

RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE CASEINATO SÓDICO CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

MASTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

Regina Sánchez Villanueva

Pau Talens Oliag

M^a José Fabra Rovira

E.T.S.I.A.

RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE CASEINATO SÓDICO CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Sánchez-Villanueva, R.; Fabra, M.J.; Talens, P*.

RESUMEN

En este artículo se estudia el efecto de la adición de antioxidantes en las propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua, oxígeno y hexanal de films a base de caseinato sódico, así como en sus propiedades ópticas y estructurales. En concreto, el estudio compara la influencia del tipo de antioxidante (ácido ferúlico y vitamina E) y su concentración (20, 40 y 60 mg antioxidante/g proteína) en las propiedades físico-químicas de los films. Los resultados ponen de manifiesto que las propiedades mecánicas dependen del tipo de antioxidante pero no de la concentración. Por otro lado, la permeabilidad al vapor de agua también depende del tipo de antioxidante, observándose una disminución de la misma con la adición de ácido ferúlico, tanto mayor cuanto mayor es la concentración del mismo. Sin embargo, no se observan diferencias significativas respecto al film control con la adición de vitamina E. Respecto a la permeabilidad al oxígeno y al hexanal, se pone de manifiesto la efectividad de ambas sustancias como compuestos antioxidantes, siendo dicho efecto directamente proporcional a la concentración de antioxidante, y más marcado en el caso del ácido ferúlico.

Finalmente, en cuanto a las propiedades ópticas y estructurales, se puede afirmar que existe una correlación entre ellas; y que dependen del tipo de antioxidante y de su concentración, produciendo la adición de antioxidantes una disminución de la transparencia y el brillo, así como un aumento de la rugosidad respecto al film control (sin antioxidantes).

Palabras clave: caseinato sódico, ácido ferúlico, vitamina E, actividad antioxidante.

RESUM

Aquest article estudia l'efecte de la adició d'antioxidants en les propietats mecàniques, de permeabilitat al vapor d'aigua, a l'oxigen i a l'hexanal de films a base de caseinat sòdic, així com en les seues propietats òptiques i estructurals. Concretament, l'estudi compara la influència de dos tipus d'antioxidants (àcid ferúlic i vitamina E) i la concentració utilitzada (20, 40 i 60 mg antioxidant/g proteïna) en les propietats físico-químiques dels films. Els resultats mostren que les propietats mecàniques depenen del tipus de antioxidant, però no de la seua concentració. En relació a la permeabilitat al vapor d'aigua s'observa que aquesta depèn del tipus d'antioxidant utilitzat en la formulació. La incorporació d'àcid ferúlic provoca una disminució de la permeabilitat al vapor d'aigua, tant major quant major és la concentració de l'àcid. En canvi, la incorporació vitamina E no modifica la permeabilitat al

vapor d'aigua respecte als films control. Respecte a la permeabilitat a l'oxigen i a l'hexanal, es manifesta l'efectivitat de les dues substàncies com a compostos antioxidants, seient aquest efecte directament proporcional a la concentració de antioxidant, i més notable per a l'àcid ferúlic. Finalment, s'observa una bona correlació entre les propietats òptiques i estructurals. L'adició d'antioxidants produeix una disminució de la transparència i el brillo, així com un augment de la rugositat respecte al film control.

Paraules clau: caseïnat sòdic, àcid ferúlic, vitamina E, activitat antioxidant.

ABSTRACT

This work analyses the effect of antioxidant addition on tensile properties, water vapour, oxygen and hexanal permeability of sodium caseinate based films. Optical and structural properties have been also studied. Specifically, the study compares the effect of the kind of antioxidant (ferulic acid or vitamin E) and its concentration (20, 40 and 60 mg antioxidant/g protein) on physico-chemical properties of films. From the results obtained, tensile properties depend on the kind of antioxidant but not on its concentration. Moreover, water vapour permeability (WVP) also depends on the kind of antioxidant, decreasing WVP values as ferulic acid content increases in the film formulation. However, α -tocopherol addition does not modify significantly water barrier properties of control films. Taking into account oxygen and hexanal permeability, both ferulic acid and Vitamin E act as antioxidants compounds (the greater the ferulic acid/ α -tocopherol content, the greater the antioxidant effect), being ferulic acid the most effective. Finally, good correlation has been established between optical and structural properties and both depend on the kind and concentration of the antioxidant compounds. Control film shows the greatest transparency and gloss, whereas antioxidant compounds imparts opacity and loss of gloss to the film, due to the formation of greater roughness to film.

Keywords: sodium caseinate, ferulic acid, Vitamin E, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Los films y recubrimientos comestibles constituyen, actualmente, una técnica de conservación de alimentos muy empleada por la industria alimentaria. Un film o recubrimiento comestible es una delgada capa de material protector que envuelve a un alimento y que puede ser consumida como parte del mismo. Los films han ido adquiriendo mayor relevancia en los últimos años fundamentalmente por dos razones. La primera, que pueden mejorar la calidad de los alimentos debido a su efecto sobre su humedad, permeabilidad a gases, aromas, propiedades barrera y protección actuando sobre sus propiedades mecánicas. La segunda, que son biodegradables y pueden ser ingeridos con el alimento, por lo que reducen la polución de modo muy significativo frente a otros tipos de técnicas de conservación. Los principales materiales formadores de recubrimientos se dividen en tres grupos: proteínas, polisacáridos y lípidos derivados de animales o vegetales. Se puede adicionar a éstos una serie de aditivos tales como plastificantes (alcoholes polhídricos, ceras, aceites, ácidos grasos, etc.), surfactantes y emulsificantes (grasas, aceites, emulsificantes, polietilenglicol, etc.), conservadores químicos (ácido benzoico, benzoato de sodio, ácido sórbico, sorbato de potasio y ácido propiónico), utilizados para impartir propiedades mecánicas, nutricionales y organolépticas a los films o recubrimientos (Guilbert, 1986). En los últimos años está cobrando más fuerza el uso de sustancias antioxidantes y/o antimicrobianas en films comestibles (Cuppet, 1994; Ou et al., 2005; Gómez-Estaca et al., 2009). Las propiedades de cada film o recubrimiento comestible variarán en función de los componentes empleados (Wu et al., 2002).

