedad fue menor que en los films equilibrados a mayor humedad relativa (75/76-100% HR). Al mismo tiempo, el aumento de la temperatura potenció la difusión molecular, pero disminuyó la capacidad de adsorción de agua, causando un efecto contrario sobre la movilidad molecular. En los casos, donde la temperatura presenta una gran influencia sobre la sorción de agua, el efecto de la temperatura sobre la difusión del agua queda enmascarado y esto ha quedado reflejado también en la permeabilidad al vapor de agua.

Como conclusión podemos decir que, para interpretar el comportamiento de la PVA en los films *composites* equilibrados a diferentes condiciones, se deben tener en cuenta diferentes efectos: por un lado, las interacciones agua-polímero en el film afectadas por la presencia de EEP y por otra, la relación temperatura-sorción de agua, que a su vez afecta al comportamiento de difusión-sorción del agua, determinando la permeabilidad del vapor de agua en los films.

### *III.3.2.2.- Análisis microestructural*

La estructura final del film depende de la ordenación de los diferentes componentes en las FFRs, de su evolución durante el secado de los films y de las interacciones entre ellos. La figura III.4 muestra las micrografías de la sección transversal de los films obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), en donde se puede observar el efecto de la incorporación de EEP en la microestructura del film.

Mientras que en el film puro de HPMC (Figura III.4a) se observa una estructura homogénea y continua, al igual que observaron otros autores (Villalobos *et al.*, 2005; Sánchez-González *et al.*, 2009), la incorporación de EEP (Figuras III.4b-f) dio lugar a la formación de una estructura quebrada (no continua), donde parecen apreciarse algunas zonas cristalinas, tal y como se ha deducido del análisis del comportamiento mecánico de los films. En este sentido, Drapak *et al.* (2006b y 2008) observaron que en films orgánicos obtenidos a base de soluciones alcohólicas de própolis mostraron una estructura cristalina mediante difracción de rayos X y que el extracto no perdió su capacidad de cristalización cuando interaccionó químicamente con otros componentes. Por otro lado, esta formación de zonas cristalinas también podría contribuir a explicar la reducción en la PVA de los films *composites*, tal y como ha sido observado por otros autores (Fabra *et al.*, 2009a).



**Figura III.4.-** Micrografías obtenidas mediante SEM de los diferentes films: (a) M, b) M-0,125P, c) M-0,25P, d) M-0,5P, e) M-1P y f) M-1,5P.

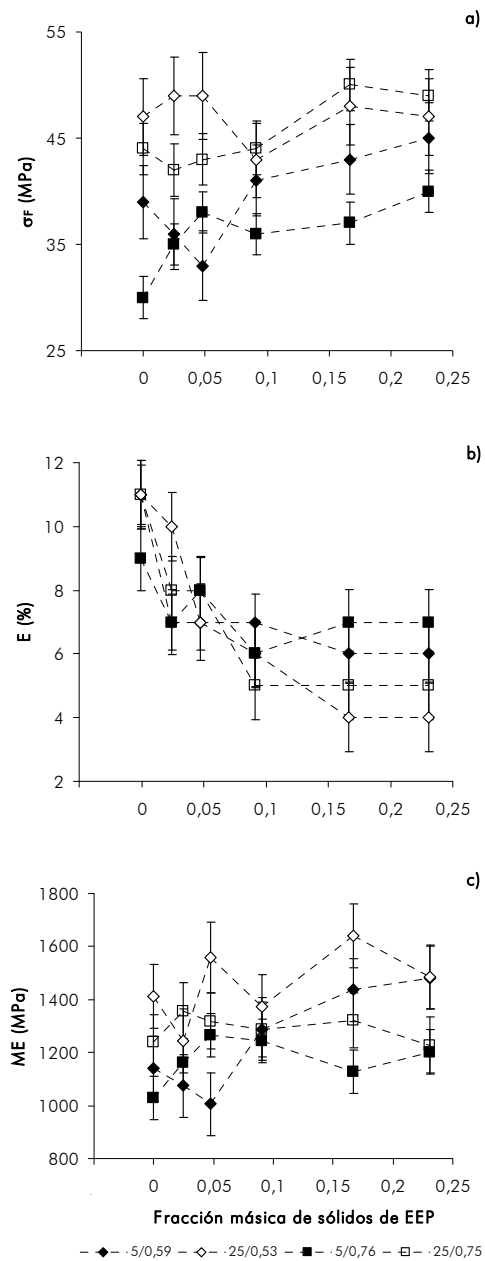
### III.3.2.3.- Propiedades mecánicas

La figura III.5 muestra el esfuerzo de fractura ( $\sigma_F$ ), el porcentaje de deformación (%E) y el módulo de elasticidad (ME) para los films equilibrados en las diferentes condiciones de humedad y temperatura. El esfuerzo de fractura representa la resistencia del film a la deformación hasta rotura del mismo, el porcentaje de deformación una medida de la capacidad de estiramiento del film y el módulo de elasticidad, de la rigidez del film.

Los valores obtenidos de los parámetros mecánicos para el film de HPMC puro fueron del orden de los encontrados en bibliografía por otros autores (Li *et al.*, 2002; Sebti *et al.*, 2007; Sánchez-González *et al.*, 2009).

Para analizar el efecto de la humedad de los films y el contenido en EEP sobre las propiedades mecánicas se realizó un ANOVA multifactor. Los resultados mostraron que el contenido en EEP no tuvo ningún efecto significativo ( $p > 0,05$ ) sobre los parámetros de carga ( $\sigma_F$  y ME) pero sí sobre el porcentaje de deformación, que disminuyó ( $p < 0,05$ ) a medida que aumentó el contenido de EEP en los films. Sin embargo, el contenido en humedad no afectó ( $p > 0,05$ ) a la capacidad de estiramiento (%E) aunque sí, al  $\sigma_F$  y al ME ( $p < 0,05$ ). En general, ambos parámetros mostraron una ligera disminución cuando aumentó el contenido en humedad, pero esta tendencia no fue reproducible para todos los contenidos de EEP, posiblemente debido a la variabilidad de los valores.

La respuesta mecánica del film estuvo influenciada principalmente por la distribución espacial de los diferentes componentes, su estado físico y por las interacciones establecidas entre ellos. En general, la incorporación de una fase dispersa provocó un descenso en los parámetros de carga ( $\sigma_F$  y ME) tal y como ha sido observado por diferentes autores en films *composites* a base de lípidos (Brindle y Krochta, 2008; Fabra *et al.*, 2008; Monedero *et al.*, 2009; Sánchez-González *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2009a).

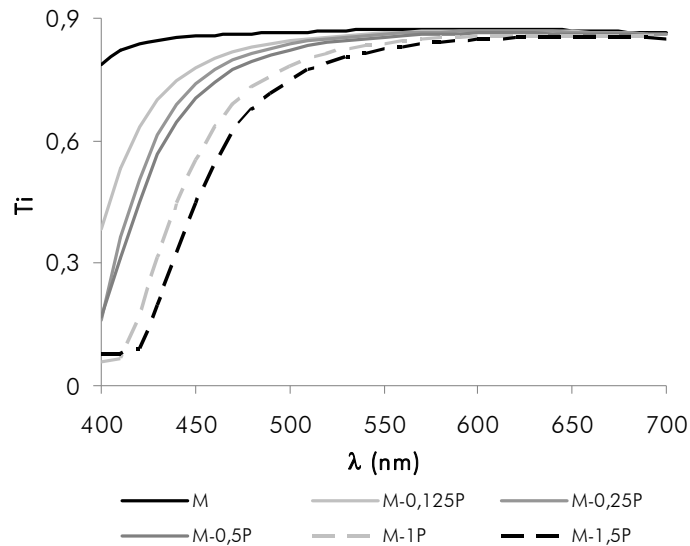


**Figura III.5.-** Esfuerzo de fractura (a), porcentaje de deformación (b) y módulo de elasticidad (c) de los films equilibrados a diferentes condiciones en función del contenido en extracto etanólico de própolis (EEP). Valores medios e intervalos LSD.

Esto ha sido atribuido a la presencia de discontinuidades estructurales que reduce la resistencia de la matriz polimérica a la fractura. En los films obtenidos, la incorporación de EEP no produjo ningún debilitamiento en la matriz polimérica ya que no se observó ninguna disminución en el esfuerzo de fractura ni el módulo de elasticidad al aumentar su contenido. Esto podría ser debido a la presencia de interacciones entre los componentes de EEP y el HPMC y también, a la formación de estructuras cristalinas, tal y como se ha comentado anteriormente. Los componentes del EEP (resinas compuestas de flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres) presentan características polares y pueden interactuar con los grupos hidrofílicos de la cadena celulósica del HPMC. Estas interacciones pueden dar lugar a una fuerte adhesión interfacial entre estos y los componentes del EEP, aumentando la resistencia mecánica de los films. Por otro lado, el comportamiento mecánico observado concuerda con la formación de cristales, ya que estos reducen la flexibilidad y la capacidad de estiramiento de los films (Fabra *et al.*, 2009b), tal y como ha sido observado de la evolución del porcentaje de deformación con el aumento del contenido de EEP en el film.

#### *III.3.2.4.- Propiedades ópticas*

La transparencia de los films fue evaluada a través de la transmitancia interna ( $T_i$ ) obtenida del análisis de Kubelka-Munk. Un aumento en los valores de  $T_i$  está relacionado con films más homogéneos y transparentes, mientras que una disminución implica una mayor opacidad del film. La figura III.6 muestra un ejemplo de las curvas de distribución espectral de  $T_i$  para cada uno de los films equilibrados a 25°C y 53% HR. Para las demás condiciones de equilibrado, la distribución espectral de  $T_i$  de los films fue muy similar.

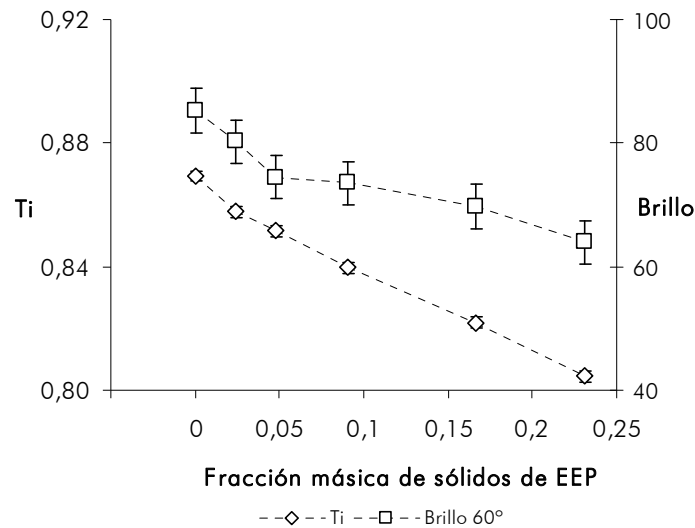


**Figura III.6.-** Curvas de distribución espectral del parámetro  $T_i$  de los films equilibrados a 25°C y 53% de humedad relativa.

Como se puede observar en la figura III.6, los films de HPMC puros (M) presentaron una elevada transparencia en comparación con la de los films *composites*. Estos valores son del orden de los obtenidos por otros autores para films de HPMC (Villalobos *et al.*, 2005; Sánchez-González *et al.*, 2009).

La presencia de EEP en la dispersión de HPMC disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) la transparencia de los films (aumentó su opacidad) debido al fenómeno de reflexión difusa provocado por la presencia de agregados (con diferente índice de refracción) distribuidos a lo largo del film. Estos agregados están organizados en estructuras cristalinas, tal y como se ha observado en las micrografías de la figura III.4. Puesto que el contenido en humedad no afectó a la transparencia de los films ( $p > 0,05$ ), la figura III.7 muestra la evolución de los valores de  $T_i$  medios a 530 nm en función del contenido en EEP para todos los films y condiciones de equilibrado. En ella se observa cómo aumenta la

opacidad de los films *composites* con el ratio de EEP, efecto típico cuando aparece una fase dispersa en el sistema con un índice de refracción diferente al de la fase continua que forma la matriz polimérica.



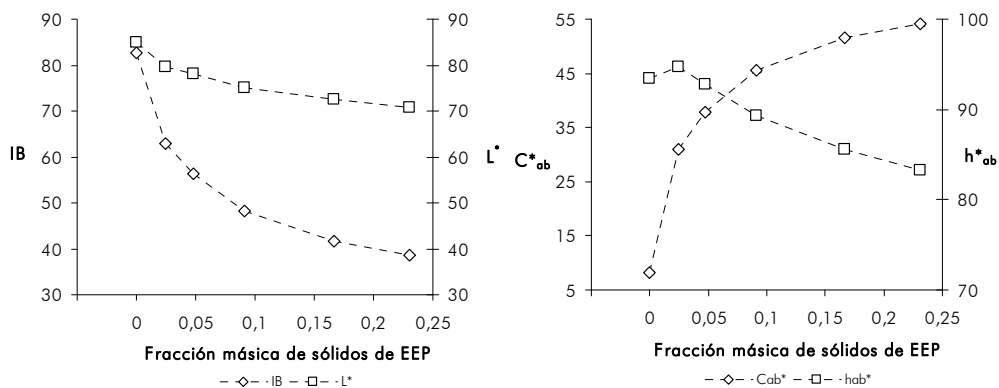
**Figura III.7.-** Transparencia (Ti) de los films a 530 nm y del brillo 60° en función del contenido en extracto etanólico de própolis (EEP). Valores medios e intervalos LSD para todos los films y condiciones de equilibrado.

