

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**  
**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural**



**ENCAPSULACIÓN EN LIPOSOMAS DE ACEITES ESENCIALES  
PARA MEJORAR SU RETENCIÓN EN FILMS DE QUITOSANO.**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS  
CURSO 2014-2015**

Presentado por:  
**Miriam Jiménez Serrallé**

Directora académica:  
**Amparo Chiralt Boix**

Directores Experimentales:  
**Cristina Valencia-Sullca**  
**Alberto Jiménez Marco**

Valencia, Julio de 2015

# **ENCAPSULACIÓN EN LIPOSOMAS DE ACEITES ESENCIALES PARA MEJORAR SU RETENCIÓN EN FILMS DE QUITOSANO**

Jiménez Serrallé, M.; Valencia-Sullca, C.; Jiménez Marco, A.; Chiralt, A<sup>1</sup>.

## **RESUMEN**

Se ha analizado el efecto de la encapsulación en liposomas de lecitina de eugenol y aceite esencial de hoja de canela (CLEO), en las pérdidas de estos compuestos durante la obtención de films de quitosano por extensión y secado de las dispersiones formadoras de film (DFF). Se han preparado DDF con eugenol o CLEO (en forma libre y encapsulados) y dispersiones de quitosano puro y con liposomas de lecitina pura para obtener los films control. Los films obtenidos con las 6 formulaciones se caracterizaron en cuanto a sus propiedades microestructurales, ópticas y mecánicas, de barrera al vapor de agua y su termoestabilidad. Se analizaron las pérdidas de eugenol en los films con compuestos activos mediante extracción y análisis por CG. La encapsulación en liposomas de eugenol o CLEO permitió la retención de una alta proporción de estos compuestos (40-50%) frente a 1-2% retenido cuando estos se incorporaron emulsionados en forma libre. Los films con liposomas presentaron una microestructura laminar que mejoró su extensibilidad, e incrementó su capacidad de barrera al vapor de agua. Los liposomas modificaron las propiedades ópticas de los films, disminuyendo el brillo y aumentando la saturación del color y dándoles una tonalidad más rojiza. La encapsulación de compuestos activos volátiles en liposomas se presenta como una buena estrategia para la obtención de films activos con aceites esenciales.

Palabras clave: Film, quitosano, eugenol, aceite de canela hoja, encapsulación.

## **ABSTRACT**

The effect of encapsulation of eugenol and cinnamon leaf essential oil (CLEO) in lecithin liposomes on the losses of these compounds during the chitosan film formation process, by casting, was evaluated. Film forming dispersions (FFD) with eugenol or CLEO (free compounds and from encapsulated compounds), and pure chitosan films and those containing lecithin liposomes were also obtained. Films with the 6 different formulations were characterized as to microstructure, optical and mechanical properties, water vapour barrier capacity and thermostability. Losses of eugenol in the active films were determined by solvent extraction and GC analysis. Encapsulation of eugenol or essential oil in lecithin liposomes lead to a 40-50% retention of this compounds in the films, whereas only 1-2% was retained when compounds were incorporated by emulsification. Films with

<sup>1</sup>Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. 46022 Valencia, España.

liposomes exhibit a lamellar structure which improved film extensibility and increased the water vapour barrier capacity. Liposomes modified optical properties of the films, reducing their gloss, increasing colour saturation and giving them redness. Encapsulation of volatile active compounds in liposomes appears as a good strategy to obtain active films with essential oils.

Key Words: Film, chitosan, eugenol, cinnamon leaf essential oil, encapsulation.

## **RESUM**

S'ha analitzat l'efecte de l'encapsulació en liposomes de lecitina d'eugenol i oli essencial de fulla de canyella (CLEO), en les pèrdues d'aquests compostos durant l'obtenció de films de quitosà per extensió i assecat de les dispersions formadores de film (DFF). S'han preparat DDF amb eugenol o CLEO (en forma lliure i encapsulats), i dispersions de quitosà pur i amb liposomes de lecitina pura per obtenir els films control. Els films obtinguts amb les 6 formulacions es van caracteritzar pel que fa a les seues propietats microestructurals, òptiques i mecàniques, de barrera al vapor d'aigua i la seua termoestabilitat. Es van analitzar les pèrdues d'eugenol en els films amb compostos actius mitjançant l'extracció dels films i anàlisi per CG. L'encapsulació en liposomes de eugenol o CLEO va permetre la retenció d'una alta proporció d'aquests compostos (40-50%) durant la formació dels films, davant al 1-2% retingut quan aquests es van incorporar emulsionats en forma lliure. Els films amb liposomes van presentar una microestructura laminar que va millorar la seua extensibilitat e incrementar la seua capacitat de barrera al vapor d'aigua. Els liposomes van modificar les propietats òptiques dels films, disminuint la brillantor i augmentant la saturació del color i donant-los una tonalitat més rogenca. L'encapsulació de compostos actius volàtils en liposomes es presenta com una bona estratègia per a l'obtenció de films actius amb olis essencials.

Paraules clau: Film, quitosà, eugenol, oli essencial de fulla de canyella, encapsulació.

## **INTRODUCCIÓN**

El desarrollo de films comestibles ha aumentado recientemente debido su interés en la conservación de los alimentos puesto que pueden actuar como soporte de compuestos activos, tales como antioxidantes y agentes antimicrobianos, mejorando la calidad del producto y alargando su vida útil. Los recubrimientos o films comestibles son una fina película preformada de material que recubre al alimento actuando como un sistema de envasado que controla la transferencia de humedad, gases, sabor y aromas entre los componentes del alimento y su entorno (Du et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Estas películas pueden adquirir la función de empaque activo, con la incorporación de compuestos que poseen la capacidad de reducir o inhibir el crecimiento microbiano y mantener las características deseadas por los consumidores como la firmeza del producto (Quintero et al., 2010). Por otro lado, durante los últimos años ha aumentado significativamente los efectos perjudiciales para el medio ambiente causados por el uso de envases a base de polímeros sintéticos, a la vez que las reservas de crudo son cada vez menores. Todo esto plantea como alternativa el uso de films biodegradables, inocuos para el medio ambiente, elaborados a partir de polímeros naturales que proceden de fuentes renovables (Jiménez A, 2013).

Para la obtención de films de biopolímeros una opción es la extensión y secado de dispersiones de hidrocoloides, compuestos lipídicos, o una mezcla de los mismos. Los hidrocoloides incluyen polisacáridos como quitosano, alginato, derivados de celulosa y agar, y proteínas como gluten, gelatina, proteína de soja, etc. Los lípidos comúnmente utilizados pueden ser ceras, acilgliceroles y ácidos grasos. El uso de los films elaborados a base de polisacáridos ha aumentado recientemente, y en especial el uso del quitosano, un biopolímero natural obtenido de la desacetilización de la quitina presente en el exoesqueleto de los crustáceos, con potencial aplicación en la industria alimentaria por ser biodegradable, no tóxico y con actividad antimicrobiana. El quitosano puede establecer interacciones electrostáticas con otros compuestos por su carácter catiónico por lo que tiene gran interés como material formador de films. Su solubilidad y peso molecular afecta a la calidad, elasticidad y brillo del material obtenido. Su solubilidad depende de la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena principal, de su peso molecular y de la naturaleza del medio ácido en el que se disuelva, siendo soluble en soluciones acuosas por debajo de pH 6 (Quintero et al., 2010; Leceta et al., 2013). Sin embargo, en comparación con los materiales sintéticos, presenta baja barrera al vapor de agua y, al almacenarse a altas temperaturas, las películas pueden adquirir un tono amarillento. No obstante, al combinarse con otros compuestos se puede mejorar las características de sus films (Salgado I. D., 2013).

