



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**"DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES
PREPARADAS A PARTIR DE EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA
ESTABILIZADAS POR COMPLEJOS PECTINA DE TEJOCOTE-
QUITOSANO"**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**



**DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
EQUIPO DE EXAMENES PROFESIONALES**

PRESENTA:

ING. ALEJANDRO MARTÍNEZ VELASCO



DICIEMBRE 2013

Chapingo, Estado de México.

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES
PREPARADAS A PARTIR DE EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA
ESTABILIZADAS POR COMPLEJOS PECTINA DE TEJOCOTE-QUITOSANO**

Tesis realizada por **Alejandro Martínez Velasco** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

CO-DIRECTOR:



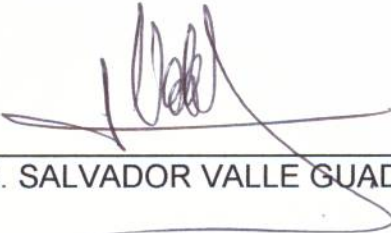
DR. ELEAZAR AGUIRRE MANDUJANO

CO-DIRECTOR:



DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO CALLEROS

ASESOR:



DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

DEDICATORIA

A dios, por darme vida para seguir cosechando triunfos.

A mi familia (Martínez-Velasco), porque son el motor para seguir esforzándome
día con día.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el financiamiento otorgado en becas para tesis de posgrado 2013.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Ingeniería Agroindustrial por los recursos brindados para mi formación académica.

Al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano por la dirección, apoyo y respaldo para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros por su apoyo en la dirección y revisión en cada una de las etapas de este proyecto, por su apoyo y sobre todo por la confianza.

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama por la revisión y consecuente culminación de este trabajo.

Al Dr. Raúl Nieto Ángel, por el apoyo en las accesiones de tejocote utilizadas y al Departamento de Fitotecnia por las facilidades brindadas en sus instalaciones.

A todos mis compañeros de la generación 2011-2013 y del Laboratorio de Alimentos de Preparatoria Agrícola, por su valiosa amistad.

DATOS BIOGRÁFICOS

Alejandro Martínez Velasco es Ingeniero Agroindustrial, egresado del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo.

Después de egresado, trabajó por un año en el Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CEVAMEX), como auxiliar de investigación en el laboratorio de maíz.

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES PREPARADAS A PARTIR DE EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA ESTABILIZADAS POR COMPLEJOS SOLUBLES PECTINA DE TEJOCOTE-QUITOSANO

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF EDIBLE FILMS MADE FROM OIL-IN-WATER EMULSIONS STABILIZED BY HAW PECTIN-CHITOSAN SOLUBLE COMPLEXES

Martínez-Velasco A.¹, Aguirre-Mandujano E.¹, Lobato-Calleros C. S. O.¹

RESUMEN

Las propiedades reológicas y el diámetro volumétrico superficial medio de emulsiones aceite-en-agua E_{Pc-Q} , E_{P18-Q} y E_{P05-Q} , estabilizadas con complejos solubles (CS) formados a partir de interacciones electrostáticas entre pectinas de tejocote (P_{18} y P_{05} de las accesiones de tejocote 18 y 05, respectivamente) o pectina cítrica (P_c) y quitosano (Q), fueron determinadas. Las E_{Pc-Q} y E_{P18-Q} tuvieron diámetros de gota similares y más pequeños (3.4 y 3.7 μm , respectivamente) que la E_{P05-Q} (4.7 μm). Todas las E exhibieron perfiles de viscosidad aparente-tasa de corte, típicos de fluidos adelgazantes al corte y propiedades viscoelásticas con carácter elástico dominante. Los valores de fuerza tensil, % de elongación al corte y permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles (P) preparadas a partir de las E, fueron afectados por el tipo de pectina formando parte del CS. Las P_{P18-Q} y P_{P05-Q} presentaron valores más altos de fuerza tensil y % de elongación, y la P_{P18-Q} valores más bajos de permeabilidad al vapor de agua que la P_{Pc-Q} .

Palabras clave: complejos biopoliméricos solubles, emulsiones, películas comestibles, reología, pectina, quitosano.

ABSTRACT

Rheological properties and the droplet mean volume-surface diameter of oil-in-water emulsions E_{Pc-Q} , E_{P18-Q} and E_{P05-Q} , stabilized with soluble complexes (CS) formed from electrostatic interactions between haw pectins (P_{18} and P_{05} from 18 and 05 haw accessions, respectively) or citrus pectin (P_c) and chitosan (Q) were determined. The E_{Pc-Q} and E_{P18-Q} had similar and smaller droplet diameters (3.4 and 3.7 μm , respectively) than the E_{P05-Q} (4.7 μm). The entire E exhibited viscosity-shear rate profiles typical of shear thinning fluids, and viscoelastic properties with dominant elastic character. The values of tensile strength, % elongation at break, and water vapor permeability of the edible films (P) prepared from the E, were affected by the pectin type forming part of the CS. The P_{P18-Q} and P_{P05-Q} presented higher values of tensile strength and % elongation, and the P_{P18-Q} lower values of water vapor permeability than the P_{Pc-Q} .

Keywords: soluble biopolymeric complexes, emulsions, edible films, rheology, pectin, chitosan.

¹ Programa en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México Texcoco, Chapingo, México. C.P. 56230.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
3.1. Objetivo general.....	5
3.2. Objetivos específicos.....	5
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1. Películas comestibles.....	6
4.2. Caracterización de películas comestibles.....	7
4.3. Pectinas.....	8
4.3.1. Aplicaciones de la pectina.....	10
4.3.2. Pectinas de tejocote.....	11
4.4. Quitsano.....	11
4.4.1. Grado de desacetilación.....	13
4.4.2. Aplicaciones del quitosano.....	14
4.5. Interacciones moleculares.....	15
4.5.1. Enlaces covalentes.....	15
4.5.2. Interacciones de van der Waals.....	15
4.5.3. Interacciones hidrofóbicas.....	16

4.5.4. Interacciones estéricas.....	17
4.5.5. Puentes de hidrógeno.....	17
4.5.6. Interacciones electrostáticas.....	17
4.6. Potencial zeta (ζ).....	19
4.7. Emulsiones.....	21
4.7.1. Clasificación de las emulsiones.....	21
4.7.2. Factores que afectan la estabilidad de las emulsiones.....	22
4.7.3. Agentes emulsificantes y plastificantes.....	23
4.8. Propiedades reológicas.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1. Materiales.....	28
5.2. Obtención y caracterización de pectinas de tejocote.....	29
5.2.1. Extracción.....	29
5.2.2. Determinación del rendimiento de las pectinas.....	30
5.2.3. Determinación del grado de esterificación (%GE).....	31
5.2.4. Determinación del contenido de humedad y proteína.....	31
5.3. Formación de complejos solubles pectina-quitosano.....	32
5.3.1. Dispersiones base de biopolímeros.....	32
5.3.2. Determinación del potencial zeta (ζ) de los biopolímeros como función del pH.....	32
5.3.3. Determinación de la relación en peso estequiométrica de la interacción entre biopolímeros.....	33
5.3.4. Establecimiento de las condiciones de pH y relación en peso entre	

biopolímeros para la formación de complejos solubles.....	34
5.4. Formulaci3n y preparaci3n de las emulsiones sencillas aceite-en-	
agua (O/W).....	35
5.5. Caracterizaci3n de las emulsiones.....	36
5.5.1. Determinaci3n del tama1o y morfologí a de gota.....	36
5.5.2. Propiedades reol3gicas.....	37
5.6. Elaboraci3n de las pelí culas comestibles.....	38
5.7. Caracterizaci3n de las pelí culas comestibles.....	38
5.7.1. Propiedades ó pticas.....	38
5.7.2. Evaluaci3n del espesor.....	39
5.7.3. Propiedades mecánicas.....	39
5.7.4. Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	40
5.8. Dise1o estadíst ico.....	43
6. RESULTADOS Y DISCUSI3N.....	44
6.1. Rendimiento, grado de esterificaci3n y contenido de proteí na de	
las pectinas.....	44
6.2. Variaci3n del potencial zeta (ζ) de las pectinas y el quitosano	
como funci3n del pH.....	46
6.3. Punto de equivalencia de los biopolí meros.....	49
6.4. Relaci3n ó ptima en peso entre quitosano y pectinas para la	
formaci3n de complejos solubles.....	55
6.5. Morfologí a de las gotas de aceite y distribuci3n de tama1o de las	
partí culas de las emulsiones.....	59

6.6. Propiedades de flujo de las emulsiones.....	65
6.7. Propiedades viscoelásticas de las emulsiones.....	69
6.8. Caracterización de las películas comestibles.....	72
6.8.1. Color.....	72
6.8.2. Espesor, permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas de las películas comestibles.....	75
7. CONCLUSIONES.....	80
8. BIBLIOGRAFÍA.....	82

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Valores de rendimiento, proteína y grado de esterificación de pectinas de tejocote y cítrica.....	45
Cuadro 2. Parámetros reológicos de curvas de flujo de las emulsiones.....	67
Cuadro 3. Valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de las emulsiones a 1 Hz de frecuencia (medias $\pm$ DE).....	72
Cuadro 4. Valores de color: Luminosidad (L^*), a^* y b^* , Hue (ángulo de tono) y croma (saturación de color) de películas comestibles.....	75
Cuadro 5. Espesor, permeabilidad al vapor de agua (PVA), esfuerzo tensil y % de elongación al corte de las películas comestibles.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido poligalacturónico (a) y estructura química representative de pectina que muestra grupos repetidos típicos (b).....	9
Figura 2. Ilustración esquemática de la estructura del quitosano	12
Figura 3. Emulsión que exhibe comportamiento de adelgazamiento al corte donde los flóculos se deforman y desorganizan en la zona de corte.....	26
Figura 4. Variación del potencial zeta de las dispersiones de pectina y quitosano (0.5 % p/p) a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$	48
Figura 5. Evolución del potencial ζ y diámetro hidrodinámico conforme el polielectrolito catiónico quitosano (Q) se tituló con el polielectrolito aniónico pectina cítrica (Pc).....	51
Figura 6. Evolución del potencial ζ y diámetro hidrodinámico conforme el polielectrolito catiónico quitosano (Q) se tituló con el polielectrolito aniónico pectina de tejocote accesión 05 (P05).....	53
Figura 7. Evolución del potencial ζ y diámetro hidrodinámico conforme el polielectrolito catiónico quitosano (Q) se tituló con el polielectrolito aniónico pectina de tejocote accesión 18 (P18).....	54

Figura 8. Absorbancia de dispersiones de quitosano (10 mL, 0.2 mg mL ⁻¹) adicionadas con distintos volúmenes de pectina cítrica (P _C , 2 mg mL ⁻¹) a pH = 4.0.....	57
Figura 9. Absorbancia de dispersiones de quitosano (10 mL, 0.2 mg mL ⁻¹) adicionadas con distintos volúmenes de pectina de tejocote accesión 05 (P ₀₅ , 2 mg mL ⁻¹) a pH = 4.0.....	58
Figura 10. Absorbancia de dispersiones de quitosano (10 mL, 0.2 mg mL ⁻¹) adicionadas con distintos volúmenes de pectina de tejocote accesión 18 (P ₁₈ , 2 mg mL ⁻¹) a pH = 4.0.....	59
Figura 11. Microfotografías ópticas de las emulsiones: (a) E _{PC-Q} , (b) E _{P05-Q} y (c) E _{P18-Q} . PC: pectina cítrica, P ₀₅ : pectina de tejocote accesión 05 y P ₁₈ : pectina de tejocote accesión 18, Q: quitosano.....	61
Figura 12. Distribución del tamaño de las partículas presentes en las emulsiones: (■)E _{PC-Q} , (●)E _{P05-Q} , y (▲)E _{P18-Q} . P _C : pectina cítrica, P ₀₅ : pectina de tejocote accesión 05 y P ₁₈ : pectina de tejocote accesión 18, Q: quitosano.....	63
Figura 13. Cambios en la viscosidad aparente como función de la tasa de corte de las emulsiones (●)E _{P05-Q} ; (▲)E _{P18-Q} ; (■)E _{PC-Q} . P _C : pectina cítrica, P _{T05} : pectina de tejocote accesión 05 y P _{T18} : pectina de tejocote accesión 18, Q: quitosano.....	66
Figura 14. Variación de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de las emulsiones, como función de la frecuencia. (●) E _{P05-Q} ; (▲) E _{P18-Q} y (■) E _{PC-Q} . P _C : pectina cítrica, P _{T05} : pectina de tejocote accesión 05 y P _{T18} : pectina de tejocote accesión 18, Q: quitosano.....	70

1. INTRODUCCIÓN

La preocupación de los consumidores cada vez mayor sobre los problemas ambientales que se derivan de la utilización de materiales de embalaje sintéticos, así como la demanda de alimentos de mayor calidad, han contribuido al desarrollo de envases fabricados con fuentes naturales, tales como polisacáridos, proteínas y/o lípidos. Lo anterior, además ha propiciado una serie de investigaciones sobre el empleo de películas comestibles obtenidas a partir de fuentes naturales, las cuales al mismo tiempo que actúen como una barrera contra la humedad funcionen como un vehículo para la utilización de agentes funcionales como antioxidantes, probióticos, sabores, colores (Granda-Restrepo *et al.*, 2009), que permitan conservar las propiedades y no modifiquen la apariencia de los alimentos.

La naturaleza química de los biopolímeros, como proteínas, polisacáridos y otros compuestos, ampliamente utilizados en la industria de los alimentos, puede dar lugar a una organización estructural e interacción de fuerzas permitiendo diferentes tipos de interacciones, como la covalente, van der Waals, estéricas y electrostáticas, principalmente. Esta última promueve la formación de complejos biopoliméricos, los cuales pueden ser utilizados en la estabilización y/o formación de nuevas estructuras.

En este contexto, las interacciones biopolímero-biopolímero juegan un papel cada vez más importante en las investigaciones de hoy en día en la biotecnología y ciencia de los alimentos debido a su influencia en la formación de microestructuras de la mayoría de los sistemas que contienen biopolímeros, determinando en gran medida su textura, estabilidad mecánica, consistencia y en última instancia aspecto y sabor. Una de las principales aplicaciones de los complejos electrostáticos se encuentra en la estabilización de emulsiones y en la formación de materiales de pared de microcápsulas para la obtención de propiedades funcionales mejoradas (Espinoza-Andrews, 2013). Las interacciones atractivas entre dos biopolímeros pueden llegar a ser evidentes en varias maneras: i) formación de pequeños complejos solubles (CS), que se manifiesta en soluciones turbias, ii) formación de un gel homogéneo débil, si las interacciones son débiles, y iii) precipitación de ambos biopolímeros, si las interacciones son fuertes (Walstra, 2003). Es así, como las interacciones que propician la formación de los denominados complejos solubles entre biopolímeros de carga opuesta como la pectina de tejocote y el quitosano, toman importancia en la estabilización de emulsiones, las cuales pueden utilizarse para el diseño de películas comestibles con excelentes propiedades.

2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la investigación en empaques de alimentos se ha centrado más en películas biodegradables, como aquellas obtenidas a partir de fuentes vegetales y utilizadas para la conservación de diferentes tipos de frutos (Saucedo-Pompa *et al.*, 2009). Dentro de las fuentes vegetales pueden incluirse biopolímeros como la pectina, así como de polisacáridos como el quitosano, con el fin de producir películas con características optimizadas (Bonilla *et al.*, 2012). En el Banco de Germoplasma de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo se cuenta con 92 accesiones de tejocotes agrupados en 5 grupos, de las cuales es posible extraer pectinas de buena calidad, pues se ha encontrado que poseen una funcionalidad igual y, en algunos casos, mejor que las comerciales como las cítricas y de manzana que son de importación (Nieto, 2007; Aguirre, 2010). Por lo anterior, existe la posibilidad de sustituir las pectinas comerciales, por aquellas extraídas de frutos producidos México.

Recientemente, se han llevado a cabo investigaciones para desarrollar películas comestibles, utilizando biopolímeros obtenidos de diversos productos agrícolas y/o materiales de desecho de alimentos. Tales biopolímeros incluyen almidones, derivados de celulosa, quitosano, gomas, pectinas cítricas, proteínas y lípidos. Estos materiales ofrecen la posibilidad de la obtención de películas delgadas y recubrimientos para proteger alimentos frescos o

procesados para extender su vida útil (Giancone *et al.*, 2008; Elsabee *et al.*, 2008). En este sentido, es importante mencionar que no existen reportes sobre la utilización de pectinas de tejocote para la obtención de complejos biopoliméricos pectina de tejocote-quitosano, para su aplicación en la elaboración de películas comestibles, y menos aún estudios donde comparen la funcionalidad de pectinas de tejocote de diferentes cultivares. Por lo anterior, la elaboración de películas comestibles utilizando complejos pectina de tejocote-quitosano puede ser una alternativa interesante y novedosa que permita a los tecnólogos en alimentos enriquecer la amplia gama de productos alimenticios y por otro lado, impulsar el aprovechamiento de los recursos agrícolas de nuestro país.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar los efectos de la adición de complejos biopoliméricos pectina de tejocote-quitosano sobre las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua de películas comestibles.

3.2. Objetivos específicos

1. Extraer, purificar y caracterizar pectinas de dos accesiones de tejocote: ACC18 y ATEX 05.
2. Establecer la formulación y el método de elaboración de emulsiones O/W a partir de complejos biopoliméricos.
3. Determinar las propiedades reológicas y la distribución del tamaño de partícula de las emulsiones O/W.
4. Establecer la formulación y el método de preparación de las películas comestibles (PC) a partir de las emulsiones O/W desarrolladas.
5. Determinar las propiedades físicas (espesor y color), mecánicas (fuerza de tensión y elongación) y permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Películas comestibles

Una película comestible se define como un material de empaque, que es una delgada capa de material comestible colocado sobre o entre los componentes de los alimentos (Pérez *et al.*, 2013). El uso de películas comestibles y recubrimientos en la protección y conservación de alimentos se ha incrementado recientemente debido a que ofrecen varias ventajas sobre los materiales sintéticos, pues son biodegradables y amigables con el medio ambiente (Tharanathan, 2003).

Una de las formas más rentables de mantener la calidad y la seguridad de los alimentos es el uso de películas comestibles. La función de las películas comestibles es proporcionar una barrera a los gases y al vapor de agua, proteger los ingredientes sensibles a la oxidación, incorporar agentes funcionales como antimicrobianos, antioxidantes y mejorar las propiedades mecánicas de manipulación de los productos (Rezvani *et al.*, 2013).

Las películas comestibles, basadas en materiales biodegradables tales como proteínas, polisacáridos, lípidos o su combinación, han atraído por las últimas dos décadas el aumento de una continua investigación debido a su potencial

uso en el empaque de alimentos, así como su capacidad para actuar como portadores de compuestos activos (Matsakidou *et al.*, 2013). Las películas de polisacáridos son flexibles, transparentes, inodoras y con baja permeabilidad al vapor de agua, debido a estas características diversos trabajos de investigación relacionados con el tema han sido enfocados en su uso para la conservación de frutas y vegetales, principalmente (Durango *et al.*, 2006).

Las películas comestibles permiten retrasar el transporte de humedad, oxígeno, aromas y solutos; además, se pueden mejorar con aditivos como antioxidantes, antimicrobianos, colorantes, saborizantes, que se adicionan en la formulación de la película (Ponce *et al.*, 2008).

4.2. Caracterización de películas comestibles

Aunque se han reconocido propiedades de las películas de biopolímeros para ser aplicadas en los sistemas alimenticios como películas o recubrimientos comestibles, tienen también algunos inconvenientes que limitan su uso en condiciones específicas debido a su sensibilidad inherente al agua y rigidez y fuerza relativamente bajas, especialmente en ambientes húmedos. Por lo tanto, varias estrategias se han utilizado para mejorar las propiedades físicas de las películas a base de biopolímeros. Entre ellas, aumentando la hidrofobicidad, mediante la adición de lípidos neutros, ácidos grasos y ceras; así como la mezcla de biopolímeros, por la combinación de proteínas con polisacáridos para mejorar las propiedades funcionales de las películas comestibles (Ferreira *et al.*, 2009).