Los valores de brillo fueron medidos a un ángulo de incidencia de 60° y también se muestran en la figura III.7. De nuevo, como el contenido de humedad no afectó significativamente ( $p < 0,05$ ) a los valores de brillo de los films con diferente contenido en EEP, la figura muestra los valores medios de brillo y los intervalos LSD para todos los films y condiciones de equilibrado. Como se puede observar, los films de HPMC (M) presentaron los mayores valores de brillo en comparación con los films *composites*, en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores en films de HPMC (Villalobos *et al.*, 2005; Sánchez-González *et al.*, 2009). A medida que aumentó el



contenido en EEP, el brillo de los films disminuyó. Normalmente la pérdida de brillo suele ser debida a la presencia de irregularidades en la superficie de los films (Ward y Nussinovich, 1996). Así, la disminución del brillo como consecuencia del aumento del contenido en EEP podría ser explicado por el aumento de la rugosidad en la superficie de los films *composites*. Esta rugosidad aparece como consecuencia de la presencia de agregados en la superficie del film, que aumentan con el incremento del contenido de EEP.

Al igual que ocurrió con la transparencia y el brillo, las coordenadas de color ( $L^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h^*_{ab}$ ) y el índice de blancura (IB) tampoco se vieron afectadas significativamente ( $p > 0,05$ ) por el contenido en humedad de los films. La figura III.8 muestra la evolución de los valores medios de las coordenadas de color y del índice de blancura de los films con diferente contenido en EEP para todas las formulaciones y condiciones de equilibrado.



**Figura III.8.-** Índice de blancura (IB), luminosidad ( $L^*$ ), croma ( $C^*_{ab}$ ) y tono ( $h^*_{ab}$ ) en función del contenido en extracto etanólico de própolis (EEP) para todos los films y condiciones de equilibrado. Valores medios e intervalos LSD.

Como se puede observar, el índice de blancura y la luminosidad disminuyeron y la saturación de color ( $C^*_{ab}$ ) aumentó con el aumento de EEP. El tono de los

films *composites* disminuyó ligeramente (de amarillo a rojizo) a medida que aumentó el contenido en EEP, seguramente debido a la presencia de sustancias coloreadas en el EEP, tales como los carotenoides, que absorben luz azul, tal y como se puede observar en la figura III.6.

#### III.3.2.5.- Análisis microbiológico

La tabla III.4 muestra el efecto inhibitorio de los films a base de própolis sobre *P. italicum* y *A. niger* calculado como la diferencia entre el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) a tiempo  $t$  de la placa con el film (UFC<sub>Ft</sub>) y el de la placa control al mismo tiempo  $t$  (UFC<sub>Ct</sub>) respecto del de la placa control a tiempo  $t$  (UFC<sub>Ct</sub>).

Para el *P. italicum*, no se observaron diferencias significativas entre las placas control y las placas recubiertas con el film puro de HPMC durante todo el período del almacenamiento. Valencia-Chamorro *et al.* (2008) tampoco observaron ningún efecto antifúngico en films de HPMC sin aditivos añadidos sobre ninguna de las especies de *Penicillium* causantes de podredumbre en frutos cítricos. El crecimiento del *P. italicum* fue de 1,5 a aproximadamente 6 logs UFC/cm<sup>2</sup> al final del período de almacenamiento. Estos resultados coinciden con los del trabajo comentado anteriormente. Como se puede observar en la tabla III.4, en los films a base de própolis se redujo el crecimiento microbiano del *P. italicum* a medida que aumentó el contenido en EEP, aunque no hubo una inhibición completa. De hecho, usando la mayor concentración de própolis se consiguió una reducción máxima del 33%, en comparación con el control. Con las menores cantidades de própolis (0,024 y 0,048 g de fracción másica de sólidos de EEP) se obtuvo una reducción fúngica de aproximadamente 0,5-1 log después de 5 días de almacenamiento a 20°C

y de 2 logs para los films con la mayor cantidad de própolis (0,231 g de fracción másica de sólidos de EEP).

**Tabla III.4.-** Efecto inhibitorio de los films a base de própolis sobre *Penicillium italicum* y *Aspergillus niger* inoculados en placas con Patata Dextrosa Agar (PDA) y almacenados a 20°C durante 5 días. Valores medios y desviaciones estándar.

Film	Reducción fúngica (log UFC/cm <sup>2</sup> )	
	<i>Penicillium italicum</i>	<i>Aspergillus niger</i>
M	0,24 (0,24) <sup>a</sup>	0,44 (0,03) <sup>a</sup>
M-0,125P	0,57 (0,14) <sup>a</sup>	0,53 (0,06) <sup>ab</sup>
M-0,25P	1,27 (0,04) <sup>b</sup>	0,56 (0,07) <sup>ab</sup>
M-0,5P	1,90 (0,05) <sup>c</sup>	0,74 (0,12) <sup>b</sup>
M-1P	1,92 (0,13) <sup>cd</sup>	1,97 (0,21) <sup>c</sup>
M-1,5P	2,02 (0,14) <sup>d</sup>	2,84 (0,14) <sup>d</sup>

a-d: Diferentes superíndices en una columna indican diferencias significativas entre FFRs ( $p < 0,05$ )

En cuanto al crecimiento del *A. niger*, los films de HPMC (M) no fueron efectivos y tampoco hubieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control, coincidiendo con los resultados de otros autores que trabajaron con films de metilcelulosa y derivados (Türe *et al.*, 2008).

La incorporación de EEP a los films de HPMC redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento del *A. niger* tal y como ha sido observado por otros autores en estudios con extractos acuosos y etanólicos de própolis (Ozcan, 1999; Soylu *et al.*, 2008). En este caso, la concentración más alta de EEP permitió la inhibición completa del crecimiento de este microorganismo y un descenso en la concentración inoculada inicialmente del microorganismo desde

1,52 logs UFC/cm<sup>2</sup> a 0,82 log UFC/cm<sup>2</sup> al final del período de almacenamiento (5 días a 20°C). Se consiguió una reducción en el número de UFC del 77,6% en comparación con el control después de cinco días a 20°C. El porcentaje de inhibición del crecimiento del *A. niger* fue menor para las otras concentraciones de EEP (0,024, 0,048 y 0,091 g), entre el 14 y el 54%.

### ***III.3.3.- Aplicación a uva (var. Moscatel)***

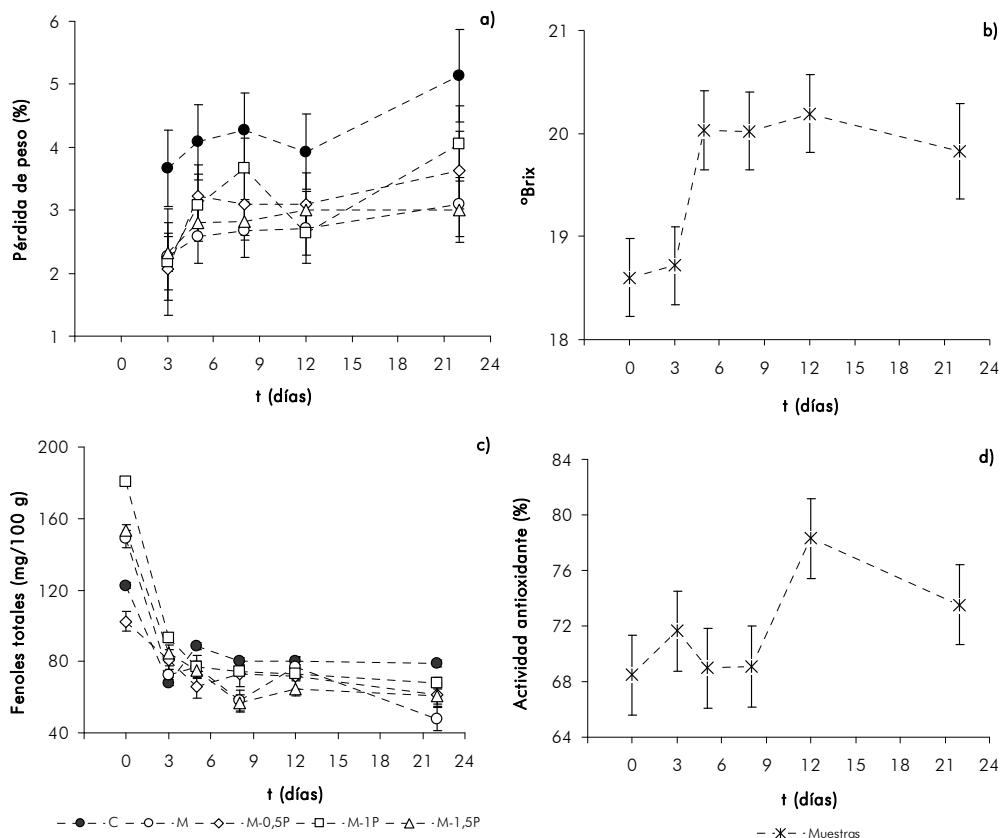
#### *III.3.3.1.- Propiedades fisicoquímicas y pérdida de peso*

El pH no cambió significativamente ( $p > 0,05$ ) durante el período de almacenamiento aunque hubo diferencias entre muestras, atribuidas a la variabilidad de las muestras y no al tratamiento ya que no se observaron tendencias claras asociadas al tipo de recubrimiento. Los valores de pH para los diferentes tratamientos y tiempos de almacenamiento estuvieron alrededor de 3,63-3,69, siendo el valor medio de  $3,67 \pm 0,10$ . Debido a la naturaleza de los ácidos orgánicos de la fruta, el descenso normal de su acidez (Vargas *et al.*, 2006) no provocó cambios notables en el pH.

La figura III.9 muestra la evolución de la pérdida de peso (%), el contenido en sólidos solubles (°Brix), los fenoles totales (mg/100 g) y la actividad antioxidante de las muestras durante el período de almacenamiento en refrigeración.

Como se puede observar en la figura III.9a, la pérdida de peso de las uvas sin recubrir (control) fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la de las uvas recubiertas y el tipo de recubrimiento aplicado no afectó significativamente ( $p > 0,05$ ) sobre la pérdida de peso. Cabe destacar que esto tuvo lugar durante los primeros 5-7 días del almacenamiento y que a partir de ahí, la pérdida de peso sólo aumentó ligeramente, probablemente debido a una reducción de la

fuerza impulsora, ya que la humedad relativa de la cámara y la actividad de agua de las muestras tendieron a ser cada vez más parecidos.



\*Valores medios de todas las muestras (recubiertas y no recubiertas), las cuales no mostraron diferencias significativas entre ellas.

**Figura III.9.-** Evolución de la pérdida de peso (%), contenido en sólidos solubles (°Brix), fenoles totales (mg/100 g) y actividad antioxidante (%) de las de las muestras sin recubrir (C), recubiertas con HPMC (M) y con las diferentes cantidades de extracto etanólico de própolis (EEP) durante el período de almacenamiento en refrigeración a 1-2°C y 85-90% de humedad relativa. Valores medios e intervalos LSD.

Se observó, por tanto, un efecto protector del recubrimiento, independientemente de la incorporación o no de própolis, a pesar de que estudios previos demostraron la menor permeabilidad al vapor de agua ( $p < 0,05$ ) de los films *composites* aislados, cuando se incorporó en las mismas concentraciones que las utilizadas en este estudio. Esto puede ser debido a problemas en la extensibilidad de los films al aplicarse sobre la superficie de la fruta, afectando al grado de uniformidad del recubrimiento (Villalobos-Carvajal *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2006). Esta falta de uniformidad causa deficiencias en los films de forma aleatoria, dificultando las observaciones entre los diferentes tratamientos.

En el último día del almacenamiento se detectó una aceleración en la pérdida de peso, que pudo ser atribuida a un aumento de la actividad metabólica de la fruta, asociada con la senescencia del tejido. Dicha pérdida de peso fue ralentizada al aplicar los recubrimientos. La eficacia de recubrimientos a base de polisacáridos como barrera al vapor de agua en frutas cítricas y su mejora al incorporar lípidos también ha sido observada por otros autores (Rojas-Argudo *et al.*, 2009; Valencia-Chamorro *et al.*, 2009).

La figura III.9b muestra la evolución del contenido en sólidos solubles de todas las muestras (recubiertas y sin recubrir) durante el período de almacenamiento en refrigeración. En ella se observa cómo los sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix) de las uvas aumentaron a lo largo del almacenamiento, desde  $18,5^{\circ}$ Brix durante los 5 primeros días, a  $20^{\circ}$ Brix que alcanzaron a partir del séptimo día en adelante. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los distintos tratamientos probablemente por la variabilidad natural de las muestras, que no permitió la observación de las posibles pequeñas diferencias inducidas por los diferentes recubrimientos.