En general, los materiales formados por hidrocoloides presentan buenas propiedades mecánicas y estructurales, alta barrera a gases, pero son muy permeables al vapor de agua. Sin embargo, los lípidos no presentan este problema dada su naturaleza hidrofóbica y, aunque tienen poca resistencia mecánica y alta permeabilidad al oxígeno, presentan una gran barrera a la humedad. Es por ello, que se plantea, como estrategia de mejora de estos films, la elaboración de composites: películas compuestas por polisacáridos y proteínas en combinación con lípidos, formando una bicapa o conglomerado, evitando así la gran permeabilidad a la humedad de los films, y mejorando en algunos casos las propiedades mecánicas (Jiménez A, 2013). Entre los compuestos de naturaleza lipídica, los aceites esenciales presentan además la ventaja de tener actividad antimicrobiana y antioxidante, lo cual convierte a los films donde se incorporan en materiales activos para el envasado. Sin embargo, estos aceites son muy volátiles y se pierden en gran proporción durante la etapa de preparación de los films (Sánchez-González et al., 2011). Una de las estrategias para evitar su

pérdida es encapsularlos formando liposomas: vesículas esféricas organizadas en una o varias capas fosfolípicas con una fase interna acuosa. Estas presentan condiciones idóneas para encapsulación debido a su biodegradabilidad y ausencia de toxicidad (Sebaaly et al., 2015). Los nanoliposomas son liposomas de tamaño nanométrico constituidos mayoritariamente por fosfolípidos, moléculas anfifílicas con una gran biocompatibilidad que les permiten actuar como sistemas portadores de una gran variedad de compuestos. Los nanoliposomas, frente a los liposomas, proporcionan un área de superficie mayor, lo que incrementa la solubilidad y biodisponibilidad del material encapsulado, mejorando la liberación y orientación controlada (Zhang et al., 2012). Uno de los aceites esenciales cuyo efecto sobre las bicapas lipídicas ha sido estudiado recientemente y tiene un gran interés por su acción antibacteriana, antifúngica y antiviral es el eugenol, reconocido como SAFE por la FDA (Food and Drug Administration) y aprobado por la comisión europea como un agente saborizante seguro en alimentos. El eugenol es un compuesto muy volátil (temperatura de ebullición: 254°C), ligeramente soluble en agua y sensible a la luz y con efectos antimutagénicos, antiinflamatorios, analgésicos, hepatoprotectores y antioxidantes, por lo que su uso en recubrimientos activos para el envasado de alimentos resulta de gran interés (Sebaaly et al., 2015). Un emulsionante natural y biodegradable muy utilizado para la estabilización de lípidos en dispersiones acuosas, es la lecitina, que posee buenas propiedades ya permite su encapsulación en condiciones adecuadas (Jiménez et al., 2014).

El presente trabajo de fin máster tiene como objetivo estudiar el efecto de la encapsulación de eugenol y aceite esencial de hoja de canela en liposomas de lecitina en su retención en films de quitosano. Así mismo, se analiza el efecto de su incorporación en forma encapsulada y libre sobre las propiedades microestructurales, físicas (permeabilidad al vapor de agua, propiedades ópticas y mecánicas) y termoestabilidad de los films.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Materiales**

Como polímero formador de los films se utilizó quitosano suministrado por Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania), en una solución de ácido acético glacial (Panreac Química SLU – An ITW Companies, Castellar del Vallés, Barcelona, España) y para la formación de los nanoliposomas se usó lecitina de semilla de girasol (Lipoid H 20) con un 20% de fosfatidilcolina, no-GMO. Además, se eligieron como compuestos antimicrobianos el aceite de hoja de canela (Herbes de Molí, Coop. V., Benimarfull, Alicante) y su compuesto mayoritario, el eugenol (Sigma-Aldrich). El disolvente orgánico utilizado en el cromatógrafo de gases con detector a la llama fue el éter dietílico estabilizado con etanol obtenido de Panreac ITW Companies.

## **2. Obtención de nanoliposomas**

Se preparó una solución de nanoliposomas al 5% (p/p) con lecitina, y se llevó a agitación durante 4h a 700 rpm. A partir de ésta, se obtuvieron tres tipos de liposomas, la muestra control sin agentes antimicrobianos, una muestra a la que se adicionó eugenol y otra a la que se le incorporó aceite esencial de hoja de canela. En todos los casos, a 40 g de la dispersión de lecitina se añadieron 2 g del compuesto activo y la mezcla se sometió a sonicación a 20kHz durante 10 minutos con pulsos de un segundo. La sonda se colocó en el centro de la muestra. Posteriormente, las muestras fueron filtradas a través de un filtro con tres capas de papel Whatman nº1. Cada dispersión de liposomas se caracterizó por triplicado en cuanto a su densidad, pH, potencial  $\zeta$  y tamaño de partículas. Las muestras de liposomas fueron: de lecitina sola (Lec), con eugenol (Lec-Eu) y con aceite esencial de hoja de canela (Lec-CLEO).

## **3. Preparación de los films de quitosano con compuestos activos.**

Se preparó una solución de quitosano al 1% (p/p) en una solución de ácido acético al 1% (v/p), se agitó a temperatura ambiente durante 24h, y posteriormente se filtró en tamiz con un tamaño de poro de 120 $\mu$ m para eliminar las partículas de quitosano no disueltas. A partir de la disolución filtrada de quitosano, se obtuvieron DFF con los compuestos activos, incorporando estos en dos formas: encapsulados en liposomas de lecitina y libres mediante emulsificación directa. Para ello, a 90 g de la solución de quitosano al 1% se añadió 0,5 g de compuesto activo en forma libre o en forma de liposomas de lecitina (en este caso 1,0 g de la mezcla activo-lecitina). Se obtuvo también un film control con liposomas de lecitina sin activo incorporando la cantidad dispersión de liposomas equivalente a 0,5 g de lecitina. Las dispersiones con liposomas se mantuvieron en agitación durante 2h antes de su vertido. Las que tenían los compuestos activos libres se homogenizaron en un equipo Ultraturrax (modelo Yellow Line DI 25 basic, IKA, Alemania) a 13.500 rpm durante 4 minutos. Posteriormente, las diferentes DFF, se vertieron en placas de teflón de 150 mm de diámetro, en una cantidad equivalente a 1 g de sólidos por placa. Los films se obtuvieron por secado a 25°C y 45% de humedad relativa. Con las consideraciones realizadas, se obtuvieron 6 formulaciones de films, solo con quitosano (CH), el control con lecitina (CH/Lec), los films con activos (eugenol y aceite esencial de hoja de canela) no encapsulados (CH/Eu y CH/CLEO) y encapsulados en lecitina (CH/Lec-Eu y CH/Lec-CLEO).

## **4. Caracterización de las dispersiones.**

### **4.1. DENSIDAD Y PH**

La densidad de las diferentes muestras se midió utilizando el método del picnómetro y el pH se midió con un pHmetro modelo GLP +21 (Crison Instruments S. A., Hospital del Llobregat, Barcelona, España).

## 4.2. MEDIDA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y POTENCIAL $\zeta$

Para la determinación del tamaño de los nanoliposomas y potencial  $\zeta$  las muestras fueron diluidas en agua destilada (1:100) y medidas a 25°C en un equipo Zetasizer Nano-Z (Nano series modelo Zen 2600, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Este equipo mide la movilidad electroforética mediante la dispersión de la luz provocada por las partículas dispersas y a partir de la misma se determina el potencial  $\zeta$  utilizando el modelo de Smoluchowsky. Todas las muestras se midieron por triplicado en distintos días para comprobar la estabilidad de los sistemas.

## 5. Caracterización de los films de quitosano

Previa a su caracterización, los films obtenidos por *casting* (extensión y secado) se acondicionaron en desecadores herméticos a 53% de humedad relativa, utilizando disoluciones saturadas de  $Mg(NO_3)_2$ , a una temperatura de 25 ( $\pm 1$ )°C.

### 5.1. GROSOR

Esta medida se realizó mediante un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona) con una precisión de 0,001 mm. Se realizaron seis medidas de cada una de las muestras en posiciones aleatorias. Los valores obtenidos fueron utilizados para la obtención de las propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua de los films.

