

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**Uso potencial de taninos en recubrimientos
comestibles: propiedades físicas y antioxidantes.**

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE ALIMENTOS.

ALUMNO/A:
María Andrés Conde

TUTOR/A ACADEMICO:
Chelo González Martínez

DIRECTOR EXPERIMENTAL:
Amalia I. Cano Embuena

VALENCIA, Julio 2016

USO POTENCIAL DE TANINOS EN RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES: PROPIEDADES FÍSICAS Y ANTIOXIDANTES.

María Andrés Conde, Amalia I. Cano Embuena y Chelo González Martínez.

RESUMEN

En el presente trabajo fin de máster se ha estudiado el efecto de la incorporación de diferentes taninos (hidrolizado gálico, hidrolizado elágico y condensado) en películas comestibles monocapa y bicapa a base de caseinato sódico, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa y gelatina. Para ello, se han analizado las propiedades microestructurales, físicas (espesor, contenido en humedad, solubilidad, permeabilidad al agua, propiedades mecánicas y propiedades ópticas) y antioxidantes de las películas tras su acondicionamiento a 25°C y 53% HR. La interacción de los taninos con los polímeros dio lugar a un mayor espesor que en las películas control y una microestructura heterogénea. Además, la incorporación de los taninos a las diferentes matrices poliméricas modificó sus propiedades físicas y antioxidantes. Las películas con taninos presentaron un menor contenido en humedad, menor solubilidad, permeabilidad al agua, luminosidad, tono, brillo y transmitancia interna. Sin embargo, las películas fueron más rígidas y con mayor pureza de color. Todas las películas con taninos tuvieron capacidad antioxidante en los tres simulantes alimentarios ensayados (A, B y D1), siendo mayor en aquellas con tanino hidrolizado gálico. Se recomienda las películas bicapa ya que presentaron mejores propiedades barrera que las monocapa.

Palabras clave: caseinato sódico, metilcelulosa, HPMC, gelatina, antioxidante.

RESUM

En el present treball fi de màster s'ha estudiat l'efecte de la incorporació de diferents tanins (hidrolitzat gàl·lic, hidrolitzat el·làgic i condensat) en pel·lícules comestibles monocapa i bicapa de caseïnat sòdic, metilcel·lulosa, hidroxipropilmetilcel·lulosa i gelatina. Per a això, s'han analitzat les propietats microestructurals, físiques (espesor, contingut en humitat, solubilitat, permeabilitat a l'aigua, propietats mecàniques i propietats òptiques) i antioxidants de les pel·lícules després de dues setmanes d'emmagatzement a 25°C i 53% HR. La interacció dels tanins amb els polímers va donar lloc a major espessor que en les pel·lícules control, i microestructura heterogènia. A més, la incorporació dels tanins a les diferents matrius polimèriques, va modificar les seves propietats físiques i antioxidants. Les pel·lícules amb tanins van presentar menor contingut en humitat, solubilitat, permeabilitat a l'aigua, lluminositat, to, lluentor i transmitància interna. No obstant això, les pel·lícules van ser més rígides i amb major pureza de color. Totes les pel·lícules amb tanins van tindre capacitat antioxidant en



els tres simulants alimentaris (A, B i D1), sent major en aquelles mostres amb tanins hidrolitzat amb àcid gàl·lic. Es recomana les pel·lícules bicapa ja que van presentar millors propietats barrera que les monocapa.

Paraules clau: caseïnat sòdic, metilcel·lulosa, hidroxipropilmetilcel·lulosa, gelatina, antioxidant.

ABSTRACT

In this work, the effect of different tannins incorporation (gallic hydrolysate, ellagic hydrolysate and condensed) in monolayer and bilayer edible films based on sodium caseinate, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose and gelatine was studied. To this aim, microstructure, physical (thickness, moisture content, solubility, water permeability, mechanical properties and optical properties) and antioxidant properties of the edible films were analysed after two weeks of storage at 25°C and 53% RH. The interactions between tannins and polymer resulted in thicker films than controls and a heterogeneous microstructure. Furthermore, the incorporation of tannins into different polymeric matrices modified their physical and antioxidant properties. The films that contained tannins showed lower moisture content, solubility, water permeability, lightness, hue, brightness and internal transmittance. However, films were more rigid and presented greater chroma values. All edible films with tannins exhibited remarkable antioxidant activity in the three food simulant (A, B, D1) assayed, being the hydrolysate tannin based on galic acid the more powerful. Bilayer films are recommended as they presented enhanced barrier properties.

Key words: sodium caseinate, methylcellulose, HPMC, gelatine, antioxidant.

1. INTRODUCCIÓN

Durante siglos se han utilizados películas o recubrimientos comestibles para prevenir la pérdida de humedad o para mejorar la estética de frutas (Pavlath y Orts, 2009). Estos términos de película y recubrimiento se utilizan indistintamente para indicar que, la superficie de un alimento está cubierta por una fina capa de material con determinada composición.

Los recubrimientos o películas comestibles se clasifican dependiendo del material estructural que los constituye (Cano, 2014). Los componentes mayoritarios comúnmente utilizados en su formulación son las proteínas (caseinatos, gelatina, etc.) y los polisacáridos (almidón, quitosano, derivados de la celulosa: hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa, etc.). Además, pueden incorporar componentes minoritarios como lípidos, plastificantes y sustancias antimicrobianas o antioxidantes. Las propiedades finales de las películas no sólo dependen de una buena selección de los componentes, sino también del proceso de obtención, la naturaleza del disolvente y las condiciones de secado del mismo (Palanca, 2014).

Las películas tienen una función importante como barrera frente a diferentes agentes externos al alimento. La permeabilidad al agua es la propiedad más importante (Palanca, 2014) ya que determina la facilidad con la que el vapor de agua puede atravesar el material. La permeabilidad a los gases, en especial al O₂ y CO₂, puede influir en gran medida en la estabilidad de los alimentos sensibles a la oxidación de lípidos, vitaminas y ciertos pigmentos (Singh y Singh, 2005). Las propiedades ópticas, se consideran importantes puesto que la apariencia de las películas es un factor de calidad que afecta a la aceptación o rechazo por parte de los consumidores, de modo que, hay que tener en cuenta aspectos como la transparencia, el color y el brillo (Palanca, 2014). Respecto a las propiedades mecánicas, las películas deben ser resistentes a la rotura, ser flexibles y presentar la suficiente plasticidad como para adaptarse a posibles deformaciones del producto sin romperse (Lacroix, 2009). Además de proteger al alimento de agentes externos, la adición de sustancias bioactivas con actividad antioxidante y/o antimicrobiana en las películas como aceites esenciales (Cano *et al.*, 2016; Sánchez-González *et al.*, 2011), resveratrol (Pastor *et al.*, 2013), nanopartículas (Orsuwan *et al.*, 2016), etc., puede contribuir a proteger a los alimentos recubiertos frente el ataque microbiano y otras reacciones químicas (Salgado *et al.*, 2015).

Entre los compuestos bioactivos naturales cabe resaltar los taninos por su marcada actividad antioxidante y antimicrobiana (Balasundram *et al.*, 2006; Daglia, 2012). Los taninos son compuestos fenólicos solubles en agua y en otras sustancias (álcalis, alcohol y acetona) formando disoluciones coloidales (Akiyama, 2001). Presentan pesos moleculares entre 500 y 3000 daltons (Porrás-Loaiza *et al.*, 2009) y una estructura con carácter polifenólico (12-16 grupos fenólicos y 5-7 anillos aromáticos por cada 1000 unidades de masa), pudiéndose encontrar en zonas de la planta como son tallos, madera, hojas y semillas (Isaza, 2007). Tienen capacidad de asociarse a iones divalentes y trivalentes y precipitar sales, tales como sales de metales pesados, Fe³⁺, Pb, Zn, Cu. Además, presentan un efecto beneficioso sobre la salud humana,

atribuido a su actividad antioxidante y anticancerígena (Balasundram et al., 2006).

Según Freudenberg, los taninos se clasifican atendiendo a su estructura (Figura 1). Dependiendo de si la polimerización es entre las moléculas elementales o entre otras, se diferencian: los taninos hidrolizables o pirogálicos, los taninos condensados o pirocatequinas y los florotaninos (Álvarez, y Lock de Ugaz, 1992). Los taninos hidrolizables son ésteres de ácidos fenólicos en particular ácido gálico o elágico, y azúcares simples. Son más pequeños que los taninos condensados y son hidrolizados con facilidad en medio ácido diluido. Con respecto a los taninos condensados (a veces también llamados proantocianidinas), son compuestos derivados de unidades de flavan-3,4-dioles unidas entre sí por enlaces C-C en las posiciones 4-8 y 4-6 (Isaza, 2007; Álvarez y Lock de Ugaz, 1992). Es común encontrarlos en la madera de las plantas leñosas. Por último, los florotaninos son polifenoles aislados de varias especies de algas pardas, cuyas estructuras están constituidas por unidades de floroglucinol unidas por enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno y, están caracterizados por su esqueleto de dibenzo-1,4-dioxina (Isaza, 2007).

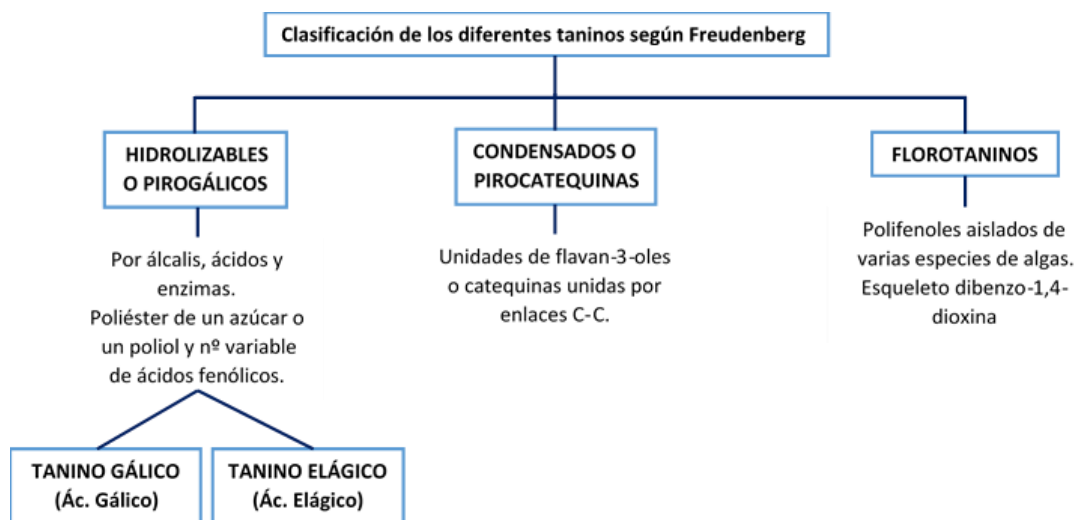


FIGURA 1. Clasificación de los taninos según Freudenberg.