Por otra parte, el contenido en fenoles totales (Figura III.9c) disminuyó drásticamente durante los cinco primeros días de refrigeración para todos los

tratamientos, independientemente de la aplicación o no del recubrimiento y a partir de ahí, disminuyó lenta y progresivamente a lo largo del almacenamiento. En este sentido, cabe destacar que la variabilidad en los fenoles totales de las muestras fue mayor al inicio ( $t=0$ ) que en el resto de los periodos de almacenamiento, coherentemente con el progresivo descenso en el contenido en fenoles que ocurre de forma normal durante la maduración de la uva y posterior periodo postcosecha. La actividad de la fenilalanina amonoliasa es un factor clave en la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos en uvas y su actividad disminuye con la maduración y almacenamiento postcosecha (Meng *et al.*, 2008). Tras tres días de almacenamiento en refrigeración, el contenido en fenoles de todas las muestras alcanzó valores muy similares, que disminuyeron progresivamente durante el almacenamiento, tal y como ha sido observado en otros trabajos con uva (Meng *et al.*, 2008) y en otras frutas no-climáticas, como la fresa (Ferreira *et al.*, 2007). Sin embargo, debido a la ausencia de compuestos de coloración rojiza en el cultivar escogido (uva blanca), los cambios en el contenido en fenoles no dieron lugar a un descenso en el correspondiente parámetro de color, como se comentará posteriormente.

La figura III.9d muestra la capacidad antioxidante (%) de todas las muestras y en ella se observa cómo a los 12 días de refrigeración aumentó ligeramente, independientemente del tratamiento aplicado, posiblemente por la aparición de compuestos de Maillard, en coherencia con el desarrollo de colores marrones que se comentarán más adelante. El proceso de pardeamiento no enzimático también puede contribuir a la formación de compuestos antioxidantes, ya que algunos autores (Meng *et al.*, 2008) han observado un aumento de las actividades de la polifenoloxidasa (PPO) y de la peroxidasa (POD) durante el almacenamiento postcosecha de uvas. Entre los compuestos fenólicos presentes en la uva, los ácidos fenólicos (cinámico y benzoico, esterificados o no con el

ácido tartárico) son los predominantes en uva blanca. Estos compuestos se oxidan fácilmente, produciendo compuestos pardos, que también presentan actividad antioxidante.

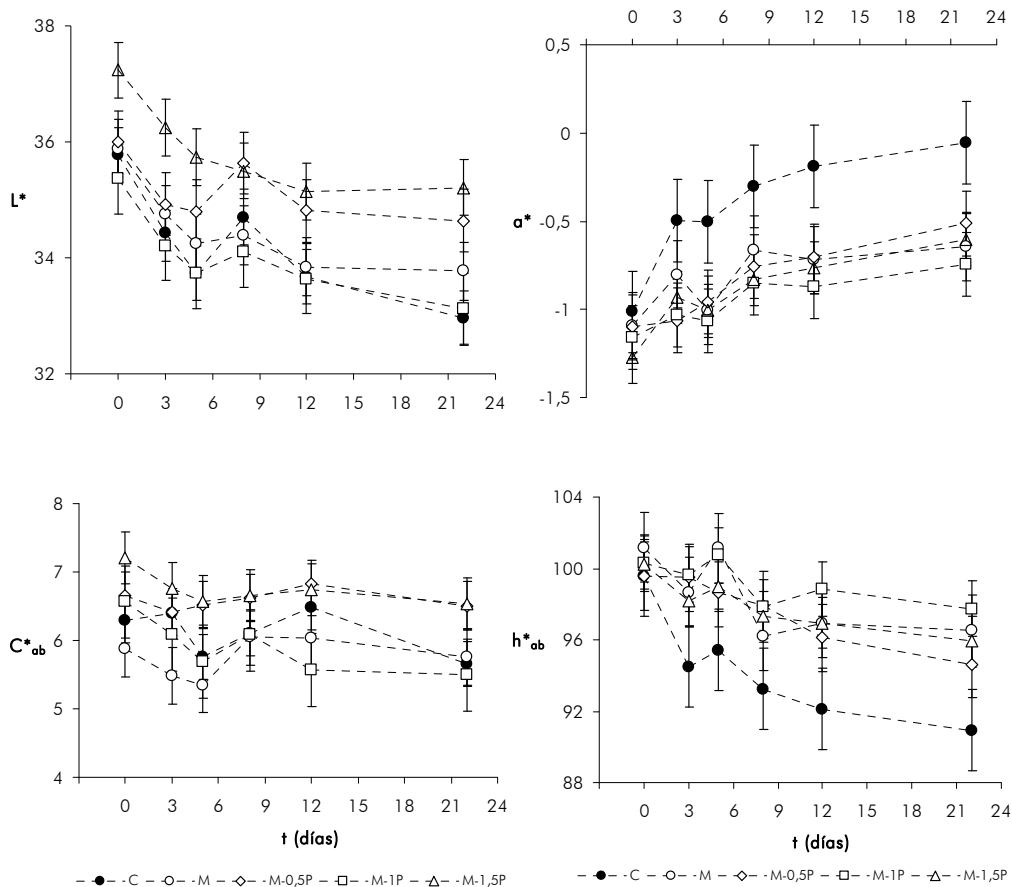
### *III.3.3.2.- Propiedades mecánicas y ópticas*

El ensayo de compresión realizado en las muestras recubiertas y no recubiertas almacenadas en refrigeración a diferentes tiempos no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la respuesta mecánica debido al tipo de recubrimiento ni al tiempo de almacenamiento. Los valores medios y las desviaciones estándar de la fuerza máxima, distancia requerida para romper la muestra y el área bajo la curva fueron de  $22 \pm 8$  N,  $10,5 \pm 0,9$  mm y  $98 \pm 35$  N.mm, respectivamente. Aunque otros autores han observado pérdida de firmeza durante el almacenamiento postcosecha en refrigeración de otras variedades de uva (Valverde *et al.*, 2005), fresas (Mali y Grossmann, 2003; del Valle *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006), manzanas (Moldao-Martins *et al.*, 2003) y tomate cherry (Yaman y Bayindirh, 2002) tanto en muestras no recubiertas como recubiertas con diferentes recubrimientos comestibles, esto no ha sido observado en este estudio, seguramente por la dura piel de la uva Moscatel, principal responsable de la respuesta mecánica obtenida durante el test de compresión realizado.

Por otro lado, los cambios detectados en el contenido de fenoles totales junto con la aparición de coloraciones marrones en las uvas, asociada con el pardeamiento enzimático y no enzimático, procesos típicos de frutas que han llegado a la senescencia, se relacionaron con los cambios externos en el color de las uvas.



La figura III.10 muestran la evolución de las coordenadas de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h^*_{ab}$ ) de las muestras recubiertas y sin recubrir a lo largo del período de almacenamiento en refrigeración.



**Figura III.10.-** Evolución de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h^*_{ab}$  de las muestras sin recubrir (C), recubiertas con HPMC (M) y con las diferentes cantidades de extracto etanólico de própolis (EEP) durante el período de almacenamiento en refrigeración a 1-2°C y 85-90% de humedad relativa. Valores medios e intervalos LSD.

Como se puede observar, la luminosidad ( $L^*$ ) y el tono ( $h^*_{ab}$ ) disminuyeron con el tiempo de almacenamiento, reflejando la aparición de coloraciones pardas.

Esta disminución fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en las uvas sin recubrir, mientras que no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los diferentes recubrimientos aplicados. Esto parece indicar que los recubrimientos retardaron los procesos de pardeamiento enzimático y no enzimático, probablemente debido al efecto barrera al oxígeno de estos recubrimientos, ya que el oxígeno participa activamente en estos procesos. El aumento de la coordenada  $a^*$ , mayor en las muestras no recubiertas, fue coherente con los cambios de tono y con el avance del pardeamiento.

Las uvas recubiertas con las concentraciones más altas de EEP (1,5P) presentaron valores de  $L^*$  significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) al resto, debido al notable aumento en la opacidad de este film, que inhibe la absorción de luz por la superficie de la uva, suavizando su color.

Por otro lado, algunos estudios sobre la actividad enzimática de uvas reflejan un gran aumento de las actividades PPO y POD durante el almacenamiento en refrigeración (Meng *et al.*, 2008), lo que explicaría tanto el descenso en el contenido de fenoles totales como la aparición de coloraciones marrones en este cultivar de uvas blancas.

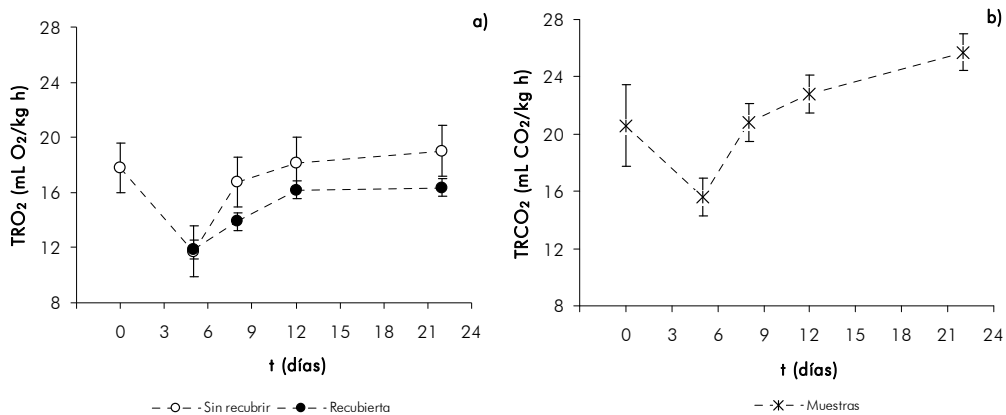
### III.3.3.3.- Tasa respiratoria

El efecto de la aplicación del recubrimiento en la tasa de respiración de la uva fue evaluado a través del consumo de oxígeno ( $O_2$ ), de la producción de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) y del coeficiente respiratorio (CR). Al inicio del almacenamiento ( $t=0$ ), los valores de  $O_2$  y  $CO_2$ , expresados como mL/kg.h, fueron de  $18 \pm 2$  y  $21 \pm 3$ , respectivamente. El CR fue cercano a la unidad (de  $1,16 \pm 0,06$ ), reflejando que la fruta siguió un metabolismo de respiración normal.

La figura III.11 muestra la evolución de las tasas respiratorias de  $O_2$  y de  $CO_2$

durante el almacenamiento en refrigeración.

Para el consumo de oxígeno (Figura III.11a), durante los primeros días del almacenamiento no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las diferentes muestras y disminuyó como consecuencia del almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, a tiempos más largos, cuando tiene lugar una aceleración de la tasa respiratoria al llegar las frutas a la senescencia, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras recubiertas y las no recubiertas, aunque no entre los diferentes tipos de recubrimientos ( $p > 0,05$ ), tal y como ocurrió con la pérdida de peso. Esto indica que todos los recubrimientos mostraron una barrera al oxígeno, limitando por tanto, la aceleración de la tasa de respiración aeróbica. En general, se ha observado que los cambios en las tasas respiratorias suelen estar relacionados con las pérdidas de peso de las muestras (Fallik *et al.*, 2005; Porat *et al.*, 2005; Valverde *et al.*, 2005).



**Figura III.11.-** Evolución de la tasa respiratoria de oxígeno (TR O<sub>2</sub>) (a) de las muestras sin recubrir (C) y recubiertas y de la tasa respiratoria de dióxido de carbono (TR CO<sub>2</sub>) (b) de todas las muestras durante el período de almacenamiento en refrigeración a 1-2°C y 85-90% de humedad relativa. Valores medios e intervalos LSD.

En la figura III.11b, se observó un aumento en la producción de CO<sub>2</sub> a partir del noveno día del almacenamiento en refrigeración en todas las muestras, de acuerdo con el incremento de la actividad metabólica a tiempos largos de almacenamiento, relacionada con el progreso de la senescencia y colapso estructural de los tejidos. Algunos autores observaron una reducción en la producción de CO<sub>2</sub> en frutas recubiertas tales como uva (Valverde *et al.*, 2005), aguacate (Maftoonazad y Ramaswamy, 2005) y tomate cherry (Alonso y Alique, 2004). Que este efecto no haya sido observado en las uvas de la variedad Moscatel recubiertas con HPMC, podría estar relacionado con la elevada permeabilidad al CO<sub>2</sub> que presenta este polímero (Miller y Krochta, 1997).

Al comparar las tasas respiratorias obtenidas con las de otras variedades de uva y de otras frutas, se observó que éstas fueron muy bajas y que además, se produjeron muy pocos cambios a lo largo del tiempo, sólo siendo destacable los cambios producidos en el último día del almacenamiento en refrigeración (24 días). Esto parece indicar que, en las condiciones de temperatura y humedad seleccionadas, los recubrimientos aplicados a las uvas no modificaron significativamente ( $p > 0,05$ ) la atmósfera interna de las mismas.

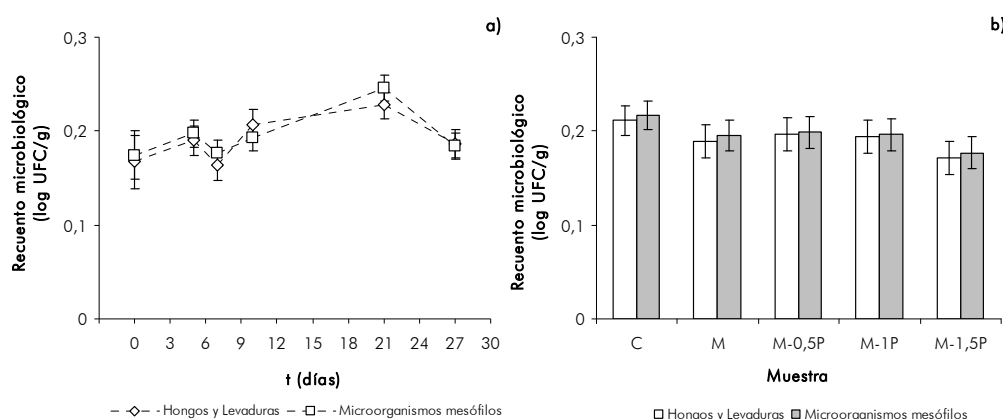
El coeficiente de respiración varió entre 1,3 y 1,5 y como era de esperar, aumentó ligeramente a lo largo del tiempo del almacenamiento, especialmente en las muestras recubiertas donde el consumo de oxígeno quedó ligeramente inhibido.