### 5.2. PROPIEDADES MECÁNICAS

De cada una de las seis formulaciones se cortaron ocho muestras rectangulares (25 mm por 100mm) y se colocaron en las pinzas de una prensa universal para ensayos de tensión (Stable Mycro Sistem, TA.TX plus, Haslemere, Inglaterra) de acuerdo al método estándar D882 (ASTM, 1992), siendo la separación inicial de las pinzas de 50 mm y la velocidad de elongación del film de 50 mm·min<sup>-1</sup>. Para todas las muestras se determinó el grosor en seis puntos aleatorios antes de proceder con el ensayo. Las curvas de fuerza frente a distancia obtenidas se transformaron en curvas de tensión ( $\sigma$ ) frente a deformación de Hencky ( $\epsilon_H$ ) que permitieron obtener los parámetros mecánicos de TS (tensión de fractura, en MPa), E (deformación hasta el punto de fractura, expresado en porcentaje respecto a la longitud inicial del film,  $L_0$ ) y EM (módulo de elasticidad en MPa).

### 5.3. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP)

La propiedad de barrera al vapor agua de los films se evaluó mediante la medida de la permeabilidad según una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (Mc Hugh et al., 1994) para un gradiente de humedad relativa 53-100% y temperatura de 25°C. Para ello, se cortaron seis muestras

circulares para cada formulación de 3,5 cm de diámetro, el mismo diámetro que las copas de aluminio a las que se acoplaron (Payne, elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica) y a las que se añadió 5 ml de agua destilada (100%HR). Se colocaron con la cara del film que estuvo en contacto con el aire durante el secado hacia arriba y, para asegurar la hermeticidad de las placas se colocó sobre ellas un anillo de caucho sujetado con tres mordazas. Todas las copas se introdujeron en un soporte con ventilador y éstos a su vez, en desecadores de vidrio equilibrados al 53%HR con solución saturada de nitrato de magnesio  $Mg(NO_3)_2$ , los cuales se almacenaron a 25°C en una cámara Hotcold UL (JP Selecta S.A., Barcelona). A las 16 h se fue registrando la masa de cada una de ellas en una balanza analítica ( $\pm 0.00001$  g) (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 1,5 h durante 24 horas. Finalmente, se midió el espesor de los films en seis puntos distintos con un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona). La transmisión de vapor de agua (WVTR) se determinó a partir de la pendiente obtenida al representar la pérdida de masa frente al tiempo y se calculó la WVP teniendo en cuenta el espesor del film (Jiménez et al. 2013).

#### 5.4. HUMEDAD Y SOLUBILIDAD EN AGUA DE LOS FILMS

Mediante un método gravimétrico se determinó el porcentaje de humedad de los films. Para ello, se secaron en una estufa de convección a 60°C durante 24 h, y luego en una estufa a vacío (Vacioterm-T, JP-selecta S.A., Barcelona, España) a 60°C y a una presión de 0,8 bar hasta masa constante durante 48 h.

Para la determinación de la solubilidad de los films, muestras de films rectangulares de 0,2 g de films se sumergieron en agua bidestilada en una proporción film: agua de 1:200, y se mantuvieron a 25 °C durante 72 h. Posteriormente, los films se secaron en una estufa de convección (J.P. Selecta, S.A. Barcelona, España) a 60°C durante 24 h y por último se trasladaron a una estufa de vacío a 60°C masa constante durante 48 h. La solubilidad se expresó como la pérdida de sólidos secos del film por disolución en el agua, durante el periodo de inmersión, respecto a los iniciales del film, en porcentaje.

#### 5.5. PROPIEDADES ÓPTICAS, TRANSLUCIDEZ, COLOR Y BRILLO

La opacidad de los films se determinó aplicando la teoría de Kubelka Munk de dispersión múltiple a los espectros de reflexión (Judd y Wysecki, 1975; Hutchings, 1999). Para la medida de la translucidez y el color se utilizó un espectrocolorímetro Minolta modelo CM-3600d (Minolta CO., Tokyo) con el que se obtuvieron los espectros de reflexión de los films sobre fondo blanco ( $R$ ) y fondo negro ( $R_0$ ) entre 400 y 700 nm, y el espectro de un fondo blanco de reflectancia conocida utilizado en las medidas anteriores ( $R_g$ ). A partir de estos espectros, se calculó la transmitancia interna ( $T_i$ ), ecuación (3), indicador de la transparencia de las muestras, y  $R_\infty$ , ecuación (6), referido a la reflectancia de un film de grosor infinito cuyo espesor fuera

suficiente como para que el efecto del fondo fuera nulo. Se tomaron tres medidas en diferentes puntos de cada uno de los diferentes films y sobre la parte que había estado en contacto con el aire durante el proceso de secado del film. Con los espectros de  $R_\infty$ , se determinaron las coordenadas de color en el espacio Ciel\*a\*b\*, utilizando como referencia el observador 10° y el iluminante D65. Con estas coordenadas se calcularon los valores de tono ( $h_{ab}^*$ ) y croma ( $C_{ab}^*$ ). Los parámetros a y b se calculan según las ecuaciones (4) y (5).

$$Ti = \sqrt{(a + R_0)^2 - b^2} \quad (3)$$

$$a = \frac{1}{2} \cdot \left( R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right) \quad (4)$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (5)$$

$$R_\infty = a - b \quad (6)$$

El brillo se midió con un brillómetro de superficie plana Multi-Gloss 268 (Minolta, Langenhagen, Alemania) que mide a un ángulo de incidencia de 20°, 60° y 85° de acuerdo con la norma ASTM D523 (1999). Para ello, los seis films de distinta formulación se colocaron sobre una superficie negra mate, tomándose tres medidas en diferentes puntos y sobre la parte que estuvo expuesta al ambiente durante el secado de las películas.

## 5.5. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

Para estudiar la estabilidad y degradabilidad de los films con la temperatura se utilizó una termo-balanza Mettler Toledo, modelo TGA/SDTA 851e (Schwarzenbach, Suiza). Se pesaron 3 mg de film triturado, que se introdujeron en un crisol dentro del equipo y fueron calentados gradualmente a una velocidad de 7°C/min desde temperatura ambiente hasta 600°C bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min). Se realizaron dos réplicas por cada una de las seis formulaciones de films.

## 5.6. PROPIEDADES MICROESTRUCTURALES

El análisis de la microestructura de los films se realizó a través de microscopía electrónica de barrido (SEM). Un film de cada una de las seis formulaciones fue almacenado en desecadores con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> previamente a la observación. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL®, modelo JSM5410. Las muestras criofracturadas se montaron en un soporte de cobre de tal forma que permitieran observar la sección transversal o la superficie. Éstas se cubrieron de oro con el fin de hacerlas conductoras y fueron observadas directamente con un voltaje de aceleración de 10 KV.

## **6. Cuantificación de la retención de eugenol y aceite esencial en los films de quitosano.**

Para la cuantificación de la cantidad de eugenol o aceite esencial en los films, muestras de 0,3 g de los diferentes films se extrajeron con 10 mL de éter dietílico durante 24 horas. Este tiempo se fijó tras ensayos previos en que se pudo fijar como tiempo de extracción total. Los extractos de cada uno de los films se inyectaron en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (CG-FID) empleando como fase estacionaria una columna DB-5 de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase (J&V Scientifics, Agilent, Palo alto, USA) empleando helio como gas portador a un flujo de 1 ml/min. El volumen de muestra inyectada en cada caso fue de 2  $\mu\text{l}$  en modo splitter a una temperatura de inyección de 50°C. La programación del calentamiento fue desde 50°C hasta 130°C, incrementándose la temperatura a 5° C/min y manteniéndola 5 minutos a 130°C. Posteriormente, se alcanzaron los 200°C a una velocidad de 10°C/min. Para la cuantificación se obtuvo una curva de calibrado utilizando disoluciones de eugenol en éter etílico de 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 y 2000 ppm de eugenol en éter.