Entre las proteínas, los caseinatos son muy utilizados, pues poseen una alta calidad nutricional, excelentes propiedades sensoriales y de barrera al vapor de agua. Y entre los plastificantes incorporados, uno de los más utilizados es glicerol ya que presenta una baja masa molecular y alta polaridad. Entre los antioxidantes más empleados se encuentran los compuestos fenólicos tales como el ácido ferúlico.

El ácido ferúlico puede usarse para la conservación de alimentos, tanto por sus propiedades antioxidantes como antimicrobianas. Comenzó a utilizarse en 1975 en Japón, en la conservación de naranjas y para inhibir la autooxidación de aceite de linaza, manteca de cerdo y aceite de soja (Graf, 1992). En la industria alimentaria también tiene múltiples aplicaciones; en USA y muchos países europeos, se seleccionan extractos de hierbas, café, especias, etc. por su alto contenido en ácido ferúlico para aplicación en alimentos (Graf, 1992); también se emplea en la producción de vanillina (Priefert, 2001), en la preparación de alimentos para deportistas (Berning y Steen, 1998; Headley y Massad, 1999); pero fundamentalmente, como conservante.

En comparación con otros compuestos fenólicos, el ácido ferúlico tiene dos ventajas. La primera es que su actividad antioxidante es mayor que la de otros ácidos (Heinonen et al., 1998), la segunda, que se ve mucho menos afectado por cambios de pH que otros compuestos fenólicos (Friedman y Jurgens, 2000). Su actividad antimicrobiana se debe a que puede inhibir el

crecimiento de bacterias, hongos y levaduras, mostrando mayor actividad antifúngica que otros compuestos fenólicos (Lattanzio et al, 1994). Raramente se encuentra en su forma libre, encontrándose normalmente en forma de éster unido a polisacáridos en las paredes celulares, como arabinosilanos en grasas, pectinas en espinacas o caña de azúcar y xiloglucanos en bambú (Iiyama et al., 1994). También puede hallarse unido a proteínas (Figueroa-Espinoza et al., 1999). Esta propiedad de entrecruzamiento del ácido ferúlico con polisacáridos y proteínas, sugiere que puede ser usado en la preparación de geles en aplicaciones alimentarias.

Por otro lado, la vitamina E (α -tocoferol), es un conocido antioxidante liposoluble. Tanto la vitamina E como otros antioxidantes naturales como el β -, γ -, y δ -tocoferol, tiene una amplia utilización como suplementos vitamínicos y como antioxidantes en la industria alimentaria, farmacéutica y de cosméticos (Constantinides et al., 2006; Elliot, 1998; Pszczola, 1998). El principal problema de estas sustancias es su baja solubilidad en agua, lo que hace que su uso sea problemático en alimentos (Tan y Nakajima, 2005). Este problema ha recibido mucha atención por parte de diversos autores y se han ofrecido diferentes alternativas. Una de las alternativas más utilizadas es la nanodispersión (Krause y Muller, 2001), siendo la técnica de emulsificación-evaporación una de las técnicas usadas para preparar dispersiones de nanotamaño (Mehnert y Mader, 2001). En general, el control en los procesos de reducción de tamaño de las partículas, influye en las propiedades de los materiales producidos; siendo muy eficiente la homogeneización de los productos para controlar dicho tamaño. A pesar de esta pequeña dificultad, la vitamina E si que ha sido empleada en la formación de films y recubrimientos comestibles, adicionándola algunos autores en films a base de goma xantana (Mei y Zhao, 2002), caseinato cálcico y proteínas del suero de la leche (Mei y Zhao, 2003), con la intención de mejorar ciertas propiedades de dichos films, como la viscosidad, la permeabilidad al vapor de agua o las propiedades mecánicas; además de para aumentar la ingesta de la vitamina E en la dieta.

El objetivo de este artículo es la adición de dos antioxidantes (ácido ferúlico y vitamina E) a films a base de caseinato sódico para estudiar la influencia tanto del tipo de antioxidante como de su concentración en las propiedades físico-químicas de dichos films. Además del caseinato sódico y los antioxidantes, únicamente se adiciona glicerol como plastificante, para que la presencia de ninguna otra sustancia pudiese enmascarar el efecto de los antioxidantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las formulaciones y obtención de los films

Para la realización del presente estudio, se prepararon siete formulaciones a base de agua destilada, caseinato sódico (Alanate-110, Industrias de Suministros Llorella, S.A.) y glicerol (Panreac Química, S.A,

Castellar del Vallés Barcelona, España). La primera formulación (formulación control) se elaboró disolviendo caseinato sódico al 8% (p/p) en agua destilada e incorporando la cantidad necesaria de glicerol para obtener una relación proteína:plastificante de 1:0.3. Las seis formulaciones restantes se obtuvieron incorporando ácido ferúlico o vitamina E a la disolución acuosa de caseinato sódico y glicerol. Las concentraciones de antioxidante empleadas fueron 20, 40 y 60 mg antioxidante/g proteína. Todas las formulaciones fueron homogenizadas, 1 minuto a 13500 r.p.m. y 3 minutos a 20500 r.p.m. utilizando un ultraturrax a vacío (Janke y Kunkel, Alemania), y desgasificadas con una bomba de vacío (Diaphragm vacuum pump, Wertheim, Alemania) a temperatura ambiente.