Un enfoque reciente de la tecnología de películas comestibles y biodegradables involucra la producción de películas compuestas, mediante la combinación de

diferentes polisacáridos, proteínas y lípidos, con el fin de mejorar su funcionalidad. Las películas compuestas pueden ser diseñadas para lograr un efecto sinérgico de las características combinadas de compuestos puros, a pesar de que como polímeros sintéticos, las propiedades mecánicas y de barrera de las biopelículas compuestas dependen en gran medida de las características de composición de los polímeros y su compatibilidad (Galus y Lenart, 2013). Las películas compuestas pueden formularse por la técnica de bicapa, multicapa o emulsión. Las películas en bicapa tienen mejores propiedades de barrera al vapor de agua que las películas emulsionadas pero su elaboración requiere de varios pasos, mientras que las películas emulsionadas tienen propiedades mecánicas casi similares y su preparación consiste en un solo paso (Kester y Fenema, 1989). En las películas emulsionadas, el tamaño de las partículas de aceite (fase oleosa) tiene una gran influencia en la permeabilidad al vapor de agua (PVA). De acuerdo a Pérez-Gago y Krochta, (2001), la eficiencia de las propiedades de barrera aumenta cuando decrece el tamaño de glóbulo de aceite y cuando su distribución es homogénea. No obstante, la permeabilidad al vapor de agua frecuentemente también es asociada al tipo de proteína o polisacárido con el que se fabrica la película (Morillon *et al.*, 2002).

4.3. Pectinas

La pectina es uno de los principales componentes de la pared celular vegetal, que contribuyen a la integridad y rigidez de los tejidos y se considera una de las macromoléculas más complejas de la naturaleza. Las principales fuentes

industriales para la extracción de pectina son la pulpa de manzana y la cáscara de cítricos (Pérez *et al.*, 2013). Además, es posible extraerlas de guayaba dulce, tomate de árbol, maracuyá y remolacha. En la actualidad, las pectinas son ingredientes muy importantes en la industria de los alimentos, como en la elaboración de gelatinas, salsas, quesos, etc. (Yáñez *et al.*, 2007).

La pectina es un biopolímero aniónico soluble en agua que muestra bajos valores de permeabilidad al oxígeno. Es uno de los principales polisacáridos estructurales de las células de plantas superiores y consiste de cadenas de regiones lineales de unidades α (1-4)-D-galacturonosilo y sus metil-esteres interrumpidos en lugares por unidades α (1-2)-L-ramnopiranosilos (Figura 1) (Medeiros *et al.*, 2012).

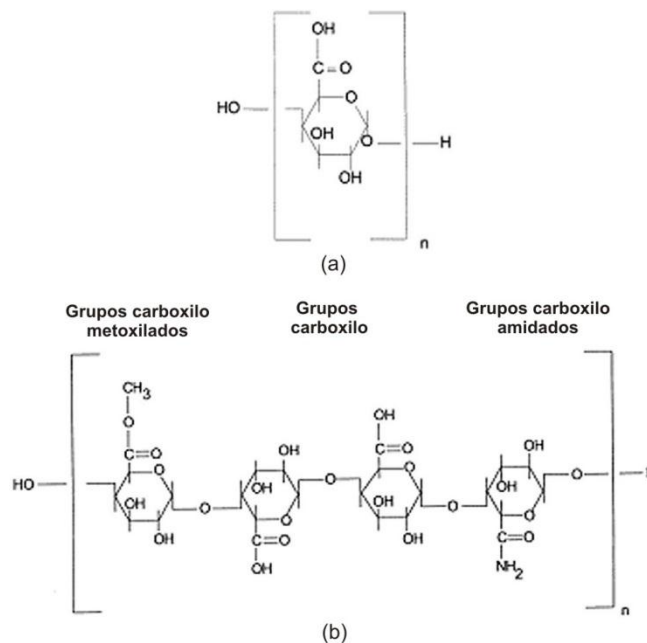


Figura 1. Estructura química del ácido poligalacturónico (a) y estructura química representativa de pectina que muestra grupos repetidos típicos (b). (Pérez *et al.*, 2013).

4.3.1. Aplicaciones de la pectina

La pectina es un importante material funcional en la industria de los alimentos y puede ser usado como un agente quelante, modificador de la viscosidad, espesante, emulsificador y separador de sabor, cuyas propiedades funcionales son frecuentemente influenciadas por el grado de esterificación y el peso molecular (Kim *et al.*, 2008). Se aplica extensamente en productos alimenticios debido a su gran capacidad de retención de agua, así como la estabilización de sistemas coloidales y fácil plastificación con glicerol, debido a la capacidad de sus grupos hidrofóbicos para absorber sustancias orgánicas lipídicas (Baeva y Panchev, 2005).

Estudios de pectinas extraídas no modificadas mostraron que no solo los factores intrínsecos, tales como el contenido de ácido galacturónico y contenido de azúcares neutrales, grados de metilación y acetil-esterificación, y el peso molecular promedio, sino también, factores extrínsecos como el contenido de cenizas y la fuerza iónica de las soluciones de pectina pueden influir en sus propiedades gelificantes (Yapo *et al.*, 2009).

De acuerdo al grado de esterificación (GE) con metanol, que es la proporción de grupos de ácido galacturónico esterificados del total de grupos de ácido galacturónico, las pectinas pueden ser clasificadas como pectinas de alto metoxilo (PAM) o pectina de bajo metoxilo (PBM). Las primeras tienen más del 50% de sus grupos carboxilos esterificados ($DE > 50$), mientras que las PBM tienen un DE de $< 50\%$. Su GE afecta las propiedades de gelificación de las pectinas. De esta manera, las PBM forman geles en presencia de iones

multivalentes, que actúan como un puente entre pares de grupos carboxilos de diferentes cadenas de pectinas. Por otro lado, las PAM forman geles en un medio ácido con la adición de diferentes azúcares como sacarosa y glucosa (Pérez *et al.*, 2013).

4.3.2. Pectina de tejocote

El tejocote pertenece a la familia de las Rosáceas y concretamente al género *Crataegus*, el cual agrupa alrededor de 140 especies. En el continente Americano se localizan 100 de ellas y alrededor de 13 crecen en la República Mexicana, de las cuales sólo dos se consumen como fruta fresca (Phipps *et al.*, 2003). En algunos estados de la República Mexicana el tejocote toma vital importancia en la alimentación ya que, dentro de sus variados usos, es una fuente importante de pectina, llegando a obtener hasta un 27 % de rendimiento con calidad igual o superior a la obtenida de fuentes comerciales (Nieto, 2007). Por su costo y fácil adquisición se han utilizado principalmente pectinas extraídas de cítricos o de manzana. Sin embargo, estudios sobre el contenido de pectina en el fruto de tejocote, ofrecen resultados similares, por lo que se puede considerar al fruto de tejocote como una fuente importante de sustancias pécticas (Aguirre, 2010).

4.4. Quitosano

El quitosano es un polisacárido catiónico de alto peso molecular obtenido de la desacetilación de la quitina, que se extrae del exoesqueleto de los crustáceos, hongos e insectos, con numerosas aplicaciones en el campo de la agricultura y

la alimentación debido a su excelente capacidad formadora de película, actividad antimicrobiana, antifúngica, biocompatibilidad, biodegradabilidad y no-toxicidad para las personas (Gao *et al.*, 2013). Consiste principalmente de un polímero de unidades beta (1-4)-2 amino-2 deoxi D-glucosa (Figura 2). Este polímero puede formar películas transparentes, que pueden encontrar aplicación en una variedad de necesidades de empaque. Dentro de ellas, su utilización para la formulación de películas o recubrimientos comestibles que pueden ser útiles en extender la vida de anaquel y calidad sensorial de frutas y hortalizas (Cissé *et al.*, 2012).

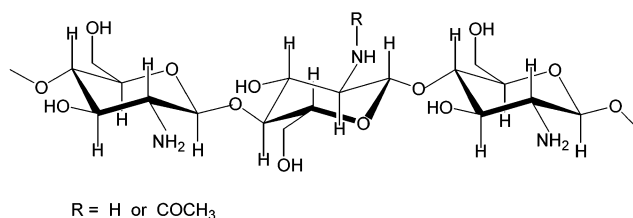


Figura 2. Ilustración esquemática de la estructura del quitosano (Nordby *et al.*, 2003).

El quitosano es naturalmente abundante, no tóxico, biocompatible y biodegradable, y muestra interesantes propiedades antimicrobianas y hemostáticas, lo que explica su amplio rango de aplicaciones, incluyendo productos farmacéuticos, biotecnología, biomateriales, biomedicina, agricultura y procesamiento de alimentos. Varios aspectos de las propiedades de formación de las películas de quitosano, incluyen el efecto del solvente, el tipo y la concentración del plastificante, efectos de almacenamiento y la influencia de

importantes características estructurales como el peso molecular del quitosano y su grado de desacetilación (Ferreira *et al.*, 2009).

Las películas de quitosano tienen una permeabilidad selectiva a gases (CO_2 y O_2) y buenas propiedades mecánicas. Sin embargo, son altamente permeables al vapor de agua, lo cual limita sus usos, pues es una desventaja importante como control efectivo de la transferencia de humedad, una propiedad deseable en muchos alimentos (Vargas *et al.*, 2009). La mezcla del quitosano con gelatina, han demostrado ser homogéneas debido a la buena miscibilidad entre ambos biopolímeros, permitiendo la mejora de las propiedades de las películas, en comparación con las obtenidas de los biopolímeros puros, explicado por la formación de interacciones electrostáticas entre los grupos amonio del quitosano y los grupos carboxilato de la gelatina (Haider *et al.*, 2008). También han sido estudiadas películas de quitosano/caseinato de sodio, donde se observó que no hay separación de fase, debido al complejamiento de los dos polímeros dentro de la matriz de la película (Pereda *et al.*, 2008).

4.4.1. Grado de desacetilación

El grado de desacetilación (GD) es la proporción (usualmente expresado en porcentaje) de la cantidad (en moles) de unidades D-glucosamina del total de unidades D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. El quitosano se forma cuando el GA alcanza un cierto valor. Por ejemplo, el quitosano contiene un mínimo de 60% de unidades D- glucosamina (Dimzon *et al.*, 2013).

La capacidad de los grupos amino para ganar una carga positiva en un ambiente ácido hace que el quitosano desacetilado se disuelva fácilmente en un medio acuoso ácido (Qin *et al.*, 2006). Se ha reportado que el comportamiento del quitosano en soluciones acuosas de alta fuerza iónica como índice de refracción y radio de giro está en función del GD. En este sentido, las interacciones del quitosano en soluciones acuosas se puede dividir en 3, basado en el GD: 1) Un $GD > 80\%$, predominan las interacciones electrostáticas; 2) Un $50\% < GD < 80\%$, las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas están balanceadas; y 3) Un $GD < 50\%$, son favorecidos los agregados estables (Schatz *et al.*, 2003).

4.4.2. Aplicaciones del quitosano

Las propiedades funcionales de películas a base de quitosano pueden ser mejoradas combinándolas con otros hidrocoloides. En este sentido, algunos investigadores han desarrollado películas laminadas de quitosano/pectina por la interacción de los grupos positivos del quitosano con los grupos negativos de la pectina. De esta manera, el quitosano puede mejorar la estabilidad de la emulsión por un efecto electro-estérico que está cargado positivamente en medio ácido, así como por un efecto viscoso, que promueve una estabilidad de la emulsión y disminuye la velocidad de cremado (Vargas *et al.*, 2009). El uso del quitosano en aplicaciones alimenticias es prometedor, particularmente debido a su biocompatibilidad y no toxicidad, lo que permite su uso en películas biodegradables y materiales de recubrimiento (Kim *et al.*, 2008).

4.5. Interacciones moleculares

Las interacciones pueden ser cuidadosamente adaptadas para diversos fines como el diseño de biopolímeros adhesivos, películas comestibles y aplicaciones en la liberación controlada. Una mejor comprensión de las interacciones entre biopolímeros y factores/condiciones conduce al conocimiento de su comportamiento lo que podría aumentar su utilidad para la adaptación de estructuras alimenticias o en el desarrollo de aplicaciones de mayor valor, por ejemplo microcápsulas o películas (Stone *et al.*, 2013).

4.5.1. Enlaces covalentes

Los enlaces covalentes implican el intercambio de electrones de la capa externa entre dos o más átomos, de forma que los átomos individuales pierden su naturaleza discreta. La valencia, saturación, polaridad, fuerza y direccionalidad de los enlaces covalentes determina la estructura tridimensional, flexibilidad, reactividad química y las interacciones físicas de las moléculas (Atkins, 1994). Las reacciones químicas involucran la ruptura y formación de enlaces covalentes. De esta manera, las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de emulsiones alimentarias son alteradas por varios tipos de reacciones químicas y bioquímicas que ocurren durante su producción, almacenaje y consumo (Fennema, 1996).

4.5.2. Interacciones de van der Waals

Las fuerza de van der Waals actúan entre todos los tipos de especies químicas, ya sean iónica, polar y no-polar. Estas se dividen en tres contribuciones

separadas, que dependen de la polarización de las moléculas: a) fuerza de dispersión, que surgen de la interacción entre un dipolo instantáneo y un dipolo inducido en una molécula vecina por la presencia del dipolo instantáneo. Los electrones en una molécula se mueven continuamente alrededor del núcleo. b) fuerzas de inducción, surge de la interacción entre un dipolo permanente y un dipolo inducido por la presencia del dipolo permanente. c) fuerzas de orientación, surgen de la interacción entre dos dipolos permanentes que están girando continuamente inducida por una atracción débil (Hiemenz, 1986; Israelachvili, 1992).

4.5.3. Interacciones hidrofóbicas

Las interacciones hidrofóbicas también juegan un papel importante en la determinación del comportamiento de muchos ingredientes importantes en emulsiones alimenticias. El origen actual de las interacciones hidrofóbicas es la capacidad de las moléculas de agua para formar enlace de hidrógeno relativamente fuertes con sus vecinos más cercanos, mientras que las moléculas no polares pueden formar solo enlaces van der Waals relativamente débiles (Israelachvili, 1992). Estas interacciones son importantes cuando la superficie de las gotas tiene un poco de carácter no polar, ya sea porque no están cubiertas por emulsificante (por ejemplo, durante la homogenización a bajas concentraciones de emulsificante) o porque el emulsificante tiene algunas regiones hidrofóbicas expuestas a la fase acuosa (por ejemplo, proteínas) (Monahan *et al.*, 1996).

4.5.4. Interacciones estéricas

Cuando dos átomos o moléculas están tan juntos que sus nubes de electrones se superponen, hay una fuerza repulsiva extremadamente grande generada entre ellas. La fuerte repulsión que surge de la superposición estérica determina el tamaño efectivo de los átomos y moléculas y qué tan cerca pueden estar. Por lo tanto, tienen una fuerte influencia en el empaque de moléculas en líquidos y sólidos (Israelachvili, 1992).

4.5.5. Puentes de hidrogeno

Los puentes de hidrogeno juegan un papel crucial en la determinación de las propiedades funcionales de muchas de las moléculas más importantes presentes en emulsiones alimenticias, incluyendo agua, proteínas, lípidos, carbohidratos, agentes tensioactivos y minerales. Se forman entre un par solo de electrones en un átomo electronegativo (como el oxígeno) y un átomo de hidrogeno de un grupo vecino. Los enlaces de hidrogeno son más fuertes que la mayoría de otros ejemplos de interacciones dipolo-dipolo debido a una fuerte tendencia a volverse polarizados positivamente y porque tienen un radio menor. La fuerza y carácter direccional de los enlaces de hidrogeno son responsables de muchas de las propiedades únicas del agua (Lehninger *et al.*, 1993).

4.5.6. Interacciones electrostáticas

Las interacciones electrostáticas se producen entre las especies químicas moleculares que poseen una carga eléctrica permanente, tales como iones y moléculas polares. Un ión es un átomo o molécula que ha ganado o perdido

uno o más electrones de manera que obtienen una carga permanente positiva o negativa (Atkins, 1994).

Las interacciones electrostáticas entre polianiones como pectina y policationes como el quitosano, permiten la formación de complejos polielectrolitos (CPE). En condiciones ácidas en un rango aproximado de pH de 3-6 ambos polímeros están cargados, y por tanto pueden interaccionar. Las interacciones entre estos dos diferentes polisacáridos puede causar la formación de un hidrogel físico. Complejos entre polímeros de pectina (pectina de bajo metoxilo, PBM) y quitosano han sido considerados como sistemas de liberación de medicamentos orales ya que pueden ser útiles en la restricción de la liberación de medicamentos en el tracto superior gastrointestinal, permitiendo una rápida liberación en el colón (Nordby *et al.*, 2003).

Con el fin de lograr una funcionalidad deseada (por ejemplo, emulsionantes, textura o propiedades de película) en un producto, se requiere una mayor comprensión de los factores que afectan a las interacciones entre biopolímeros, en particular los de origen electrostático. Las interacciones atractivas entre dos biopolímeros pueden llegar a ser evidentes de diversas maneras: i) formación de pequeños complejos solubles (CS), ii) formación de un gel homogéneo débil, si las interacciones son débiles, y iii) precipitación de ambos biopolímeros (coacervados), si las interacciones son fuertes (Walstra, 2003). La naturaleza de estas interacciones puede dar lugar a cualquier comportamiento de fase segregativa o asociativa, dependiendo las características del biopolímero

(densidad de carga, tamaño, tipo y distribución de los grupos reactivos), la concentración y la relación de biopolímeros, y las condiciones del disolvente (pH, temperatura y fuerza iónica) (Espinosa-Andrews *et al.*, 2013). La fase rica en biopolímeros consiste de complejos solubles e insolubles que se reorientan ya sea en un coacervado o una morfología de tipo precipitado dependiendo de la fuerza de los polielectrolitos presentes. Los coacervados consisten de biopolímeros acomplejados, por lo general involucran un polielectrolito cargado fuerte y otro débilmente, el cual atrapa pequeñas cantidades de solvente (Klassen *et al.*, 2011).

4.6. Potencial zeta (ζ)

La mayoría de las partículas dispersas en un sistema acuoso adquirirán una carga superficial, principalmente ya sea por la ionización de grupos superficiales o la adsorción de especies cargadas. Estas cargas superficiales modifican la distribución de los iones de alrededor, lo que resulta en una capa alrededor de la partícula que es diferente a la solución mayor. Si la partícula se mueve, bajo el movimiento browniano por ejemplo, esta capa se mueve como parte de la partícula. El ζ es el potencial en el punto de esta capa donde se mueve más allá de la solución. Esto generalmente se llama plano de deslizamiento. La carga en este plano será muy sensible a la concentración y el tipo de iones en solución (Malvern Instruments, 2011). El ζ es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre partículas, por lo que su medición es una herramienta importante para el conocimiento sobre los mecanismos de dispersión y atracción de partículas coloidales (Erickson *et al.*, 2000).

Las mediciones de ζ pueden ayudar a predecir la floculación y coalescencia debido a que la estabilidad de la emulsión puede estar influenciada por las cargas eléctricas interfaciales. La carga efectiva de una gota difiere de su carga actual debido a la presencia de contra-iones en la solución. Los contra-iones más cercanos están unidos por atracciones electrostáticas. Ellos están en contacto inmediato con la superficie de la gota y forman la capa de Stern. Esto por lo tanto disminuye la carga actual de la gota. Su concentración entonces disminuye rápidamente cuando se desvían de la superficie de las gotas alcanzando su concentración de solución en equilibrio (Bouyer *et al.*, 2012).

Si todas las partículas en suspensión tienen un ζ elevado, positivo o negativo, entonces tenderán a repelerse unas de otras y no habrá tendencia a la agregación. Por el contrario, si las partículas tienen valores de ζ bajos, no habrá fuerzas que prevengan la agregación de las partículas y se promoverá la floculación. En medio acuoso, el pH de la muestra es uno de los factores más importantes que afectan el ζ . Si una partícula en suspensión, se le añade una base, las partículas adquirirán mayor carga negativa. Si se adiciona ácido, se promoverá la mayor presencia de cargas positivas, de manera que la carga de la suspensión será poco a poco neutralizada. El punto en el que el ζ de una suspensión es igual a cero, se conoce como punto isoeléctrico y normalmente es el punto en el que el sistema coloidal es menos estable (Malvern Instruments, 2011).