## **7. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se realizó a través de un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Rangos Múltiples para determinar la mínima diferencia significativa (LSD), con un nivel de confianza del 95%, utilizando Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.18 (32bits).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. Propiedades de las dispersiones de nanoliposomas y formadoras de films.**

Los valores de densidad, pH y potencial  $\zeta$  de los diferentes nanoliposomas y DFF se muestran en las Tabla 1. La densidad de los nanoliposomas con eugenol o aceite esencial fue ligeramente superior a la de las dispersiones formadoras de films por la mayor densidad del eugenol (1,06 g/cm<sup>3</sup>), aunque sin diferencias significativas entre las distintas muestras. Respecto a los valores de pH, las dispersiones de CH presentaron valores inferiores (alrededor de pH 4) comparadas con las de los nanoliposomas, cuyos valores oscilaron entre pH 5,2 y 5,7. Los nanoliposomas de lecitina presentaron valores negativos de potencial  $\zeta$ , con una disminución significativa al incorporar eugenol y aceite de hoja de canela en liposomas de lecitina. Las DFF presentaron valores muy elevados del potencial  $\zeta$  debido a las cargas de la cadena de CH, por ser un polímero ionizable con grupos amino que se encuentran protonados al pH de la disolución. Esto favorece su solubilidad en medio ácido dependiendo de la carga, del pH y del grado de desacetilación (Quintero et al., 2010; Leceta et

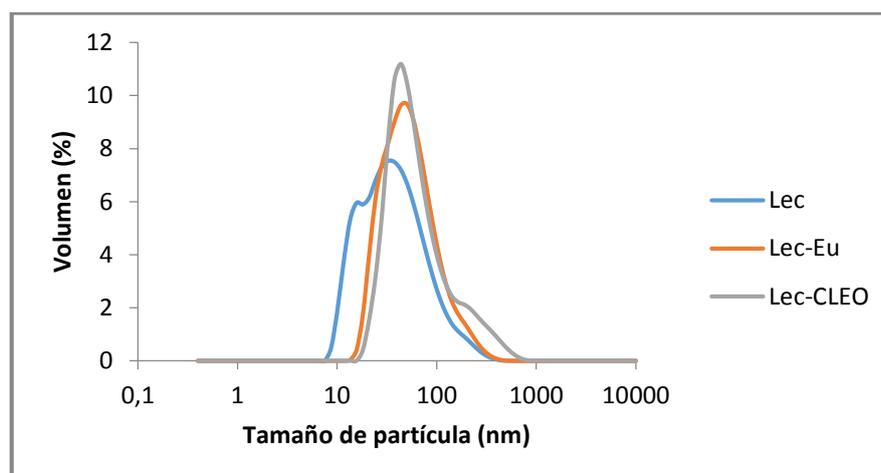
al., 2013). Las moléculas de quitosano cargadas positivamente interactuaron con los nanoliposomas cuya superficie está cargada negativamente, invirtiendo su carga superficial y generando valores más altos del potencial  $\zeta$ . Las DFF con liposomas presentaron los valores más elevados de potencial  $\zeta$ , sin diferencias significativas entre ellas, mientras que las dispersiones que no contenían liposomas presentaron valores significativamente diferentes entre ellas, aumentado el valor del potencial  $\zeta$  con la incorporación de los compuestos. Estos resultados indican que las moléculas de CH se adsorben en la superficie de los liposomas en mayor proporción que sobre las gotas de aceite, ya que la carga neta de los liposomas de signo contrario favorece las interacciones electrostáticas con las cadenas con carga positiva. Esta adsorción contribuirá a la estabilidad de los liposomas durante la etapa de secado de los films, en la cual la pérdida de agua puede llevar asociada transiciones de fase de las estructuras, liberando el material encapsulado.

**TABLA 1.** Densidad, pH y potencial  $\zeta$  de las dispersiones de nanoliposomas (DN) y formadoras de films (DFF). Valores promedio y desviación estándar.

| DN          | $\rho$ (kg/m <sup>3</sup> ) | pH                       | $\zeta$ (mV)            |
|-------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Lec         | 1,007±0,002 <sup>a</sup>    | 5,24±0,01 <sup>a</sup>   | -35,1±1,6 <sup>c</sup>  |
| Lec-Eu      | 1,009±0,001 <sup>a</sup>    | 5,68±0,05 <sup>b</sup>   | -43,0±0,7 <sup>a</sup>  |
| Lec-CLEO    | 1,009±0,000 <sup>a</sup>    | 5,62±0,02 <sup>b</sup>   | -41,4±0,5 <sup>b</sup>  |
| DFF         | $\rho$ (kg/m <sup>3</sup> ) | pH                       | $\zeta$ (mV)            |
| CH          | 1,004±0,003 <sup>a</sup>    | 3,93±0,18 <sup>bc</sup>  | 30,3±1,4 <sup>a</sup>   |
| CH/Eu       | 1,006±0,001 <sup>a</sup>    | 3,79±0,01 <sup>ab</sup>  | 43±3 <sup>b</sup>       |
| CH/CLEO     | 1,006±0,001 <sup>a</sup>    | 3,77±0,01 <sup>a</sup>   | 56,78±1,08 <sup>c</sup> |
| CH/Lec      | 1,018±0,002 <sup>b</sup>    | 3,94±0,01 <sup>abc</sup> | 65,0±3 <sup>d</sup>     |
| CH/Lec-Eu   | 1,005±0,001 <sup>a</sup>    | 4,01±0,06 <sup>c</sup>   | 66,4±0,3 <sup>d</sup>   |
| CH/Lec-CLEO | 1,005±0,001 <sup>a</sup>    | 3,97±0,01 <sup>bc</sup>  | 67,3±0,5 <sup>d</sup>   |

Diferentes letras en los superíndices denotan diferencias significativas entre muestras ( $p < 0,05$ ).

La distribución de tamaños de las partículas lipídicas dispersas en las emulsiones formadoras de films afecta a las propiedades de los mismos, tales como permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas (Pérez-Gago y Krochta, 2001). La Figura 1 muestra la distribución de tamaños de partícula en las dispersiones de liposomas obtenidas. La incorporación de eugenol o aceite da lugar a un incremento del tamaño de partículas más pequeñas. La distribución de los liposomas cargados con los compuestos fue similares. La Tabla 2 muestra los valores del tamaño promedio zeta en las tres dispersiones de nanoliposomas, donde puede observarse diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). El menor tamaño promedio correspondió al control con solo lecitina (90,6 nm) mientras que la incorporación de los compuestos activos dio lugar a partículas más grandes, debido a que el tamaño de los nanoliposomas en medio acuoso tiende a ser mayor a medida que aumenta el carácter hidrofóbico de la molécula (longitud de la cadena hidrocarbonada) que contienen en su interior (Krog, 1990; Larsson y Dejmeck, 1990).



**FIGURA 1.** Curvas típicas de distribución del tamaño de partícula de las diferentes.

**TABLA 2.** Tamaño de partícula (nm) de los nanoliposomas. Valores promedio y desviación estándar.

| Muestra  | Promedio zeta (nm)     |
|----------|------------------------|
| Lec      | 90,6±0,7 <sup>a</sup>  |
| Lec-Eu   | 94±3 <sup>b</sup>      |
| Lec-CLEO | 116,4±1,3 <sup>c</sup> |

Diferentes letras en los superíndices denotan diferencias significativas entre muestras ( $p < 0,05$ ).