Los films se obtuvieron pesando y vertiendo una cantidad controlada de disolución en una placa de teflón de 150 mm de diámetro. Se trabajó manteniendo fija para todas las formulaciones la cantidad de sólidos totales vertidos (2g). Tras el vertido, las muestras se dejaron secar durante 24 horas a una humedad relativa de $45 \pm 2\%$ y a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Tras el secado, los films se despegaron de las placas de teflón y se almacenaron a 25°C y 33% de humedad relativa utilizando una disolución saturada de cloruro magnésico (Panreac química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona, España).

Análisis realizados

ESPESOR DE LOS FILMS

El espesor de los films se determinó en cuatro puntos de los films, antes de los diferentes ensayos, utilizando un micrómetro electrónico digital Palmer ($0-25 \pm 0.001$ mm).

PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS FILMS

Las propiedades mecánicas de los films se determinaron haciendo uso de una prensa universal Stable Micro Systems (SMS) modelo TA.XTplus (Haslemere, Inglaterra) de acuerdo al método estándar ASTM D882-02. Para cada formulación se cortaron muestras rectangulares (25 mm x 100 mm) y se equilibraron al 58% de humedad relativa y $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Los films se montaron en unas pinzas para ensayos de tensión (modelo A/TG, Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra). La separación inicial de las pinzas y la velocidad de elongación del film fueron de 50 mm y $50 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente.

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

La permeabilidad al vapor de agua de los films se determinó a partir de la modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 propuesta por Mc Hugh et al. (1993), para un gradiente de humedad relativa 33-58% y 5°C . Las muestras fueron montadas en una copa de aluminio de 60 mm de diámetro (Payne, elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica). Las

copas de permeabilidad fueron introducidas en un desecador con un ventilador (CPU Y.S.TECH 12V.), con el fin de homogenizar la atmósfera y asegurar una resistencia despreciable en la superficie del film. Finalmente, los desecadores fueron introducidos en una cámara Hotcold-UL, Selecta, mantenida a $5 \pm 1^\circ\text{C}$, realizándose controles de peso de cada copa de permeabilidad.

PERMEABILIDAD AL OXÍGENO

La permeabilidad al oxígeno se midió utilizando una celda de permeabilidad que consta de dos cámaras con diferentes concentraciones de oxígeno. Para asegurar la hermeticidad de cada cámara se utilizó dos anillos de teflón. El oxígeno transferido a través del film, fue barrido con gas helio y analizado con un cromatógrafo de gases (modelo Chrompack CP9000). Las temperaturas del horno, inyector y TCD (detector de conductividad térmica) fueron de 80, 100, y 100°C , respectivamente. El área expuesta fue de 15.9 cm^2 .

PERMEABILIDAD AL HEXANAL

Para la determinación de la permeabilidad al hexanal, se utilizó un método dinámico para medir los flujos de vapor de aroma a través del film. Este equipo fue descrito por Debeaufort y Voilley (1994). Las celdas de permeación estaban compuestas por dos cámaras divididas por el film a estudiar (figura 1).

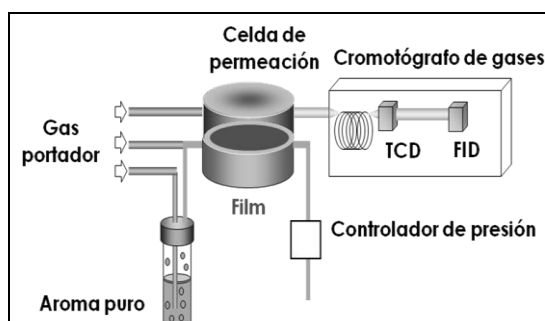


FIGURA 1. Sistema dinámico para medir la permeabilidad al hexanal de los films a base de caseinato sódico.

El área del film expuesta a la transferencia fue de 15.9 cm^2 . Ambas cámaras fueron continuamente barridas por un flujo de 30 mL/min^{-1} de nitrógeno. Las concentraciones de aroma en la fase vapor de la parte superior de la celda fueron obtenidas por la mezcla de dos flujos: uno que contenía el componente volátil y el otro compuesto por nitrógeno seco. Los compuestos volátiles que pasaban a través del films fueron barridos por un flujo de gas portador (N_2) y conducidos a una válvula de inyección automática a través de una columna de transferencia calentada a 190°C para prevenir la adsorción del aroma. Un total de 1 mL de gas portador fue inyectado periódicamente y de forma automática en el cromatógrafo de

gases. Los compuestos volátiles orgánicos fueron analizados con un detector de llama de ionización (FID). La calibración se realizó utilizando soluciones acuosas del aroma (desde 50 ppm hasta el 90% del límite de solubilidad en agua) que fueron inyectadas con una jeringa.

La concentración más alta del aroma en la fase vapor (saturación) fue obtenida burbujeando el gas portador a través del aroma puro a 25°C y presión atmosférica, y estas concentraciones fueron medidas por cromatografía gas-líquido (GLC; Chrompack CP9000, Varian, Francia).

PROPIEDADES ÓPTICAS

La opacidad de los films se determinó aplicando la teoría de Kubelka-Munk de dispersión múltiple a los espectros de reflexión (Hutchings, 1999). Esta teoría se basa en que la luz que incide en un producto traslucido puede ser absorbida o dispersada en función del coeficiente de absorción (K) y el coeficiente de dispersión (S) del material. Las medidas de los espectros de reflexión de las muestras se realizaron sobre un fondo blanco y sobre un fondo negro. En primer lugar, se calculó R_{∞} que es la reflectancia de una lámina infinita de muestra (grosor suficiente para que el fondo no afecte a la medida), a través de las ecuaciones (1) a (3), donde R es la reflectancia de la muestra determinada sobre un fondo blanco de reflectancia conocida, R_g y R_0 es la reflectancia de la muestra determinada sobre un fondo negro ideal.