Tal y como se ha descrito anteriormente, los taninos son compuestos fenólicos, por lo que intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, debido a su estructura y sus propiedades redox, las cuales juegan un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres y, en la descomposición de peróxidos (Balasundram *et al.*, 2006). Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares y cáncer (Daglia, 2012).

A parte de la actividad antioxidante, existen investigaciones que estudian otros efectos biológicos de los taninos como su actividad antimicrobiana debido a que son metabolitos secundarios muy distribuidos en plantas superiores, con un importante papel como defensa contra microorganismos patógenos y hongos (Akiyama *et al.*, 2001 y Doss *et al.*, 2009).

En la bibliografía existen numerosos estudios sobre películas o recubrimientos comestibles bioactivos a base de caseinatos (Arrieta *et al.*, 2013; Fabra *et al.*, 2011; Atarés *et al.*, 2010), gelatina (Clarke *et al.*, 2016; Fakhouri *et al.*, 2015), hidroxipropilmetilcelulosa (Akhtar *et al.*, 2013; Rubilar *et al.*, 2015) y metilcelulosa (Romano *et al.*, 2014; Peressini *et al.*, 2003) donde se han incorporado diferentes compuestos bioactivos naturales. Sin embargo, en ninguno de ellos se ha estudiado el efecto de la incorporación de taninos.

Teniendo en cuenta las nuevas tendencias comerciales en el sector alimentario y conociendo las propiedades beneficiosas que pueden aportar los taninos a las películas comestibles, el objetivo de la presente Tesis de Master es estudiar el efecto de la incorporación de tres taninos a diferentes recubrimientos comestibles a base de gelatina, caseinato sódico, hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa. Para ello, se han obtenido las películas y se ha determinado su actividad antioxidante en diferentes simulantes alimentarios, así como sus propiedades físicas (propiedades mecánicas, ópticas, humedad, solubilidad, espesor y permeabilidad al vapor de agua).

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Materiales

Para la obtención de las películas se utilizó hidroxipropilmetilcelulosa (H) y caseinato sódico (Cs) suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid), metilcelulosa (M) suministrada por VWR (Llinars del Vallés, Barcelona) y gelatina bovina (G) tipo A procedente de Sancho de Borja (Zaragoza).

A estos polímeros se les adicionaron como compuestos activos tres tipos de taninos (hidrolizado gálico-H_g, hidrolizado elágico-H_e y condensado-C) suministrados por Dolmar Productos Enológicos S.L. (Haro, La Rioja).

Como plastificante se utilizó glicerol suministrado por Panreac Química S.A (Castellar del Vallés, Barcelona), necesario únicamente para las películas de caseinato.

2.2. Diseño y obtención de las películas

2.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se prepararon 18 formulaciones a base de agua destilada, polímero y cada uno de los diferentes taninos (tabla 1). La dispersión formadora de recubrimiento (DFR) se preparó al 2% (p/p) para las películas de Cs, G y M, y al 5% (p/p) para las de H. Posteriormente, se adicionaron los taninos en un ratio polímero:tanino de 3:1 y el glicerol al 30% en el caso de la DFR de caseinato.

TABLA 1. Nomenclatura, composición y codificación de las formulaciones ensayadas.

MATRIZ POLIMÉRICA	FORMA DE ELABORACIÓN	TANINO	NOMENCLATURA	CODIFICACIÓN
Caseinato sódico	Monocapa	No	Cs	1
		Hidrolizado gálico	CsH _g ^m	2
		Hidrolizado egálico	CsH _e ^m	3
	Bicapa	Condensado	CsC ^m	4
		Hidrolizado gálico	CsH _g ^b	5
		Hidrolizado egálico	CsH _e ^b	6
		Condensado	CsC ^b	7
Metilcelulosa	Monocapa	No	M	8
		Hidrolizado gálico	MH _g ^m	9
		Hidrolizado egálico	MH _e ^m	10
	Bicapa	Condensado	MC ^m	11
		Hidrolizado gálico	MH _g ^b	12
		Hidrolizado egálico	MH _e ^b	13
		Condensado	MC ^b	14
HPMC	Bicapa	No	H	15
		Hidrolizado gálico	HH _g ^b	16
		Hidrolizado egálico	HH _e ^b	17
		Condensado	HC ^b	18
Gelatina	Bicapa	No	G	19
		Hidrolizado gálico	GH _g ^b	20
		Hidrolizado egálico	GH _e ^b	21
		Condensado	GC ^b	22
-	-	Hidrolizado gálico	H _g	23
-	-	Hidrolizado egálico	H _e	24
-	-	Condensado	C	25

2.2.2. OBTENCIÓN DE LAS PELÍCULAS

Las películas se obtuvieron de dos formas diferentes: monocapa (Cs y M) y bicapa (Cs, M, H y G). A los primeros se les adicionó el tanino a la DFR y, a las bicapa se les adicionó una disolución de tanino correspondiente a un ratio tanino:agua de 1:10, tras el secado parcial de la película.

Una cantidad determinada de DFR, previamente calculada, se vertió en placas de teflón de 150 mm de diámetro. La cantidad de sólidos totales finales en la película (2g) se mantuvo constante en todas las formulaciones. Tras verter la DFR, las muestras se dejaron secar durante 24-48 horas a una humedad relativa de 45% (± 2) y una temperatura de 23 (± 1) °C. Una vez secas, las películas monocapa se despegaron de las placas de teflón y, a las bicapas, como se ha descrito anteriormente, tras secarse parcialmente se les adicionó la disolución de tanino en la superficie. Finalmente, se despegaron y, todas las formulaciones, se almacenaron en desecadores a una humedad relativa de 53%, mediante el uso de una disolución saturada de nitrato de magnesio 6-hidrato (Panreac Química, S.A, Castella del Vallés, Barcelona) y a una temperatura de 25°C.

Las muestras se analizaron tras dos semanas de almacenamiento, una vez equilibradas.

2.3. Caracterización de las películas

2.3.1. PROPIEDADES MICROESTRUCTURALES

El análisis de la microestructura de las películas se realizó a través de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM, Zeiss, Alemania). Las muestras se montaron en un soporte de metal de tal forma que se pudo observar la sección transversal de las películas. Finalmente, se cubrieron con carbono con la finalidad de hacerlas conductoras y poder observarlas en el microscopio. Fueron observadas directamente con un voltaje de aceleración de 1 KV y una distancia de trabajo de 5.3 mm.

2.3.2. ESPESOR DE LAS PELÍCULAS

El espesor de las películas se midió en seis puntos diferentes de éstas, utilizando un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona) con una precisión de 0.001 mm.

2.3.3. HUMEDAD Y SOLUBILIDAD DE LAS PELÍCULAS

Para determinar el contenido en humedad de las películas, 5 muestras de cada formulación se secaron en una estufa de convección a 60°C durante 24 horas y, posteriormente se trasladaron a un desecador con P₂O₅ (Panreac Química S.A.) a temperatura ambiente hasta alcanzar un peso constante.

Para determinar la solubilidad, se pesaron 5 muestras de las diferentes formulaciones y se añadió agua en una proporción película: agua destilada de 1:80. Tras 24 horas en contacto, se sacaron las películas de los crisoles y se secaron las muestras tal y como se ha descrito anteriormente.

2.3.4. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

La propiedad de barrera al agua de las películas se evaluó mediante la permeabilidad a vapor de agua según una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (Mc Hugh *et al.*, 1994), para un gradiente de humedad relativa entre 53 y 100% y una temperatura de 25°C. Las películas fueron seleccionadas y cortadas de manera que no presentaran defectos físicos como pueden ser roturas o burbujas. Se prepararon cuatro muestras por formulación, se montaron entre la base y la tapa de una copa de aluminio de 3.5 cm de diámetro (Payne, elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica). En el interior de la copa, se adicionó agua destilada para crear un ambiente con HR del 100%. Cada una de las copas se introdujo dentro de un desecador con una disolución saturada de nitrato magnésico (HR de 53%).

Para poder estudiar la permeabilidad que presentaba cada muestra, se realizaron controles de peso de cada copa con una balanza electrónica ($\pm 0,00001$) (ME36S Sartorius, Alemania). La transmisión de vapor de agua se determinó a partir de la pendiente obtenida en el análisis de regresión de los datos del peso frente al tiempo, dividido por el área de la película.

2.3.5. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de las películas se determinaron con una prensa universal de ensayos mecánicos Stable Micro Systems, TA.XT plus (Haslemere, Inglaterra) de acuerdo al método estándar D882 (ASTM, 1992).

Para cada una de las 18 formulaciones se cortaron 8 muestras de 25 x 100 mm y, posteriormente, se equilibraron en un desecador a una HR de 53% y a una temperatura de 25°C. A la hora de realizar el ensayo, las películas se montaron en unas pinzas para ensayos de tensión (modelo A/TG, Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). La separación inicial de las pinzas y la velocidad de elongación de las películas fueron de 50 mm y 20 mm/min, respectivamente. Tras realizar el ensayo se obtuvieron las curvas de fuerza-distancia, las cuales se transformaron en curvas de tensión (σ)-deformación de Henky (ϵ_H), de modo que permitieron obtener los parámetros mecánicos de módulo de elasticidad (EM), tensión de fractura (TS) y deformación hasta el punto de fractura (E).