#### *III.3.3.4.- Análisis microbiológico*

La figura III.12a muestra los resultados del análisis microbiológico (hongos, levaduras y microorganismos mesófilos) para todas las muestras durante el período del almacenamiento en refrigeración y la figura III.12b, para cada una

de las muestras. Como se puede observar, la calidad microbiológica de las uvas recubiertas y no recubiertas se mantuvo durante todo el período del almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, en las uvas recubiertas se observó una ligera disminución del crecimiento microbiano, tanto para los hongos y levaduras como para los mesófilos aerobios, en comparación con las no recubiertas, especialmente en aquellas que fueron recubiertas con la mayor cantidad de EEP (M-1,5P).

Aunque se pueden observar disminuciones aleatorias en el recuento total a determinados tiempos, se observó, en general, un aumento del crecimiento de microorganismos a lo largo del almacenamiento, sin alcanzarse en ningún caso los niveles permitidos, ya que se mantuvieron por debajo de los 0,4 log UFC/g.



**Figura III.12.-** Recuento microbiológico (hongos, levaduras y microorganismos mesófilos) de todas las muestras durante el período de almacenamiento en refrigeración a 1-2°C y 85-90% de humedad relativa (a) y para cada una de las muestras (b): sin recubrir (C), recubiertas con HPMC (M) y con las diferentes cantidades de extracto etanólico de própolis (EEP). Valores medios e intervalos LSD.

### III.3.3.5.- Evaluación organoléptica

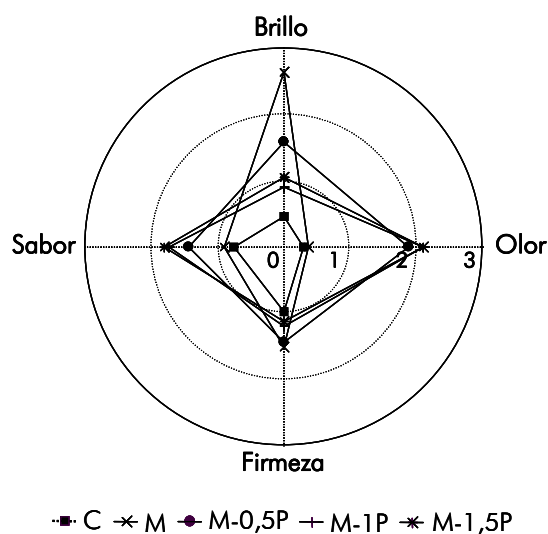
Los resultados de la evaluación organoléptica se muestran en la tabla III.5 y figura III.13. Como era de esperar, las uvas recubiertas fueron significativamente más brillantes ( $p < 0,05$ ) que las no recubiertas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para los films aislados. Los jueces no encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre la firmeza de las uvas recubiertas y las no recubiertas, en coherencia con los resultados obtenidos del ensayo mecánico descrito anteriormente. En cuanto al olor y sabor, los jueces encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras recubiertas con EEP y las no recubiertas debido al impacto del sabor del própolis en el aroma y olor de las muestras. Sin embargo, estas diferencias fueron menos apreciables que las detectadas cuando se utilizó própolis puro para recubrir directamente las uvas (resultados no publicados), lo cual indicó que el HPMC encapsuló los componentes del própolis, disminuyendo su apreciación sensorial.

**Tabla III.5.-** Valores del test de Dunnett de las muestras sin recubrir (C), recubiertas con HPMC (M) y con las diferentes cantidades de extracto etanólico de própolis (EEP).

Atributo	d <sup>z</sup>	C	M	M-0,5P	M-1P	M-1,5P
Brillo	0,56	0,62a <sup>y</sup>	3,52b	2,05b	1,20b	1,37b
Olor	0,71	0,36a	0,54a	2,49b	2,77b	2,85b
Firmeza	0,73	1,33a	2,03a	1,87a	1,58a	1,48a
Sabor	0,75	1,00a	1,15a	1,90b	2,25b	2,38b

<sup>z</sup> Parámetro del test de Dunnett

<sup>y</sup> letras diferentes en una fila indican diferencias significativas entre muestras al 95%



**Figura III.13.-** Evaluación organoléptica de las muestras sin recubrir (C), recubiertas con HPMC (M) y con las diferentes cantidades de extracto etanólico de própolis (EEP).

#### III.4.- CONCLUSIONES

Las propiedades de los films de HPMC se vieron afectadas por la presencia del EEP, que dieron lugar a estructuras cristalinas en los films secos. Estas formaciones fueron muy efectivas en la mejora de las propiedades barrera al vapor de agua. La reducción en la PVA para los films con la mayor cantidad de EEP fue del 56-88%, respecto a los films puros y esta reducción, causada por la incorporación de EEP, fue mayor cuando el contenido en humedad de los films aumentó. Los films *composites* mostraron una mayor resistencia mecánica y rigidez y menor flexibilidad, con mayor opacidad y menor brillo que los films puros a base de HPMC, además de aportarles color. Los cambios en las propiedades ópticas fueron dependientes de la concentración de EEP. Los films a base de própolis mostraron una notable actividad antifúngica contra los

hongos estudiados, siendo más efectivos contra el *A. niger* que contra el *P. italicum*. La incorporación de EEP a los films de HPMC conservó las propiedades antifúngicas de este compuesto natural, por lo que podría ser potencialmente utilizado para el control del ataque fúngico en alimentos.

Los recubrimientos de HPMC limitaron la pérdida de peso y el pardeamiento de las uvas de la variedad Moscatel, mejoraron su brillo y calidad microbiológica y controlaron el aumento de consumo de oxígeno durante su almacenamiento en refrigeración.

La incorporación de EEP aumentó la luminosidad de las uvas debido a la mayor opacidad de los films, lo que contribuyó a homogeneizar la apariencia de las uvas, siendo éste un factor que afectó positivamente a su calidad. Sin embargo, su incorporación no ejerció ningún efecto significativo ( $p > 0,05$ ) sobre el mantenimiento de la calidad de las uvas durante el almacenamiento en refrigeración. No obstante, teniendo en cuenta las numerosas propiedades que posee el própolis, su incorporación en los recubrimientos de HPMC podría contribuir a enriquecer las características nutricionales de los productos recubiertos. En este sentido, estos recubrimientos *composites* pueden ser considerados como una alternativa eficaz para obtener frutas y hortalizas más saludables.







## CONCLUSIÓN FINAL

---

En este trabajo ha quedado patente que la aplicación de recubrimientos *composites* se puede considerar como un método alternativo para alargar la vida útil de las frutas y hortalizas puesto que permite eliminar el uso de envases tradicionales, tan perjudiciales para el medio ambiente e incorporar compuestos de interés nutricional para mejorar la calidad de los productos y hacerlos más saludables.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los films secos aislados, se puede decir que los mejores fueron los formulados a partir de extracto etanólico de própolis, en cuanto a que presentaron una mayor reducción en la permeabilidad al vapor de agua. Por otro lado, en el estudio ha quedado reflejada la importancia del alimento como matriz soporte, que hace que la respuesta obtenida al aplicar los films no siempre se ajuste a lo obtenido con los films aislados. Aunque es complicado encontrar films que no modifiquen las propiedades sensoriales del producto al recubrirlo, su estudio se hace indispensable para poder desarrollar formulaciones que minimicen los impactos sobre los atributos sensoriales del producto o bien, que den lugar a formulaciones que resulten interesantes desde un punto de vista organoléptico o nutricional.



## BIBLIOGRAFÍA

---

### A

- Alankararao, G.S.J.G., Baby, P., Rajendra, P.Y. 1991. Leaf oil of *Coleus amboinicus* Lour: The in vitro antimicrobial studies. *Perfumerie Kosmetics*, 72, 744-745.
- Alonso, J., Alique, R. 2004. Influence of edible coating on shelf life and quality of *Picota* sweet cherries. *European Food Research and Technology*, 218, 535-539.
- Al-Sabagh, A.M. 2002. The relevante HLB of surfactants on the stability of asphalt emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204, 73-83.
- Appendini, P., Hotchkiss, J.H. 2002. Review of antimicrobial food packaging. Innovative. *Food Science and Technologies*, 3, 113-126.
- ASTM. 1995. Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standard Designations: E96-95. En: Annual Book of American Society for Testing Materials, West Conshohocken, PA, USA.

- ASTM. 1996. Standard practice for maintaining constant relative humidity by means of aqueous solutions. Standard Designations: E104-85. En: Annual Book of American Society for Testing Materials, West Conshohocken, PA, USA.
- ASTM. 1999. Standard test method for specular gloss. Standard Designation: D523-89. En: Annual Book of American Society for Testing Materials, West Conshohocken, PA, USA.
- ASTM. 2001. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard Designation: D882-09. En: Annual Book of American Society for Testing Materials, West Conshohocken, PA, USA.
- Aust, L.B., Gacula, M.C., Beard, S.A., Washam, R.W. 1985. Degree of difference test method in sensory evaluation of heterogeneous product types. *Journal of Food Science*, 50, 511-513.
- Avena-Bustillos, R.J., Krochta, J.M., Saltveit, M.E., Rojas-Villegas, R.J., Saucedo-Pérez, J.A. 1994. Optimization of edible coatings formulations on zucchini to reduce water loss. *Journal of Food Engineering*, 21, 197-214.
- Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G.A., Wang, C.Y., Wang, S.Y. 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT-Food Science and Technology*, 37, 687-695.

**B**

- Bai, J.H., Alleyne, V., Hagenmaier, R.D., Mattheis J.P., Baldwin E.A. 2003a. Formulation of zein coatings for apples (*Malus domestica borkh*). *Postharvest Biology and Technology*, 28, 259-268.
- Bai, J.H., Hagenmaier, R.D., Baldwin, E.A. 2003b. Coating selection for *Delicious* and others apples. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 381-390.
- Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Chen, X., Hagenmaier, R.D. 1996. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, 9, 151-163.
- Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O., Hagenmaier, R.D., Baker, R.A. 1997. Use of lipids in coatings for food products. *Food Technology*, 51, 56-64.

- Baldwin, E.A., Burns, J.K., Kazokas, W., Brecht, J.K., Hagenmaier, R.D., Bender, R.J., Pesis, E. 1999. Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica* L.) ripening during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 17, 215-226.
- Bankova, V. 2000. Determining quality in propolis samples. *Journal of the American Apither Society*, Vol 7, N° 2.
- Banks, N.H. 1983. Evaluation of methods for determining internal gases in banana fruit. *Journal of Experimental Botany*, 34, 871-879.
- Banks, N.H. 1984. Some effects of Tal Pro-Long coating on ripening bananas. *Journal of Experimental Botany*, 35, 127-137.
- Banks, N.H. 1985. Internal atmosphere modification in Pro-long® coated apples. *Acta Horticulturae*, 157, 105-112.
- Barreto, P.L.M., Roeder, J., Crespo, J.S., Maciel, G.R., Terenzi, H., Pires, A.T.N., Soldi, V. 2003. Effect of concentration, temperature and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films. *Food Chemistry*, 82, 425-431.
- Baruah, P., Sharma, R.K., Singh, R.S., Ghosh, A.C. 1996. Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*. *Journal of Essential Oil Research*, 8, 411-441
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15-27.
- Berthold, J., Desbrieres, J., Rinaudo, M., Salmen, L. 1994. Types of adsorbed water in relation to the ionic groups and their counterions for some cellulose derivatives. *Polymer*, 35, 5729-5736.
- Beuchat, L.R., Golden, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 43, 134-142.
- Brindle, L.P., Krochta, J.M. 2008. Physical properties of whey protein hydroxypropylmethylcellulose blend edible films. *Journal of Food Science*, 73, 446-454.

- Brito, A. 2009. Control de podredumbres y calidad poscosecha de limones tratados con recubrimientos naturales. Tesis de Master. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Brunauer, S., Deming, L.S., Deming, W.E., Teller, E. 1940. On a theory of de van der waals adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society*, 62, 1723-1732.
- Budija, F., Kricej, B., Petric, M. 2008. Possibilities of use of propolis for wood finishing. *Wood Research*, 53, 91-101.
- Burdock, G.A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347-363.

## C

- Cagri, A., Ustunol, Z., Ryser, E.T. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67, 833-848.
- Campanella, O.H., Dorward, N.M., Singh, H. 1995. A study of the rheological properties of concentrated food emulsions. *Journal of Food Engineering*, 25, 427-440.
- Castelló, M.L., Fito, P.J., Chiralt, A. 2006. Effect of osmotic dehydration and vacuum impregnation on respiration rate of cust strawberries. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 1171-1179.
- Castro, I., Gonçalves, O., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. 2002. Comparative study of Selva and Camorosa strawberries for the commercial market. *Food Chemistry and Toxicology*, 67, 2132-2137.
- Cavaco, A.M., Cruz, C., Ferreira, A.L., Guia, M.D., Antunes, M.D., Miguel, M.G. 2008. Pigments, protein and activity of antioxidant enzymes in propolis collected at various sites of Algarve. En: Oria, R., Val, J., Ferrer, A. (eds.). *Avances en Maduración y Post-recolección de Frutas y Hortalizas*. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España, pp. 286-293
- Cha, D.S., Chinnan, M.S. 2004. Bipolymer-based antimicrobial packaging: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 223-237.