4.7. Emulsiones

La emulsión es un sistema que contiene por lo menos dos líquidos no miscibles (generalmente agua y aceite) con uno de ellos disperso en forma de pequeños glóbulos esféricos (gotas) en el otro. Las gotas de la emulsión se refieren a la fase dispersa o fase interna y el líquido circundante se denomina fase continua o fase externa (McClements, 1999). Para la elaboración de los recubrimientos y películas, la industria alimentaria se inclina por el uso de formulaciones emulsificadas en la que las sustancias formadoras de matrices estructurales están asociadas en una emulsión (Kester y Fennema, 1989).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido a que el contacto entre las moléculas de agua y aceite no son favorables energéticamente, sin embargo, es posible formar emulsiones que son cinéticamente estables (metaestables) por un periodo razonable (días, semanas, meses, años) mediante la incorporación de un tercer componente previo a la homogeneización, que puede estar formado por sustancias conocidas como emulsificantes y/o agentes espesantes. Estos compuestos se adsorben en la superficie de las gotas, formando una membrana protectora que retarda la aproximación de las gotas y su agregación (McClements, 1999).

4.7.1. Clasificación de las emulsiones

Existen dos tipos importantes de emulsiones, simples y múltiples o dobles, las cuales son ampliamente usadas tanto en aplicaciones prácticas como en productos industriales, preparaciones farmacéuticas, cosméticos, alimentos, entre otros. Las emulsiones simples se clasifican en dos tipos: 1) Emulsión

aceite en agua (O/W, por sus siglas en inglés: oil-in-water) donde las gotas de aceite son suspendidas en una fase acuosa continua (Di mattia *et al.*, 2011). Estas emulsiones son las más versátiles, y se pueden encontrar en diversos tipos de alimentos (mayonesas, cremas de licores, helados, cremas batidas). 2) En las emulsiones agua en aceite (W/O, por sus siglas en inglés: water-in-oil) las gotas pequeñas de la fase dispersa son de agua y la fase continua es aceite, algunos ejemplos característicos de alimentos elaborados con este tipo de emulsiones son la mantequilla, la margarina y en general todos los productos untables elaborados a base de grasas (Nordby *et al.*, 2003).

4.7.2. Factores que afectan la estabilidad de las emulsiones

La granulometría de una emulsión es un parámetro muy importante que está relacionado al proceso de emulsión. La distribución del tamaño de partícula y la polidispersidad se pueden medir por varias técnicas experimentales como difracción láser, dispersión de luz dinámica y microscopia óptica. Las mediciones de potencial zeta pueden ayudar a predecir la floculación y la coalescencia debido a que la estabilidad de la emulsión puede estar influenciada por las cargas eléctricas interfaciales (Bouyer *et al.*, 2012).

La manera en la que los lípidos se emulsifican (estructura de la emulsión) y la estabilidad de la emulsión afecta directamente la estructura de la película y, por lo tanto, sus propiedades. Durante el secado de la película, el solvente es evaporado y la concentración efectiva de lípidos aumenta, de acuerdo con fenómenos de floculación, coalescencia y cremado, dependiendo del estado

físico de los lípidos, la composición de la fase continua y las condiciones de secado (Vargas *et al.*, 2011).

La estabilidad de la emulsión depende de mecanismos complejos, pero es bien sabido que algunos de los aspectos clave son el tamaño del glóbulo de grasa medio y su patrón de distribución de tamaño que, a su vez, afectan la estabilidad, color y propiedades reológicas de las dispersiones formadoras de película (emulsión), entre otros factores (Vargas *et al.*, 2011). A su vez, existe una dependencia de las características de la emulsión con las propiedades finales de la película (permeabilidad al vapor de agua, resistencia tensil y elongación).

4.7.3. Agentes emulsificantes y plastificantes

Los emulsificantes son moléculas anfifílicas que se adsorben fácilmente y se acumulan en la interfase entre la fase dispersa (por ejemplo, lípidos) y la fase continua (por ejemplo, agua) de una emulsión (por ejemplo, aceite en agua). Estos disminuyen la tensión interfacial y producen interacciones repulsivas entre las gotitas para evitar la agregación o coalescencia de las gotas. El papel de los emulsificantes también puede ser importantes para prolongación de la estructura inicial que determina algunas características de las emulsiones alimenticias como sabor, olor y valor nutritivo (Mosca *et al.*, 2013).

Para conseguir propiedades mecánicas, de barrera, sensoriales o nutricionales deseables en las películas terminadas, se emplean materiales que pueden incorporarse en las formulaciones; entre los más usuales se encuentran los

plastificantes como el glicerol, propilenglicol y sorbitol, compuestos de baja volatilidad, que se adicionan para conferir flexibilidad a una película o recubrimiento polimérico induciendo un debilitamiento de las fuerzas intermoleculares entre las cadenas adyacentes del polímero (Shaw *et al.*, 2002).

Los plastificantes disminuyen las fuerzas intermoleculares entre las cadenas de biopolímeros, por lo tanto aumentan la flexibilidad y extensibilidad. Generalmente, los plastificantes actúan al entrar entre las cadenas moleculares poliméricas, asociadas fisicoquímicamente con el polímero, reduciendo la cohesión dentro de la red de la película, y extendiendo efectivamente y suavizando la estructura de la película (Pérez *et al.*, 2013).

4.8. Propiedades reológicas

La aplicación de una fuerza a un material hace que se deforme y/o fluya. La medida de la deformación y el flujo depende de las propiedades fisicoquímicas del material. La reología es la ciencia que se encarga del estudio de la relación entre las fuerzas aplicadas y la deformación y flujo de la materia (Macosko, 1994). El conocimiento de las propiedades reológicas de las emulsiones es muy importante, ya que muchos de los atributos sensoriales de la emulsiones alimenticias están directamente relacionadas con sus propiedades reológicas (por ejemplo, cremosidad, espesor, suavidad, extensibilidad, fluidez y fragilidad) (Rao, 1995). Además, la vida útil de muchas emulsiones depende de las características reológicas de sus componentes. De esta manera, las propiedades reológicas son utilizadas por los científicos en alimentos como una herramienta analítica para proporcionar conocimientos fundamentales sobre la

organización estructural e interacciones de los componentes dentro de las emulsiones (Tadros, 1994).

Las propiedades reológicas de muchas emulsiones alimenticias están dominadas por la agregación de las gotas, por lo que es importante entender los factores que determinan las características reológicas de estos sistemas (Liu y Masliyah, 1996). Las suspensiones de partículas agregadas tienden a exhibir un comportamiento de adelgazamiento pronunciado al corte (Figura 3). A bajas tasas de corte, las fuerzas hidrodinámicas no son lo suficientemente grandes para desorganizar los enlaces que mantienen unidas a las moléculas, por lo que los agregados actúan como partículas con tamaño y forma fijos, resultando en una viscosidad constante. A medida que aumenta la tasa de corte, las fuerzas hidrodinámicas se vuelven lo suficientemente grandes como para causar que los agregados se deformen y eventualmente se desorganicen. La deformación de los agregados resulta en su conversión alargada y alineada con la zona de corte, produciendo una reducción de la viscosidad. La desorganización de los agregados disminuye su fracción volumétrica efectiva y por lo tanto contribuye a disminuir la viscosidad de la suspensión. La viscosidad alcanza un valor constante a altas tasas de corte, ya sea porque los agregados están completamente desorganizados, de manera que solo permanecen gotas individuales o porque el número de gotas agregadas se mantiene constante ya que la velocidad de formación y desorganización de agregados es igual (Campanella *et al.* 1995).

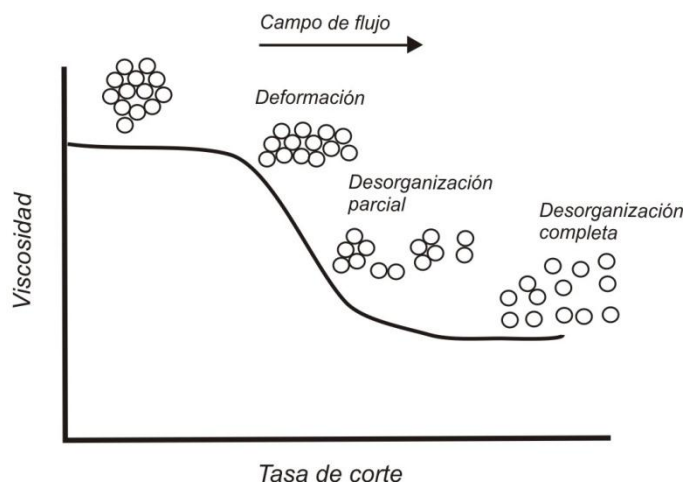


Figura 3. Emulsión que exhibe comportamiento de adelgazamiento al corte donde los flóculos se deforman y desorganizan en la zona de corte.

La superficie de las películas o recubrimientos comestibles se ve influenciada por el comportamiento reológico de los componentes, mecanismos de aplicación y cambios en las propiedades asociadas a la transición del estado líquido al sólido. La mayoría de los sistemas de recubrimientos son pseudoplásticos, viscoelásticos y tixotrópicos, donde su estado reológico es dependiente fuertemente del proceso de recubrimiento que implica el corte en diferente magnitud. Sin embargo, la eficiencia de una película comestibles contra la humedad no puede ser mejorada simplemente por la adición de materiales grasos hidrofóbicos a menos que se haya logrado la formación de una capa lipídica homogénea y continua al interior de la matriz del hidrocoloide (Rezvani *et al.*, 2013).

Además, las características de flujo de las emulsiones están influenciadas por varias fuerzas de interacción que ocurren en el sistema durante la sedimentación o cremado, floculación, coalescencia y la maduración de

Ostwald. Varios factores afectan la reología de las emulsiones como la fracción volumétrica y la viscosidad de la fase dispersa, la granulometría de las gotas, viscosidad de la fase continua así como su composición química (polaridad, pH), naturaleza y concentración de electrolitos y la reología interfacial (Bouyer *et al.*, 2012).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Para la formación de complejos solubles polisacárido-polisacárido, se utilizaron pectinas de tejocote (PT) de las accesiones ACC18 (P₁₈) y ATEX05 (P₀₅), pectina de alto metoxilo comercial (P_C, 76.47 % de grado de esterificación (GE) Grinsted ® Pectin LC 710, Danisco México, S.A. de C.V., México, D.F.), Quitosano, (Q, grado de desacetilación mayor al 75 % y elevado peso molecular, Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, Edo. Méx., México).

Para la elaboración de emulsiones aceite-en-agua se usó como fase oleosa (O) aceite de oliva extravirgen (Olave, Valle Grande, S.A. Milipilla, Chile), Monoestearato de sorbitán polioxietileno (tween60) como emulsificante hidrofílico (Sigma Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, Edo. Méx, México) y monoestearato de glicerilo como emulsificante lipofílico (J.T. Baker, S.A. de C.V. México). Otros reactivos utilizados fueron: ácido acético glacial y glicerol como agente plastificante (J.T. Baker, S.A. de C.V. México), ácido clorhídrico (HCl) 0.1N. hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, etanol 96% v/v (Laboratorios Laitz, S.A. de C.V., México). En todos los experimentos se utilizó agua desionizada.

5.2. Obtención y caracterización de pectinas de tejocote

Se colectaron frutos de las accesiones ACC18 y ATEX05 de tejocote (*Crataegus spp.*) en madurez fisiológica del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo, para la extracción de las pectinas P₀₅ y P₁₈, respectivamente. Los frutos se guardaron en bolsas de plástico con cierre hermético y se mantuvieron bajo condiciones de congelación (Metafrio, Nieto y CIA SA DE CV, México) ($-20 \pm 2^\circ \text{C}$) hasta su utilización.

5.2.1. Extracción

La extracción de las pectinas P₁₈ y P₀₅ se llevó a cabo mediante el proceso de hidrólisis ácida propuesto por Yapó *et al.* (2007) con algunas modificaciones. Cantidades de 100 g de pulpa de tejocote de cada una de las accesiones fueron mezclados con 1000 mL de HCl 0.1 N y molidos en una licuadora (Osterizer 465-13, Sunbeam Mexicana, S.A. DE C.V. México) durante 15 s. La mezcla se calentó hasta $85 \pm 1^\circ \text{C}$ en baño maría, durante 60 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ \text{C}$) y se pasó por un filtro de tela, para separar la fibra insoluble de tejocote de la solución de pectina. Enseguida, a la solución de pectina se le adicionó una mezcla de etanol/agua (50% v/v) en una relación 1:1, dejándose reposar 24 h a $4 \pm 1^\circ \text{C}$ para favorecer la precipitación de las pectinas. Las pectinas se filtraron (tela de manta) y lavaron en dos ocasiones con una mezcla de etanol/agua 70/30 (v/v) en una relación 1:1 y finalmente centrifugaron por 15 min a $20 \pm 1^\circ \text{C}$ ($1700 \times g$) en una centrífuga Sorvall RC-5B (GMI Inc., Ramsey, MN, EUA).

Las PT obtenidas fueron purificadas utilizando membranas de diálisis (MWCO = 15,000; Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories Inc., CA, EUA); para ello, las PT se llevaron al interior de las membranas (15 cm de largo) con ayuda de una espátula de acero inoxidable y se sellaron con hilo desinfectado; enseguida las PT contenidas en las membranas se colocaron en el interior de recipientes de plástico de 500 mL con agua destilada para el proceso de purificación por 72 h, cambiando el agua 3 veces/día. Todo el proceso de purificación de PT se realizó en condiciones de refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$). Después de este periodo, las PT fueron secadas al vacío en charolas metálicas, forradas con papel encerado en una estufa Memmert (Wisconsin Oven Distributors, LLC., WI, EUA) durante 12 h a $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Posteriormente, el papel encerado con las PT secas se retiró de las charolas y se llevó a un desecador (30 % HR) para extraer toda la humedad residual. Después, las PT se trozaron para ser guardadas en recipientes de plástico cerrados y finalmente, fueron molidas con ayuda de una licuadora (Osterizer 465-13, Sunbeam Mexicana, S.A DE C.V. México) por 90 s hasta obtener un polvo fino.

5.2.2. Determinación del rendimiento de las pectinas

Se determinó el rendimiento del proceso de extracción de las pectinas y se, el cual fue determinado mediante la Ecuación 1 y se expresó en porcentaje:

$$Rendimiento = \frac{\text{peso pectina}}{\text{Peso pulpa}} \times 100 \quad (1)$$

5.2.3. Determinación del grado de esterificación (% GE)

El grado de esterificación de las pectinas se determinó mediante la técnica desarrollada por Singthong *et al.* (2004). 500 mg de pectina se adicionaron con 2 mL de etanol al 96% v/v y se disolvieron en 100 mL de agua destilada, aplicando agitación vigorosa (agitador magnético Thomas 4x4 CER HOT/STRIRR Scientific, Henry Troemner, LLC, EUA). A la solución de pectina se añadieron 5 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0.5 M; el volumen gastado se denominó como “A”. A la solución de pectina titulada se le agregaron 9.69 mL de NaOH 0.5 M, se dejó reposar por 15 min y posteriormente se le añadieron 9.71 mL de HCl 0.5M. La solución resultante se tituló finalmente con NaOH 0.5 M; el volumen gastado se denominó como “B”. El grado de esterificación (DE) se calculó con la Ecuación 2:

$$\circ \quad \% DE = \frac{B}{A+B} \times 100 \quad (2)$$

Donde A: volumen de NaOH inicialmente gastado; B: volumen de NaOH gastado al final.

5.2.4. Determinación del contenido de humedad y proteína

La determinación de proteína se realizó por el método Kjeldahl, utilizando un factor de conversión de 6.25.y la humedad de las pectinas se determinó por el método de la AOAC (1995).

5.3. Formación de complejos solubles pectina-quitosano

5.3.1. Dispersiones base de biopolímeros

Se prepararon dispersiones base de P_C, P₁₈ y P₀₅ al 0.5% p/p utilizando agua destilada. Asimismo, se preparó una dispersión base de Q al 0.5% p/p, usando ácido acético (1% p/v). Cada una de las dispersiones de biopolímero fueron sometidas a agitación constante por 12 h hasta dispersión completa. Las dispersiones se almacenaron bajo refrigeración ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 24 h, para lograr una hidratación completa (Espinoza-Andrews *et al.*, 2013).

5.3.2. Determinación del potencial zeta (ζ) de los biopolímeros como función del pH

Para determinar el rango de pH al cual cada una de las pectinas y Q pueden interaccionar electrostáticamente, se midió la variación del potencial ζ de dispersiones de estos biopolímeros como función del pH, utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, RU). A partir de las dispersiones base, se prepararon dispersiones de cada biopolímero (P₀₅, P₁₈, P_C y Q) a una concentración de 0.05% p/p, utilizando agua desionizada y se ajustó su pH en 4.0. Muestras de 10 mL de cada una de las dispersiones se colocaron en un autotitulador MPT-2 (Malvern Instruments, Worcestershire, RU) y se midió su valor de potencial ζ al variar su pH en el rango de 2.5 a 6.0, con incrementos de 0.5 unidades, usando disoluciones de HCl 0.1 M o NaOH 0.1 M, previamente alimentadas al autotitulador. A partir de las curvas de potencial ζ versus pH obtenidas, se determinó el valor de pH de máxima diferencia entre

las cargas de signo opuesto de cada una de las pectinas y el Q (Murillo, 2011; Espinosa-Andrews *et al.*, 2013).

5.3.3. Determinación de la relación en peso estequiométrica de la interacción entre biopolímeros

Con objeto de determinar la relación en peso estequiométrica para la formación de complejos biopoliméricos entre las distintas pectinas y el Q, se determinó el punto de equivalencia para cada par de biopolímeros (Espinosa-Andrews *et al.*, 2013). Dispersiones de Q (10 mL, 0.02 mg mL⁻¹, pH 4.0) se titularon con dispersiones de las distintas pectinas (0.2 mg mL⁻¹, pH 4.0), con ayuda del autotitulador MPT-2. Los valores de potencial ζ de las mezclas se midieron conforme se fueron añadiendo alícuotas de 0.25 mL de pectina, y el punto de equivalencia se consideró como aquel en el que el potencial ζ de la mezcla Q-Pectina alcanzó un valor igual a cero. Adicionalmente, con el mismo equipo se midió el tamaño de los complejos biopoliméricos, en la forma de diámetro hidrodinámico (d_h) como función de los mL de pectina adicionados a la dispersión de Q.

5.3.4. Establecimiento de las condiciones de pH y relación en peso entre biopolímeros para la formación de complejos solubles

A partir del conocimiento del valor de pH potencialmente óptimo para la interacción electrostática entre biopolímeros, se determinó la relación en peso estequiométrica entre las distintas pectinas y el Q (R_{P-Q}) que rindiera la máxima formación de complejos solubles (CS), mediante mediciones de absorbancia

(Ramírez-Santiago *et al.*, 2012). Se prepararon mezclas de Q y las distintas pectinas (P_{05} , P_{18} , P_c), previamente ajustados al valor de pH óptimo (potenciómetro Conductronic modelo pH120, Micro precision calibration Inc. EUA), en relaciones en peso cercanas a aquellas que resultaron en valores de potencial ζ iguales a cero. Se llevó a cabo una homogenización de los biopolímeros usando un sonicador equipado con una punta de 8 mm de diámetro (Ultrasonic processor, Model VCX 130PB 500 y 750 W, 20 kHz. Newtown, CT, EUA), operado a una amplitud de 35 % durante 3 min a 25° C, y las mezclas se dejaron reposar durante 48 h para que la formación de complejos biopoliméricos alcanzara el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min a 20° C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Alemania). Finalmente, la absorbancia de los sobrenadantes conteniendo los CS se midió a una longitud de onda de 400 nm (Espectrofotómetro UV, Spectrophotometer CS-200PC® Globe™, 340-1000 nm, Spectronics Instruments Inc., Rochester, NY, EUA) usando agua desionizada como blanco. La longitud de onda de medición de la absorbancia de los CS fue previamente determinada, considerando que los CS tuvieran una máxima absorbancia, mientras que los biopolímeros individuales mostraran baja absorbancia a esta longitud de onda. El valor de pH de máxima formación de CS fue aquel en el que el valor de absorbancia para cada par de Q-pectina fue el más elevado.