2.3.6. PROPIEDADES ÓPTICAS

Se determinaron las coordenadas L^* , C_{ab}^* y h_{ab}^* así como la transmitancia interna (T_i) de las películas como medida de la transparencia. Para ello, los espectros de reflexión (400-700nm) sobre fondo blanco y fondo negro se determinaron con un espectrocromómetro Minolta, modelo CM-3600d (Minolta CO. Tokyo, Japón) con un área de la muestra de 30mm, usando un iluminante D65/ observador de 10°. Estas determinaciones se realizaron por triplicado y sobre la cara de la película que había estado en contacto con el aire durante la etapa de secado. La opacidad de las películas se determinó mediante la teoría de Kubelka-Munk de dispersión múltiple a los espectros de reflexión (Judd y Wysecki, 1975; Hutchings, 1999). Dicha teoría se basa en que la luz que incide en un producto translúcido puede ser absorbida o dispersada en función del coeficiente de absorción (K) y de dispersión (S) del material a analizar. La transmitancia interna de las películas se determinó según el método descrito por Cano et al., (2014). El brillo se determinó por triplicado a un ángulo de incidencia de 60° respecto a la normal sobre un fondo negro, utilizando un brómeto Multi-Gloss 268, Minolta.

2.3.7. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

El poder antioxidante de las películas se midió mediante una determinación *in vitro* de la capacidad de eliminación de los radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Este método se basa en la reducción del DPPH en una solución alcohólica en presencia de un compuesto antioxidante donador de hidrógeno, debido a la formación de la forma no radical de DPPH en reacción. En la forma radical, estas moléculas muestran absorbancias de 515nm, las cuales desaparecen al tomar un electrón o un radical hidrógeno proveniente de un compuesto antioxidante, dando lugar a una molécula estable.

Para llevar a cabo el ensayo, muestras de 1,1 cm² (3,125mg de tanino) de cada una de las películas se puso en contacto con 50 ml de tres simulantes alimentarios diferentes (Etanol 10% (v/v) – Simulante A, ácido acético 3% (v/v)

- Simulante B, y etanol 50% (v/v) – Simulante D1) y, se dejaron en agitación durante 12 horas a 25°C. La reducción de la absorbancia a 25°C se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro Evolution 201 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, EEUU) a una longitud de onda de 515nm. Estas medidas se realizaron a los 40 minutos, tiempo en el cual la reacción había llegado a un estado estacionario. La concentración de DPPH medio (mM) en la reacción, se calculó mediante una recta de calibrado (Ecuación 1 ($R^2=0,999$)).

$$\text{Abs}_{515\text{nm}} = 14,546 \cdot [\text{DPPH}] - 0,005 \quad (1)$$

Una vez realizado el ensayo, se representó el porcentaje de DPPH frente a los g de película/mg de DPPH, para obtener la cantidad de antioxidante necesario para reducir la concentración de DPPH hasta un 50% (EC_{50}). Este parámetro se utilizó para medir la actividad antioxidante que presentaban las películas, expresada en g de película/mg de DPPH y por g de tanino/mol de DPPH.

2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) usando el programa Statgraphics Centurion XVI. Para discernir entre las medias se utilizó el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de las películas

3.1.1. PROPIEDADES MICROESTRUCTURALES

La estructura final de la película depende de la organización de los diferentes componentes en las DFRs, de su evolución durante el secado de las películas y de las interacciones entre ellos.

La Figura 2 muestra las micrografías de la sección transversal de las películas control (Cs, M, H y G) obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM). Todas las películas puras muestran una estructura compacta, homogénea y continua, tal y como ha sido descrito previamente por otros autores (Jiménez *et al.*, 2012; Pastor *et al.*, 2013; Pastor *et al.*, 2010 tesis; Villalobos *et al.*, 2005; Sánchez-González *et al.*, 2009 y Jiménez *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014). En algunas películas se observaron micro-roturas durante la observación al microscopio debido a la fragilidad de su estructura.

La incorporación de taninos a las películas introdujo diferencias a nivel microestructural asociadas a la dificultad de entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas cuando los taninos están presentes en la matriz, dando lugar a un incremento en el espesor de las películas tal y como se puede observar en la Figura 5.

Las Figuras 3 y 4 muestran un resumen de las micrografías de las secciones transversales de las películas monocapa y bicapa, respectivamente. Las películas basadas en proteínas (Cs y G) mostraron una estructura muy similar, del mismo modo que las basadas en hidrocoloides (M y H), por ello solo se muestran algunas formulaciones a modo de ejemplo. Esto sugiere que las interacciones entre los taninos y las matrices poliméricas dependen sustancialmente del tipo de matriz.

En los cortes transversales de las películas monocapa, las de Cs fueron muy similares a las de G, por lo que solo se muestran los de Cs. Se puede apreciar además, que los tres taninos dieron lugar a estructuras muy parecidas, con zonas compactas, lisas y fracturadas, probablemente en las zonas ricas en taninos. Las películas monocapa de M mostraron una organización más desordenada, porosa en algunos casos, pero homogénea, sin que se puedan diferenciar los diferentes componentes de la mezcla, típico de componentes parcialmente compatibles entre sí. Tampoco hubo grandes diferencias entre H_g y H_e. En cambio, la micrografía transversal de metilcelulosa con tanino C presentó una estructura más lisa y ordenada, más parecida a los caseinatos.

En las películas bicapa (Figura 4), las secciones transversales muestran dos capas, una primera capa (parte superior) compuesta por taninos, ya que estos se adicionaron tras el secado parcial de la matriz polimérica, y una segunda capa (parte inferior), atribuida a la matriz polimérica de la película. La capa de taninos es compacta y continua y presenta grietas que ponen de nuevo de manifiesto la fragilidad de la misma. El grado de interacción de la capa de taninos con la capa polimérica de abajo determinó en gran medida las propiedades mecánicas y barrera de las mismas. No se observaron diferencias estructurales importantes entre los diferentes taninos.

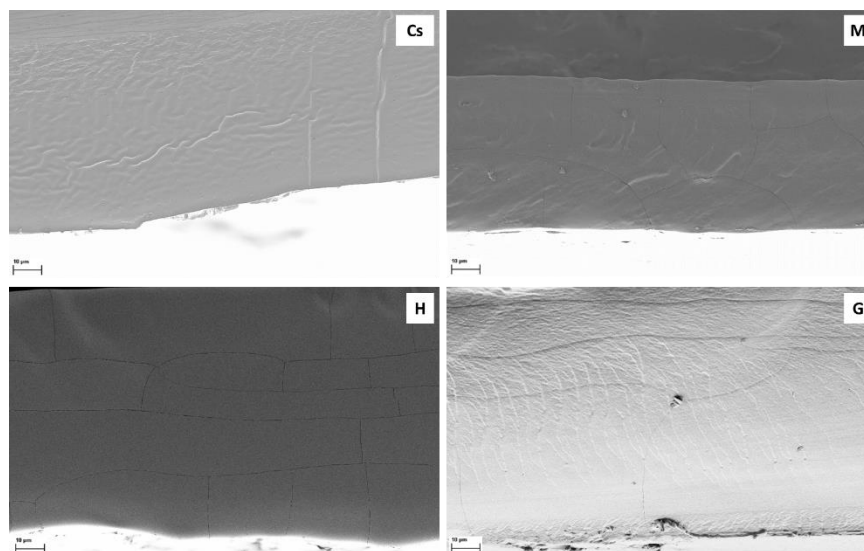


FIGURA 2. Micrografías de la sección transversal de las películas puras obtenidas mediante FESEM (Cs: caseinato, M: metilcelulosa, H: HPMC y G: gelatina).

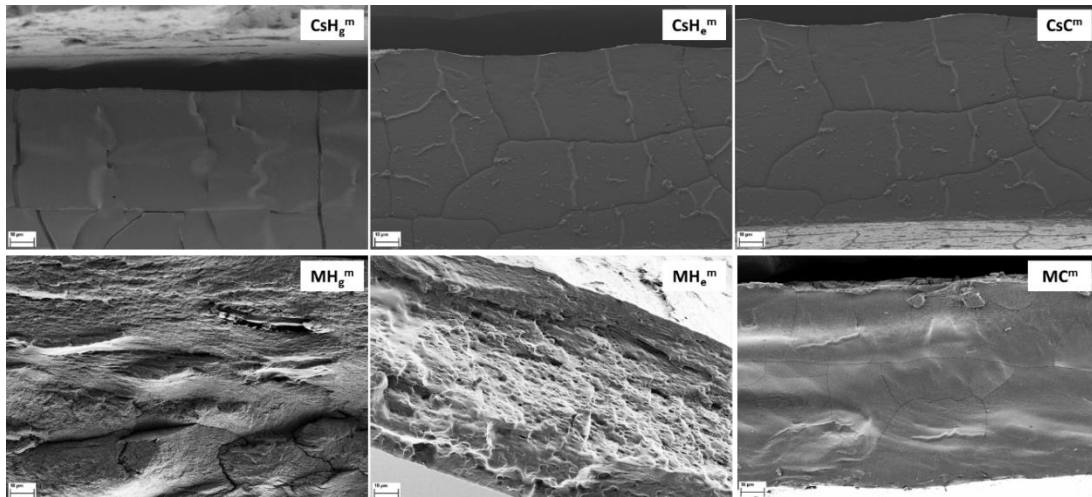


FIGURA 3. Micrografías de la sección transversal de las películas monocapa con diferentes taninos (H_g , H_e y C) obtenidas mediante FESEM.