- Chi, S., Zivanovic, S., Penfield, M.P. 2006. Application of chitosan films enriched with oregano essential oil on Bologna. Active compounds and sensory attributes. *Food Science and Technology International*, 12, 111-117.
- Chien, P.J., Sheu, F., Yang, F.H. 2007. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, 78, 225-229.
- Chinnan, M., Park, H.J. 1995. Effect of plasticizer level and temperature on water vapor transmission of cellulose-based edible films. *Journal of Food Process Engineering*, 18, 417- 429.
- Cho, S.Y., Park, J.W., Batt, H.P., Thomas, R.L. 2007. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 418-423.
- Cho, S.Y., Rhee, C. 2004. Mechanical properties and water vapour permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. *LWT-Food Science and Technology*, 37, 833-839.
- Choi, Y.H., Lee, W.Y., Nam, S.Y., Choi, K.C., Park, Y.E. 1999. Apoptosis induced by propolis in human hepatocellular carcinoma cell line. *International Journal of Molecular Medicine*, 4, 29-32.
- Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G.J., Haroutounian, S.A. 2004. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8261-8267.
- Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Skandamis, P.N., Haroutounian, S.A, Nychas, G.J.E. 2008. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1586-1869.
- Cordenunsi, B.R., Nascimento, J.R.O., Lajolo, F.M. 2003. Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. *Food Chemistry*, 83, 167-173.

- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130-135.
- Cuero, R.G. 1999. Antimicrobial action of exogenous chitosan. En: Jollès, P., Muzzarelli, R.A.A. (eds.). *Chitin and Chitinases*. Ed. Birkhäuser Verlag, Switzerland, pp. 315-333.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J.L., Guilbert, S. 1996. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. *Journal of Food Science*, 61, 580-584.
- Curtis, G.J. 1988. Some experiments with edible coatings on the long-term storage of citrus fruit. Proceedings of the Sixth International Citrus Congress. Tel Aviv, Israel, pp. 1515-1520.

## D

- Dalgleish, D.G. 2006. Food emulsions-Their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids*, 20, 415-422.
- Dangaran, K.L., Cooke, P., Tomasula, P.M. 2006. The effect of protein particle size reduction on the physical properties of CO<sub>2</sub>-precipitated casein films. *Journal of Food Science*, 71, 196-201.
- Davidson, P.M., Branen, A.L. 1993. *Antimicrobial in Foods*. 2<sup>nd</sup> ed. Ed. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Davidson, P.M., Naidu, A.S. 2000. Phyto-Phenols. En: Naidu, A.S. (ed.). *Natural Food Antimicrobial Systems*. Ed. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 265-294.
- de Capdeville, G., Wilson, C.L., Beer, S.V., Aist, J.R. 2002. Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested *Red Delicious* apple fruit. *Phytopathology*, 92, 900-908.
- de Moura, M.R., Aouada, F.A., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Krochta, J.M., Mattoso, L.H.C. 2009. Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropylmethylcellulose edible films with chitosan tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 92, 448-453.

- Deans, S.G., Ritchie, G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5, 165-180.
- Debeaufort, F., Voilley, A. 1995. Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films. *International Journal of Food Science and Technology*, 30,183-190.
- Debeaufort, F., Voilley, A. 1997. Methylcellulose-based edible films and coatings: 2. Mechanical and thermal properties as a function of plasticizer content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 685-689.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.A., Volley, A. 1998. Edible films and coatings: Tomorrow's packaging: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 229-313.
- del Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A., Galotto, M.J. 2005. Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf life. *Food Chemistry*, 91, 751-756.
- Dhalla, R., Hanson, W. 1988. Effect of permeable coating on the storage life of fruits. II. Pro-Long treatments of mangoes (*Mangifera indica* L. cv. Julie). *International Journal of Food Science and Technology*, 23, 107-112.
- Dickinson, E. 1992. An Introduction to Food Colloids. Oxford University Press. Oxford.
- Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes.
- Directiva 98/72/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de octubre de 1998 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes.
- Drake, S.R., Fellman, J.K., Nelson, J.W. 1987. Postharvest use of sucrose polyesters for extending the shelf-life of stored *Golden Delicious* apples. *Journal of Food Science*, 52, 1283-1285.
- Drake, S.R., Kupferman, E.M., Fellman, J.K. 1988. *Bing* sweet cherry (*Prunus avium* L.) quality as influenced by wax coatings and storage temperature. *Journal of Food Science*, 53, 124-126.
- Drapak, S.I., Bakhtinov, A.P., Gavrylyuk, S.V., Drapak, I.T., Kovalyuk, Z.D. 2006a. Structural and optical characterization of the propolis films. *Applied Surface Science*, 253, 279-282.

- Drapak, S.I., Bakhtinov, A.P., Gavrilyuk, S.V., Prylutsky, Yu.I., Kovalyuk, Z.D. 2006b. X-ray diffraction investigation of the structure of propolis films. *Physics of the Solid State*, 48, 1602-1604.
- Drapak, S.I., Gavrilyuk, S.V., Kaminskii, V.M., Kovalyuk, Z.D. 2008. X-ray diffraction study of the molecular propolis films deposited from an alcohol solution onto the cleavage surfaces of layered  $V_2VI_3$  compounds. *Technical Physics*, 53, 1215-1221.
- Du, W.X., Olsen, C.W., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Levin, C.E., Friedman, M. 2009a. Effects of allspice, cinnamon, and clove bud essential oils in edible apple films on physical properties and antimicrobial activities. *Journal of Food Science*, 74, 372-378.
- Du, W.X., Olsen, C.W., Avena-Bustillos, R.J., McHugh, T.H., Levin, C.E., Mandrell, R., Friedman, M. 2009b. Antibacterial effects of allspice, garlic, and oregano essential oils in tomato films determined by overlay and vapour-phase methods. *Journal of Food Science*, 74, 390-397.
- Duan, J.Y., Cherian, G., Zhao, Y.Y. 2010. Quality enhancement in fresh and frozen lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets by employment of fish oil incorporated chitosan coatings. *Food Chemistry*, 119, 524-532.
- Durk, E. 1997. The ability of bee products to modulate human immuno system. Eight International Symposium on Trends in Biomedicine in Finland: Allergy, Oxidants and Antioxidants, and Human Health. Orion, Finland.

## E

- Eklund, T. 1985. Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic acid and propionic acids and esters of p-hydroxy-benzoic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 2, 159-163.
- El Gaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R., Boulet, M. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science*, 56, 1618-1620.
- Essawi, T., Srour, M. 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 343-349.

Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N.S., Johnson, M.G. 2004. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*. *Journal of Food Science*, 69, 79-84.

## F

Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. 2008. Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85, 393-400.

Fabra, M.J., Jiménez, A., Atarés, L., Talens, P., Chiralt, A. 2009a. Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10, 1500-1507.

Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. 2009b. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23, 676-683.

Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. 2010. Influence of calcium on tensile, optical and water vapour permeability properties of sodium caseinate edible films. *Journal of Food Engineering*, 96, 356-364.

Fallik, E., Shalom, Y., Alkalai-Tuvia, S., Larkov, O., Brandeis, E., Ravid, U. 2005. External, internal and sensory traits in Gala-type melon treated with different waxes. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 69-75.

Fan, Y., Xu, Y., Wang, D., Zhang, L., Sun, J., Sun, L., Zhang, B. 2009. Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria x ananassa*) preservation quality. *Postharvest Biology and Technology*, 53, 84-90.

Farré, R., Frasset, I., Sánchez, A. 2004. Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, 45, 21-43.

Fayaz, A.M., Balaji, K., Girilal, M., Kalaichelvan, P.T., Venkatesan, R. 2009. Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6246-6252.

- FDA 21CFR172. 2006. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Subpart C. Coatings, Films and Related Substances. Code of Federal Regulations, Title 21, Volume 3.
- Fellows, P. 1990. *Food Processing Technology: Principles and Practice*. Ed. Ellis Horwood, New York, USA.
- Ferreira, R.M., Viña, S.Z., Mugridge, A., Chaves, A.R. 2007. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. *Scientia Horticulturae*, 112, 27-32.
- Fonseca, S.C., Oliveira, F.A.R., Jeffrey, K., Brecha, J.K. 2002. Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: A review. *Journal of Food Engineering*, 52, 99-119.
- Fontan, C.F., Chirife, J., Sancho, E., Iglesias, H.A. 1982. Analysis of a model for water sorption phenomena in foods. *Journal of Food Science*, 47, 1590-1594.
- Franssen, L.R., Krochta, J.M. 2003. Edible coatings containing natural antimicrobials for processed foods. En: Roller, S. (ed.). *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Ed. Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge, UK, pp. 250-262.
- G**
- Gadang, V.P., Hettiarachchy, N.S., Johnson, M.G., Owens, C. 2008. Evaluation of antibacterial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a turkey Frankfurter system. *Journal of Food Science*, 73, 389-394.
- Gamage, G.R., Park, H.J., Kim, K.M. 2009. Effectiveness of antimicrobial coated oriented polypropylene/polyethylene films in sprout packaging. *Food Research International*, 42, 832-839.
- García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. 2000. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science*, 65, 941-947.
- García, M.A., Pinotti, A., Martino, N.M., Zaritzky, N.E. 2004. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 395-345.

- Gaudin, S., Lourdin, D., Le Botlan, D., Ilari, J.L., Colonna, P. 1999. Plasticization and mobility in starch-sorbitol films. *Journal of Cereal Science*, 29, 273-284.
- Gennadios, A., Weller, C.L. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 44, 63-69.
- Gennadios, A., Weller, C.L. 1991. Edible films and coatings from soymilk and soy protein. *Cereal Foods World*, 36, 1004-1009.
- Gennadios, A., Weller, C.L., Gooding, C.H. 1994. Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21, 395-409.
- Ghisalberti, E. 1979. Propolis: A review. *Bee World*, 60, 59-84.
- Glicksman, M. 1983. *Food Hydrocolloids*. Vol. III. Ed. CRC Press Inc., Boca Raton, USA.
- Gogoi, R., Baruah, P., Nath, S.C., 1997. Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* Pers. *Journal of Essential Oil Research*, 9, 213-215.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B., Gómez-Guillén, M.C. 2007. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 105, 511-520.
- Gómez-Estaca, J., de Lacey, A., Gómez-Guillén, M.C., López-Caballero, M.E., Montero, P. 2009. Antimicrobial activity of composite edible films base don fish gelatina and chitosan incorporated with clove Essentials oil. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18, 46-52.
- Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.L. 1992. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57, 190-195.
- Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, J.L. 1993. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water-vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58, 206-211.
- Gontard, N., Guilbert, S. 1994. Bio-packaging: Technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. En: Mathlouthi, M. (ed.). *Food*

- Packaging and Preservation*. Ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, pp.159-181.
- Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B., Guilbert, S. 1996. Influence of relative humidity and film composition on oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1064-1069.
- Goswami, N., Han, J.H., Holley, R.A. 2009. Effectiveness of antimicrobial starch coating containing thyme oil against *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, and *Pseudomonas* on chicken breast meat. *Food Science and Biotechnology*, 18, 425-431.
- Greener, I., Fennema, O. 1994. Edible films and coatings: Characteristics, formation, definitions, and testing methods. En: Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O. (eds.). *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Ed. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, USA, pp. 1-24.
- Guiga, W., Galland, S., Peyrol, E., Degraeve, P., Carnet-Pantiez, A., Sebti, I. 2009. Antimicrobial plastic film: Physico-chemical characterization and nisin desorption modeling. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 203-207.
- Guilbert, S. 1986. Technology and application of edible protective films. En: Mathlouthi, M. (ed.). *Food Packaging and Preservation. Theory and Practice*. Ed. Elsevier Applied Science Publishers, New York, USA, pp. 371-394.
- Guilbert, S. 1988. Use of superficial edible layer to protect intermediate moisture foods: application to the protection of tropical fruit dehydrated by osmosis. En: Seow, C.C., Teng, T.T., Quah, C.H. (eds.). *Food Preservation by Moisture Control*. Ed. Elsevier Applied Science Publishers, London, UK, pp. 199-219.
- Guilbert, S. 2000. Edible Films and Coatings and Biodegradable Packaging. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 346, 10-16.
- Guilbert, S., Gontard N., Cuq, B. 1995. Technology and applications of edible protective films. *Packaging Technology and Science*, 8, 339-346.
- Guilbert, S., Gontard, N., Gorris, L.G.M. 1996. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT-Food Science and Technology*, 29, 10-17.



Gutiérrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, R. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91-97.

## H

Hadwiger, L.A., Beckman, J.M. 1980. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiology*, 66, 205-211.

Hagenmaier, R.D., Baker, R.A. 1993. Reduction in gas exchange of citrus fruit by wax coatings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 283-287.

Hagenmaier, R.D., Baker, R.A. 1997. Edible coatings from morpholine-free wax microemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 349-352.

Hagenmaier, R.D., Shaw, P.E. 1990. Moisture permeability of edible films made with fatty acid and hydroxypropylmethylcellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1799-1803.

Ham-Pichavant, F., Sèbe, G., Pardon, P., Coma, V. 2005. Fat resistance properties of chitosan-based paper packaging for food applications. *Carbohydrate Polymers*, 61, 259-265.