5.4. Formulación y preparación de las emulsiones sencillas aceite-en-agua (O/W)

Se prepararon tres emulsiones (E) aceite-en-agua (O/W) con una fracción gravimétrica de fase oleosa (ϕ) igual a 0.1, que variaron en el tipo de CS presente en la fase W (Pc-Q, P₀₅-Q y P₁₈-Q), resultando en las E codificadas como: E_{PC-Q}, E_{P05-Q} y E_{P18-Q}. La composición de cada 100 g de emulsión O/W fue la siguiente: O (9.75 g de aceite de oliva + 0.25 g de monoestearato de glicerilo) y W (89.25 g de dispersión acuosa de CS + 0.75 g de tween 60). La fase oleosa se preparó por separado a una temperatura de 40 °C y la preparación de las dispersiones acuosas de CS se realizó siguiendo el método descrito en la sección 5.3.4, a los valores de pH y relación en peso estequiométrica entre biopolímeros determinados previamente.

La preparación de las E involucró los siguientes procedimientos: (a) las fases W se homogenizaron con un equipo Ultra-turrax (modelo T50basic, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) operado a 4 000 rpm durante 1 min; (b) integrar los remanentes de CS adheridos al vástago; (c) se continuó el proceso, aplicando homogenización a 5200 rpm x 1 min, hasta integrar toda la fase continua y (d) Se integró a la mezcla la fase oleosa, previamente preparada, hasta adicionarla por completo utilizando 6400 rpm hasta completar 3 min en total, en un equipo homogenizador Ultra-Turrax (modelo T50basic, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania).

5.5. Caracterización de las emulsiones

5.5.1. Determinación del tamaño y morfología de gota

El tamaño de gota de las E se midió mediante la técnica de dispersión de luz láser (20°C), utilizando un equipo Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, RU) y se expresó como diámetro medio volumétrico-superficial ($d_{3,2}$) (Ecuación 3):

$$d_{32} = \frac{\sum_i z_i d_i^3}{\sum_i z_i d_i^2} \quad (3)$$

Donde z_i es el número de gotas con diámetro d_i . (Ma *et al.*, 2012)

Muestras de cada una de las E se dispersaron en agua dentro de la unidad de medición (Hydro EV, Worcestershire, RU) hasta alcanzar una tasa de oscuración en el rango de 5-20%. Los índices de refracción del aceite de oliva y del agua como medio de dispersión, se determinaron previamente y fueron 1.4677 y 1.33, respectivamente.

Las gotas de las E fueron examinadas por microscopia óptica (microscopio óptico Olympus modelo BX53, Olympus Co. Ltd, Tokio, Japón), acoplado a una cámara digital (Moticam 2500, Motic Corp. China) y un software Motic Images-Plus V. 2.0 (Motic, Corp., Ltd, China). Muestras de cada E diluida en agua destilada (1:10 v/v), se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio con cubreobjetos y se observaron a una magnificación de 100x.

5.5.2. Propiedades reológicas

Con objeto de determinar el impacto de las propiedades reológicas de las E sobre las propiedades finales de las películas comestibles, las primeras fueron sometidas a pruebas oscilatorias y dinámicas en un reómetro MRC 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania) a una temperatura de 25 °C (Physica TEK 150P), usando una geometría cono-plato, en el cual el cono rotatorio fue de 50 mm de diámetro y el ángulo de cono de 1°(CP50-1-SN29993).

La variación de la viscosidad aparente como función de la tasa de corte de las E, fue determinada mediante la obtención de curvas de flujo. Muestras de 3 mL de cada E fueron colocadas cuidadosamente en el sistema de medición, se dejaron reposar durante 5 min para permitir su reestructuración y el equilibrio de la temperatura, y se sometieron a tasas de corte que variaron de 10^{-3} - 10^3 s⁻¹. Los datos de las curvas log viscosidad aparente-tasa de corte resultantes, se fijaron usando el software del reómetro (Rheoplus/32 v2.62, Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania) a los modelos reológicos de Carreau, Casson, Cross, Herschel-Bulkley y Ellis (Steffe, 1996) que describen el comportamiento de fluidos independiente del tiempo.

Para determinar el comportamiento viscoelástico de las E, muestras de éstas, de forma similar a lo informado para las curvas de flujo, se sometieron a barridos de amplitud, aplicando un rango de deformación de 0.01 a 100%, a una frecuencia constante de 1Hz. A partir de las curvas obtenidas, se determinó la zona en las que las E mostraron comportamiento viscoelástico lineal (ZVL), Posteriormente, las E se sometieron a barridos de frecuencia, aplicando una deformación de 1% (correspondiente a la ZVL) y variando la frecuencia de 0.01

a 100 Hz (Murillo *et al.*, 2011). Mediante el software del equipo se obtuvieron los valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G''), como función de variaciones en la deformación y la frecuencia.

Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado, después de 24 h de preparación de las E y así permitir la estabilización de cada una de ellas, previo a su análisis.

5.6. Elaboración de las películas comestibles

Se elaboraron tres variantes de películas comestibles (P) a partir de las emulsiones E_{PC-Q} , E_{P05-Q} y E_{P18-Q} , las cuales fueron codificadas como: P_{PC-Q} , P_{P05-Q} y PP_{18-Q} , respectivamente. El método de preparación de las P fue mediante la técnica de vaciado en placa (Bósquez-Molina *et al.*, 2003); para ello 10 g de E se vertieron en cajas petri de vidrio (diámetro de 9.5cm) y se secaron en un horno de convección (Felisa, modelo FE, México D. F., México) a 30 ± 1 °C por 12 h. Las P formadas se removieron de las cajas Petri con la ayuda de una espátula delgada y se almacenaron en un ambiente controlado de humedad (30 %HR) en un desecador con sílica por 72 h, previo a las mediciones de fuerza de tensión, elongación de ruptura y PVA.

5.7. Caracterización de las películas comestibles

5.7.1. Propiedades ópticas

Los parámetros de color de las películas se midieron con un colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica minolta optics, Inc. Japón), tomando 5 mediciones por película y se reportó el promedio (Galus y Lenart, 2013). Las

muestras de película fueron colocadas sobre una placa blanca estándar (placa de calibración CR-400; Y= 87.3, X=0.3153 y Y= 0.3226) y se obtuvieron los valores L^* , a^* y b^* . Estos valores fueron utilizadas para calcular el tono ($h^\circ = \arctan[b^*/a^*]$) y el croma (saturación de color) [$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$] (Vargas *et al.*, 2009).

5.7.2. Evaluación del espesor

El espesor de las películas se midió en cinco zonas (1 en el centro y cuatro alrededor del perímetro de las películas) (Galus y Lenart, 2013) con un micrómetro digital (modelo Coolant proof IP65, Mitutoyo Co. Tokyo, Japón), con precisión de 0.001 mm. Cada película se colocó entre los sujetadores del micrómetro y posteriormente se ajustó éste último a la muestra para medir el espesor. Los valores promedio de espesor se utilizaron para los cálculos de las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua de las P.

5.7.3. Propiedades mecánicas

A las P se les determinó el esfuerzo tensil (ET) y porcentaje de elongación al corte (% E), de acuerdo al método D882 de la ASTM con ligeras modificaciones (Galus y Lenart., 2013), usando un equipo analizador de textura TA.XT2i (Stable Micro Systems UK, Surrey, RU), con una celda de 5 kg.

El ET se calculó dividiendo la fuerza máxima entre el área de la sección transversal inicial de la muestra (ancho x espesor promedio de las películas) y se expresó en Mpa (Ecuación 4). La elongación al corte (%) se calculó como la

elongación al punto de rotura de la muestra, respecto a la longitud inicial de dicha muestra (Ecuación 5), expresado como porcentaje (Cissé *et al.*, 2012).

$$ET = \frac{\text{Fuerza máxima}}{\text{Ancho} \times \text{espesor}} \quad (4)$$

Dónde: la RT= Resistencia a la tensión, expresada en Mpa; la fuerza máxima se expresó en N, el ancho y el espesor en m.

$$E = \frac{\text{longitud de estiramiento}}{\text{longitud inicial}} \times 100 \quad (5)$$

Dónde: E= Elongación, expresada en porcentaje (%), la longitud de estiramiento y longitud inicial se expresaron en cm.

Para las mediciones, se cortaron fracciones rectangulares de película de 80 mm de largo y 25 mm de ancho, las cuales fueron acondicionadas previamente en un desecador (30 % HR, con sílica de gel) para evitar la absorción de humedad del ambiente. La distancia inicial de separación de las pinzas para sujetar la muestra de PC a lo largo y la velocidad de medición se ajustaron a 50 mm y 1 mms⁻¹, respectivamente.

Estas determinaciones se realizaron por triplicado y se reportó la media.

5.7.4. Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La PVA de las P se determinó por el método descrito por Gennadios *et al.*, 1994 y McHugh *et al.*, 1993, con modificaciones. Previamente a la medición de la PVA, se prepararon disoluciones saturadas de K₂CO₃ y de K₂SO₄ usando el valor de solubilidad de cada sal, informado en la literatura a una temperatura de 25° C. Cantidades de 10 mL de disoluciones saturadas de K₂CO₃ y de K₂SO₄ se

colocaron en vasos rectos de vidrio, por separado, adaptados como celdas de permeabilidad. Después, cada una de ellas se colocaron en un desecador, donde se monitoreó tanto el cambio de HR y presión a una temperatura constante ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) con un sensor de HR (Kestrel 400, pocket weather tracker, New York, USA) hasta que dichos parámetros fueron estables. Los valores de HR y presión obtenidos, se utilizaron para el cálculo de la PVA de las P.

Para la evaluación de la PVA de las P, se utilizaron vasos de precipitados de vidrio (8.35 cm de alto y 4.93 cm de diámetro) de 50 mL, de peso conocido, como celdas de permeabilidad. Se colocaron 10 mL de la disolución saturada de K_2SO_4 (94% de HR) en los vasos de precipitados y se cubrieron con muestras circulares de película (9.5 cm, correspondiente al diámetro de la caja Petri). Para fijar las películas al borde de los vasos, se utilizaron ligas. Después, 6 celdas de permeabilidad se acondicionaron por 2 h en la parte superior del desecador, contenido en el interior de cada una de ellas 10 mL de la disolución de K_2SO_4 con HR de 94% y enseguida se determinaron sus pesos iniciales (P_1 : peso del vaso + sal + película + ligas). Al mismo tiempo, en el mismo desecador pero en la parte inferior se colocaron 150 mL de la disolución saturada de K_2CO_3 (75% de HR), correspondiendo a una relación 25:1 de la disolución de K_2CO_3 , respecto a la de K_2SO_4 . Lo anterior, con el fin de crear un gradiente de HR y así propiciar la migración del vapor de agua desde el interior de la celda de permeabilidad, atravesando la muestra de película, hacia el exterior. Variaciones en el peso de la celda de permeabilidad se monitorearon por 24 h a intervalos de 2.5 h, hasta alcanzar un peso constante (P_2). Los valores de PVA de las PC se calcularon usando la Ecuación 6 (Murillo *et al.*, 2011).

$$PVA = \frac{\Delta m * x}{A * \Delta t * \Delta p} = \frac{WVTR * x}{P_1 - P_2} \quad (6)$$

Donde: PVA = permeabilidad al vapor de agua ($\text{g/m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$); Δm = pérdida de peso (g) de la celda de ensayo después de 24 h; x = espesor de la película (m); A = área expuesta de la película (m^2); Δt = diferencial de tiempo (s) entre cada medición; P_1 = presión de vapor de agua (Pa) y P_2 = presión de vapor corregida (Pa) (Ecuación 7).

$$P_1 = P - P_0 * e^{\frac{VTVA * R * T * Z}{P * D}} \quad (7)$$

P es la presión atmosférica total (Pa), P_0 = presión parcial de vapor de agua ($P_0 = 4.84T^2 - 52.24T + 1449.63$ (T en $^{\circ}\text{C}$) (Pa); $VTVA$ = velocidad de transferencia al vapor de agua ($\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$); T = temperatura absoluta durante la prueba ($^{\circ}\text{K}$); Z = altura de la capa de aire (m); R = constante universal de los gases $8.314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ y D = coeficiente de difusión del vapor de agua en el aire ($\text{m}^2 \text{día}^{-1}$) (Ecuación 8).

$$P_2 = \frac{Hr}{100} x P_v^* \quad (8)$$

Hr = humedad relativa al interior del desecador, en la zona de estabilidad, después de 24 h (Ecuación 9).

$$P_v^* = 10^{A - (\frac{B}{C+T})} \quad (9)$$

A , B y C son constantes, donde $A = 8.0713$; $b = 1730.63$; $C = 233.426$ y T = temperatura en la zona de estabilidad, después de 24 h ($^{\circ}\text{C}$).

Se analizaron tres repeticiones de cada película y se reportó la media.

5.8. Diseño estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado usando un diseño experimental completamente al azar y los datos de las variables de respuesta evaluadas corresponden a las medias $\pm$ desviación estándar. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA), y en los casos pertinentes, a pruebas de comparación de medias de Tukey. La significancia se estableció como $p \leq 0.05$. Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Manugistics Inc., Cambridge, MA, EUA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Rendimiento, grado de esterificación y contenido de proteína de las pectinas

La caracterización de las pectinas utilizadas en cuanto a rendimiento, proteína y grado de esterificación se muestra en el Cuadro 1. La extracción de pectinas por medio ácido, no produjo diferencia significativa en el rendimiento de las variantes de tejocote (P_{05} y P_{18}), extraídas utilizando medio ácido. Sin embargo, en proteína si se encontró una marcada diferencia, en el siguiente orden: la P_{18} tuvo el mayor valor, seguida de la P_c y P_{05} , donde estas últimas se comportaron de manera similar. Respecto al GE, las 3 pectinas evaluadas pueden ser clasificadas como pectinas de alto metoxilo ($DE \geq 50 \%$), en la que las P_c y P_{05} fueron significativamente similares y con un valor mayor en comparación a la P_{18} . Este tipo de pectinas forman geles térmicamente irreversibles en presencia de grandes cantidades de azúcar ($> 55 \%$) y relativamente altos valores de pH (2.0-6.0) (Yapo *et al.*, 2007). Existen reportes en los que se menciona que los grupos carboxílicos de la cadena de ácido galacturónico de las pectinas puede estar más o menos esterificados con grupos metoxilo dependiendo del origen botánico, la localización de la pectina (pared celular o lamela media), el clima y el tipo de proceso de extracción (Joye *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Valores de rendimiento, proteína y grado de esterificación de pectinas de tejocote y cítrica.

Pectina	Rendimiento*	Proteína*	GE
		(%)	
Pc	np	2.620±0.127 ^b	74.470±0.283 ^a
P05	3.515±0.360 ^a	2.215±0.148 ^b	77.363±1.603 ^a
P18	2.965±0.262 ^a	5.49±0.042 ^a	68.475±0.643 ^b

* Expresados en base seca; GE: Grado de esterificación.

Los valores son dados como el promedio ± desviación estándar. Valores con la misma letra por columna no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

El conocimiento del valor del GE de una pectina es relevante, puesto que este factor determina en gran medida su propiedad gelificante, habilidad para ligar agua y capacidad estabilizante/ en sistemas alimenticios (Yapo, 2009). Otro aspecto importante en las características de las pectinas se refiere a su contenido de proteína asociada; debido a que el carácter anfifílico de las proteínas les confiere capacidad emulsificante (Dickinson, 2011). Los contenidos de proteína de las pectinas estudiadas variaron como sigue: P05 < Pc < P18, como se indica en el Cuadro 1. Los contenidos de proteína de las pectinas estudiadas fueron superiores al valor reportado por Vivar-Vera *et al.* (2007) de 0.34 ± 0.01 g/100 g en pectina de tejocote de alto metoxilo ($92 \pm 0.06\%$) de *Crataegus pubescens*. Por otro lado, en pectinas de tejocote de bajo metoxilo, Li *et al.* (2008) encontraron valores de proteína de 5, 11 y 23 % para

extracciones utilizando agua fría, agua caliente y medio ácido, respectivamente. Lo anterior indica, que las condiciones de extracción de las pectinas influyen en gran medida en el GE y en el contenido de proteína. Yapó (2009), utilizó 3 métodos de extracción de pectinas de *Passiflora edulis* flavicarpa y encontró que a mayor GE menor contenido de pectina como sigue: precipitación con metales (54, 1.4) < diálisis (59, 3.1) < extracción con alcohol (58, 3.2), para GE, % P; respectivamente. Este mismo autor, encontró que la resistencia de los geles de pectina precipitados por iones metálicos fue más alta que la de los geles extraídos usando alcohol puro y diálisis. Este comportamiento lo atribuyó al contenido relativamente bajo de cenizas y posiblemente al contenido de proteína por con la mayor presencia de ácido galacturónico.

6.2. Variación del potencial zeta (ζ) de las pectinas y el quitosano como función del pH

La medición de los valores de ζ de las pectinas y de Q como función del pH (2.5 a 6.0), se realizó con el fin de determinar el rango de pH en el cual las cadenas de pectinas y aquellas de Q presentaran cargas eléctricas de signo opuesto, pudiendo así interaccionar electrostáticamente y formar complejos biopoliméricos.

La dependencia del pH de los valores del ζ de las disoluciones de los biopolímeros /0.5 % p/p) se muestra en la figura 4. El ζ de las tres pectinas utilizadas fue negativo en todo el rango de pH y los valores de ζ se incrementaron conforme el valor de pH aumentó debido a la creciente

ionización de los grupos carboxílicos (-COOH) del ácido galacturónico en grupos carboxilato (-COO⁻) (Jones *et al.*, 2011). El pKa de los grupos carboxílicos de la pectina se encuentran en un intervalo de 3.0-4.5, cuando el pH se encuentra en estos valores la mitad de los grupos ácidos se encuentran disociados y a medida que el pH se incrementa, la proporción de -COO⁻/COOH también aumenta, lo que se refleja en los valores más negativos del ζ (Giancone *et al.*, 2008). Aun cuando los valores de ζ fueron negativos para las tres pectinas en todo el rango de pH estudiado, se observaron diferencias en sus magnitudes, dependiendo de la pectina. Así, los valores de ζ de la P₀₅ variaron de -6.6 mV en pH= 2.5 a -33.3 mV en pH=6.0; Los valores de ζ de la P_c variaron -5.6 mV en pH=2.5 a -26.5 mV en pH=6.0 y finalmente los valores de ζ de la P₁₈ variaron de -6.1 mV en pH=2.5 a -14.3 mV en pH=6.0. Los resultados obtenidos muestran que la P₀₅ y P_c exhibieron valores de ζ cercanos, los cuales fueron de mayor magnitud que aquellos presentados por P18. Este comportamiento parece indicar la presencia de un mayor número de grupos carboxilos en las cadenas de ácido poligalacturónico de P₀₅ y P_c, en comparación con aquellos contenidos en las cadenas de ácido poligalacturónico en P18. En efecto, los valores de ζ de P₁₈, permanecieron prácticamente constantes a partir de pH de 3.5 hasta 6.0; mientras que aquellos de las P₀₅ y P_c, continuaron disminuyendo en ese rango de pH (Figura 4).