La transmitancia interna (T_i) de los diferentes films fue evaluada mediante la ecuación (4).

$$R_{\infty} = a - b \quad (1)$$

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

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (3)$$

$$T_i = \sqrt{(a - R_0)^2 - b^2} \quad (4)$$

Los espectros de reflexión sobre fondo blanco y fondo negro se determinaron con un espectrocolorímetro MINOLTA, modelo CM-3600d (Minolta CO. Tokyo, Japón), utilizando como referencia observador 10° e iluminante D65. Las determinaciones se realizaron sobre la cara en que se estableció la interfase líquido-aire durante el secado.

Para la medida del brillo se utilizó un Brillómetro Multi-Gloss 268, MINOLTA y se realizaron las medidas a un ángulo de incidencia de 20, 60 y 85° respecto a la normal sobre un fondo negro.

PROPIEDADES ESTRUCTURALES

La topografía superficial de los films se estudió mediante AFM en un Nanoscope IIIa, Scanning Probe Microscope (Digital Instruments, Veeco

Metrology Group), versión 5.30r2. En cada muestra se realizó un barrido superficial, utilizando el modo tapping, sobre un área de 50x50 µm, con un límite vertical máximo de 6 µm impuesto por el equipo. La imagen tridimensional de la superficie de cada muestra fue analizada por el software incluido en el equipo para cuantificar sus parámetros superficiales. Los parámetros de rugosidad calculados para toda la imagen fueron:

- Rugosidad promedio (R_a): promedio aritmético de los valores absolutos de las desviaciones de las alturas superficiales medido a partir de un plano medio (ecuación 5).

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |Z_j| \quad (5)$$

- Rugosidad media cuadrática (R_q): raíz cuadrada del promedio de las desviaciones de altura desde un plano medio (Z_1) al cuadrado (ecuación 6).

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N Z_j^2}{N}} \quad (6)$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Corp., Rockville, MD). Para discernir entre las medias se utilizó el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95%. Las correlaciones bivariadas de Pearson entre las distintas variables se realizaron usando el programa SPSS 16.0 para Windows V.14.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades mecánicas

La tabla 1 muestra los parámetros mecánicos para el film control y los films que incorporan ácido ferúlico o vitamina E acondicionados a 33% de humedad relativa. El módulo de elasticidad (EM) es una medida de la fuerza que hay que aplicar al film para lograr deformarlo e informa indirectamente de la rigidez del film, la tensión de fractura (TS) es la máxima tensión que puede aplicarse sobre el film antes de provocar su ruptura, y la deformación hasta el punto de fractura (E), es la máxima deformación que el material puede soportar antes de la rotura, y por tanto es una medida de la capacidad para alargarse o estirarse del film. Para evaluar la influencia de los factores tipo de antioxidante y concentración del mismo, se realizó un análisis de varianza factorial utilizando el procedimiento de las menores diferencias

significativas de Fisher (LSD), con un nivel de confianza del 95% para discernir entre las medias.

TABLA 1. Valores de los parámetros mecánicos y de la permeabilidad de los films. Valor medio (desviación estándar).

	mg antioxidante/ g proteína	EM (MPa)	TS (MPa)	E(%)	WVP (g·mm/ kPa·h·m ²)
Control	0	1290 (63) ^a	27.1 (1.6) ^a	3.1 (0.1) ^a	0.61 (0.01) ^a
Ácido Ferúlico	20	1416 (64) ^c	25.3 (1.0) ^a	2.9 (0.2) ^a	0.62 (0.05) ^{ab}
	40	1340 (84) ^c	24.8 (1.2) ^{ab}	3.1 (0.1) ^a	0.52 (0.06) ^{bc}
	60	1276 (66) ^{ac}	23.0 (0.8) ^b	2.9 (0.2) ^a	0.45 (0.05) ^d
Vitamina E	20	1158 (28) ^b	20.7 (0.6) ^c	2.9 (0.1) ^a	0.58 (0.01) ^b
	40	1217 (63) ^{ab}	22.1 (1.0) ^{cb}	2.9 (0.1) ^a	0.55 (0.03) ^{bc}
	60	1116 (52) ^b	20.0 (0.8) ^c	2.9 (0.1) ^a	0.50 (0.07) ^{cd}

a-d: grupos homogéneos para un mismo parámetro

No se observan grandes cambios en los parámetros mecánicos; si bien, el ácido ferúlico aumenta ligeramente la rigidez de los films y la vitamina E proporciona films más elásticos. En cuanto a los resultados obtenidos para el ácido ferúlico, éstos difieren de los encontrados por Marthew y Abraham (2008) en films laminados a base de mezclas de almidón y quitosano, así como Cao et al. (2007) en films a base de gelatina, quienes observaron que la incorporación de ácido ferúlico provoca un aumento en la tensión de fractura y una disminución en la elongación hasta el punto de fractura, probablemente debido a la formación de entrecruzamientos entre el ácido ferúlico y las proteínas o polisacáridos empleados en la formulación. Los resultados obtenidos para la vitamina E, concuerdan con los resultados observados por Mei y Zhao (2003), donde la incorporación de vitamina E en una concentración de 0.2% a films a base de caseinato sódico y proteínas del suero de la leche, aumenta la flexibilidad y elasticidad del film.