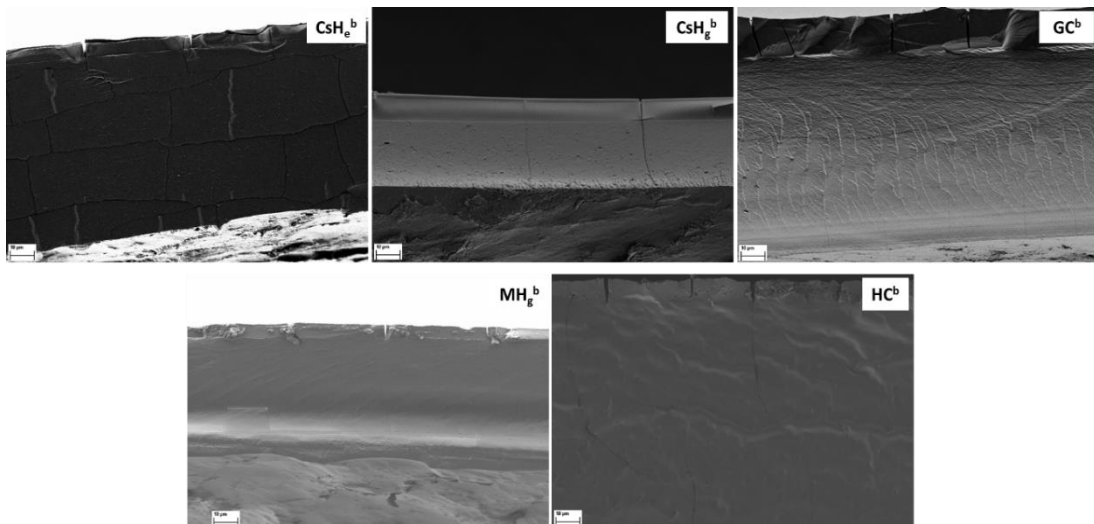


FIGURA 4. Micrografías de la sección transversal de las películas bicapa con diferentes taninos (H_g , H_e y C) obtenidas mediante FESEM.

3.1.2. ESPESOR DE LAS PELÍCULAS

Normalmente el espesor de las películas está condicionado por la humedad que retiene y por las interacciones entre componentes, que hacen que éstos se dispongan de forma más expandida o más compacta.

En el caso de las películas de caseinato y de metilcelulosa, el espesor aumentó en mayor medida, como consecuencia de la incorporación de taninos (Figura 5 y Tabla A2 del anexo). En el caseinato, no fue significativo ni el tipo de tanino ni la forma de obtención (monocapa o bicapa). En este caso, el efecto es probablemente debido a la repulsión electrostática entre componentes con la misma carga (negativas), a pesar de la disminución en el contenido en humedad (Figura 6). Con metilcelulosa, este efecto fue más acusado ($p < 0.05$) en las películas monocapa (formulaciones 9 a 11) y entre

ellas, las que incorporaron tanino H_g (formulación 9), que justamente presentaron el mayor contenido en humedad.

Por último, en las películas bicapa de H y G, este aumento de espesor solo fue significativo cuando se utilizó tanino H_e (formulaciones 17 y 21).

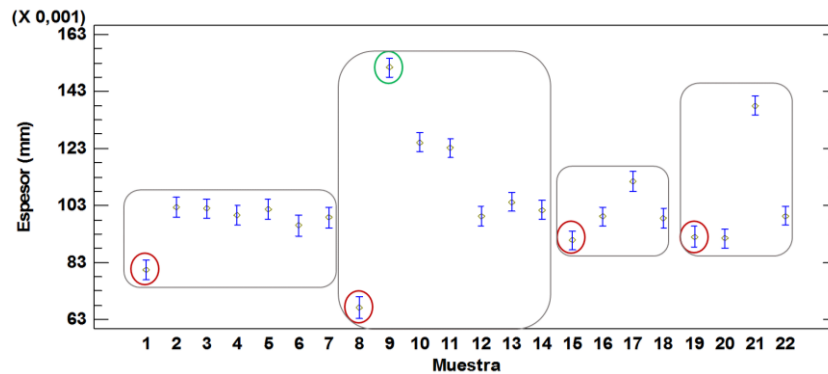


FIGURA 5. Valores medios de espesor e intervalos LSD a un nivel de confianza del 95% para las diferentes películas de Cs (1-7), M (8-14), H (15-18) y G (19-22). En rojo: matrices puras.

3.1.3. CONTENIDO EN HUMEDAD

Los valores del contenido en humedad de las diferentes películas almacenados a 25°C y HR 53% analizados tras dos semanas de acondicionamiento, se muestran en la Figura 6 y Tabla A1 (anexo). Todas las matrices puras (señaladas en rojo) mostraron valores de humedad similares a las descritas previamente en otros estudios, acondicionadas a la misma temperatura y humedad relativa (Atarés *et al.*, 2010; Pastor *et al.*, 2013; Akhtar *et al.*, 2013; Moreno *et al.*, 2016).

Al incorporar los taninos, se observaron diferentes comportamientos dependiendo de la matriz polimérica. En las matrices más higroscópicas, como es el caso de las proteínas (caseinato y gelatina), se observó una reducción significativa en el contenido en humedad al adicionar los taninos en dicha matriz. Esto fue mucho más acusado cuando se utilizó caseína. En cambio, cuando se utilizaron polisacáridos (menos higroscópicos), la humedad aumentó ligeramente con respecto a los controles, aunque este aumento no siempre fue significativo (en formulaciones 14, 16 y 18, $p > 0.05$). Por último, comentar que en general, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de humedad entre las películas monocapa y bicapa ni debido al tipo de tanino utilizado. Solo las formulaciones MH_g^m (9) y la HH_e (17) presentaron un mayor contenido en humedad con respecto a su control.

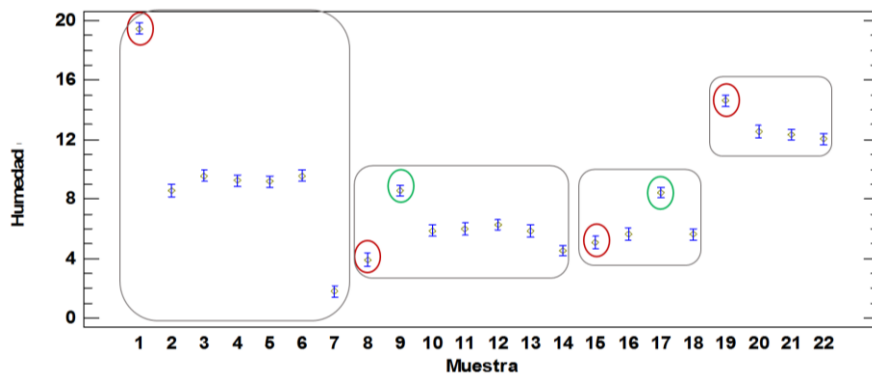


FIGURA 6. Valores medios de humedad e intervalos LSD a un nivel de confianza del 95% para las diferentes películas de Cs (1-7), M (8-14), H (15-18) y G (19-22). En rojo: matrices puras.

3.1.4. SOLUBILIDAD

Se determinó la solubilidad de 5 muestras de películas comestibles de cada una de las diferentes formulaciones, obteniendo los valores que se muestran en la Figura 7 y Tabla A1 (anexo). Las matrices puras presentaron un porcentaje de solubilidad en agua alrededor del 100%, tal y como ha sido descrito previamente por otros autores (Jridi *et al.*, 2014; Fabra *et al.*, 2011; Rubilar *et al.*, 2015), debido a su marcada naturaleza hidrofílica. Las mezclas con taninos presentaron también valores cercanos al 100%, excepto las formulaciones CsH_g^b (5) y las formuladas a base de metilcelulosa (del 8 al 14), que redujeron su solubilidad en torno al 20-50%.

Las menos solubles fueron las películas formuladas con metilcelulosa y tanino hidrolizado gálico H_g (formulaciones 9 y 12), y entre ellas, las formulaciones monocapa (9). Esto puede deberse a las interacciones establecidas entre metilcelulosa-H_g, que son más intensas en las formulaciones monocapa y disminuyen la solubilización de dicho polímero en el agua.

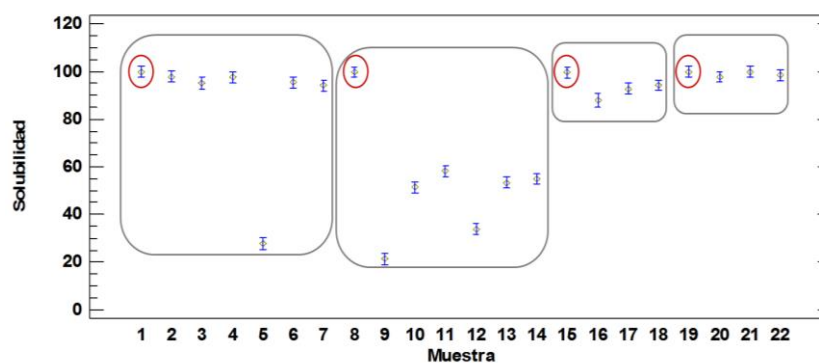


FIGURA 7. Valores medios de solubilidad e intervalos LSD a un nivel de confianza del 95% para las diferentes películas de Cs (1-7), M (8-14), H (15-18) y G (19-22). En rojo: matrices puras.

3.1.5. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (PVA)

Los valores medios e intervalos LSD de la PVA de las diferentes formulaciones se pueden ver en la Figura 8 y en la Tabla A1 del anexo. Como se puede observar en dicha figura, la PVA dependió del tipo de matriz y tipo de taninos incorporados a las películas.

La incorporación de taninos tuvo un efecto marcado sobre las propiedades barrera al agua en matrices con alta PVA, como es el caso del caseinato, que se vio reducida ($p < 0.05$) sobre todo al usar tanino H₉ (formulaciones 2 y 5). Su estructura más homogénea, deducida de las micrografías obtenidas, podría explicar su mayor efecto barrera al vapor de agua (Martin-Polo et al., 1992b). En el resto de las películas con PVA menores, ésta no se vio afectada o incluso empeoró ligeramente (mayor valor) en algunos casos (9, 11, 13 y 21). En general, las películas bicapa tuvieron una PVA menor que las monocapa, por la mayor resistencia al paso del vapor de agua que opone la presencia de diferentes capas continuas (a modo de láminas), tal y como ha sido observado por otros autores en películas hidrofílicas (Kamper y Fennema, 1984; Martin-Polo et al., 1992a).