## 2. Propiedades físicas de los films.

### 2.1. PROPIEDADES MECÁNICAS

Los valores de los parámetros mecánicos obtenidos para cada una de las formulaciones objeto de estudio se observan en la Tabla 3. El espesor de los films de quitosano varió entre 48 y 65  $\mu\text{m}$ , observándose un efecto significativo, el espesor disminuyó en gran medida, con la incorporación de los compuestos activos. Este resultado se debe a la volatilización parcial de los aceites que implica una disminución efectiva de la cantidad de sólidos por unidad de superficie. El módulo de elasticidad (EM), la tensión de fractura (TS) y la deformación hasta el punto de fractura (%E) son parámetros que permiten describir las propiedades mecánicas de los films, y se relacionan estrechamente con su estructura (Mc Hugh y Krochta, 1994). El módulo de elasticidad disminuyó significativamente con la adición de liposomas tanto de lecitina sola como los cargados con los aceites. Esto puede atribuirse a la interrupción de la matriz polimérica por la partículas lipídicas lo que conlleva una pérdida de cohesión de la red, tal como han observado otros autores en diferentes matrices (Fabra et al., 2008; Sánchez-González et al., 2009). Respecto a los films sin lecitina, la adición de los compuestos activos redujo en menor medida el EM lo que puede explicarse por una diferente estructuración de los lípidos en la matriz. Mientras que el

comportamiento a la fractura (valores de TS y E) no cambió notablemente con la adición de los aceites no encapsulados (sin diferencias significativas entre el film CH y CH/Eu), los films con liposomas fueron más extensibles, con valores similares de TS comparados con el film control de CH. Los films de CH puro fueron mecánicamente más resistentes y menos extensibles que los films con liposomas. Es análisis estructural permitirá esclarecer alguna de las causas de este comportamiento.

**TABLA 3.** Propiedades mecánicas de las películas (EM, TS, %E) y espesor. Valores promedio y desviación estándar.

| Film        | EM (Mpa)              | TS (Mpa)           | %E                | Espesor (mm)      |
|-------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| CH          | 1660±174 <sup>d</sup> | 53±4 <sup>b</sup>  | 6±1 <sup>a</sup>  | 65±5 <sup>c</sup> |
| CH/Eu       | 1623±72 <sup>d</sup>  | 46±4 <sup>ab</sup> | 8±3 <sup>a</sup>  | 48±4 <sup>a</sup> |
| CH/CLEO     | 1461±28 <sup>c</sup>  | 42±3 <sup>a</sup>  | 7±4 <sup>a</sup>  | 54±4 <sup>b</sup> |
| CH/Lec      | 1145±4 <sup>b</sup>   | 41±1 <sup>a</sup>  | 11±3 <sup>a</sup> | 62±3 <sup>c</sup> |
| CH/Lec-Eu   | 836±78 <sup>a</sup>   | 51±10 <sup>b</sup> | 31±8 <sup>b</sup> | 48±2 <sup>a</sup> |
| CH/Lec-CLEO | 864±68 <sup>a</sup>   | 43±3 <sup>a</sup>  | 27±4 <sup>b</sup> | 53±3 <sup>b</sup> |

Diferentes letras en los superíndices denotan diferencias significativas entre muestras ( $p < 0,05$ ).

## 2.2. CONTENIDO DE HUMEDAD Y PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP)

La humedad, permeabilidad al vapor de agua y solubilidad de los films con y sin compuestos bioactivos se muestra en la Tabla 4. Según Ma et al., 2008, la permeabilidad al vapor de agua (WVP) es una propiedad relevante ya que está directamente relacionada con la utilidad del film en el sistema alimentario y debe ser lo más baja posible para evitar la transferencia de agua. La humedad de equilibrio de los films disminuyó significativamente al añadir los compuestos lipídicos tanto libres como encapsulados, ya que disminuye la proporción de puntos activos para la adsorción de agua por unidad de masa seca del sustrato, como también se observa en Fabra et al. (2010). Las interacciones entre las cadenas de CH y los compuestos activos pueden reducir la disponibilidad de los grupos polares de la cadena para formar puentes hidrófilos con las moléculas de agua (Shen et al., 2015). La incorporación de lecitina supuso una disminución significativa de la permeabilidad de los films, con valores muy similares, frente a los que no contienen lecitina. La incorporación de los compuestos activos libres no supuso una mejora notable en las propiedades barrera de los films a pesar de su carácter hidrofóbico. La presencia de una fase hidrofóbica dispersa, incluso en pequeñas cantidades, produce discontinuidades en la fase hidrófila disminuyendo la difusión de las moléculas de agua a través de la matriz y disminuyendo, por tanto, la permeabilidad de los films (Sánchez-González et al. 2009; Shen et al., 2015).

**TABLA 4.** Humedad, permeabilidad al vapor de agua y solubilidad de los films de quitosano. Valores promedio y desviación estándar.

| Film        | Humedad<br>b.s. (%)    | WVP (g·mm·<br>kPa-1·h-1·m <sup>2</sup> ) | Solubilidad           |
|-------------|------------------------|--|-----------------------|
| CH          | 39±3 <sup>f</sup>      | 4,32±0,08 <sup>d</sup>                   | 100±0 <sup>f</sup>    |
| CH/Eu       | 25,4±0,8 <sup>ab</sup> | 3,7±0,2 <sup>c</sup>                     | 32±2 <sup>bc</sup>    |
| CH/CLEO     | 25,6±1,2 <sup>ab</sup> | 4,6±0,4 <sup>e</sup>                     | 35,5±1,6 <sup>c</sup> |
| CH/Lec      | 30,1±1,7 <sup>d</sup>  | 2,48±0,07 <sup>b</sup>                   | 27±5 <sup>ab</sup>    |
| CH/Lec-Eu   | 24,2±0,6 <sup>a</sup>  | 2,16±0,17 <sup>a</sup>                   | 24,2±1,6 <sup>a</sup> |
| CH/Lec-CLEO | 26,9±0,8 <sup>cd</sup> | 1,90±0,13 <sup>a</sup>                   | 22±5 <sup>a</sup>     |

Diferentes letras en superíndices denotan diferencias significativas entre films ( $p < 0,05$ ).

### 2.3. PROPIEDADES ÓPTICAS

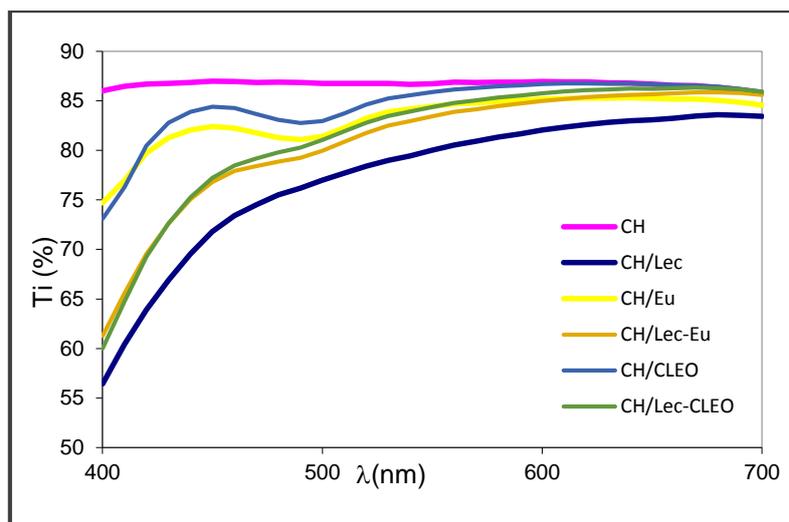
Según Hutchings (1999), la transparencia y el brillo del material son las propiedades ópticas de mayor relevancia para poder evaluar el impacto directo sobre la apreciación del color y aspecto de un producto recubierto/envasado. La Tabla 5 muestra los valores de luminosidad ( $L^*$ ), croma ( $C^*_{ab}$ ), tono ( $h^*_{ab}$ ) y brillo a 60° de los films obtenidos. Los films formulados con liposomas fueron más oscuros (menor  $L^*$ ), con un color más saturado (mayor  $C^*_{ab}$ ) y un tono más rojizo que los films de CH, debido al color propio de la lecitina. El brillo disminuyó significativamente al incorporar los compuestos antimicrobianos, especialmente en forma de emulsión. Esto es debido a la aparición de rugosidad superficial asociada al cremado de los lípidos a la superficie del film durante el secado, tal como han observado otros autores para diferentes lípidos (Sánchez-González et al., 2009; Fabra et al., 2009).