Las diferencias encontradas entre ambos antioxidantes sobre las propiedades mecánicas de los films a base de caseinato sódico, podrían atribuirse a que la vitamina E se encuentra en estado líquido, permitiendo fluir más la estructura durante el ensayo de tensión. En cambio, la formación de entrecruzamientos entre el ácido ferúlico y los residuos de aminoácidos de la proteína, hace que el film sea más rígido. En estudios previos en films a base de caseinato sódico se observó que la incorporación de ácido oleico (líquido a temperatura ambiente), mejoró considerablemente la flexibilidad y elasticidad de films a base de caseinato sódico, mientras que la incorporación de ácidos grasos saturados (sólidos a temperatura ambiente) aumentó la rigidez de los films (Fabra et al., 2009a).

Permeabilidad al vapor de agua

La tabla 1 muestra también los valores de permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los films para un gradiente de 33-58% de humedades relativas y 25°C de temperatura. Se observa que aunque ambos antioxidantes reducen

la permeabilidad al vapor de agua, es el ácido ferúlico el que produce un mayor efecto sobre los valores finales, siendo este efecto más significativo al aumentar la cantidad de ácido adicionada al film. Esta reducción en la permeabilidad al vapor de agua podría atribuirse a la presencia de entrecruzamientos entre el ácido ferúlico y los residuos de aminoácidos de la proteína. Algunos autores han reportado varios mecanismos de entrecruzamiento del ácido ferúlico con las proteínas. Primero, el ácido ferúlico es oxidado a quinona y ésta reacciona con aminos de las proteínas. En segundo lugar, el ácido ferúlico puede entrecruzarse con residuos de tirosina u otros aminoácidos a través del mecanismo de radicales libres. Una tercera posibilidad es la esterificación de hidroxil amino ácidos tales como la serina (Ou et al., 2005; Cao et al., 2007). Sin embargo, a pesar de la presencia de estos entrecruzamientos, el efecto de la adición de ácido ferúlico sobre las propiedades barrera al vapor de agua de los films depende de la matriz. Mientras Mathew y Abraham (2008), observaron que la adición de ácido ferúlico disminuye la permeabilidad al vapor de agua de films a base de mezclas de almidón y quitosano, Ou et al. (2005) y Cao et al. (2007) no observaron mejoras significativas en films a base de proteína de soja o gelatina con ácido ferúlico.

A pesar del mayor carácter lipófilo de la vitamina E, ésta no tiene un efecto tan marcado en la disminución de los valores de permeabilidad al vapor de agua de los films a base de caseinato sódico, como el ácido ferúlico. Éste comportamiento podría atribuirse a que la cantidad de vitamina E adicionada es baja y queda dispersa de forma heterogénea en los films, con lo que no les confiere la tortuosidad suficiente como para crear una barrera eficiente a dicha transferencia. Mei y Zhao (2003), observaron que la adición de vitamina E disminuye la permeabilidad al vapor de agua respecto a films a base de caseinato cálcico, pero no a films a base de proteínas del suero de la leche.

Permeabilidad al oxígeno

La tabla 2 muestra los valores de permeabilidad al oxígeno de los films estudiados.

TABLA 2. Valores de permeabilidad al oxígeno de los films. Valor medio (desviación estándar).

Film	mg antioxidante/g proteína	Permeabilidad al oxígeno (cc O ₂ /m·día·kPa)
Control	0	0.055 (0.003) ^a
Ácido Ferúlico	20	0.049 (0.001) ^b
	40	0.046 (0.001) ^b
	60	0.037 (0.003) ^c
Vitamina E	20	0.055 (0.002) ^a
	40	0.048 (0.004) ^b
	60	0.049 (0.002) ^b

a-c: grupos homogéneos para un mismo parámetro

Se observa que la adición de ambos antioxidantes reduce la permeabilidad al oxígeno de los films a base de caseinato sódico, siendo este efecto más significativo al aumentar la cantidad de antioxidante presente en el film. Los resultados ponen de manifiesto la mayor efectividad del ácido ferúlico en comparación con la vitamina E, alcanzándose valores de 0.037cc O₂/m²día-kPa para los films que incorporan 60 mg/g de ácido ferúlico/g proteína. Efectos similares fueron observados en films a base de mezclas de almidón y quitosano (Mathew y Abraham, 2008). Heinonen et al. (1998), mostraron la mayor efectividad del ácido ferúlico frente a otros ácidos tales como el ácido tánico, debido posiblemente a las relaciones de entrecruzamiento que establece el ácido ferúlico con las proteínas, y que le permiten formar una barrera efectiva frente al paso de oxígeno. Por lo que respecta a la vitamina E, ésta también disminuye la permeabilidad al oxígeno respecto a los films control a base de caseinato sódico, sin embargo necesita mayores concentraciones para conseguir el mismo efecto que el ácido ferúlico consigue con concentraciones menores.

Permeabilidad al hexanal

El hexanal es un compuesto aromático fácilmente oxidable, cuya determinación se realiza mediante un método simple y rápido que se utiliza como herramienta para medir el grado de deterioro/oxidación en alimentos con bajo contenido en grasa, principalmente en cereales para desayuno (Fritsch y Gale, 1977). En este estudio, la determinación de la permeabilidad al hexanal es útil para ver la efectividad de los antioxidantes en films a base de caseinato sódico. La tabla 3 muestra los valores de permeabilidad de los distintos films estudiados.

TABLA 3. Valores de permeabilidad al hexanal de los films. Valor medio (desviación estándar).

Film	mg antioxidante/g proteína	Permeabilidad al hexanal (g·mm/Pa·m ² ·sec)
Control	0	0.242 (0.021) ^a
Ácido Ferúlico	20	0.019 (0.008) ^{bd}
	40	0.015 (0.006) ^d
	60	0.017 (0.006) ^d
Vitamina E	20	0.033 (0.003) ^{bc}
	40	0.037 (0.009) ^c
	60	0.042 (0.002) ^c

a-d: grupos homogéneos para un mismo parámetro

Paralelamente a lo observado en la permeabilidad al oxígeno, la permeabilidad al hexanal disminuye significativamente ($\alpha < 0.05$) con la incorporación de compuestos antioxidantes (ácido ferúlico o vitamina E) y esta reducción es más importante para los films que incorporan ácido

ferúlico, si bien, para ambos antioxidantes, la permeabilidad al hexanal es independiente de la concentración de antioxidante presente en el film.