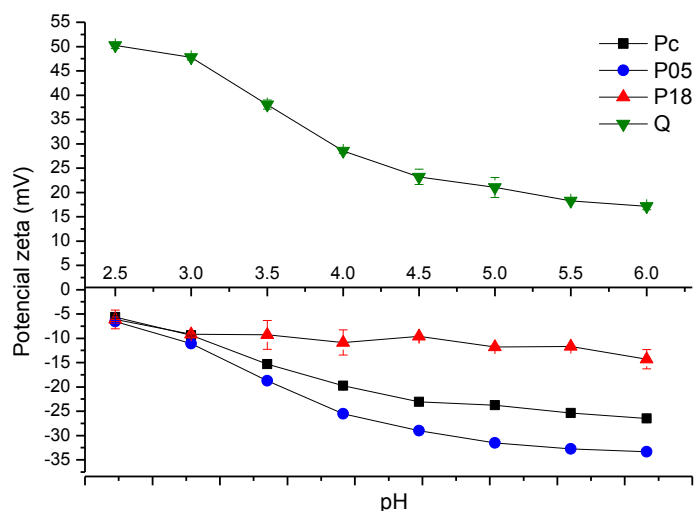


Figura 4. Variación del potencial zeta de las dispersiones de pectina y quitosano (0.5 % p/p) a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

El Q por su parte, se comportó como un polielectrolito cargado positivamente en todo el rango de pH estudiado, aun cuando, la magnitud de dicha carga disminuyó progresivamente al aumentar el pH. Los valores de ζ del Q variaron de 50.3 mV en pH=2.5 a 17.1 mV en pH=6.0. La magnitud de los valores de ζ del Q y su disminución con incrementos de pH son función de su grado de desacetilación (Gusey y McClements, 2006; Espinoza-Andrews *et al.*, 2013). Los grupos NH_3^+ del quitosano presentan un $\text{pKa} \approx 6.5$ (Bonilla *et al.*, 2012), lo cual asegura que predominan los grupos amonio ($(-\text{NH}_3^+)$) sobre los grupos amino ($(-\text{NH}_2)$) en los segmentos de glucosamina. Lo anterior, explica la existencia de la carga positiva que el Q presenta en todo el intervalo de pH estudiado. Así, la disminución en la magnitud de esta carga positiva al incrementarse el pH se debe a la transformación de los grupos NH_3^+ en grupos amina (NH_2).

A partir de los resultados mostrados en la figura 4, se seleccionó el rango de pH entre 4.0 a 4.5, como aquel favorable para la interacción entre Q y las distintas pectinas, con la consecuente formación de complejos biopoliméricos. Lo anterior, debido a que en este rango de pH se observó la máxima diferencia en la carga absoluta presentada entre el Q y las pectinas; esto es, un balance estequiométrico adecuado entre la carga positiva del Q y la carga negativa de las pectinas.

6.3. Punto de equivalencia de los biopolímeros

En la Fig. 5 se muestra la evolución del potencial zeta (ζ) y del diámetro hidrodinámico (d_h) de las especies químicas presentes en la dispersión de Q (10 mL, 0.2 mg mL⁻¹) conforme se tituló con Pc (2 mg mL⁻¹). Las curvas obtenidas se caracterizaron por la aparición de tres zonas conforme se adicionó la Pc: (A) una zona a relaciones de polielectrolito aniónico (Pc) a polielectrolito catiónico (Q) (R_{Pc-Q}) relativamente bajas ($\sim 0.25:1 - 2.5:1$), en la que se observa una disminución progresiva de los valores de ζ desde 38.1 mV hasta 11.4 mV y un aumento progresivo de los valores de d_h (~ 1800 a 6600 nm), indicando estos resultados la asociación débil entre ambas macromoléculas y la formación de CS, los cuales permanecieron solubles debido a la neutralización incompleta de las cargas eléctricas de las moléculas de Q (Hernández-Marín *et al.*, 2013). (B) Una zona intermedia a valores de R_{Pc-Q} de $\sim 2.6:1$ a $2.8:1$, en la que los valores de ζ disminuyeron drásticamente, cambiando de positivos a negativos, hasta alcanzar un valor de ~ -7 mV, acompañados por una reducción pronunciada de los valores de d_h ; los valores de ζ señalan que

ocurrió la neutralización completa de las macromoléculas con carga positiva del Q, a través de la unión sobre sus cadenas de moléculas de Pc con carga negativa, existiendo a una R_{Pc-Q} de 2.8:1, un exceso de moléculas de Pc en el sistema. En esta zona ocurrió la formación de complejos insolubles o complejos coacervados complejos (CC) mediante la neutralización completa de las cargas de Q y la agregación progresiva de CS en CC. Los bajos valores de d_h obtenidos en esta zona pueden ser atribuidos a moléculas individuales de biopolímeros presentes en el sistema: los valores de d_h de los CC no pudieron ser medidos por el equipo por rebasar el rango de tamaño de detección (5 μm), pero fueron observados a simple vista, en la forma de agregados ocupando la superficie del sistema. De esta manera, como la mayor parte de las biomoléculas formaron aglomerados, solo una pequeña proporción de ellas quedaron en disolución y son las que detecta el equipo. El punto isoeléctrico entre Pc y Q ocurrió alrededor de una R_{Pc-Q} de 2.7 mg de Pc a 1.0 mg de Q, ocurriendo en este punto la transición de CS a CC. (C) Una región a valores de R_{Pc-Q} relativamente altos > 2.8:1 hasta 7:1, en la que los valores de ζ (~ -10 mV) y de d_h (~ 1000 nm) permanecieron casi constantes, indicando ello que no existió cambio en la carga del sistema, la cual fue cercana a la observada para la Pc sola. Lo anterior, sugiere que las moléculas presentes de Q se encontraron completamente unidas a moléculas de Pc, existiendo un exceso de éstas últimas en el sistema. Bengoechea *et al.* (2011), encontraron un comportamiento similar en una mezcla de lactoferrina y pectina, donde la mezcla de dichas soluciones se cargó más negativamente, conforme se

incrementó la cantidad de pectina adicionada y se formaron complejos moleculares.

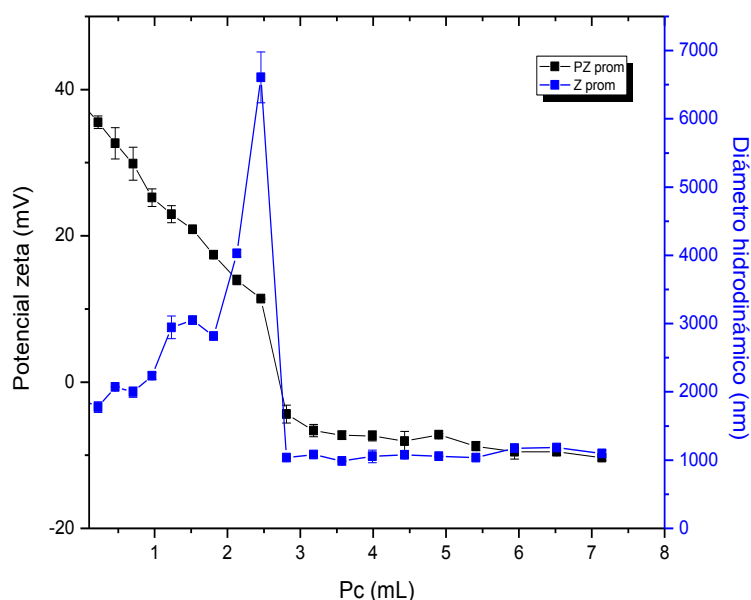


Figura 5. Evolución del potencial zeta (ζ) y diámetro hidrodinámico conforme el polielectrolito catiónico quitosano (Q) se tituló con el polielectrolito aniónico pectina cítrica (Pc).

La Figura 6, describe la evolución del ζ y del d_h de las especies químicas presentes en la dispersión de Q (10 mL, 0.2 mg mL^{-1}) conforme se tituló con P₀₅ (2 mg mL^{-1}). Los comportamientos del ζ y del d_h fueron similares a los presentados por el sistema Pc: Q (Figura 5), existiendo las mismas zonas ya descritas. (A) una zona a relaciones de ($R_{\text{P05-Q}}$) relativamente bajas ($\sim 0.25:1$ – $2.5:1$), en la que se observa una disminución progresiva de los valores de ζ desde alrededor de 40.4 mV hasta 12.6 mV y un aumento progresivo de los valores de d_h (~ 1100 a 2860 nm), indicando con ello la formación de $\text{CS}_{\text{P05-Q}}$.

(B) una zona intermedia a valores de $R_{P_{05}-Q}$ de $\sim 2.6:1$ a $4.4:1$, en la que los valores de ζ disminuyeron drásticamente, en particular en el rango de $R_{P_{05}-Q}$ de $2.8:1$ a $3.2:1$, cambiando de positivos a negativos, hasta alcanzar un valor de ~ -13.6 mV, acompañados por una reducción pronunciada de los valores de d_h ; los valores de ζ indicaron la neutralización completa de las moléculas de Q con carga positiva, mediante su unión a moléculas de P_{05} , existiendo a una $R_{P_{05}-Q}$ de $4.4:1$ un exceso de moléculas de P_{05} en el sistema. En esta zona ocurrió la formación de CC mediante la neutralización completa de las cargas de Q y la agregación progresiva de los CS en CC. Los valores de d_h obtenidos en esta zona presentaron gran variabilidad, la cual puede ser atribuida a la presencia de una mezcla de moléculas individuales de los biopolímeros sin reaccionar, principalmente de P_{05} y a la disgregación parcial de los CC formados al aplicar agitación continua al sistema. Aun cuando la formación de CC fue evidente para el observador, los valores reales de su d_h no pudieron ser medidos por rebasar el rango de tamaño de detección del equipo. El punto isoeléctrico entre P_{05} y Q ocurrió aproximadamente a una $R_{P_{05}-Q}$ de 2.6 mg de P_{05} a 1.0 mg de Q. (C) una región a valores de $R_{P_{05}-Q}$ relativamente altos $> 4.5:1$ hasta $7:1$, en la que la carga del sistema permaneció casi constante, presentándose valores de $\zeta \sim -15.6$ mV. Lo anterior, posiblemente debido a que las moléculas de Q se encontraron completamente unidas a las moléculas de P_{05} , existiendo un exceso de éstas últimas en el sistema.

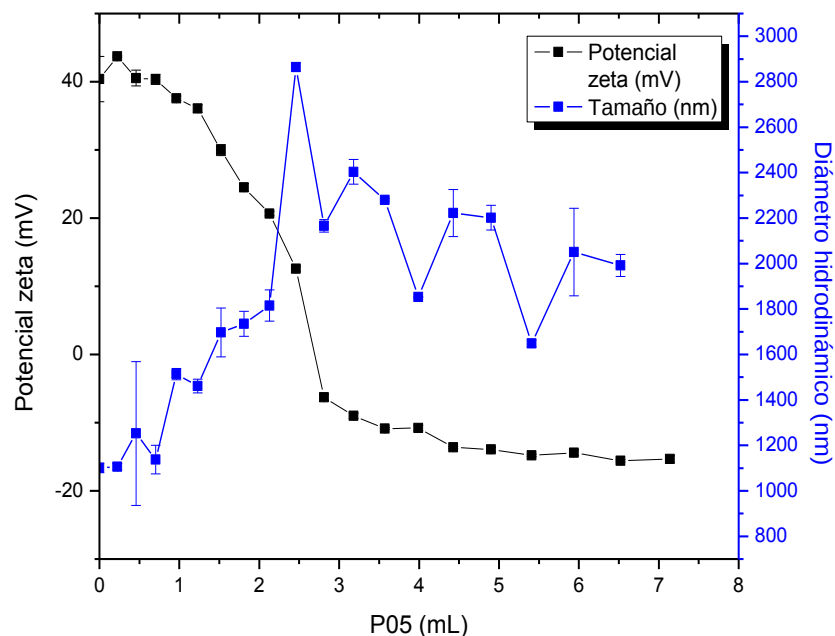


Figura 6. Evolución del ζ y diámetro hidrodinámico conforme el polielectrolito catiónico quitosano (Q) se tituló con el polielectrolito aniónico pectina de tejocote accesión 05 (P₀₅).

La Figura 7, muestra las variaciones del ζ y del d_h de las especies químicas presentes en la dispersión de Q (10 mL, 0.2 mg mL⁻¹) conforme se tituló con P₁₈ (2 mg mL⁻¹). Los comportamientos del ζ y del d_h fueron comparables a aquellos presentados por las mezclas P_c: Q y P₀₅: Q (Figuras. 5 y 6), pudiendo observarse las siguientes zonas: (A) una zona a relaciones de (R_{P18-Q}) relativamente bajas ($\sim 0.25:1 - 2.5:1$), en la que los valores de ζ disminuyeron progresivamente desde alrededor de 37.1 mV hasta 17.5 mV y los valores de d_h aumentaron de ~ 1700 a 5700 nm, como resultado de la formación de CS_{Q:P18}. (B) una zona intermedia a valores de R_{P18-Q} de $\sim 2.6:1$ a 3.6:1, en la que los

valores de ζ disminuyeron drásticamente, en particular en el rango de R_{P18-Q} de 2.6:1 a 3.0:1, cambiando de positivos a negativos, hasta alcanzar un valor de ~ -13.4 mV, acompañado por un aumento considerable del d_h a un valor de ζ de 3.6 mV (formación de CS) y luego una reducción pronunciada de los valores de d_h a partir de valores de ζ de -13.4 mV (formación de CC). Los valores de d_h obtenidos en esta zona presentaron gran variabilidad al igual que en la mezcla Q: P₀₅. El punto isoelectrónico entre P₁₈ y Q ocurrió aproximadamente a una R_{P18-Q} de 2.9 mg de P₁₈ a 1.0 mg de Q. (C) una región a valores de R_{P18-Q} relativamente altos $> 3.6:1$ hasta 7:1, en la que la carga del sistema permaneció casi constante, con valores de ζ de ~ -17.5 mV, indicando que las moléculas de Q se encontraron completamente unidas a moléculas de P₁₈, existiendo un exceso de éstas últimas en el sistema.

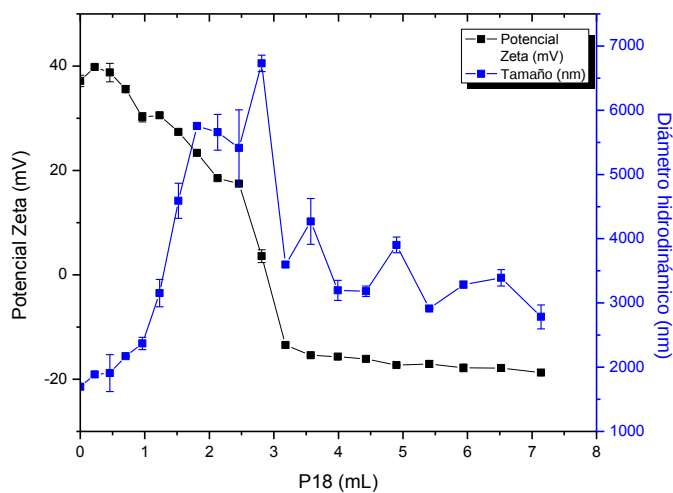


Figura 7. Evolución del ζ y diámetro hidrodinámico conforme el polielectrolito catiónico quitosano (Q) se tituló con el polielectrolito aniónico pectina de tejocote accesión 18 (P₁₈).

Las R_{P-Q} correspondientes al punto de equivalencia o punto isoeléctrico de las mezclas de Q: pectinas a una valor de pH=4.0, variaron de la siguiente manera: Q: P_{05} (2.6:1.0) $\sim P_c$ (2.7:1.0) $< P_{18}$ (2.9:1.0). Diferencias en los valores de R_{P-Q} de equivalencia pueden ser atribuidas a variaciones en la composición química de las pectinas estudiadas. Así por ejemplo, las P_{05} y P_c con GE similares (76.4 y 76.5 %, respectivamente) y contenidos de proteína comparables (2.2 y 2.6 %, respectivamente) presentaron valores de R_{P-Q} de equivalencia similares. Por su parte, la P_{18} con GE=68.5 % y contenido de proteína de 5.4 % exhibió un mayor valor de R_{P-Q} de equivalencia, aun cuando tuvo una mayor proporción de grupos carboxilo libres (-COOH) que de grupos carboxilo esterificados (-COOCH₃), en comparación con P_{05} y P_c . Lo anterior, probablemente debido al mayor contenido de proteína asociada a P_{18} . Al valor de pH de la mezcla, los grupos NH₂ de la proteína asociada a P_{18} pudieron encontrarse como grupos NH₃⁺, los cuales en turno causaron un requerimiento de una mayor cantidad de esta pectina para neutralizar la carga positiva del Q.

6.4. Relación óptima en peso entre quitosano y pectinas para la formación de complejos solubles

La formación de complejos biopoliméricos solubles (CS) se lleva a cabo cuando las interacciones electrostáticas entre sus moléculas son relativamente débiles y la carga neta del complejo resultante es relativamente alta. Por su parte, la formación de complejos coacervados complejos (CC) ocurre cuando las interacciones electrostáticas entre las moléculas de biopolímeros son más

fuertes y la carga neta del complejos formado es baja (McClements *et al.*, 2009). El interés de este trabajo se centró en la obtención de CS, por lo que se determinó la relación R_{P-Q} para cada tipo de pectina, tal que rindiera la máxima formación de CS. Para ello, se midió la absorbancia de dispersiones de pectinas: Q con valores de R_{P-Q} cercanos a aquel que resultó en un valor de $\zeta = 0$, y a partir de los resultados obtenidos, se seleccionó la R_{P-Q} que proporcionó la máxima formación de CS; esto es, aquella que rindió la lectura más elevada de absorbancia. La turbidez de una disolución, medida como absorbancia, es un indicador de los sólidos disueltos presentes y es debida principalmente a la dispersión de la luz de éstas partículas. Ha sido también usada como un indicador de la formación y disociación de complejos proteína-polisacárido (Ramírez-Santiago *et al.*, 2012; Hernández-Marín *et al.*, 2013; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

En las figuras 8 a 10, se muestra la variación de la absorbancia de la disolución de Q (10 mL, 0.2 mg mL^{-1}) al ir aumentando los volúmenes de P (2 mg mL^{-1}) adicionados. Es importante señalar que los mL de P equivalen a mg de P por 1 mg de Q; así, 2 mL de P representan una $R_{P-Q} = 2:1$ (2 mg de P por 1 mg de Q).

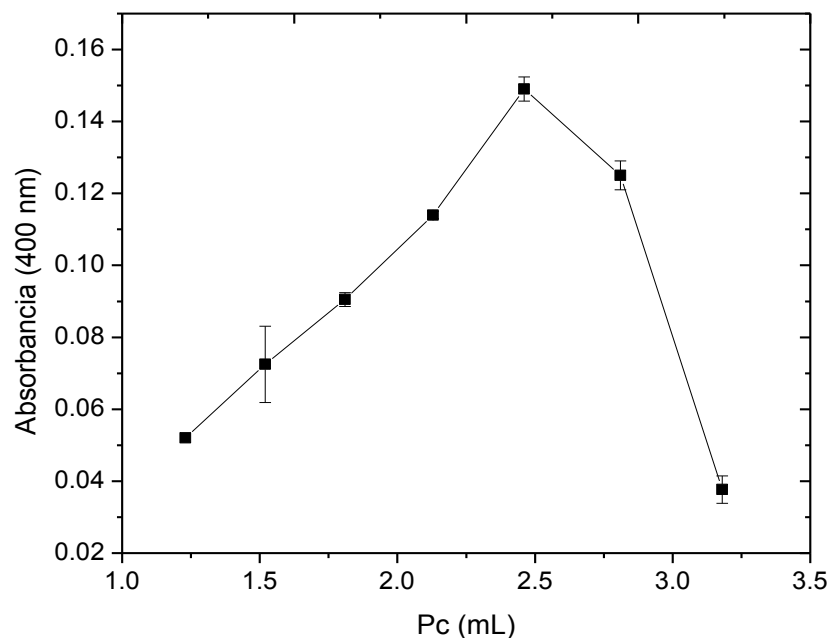


Figura 8. Absorbancia de dispersiones de quitosano (10 mL, 0.2 mg mL⁻¹) adicionadas con distintos volúmenes de pectina cítrica (P_c, 2 mg mL⁻¹) a pH = 4.0.