**TABLA 5.** Luminosidad ( $L^*$ ), croma ( $C^*_{ab}$ ), tono ( $h^*_{ab}$ ) y brillo (60°) de los films de CH. Valores promedio y desviación estándar.

| Film        | $L^*$                    | $C^*_{ab}$            | $h^*_{ab}$              | Brillo<br>(60°)       |
|-------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| CH          | 91,0±1,9 <sup>e</sup>    | 4,0±1,9 <sup>a</sup>  | 109±5 <sup>c</sup>      | 51±6 <sup>e</sup>     |
| CH/Eu       | 75±4 <sup>cd</sup>       | 14±6 <sup>b</sup>     | 66±6 <sup>a</sup>       | 19±2 <sup>c</sup>     |
| CH/CLEO     | 77,3±1,3 <sup>d</sup>    | 15,0±1,3 <sup>b</sup> | 66±2 <sup>a</sup>       | 15±3 <sup>a</sup>     |
| CH/Lec      | 67,39±1,02 <sup>a</sup>  | 23,0±0,2 <sup>c</sup> | 80,4±0,7 <sup>c</sup>   | 33±2 <sup>d</sup>     |
| CH/Lec-Eu   | 69,61±1,04 <sup>ab</sup> | 23,0±0,3 <sup>c</sup> | 78,4±0,3 <sup>c</sup>   | 15±2 <sup>ab</sup>    |
| CH/Lec-CLEO | 72,0±0,3 <sup>bc</sup>   | 26,3±0,4 <sup>c</sup> | 80,03±0,16 <sup>c</sup> | 50,0±0,3 <sup>e</sup> |

Diferentes letras en superíndices denotan diferencias significativas entre films ( $p < 0,05$ ).

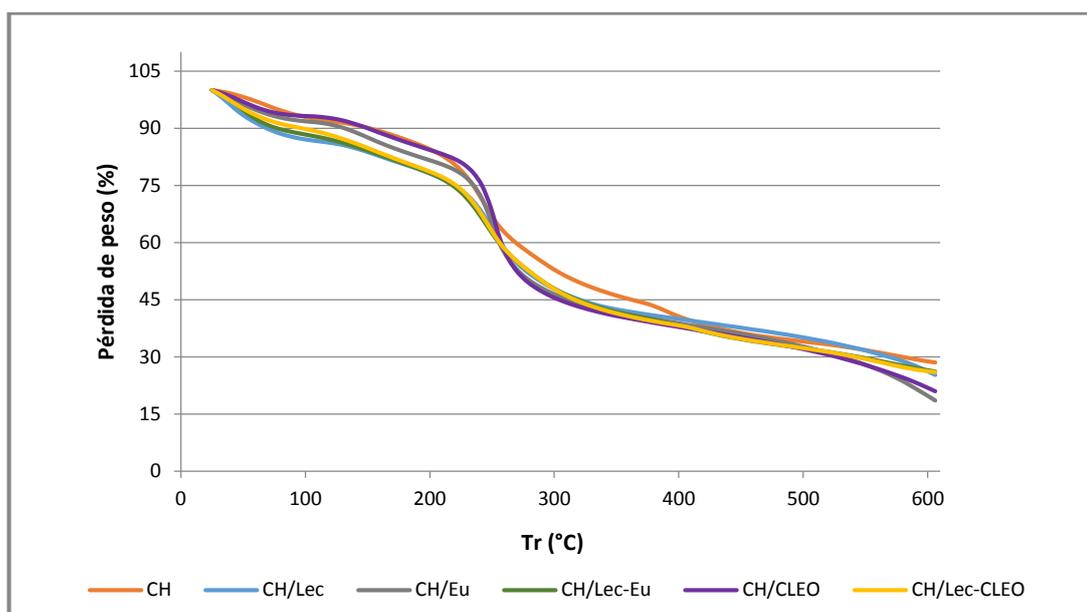
La Figura 2 muestra las curvas de distribución espectral del parámetro  $T_i$  (transmitancia interna) para los films objetos de estudio. Puede observarse que la incorporación de lípidos libres o liposomas redujo la  $T_i$  de los films de quitosano, especialmente los liposomas. Esto es debido a la presencia de una fase dispersa en la matriz que potencia la dispersión de la luz. En el caso de los liposomas, la absorbancia en el intervalo visible por parte de la lecitina contribuya también al descenso de la transmitancia de los films.



**FIGURA 2.** Curvas de distribución espectral del parámetro  $T_i$  para los films estudiados.

#### 2.4. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

La Figura 3 muestra las curvas de degradación térmica de los films de CH donde pueden observarse tres etapas de pérdida de peso, la primera etapa se debe a la evaporación del agua residual de los films; la segunda etapa corresponde a la degradación de fracciones de bajo peso molecular como los compuestos volátiles y lecitina o despolimerización del quitosano, mientras que la tercera etapa está asociada descomposición de las unidades del polímero, tal como han observado otros autores Shen et al. (2015). Puede observarse que los films con lecitina presentan mayor pérdida de peso en la segunda etapa lo que es atribuible a la descomposición progresiva de la lecitina que presenta pérdidas de peso del orden del 20 % hasta 270°C en estado puro. Esto afectó a la temperatura de inicio de la descomposición de los films que fue significativamente menor cuando llevan liposomas (Tabla 6). En la tabla 6 se muestra la temperatura de inicio (onset) y temperatura de máxima velocidad de degradación para todos los films. Los films que incorporaron lecitina presentan temperaturas inferiores de degradación, por lo que tendrían menor estabilidad térmica en procesos de termoformado. Los films con eugenol libre (CH/Eu) presentaron la mayor temperatura de inicio de degradación, lo cual podría indicar que el eugenol residual en el film podría estar fuertemente ligado a las cadenas del polímero.



**FIGURA 3.** Curvas de la estabilidad térmica de los films de CH sin y con eugenol y aceite esencial de hoja de canela encapsulados y no encapsulados.

**TABLA 6.** Resultados de la estabilidad térmica de los films de CH sin y con eugenol y aceite esencial de hoja de canela encapsulados y no encapsulados. Valores promedio y desviación estándar.

| Film        | T <sup>o</sup> onset (°C) | T <sup>o</sup> peak (°C) |
|-------------|---------------------------|--------------------------|
| CH          | 216,7±1,9 <sup>c</sup>    | 248±3 <sup>a</sup>       |
| CH/Eu       | 226,6±1,4 <sup>d</sup>    | 249,08±1,06 <sup>a</sup> |
| CH/CLEO     | 212±3 <sup>ab</sup>       | 248±6 <sup>a</sup>       |
| CH/Lec      | 212±2 <sup>c</sup>        | 243,42±1,06 <sup>a</sup> |
| CH/Lec-Eu   | 209,4±0,7 <sup>ab</sup>   | 245,3±0,4 <sup>a</sup>   |
| CH/Lec-CLEO | 207,5±0,5 <sup>a</sup>    | 247,7±1,9 <sup>a</sup>   |