Las diferencias observadas entre ambos antioxidantes podrían atribuirse a los procesos de sorción y difusión implicados en la permeabilidad. En ambos casos, el aroma se adsorbe en el film, pero debido a los entrecruzamientos promovidos por el ácido ferúlico y los residuos de aminoácidos, el hexanal no puede difundirse fácilmente a través del film. En cambio, el mayor carácter lipófilo de la vitamina E y el estado líquido de la misma, facilita la mayor difusión del aroma a través del film, tras la sorción del mismo.

Los resultados de permeabilidad al oxígeno y al hexanal observados, ponen de manifiesto la efectividad del ácido ferúlico y la vitamina E como compuestos antioxidantes en films a base de caseinato sódico.

Propiedades ópticas y estructurales

Las propiedades ópticas más importantes a la hora de evaluar el impacto directo sobre la apreciación del color y aspecto de un producto recubierto son la transparencia u opacidad y el brillo (Hutchings, 1999). Como la habilidad de los materiales para transmitir la luz depende de sus propiedades para absorber y dispersar la luz, el grado de transparencia u opacidad de los films se evaluó a través de la cuantificación del coeficiente K/S y la transmitancia interna (Ti). Valores altos de K/S y Ti se relacionan con una mayor homogeneidad del film y por tanto se corresponden con films más transparentes, mientras que valores bajos de K/S y Ti se relacionan con una mayor heterogeneidad en el film y por tanto con aumentos de opacidad. La figura 2 muestra la curva de distribución espectral de los parámetros K/S y Ti para los films estudiados.

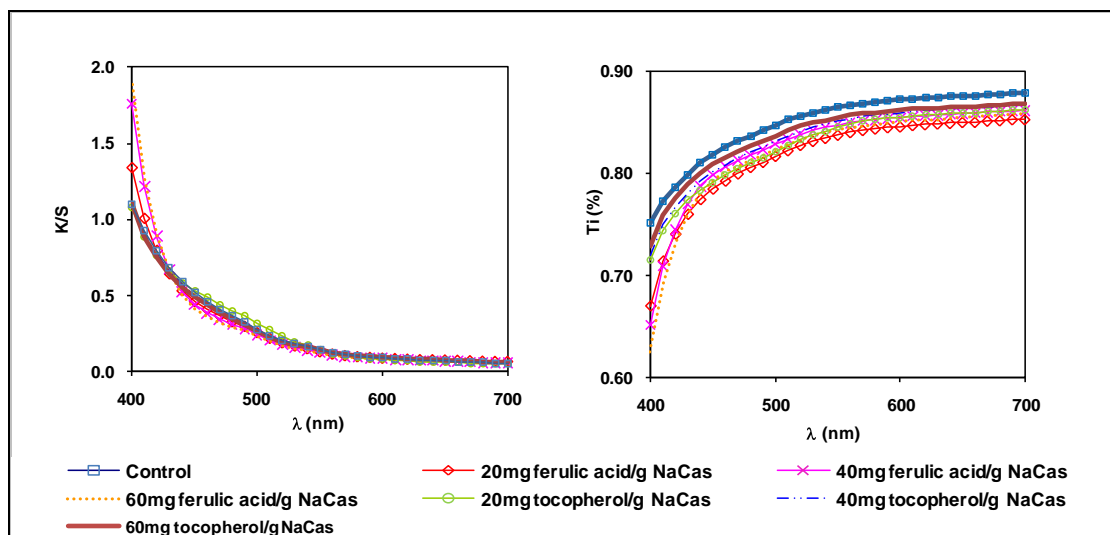


FIGURA 2. Curvas de distribución espectral de los parámetros K/S y Ti para los films estudiados.

En este estudio, las mayores diferencias entre los films vienen determinadas por Ti mientras que no se observan grandes diferencias en los valores de K/S. Se observa que los valores más altos de Ti a las diferentes longitudes de onda se corresponden con el film control (sin antioxidantes), mientras que la incorporación de ácido ferúlico o vitamina E disminuye dichos valores. Estos resultados muestran que de todos los films formulados el film control es el más transparente mientras que la incorporación de antioxidantes confiere una mayor heterogeneidad al film, lo que supone una mayor opacidad. Entre los dos antioxidantes adicionados, el ácido ferúlico es el que presenta valores más bajos de Ti, es decir, films más opacos. Esto es debido posiblemente al diferente estado físico entre ambos, mientras que el ácido ferúlico es en su origen sólido, la vitamina E es líquida a temperatura ambiente. Fabra et al. (2009b), comprobaron este mismo efecto en films a base de caseinato sódico con ácido oleico (líquido a temperatura ambiente) y distintos ácidos grasos saturados (sólidos a temperatura ambiente), donde los films formulados con ácido oleico exhibieron una mayor transparencia. No obstante cabe resaltar que no se observan grandes diferencias en las curvas de distribución para las distintas formulaciones lo que indica que en general su contribución a modificar el color final de un producto recubierto no debería ser muy diferente.

La tabla 4 muestra los valores de brillo para los diferentes films medidos con ángulos de 20, 60 y 85° respecto a la normal. La adición de antioxidantes redujo significativamente ($\alpha < 0.05$) el brillo de los films a base de caseinato. Algunos autores atribuyen la reducción del brillo al aumento en la rugosidad superficial de la matriz como consecuencia de su migración durante el secado de las películas, hacia la superficie de los films (Fabra et al., 2009 a y b).