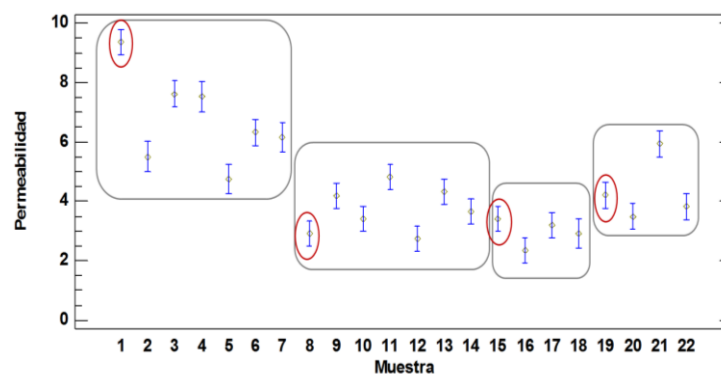


FIGURA 8. Valores medios de permeabilidad al agua e intervalos LSD a un nivel de confianza del 95% para las diferentes películas de Cs (1-7), M (8-14), H (15-18) y G (19-22). En rojo: matrices puras.

3.1.6. PROPIEDADES MECÁNICAS

La Figura 9 y la Tabla A2 muestran la media e intervalos LSD de los valores de tensión (TS) y deformación (E) en el punto de ruptura y el módulo de elasticidad (ME) de las películas, relacionadas con la dureza, extensibilidad y la rigidez de las muestras, respectivamente. En rojo se han marcado los controles sin taninos.

El efecto de la incorporación de taninos en las propiedades mecánicas de las películas dependió del tipo de matriz polimérica y del tipo de tanino usado. Para aquellas matrices con una alta extensibilidad (altos valores de E) y baja rigidez (bajos valores de ME) (Cs y M), la incorporación de taninos las hizo menos extensibles (menor %E) y más rígidas (mayor ME). En cambio, para aquellas matrices ya de por sí poco extensibles y rígidas (como H y G), los cambios fueron, en general, poco notables o incluso, opuestos, como en el

caso del tanino hidrolizado elágico (formulaciones 17 y 21), que disminuyó la rigidez ($p < 0.05$).

La tensión en el punto de fractura (TS) no se vio afectada significativamente en el caso de las películas de caseinato. En cambio, con metilcelulosa los valores aumentaron alrededor de un 50%, especialmente cuando se utilizó tanino H_g (formulación 9). La incorporación de taninos a HPMC o gelatina tuvo un efecto similar en ambas matrices, que quedaron debilitadas (menores valores de TS), sobre todo al utilizar tanino H_e (formulaciones 17 y 21).

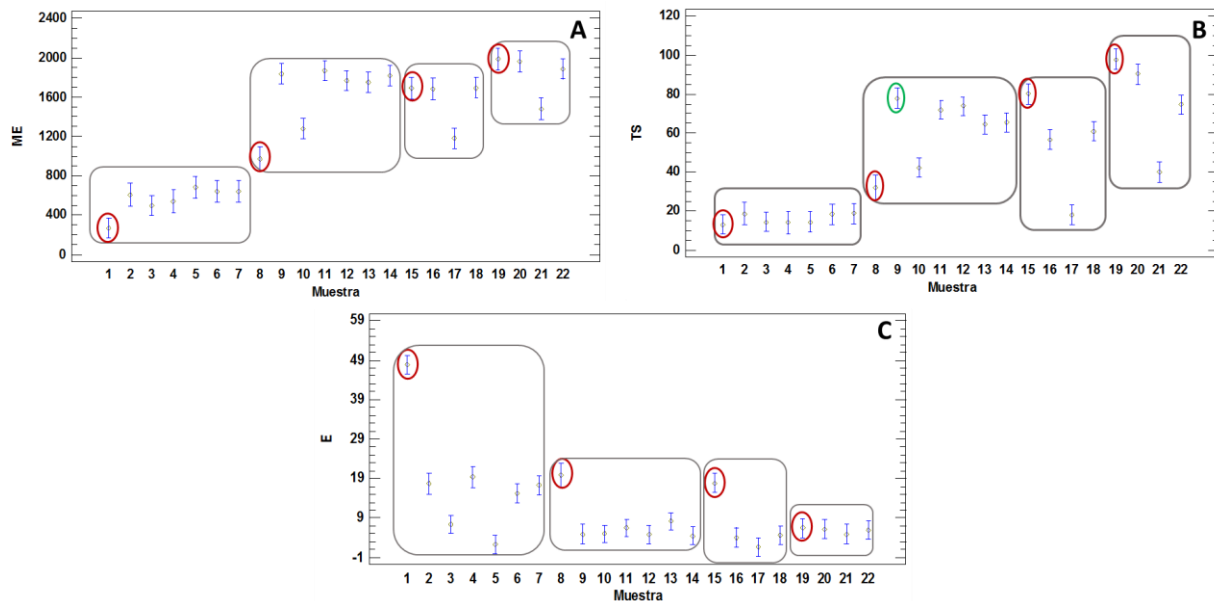


FIGURA 9. Valores medios de A) módulo elástico (ME), B) tensión de fractura (TS) y C) deformación (E) e intervalos LSD a un nivel de confianza del 95% para las diferentes películas de Cs (1-7), M (8-14), H (15-18) y G (19-22). En rojo: matrices puras.

3.1.7. PROPIEDADES ÓPTICAS

Según Hutchings (1999), las propiedades ópticas de mayor relevancia a la hora de evaluar el color y el aspecto de un producto recubierto son la opacidad y el brillo. En este caso, además, también se determinó la luminosidad (L^*), la tonalidad (h_{ab}^*) y la pureza de color o croma (C_{ab}^*), obteniendo los resultados que se muestran en las Figuras 10, 11 y 12 y la Tabla A3 (anexo).

En lo que se refiere al parámetro de luminosidad (Figura 11), los controles presentaron los valores más altos, siendo similares a los encontrados previamente por otros autores (Atarés *et al.*, 2010; Pastor *et al.*, 2013; Atarés *et al.*, 2011; Jridi *et al.*, 2014, Moreno *et al.*, 2016).

La incorporación de taninos disminuyó la luminosidad, el tono de las películas y los valores de transmitancia interna (Figuras 10 y 11) (relacionada con la transparencia-opacidad) de forma significativa, y este efecto fue más marcado ($p < 0.05$) al incorporar tanino condensado C (4,11,18 y 22) y tanino hidrolizado elágico H_e (3,10,17,21), que aportaron menor luminosidad, coloraciones pardo-rojizas y mayor opacidad.

La pureza de color o croma aumentó ($p < 0.05$) debido a la incorporación de taninos (sobre todo al utilizar H_g), excepto en las formulaciones de caseinato con tanino condensado e hidrolizado elágico (3,6,4,7). Esto puede deberse a que, el propio caseinato tiene una tonalidad amarillenta similar a la del tanino H_g, lo que hace que se reduzca su pureza con la adición de los taninos oscuros como el C o el H_e. La forma de obtención de las películas (monocapa o bicapa) no tuvo un efecto significativo en las propiedades ópticas comentadas.

En cuanto al brillo (Figura 12), las matrices puras sin taninos presentaron valores similares a los encontrados por otros autores. En general, la adición de taninos disminuyó el brillo de las películas, excepto cuando se utilizó tanino H_g como bicapa (formulaciones 5, 12, 16 y 20). En este caso, aumento el brillo o no fue diferente del control (formulación 16). La formación de una capa superficial más homogénea y lisa con este tanino podría explicar este efecto (Figura 4).

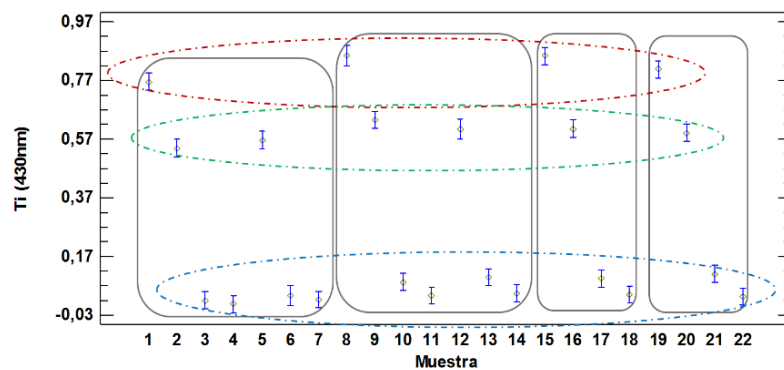


FIGURA 10. Valores medios de transmitancia interna (Ti) e intervalos LSD a un nivel de confianza del 95% para las diferentes películas de Cs (1-7), M (8-14), H (15-18) y G (19-22). En rojo: matrices puras.