Han, C., Zhao, Y., Leonard, S.W., Traber, M.G. 2004. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, 33, 67-78.

Han, C., Lederer, C., McDaniel, M., Zhao, Y. 2005. Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*) coated with chitosan-based edible coatings. *Journal of Food Science*, 70, 172-178.

Hartmann, V., Vermant, J., Heinrich, E., Mewis, J., Moldenaers, P. 2000. Effects of particles on the steady state and transient rheology of lyotropic hydroxypropylcellulose solutions. *Journal of Rheology*, 44, 1417-1432.

Hayakawa, K., Kawaguchi, M., Kato, T. 1997. Protective colloidal effects of hydroxypropyl methylcellulose on the stability of silicon oil emulsions. *Langmuir*, 13, 6069-6073.

- Hernández, E. 1994. Edible coatings from lipids and resins. En: Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O. (eds.). *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Ed. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, USA, pp. 279-303.
- Hernández-Muñoz, P., Villalobos, R., Chiralt, A. 2004. Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. *Food Hydrocolloids*, 18, 647-654.
- Hiemenz, P.C., Rajagopalan, R. 1997. Surface tension and contact angle. En: Hiemenz, P.C., Rajagopalan, R. (eds.). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Ed. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 248-255.
- Hood, L.L. 1987. Collagen in sausages casings. *Advances in Meat Research*, 4, 109.
- Hsu, J.P., Nacu, A. 2003. Behavior of soybean oil-in-water emulsion stabilized by nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science*, 259, 374-381.
- Hutchings, J.B. 1999. *Food Color and Appearance*, 2<sup>nd</sup> ed. Ed. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA.

## I

- Isla, M.I., Moreno, M.I.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. 2001. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 165-170.
- ISO 4833. 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30°C. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO 7954. 1987. General guidance for enumeration of yeasts and moulds. Colony-count technique at 25°C. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

## J

- Jeon, Y.J., Kamil, J.Y.V.A., Shahidi, F. 2002. Chitosan as an edible film for quality preservation of Herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5167-5178.
- Jiang, Y., Li, Y. 2001. Effect of chitosan coating on postharvest life and quality and longan fruit. *Food Chemistry*, 73, 39-143.

- Joerger, R.D. 2007. Antimicrobial films for food applications: A quantitative analysis of their effectiveness. *Packaging Technology and Science*, 20, 231-273.
- Juliano, C., Pala, C.L., Cossu, M. 2007. Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 17, 177-181.

## K

- Kabara, J.J. 1983. Medium-chain fatty acids and esters. En: Branen, A.L., Davidson, P.M. (eds.). *Antimicrobials in Foods*. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, p.109.
- Kabara, J.J., Eklund, T. 1991. Organic acids and esters. En: Russell, N.J., Gould, G.W. (eds.). *Food Preservatives*. Ed. Blackie and Son, Glasgow, UK, p. 23.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V.T. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452-461.
- Kamper, S.L., Fennema, O. 1984a. Water vapor permeability of edible bilayer films. *Journal of Food Science*, 49, 1478-1481, 1485.
- Kamper, S.L., Fennema, O. 1984b. Water vapor permeability of an edible, fatty acid bilayer film. *Journal of Food Science*, 49, 1482-1484.
- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U., Ilcim, A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the Essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 183-186.
- Karbowiak, T., Debeaufort, F., Voilley, A. 2006. Importance of surface tension characterization for food pharmaceutical and packaging products: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 391-407.
- Kaufman, V.R., Garti, N. 1981. Spectral absorption measurements for determination of ease of formation and stability of oil in water emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2, 475-490.

- Kester, J.J., Fennema, O. R. 1985. Use of edible films to maintain water vapour gradients in foods. *Journal of Food Science*, 50, 382-384.
- Kester, J.J., Fennema, O.R. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technology*, 40, 47-59.
- Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., Hardy, J. 2004. Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 239-251.
- Kim, S., Fung, D.Y.C. 2004. Antibacterial effect of water soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extracts on foodborne pathogens in ground beef and mushroom soup. *Journal of Food Protection*, 67, 1953-1956.
- Koelsch, C.M., Labuza, T.P. 1992. Functional, physical and morphological properties of methyl cellulose and fatty acid-based edible barriers. *LWT-Food Science and Technology*, 25, 404-411.
- Koelsch, C. 1994. Edible water vapor barriers: properties and promise. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 76-81.
- Krell, R. 1996. Value-added products from beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin, N° 124.
- Kristo, E., Koutsoumanis, K.P., Biliaderis, C.G. 2008. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22, 373-386.
- Krochta, J.M. 1997a. Edible protein films and coatings. En: Damodaran, S., Paaraf, A. (eds.). *Food Proteins and their Applications in Foods*. Ed. Marcel Dekker, New York, USA.
- Krochta, J.M. 1997b. Edible composite moisture-barrier films. En: Blakistone, B. (ed.). *Packaging Yearbook: 1996*. Ed. National Food Processors Association, Washington DC, USA.
- Krochta, J.M., de Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, 51, 61-74.
- Kumar, S. 2006. Functional coatings and microencapsulation: A general perspective. En: Kumar, S. (ed.). *Functional Coatings*. Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

## L

- Labuza, T.P., Kaanane, A., Chen, J.Y. 1985. Effect of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity shift of two dehydrated foods. *Journal of Food Science*, 50, 385-391.
- Larotonda, F.D.S., Matsui, K.N., Sobral, P.J.A., Laurindo, J.B. 2005. Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. *Journal of Food Engineering*, 71, 394-402.
- Lawless, H.T., Heymann, H. 1998. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. Ed. Chapman & Hall, New York, USA.
- Lee, J.Y., Park, H.J., Lee, C.Y., Choi, W.Y. 2003. Extending shelf life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *LWT-Food Science and Technology*, 26, 323-329.
- Li, S., Martelluci, S., Bruce, R., Kinyon, A., Hay, M., Higgins, J. 2002. Evaluation of the film-coating properties of a hydroxyethylcellulose-hydroxypropylmethylcellulose polymer system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28, 389-401.
- Lim, G.O., Hong, Y.H., Song, K.B. 2010. Application of *Gelidium corneum* edible films containing carvacrol for ham packages. *Journal of Food Science*, 75, 90-93.
- Lima, A.M., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Santos, E.C.M., Teixeira, J.A., Moreira, R.A., Vicente, A.A. 2010. New edible coatings composed of galactomannans and collagen blends to improve the postharvest quality of fruits-Influence on fruits gas transfer rate. *Journal of Food Engineering*, 97, 101-109.
- Lis-Balchin, M., Deans, S.G., Eaglesham, E. 1998. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 98-104.
- Liu, L., Kerry, J.K., Kerry, J.P. 2006. Effect of food ingredients and selected lipids on the physical properties of extruded edible films/casings. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 295-302.
- López-Malo, A., Alzamora, S.M., Palou, E. 2005. Naturally occurring compounds: Plant sources. En: Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branen, A.L. (eds.). *Antimicrobials in Food*. 3<sup>rd</sup> ed. Ed. CRC Press, New York, USA, pp. 429-251.

## M

- Ma, L., Barbosa-Cánovas, G.V. 1993. Review: Rheological properties of food gums and gum mixtures. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 33, 133-163.
- Maas, J.L., 1981. Postharvest diseases of strawberry. En: Childers, N.F. (ed.). *The Strawberry. Cultivars to Marketing*. Ed. Horticultural Publications, Gainesville, Florida, USA, pp. 329-353.
- Maftoonazad, N., Ramaswamy, H.S. 2005. Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coatings. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 617-624.
- Mali, S., Grossmann, M.V.E. 2003. Effects of yam starch on storability and quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 7005-7011.
- Marino, M., Bersani, C., Comi G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 187-195.
- Martín-Polo, M., Maughuin, C., Voilley, A. 1992a. Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 1. Influence of the film preparation technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 407-412.
- Martín-Polo, M., Voilley, A., Blond, G., Colas, B., Mesnier, M., Ploquet, N. 1992b. Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 2 Influence of the physical state. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 413-418.
- Martins, J.T., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Avides, M.C., Vicente A.A. 2010. Shelf life extension of Ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1884-1891.
- Maté, J.I., Frankel, E.N., Krochta, J.M. 1996. Whey protein isolate edible coatings: Effect on the rancidity process of dry roasted peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1736-1740.

- McClements, D.J. 2005. *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques*. 2<sup>nd</sup> ed. Ed. CRC Press Inc., Boca Raton, USA.
- McClements, D.J. 2007. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 611-649.
- McHugh T.H., Avena-Bustillos, R., Krochta, J.M. 1993. Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58, 899-903.
- McHugh, T.H., Krochta, J.M. 1994a. Dispersed phase particle-size effects on water-vapor permeability of whey-protein beeswax edible emulsion films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 18, 173-188.
- McHugh, T.H., Krochta, J.M. 1994b. Sorbitol-plasticized vs glycerol-plasticized whey-protein edible films-integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 841-845.
- McHugh, T.H., Krochta, J.M. 1994c. Water-vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71, 307-312.
- McHugh, T.H., Krochta, J.M. 1994d. Permeability properties of edible films. En: Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O. (eds.). *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Ed. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, USA, pp. 139-187.
- McHugh, T.H., Aujard, J.F., Krochta, J.M. 1994. Plasticized whey protein edible films: Water vapor permeability properties. *Journal of Food Science*, 59, 416-423.
- McHugh, T.H. 1996. Effects of macromolecular interactions on the permeability of edible films. En: Parris, N., Kato, A., Creamer, L.K., Pearce, J. (eds.). *Macromolecular Interactions Technology*. ACS Symposium series 650, pp. 133-144.
- McHugh, T.H., Senesi, E. 2000. Apple wraps: A novel method to improve the quality and extend the self life of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 65, 480-485.

- Meepagala, K.M., Sturtz, G., Wedge, D.E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6989-6992.
- Mei, Y., Zhao, Y. 2003. Barrier and mechanical properties of milk protein-based edible films containing nutraceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1914-1918.
- Meilgaard, M., Civille, G.V., Carr, B.T. 1991. *Sensory Evaluation Techniques*. 2<sup>nd</sup> ed. Ed. CRC Press Inc., Boca Raton, USA, pp. 354.
- Meng, X., Li, B., Liu, J., Tian, S. 2008. Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 106, 501-508.
- Mihaliak, C.A., Gershenzon, J., Croteau, R. 1991. Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants. Implications for theories of plant chemical defense. *Oecologia*, 87, 373-376.
- Miller, K.S., Krochta, J.M. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 228-237.
- Min, S., Krochta, J.M. 2005. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *Journal of Food Science*, 74, 73-79.
- Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., Calder, P.C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and mobility of bacteria. *Microbiological Research*, 152, 239-246.
- Mitchell, J.R. 1979. Rheology of polysaccharide solutions and gels. En: Blanshard, J.M., Mitchell, J.R. (eds.). *Polysaccharides in Food*. Ed. Butterworth and Co. Publishers Ltd., London, UK.
- Moldao-Martins, M., Beirao-da-Costa, S.M., Beirao-da-Costa, M.L. 2003. The effects of edible coatings on postharvest quality of the *Bravo de Esmolfe* apple. *European Food Research and Technology*, 217, 325-328.
- Monedero, F.M., Fabra, M.J., Talens, P., Chiralt, A. 2009. Effect of oleic acid-beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering*, 91, 509-515.



- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., Voilley, A. 2002. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 67-89.
- Moules, C.A. 1995. Surface effects including interfacial tension, wettability, contact angles and dispersibility. En: Beckett, S.T. (ed.). *Physico-Chemical Aspects of Food Processing*. Ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, pp. 167-192.
- Muller, C., Borges, J., Yamashita, F. 2008. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymers*, 72, 82-87.
- Muller, C., Borges, J., Yamashita, F. 2009. Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films. *Food Hydrocolloids*, 23, 1328-1333.
- Murakami, K., Chang, S.Y., Routtenberg, A. 1986. Protein kinase C activation by cis-fatty in the absence of  $Ca^{2+}$  and phospholipids. *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 15424-15429.
- Muzzarelli, C., Muzzarelli, R.A.A. 2003. Chitin related food science today (and two centuries ago). *Agro Food Industry Hi-Tech*, 14, 39-42.
- Myllarinen, P., Partanen, R., Seppala, J., Forssell, P. 2002. Effect of glycerol on behaviour of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymer*, 50, 355-361.

## N

- Namesny, A. 1999. *Post-recolección de Hortalizas*. Vol. III. Ediciones de Horticultura, Reus, España.
- Navarro, M. 2009. Nuevos recubrimientos antimicrobianos para el control postcosecha de la podredumbre azul de los cítricos. Tesis de Master. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Nísperos-Carriedo, M.O., Baldwin, E.A., Shaw, P.E. 1992. Development of an edible coating for extending postharvest life of selected fruits and vegetables. Proceedings of the Annual Meeting Florida State Hort. Society, 104, 122-125.

- Nisperos-Carriedo, M.O. 1994. Edible coatings and films based on polysaccharides. En: Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M. (eds.). *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Ed. CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 305-335.
- Nussinovitch, A., Ward, G., Lurie, S. 1996. Nondestructive measurement of peel gloss and roughness to determine tomato fruit ripening and chilling injury. *Journal of Food Science*, 61, 383-387.