Todas las curvas de absorbancia versus mL de P, mostraron perfiles similares, de la siguiente manera de izquierda a derecha: conforme se incrementaron los volúmenes y en consecuencia la cantidad de P adicionada a la disolución de Q, en valores menores a la relación R_{P-Q} determinada como de equivalencia, los valores de absorbancia sufrieron aumentos continuos, evidenciando la formación progresiva de CS_{P-Q} y alcanzando una lectura máxima a un determinado volumen de P, dependiendo del tipo de pectina. En esta región ocurre el enlace de moléculas de P a las moléculas de Q; sin embargo, sin embargo, los CS_{P-Q} formados permanecen solubles debido a la neutralización incompleta de las moléculas de Q cargadas positivamente (Espinosa-Andrews

et al., 2013) y donde las lecturas de absorbancia más elevadas indican la óptima formación de CS_{P-Q} . Volúmenes de P superiores a aquellos que rinden la R_{P-Q} de equivalencia, fueron acompañados por la disminución pronunciada de las lecturas de absorbancia, alcanzando éstos valores cercanos a 0. Lo anterior, puede explicarse por la agregación continua de los CS_{P-Q} en complejos insolubles CC_{P-Q} , los cuales precipitaron. En esta región existió una relación más balanceada entre las moléculas de Q cargadas positivamente y las moléculas de P cargadas negativamente, desarrollándose la neutralización de sus cargas con la consecuente separación de fases; una rica en CC_{P-Q} y la otra rica en disolvente (Ramírez-Santiago *et al.*, 2012).

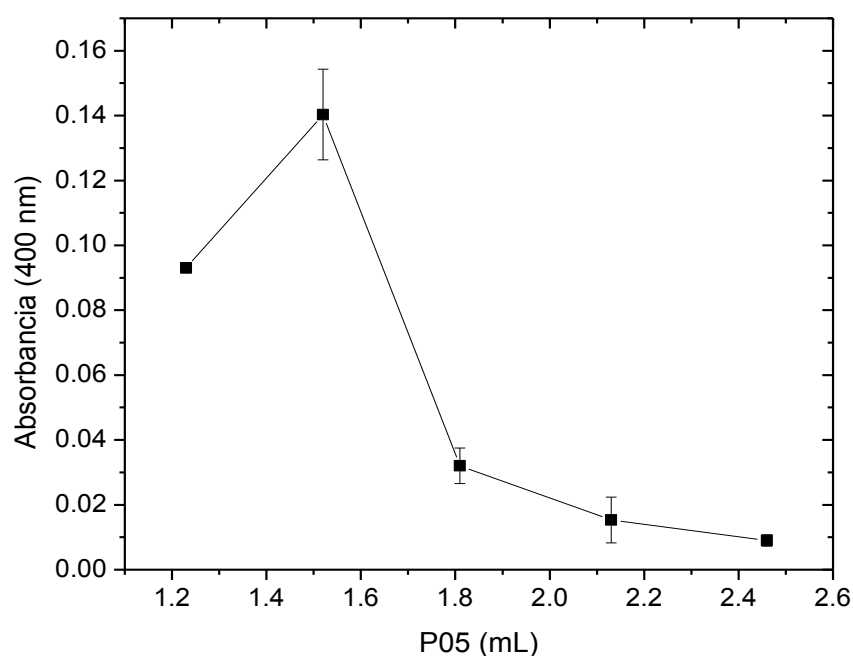


Figura 9. Absorbancia de dispersiones de quitosano (10 mL, 0.2 mg mL⁻¹) adicionadas con distintos volúmenes de pectina de tejocote accesión 05 (P₀₅, 2 mg mL⁻¹) a pH = 4.0.

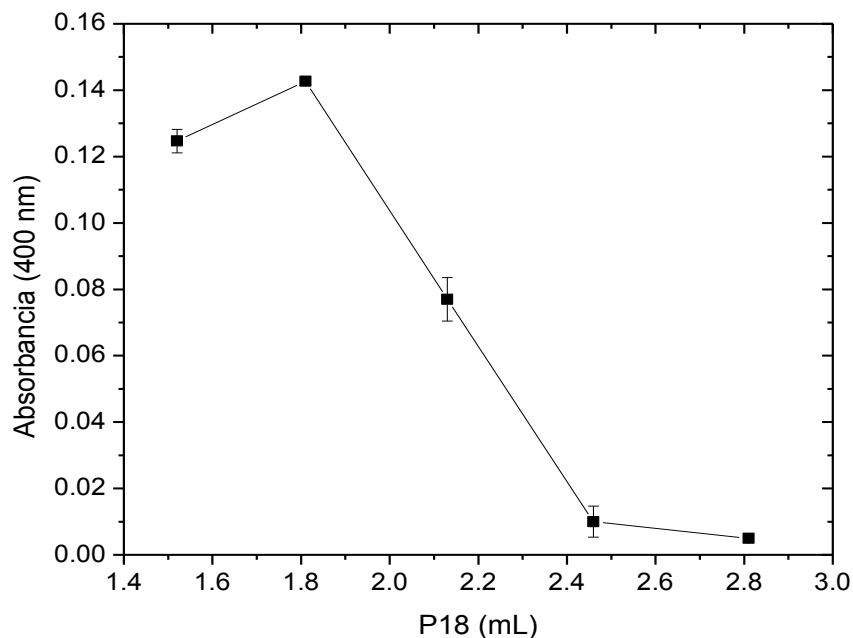


Figura 10. Absorbancia de dispersiones de quitosano (10 mL, 0.2 mg mL⁻¹) adicionadas con distintos volúmenes de pectina de tejocote accesión 18 (P₁₈, 2 mg mL⁻¹) a pH = 4.0.

Las R_{P-Q} de las distintas mezclas P:Q que rindieron las máximas lecturas de absorbancia relacionadas con la máxima formación de CS_{P-Q} fueron: P_c:Q (2.5:1.0), P₀₅:Q (1.5:1.0) y P₁₈:Q (1.8:1.0). Los valores de d_h de los CS_{P-Q} variaron de la siguiente forma: CS_{P18-Q} (751.1 ± 16.5 nm) = CS_{P05-Q} (796.8 ± 19.49 nm) < CS_{Pc-Q} (950.5 ± 19.1 nm).

6.5. Morfología de las gotas de aceite y distribución de tamaño de las partículas de las emulsiones

En la Figura 11, se presentan las micrografías ópticas de las E_{Pc-Q} (a), E_{P05-Q} (b) y E_{P18-Q} (c), pudiendo observar que todas ellas estuvieron constituidas por gotas

de aceite de forma esférica, tamaño relativamente variable, y rodeadas por un halo, atribuido a los distintos CS usados para su formación y estabilización.

Aun cuando en todas las E se observa cierto grado de floculación, éste es más pronunciado entre las gotas de aceite de las E_{P05-Q} y E_{P18-Q} , apareciendo gotas de tamaño similar floculadas, así como pequeñas gotas unidas a la superficie de las gotas más grandes, fenómeno que pudo generarse después del proceso de homogenización (Bonilla *et al.*, 2012). Es importante señalar que las gotas de aceite formando agregados en las E_{P05-Q} y E_{P18-Q} conservaron su individualidad, lo cual se corrobora al no observarse la presencia de gotas demasiado grandes, como resultado del fenómeno de coalescencia. Estos resultados parecen indicar una mayor interconectividad entre los CS_{P05-Q} y CS_{P18-Q} adsorbidos a la superficie de las gotas vecinas, en comparación con la interconexión entre gotas de aceite de la E_{PC-Q} a través de interacciones entre los CS_{PC-Q} . La inspección visual de las micrografías de las E, reveló que la gran mayoría de las gotas de aceite mostraron valores de diámetro lineal ($d_{1,0}$) menores de $10\ \mu\text{m}$ y solamente algunas de ellas alcanzaron valores ligeramente mayores. En adición se observa una tendencia de variación del tamaño de las gotas de aceite de las E en el siguiente orden ascendente: $E_{PC-Q} < E_{P18-Q} < E_{P05-Q}$.

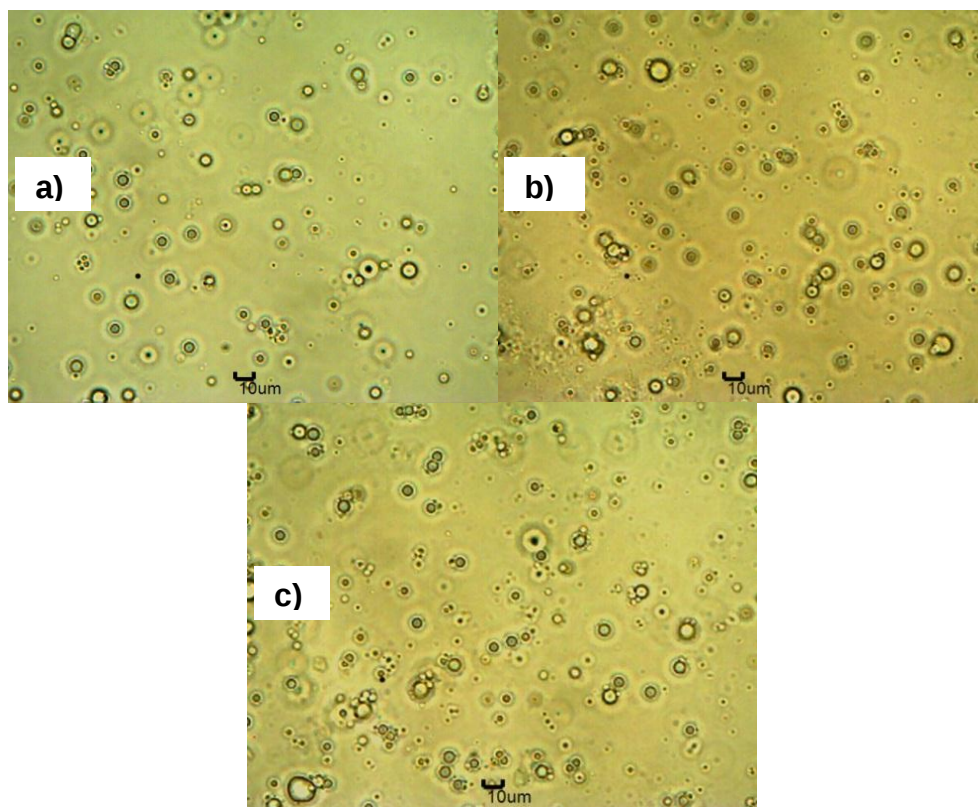


Figura 11. Microfotografías ópticas de las emulsiones: (a) E_{PC-Q} , (b) E_{P05-Q} y (c) E_{P18-Q} . PC: pectina cítrica, P_{05} : pectina de tejocote accesión 05 y P_{18} : pectina de tejocote accesión 18, Q: quitosano.

Debido a que el tamaño de gota de una emulsión tiene un gran impacto sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales, como apariencia, sabor, textura y estabilidad (McClements, 2009), se determinó el diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$) de las partículas presentes en las E, entre las que se encontraron las gotas de aceite. En la figura 12 se muestra el diagrama de distribución de tamaño de las partículas conformando las distintas E, pudiendo observar que ésta varió con el tipo de CS_{P-Q} usado para su formación y estabilización. Sin embargo, en forma general puede apreciarse que todas las

E exhibieron la presencia de distintos picos correspondientes a volúmenes variables de partículas con tamaños diferentes; de izquierda a derecha: (a) 2 μm , (b) 20 μm sólo para la E_{P05} , (c) 100 μm y (d) 400 μm . El volumen máximo de partículas para todas las E se encontró en un rango de diámetro volumétrico superficial ($d_{3,2}$) de 0.5 μm (límite de detección del equipo) hasta alrededor de 35 μm para las E_{PC-Q} , 17 μm para E_{P18-Q} y 8 μm E_{P05-Q} . Cabe señalar que ésta última también presentó un volumen importante de partículas con un máximo correspondiente a 20 μm . Los volúmenes de partículas en este rango de tamaño para las distintas E varió de la siguiente forma: $E_{P05-Q} < E_{P18-Q} < E_{PC-Q}$, por lo que puede inferirse que la E_{PC-Q} fue la que estuvo constituida por una mayor cantidad de partículas pequeñas (con valores de $d_{3,2} \leq 35 \mu\text{m}$). Al considerar la microfotografías de las E (Figura 11), puede inferirse que las partículas que se encontraron en el rango de tamaño más pequeño fueron las gotas de aceite de las E.

El pico de volumen de partículas correspondiente a un valor cercano a 100 μm , muy probablemente está relacionado con la presencia de agregados de gotas de aceite floculadas, rodeadas por CS, siendo más evidente su existencia en las E_{PC-05} y E_{P18-Q} , en comparación con las E_{PC-Q} , resultados acordes con lo observado en la Figura 11. Finalmente, el pico de volumen a 400 μm puede ser atribuido a la presencia de agregados de CS dispersos en la fase acuosa dispersante, los cuales después de ser sometidos a sonicación presentaron valores de d_h entre 751.1 a 950.5 nm.

Los valores medios de $d_{3,2}$ de las E_{PC} y E_{P18} ($3.37 \pm 0.21 \mu m$ y $3.74 \pm 0.25 \mu m$, respectivamente) fueron similares ($p > 0.05$) y significativamente menores a aquel de la E_{P05} ($4.69 \pm 0.03 \mu m$). El rango de valores de $d_{3,2}$ de las E obtenidas se encuentra en aquel informado por Vargas *et al.* (2011) para películas comestibles estabilizadas con quitosano y utilizando ácido oleico como fase oleosa de la emulsión ($0.4-10 \mu m$). Por otro lado, Bonilla *et al.* (2012) obtuvo valores de $5-9 \mu m$, para emulsiones incorporadas con aceites esenciales de orégano y tomillo en una fase continua de quitosano.

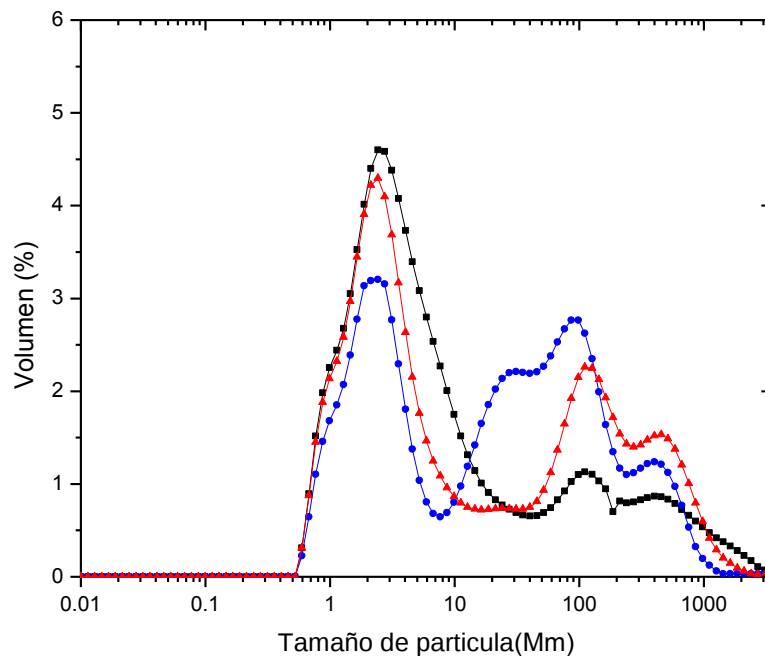


Figura 12. Distribución del tamaño de las partículas presentes en las emulsiones: (■) E_{PC-Q} , (●) E_{P05-Q} , y (▲) E_{P18-Q} . P_C : pectina cítrica, P_{05} : pectina de tejocote accesión 05 y P_{18} : pectina de tejocote accesión 18, Q: quitosano.

Al considerar los resultados en términos tanto del perfil de distribución de tamaño como de los valores de $d_{3,2}$ de las gotas de aceite de las E, puede

inferirse que la habilidad emulsificante de los CS varió en orden ascendente de la siguiente manera: $CS_{P05} < CS_{P18-Q} < CS_{PC-Q}$. Puesto que la pectina es el componente de los CS que exhibe capacidad emulsificante, variaciones en la capacidad emulsificante de los CS pueden ser explicados con base en el tipo y proporción de pectina acomplejada con el Q. Se ha informado que el peso molecular, el contenido de proteína y el grado de esterificación (GE) influyen significativamente en las propiedades emulsificantes de las pectinas. Las pectinas con bajo peso molecular, alto grado de esterificación y elevado contenido de proteína rinden emulsiones con mejores tamaños de gota y perfil de distribución de tamaño (Leroux *et al.*, 2003). Los valores de GE de las P_C y P_{05} (76.5 y 76.4 %, respectivamente), fueron significativamente mayores que los de la P_{18} (68.5 %). Los contenidos de proteína variaron de la siguiente manera P_{18} (5.5 %) > P_C (2.6 %) > P_{05} (2.2 %). El elevado GE y moderado contenido de proteína de la P_C pudieron impartirle mejor capacidad emulsificante que aquel presentado por el resto de las pectinas. Leroux *et al.* (2003) encontraron que la fracción “activa” de pectina adsorbida en la superficie de las gotas de aceite, muestra un aumento significativo en proteína y grupos carboxilos esterificados. Lo anterior, relacionado con el carácter anfifílico de la proteína y el carácter no polar o hidrófobo de los grupos carboxilo esterificados. Por su parte, la P_{18} , presentó una capacidad emulsificante intermedia debido a su elevado contenido en proteína, el cual fue contrarrestado por su bajo GE. Finalmente, la P_{05} , tuvo un elevado GE, pero el más bajo contenido de proteína. Cabe señalar además que la capacidad emulsificante de los CS_{P-Q} también pudo ser afectada por la relación en peso P-Q (W_{P-Q}) usada para su formación,

la cual varió de la siguiente manera: $W_{PC-Q} (2.5:1) > W_{P18-Q} (1.8:1) > W_{P05-Q} (1.5:1)$. La disponibilidad de más moléculas con capacidad para adsorberse sobre la superficie de las gotas de aceite, generará repulsiones estérica y electrostática mayores entre gotas, las cuales en turno, incrementaran la estabilidad de estos sistemas (Neiryneck *et al.*, 2007).

6.6. Propiedades de flujo de las emulsiones

La aplicación de esfuerzos cortantes provoca modificaciones en la organización macromolecular de sistemas dispersos, a través de la ruptura de unidades estructurales por la acción de fuerzas hidrodinámicas y proporciona información sobre el arreglo estructural de estos sistemas (Rao, 1999). Los perfiles de viscosidad aparente (η_{ap}) versus tasa de corte para las distintas E se muestran en la Figura 13, pudiendo observar que todas las E presentaron perfiles similares, caracterizados por una región newtoniana a bajas tasas de corte y una región adelgazante al corte a tasas de corte relativamente altas. En la región newtoniana, a tasas de corte muy pequeñas, del orden de hasta 0.07 s^{-1} , las E sufrieron en su estructura, de manera equilibrada, la ruptura de enlaces y la formación de otros; por lo que no se produjo un cambio neto en su organización molecular y los valores de η_{ap} permanecen prácticamente constantes. A tasas de corte relativamente altas (de alrededor de 0.1 a 1000 s^{-1}), la ruptura de enlaces estructurales predomina sobre la formación de nuevas estructuras, lo que causa la alineación de las moléculas en dirección al flujo y la disminución progresiva y pronunciada de la η_{ap} (Murillo *et al.*, 2011). Este último comportamiento se denomina como adelgazante al corte o pseudoplástico, y es

característico de emulsiones floculadas y fluidos poliméricos (Sittikijyothin *et al.*, 2013).