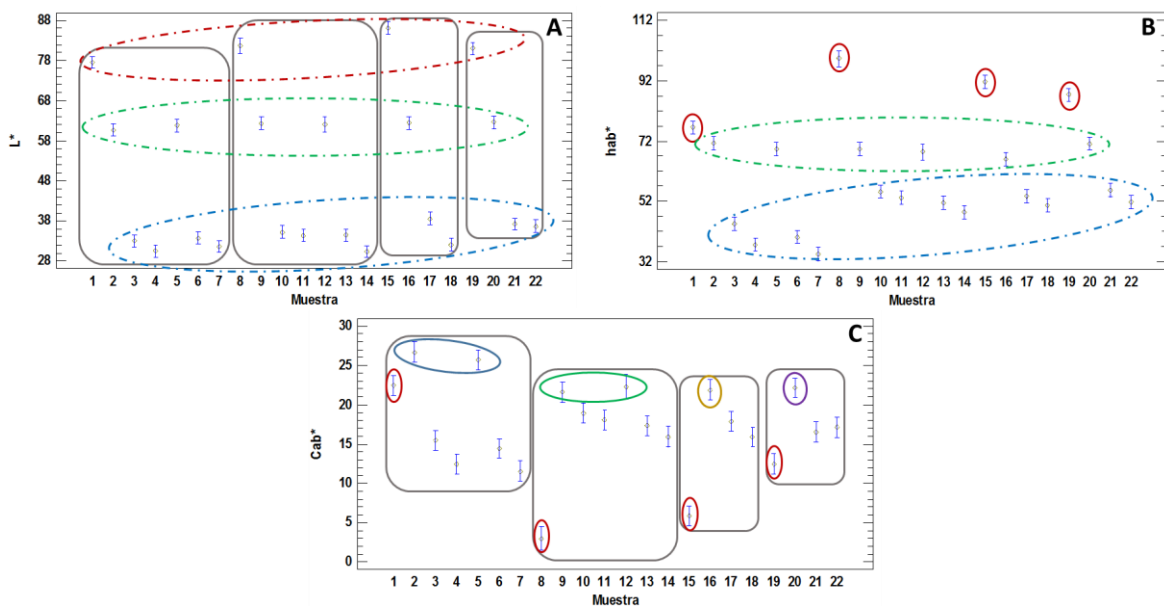


FIGURA 11. Valores medios de A) luminosidad (L^*), B) tonalidad (h_{ab}^*) y C) croma (C_{ab}^*) e intervalos LSD a un nivel de confianza del 95% para las diferentes películas de Cs (1-7), M (8-14), H (15-18) y G (19-22). En rojo: matrices puras.

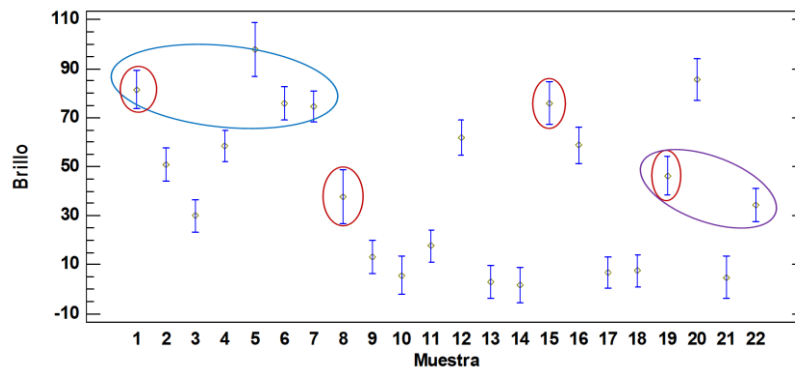


FIGURA 12. Valores medios de brillo e intervalos LSD a un nivel de confianza del 95% para las diferentes películas de Cs (1-7), M (8-14), H (15-18) y G (19-22). En rojo: matrices puras.

3.1.8. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante (AA), expresada en g de tanino/mol DPPH, tanto de los taninos puros (23:H_g; 24:H_e; 25:C) como de las películas desarrolladas, se determinó para tres simulantes alimentarios diferentes: simulante A – etanol al 10% (v/v), simulante B - ácido acético al 3% (v/v) y simulante D1 – etanol al 10% (v/v) (Figura 13). Tal y como se puede observar en la figura y en la tabla A4 (anexo), todas las películas con taninos presentaron AA, y dicha actividad dependió del tipo de tanino. En general, el poder antioxidante siguió el siguiente orden: H_g>>H_e>C (al igual que los taninos puros), independientemente del simulante utilizado. Estos resultados sugieren que la actividad antioxidante fue similar tanto en medios polares como apolares, de acuerdo con la alta solubilidad de estos compuestos tanto en agua como en etanol (Akiyama, 2001). Además, esa AA fue similar a los compuestos puros, lo que sugiere que no hay una pérdida de dicha actividad durante el secado o acondicionamiento de las películas. No se vio un efecto claro de la forma de obtención de las películas (monocapa-bicapa) sobre su actividad antioxidante.

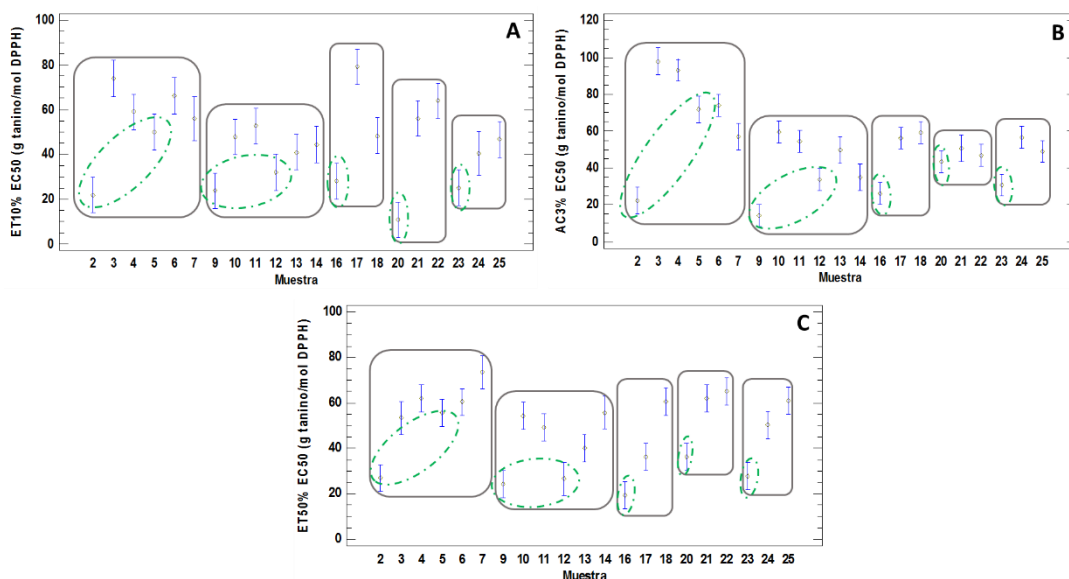


FIGURA 13. Valores medios de la capacidad antioxidante en A) simulante A, B) simulante B y C) simulante D1 e intervalos LSD a un nivel de confianza del 95% para las diferentes películas de Cs (1-7), M (8-14), H (15-18) y G (19-22).

4. CONCLUSIONES

La incorporación de taninos a las matrices poliméricas dio lugar a cambios significativos en sus propiedades físicas y capacidad antioxidante, siendo los factores más significativos estadísticamente, el tipo de tanino y la matriz polimérica utilizada. Las mejores formulaciones resultaron ser las de metilcelulosa, ya que, al incorporar taninos, mejoraron sus propiedades mecánicas (presentaron mayor dureza y rigidez), redujeron considerablemente su solubilidad, a la vez que presentaron la mayor capacidad antioxidante con respecto al resto de películas estudiadas. De los diferentes taninos utilizados, se recomienda utilizar el tanino hidrolizado gálico, cuyos efectos en la matriz de metilcelulosa fueron más marcados. En cuanto a la forma de obtención de las películas, se recomiendan las bicapa, ya que presentaron mejores propiedades barrera que las monocapa.

5. REFERENCIAS

- Acosta S., González-Martínez C., Cháfer M. (2014). Propiedades de films de almidón de yuca y gelatina. Incorporación de aceites esenciales con efecto antifúngico. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Akhtar M.J., Jacquot M., Jamshidian M., Imrad M., Arab-Tehrany E., Desobry S. (2013). Fabrication and physicochemical characterization of HPMC films with commercial plant extract: Influence of light and film composition. *Food Hydrocolloids*, 31, 420-427.
- Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K. (2001). Antimicrobial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 48, 487-491.
- Alvarez C., Lock de Ugaz O. (1992). Taninos. *Revista de Química*. VI n^o1, 47-61.
- Arrieta M.P., Peltzer M.A., Garrigós M.C., Jiménez A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114, 486-494.
- ASTM (1992). Standard methods for tensile properties of thin plastic sheeting. In: *Annualbook of American Standard Testing Methods*. D882-91. Philadelphia, Pa:ASTM
- Atarés L., Bonilla J., Chiralt A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100, 678-687.
- Atarés L., Pérez-Masiá R., Chiralt A. (2011). The role of some antioxidants in the HPMC film properties and lipid protection in coated toasted almonds. *Journal of Food Engineering*, 104, 649-656.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Cano A.I., Cháfer M., Chiralt A., González-Martínez C. (2016). Physical and antimicrobial properties of starch-PVA blend films as affected by the incorporation of natural antimicrobial agents. *Foods*, 5,3, DOI: 10.3390/foods5010003.
- Cano A.I., Jiménez A., Chiralt A., Cháfer M., González-Martínez C. (2014). Efecto de la incorporación de salvado de arroz sobre las propiedades físicas y microestructurales de films biodegradables a base de almidón. Trabajo Fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Clarke D., Molinaro S., Tyuftin A., Bolton D., Fanning S., Kerry J.P. (2016). Incorporation of commercially-derived antimicrobials into gelatin-based films and assessment of their antimicrobial activity and impact on physical film properties. *Food Control*, 64, 202-211.
- Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 174-181.