## O

- O'Mahony, M. 1986. *Sensory Evaluation of Food: Statistical Methods and Procedures*. Ed. Marcel Dekker, New York, USA.
- Ochoa-Machiste, G., Buckton, E. 1996. Dynamic surface tension studies of hydroxypropylmethylcellulose film-coating solutions. *International Journal of Pharmaceutics*, 145, 97-201.
- Ohl, N., Gleissle, W. 1993. The characterization of the steady-state shear and normal stress functions of highly concentrated suspension formulated with viscoelastic liquid. *Journal of Rheology*, 37, 381-406.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. 2008. Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 87-94.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A., Holley, R.A. 2002. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 139-148.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73, 236-244.
- Ozcan, M. 1999. Antifungal properties of propolis. *Grasas y Aceites*, 50, 395-398.

## P

- Padgett, T. Han, I.Y., Dawson, P.L. 1998. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection*, 61, 1330-1335.
- Park, J.W., Testin, R.F., Park, H.J., Vergano, P.J., Weller, C.L. 1994. Fatty acid concentration effect on tensile strength, elongation, and water vapor permeability of laminated edible films. *Journal of Food Science*, 59, 916-919.
- Park, H.J. 1999. Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 254-260.
- Park, S.Y., Lee, B.I., Jung, S.T., Park, H.J. 2001. Biopolymer composite films based on k-carrageenan and chitosan. *Materials Bulletin Research*, 36, 511-519.
- Park, S.I., Zhao, Y. 2004. Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1933-1939.
- Pastor, C.**, Vargas, M., González-Martínez, C. 2005. Recubrimientos comestibles: Aplicación a frutas y hortalizas. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 197, 130-135.
- Pelayo, C., Ebeler, S.E., Kader, A.A. 2003. Postharvest life and flavor quality of three strawberry cultivars kept at 5°C in air or air + 20 kPa CO<sub>2</sub>. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 171-183.
- Peleg, M. 1979. Characterization of stress relaxation curve of solid foods. *Journal of Food Science*, 44, 277-281.
- Pérez, L. 2003. Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad *Blanquilla*) mínimamente procesada. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Pérez-Gago, M.B., Krochta, J.M. 2001. Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 996-1002.
- Pérez-Gago, M.B., Serra, M., Alonso, M., Mateos, M., del Río, M.A. 2006. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 84-92.

- Peterson, M., Stading, M. 2005. Water vapour permeability and mechanical properties of mixed starch-monoglyceride films and effect of film forming conditions. *Food Hydrocolloids*, 19, 123-132.
- Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Martinez-de-Oliveira, J. 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18, 73-78.
- Pinotti, A., García, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. 2007. Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 21, 66-72.
- Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S., Sousa, I. 2009. Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 72, 1891-1896.
- Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S., Sousa, I. 2010. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21, 240-246.
- Pitarokili, D., Tzakou, O., Couladis, M., Verykokidou, E. 1999. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Salvia pomifera* subsp. *calycina* growing wild in Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 11, 655-659.
- Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Biton, A. 2005. Effects of polyethylene wax content and composition on taste, quality, and emission of off-flavor volatiles in *Mor* mandarins. *Postharvest Biology and Technology*, 38, 262-268.
- Pranoto, Y., Rakshit, S.K., Salokhe, V.M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic acid, potassium sorbate and nisin. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 859-865.

## R

- Rahate, A.R., Nagarkar, J.M. 2007. Emulsification of vegetable oils using a blend of nonionic Surfactants for cosmetic applications. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 28, 1077-1080.

- Reuveni, R., Fleischer, A., Putievsky, E. 1984. Fungistatic activity of essential oils from *Ocimum Basilicum* Chemotypes. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology*, 110, 20-22.
- Ribeiro, C., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Miranda, C. 2007. Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 63-70.
- Rice, J. 1994. What's new in edible films? *Food Processing*, 55, 61-62.
- Rocculi, P., Romani, S., Dalla Rosa, M. 2005. Effect of MAP with argon and nitrous oxide on quality maintenance of minimally processed kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 319-328.
- Rodríguez, M., Osés, J., Ziani, K., Maté, J.I. 2006. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International*, 39, 840-846.
- Rojas-Argudo, C., del Río, M.A., Pérez-Gago, M.B. 2009. Development and optimization of locust bean gum (LBG) based edible coatings for postharvest storage of *Fortune* mandarins. *Postharvest Biology and Technology*, 52, 227-234.
- Rojas-Graü, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Friedman, M., Henika, P.R., Martín-Belloso, O., McHugh, T.H. 2006. Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9262-9267.
- Rojas-Graü, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P.R., Martín-Belloso, O., Pan, Z., McHugh, T.H. 2007a. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81, 634-641.
- Rojas-Graü, M.A., Tapia, M.S., Rodríguez, F.J., Carmona, A.J, Martín-Belloso, O. 2007b. Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut *Fuji* apples. *Food Hydrocolloids*, 21, 118-127.
- Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. 2009. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 438-447.

- Roland, I., Piel, G., Delattre, L., Evrard, B. 2003. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *International Journal of Pharmaceutics*, 263, 85-94.
- Rossi-Márquez, G., Han, J.H., García-Almendárez, B., Castaño-Tostado, E., Regalado-González, C. 2009. Effect of temperature, pH and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2492-2497.
- Roth, T., Loncin, M. 1984. Superficial activity of water. En: Mckenna, B.M. (ed.). *Engineering and Food*. Vol 1. Ed. Elsevier, London, UK, p. 433.
- Rowe, R.C. 1978. The measurement of the adhesion of film coating to tablet surface: The effect of tablet porosity, surface roughness and film thickness. *Journal of Pharmaceutical Science*, 30, 343-346.

## S

- Sagoo, S., Board, R., Roller, S. 2002. Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork. *Food Microbiology*, 19, 175-182.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. 2009. Characterization of edible films based on hydroxypropyl methylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 2102-2109.
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. 2010. Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*, 98, 443-452.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M.P. 2003. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 430-439.
- Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L., Jagus, R. 2006. Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*, 39, 749-754.
- Sapru, V., Labuza, T.P. 1994. Dispersed phase concentration-effect on water-vapor permeability in composite methyl cellulose-stearic acid edible film. *Journal of Food Processing and Preservation*, 18, 359-368.

- Sarkar, N., Walker, L.C. 1995. Hydration-dehydration properties of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *Carbohydrate Polymers*, 27, 177-185.
- Saucedo-Pompa, S., Rojas-Molina, R., Aguilera-Carbó, A.F., Saenz-Galindo, A., de la Garza, H., Jasso-Cantú, D., Aguilar, C.N. 2009. Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International*, 42, 511-515.
- Scazzocchio, F., D'Auria, F.D., Alessandrini, D., Pantanella, F. 2006. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, 161, 327-333.
- Schär, W., Rüegg, M. 1985. The evaluation of GAB constants from water vapor sorption data. *LWT-Food Science and Technology*, 18, 225-229.
- Scheller, S., Dworniczak, S., Waldemar-Klimmek, K., Rajca, M., Tomczyk, A., Shani, J. 1999. Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, 54, 549-553.
- Schulz, M.B., Daniels, R. 2000. Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 49, 231-236.
- Sebti, I., Pichavant, F.H., Coma, V. 2002. Edible bioactive fatty acid-cellulosic derivative composites used in food-packaging applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4290-4294.
- Sebti, I., Delves-Broughton, J., Coma, V. 2003. Physicochemical properties and bioactivity of nisin-containing cross-linked hydroxypropylmethylcellulose films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6468-6474.
- Sebti, I., Chollet, E., Degraeve, P., Noel, D., Peyrol, E. 2007. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 693-699.
- Sejersen, M.T., Tina Salomonsena, T., Ipsen, R., Clark, R., Rolin, C., Engelsen, S.B. 2007. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks. *International Dairy Journal*, 17, 302-307.

- Selvendran, R.R., Ryden, P.R. 1990. Isolation and analysis of plant cell walls. En: Dey, P.M., Harborne, J.B. (eds.). *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 2. Ed. Academic Press, London, UK, pp. 549-580.
- Seo, M., Kumacheva, E. 2002. Response of adsorbed layers of hydroxypropyl cellulose to variations in ambient humidity. *Colloid and Polymer Science*, 280, 607-615.
- Seydim, A.C., Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39, 639-644.
- Sharma, S.C. 1981. Gums and Hydrocolloids in oil-water emulsions. *Food Technology*, 35, 59-67.
- Shellhammer, T.H., Krochta, J.M. 1997. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *Journal of Food Science*, 62, 390-394.
- Shin, S.Y., Bajpai, V.K., Kim, H.R., Kang, S.C. 2007. Antibacterial activity of bioconverted eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) against foodborne pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 233-236.
- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1202-1205.
- Skandamis, P., Tsigarida, E., Nychas, G.J.E. 2002. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*, 19, 97-103.
- Smolelis, A.N., Hartsell, S.E. 1952. Factors affecting the lytic activity of lysozyme. *The Journal of Bacteriology*, 63, 665-674.
- Sovilj, V.J., Petrovic, L.B. 2006. Influence of hydroxypropylmethylcellulose-sodium dodecylsulfate interaction on the solution conductivity and viscosity and emulsion stability. *Carbohydrate Polymers*, 64, 41-49.
- Soylu, E.M., Ozdemir, A.E., Erturk, E., Sahinler, N., Soylu, S. 2008. Antifungal activity of propolis against postharvest disease agent *Penicillium digitatum*. *Asian Journal of Chemistry*, 20, 4823-4830.



- Spiess, W.E.L., Wolf, W.R. 1983. The results of the COST 90 Project on water activity. En: Jowitt, R., Escher, F., Hallstrom, B., Meffert, H.F.Th., Spiess, W.E.L., Vos, G. (eds.). *Physical Properties of Foods*. Ed. Applied Science Publishers, London, UK, pp. 65-91.
- Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Tharanathan, R.N. 2007. Effect of plastizicers and fatty acidson mechanical and permeability charcateristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1113-1122.

## T

- Taylor, D.J.F., Thomas, R.K., Penfold, J. 2007. Polymer/surfactant interaction at the air/water interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 132, 69-110.
- Tharanathan, R.N., Kittur, F.S. 2003. Chitin-The undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 61-87.
- Thompson, N. 1999. *Difference from Control Sensory Test (ICM)*. American Society of Brewing Chemists, Inc., pp. 168-171.
- Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, k., Bourke, P., Cullen, P.J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5987-6000.
- Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Hess-Pierce, B., Kader, A.A. 2001. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4748-4760.
- Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., Bruni, A. 1996. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy Research*, 10, 335-336.
- Trezza, T.A., Krochta, J.M. 2000a. Color stability of edible coatings during prolonged storage. *Journal of Food Science*, 65, 1166-1169.
- Trezza, T.A., Krochta, J.M. 2000b. The gloss of edible coatings as affected by surfactants, lipids, relative humidity, and time. *Journal of Food Science*, 65, 658-662.

Türe, H., Eroglu, E., Soyer, F., Özen, B. 2008. Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 2026-2032.

Tzoumaki, M.V., Biliaderis, C.G., Vasilakakis, M. 2009. Impact of edible coatings and packaging on quality of White asparagus (*Asparagus officinalis*, L.) during cold storage. *Food Chemistry*, 117, 55-63.

## U

UNE 87-004-79. 1997. Análisis sensorial. Guía para la instalación de una sala de cata. AENOR (ed.). *Análisis Sensorial. Tomo I: Alimentación. Recopilación de Normas UNE*. Ed. AENOR, Madrid, España, pp. 57-62.

UNE 87-005-92. 1997. Análisis sensorial. Prueba de comparación por parejas. AENOR (ed.). *Análisis Sensorial. Tomo I: Alimentación. Recopilación de Normas UNE*. Ed. AENOR, Madrid, España, pp. 75-81.

UNE 87-006-92. 1997. Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular. AENOR (ed.). *Análisis Sensorial. Tomo I: Alimentación. Recopilación de Normas UNE*. Ed. AENOR, Madrid, España, pp. 82-91.

UNE 87-008-92. 1997. Análisis sensorial de alimentos. Metodología. Guía general. AENOR (ed.). *Análisis Sensorial. Tomo I: Alimentación. Recopilación de Normas UNE*. Ed. AENOR, Madrid, España, pp. 92-111.

UNE 87-023-95. 1997. Análisis sensorial. Metodología. Ensayo de clasificación por ordenación. AENOR (ed.). *Análisis Sensorial. Tomo I: Alimentación. Recopilación de Normas UNE*. Ed. AENOR, Madrid, España, pp. 151-166.

## V

Valencia-Chamorro, S.A., Palou, L., del Río, M.A., Pérez-Gago, M.B. 2008. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by hydroxypropylmethylcellulose-lipid edible composite films containing food additives with antifungal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11270-11278.