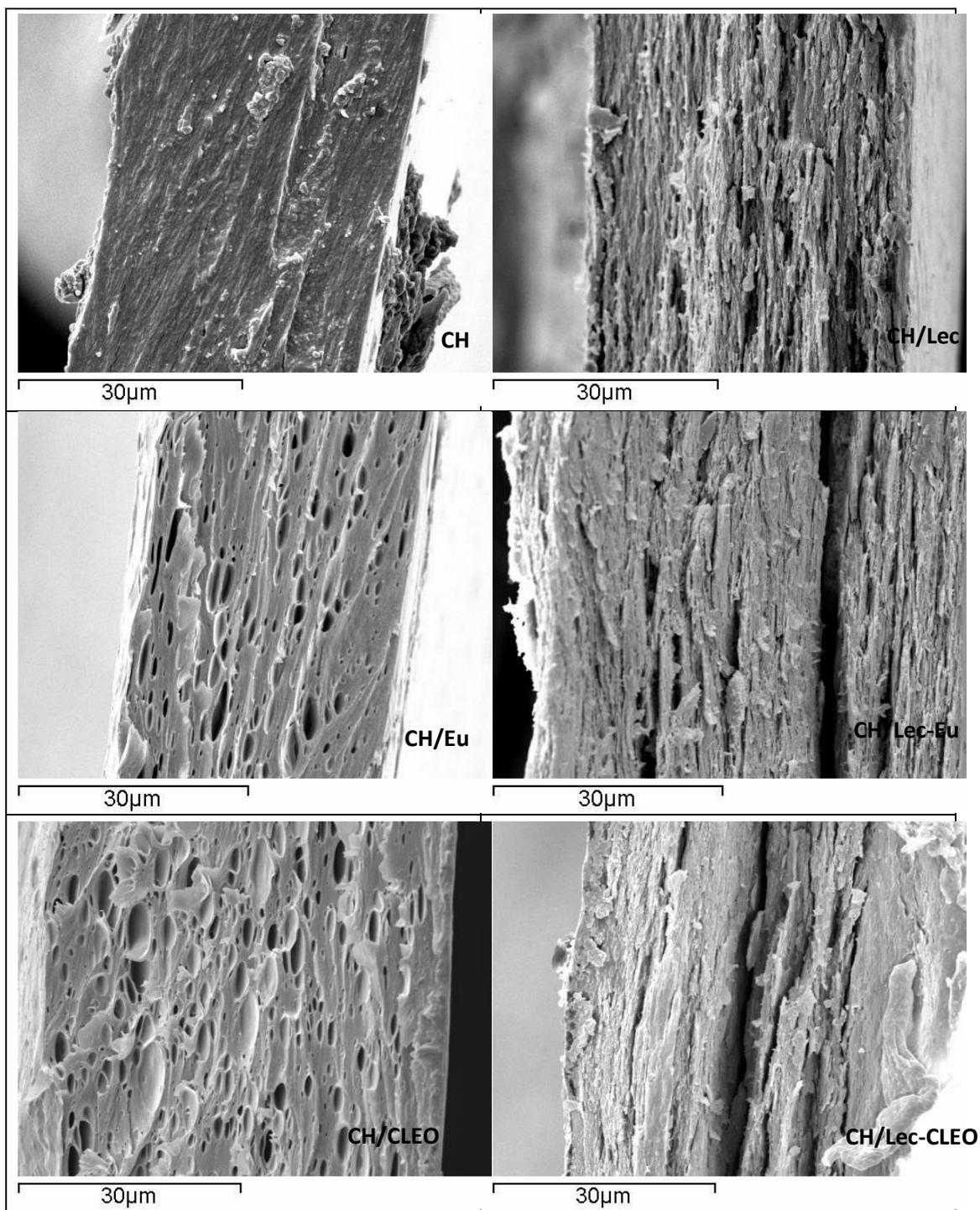
Diferentes letras en superíndices denotan diferencias significativas entre films ( $p < 0,05$ ).

## 2.5. PROPIEDADES MICROESTRUCTURALES

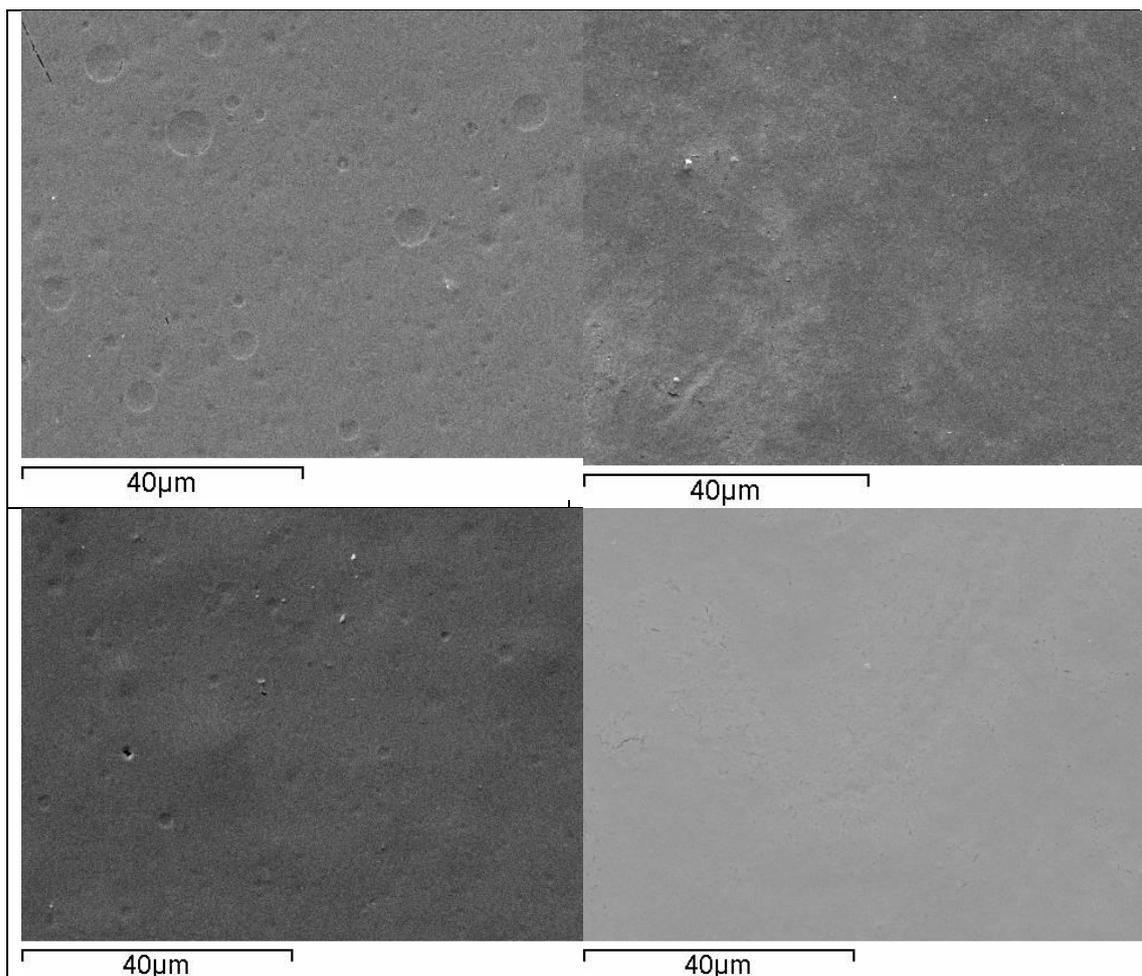
El estudio microestructural de los films permite conocer la disposición de los distintos componentes de la dispersión inicial una vez los films están totalmente secos, y correlacionar la información obtenida con otras propiedades funcionales como la capacidad barrera, propiedades mecánicas y ópticas (Cano A, 2013). Las Figura 5 muestra las micrografías de la sección transversal de los distintos films de CH obtenidas tras ser criofracturados con nitrógeno líquido, y observados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se observan los huecos correspondientes a las gotas del eugenol o del aceite en la sección transversal cuando estos se incorporan en forma libre a la formulación. En la superficie de los films con eugenol o aceite libres, también se observan los huecos de las gotas,

mientras que en los films con liposomas se observa una superficie lisa (Figura 6). Los huecos podrían haberse formado por la evaporación de los volátiles durante el secado del film o debido al alto vacío durante la observación microscópica. Cuando los activos se añaden encapsulados en forma de liposomas, no hay restos de gotas visibles en la estructura, mientras que en la matriz del polímero se observan agregaciones laminares que dejan huecos entre ellas. Esto podría deberse a la formación de asociaciones laminares de los lípidos liposomiales formadas durante la etapa de secado del film que se intercalan entre capas de polímero dando lugar a una estructura que parece exfoliarse. Con esta hipótesis, el eugenol o el aceite esencial de canela ocuparían el *core* más hidrofóbico de las estructuras laminares.