Por lo que respecta a los films que incorporan ácido ferúlico, el brillo disminuye respecto al film control sin existir diferencias dependientes de la cantidad adicionada del mismo. Por el contrario, en el caso de la vitamina E, ésta disminuye significativamente el brillo respecto al film control alcanzando valores similares ($\alpha > 0.05$) a los films formulados con ácido ferúlico. No obstante, la incorporación de vitamina E a la concentración más alta proporciona films con mayor brillo que el resto de formulaciones que incorporan antioxidantes.

TABLA 4. Valores de brillo 20°, brillo 60°, brillo 85° y de los parámetros de rugosidad de los films estudiados. Valor medio (desviación estándar).

Film	Brillo 20°	Brillo 60°	Brillo 85°	Ra (μm)	Rq (μm)
Control	16 (5) ^a	63 (11) ^a	51 (6) ^a	9.6 (1.4) ^a	12.5 (1.5) ^a
F1	3.5 (1.9) ^c	29 (8) ^{cd}	31 (13) ^a	32 (3) ^b	52 (3) ^b
F2	5.1 (4.4) ^c	29 (9) ^c	29 (11) ^b	34 (4) ^b	54 (2) ^b
F3	5.1 (4.3) ^c	30 (11) ^c	28 (14) ^b	42 (3) ^c	54 (4) ^b
E1	1.9 (0.9) ^c	18 (1) ^d	24 (6) ^b	40 (2) ^{cd}	50 (2) ^{bc}
E2	2.4 (0.9) ^c	28 (15) ^{cd}	29 (22) ^b	35 (2) ^{bd}	42 (2) ^c
E3	9.2 (2.7) ^b	45 (7) ^b	47 (15) ^b	12 (3) ^a	26 (7) ^d

a-d: grupos homogéneos para un mismo parámetro

La tabla 4 muestra también los datos de rugosidad superficial correspondiente a una sección de 50x50 μm de los distintos films estudiados. La caracterización cuantitativa de la textura superficial de los films se realizó mediante el cálculo de la rugosidad promedio (Ra), que es uno de los estadísticos más comúnmente utilizados en la industria para este tipo de cuantificaciones (De Chiffre et al., 2000; Verran et al., 2001), y la rugosidad media cuadrática (Rq). En general, la presencia del compuesto antioxidante provoca un aumento de la rugosidad de los films, siendo este efecto más significativo en el caso de los films que incorporan ácido ferúlico, pero sin observarse diferencias significativas entre las distintas concentraciones del mismo. La adición de vitamina E aumenta la rugosidad superficial de los films, aunque ésta parece disminuir al aumentar la concentración de antioxidante. Este comportamiento es coherente con el aumento de los valores de brillo y transmitancia interna al aumentar la concentración de vitamina E en el film.

Con el fin de profundizar en el estudio de estas relaciones se realizó un análisis cuantitativo por el procedimiento de correlaciones bivariadas utilizando el software SPSS para Windows V.14.0 entre los parámetros obtenidos de la caracterización cuantitativa de la textura superficial de los films (rugosidad promedio, rugosidad media cuadrática y factor de rugosidad) y los parámetros de brillo a 20, 60 y 85°. La tabla 5 muestra la matriz de correlación bivariada obtenida, en la que el coeficiente de correlación de Pearson indica el grado de correlación lineal entre las variables.

TABLA 5. Correlación bivariada de Pearson entre las propiedades estructurales y ópticas.

	Brillo 20°	Brillo 60°	Brillo 85°	Ra (μm)	Rq (μm)
Brillo 20°	1	0.980 ^(**)	0.927 ^(**)	-0.872 ^(*)	-0.881 ^(**)
Brillo 60°		1	0.959 ^(**)	-0.907 ^(**)	-0.913 ^(**)
Brillo 85°			1	-0.982 ^(**)	-0.937 ^(**)
Ra (μm)				1	0.928 ^(**)
Rq (μm)					1

(**) La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral)

(*) La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral)

Ra: Rugosidad promedio

Rq: Rugosidad media cuadrática

Se observan unas relaciones indirectas significativas entre el brillo y la rugosidad (los valores de brillo disminuyen cuando la rugosidad aumenta), y también son significativas las correlaciones entre el brillo a los tres ángulos, aunque el coeficiente de correlación del ángulo a 85° respecto a los otros dos es menor.

CONCLUSIONES

Este trabajo pone de manifiesto el efecto antioxidante del ácido ferúlico y vitamina E en films base de caseinato sódico. Los resultados de permeabilidad al oxígeno y hexanal muestran que la acción del ácido ferúlico es dependiente de la concentración (mayor cuanto mayor es la concentración) mientras que el efecto de la vitamina E no depende de la concentración adicionada en el film. De ambos compuestos, el ácido ferúlico ejerce un mayor efecto antioxidante. El posible entrecruzamiento del ácido ferúlico con los residuos de aminoácidos de la proteína contribuye a aumentar las propiedades barrera al vapor de agua de los films a base de caseinato sódico, aumentando a su vez la rigidez de los films. Existe una correlación significativa entre los parámetros estructurales y las propiedades ópticas del film. La adición de ambos antioxidantes, especialmente el ácido ferúlico, implica una mayor opacidad y menor brillo con respecto al film control, consecuencia de una estructura más rugosa que da lugar a una mayor dispersión de luz. Mientras que al aumentar la concentración de ácido ferúlico aumenta la rugosidad y opacidad del film, la vitamina E ejerce un efecto contrario (a mayor concentración de vitamina E, menor rugosidad y mayor transparencia y brillo). En cualquier caso, no se observan grandes diferencias por lo que su contribución a modificar el color final de un producto recubierto no debería ser muy diferente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco nuevamente a Pau su confianza depositada en mí para la realización de esta tesina, así como su apoyo y calidad como director del trabajo. A M^a José, gracias por tu gran ayuda y dedicación, y por lo sencillo que ha sido trabajar contigo, tanto a nivel de trabajo como personal. A Rocío y a Jordi, por compartir este año conmigo; y por supuesto, por el interés que han mostrado, a mis amigos, a Luis Miguel, y a mi familia.