- Doss A., Mubarak H.M., Dhanabalan R. (2009). Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian Journal of Science and Technology*, 2, 41-43.
- Fabra M.J., Hambleton A., Talens P., Debeaufort F., Chiralt A. (2011). Effect of ferulic acid and α -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films. *Food Hydrocolloids*, 25, 1441-1447.
- Fakhouri F.M., Martelli S.M., Caon T., Velasco J.I., Innocentini Mei, L.H. (2015). Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 57-64.
- Hutchings, J.B. (1999). *Food and Colour Appearance*, Second Edition. Gaithersburg, Maryland: Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication.
- Isaza J.H. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica* Año XIII, 33, 13-18.
- Jiménez A., Fabra M.J., Talens P., Chiralt A. (2012). Effect of sodium caseinate on properties and ageing behaviour of corn starch based films. *Food Hydrocolloids*, 29, 265-271.
- Jiménez A., Fabra M.J., Talens P., Chiralt A. (2013). Physical properties and antioxidant capacity of starch-sodium caseinate films containing lipids. *Journal of Food Engineering*, 116, 695-702.
- Jridi M., Hajji S., Ben Ayed H., Lassoued I., Mbarek A., Kammoun M., Souissi N., Nasri M. (2014). Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67, 373-379.
- Kamper S.L., Fennema O. (1984). Water vapor permeability of edible bilayer films. *Journal of Food Science*, 49, 1478-1485.
- Lacroix M. (2009). Mechanical and permeability properties of edible films and coating for food and pharmaceutical applications. Embuscado E, Huber K.C (Ed). *Edible films and coating for food applications* (p. 347-366). New York/London: Springer.
- Martin-Polo M., Mauguin C., Voilley A. (1992). Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. I. Influence of the film preparation technique. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40, 407-412.
- Martin-Polo M., Voilley A., Blond G., Colas B., Mesnier M., Floquet N. (1992). Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. II. Influence of the physical state. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 40, 413-418.
- 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.
- Moreno O., Díaz R., Atarés L., Chiralt A. (2016). Influence of the processing method and antimicrobial agents on properties of starch-gelatin biodegradable films. *Society of Chemical Industry*, DOI: 10.1002/pi.5115
- Orsuwan A., Shankar S., Wang L-F., Sothornvit R., Rhim J-W. (2016). Preparation of antimicrobial agar/banana powder blend films reinforced with silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 60, 476-485.
- Paladino S.C., Zuritz C.A. (AÑO). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinífera* L.). Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Cuyo.
- Palanca M., González-Martínez C., Cano A.I. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de sustancias naturales en films biodegradables. Trabajo Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pastor C., González-Martínez C., Chiralt A. (2010). Recubrimientos comestibles a base de hidroxopropil metilcelulosa: caracterización y aplicación. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Pastor C., Sánchez-González L., Chiralt A., Cháfer M., González-Martínez C. (2013). Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 30, 272-280.
- Pavlath A.E, Orts W. (2009). Edible films and coating: why, what and how? Embuscado E, Huber K.C (Ed). *Edible films and coating for food applications* (p. 1-25). New York/London: Springer.
- Peressini D., Bravin B., Lapasin R., Rizzotti C., Sensidoni A. (2003). Starch-methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions. *Journal of Food Engineering*, 59, 25-32.



- Porras-Loaiza A.P., López-Malo A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3-1, 121-134.
- Romano N., Tavera-Quiroz M.J., Bertola N., Mobili P., Pinotti A., Gómez-Zavaglia A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicle for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560-566.
- Rubilar J.F., Zúñiga R.N., Osorio F., Pedreschi F. (2015). Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose/whey protein isolate (HPMC/WPI) edible films. *Carbohydrate Polymers*, 123, 27-38.
- Salgado P.R., Ortiz C.M., Musso Y.S., Di Giorgio L., Mauri A.N. (2015). Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science*, 5, 86-92.
- Sánchez-González L., Cháfer M., Hernández M., Chiralt A., González-Martínez C. (2011). Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. *Food Control*, 22, 1302-1310.
- 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.
- Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
- Singh R.K., Singh N. (2005). Quality of packaged foods. Jung H. Han (Ed). *Innovations in food packaging* (p. 24-40). London: Elsevier Academic Press.

ANEXO

PROPIEDADES FÍSICAS

TABLA A1. Humedad, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua de películas de C, M, H, G con diferentes taninos (Hg, He y C). Valores medios \pm desviación estándar.

MUESTRA	Humedad	Solubilidad	PVA (g·mm/kPa·h·m ²)
Cs	19,5 \pm 1,3 ^a	100.0 \pm 0,5 ^a	9,38 \pm 0,96 ^a
CsHg^m	8,6 \pm 0,4 ^{ef}	97,8 \pm 1,8 ^{abc}	5,5 \pm 1,3 ^{cd}
CsHe^m	9,6 \pm 0,5 ^d	95,0 \pm 1,9 ^{bcd}	7,62 \pm 1,00 ^b
CsC^m	9,3 \pm 0,5 ^{de}	97,6 \pm 0,5 ^{abc}	7,5 \pm 0,8 ^b
CsHg^b	9,2 \pm 0,3 ^{def}	28 \pm 2 ⁱ	4,7 \pm 0,7 ^{def}
CsHe^b	1,7 \pm 0,3 ^d	95,4 \pm 0,6 ^{bcd}	6,32 \pm 1,09 ^c
CsC^b	11,81 \pm 1,09 ^k	94 \pm 5 ^{cd}	6,2 \pm 1,3 ^c
M	3,94 \pm 0,07 ⁱ	99,8 \pm 0,5 ^{ab}	2,9 \pm 0,2 ^{kl}
MHg^m	8,73 \pm 0,13 ^{ef}	21,3 \pm 0,4 ^j	4,2 \pm 0,4 ^{efgh}
MHe^m	5,9 \pm 0,7 ^g	51,5 \pm 0,6 ^g	3,4 \pm 0,2 ^{hijk}
MC^m	6,0 \pm 0,2 ^g	58,11 \pm 1,03 ^f	4,8 \pm 0,4 ^{de}
MHg^b	6,3 \pm 0,6 ^g	34 \pm 6 ^h	2,74 \pm 0,12 ^{kl}
MHe^b	5,83 \pm 0,13 ^{gh}	53 \pm 7 ^{fg}	4,3 \pm 0,6 ^{efg}
MC^b	4,5 \pm 0,3 ^{ij}	55 \pm 6 ^{fg}	3,7 \pm 0,2 ^{ghij}
H	5,07 \pm 0,13 ^{hi}	99,7 \pm 0,5 ^{ab}	3,41 \pm 0,10 ^{hijk}
HHg^b	5,7 \pm 0,3 ^{gh}	88 \pm 2 ^e	2,35 \pm 0,14 ⁱ
HHe^b	8,44 \pm 0,98 ^f	93 \pm 5 ^{de}	3,2 \pm 0,2 ^{ijkl}
HC^b	5,6 \pm 1,2 ^{gh}	94,3 \pm 1,2 ^{cd}	2,92 \pm 0,09 ^{ijkl}
G	14,5 \pm 0,3 ^b	100.0 \pm 0,5 ^a	4,2 \pm 0,5 ^{efgh}
GHg^b	12,5 \pm 0,3 ^c	98 \pm 4 ^{abc}	3,5 \pm 0,2 ^{ghijk}
GHe^b	12,3 \pm 0,9 ^c	100 \pm 2 ^a	5,94 \pm 0,13 ^c
GC^b	12,0 \pm 0,5 ^c	98 \pm 3 ^{abc}	3,8 \pm 0,4 ^{fghi}

TABLA A2. Módulo de elasticidad (ME), tensión de fractura (TS), porcentaje de extensibilidad (E) y espesor de películas de C, M, H y G con diferentes taninos (Hg, He y C). Valores medios \pm desviación estándar.

MUESTRA	ME (MPa)	TS (MPa)	E (%)	Espesor (mm)
Cs	267 \pm 35 ^a	13,2 \pm 1,5 ^a	48 \pm 8 ^a	0,080 \pm 0,013 ^a
CsHg^m	613 \pm 40 ^b	18,2 \pm 1,2 ^a	14 \pm 7 ^b	0,10 \pm 0,02 ^{de}
CsHe^m	500 \pm 48 ^b	14,4 \pm 1,3 ^a	7 \pm 3 ^c	0,103 \pm 0,014 ^{de}
CsC^m	553 \pm 35 ^b	15 \pm 2 ^a	18 \pm 6 ^b	0,995 \pm 0,019 ^{de}
CsHg^b	681 \pm 215 ^b	14 \pm 6 ^a	2,3 \pm 0,6 ^{de}	0,10 \pm 0,02 ^{de}
CsHe^b	644 \pm 109 ^b	18 \pm 5 ^a	15 \pm 10 ^b	0,096 \pm 0,018 ^{bcd}
CsC^b	644 \pm 60 ^b	19 \pm 3 ^a	17 \pm 12 ^b	0,099 \pm 0,015 ^{cde}
M	1346 \pm 279 ^c	38 \pm 14 ^b	21 \pm 5 ^b	0,067 \pm 0,009 ^j
MHg^m	1839 \pm 379 ^{ghi}	78 \pm 12 ^f	4,9 \pm 0,6 ^{cde}	0,15 \pm 0,05 ⁱ
MHe^m	1254 \pm 123 ^{de}	42 \pm 4 ^b	5,0 \pm 1,2 ^{cde}	0,13 \pm 0,05 ^g
MC^m	1868 \pm 186 ^{ghi}	72 \pm 8 ^{def}	6,5 \pm 1,2 ^{cd}	0,12 \pm 0,02 ^g
MHg^b	2036 \pm 211 ^{gh}	65 \pm 21 ^{def}	5 \pm 3 ^{cde}	0,10 \pm 0,02 ^{de}
MHe^b	1753 \pm 180 ^{gh}	65 \pm 8 ^{cd}	8 \pm 3 ^c	0,104 \pm 0,016 ^e
MC^b	1821 \pm 139 ^{ghi}	65 \pm 12 ^{cde}	4,5 \pm 0,9 ^{cde}	0,10 \pm 0,02 ^{de}
H	1695 \pm 40 ^{fg}	80 \pm 9 ^{fg}	18 \pm 4 ^b	0,091 \pm 0,007 ^b
HHg^b	1662 \pm 87 ^{fg}	53 \pm 10 ^c	3,8 \pm 0,9 ^{cde}	0,10 \pm 0,02 ^{de}
HHe^b	1179 \pm 65 ^{cd}	17 \pm 4 ^a	1,7 \pm 0,4 ^e	0,11 \pm 0,02 ^f
HC^b	1695 \pm 126 ^g	61 \pm 4 ^c	4,61 \pm 0,95 ^{cde}	0,099 \pm 0,013 ^{cde}
G	1991 \pm 135 ⁱ	98 \pm 8 ^h	6,5 \pm 1,2 ^{cd}	0,092 \pm 0,014 ^{bc}
GHg^b	1965 \pm 186 ^{hi}	90 \pm 18 ^{gh}	6,1 \pm 1,5 ^{cde}	0,092 \pm 0,012 ^b
GHe^b	1405 \pm 236 ^{ef}	38 \pm 13 ^b	4,98 \pm 0,98 ^{cde}	0,14 \pm 0,02 ^h
GC^b	1885 \pm 92 ^{ghi}	75 \pm 15 ^{ef}	5,95 \pm 1,24 ^{cde}	0,099 \pm 0,009 ^{de}

TABLA A3. Valores de luminosidad (L^*), croma (Cab^*), tono (Hab^*), transmitancia interna (T_i) y brillo de películas de C, M, H, G con diferentes taninos (Hg, He y C). Valores medios \pm desviación estándar.