De hecho la separación entre capas parece ensancharse cuando hay eugenol o aceite esencial en la formulación. Las asociaciones micelares sufren cambios de fase al disminuir la cantidad de agua, tendiendo a formarse a alta concentración de lípido las estructuras laminares (Jiménez et al., 2010). En el film con solo lecitina también se aprecia esta estructura laminar. Esta estructura es coherente con la mayor capacidad de elongación de los films con liposomas durante el test de extensión, especialmente aquellos que contienen eugenol o aceite esencial, ya que las diferentes capas podrían deslizarse unas frente a otras, permitiendo una mayor extensión de la estructura sin fractura neta. No obstante, la menor fuerza de cohesión entre las capas en comparación con la de las cadenas en la red polimérica, daría lugar a films menos fuertes con menor módulo de elasticidad, tal como se observa en la Tabla 3.



**FIGURA 5.** Micrografías SEM de la sección transversal de los films de quitosano sin y con eugenol y aceite esencial de hoja de canela en forma libre (izquierda) o en liposomas de lecitina (derecha).



**Figura 6.** Micrografías SEM de la superficie de los films de quitosano con eugenol (arriba) y aceite esencial de hoja de canela (abajo) en forma libre (izquierda) o en liposomas de lecitina (derecha).

## 2.6. CUANTIFICACIÓN DE LA RETENCIÓN DE EUGENOL Y ACEITE ESENCIAL EN LOS FILMS DE QUITOSANO.

La Tabla 7 muestra la concentración final de eugenol en los films con activos determinada mediante su extracción y análisis por CG, así como el porcentaje de recuperación respecto a la cantidad inicial incorporada. Puede observarse que la encapsulación de los compuestos activos en liposomas de lecitina redujo en gran medida la pérdida de los compuestos activos durante la etapa de formación del film, manteniéndose entre el 40-50 % de la cantidad de eugenol añadida. La mayor recuperación de eugenol se produjo en los films que contenían aceite de hoja de canela encapsulado, lo cual puede deberse a la pérdida predominante de otros compuestos más volátiles que el eugenol durante el secado del film. En los films con compuestos activos libres se obtuvieron pérdidas del 98 y 99 % de eugenol, lo cual sugiere que los huecos de gotas observados por SEM se formaron durante la etapa de secado.

**TABLA 7.** Concentración (mg/g ss) y recuperación de eugenol contenido en los films de CH sin y con eugenol y aceite esencial de hoja de canela encapsulados y no encapsulados.

| Film        | mg/g ss extractos      | mg/g ss teóricos | % Recuperación |
|-------------|------------------------|------------------|----------------|
| CH/Eu       | 4,93±1,02 <sup>b</sup> | 357,14           | 1              |
| CH/Lec-Eu   | 108,9±1,3 <sup>c</sup> | 263,16           | 41             |
| CH/CLEO     | 5,4±1,3 <sup>d</sup>   | 317,86           | 2              |
| CH/Lec-CLEO | 118±3 <sup>e</sup>     | 234,21           | 51             |

Diferentes letras en superíndices denotan diferencias significativas entre films ( $p < 0,05$ ).

## **CONCLUSIONES**

La incorporación eugenol o aceite esencial de hoja de canela en liposomas de lecitina a films de quitosano obtenidos por *casting* permitió una alta proporción de su retención (40-50 %), frente a 1-2 % retenido cuando estos se incorporaron de forma libre. Los films con liposomas presentaron una microestructura laminar donde parecen alternar capas lipídicas de lecitina con capas de material polimérico, formadas probablemente por las transiciones de fase de los liposomas durante el proceso de deshidratación progresiva en la formación del film. Esta microestructura mejoró la extensibilidad de los films, redujo su firmeza y permeabilidad al vapor de agua. La incorporación de liposomas modificó las propiedades ópticas de los films, disminuyendo el brillo y aumentando la saturación del color, y dándoles una tonalidad más rojiza; todo ello asociado a las propiedades cromáticas de la lecitina. Por tanto, la encapsulación de compuestos activos volátiles en liposomas se presenta como una buena estrategia para la obtención de films activos con aceites esenciales.

## **REFERENCIAS**

- ASTM (1992). Standard methods for tensile properties of thin plastic sheeting. En: Annualbook of American Standard Testing Methods. D882-91. Philadelphia, Pa:ASTM.
- ASTM. (1995). Standard test methods for water vapour transmission of materials. Standard designations: E96-95 Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials. (pp. 406e413).
- ASTM. (1999). Standard test method for specular gloss. In Designation (D523). Annual book of ASTM standards, Vol. 06.01. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- Cano, A., Jiménez A., Cháfer M., González C. (2013). Efecto de la incorporación de salvado de arroz sobre las propiedades físicas y microestructurales de films biodegradables a base de almidón. Tesis de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Du, W-X., Avena-Bustillos R. J., Hua, S., Mc Hung, T. H. (2011). Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Méndez-Vilas (Ed.)
- Fabra, M.J., Talens, P., y Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapour permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. Journal of Food Engineering, 85, 393-400.

- Fabra, M. J., Talens, P., Chiralt, A. (2009). 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). Water sorption isotherms and phase transitions of sodium caseinate-lipid films as affected by lipid interactions. *Food Hydrocolloids*, 24, 384-391.
- Hutchings, J.B. (1999). *Food and Colour Appearance*, Second Edition. Gaithersburg, Maryland: Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication.
- Larsson, K., y Dejmek, P. (1990). Crystal and liquid crystal structures of lipids. En K. Larsson, & S. E. Friberg (Eds.), *Food emulsions*. New York/Basel: Maecer Dekker, Inc.
- Leceta, I., Guerrero, P., de la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 93, 339-346.
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., Chiralt, A. (2010). Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 82, 585-593.
- Jiménez, A., Chiralt, A., Talens, P., Fabra, M.J. (2013). Propiedades de films de almidón de maíz. Influencia de la incorporación de lípidos, biopolímeros y compuestos bioactivos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Jiménez, A., Sánchez-González, L., Desobry, S., Chiralt, A., Tehrany, E. A. (2014). Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35, 159-169.
- Judd, D. B. y Wyszecski, G. (1975). *Colour in Business, Science and Industry*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Krog, N. J. (1990). Food emulsifiers and their chemical and physical properties. En K.Larsson, & S. E. Friberg (Eds.), *Food emulsions*. New York/Basel: Maecer Dekker, Inc.
- Ma, X., Chang, P.R., Yu, J. (2008). Properties of biodegradable thermoplastic pea starch/carboxymethyl cellulose and pea starch/microcrystalline cellulose composites. *Carbohydrate Polymers*, 72, 369-375.
- Mc Hugh, T. H. y Krochta, J. M. (1994). Water vapour permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71, 307-312.
- Pérez-Gago, M. B., y 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.
- Quintero, C. J., Falguera, V., Muñoz, H. A. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbaga*, 5, 93-118.
- Salgado, I. D., Atarés, L., Vargas, M., Bonilla, J. (2013). Efecto de la adición de quitosano en las propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y oxígeno, brillo y microestructura en films comestibles a base de almidón de trigo. Tesis de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. y Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23 (8), 2102-2109.
- Sánchez-González, L., Chiralt, A., González-Martínez, C., y Cháfer, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 105, 246-253.
- Sebaaly, C., Jraj, A., Fessi, H., Charcosset, C., Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food Chemistry*, 178, 52-62.
- Shen, Z., Kamdem, D. P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essentials oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 289-296.
- Zhang, H. Y., Tehrany, E. A., Kahn, C. J. F., Ponçot, M., Linder, M., Cleymand, F. (2012). Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 88, 618-627.