Valencia-Chamorro, S.A., Pérez-Gago, M.B., del Río, M.A., Palou, L. 2009. Effect of antifungal hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)-lipid edible composite coatings on

- postharvest decay development and quality attributes of cold-stored *Valencia* oranges. *Postharvest Biology and Technology*, 54, 72-79.
- Valverde, J.M., Valero, D., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Castillo, A., Serrano, M. 2005. Novel edible coating based on aloe vera gel to maintain table grape quality and safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7807-7813.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. 2006. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41, 164-171.
- Vargas, M., Weiss, J., McClements, D.J. 2007a. Adsorption of protein-coated lipid droplets to mixed biopolymer-hydrogel surfaces: Role of biopolymer diffusion. *Langmuir*, 23, 13059-13065.
- Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. 2007b. Estudio preliminar del uso de recubrimientos de quitosano y de microorganismos eficaces en el control postcosecha de la podredumbre azul de naranjas. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones, Cartagena, España, pp.1415-1423.
- Vargas, M. 2008. Recubrimientos comestibles a base de quitosano: Caracterización y aplicación. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Vargas, M., **Pastor, C.**, Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. 2008a. Development of edible coatings for fresh fruits and vegetables: Possibilities and limitations. *Fresh Produce*, 2, 32-40.
- Vargas, M., **Pastor C.**, Chiralt, A., McClements, D.J. González-Martínez, C. 2008b. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally-processed fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 496-511.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. 2009a. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23, 536-547.
- Vargas, M., Chiralt, A., Albors, A., González-Martínez, C. 2009b. Effect of chitosan-based edible coatings applied by vacuum impregnation on quality preservation of fresh-cut carrot. *Postharvest Biology and Technology*, 53, 263-271.
- Vargas, M., González-Martínez, C. 2010. Recent patents on food applications of chitosan. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2, 121-128.

- Villalobos, R. 2003. Propiedades de recubrimientos comestibles formulados con hidroxipropil metilcelulosa y tensoactivos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Villalobos, R., Chanona, J., Hernández, P., Gutiérrez, G., Chiralt, A. 2005. Gloss and transparency of hydroxypropylmethylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, 19, 53-61.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P., Chiralt, A. 2006. Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropylmethylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20, 502-509.
- Villalobos-Carvajal, R., Hernández-Muñoz, P., Albors, A., Chiralt, A. 2009. Barrier and optical properties of edible hydroxypropylmethylcellulose coatings containing surfactants applied to fresh cut carrot slices. *Food Hydrocolloids*, 23, 526-535.
- Vojdani, F., Torres, J.A. 1989. Potassium sorbate permeability of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose multi-layer films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13, 417-430.

## W

- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M.A.J.S. 1999. *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*. Ed. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Ward, G., Nussinovitch, A. 1996. Gloss properties and surface morphology relationships of fruits. *Journal of Food Science*, 61, 973-977.
- Weiss, J., Takhistov, P., McClements, D.J. 2006. Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71, 107-116.
- Wild, R. 1994. *The Complete Book of Natural and Medical Cures*. Ed. Rodale Press, Inc., Emmaus, PA.
- Wollenweber, C., Makievski, A.V., Miller, R., Daniels, R. 2000. Adsorption of hydroxypropylmethylcellulose at the liquid:liquid interface and the effect on emulsion stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172, 91-101.

- Wong, D.W.S., Gastineau, F.A., Gregorski, K.S., Tillin, S.J., Pavlath, A.E. 1992. Chitosan-lipid films: Microstructure and surface energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 540-544.
- Wszelaki, A.L., Mitcham, E.J. 2000. Effects of superatmospheric oxygen on strawberry fruit quality and decay. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 125-133.
- Wu, S. 1974. Interfacial and surface tension of polymers. *Journal of Macromolecular Science/Reviews in Macromolecular Chemistry*, 10, 1-73.
- Wu, Y., Weller, C.L., Hamouz, F., Cuppet, S.L., Schnepf, M. 2002. Development and applications of multicomponent edible coatings and films: A review. *Advances in Food and Nutrition Research*, 44, 347-394.
- [www.interamsa.com](http://www.interamsa.com) (29/07/04).

## Y

- Yaman, O., Bayindirh, L. 2002. Effects of an edible coating and cold storage on shelf-life and quality of cherries. *LWT-Food Science and Technology*, 35, 146-150.
- Yener, F.Y.G., Korel, F., Yemenicioglu, A. 2009. Antimicrobial activity of lactoperoxidase system incorporated into cross-linked alginate films. *Journal of Food Science*, 74, 73-79.

## Z

- Zhang, D., Quantick, P.C. 1998. Antifungal effect of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73, 763-767.
- Zinoviadou, K.G., Koutsoumanis, K.P., Biliaderis, C.G. 2009. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82, 338-345.

ANEXOS





## Valores normalizados para el iluminante D65, observador 10°

$\lambda$	x	y	z
400	0,136	0,014	0,613
410	0,668	0,069	3,066
420	1,645	0,172	7,821
430	2,349	0,289	11,590
440	3,465	0,560	17,755
450	3,735	0,901	20,088
460	3,067	1,300	17,697
470	1,935	1,831	13,025
480	0,804	2,531	7,704
490	0,152	3,177	3,889
500	0,036	4,338	2,057
510	0,348	5,631	1,040
520	1,063	6,872	0,548
530	2,193	8,113	0,282
540	3,387	8,646	0,123
550	4,747	8,883	0,036
560	6,073	8,585	0,000
570	7,289	7,924	0,000
580	8,365	7,165	0,000
590	8,542	5,935	0,000
600	8,712	5,101	0,000
610	7,951	4,072	0,000
620	6,467	3,005	0,000
630	4,644	2,033	0,000
640	3,111	1,296	0,000
650	1,849	0,742	0,000
660	1,054	0,416	0,000
670	0,576	0,225	0,000
680	0,275	0,107	0,000
690	0,120	0,047	0,000
700	0,059	0,023	0,000
	94,814	100	107,331
	X <sub>n</sub>	Y <sub>n</sub>	Z <sub>n</sub>





*Catador 1*

NOMBRE:

FECHA:

**Prueba Triangular**

Redondea el código de la muestra que difiere de cada una de las triadas que te presentamos a continuación y señala cuáles son las diferencias.

343

834

709

La muestra que difiere tiene mejor / peor sabor que las otras dos.

La muestra que difiere tiene mejor / peor textura que las otras dos.

La muestra que difiere tiene mejor / peor olor que las otras dos.

Otras diferencias: \_\_\_\_\_

**Ensayo de clasificación por ordenación**

**Ordena** de forma decreciente los códigos de las siguientes muestras de más a menos brillo.

834

263

176

532

--	--	--	--

+ brillo  $\longrightarrow$  - brillo

Redondea los códigos de las muestras que tiene el mismo brillo

**Valora** el aspecto del recubrimiento: homogeneidad, manchas, etc.

1: Malo; 2: Aceptable; 3: Bueno

Muestra	Puntuación
834	
263	
176	
532	

### Normas para realizar las sesiones de evaluación sensorial

Se recomienda que, en la medida de lo posible, cuando se acuda a las sesiones de evaluación sensorial:

- No llevar perfumes
- No fumar al menos media hora antes de realizar la cata
- No comer ni tomar café inmediatamente antes de acudir a la cata
- Ser puntual
- Prestar la máxima atención a la explicación previa y pedir cualquier explicación cuando no quede claro algún concepto. Si se realiza alguna discusión, participa y aporta tus ideas o conocimientos.
- Beber agua antes de empezar y entre muestra y muestra.
- Intentar que la valoración sea personal y que no se vea influenciada por los demás cuando se evalúe una muestra.
- Mantener silencio mientras se realice la cata.
- Tomarse el tiempo necesario para realizar la cata correctamente puesto que se trata de evaluar la calidad sensorial **Y SÓLO TÚ ERES NUESTRO INSTRUMENTO DE MEDIDA.**



## Niveles de significación de la prueba triangular (UNE 87-006-92, 1997)

Número de respuestas	Número mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación del 5%	Número de respuestas	Número mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación del 5%
5	4	51-53	24
6-7	5	54-55	25
8-9	6	56-58	26
10-11	7	59-61	27
12-13	8	62-63	28
14-16	9	64-66	29
17-18	10	67-68	30
19-20	11	69-71	31
21-23	12	72-74	32
24-25	13	75-76	33
26-27	14	77-79	34
28-30	15	80-82	35
31-32	16	83-84	36
33-35	17	85-87	37
36-37	18	88-90	38
38-40	19	91-92	39
41-43	20	93-95	40
44-45	21	96-98	41
46-48	22	99-100	42
49-50	23		



## Valores críticos aproximados para la prueba de Friedman (UNE 87-023-95, 1997)

Número de jueces (J)	Número de muestras ó productos (P)		
	3	4	5
	Nivel de significación $p = 0,05$		
2	-	6,00	7,60
3	6,00	7,00	8,53
4	6,50	7,50	8,80
5	6,40	7,80	8,96
6	6,33*	7,60	9,49**
7	6,00*	7,62	9,49**
8	6,25	7,65	9,49**
9	6,22	7,81**	9,49**
10	6,20	7,81**	9,49**
11	6,54	7,81**	9,49**
12	6,16	7,81**	9,49**
13	6,00	7,81**	9,49**
14	6,14	7,81**	9,49**
15	6,40	7,81**	9,49**

<sup>1</sup>La prueba de Friedman podría tabularse a  $P = 2$ . Sin embargo, en este caso es suficiente aplicar la distribución binomial al número de veces que una de las dos muestras ocupa la misma posición en la ordenación. En este caso se considera como una prueba de comparación por parejas 'modelo bilateral' (UNE 87-005,-92, 1997).

<sup>2</sup>El valor de  $F$  puede tener únicamente valores discontinuos, siendo esta discontinuidad muy pronunciada para valores pequeños de  $J$  y  $P$ . Por lo tanto, no es posible obtener valores críticos que correspondan exactamente al nivel 0,05. Los valores marcados con un (\*) corresponden a niveles ligeramente superiores a 0,05. Los valores no marcados corresponden a niveles reales inferiores a 0,05.

<sup>3</sup>Los valores marcados con un asterisco doble (\*\*) son valores críticos obtenidos por medio de aproximaciones utilizando la distribución  $\chi^2$ .





Ensayo bilateral (UNE 87-005-92, 1997).

Número de respuestas (n)	Número mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación del 5%	Número de respuestas (n)	Número mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación del 5%
7	7	32-33	23
8-9	8	34-35	24
10	9	36-37	25
11-12	10	38	26
13	11	39-40	27
14-15	12	41-42	28
16-17	13	43-44	29
18	14	45	30
19-20	15	46-47	31
21	16	48-49	32
22-23	17	50	33
24-25	18	60	39
26	19	70	44
27-28	20	80	50
29-30	21	90	55
31	22	100	61



### Test de Diferenciación del Control

Se tienen 5 muestras a evaluar, codificadas con un número con 3 dígitos y una muestra control codificada como **C**. Compara el control **C** con cada una de las muestras de izquierda a derecha indicando el tamaño de la diferencia marcando con un **+** ó un **-** si difieren por ser *más* o *menos* brillante/olorosa/firme/sabrosa.

**Brillo:** Coloca un grano de la muestra control **C** (a la izquierda) al lado de la muestra a comparar. Repite la misma operación para todas las muestras colocando los granos siempre en la misma posición.

**Olor:** Huele un grano de la muestra control **C** y luego uno de la muestra a comparar.

**Firmeza y sabor:** Degusta un grano de la muestra control **C** y luego uno de la muestra a comparar.

#### *Significado de la escala*

<b>Ninguna diferencia</b>	Son exactamente la misma muestra. IGUALES
<b>Una ligera diferencia</b>	No son iguales pero prácticamente no soy capaz de definir la diferencia.
<b>Una pequeña diferencia</b>	No son iguales, diría que es un poco más/menos.....
<b>Diferente</b>	Son diferentes y esta es la diferencia ..... más/menos
<b>Bastante diferente</b>	Son bastante diferentes en..... más/menos
<b>Gran diferencia</b>	Son muy diferentes en..... más/menos
<b>Muy diferente</b>	No se parecen en nada ..... más/menos

*Catador 1*

NOMBRE:

FECHA:

CÓDIGO: 533

<b>Escala</b>	<b>Brillo</b>	<b>Olor</b>	<b>Firmeza</b>	<b>Sabor</b>
Ninguna diferencia				
Una ligera diferencia				
Una pequeña diferencia				
Diferente				
Bastante diferente				
Una gran diferencia				
Muy diferente				

Si existen diferencias, coméntalas:

Valores críticos del Test de Dunnett para comparar tratamientos con un control (O'Mahony, 1986).

Test de dos vías para $p = 0,05$									
$gl_{\text{residuales}}$	k: número de tratamientos incluido el control								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,82	3,90	3,97
6	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,57	3,64	3,71
7	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,41	3,47	3,53
8	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,29	3,35	3,41
9	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,20	3,26	3,32
10	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,14	3,19	3,24
11	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,08	3,14	3,19
12	2,18	2,50	2,68	2,81	2,90	2,94	3,04	3,09	3,14
13	2,16	2,48	2,65	2,78	2,87	2,94	3,00	3,06	3,10
14	2,14	2,46	2,63	2,75	2,84	2,91	2,97	3,02	3,07
15	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	2,95	3,00	3,04
16	2,12	2,42	2,59	2,71	2,80	2,87	2,92	2,97	3,02
17	2,11	2,41	2,58	2,69	2,78	2,85	2,90	2,95	3,00
18	2,10	2,40	2,56	2,68	2,76	2,83	2,89	2,94	2,98
19	2,09	2,39	2,55	2,66	2,75	2,81	2,87	2,92	2,96
20	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,86	2,90	2,95
24	2,06	2,35	2,51	2,61	2,70	2,76	2,81	2,86	2,90
30	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,77	2,82	2,86
40	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,73	2,77	2,81
60	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,69	2,73	2,77
120	1,98	2,24	2,38	2,47	2,55	2,60	2,65	2,69	2,73
$\infty$	1,96	2,21	2,35	2,44	2,51	2,57	2,61	2,65	2,69