MUESTRA	L^*	Cab^*	Hab^*	T_i (430 nm)	Brillo
Cs	77,5 \pm 0,7 ^a	23,0 \pm 0,8a	76,12 \pm 0,95a	0,770 \pm 0,012a	82 \pm 7ab
CsH_g^m	60,7 \pm 1,4d	26,70 \pm 0,12b	71,3 \pm 0,8d	0,54 \pm 0,02e	51 \pm 16def
CsH_e^m	33 \pm 2hij	15 \pm 3ef	45 \pm 4ij	0,02 \pm 0,014j	30 \pm 13hi
CsC^m	30,48 \pm 0,13j	12,41 \pm 0,13gh	37,73 \pm 0,12kl	0,007 \pm 0,005j	58 \pm 24de
CsH_g^b	60 \pm 4d	24,26 \pm 0,17b	68,8 \pm 0,8de	0,54 \pm 0,05de	98 \pm 3b
CsH_e^b	33,7 \pm 1,2ghi	14 \pm 2fg	40 \pm 5jk	0,040 \pm 0,014ghij	76 \pm 21a
CsC^b	31,6 \pm 0,7ij	11,55 \pm 1,02h	34,5 \pm 1,4l	0,023 \pm 0,009j	74 \pm 25ac
M	81,6 \pm 1,4b	3,0 \pm 0,3j	99 \pm 3c	0,850 \pm 0,003b	38 \pm 5fgh
MH_g^m	62,31 \pm 0,98d	21,60 \pm 0,12a	69,3 \pm 0,8de	0,630 \pm 0,013c	5,6 \pm 0,9jk
MH_e^m	35 \pm 2fgh	19 \pm 4c	55 \pm 5f	0,08 \pm 0,04fghi	18 \pm 10jk
MC^m	34,3 \pm 0,9fghi	18,1 \pm 0,7cd	53,2 \pm 0,9fg	0,040 \pm 0,002hij	17 \pm 16ij
MH_g^b	62,1 \pm 0,6d	22,3 \pm 0,7a	68,4 \pm 1,5de	0,6032 \pm 0,0109cde	62 \pm 13cd
MH_e^b	34,41 \pm 3,24fghi	17,3 \pm 0,4cde	51,5 \pm 1,5fgh	0,099 \pm 0,013fg	3,1 \pm 1,3k
MC^b	30,32 \pm 1,62j	16 \pm 3def	48 \pm 5hi	0,045 \pm 0,012ghij	1,7 \pm 0,5k
H	86,12 \pm 0,99c	5,9 \pm 0,8i	91,6 \pm 1,3b	0,850 \pm 0,009b	76 \pm 17ac
HH_g^b	62,43 \pm 2,50d	22 \pm 3a	65,9 \pm 0,9e	0,61 \pm 0,06cd	59 \pm 17de
HH_e^b	38,52 \pm 1,30e	17,9 \pm 1,3cde	54 \pm 2fg	0,09 \pm 0,02fgh	4,8 \pm 0,2jk
HC^b	32,01 \pm 1,12ij	15,9 \pm 0,9def	50,7 \pm 1,7gh	0,04 \pm 0,02hij	34 \pm 21jk
G	80,72 \pm 0,55b	12,3 \pm 1,2gh	87 \pm 2,4b	0,810 \pm 0,004ab	46 \pm 14efg
GH_g^b	63,35 \pm 1,005d	22,2 \pm 0,3a	71,3 \pm 0,6d	0,59 \pm 0,03cde	52 \pm 20ab
GH_e^b	37,23 \pm 0,36ef	16,6 \pm 0,8cdef	56 \pm 3f	0,11 \pm 0,03f	6,7 \pm 0,5jk
GC^b	36,64 \pm 1,12efg	17,1 \pm 1,2cde	52 \pm 3fgh	0,030 \pm 0,007ij	7,5 \pm 1,6gh

TABLA A4. Concentración eficaz (EC₅₀) (cantidad de antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPHH un 50%) de diferentes taninos puros (Hg, He y C) y de las diferentes películas de C, M, H, G con distintos simulantes (A, B y D1). Valores medios ± desviación estándar.

MUESTRA	Etanol 10%		Ácido acético 3%		Etanol 50%	
	EC ₅₀ ⁽¹⁾	EC ₅₀ ⁽²⁾	EC ₅₀ ⁽¹⁾	EC ₅₀ ⁽²⁾	EC ₅₀ ⁽¹⁾	EC ₅₀ ⁽²⁾
H _g	25,10 ± 1,04 ^{abcd}		31 ± 4 ^b		27,8 ± 1,3 ^{abc}	
H _e	56 ± 6 ^{cdef}		40 ± 2 ^{fg}		50,4 ± 1,7 ^{efg}	
C	47 ± 8 ^{efg}		49,0 ± 1,4 ^{efg}		61 ± 8 ^{fghi}	
CsH _g ^m	21,8 ± 1,2 ^{ab}	0,34 ± 0,02 ^{ab}	22,2 ± 0,3 ^{ab}	0,349 ± 0,005 ^a	27 ± 2 ^{abc}	0,42 ± 0,04 ^{ab}
CsH _e ^m	74 ± 2 ^{jk}	0,86 ± 0,03 ^{jk}	97,9 ± 0,2 ⁱ	1,136 ± 0,003 ^a	53,4 ± 1,5 ^{efgh}	0,62 ± 0,02 ^{cde}
CsC ^m	62 ± 3 ^{ghij}	1,06 ± 0,05 ^{ghij}	93 ± 7 ^j	1,58 ± 0,12 ^a	61,9 ± 0,9 ^{fghi}	1,05 ± 0,02 ^h
CsH _g ^b	50 ± 24 ^{fgh}	0,6 ± 0,3 ^{fgh}	76 ± 7 ^{hi}	0,91 ± 0,08 ^a	56 ± 15 ^{fgh}	0,7 ± 0,2 ^{def}
CsH _e ^b	66 ± 15 ^{ijk}	0,9 ± 0,2 ^{ijk}	74 ± 14 ⁱ	0,99 ± 0,18 ^a	60 ± 15 ^{fghi}	0,8 ± 0,2 ^{fg}
CsC ^b	56 ± 6 ^{fghij}	0,67 ± 0,07 ^{fghij}	53 ± 7 ^g	0,63 ± 0,08 ^a	73,48 ± 0,13 ⁱ	0,873 ± 0,002 ^g
MH _g ^m	24 ± 2 ^{abc}	0,29 ± 0,03 ^{abc}	14 ± 2 ^a	0,17 ± 0,03 ^a	24 ± 2 ^{ab}	0,29 ± 0,02 ^{ai}
MH _e ^m	47,8 ± 1,5 ^{efg}	0,55 ± 0,02 ^{efg}	60 ± 11 ^{gh}	0,69 ± 0,12 ^a	54 ± 13 ^{fgh}	0,6 ± 0,2 ^{cde}
MC ^m	53 ± 4 ^{fghi}	0,64 ± 0,05 ^{fghi}	54 ± 6 ^{efg}	0,66 ± 0,07 ^a	49 ± 4 ^{ef}	0,60 ± 0,05 ^{cde}
MH _g ^b	32 ± 4 ^{bcde}	0,33 ± 0,04 ^{bcde}	34 ± 7 ^{bc}	0,34 ± 0,07 ^a	26,6 ± 1,3 ^{abc}	0,272 ± 0,013 ^{ijk}
MH _e ^b	41 ± 5 ^{def}	0,50 ± 0,06 ^{def}	35 ± 4 ^{efg}	0,42 ± 0,05 ^a	40 ± 4 ^{de}	0,49 ± 0,05 ^{bc}
MC ^b	44 ± 5 ^{efg}	0,42 ± 0,05 ^{efg}	35,1 ± 1,2 ^{bcd}	0,3340 ± 0,0113 ^a	56 ± 5 ^{fgh}	0,53 ± 0,05 ^{bcd}
HH _g ^b	28 ± 4 ^a	0,31 ± 0,04 ^a	26 ± 3 ^{ab}	0,29 ± 0,04 ^a	19,4 ± 0,3 ^a	0,215 ± 0,004 ^{jk}
HH _e ^b	79 ± 18 ^{abcd}	0,9 ± 0,2 ^{abcd}	56 ± 9 ^{fg}	0,63 ± 0,01 ^a	36 ± 2 ^{bcd}	0,40 ± 0,03 ^{ab}
HC ^b	48 ± 8 ^{abcd}	0,46 ± 0,08 ^{abcd}	59 ± 6 ^{gh}	0,56 ± 0,05 ^a	61 ± 6 ^{fghi}	0,57 ± 0,06 ^{cde}
GH _g ^b	11 ± 18 ^{abc}	0,43 ± 0,07 ^{abc}	43 ± 10 ^{cde}	0,50 ± 0,12 ^a	36 ± 8 ^{cd}	0,4 ± 0,4 ^{ab}
GH _e ^b	56 ± 6 ^{abcd}	0,64 ± 0,07 ^{abcd}	51 ± 6 ^{efg}	0,58 ± 0,07 ^a	62 ± 10 ^{fghi}	0,71 ± 0,12 ^{ef}
GC ^b	64 ± 8 ^{abc}	0,65 ± 0,08 ^{abc}	47 ± 2 ^{def}	0,47 ± 0,02 ^a	65 ± 4 ^{hi}	0,66 ± 0,04 ^{de}

⁽¹⁾ (g tanino/mol DPPH); ⁽²⁾ (mg película/mg DPPH)