REFERENCIAS

- ASTM (2002). Standard methods for tensile properties of thin plastic sheeting. En: Annual book of American Standard Testing Methods. D882-46T. Nueva York. Pa:ASTM.
- Berning, J.R. y Steen, S.N. (1998). Nutrition for sport and exercise, 2nd edn. Aspen Publishers Inc, Gaithersberg, Maryland, p130.
- Cao, N.; Fu, Y. y He, J. (2007). Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. Food Hydrocolloids. 21(2):575-584.
- Constantinides, P.P.; Han, J.; Davis, S.S. (2006). Advances in the use of tocals as drug delivery vehicles. Pharmaceutical Research 23, 243–255.
- Cuppett, S.L. (1994). Edible coatings as carriers of food additives, fungicides and natural antagonist. En: Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. Eds J.M. Krochta, E.A. Baldwin, M. Nisperos-Carriedo. Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, PA, USA. P121-137.
- Debeaufort, F., y Voilley, A. (1994). Aroma compound and water vapour permeability of edible films and polymer packaging. Journal of Agricultural Food Chemistry, 42: 2871-2875.

- De Chiffre, L.; Lonardo, P.; Trumpold, H.; Lucca, D. A.; Goch, G.; Brown, C. A.; Raja, J. y Hansen, H. N. (2000). Quantitative characterization of surface texture. *Annals of the CIRP* 49(2), 635-652.
- Elliott, J. G. (1998). Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technol.* 53: 46-48.
- Fabra, M.J.; Talens, P.; Chiralt, A. (2009a). Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic-acid beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids.* 23(3):676-683.
- Fabra, M.J.; Jiménez, A.; Atarés, L.; Talens, P. y Chiralt, A. (2009b). Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, (In press).
- Figueroa-Espinoza, M.C.; Morel, M.H.; Surget, A.; Asther, M.; Moukha, S.; Sigoillot, J.C. y Rouau, X. (1999). Attempt to cross-link feruloylated arabinoxylans and proteins with a fungal laccase. *Food Hydrocolloids* 13:65-71.
- Fritsch, C. W. & Gale, J. A. (1977). Hexanal as a measure of rancidity in low fat foods. *Journal of the American oil chemists' society* 54: 225-228.
- Friedman, M. y Jurgens, H.S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 48:2101-2110.
- Gómez-Estaca, J. Giménez, B., Montero, P., y Gómez-Guillén, M. C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92:78-85.
- Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic BiolMed.* 13:435-448.
- Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible films. In *Food Packaging and Preservation*. Mathlouthi, M. Ed. Elsevier Applied Science Publishers: New York. pp. 371-394.
- Headley, S. y Massad, S. (1999). Nutritional supplements for athletes. National Association for Sport and Physical Education, and Association of the American Alliance for Health, Physical Education, Recreation and Dance, pp 51-52.
- Heinonen, M.; Rein, D.; Satue-Gracia, M.T.; Huang, S.W.; German, J.B. y Frankel, E.N. (1998). Effect of protein on the antioxidant activity of phenolic compounds in a lecithin-liposome oxidation system. *J Agric Food Chem* 46:917-922.
- Hutchings, J.B. (1999). *Food and Colour Appearance*, Second Edition. Gaithersburg, Maryland: Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication.
- Iiyama, K.; Lam, T.B.T. y Stone, B.A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol* 104:315-320.
- Judd, D. B. y Wyszecski, G. (1975). *Colour in Business, Science and Industry*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Krause, K.P. y Muller, R.H. (2001). Production and characterization of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenisation. *International Journal of Pharmaceutics* 214, 21-24.
- Lattanzio, V.; De Cicco, V.; Di Venere, D.; Lima, G. y Salerno, M. (1994). Antifungal activity of phenolics against fungi commonly encountered during storage. *Int J Food Sci* 1:23-30.
- Mathew, S. y Abraham, T.E. (2008). Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids.* 22:826-835.
- Mc Hugh, T.H.; Avena-Bustillos, R. y Krochta, J.M. (1993). Hydrophilic edible films: modified Procedure for water vapour permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science.* 58(4): 899-903.
- Mehnert, W. y Mader, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, 165-196.
- Mei, Y. y Zhao, Y. (2002). Using edible coating to enhance nutritional and sensory qualities of baby carrots. *J. Food Sci.* 65:1964-1968.
- Mei, Y. y Zhao, Y. (2003). Barrier and mechanical properties of Milk Protein Edible Films Containing Nutraceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51:1914-1918.
- Ou, S. ; Wang, Y. ; Tang, S. ; Huang, C. y Jackson, M. G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 70(2), 205-210.
- Priefert, H.; Rabenhorst, J. y Steinbuchel, A. (2001). Biotechnological production of vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:296-314.

- Pszczola, D. E. (1998). The ABCs of nutraceutical ingredients. *Food Technol* 52: 30-37.
- Tan, C.P. y Nakajima, M. (2005). β -carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry* 92, 661–671.
- Verran, J.; Rowe, D. L. y Boyd, R. D. (2001). The effect of nanometer dimension topographical features on the hygienic status of stainless steel. *J Food Protection*. 64(8), 1183-1187.
- Wu, Y.; Weller, C.L.; Hamouz, F.; Cuppet, S.L. y Schnepf, M. (2002). Development and application of multicomponent edible coatings and films: a review. *Advances in Food and Nutrition Research*, 44:347-394.