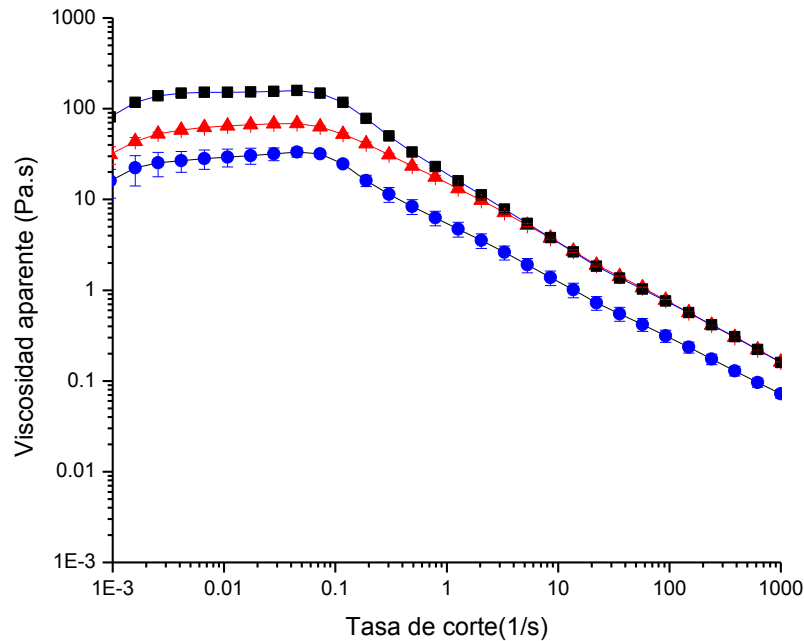


Figura 13. Cambios en la viscosidad aparente como función de la tasa de corte de las emulsiones (●) E_{P05-Q} ; (▲) E_{P18-Q} ; (■) E_{PC-Q} . P_C : pectina cítrica, PT_{05} : pectina de tejocote accesión 05 y PT_{18} : pectina de tejocote accesión 18, Q: quitosano.

Los valores de η_{ap} de las E en el espectro de tasa de corte estudiado (Figura 13), difirieron dependiendo del CS utilizado para su formación, variando de las siguiente forma en orden creciente: $E_{P05-Q} < E_{P18-Q} < E_{PC-Q}$. Es interesante notar que los valores de η_{ap} de las E_{P18-Q} y E_{PC-Q} se igualaron en el rango de tasa de corte de ~ 1 a 1000 s^{-1} , lo cual indica que su nivel de estructuración, bajo esas tasa de corte, fue similar.

El modelo que ajustó mejor los datos de η_{ap} como función de la tasa de corte fue el de Ellis con una $R^2 = 0.84$ a 0.93 (Ecuación 10) (Darby, 1996):

$$\eta_{ap} = \frac{\eta_0}{[1+(\lambda\dot{\gamma})^2]} p^a \quad (10)$$

Donde: η_{ap} es la viscosidad aparente; η_0 es una viscosidad limitante a bajo corte; λ es un tiempo constante asociado al tiempo de relajación de los polímeros; $\dot{\gamma}$ = tasa de corte y p = índice de adelgazamiento al corte.

Los valores de la ecuación de Ellis para las E variaron significativamente dependiendo del CS_{P-Q} usado para su formación (Cuadro 2).

Cuadro 2. Parámetros reológicos de curvas de flujo de las emulsiones.

Código de la emulsión	η_0 (Pa.s)	λ (s)	p
E _{PC-Q}	142.580±5.656 ^a	14.108±0.057 ^a	0.364±0.0013 ^a
E _{P05-Q}	40.020±10.762 ^b	15.091±2.673 ^a	0.331±0.0001 ^b
E _{P18-Q}	57.075±1.774 ^b	7.074±0.951 ^b	0.332±0.0033 ^b

PC: pectina cítrica, PT₀₅: pectina de tejocote accesión 05 y PT₁₈: pectina de tejocote accesión 18, Q: quitosano. Misma letra por columna, no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los sistemas dispersos descritos por el modelo de Ellis poseen una viscosidad estructural (η_0), caracterizada por un flujo newtoniano a bajas tasas de corte, atribuida a la formación de una estructura reversible o en estado de reposo (Darby, 1996). La variación de los valores de η_0 de las emulsiones siguió el siguiente orden: E_{PC-Q} > E_{P18-Q} = E_{P05-Q}. Los valores más elevados de η_0 exhibidos por la E_{PC-Q} sugieren la existencia de mayor número de interacciones

entre los CS_{PC-Q} de gotas de aceite adyacentes, en comparación con las presentes entre los CS_{P18-Q} y CS_{P05-Q} de gotas adyacentes en las E_{P18-Q} y E_{P05-Q} (Murillo *et al.*, 2011). Los datos de $d_{3,2}$ y la distribución de tamaño de las E, indicaron la existencia de un mayor número de gotas de aceite por unidad de volumen en la E_{PC-Q} , respecto a aquellos presentes en las E_{P18-Q} y E_{P05-Q} ; lo anterior, evidenciado por un menor valor medio de $d_{3,2}$ y un mayor volumen de partículas en el rango de 0.5 a 35 μm en la E_{PC-Q} . El valor número de gotas presentes en ésta última E, al parecer favoreció las interacciones entre gotas de aceite vecinas.

Los valores de λ de las E_{PC-Q} y E_{P05-Q} fueron similares ($p > 0.05$) y más elevados que aquel mostrado por la E_{P18-Q} (Cuadro 2). Bajos valores de λ han sido relacionados con menores tiempos de recuperación de la estructura de las emulsiones dobles (Murillo *et al.*, 2011) al ser sometidos sus enlaces estructurales a deformación y estiramiento (Steffe, 1996). Los valores de p de las E no difirieron significativamente y todos fueron menores a la unidad, evidenciando el carácter pseudoplástico de las E.

Diferencias en los valores de los parámetros de flujo de las E, indican que los CS_{P-Q} contribuyeron de distinta manera a su estructura; mientras que el CS_{PC-Q} contribuyó a la formación de una estructura inicial con mayor consistencia y resistencia a fluir, el CS_{P18-Q} proporcionó una estructura con capacidad de recuperación en tiempos menores. En la conformación estructural de las E y en consecuencia en sus propiedades de flujo, participaron dos tipos de partículas: agregados de CS_{P-Q} y gotas de aceite (partículas de relleno), en cuya superficie

se encontraron adsorbidos parte de los CS_{P-Q} . Lo anterior, puede causar el entrecruzamiento entre diferentes agregados de CS_{P-Q} en la fase acuosa y también entre aquellos adsorbidos en la interfase aceite-agua (Chen *et al.*, 2000). Así, los resultados sugieren que la presencia de gotas de aceite pequeñas en la E_{P-C-Q} , favoreció su interconexión rindiendo valores elevados de η_0 ; mientras que el entrecruzamiento entre los agregados CS_{P18-Q} , mostró una mejor capacidad de recuperación bajo la aplicación de un esfuerzo cortante.

6.7. Propiedades viscoelásticas de las emulsiones

Los valores del módulo de almacenamiento (G') como función de la deformación, indicaron que la zona de comportamiento viscoelástico lineal de las E ocurrió a 1Hz de frecuencia, hasta un máximo de % de deformación de: 1.6 para la E_{P05-Q} , 2.3 para la E_{P-C-Q} y 2.8 % para la E_{P18-Q} (figura no mostrada). Todas las E presentaron comportamiento viscoelástico a 1 % de deformación, por lo que las E se sometieron a barridos de frecuencia aplicando este % de deformación. Los rangos de deformación en los cuales las E exhibieron comportamiento viscoelástico lineal; esto es, independencia de los valores de G' respecto a la deformación, pueden ser indicativos de las fuerzas intermoleculares que participan en sus arreglos estructurales (Lobato-Calleros *et al.*, 2009).

Las variaciones de G' y el módulo de pérdida de las E son mostradas en la Figura 14. Los valores de G' de las E representan una medida de su naturaleza elástica y los valores de G'' representan una medida de su naturaleza viscosa

(Lobato-Calleros *et al.*, 2009). Independientemente del tipo de E, ambos módulos presentaron dependencia significativa de la frecuencia, incrementando conforme la frecuencia aumentó; sin embargo, se observaron diferencias en el comportamiento de G' y G'' en el rango de frecuencia estudiado, de acuerdo al tipo de pectina formando parte del CS_{P-Q} usado en la preparación.

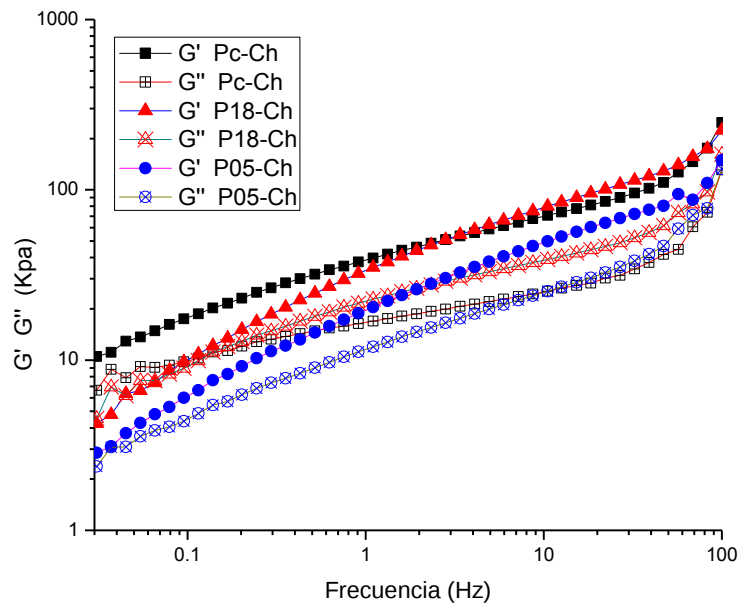


Figura 14. Variación de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de las emulsiones, como función de la frecuencia. (●) E_{P05-Q} ; (▲) E_{P18-Q} y (■) E_{PC-Q} . P_C : pectina cítrica, PT_{05} : pectina de tejocote accesión 05 y PT_{18} : pectina de tejocote accesión 18, Q: quitosano.

Mientras que la E_{PC-Q} exhibió valores de $G' > G''$ en todo el rango de frecuencia estudiado, las E_{P05-Q} y E_{P18-Q} tendieron a exhibir un comportamiento más complejo. Así, la E_{PT18-Q} mostró valores de $G'' > G'$ a frecuencias muy bajas (de hasta alrededor de 0.06 Hz), los cuales tendieron a ser muy cercanos hasta

frecuencias de 0.15 Hz; finalmente, a frecuencias muy elevadas los valores de G' fueron mayores que aquellos de G'' . Por su parte, la E_{P05-Q} exhibió valores de G' y G'' muy similares a frecuencias bajas (hasta alrededor de 0.05 Hz) y valores de $G' > G''$ a frecuencias muy elevadas. Las variaciones de los valores de G' y G'' , indican que mientras la E_{PC-Q} presentó un comportamiento predominantemente elástico en todo el rango de frecuencia estudiado, las E_{P05} y E_{P18-Q} tuvieron un comportamiento global más sólido que líquido, presentando una región a bajas frecuencias en las que los valores de G' y G'' fueron muy similares o los valores de G'' fueron mayores que aquellos de G' . Esto es, tendieron a mostrar un aumento en su carácter sólido conforme incrementó la frecuencia, comportamiento que puede ser el resultado de entrecruzamientos moleculares en su estructura (Rodríguez-González *et al.*, 2004).

La información proporcionada por los barridos de frecuencia puede ser utilizada para caracterizar o clasificar una dispersión. Las cuatro clasificaciones más comunes son: soluciones diluidas, solución concentrada o sistema de red enmarañada, gel débil y gel fuerte. En una dilución diluida, los valores de G'' son mayores que aquellos de G' en todo el rango de frecuencia, a pesar de que ambos módulos se aproximan a frecuencias muy altas. En un sistema de red enmarañada, los valores de G'' y G' se intersectan a la mitad del rango de frecuencia, indicando una clara tendencia a un mayor comportamiento viscoelástico sólido a altas frecuencias (Ross-Murphy, 1984; Steffe, 1996). Por su parte, los geles débiles presentan valores de G' mayores que aquellos de G'' , encontrándose estos módulos casi paralelos uno respecto a otro. Los geles

fuertes exhiben valores de G' mayores que aquellos de G'' ; sin embargo, G' tiene una pendiente cercana a 0 y G'' presenta un mínimo a frecuencias intermedias (Clark y Ross-Murphy, 1987).

Puesto que las E, en general, presentaron valores de G' mayores que aquellos de G'' (Cuadro 3), pueden ser clasificados como geles débiles, los cuales estuvieron conformados por gotas de aceite inmersas en una red tridimensional biopolimérica, formada por los CS_{P-Q}.

Cuadro 3. Valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de las emulsiones a 1Hz de frecuencia (medias $\pm$ DE).

Emulsión	G' (Kpa)	G'' (Kpa)
E _{Pc-Q}	20.166 $\pm$ 1.476 ^a	10.916 $\pm$ 0.585 ^a
E _{P05-Q}	12.150 $\pm$ 1.300 ^b	11.023 $\pm$ 1.045 ^a
EP _{18-Q}	7.516 $\pm$ 0.809 ^c	5.346 $\pm$ 0.434 ^b

^{a,b,c}. superíndices distintos en una misma columna indican que las medias difieren significativamente (P = 0.05).

6.8. Caracterización de las películas comestibles

6.8.1. Color

En productos alimenticios, los aspectos sensoriales son esenciales para asegurar que la aplicación de tecnologías emergentes tales como películas (P) y recubrimientos comestibles se conviertan en éxito. Por lo tanto, el color es uno de los parámetros más importantes que debe ser controlado. Las P y recubrimientos comestibles deben de ser incoloros en lo posible, para simular el

aspecto de las películas poliméricas comunes. Los atributos de color son de suma importancia porque influyen directamente en la aceptabilidad del consumidor (Galus y Lenart, 2013). En este sentido, la inspección visual de las películas comestibles P_{PC-Q} reveló una consistencia de textura lisa y transparente, mientras que las P_{P05-Q} y P_{P18-Q} fueron menos claras (opacas) y ligeramente rugosas (granulosidad). El nivel de transparencia diferente de las P obtenidas, pudo estar vinculado a las estructuras desarrolladas durante el proceso de secado, las cuales son influenciadas por la estructura inicial de las E formadoras de película, es decir, por la fracción volumétrica de la fase dispersa y el tamaño de las partículas presentes en el sistema. Durante el secado, se generan cambios en las propiedades del disolvente de la fase continua, provocando coalescencia y cremado de las gotas de aceite, por la eliminación gradual de agua. Al mismo tiempo, la viscosidad de la fase continua aumenta, lo que limita la agregación y el cremado; contribuyendo a garantizar un nivel de dispersión adecuado de los componentes lipídicos de la matriz (Pereda *et al.*, 2012). De esta manera, la menor transparencia de las P_{P05-Q} y P_{P18-Q} , respecto a la correspondiente P_{PC-Q} , podría atribuirse al mayor tamaño de gota y menor tamaño de los CS de las primeras, respecto a los presentados por la P_{PC-Q} . La formación de estructuras tridimensionales relativamente abiertas, interrumpidas por gotas de aceite, ha sido relacionada con una estructura más abierta, especialmente en altas actividades de agua, donde la hidratación también promueve la transparencia de las P resultantes, conforme se incrementa la movilidad molecular (Vargas *et al.*, 2009; Pereda *et al.*, 2012). Además, estos mismos autores, encontraron que la adición de aceite (fase oleosa) promovió

una disminución significativa del índice de blancura de las películas comestibles, lo cual atribuyeron a una absorción selectiva de luz del aceite que impartió la coloración amarilla.

El Cuadro 4 presentan los datos de color de las P elaboradas, pudiendo observar que los valores de luminosidad no difirieron significativamente entre las P_{PC-Q} , P_{05-Q} y P_{P18-Q} . Los valores del ángulo de tono (hue), indicaron que todas las P se encuentran en el rango de los tonos amarillos; sin embargo, la P_{P18-Q} mostró una ligera orientación hacia los tonos rojos, evidenciada por un valor de hue menor, respecto a aquellos presentados por las P_{PC-Q} y P_{P05-Q} . Por otro lado, en saturación de color (croma), las P_{P18-Q} P_{05-Q} mostraron valores más altos ($p \leq 0.05$) que la P_{PC-Q} , es decir, su tonalidad del color rojo fue más intensa, presentando un comportamiento contrario a sus valores de luminosidad. Las variaciones en los valores de croma pudieron a diferencias en el tamaño gota de la fase dispersa, es decir a mayor tamaño de gota mayor croma, lo cual promueve la opacidad en función de las diferencias en el índice de refracción de dicha fase (Pereda *et al.*, 2012).

Cuadro 4. Valores de color: Luminosidad (L^*), a^* y b^* , Hue (ángulo de tono) y croma (saturación de color) de películas comestibles.

Código de película	L^*	a^*	b^*	Hue	Croma
P_{PC-Q}	75.6 ± 1.2^a	-3.4 ± 0.5^a	12.6 ± 1.7^a	105.4 ± 0.2^a	13.0 ± 1.9^b
P_{P05-Q}	72.9 ± 2.6^a	-3.4 ± 0.5^{ab}	14.6 ± 0.2^a	103.0 ± 1.6^a	15.0 ± 0.3^a
P_{P18-Q}	72.3 ± 1.6^a	-2.1 ± 0.4^b	15.2 ± 1.1^a	98.0 ± 0.8^b	15.3 ± 1.2^a

Superíndices distintos en una columna indican que las medias difieren significativamente ($p < 0.05$). P_C : pectina cítrica, PT_{05} : pectina de tejocote accesión 05 y PT_{18} : pectina de tejocote accesión 18, Q: quitosano.

6.8.2. Espesor, permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas de las películas comestibles

En el Cuadro 5, puede observarse que el espesor de las P_{PC-Q} , P_{P05-Q} y P_{P18-Q} fue similar ($p > 0.05$); resultados esperados debido al control que se tuvo sobre el diámetro y la cantidad de muestra (10 g) que se utilizó para el secados de las E.

Los valores de permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las P fueron significativamente afectados por el tipo de pectina que formó parte del CS_{P-Q} usado en su preparación (Cuadro 5). Los valores de PVA de las P variaron de la siguiente manera: $P_{P18-Q} < P_{PC-Q} < P_{P05-Q}$. A partir de los valores de $d_{3,2}$ de las E formadoras de película ($E_{PC-Q} < E_{P18-Q} < E_{P05-Q}$), se esperaba que los menores valores de PVA los presentara la P_{PC-Q} , seguida por la P_{P18-Q} y P_{P05-Q} , debido a

que una disminución en el tamaño de gotas de las E, generalmente disminuye la tasa de transferencia de agua a través de la película (Bonilla *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos, posiblemente se deban a diferencias en las interacciones entre las moléculas biopoliméricas conformando los distintos CS_{P-Q} a través de la estructura de estos sistemas.

Cuadro 5. Espesor, permeabilidad al vapor de agua (PVA), esfuerzo tensil y % de elongación al corte de las películas comestibles.

Código de película	Espesor (mm)	PVA (10^{-11}) ($\text{g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$)	ET (Mpa)	EC (%)
Pc-Q	0.219±0.00198 ^a	1.19 ± 0.2 ^{-12b}	0.108±0.00 ^a	19.50±4.9 ^a
P05-Q	0.215±0.00014 ^a	1.54 ± 0.03 ^c	0.268±0.01 ^b	34.93±4.3 ^b
P18-Q	0.213±0.01410 ^a	0.79 ± 0.08 ^a	0.307±0.03 ^b	32.10±1.2 ^b

PVA: permeabilidad al vapor de agua, RT: esfuerzo tensil y E: % de elongación al corte. Superíndices distintos en una columna indican que las medias difieren significativamente ($p < 0.05$). P_C: pectina cítrica, PT₀₅: pectina de tejocote accesión 05, PT₁₈: pectina de tejocote accesión 18 y Q: quitosano.

La evaporación de agua durante el proceso de secado de las P, promueve la floculación de las gotas de lípido, las interacciones estéricas y el incremento de las interacciones entre los complejos biopoliméricos que las conforman (Vargas *et al.*, 2009). El bajo valor de PVA de la P_{P18-Q}, sugiere que la pérdida de agua en la E_{P18-Q} provocó un acercamiento de las gotas y con ello, un incremento en

las interacciones entre los CS_{P18-Q} adsorbidos sobre la superficie de las gotas adyacentes, así como la interacción entre CS_{P18-Q} superficiales con aquellos presentes en la fase continua. Lo anterior resulta en la formación de una matriz polimérica compacta, amorfa, aumentando el factor de tortuosidad para la transferencia de agua en la matriz continua de la película, lo que disminuye la tasa de transferencia de masa a través de ella, contribuyendo a la disminución del PVA (Bonilla *et al.*, 2012; Medeiros *et al.*, 2012). Los valores de PVA indican que las interacciones biopoliméricas en la P_{P18-Q} fueron más intensa que aquellas generadas en las P_{PC-Q} y P_{P05-Q}.

Cabe señalar que los valores de PVA obtenidos en las P_{P-Q} son inferiores a los obtenidos por Fajardo *et al.* (2010) de 8.60×10^{-11} a 8.95×10^{-11} g (m.s.Pa)⁻¹, para películas comestibles de quitosano, conteniendo natamicina. Lo anterior, indica que la incorporación de gotas de emulsión estabilizadas con CS_{P-Q} confirieron un carácter menor polar a la matriz de las P, con la consecuente disminución de los valores de PVA.

Las propiedades mecánicas de películas de biopolímeros a menudo se determinan en términos de esfuerzo tensil (ET) y % de elongación al corte (EC). El ET cuantifica la resistencia mecánica de las películas debida a fuerzas de cohesión entre las cadenas de los compuestos que las conforman; mientras que EC mide su plasticidad, que es la capacidad de una película para extenderse antes de romperse (Galus y Lenart, 2013).

Debido a su naturaleza estructural; por lo general, las P con alta resistencia mecánica (FT), muestran bajos porcentajes de EC. Los valores de FT y EC de las películas fueron afectados significativamente por el tipo de pectina formando parte del CS_{P-Q}, usado para su preparación (Cuadro 5). Los valores de FT variaron de la siguiente forma: $P_{PC-Q} < P_{P05-Q} = P_{P18-Q}$, pudiendo inferirse que la incorporación de pectina de tejocote a estos sistemas, reforzó la red o matriz polimérica. La variación de los valores de EC de las P, corroboraron la afirmación anterior, siendo los valores de EC para las P_{P05-Q} y P_{P18-Q} similares ($p > 0.05$) y más elevados ($p \leq 0.05$) que aquel correspondiente a la P_{PC-Q}. Los valores de EC de las P obtenidas, fueron acordes a los informados en la literatura (31.3 %) para películas de quitosano con aceite de oliva, utilizando una fracción oleosa del 10 %; sin embargo, los valores de FT obtenidos en estas P fueron superiores (11.1 Mpa) a los obtenidos en nuestro estudio (Pereda *et al.*, 2012).

Existen reportes donde se establece que la adición de una fase lipídica a películas elaboradas a base de quitosano, disminuye sus propiedades mecánicas, debido a que se induce una discontinuidad en la matriz de quitosano por las gotas de aceite, provocando una pérdida de cohesión y resistencia mecánica (Bonilla *et al.*, 2012). Sin embargo, la utilización de CS_{P-Q} puede moderar esa pérdida de cohesión y resistencia mecánica, reforzando la estructura. Especialmente, este efecto se observó en las P_{P18-Q} y P_{P05-Q}, las cuales muy probablemente presentaron asociaciones intermoleculares más fuertes que las generadas en la P_{PC-Q}, provocando ello que las primeras

presentaran una estructuración mayor y más regular en su red interna que la segunda, al generar un mayor número de interconexiones entre los CS_{P-Q} adsorbidos sobre la superficie de las gotas y con aquellos presentes en la fase dispersante. Lo anterior, provoca que las P se vuelvan menos frágiles y que presenten valores de ET y EC relativamente elevados, como sucedió con las P_{P18-Q} y P_{P05-Q} . Entre estas últimas P, los valores de PVA señalaron que el arreglo estructural de la P_{P18-Q} fue más ordenado y homogéneo que aquel generado en la P_{P05-Q} , proporcionando una red estructurada con menor PVA.

7. CONCLUSIONES

Las pectinas extraídas de las accesiones de tejocote ATEX05 (P_{05}) y ACC18 (P_{18}), mostraron grados de esterificación (GE) de 76.4 y 68.5 %, respectivamente, y contenidos de proteína de 2.2 y 5.5 %; mientras que la pectina cítrica (P_C), usada como testigo, presentó un GE de 76.5 % y un contenido de proteína de 2.6 %.

La óptima formación de complejos solubles pectina-quitosano (CS_{P-Q}), se obtuvo a un valor de pH de 4.0 y relaciones en peso entre las distintas pectinas y el quitosano (P: Q) de: 2.5: 1.0 (CS_{P_C-Q}), 1.8: 1.0 ($CS_{P_{18}-Q}$) y 1.5 : 1.0 ($CS_{P_{05}-Q}$). El diámetro hidrodinámico de los complejos varió de la siguiente forma: $CS_{P_{05}-Q}$ (716 nm) < $CS_{P_{18}-Q}$ (751 nm) < CS_{P_C-Q} (950 nm).

Los valores de diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$) de emulsiones (E) aceite-en-agua formadas y estabilizadas con los CS_{P-Q} , varió de la siguiente manera: E_{P_C-Q} (3.4 μm) = $E_{P_{18}-Q}$ (3.7 μm) < $E_{P_{05}-Q}$ (4.7 μm); resultados que muestran un mejor poder emulsionante de las pectinas cítrica (P_C) y ACC18 (P_{18}), respecto a aquel de la pectina ATEX05 (P_{05}).

Todas las E exhibieron perfiles de viscosidad aparente-tasa de corte típicos de fluidos adelgazantes al corte y propiedades viscoelásticas con carácter elástico dominante e indicativas de la formación de estructuras correspondientes a las de geles débiles.

Los valores de esfuerzo tensil, % de elongación al corte y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas comestibles (P) preparadas a partir de las E, fueron afectados por el tipo de pectina formando parte del CS. Las P_{P18-Q} y P_{P05-Q} presentaron valores más altos de fuerza tensil y % de elongación que la P_{PC-Q} . Por su parte, P_{P18-Q} fue la que mostró valores más bajos de PVA.

8. BIBLIOGRAFÍA

- + AOAC. (1995) *Association of Official Analytical Chemists*, 16a. ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- + Aguirre, M. E. (2010). Caracterización de pectinas de tejocote (*Crataegus* spp.) Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Méx. México. 69p.
- + Atkins, P. W. (1994). *Physical Chemistry*. 5a. ed. Oxford: Oxford University Press.
- + Baeva, M., Panchev, I. (2005) Investigation of the retaining effect of a pectin-containing edible film upon the crumb ageing of dietetic sucrose-free sponge cake. *Food Chemistry*, 92: 343-348.
- + Bengoechea, C., Jones, O. G., Guerrero, A., McClements, D. J. (2011). Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. *Food Hydrocolloids*, 25: 1227-1232.
- + Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2012). Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 26: 9-16.

- ✚ Bósquez-Molina, E., Guerrero-Legarreta, M. I., Vernon-Carter, E. J. (2003). Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum-candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Research International*, 36: 885-893.
- ✚ Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.L., Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? A Review. *International Journal of Pharmaceutics*, 436: 359-378.
- ✚ Campanella, O. H., Dorward, N. M., Singh, H. (1995). A study of the rheological properties of concentrated food emulsions. *Journal of Food Engineering*, 25: 427-440.
- ✚ Chen, J., Dickinson, E., Langton, M., Hermansson, A. M. (2000). Mechanical properties and microstructure of heat-set whey protein emulsion gels: effect of emulsifiers. *LWT-Food Science and Technology*, 33: 299-307.
- ✚ Cissé, M., Montet, D., Loiseau, G., Noelle, M., Collin, D. (2012). Influence of the concentrations of chitosan and glycerol on edible film properties showed by response surface methodology. *Journal and Polymer Environment*, 20: 830-837.
- ✚ Clark, A. H., Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83: 57-192.
- ✚ Darby, R. (1996). *Chemical Engineering Fluid Mechanics*. Nueva York: Marcel Dekker, Inc.

- ✚ Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Pittia, P. (2011). Interfacial behavior and antioxidant efficiency of olive phenolic compounds in O/W olive oil emulsions as affected by surface active agent type. *Food Biophysics*, 6: 295-302.
- ✚ Dickinson, E. (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, 6: 1-11.
- ✚ Dimzon, I. K. D., Ebert, J., Knepper T. P. (2013). The interaction of chitosan and olive oil: Effects of degree of deacetylation and degree of polymerization. *Carbohydrate Polymers*, 92: 564-570.
- ✚ Durango, A., Soares, N., Andrade, N. (2006). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 17: 336–341.
- ✚ Elsabee, M. Z., Abdou, E. S., Nagy, K. S. A., Eweis, M. (2008). Surface modification of polypropylene films by chitosan and chitosan/pectin multilayer. *Carbohydrate Polymer*, 71: 187-195.
- ✚ Erickson, D., Li, D., Werner, C. (2000). An Improved Method of Determining the ζ -Potential and Surface Conductance. *Journal of Colloid and Interface Science*, 232: 186-197.
- ✚ Espinosa-Andrews, H., Enríquez-Ramírez, K. E., García-Márquez, E., Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J. (2013). Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. *Carbohydrate Polymers*, 95: 161-166.
- ✚ Fajardo, P., Martins, J. T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., Vicente, A. A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as

carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101: 349-356.

- ✚ Fennema, O.R. (1996). *Food Chemistry*, 3a. ed. Nueva York: Marcel Dekker.
- ✚ Ferreira, C. O., Nunes, C. A., Delgadillo, I., Lopes-da-Silva, J. A. (2009). Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. *Food Research International*, 42: 807-813.
- ✚ Gao, P., Zhu, Z., Zhang, P. (2013). Effects of chitosan–glucose complex coating on postharvest quality and shelf life of table grapes. *Carbohydrate Polymers*, 95: 371-378.
- ✚ Galus, S., Lenart, A. (2013). Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering*, 115: 459-465.
- ✚ Gennadios, A., Weller, C. L., Gooding, C. H. (1994). Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21: 395–409.
- ✚ Giancone, T., Torrieri, E., Di Pierro, P., Mariniello, L., Moresi, M., Porta, R. (2008). Role of constituents on the network formation of hydrocolloid edible films. *Journal of Food Engineering*, 89:195–203.
- ✚ Granda-Restrepo, D. M., Soto-Valdez, H., Peralta, E., Troncoso-Rojas, R., Vallejo-Córdoba, B., Gámez-Meza, N., Graciano-Verdugo, A. Z. (2009). Migration of α -tocopherol from an active multilayer film into whole milk powder. *Food Research International*, 42: 1396-1402.

- ✚ Guzey, D., McClements, D. J. (2006). Characterization of b-lactoglobulin–chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20: 124–131.
- ✚ Haider, S., Park, S.-Y., Lee, S.-H. (2008). Preparation, swelling and electro-mechano-chemical behaviors of a gelatin–chitosan blend membrane. *Soft Matter*, 4: 485–492.
- ✚ Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. *Journal of Food Engineering*, 119: 181-187.
- ✚ Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D. J., Vernon-Carter, E. J. (2014). Lactobacillus plantarum protection by entrapment in whey protein isolate: κ -carrageenan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 36: 181-188.
- ✚ Hiemenz, P. C. (1986). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. New York: Dekker.
- ✚ Israelachvili, J.N. (1992). *Intermolecular and Surface Forces*. Londres: Academic Press.
- ✚ Jones, O. G., Handschin, S., Adamcik, J., Harnau, L., Bolisetty, S., Mezzenga, R. (2011). Complexation of β -lactoglobulin fibrils and sulfated polysaccharides. *Biomacromolecules*, 12: 3056-3065.

- ✚ Joye, D. D., Luzzi, G. A. (2000). Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH. *Carbohydrate Polymers*, 43: 337–342.
- ✚ Kester, J. J., Fennema, O. (1989). Resistance of lipid films to water vapor transmission. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 66: 1139-1146.
- ✚ Kim, Y., Yoo, Y. H., Kim, K. O., Park, J. B., Yoo, S. H. (2008) Textural properties of gelling system of low-methoxyl pectins produced by demethoxylating reaction of pectin methyl esterase. *Journal Food Science*, 75: 367-372.
- ✚ Klassen, D. R., Elmer, C. M., Nickerson, M. T. (2011). Associative phase separation involving canola protein isolate with both sulphated and carboxylated polysaccharides. *Food Chemistry*, 126: 1094-1101.
- ✚ Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (1993). *Principles of Biochemistry*, 2a. ed., Nueva York: Worth Publishers.
- ✚ Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17: 455-462.
- ✚ Li, T., Li, S., Wang, N., Liu, J. (2008). Physicochemical properties and partial structural features of haw pectin. *European Food Research and Technology*, 227: 1035-1041.
- ✚ Liu, S., Masliyah, J. H. (1996). Rheology of suspensions. En: *Suspensions: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*. Cap. 3. Schramm, L. L., Ed. Washington, D. C.: American Chemical Society.

- ✚ Lobato-Calleros, C., Recillas-Mota, M. T., Espinosa-Solares, T., Álvarez-Ramírez, J., Vernon-Carter, E. J. (2009). Microstructural and rheological properties of low-fat stirred yoghurts made with skim milk and multiple emulsions. *Journal of Texture Studies*, 40: 657-675.
- ✚ Ma, W., Tang, C. H., Yin, S. W., Yang, X. Q., Wang, Q., Liu, F., Wei, Z. H. (2012). Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. *Food Research International*, 49: 572-579.
- ✚ Macosko, C. W. (1994). *Rheology: Principles, Measurements and Applications*. Nueva York: VCH Publishers
- ✚ Malvern Instruments. (2011). Zeta potential: An introduction in 30 minutes. Technical Note. Accesado: 10/12/2013.
<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zeta%20potential%20>
- ✚ Matsakidou, A., Biliaderis, C.G., Kiosseoglou, V. (2013). Preparation and characterization of composite sodium caseinate edible films incorporating naturally emulsified oil bodies. *Food Hydrocolloids*, 30: 232-240.
- ✚ McClements, D. J. (1999). *Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques*. Florida, EUA, Boca Raton: CRC Press.
- ✚ McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49: 577-606.
- ✚ McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R., Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58: 899-903.

- ✚ Medeiros, B. G. de S., Pinheiro, A. C., Carneiro-da-Cunha, M. G., Vicente, A. A. (2012). Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan – Evaluation of its gas barrier properties and application on ‘Tommy Atkins’ mangoes. *Journal of Food Engineering*, 110: 457-464.
- ✚ Monahan, F. J., McClements, D. J., German, J. B. (1996). Disulfide-mediated polymerization reactions and physical properties of heated WPI-stabilized emulsions. *Journal of Food Science*, 61 (3): 504-509.
- ✚ Morillon, V., Debeaufort, F., Bond, G., Capelle, M., Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid –based edible films: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (1):67–89.
- ✚ Mosca, M., Cuomo, F., Lopez, F., Ceglie, A. (2013). Role of emulsifier layer, antioxidants and radical initiators in the oxidation of olive oil-in-water emulsions. *Food Research International*, 50: 377-383.
- ✚ Murillo, M. M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez-Férez, A., Vernon-Carter, E. J. (2011). Designing W1/OW2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 25: 577-585.
- ✚ Neiryneck, N., Van der Meeren, P., Lukaszewicz-Lausecker, M., Cocquyt, J., Verbeken, D., Dewettinck, K. (2007). Influence of pH and biopolymer ratio on whey protein–pectin interactions in aqueous solutions and in OW emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 298: 99–107.

- ✚ Nieto-Ángel, R. (2007). Colección, conservación y caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). En: *Frutales Nativos, Un recurso Fitogenético de México*. (pp. 25-107). (R. Nieto Ángel, ed). Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Méx. México.
- ✚ Nordby, M. H., Kjøniksen, A. L., Nystrom, B., Roots, J. (2003). Thermoreversible gelation of aqueous mixture of pectin and chitosan. *Rheology. Biomacromolecules*, 4: 337-343.
- ✚ Pereda, M., Amica, G., Marcovich, N.E. (2012). Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydrate Polymers*, 87: 1318-1325.
- ✚ Pereda, M., Aranguren, M. I., Marcovich, N. E. (2008). Characterization of chitosan/caseinate films. *Journal of Applied Polymer Science*, 107: 1080–1090.
- ✚ Pérez, E. P. J., Xian, D. W., Avena Bustillos, R. J., Ferreira, S. N. F., McHugh, T. H. (2013). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*: 1-10.
- ✚ Perez-Gago, M. B., Krochta, J. (2001). Lipid particle size effect on the water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 996-1002.
- ✚ Phipps, J. B., O'kennon, R. J., Lence, R. W. (2003). Hawthorns and Medlars. *Plant Collector Guide*. Royal Horticultural Society. Portland: Timber Press.

- ✚ Ponce, A. G., Roura, S. I., Del valle, C. E., Moreira, M. R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 294-300.
- ✚ Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., Du, Y. (2006) Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 63: 367-374.
- ✚ Rao, M. (1999). *Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- ✚ Rao, M. A. (1995). Rheological properties of fluid foods. En: *Engineering Properties of Foods*, 2a. ed. (M. A. Rao, S. S. H. Rizvi, eds.). Nueva York: Marcel Dekker.
- ✚ Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., Vernon-Carter, E. J. (2012). Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced-fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate. *Dairy Science and Technology*, 92: 383-398.
- ✚ Rezvani, E., Schleining, G., Sümen, G., Taherian, A. R. (2013). Assessment of physical and mechanical properties of sodium caseinate and stearic acid based film-forming emulsions and edible films. *Journal of Food Engineering*, 116: 598-605.
- ✚ Rodriguez-Gonzalez, F. J., Ramsay, B. A., Favis, B. D. (2004). Rheological and thermal properties of thermoplastic starch with high glycerol content. *Carbohydrate Polymers*, 58: 139-147.

- ✚ Ross-Murphy, S. B. (1984). Rheological methods. En: *Biophysical Methods in Food Research*. (pp. 138-199) (H. W. S. Chan, ed.). Palo Alto CA: Blackwell.
- ✚ Saucedo-Pompa, S., Rojas-Molina, R., Aguilera-Carbó, A. F., Saenz-Galindo, A., De la Garza, H., Jasso-Cantú, D., Aguilar, C. N. (2009). Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International*, 42: 511-515.
- ✚ Schatz, C., Viton, C., Delair, T., Pichot, C., Domard, A. (2003) Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution. *Biomacromolecules* 4: 641-648.
- ✚ Shaw, N. B., Monahan, F. J., O’Riordan, E. D. y O’Sullivan, M. (2002). Physical Properties of WPI films Plasticized with Glycerol, Xylitol or Sorbitol. *Journal of Food. Science*, 67: 164-167.
- ✚ Singthong, J.; Steve, W. C.; Ningsanond, S.; Douglas, G. H. (2004). Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 58: 391-400.
- ✚ Sittikijyothin, W., Torres, D., Goncalves, M. P. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18: 272–282
- ✚ Steffe, J. F. 1996. *Rheological methods in food process engineering*. Michigan: East Lansing: Freeman Press.
- ✚ Stone, A. K., Cheung, L., Chang, C., Nickerson, M. T. (2013). Formation and functionality of soluble and insoluble electrostatic complexes within

mixtures of canola protein isolate and (κ -, ι - and λ -type) carrageenan.

Food Research International, 54: 195-202.

- ✚ Tadros, T. F. (1994). Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91: 39-55.
- ✚ Tharanathan, N. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science and Technology* 14: 71-78.
- ✚ Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González, M. C. (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23: 536-547.
- ✚ Vargas, M., Perdonés, A., Chiralt, A., Cháfer, M., González, M. C. (2011). Effect of homogenization conditions on physicochemical properties of chitosan-based film-forming dispersions and films. *Food Hydrocolloids*, 25: 1158-1164.
- ✚ Vivar-Vera, M. A., Salazar-Montoya, J. A., Calva-Calva, G., Ramos-Ramírez, E. G. (2007). Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 40: 278-284.
- ✚ Walstra, P. (2003). Physical chemistry of food. En: *Polymers* (pp.179–187) (P. Walstra, ed.). Nueva York: Marcel Dekker, Inc.
- ✚ Yáñez, F. J., González, M. M. G. and Jaime, F. M. (2007). Estudio preliminar para la obtención de un extracto pectínico de cáscara de xoconostle. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 16: 60-61.

- ✚ Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B., Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry*, 100: 1356-1364.
- ✚ Yapo, B. M. (2009). Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Research International*, 42: 1197-1202.