

# **INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN FILMS COMESTIBLES A BASE DE CASEINATO SÓDICO Y ÁCIDO ESTEÁRICO O ÁCIDO OLEICO**

**MASTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS**

Rocio Pérez Masiá

Pau Talens Oliag

M<sup>a</sup> José Fabra Rovira

E.T.S.I.A.

# INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN FILMS COMESTIBLES A BASE DE CASEINATO SÓDICO Y ÁCIDO ESTEÁRICO O ÁCIDO OLEICO

Pérez-Masiá, R.; Fabra, M.J.; Talens, P.\*

## RESUMEN

En este trabajo se estudia la influencia del tamaño de partícula sobre las propiedades físicas de los films elaborados a base de caseinato sódico y ácidos grasos (oleico o esteárico). Para ello se prepararon distintas formulaciones con diferentes tamaños de partícula y se caracterizaron midiendo el tamaño de partícula y las propiedades reológicas de las emulsiones, así como las propiedades mecánicas, estructurales y ópticas y la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los films obtenidos. Los films elaborados con ácido esteárico muestran estructura laminar. Sin embargo, las gotas de ácido oleico quedan homogéneamente distribuidas en la matriz del film que incorpora dicho ácido graso. Estas diferencias en la estructura hacen que los films a base de ácido esteárico sean menos elásticos, más rugosos y con menos brillo que los films a base de ácido oleico. Además, la estructura también afecta a la WVP, de forma que, para los films elaborados con ácido oleico la permeabilidad disminuye con el tamaño de partícula, mientras que para los films con ácido esteárico, la permeabilidad aumenta al reducir el tamaño de partícula.

Palabras clave: caseinato sódico, ácido oleico, ácido esteárico, tamaño de partícula

## RESUM

En aquest treball s'estudia la influència de la grandària de la partícula sobre les propietats físiques dels films elaborats a base de caseïnat sòdic i àcids grassos (oleic o esteàric). Per a això es van preparar distintes formulacions amb diferents grandàries de partícula i es van caracteritzar mesurant la grandària de la partícula i les propietats reològiques de les emulsions, així com les propietats mecàniques, estructurals i òptiques i la permeabilitat al vapor d'aigua (WVP) dels films obtinguts. Els films que incorporen àcid esteàric mostren una estructura laminar. En canvi, les gotes d'àcid oleic queden homogèniament distribuïdes en la matriu del film. Estes diferències en l'estructura fan que els films a base d'àcid esteàric siguin menys elàstics, més rugosos i amb menys brillantor que els films a base d'àcid oleic. A més, l'estructura també afecta a la WVP, de forma que, per als films elaborats amb OA la permeabilitat disminueix amb la grandària de partícula, en canvi que per als films amb àcid esteàric, la permeabilitat augmenta al reduir grandària de partícula.

\*[pautalens@tal.upv.es](mailto:pautalens@tal.upv.es). Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo - Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. 46022 Valencia, España

Paraules clau: caseinat sòdic, àcid oleic, àcid esteàric, grandària de de partícula

## **ABSTRACT**

The effect of particle size on physical properties of sodium caseinate and fatty acids (oleic and stearic) films were studied. For this purpose, different formulations were prepared with different particle sizes and were characterized by measuring the particle size and rheological properties of emulsions, as well as mechanical, structural and optical properties and water vapour permeability (WVP) of films obtained. While stearic acid showed a laminar-like structure, oleic acid droplets were homogeneously dispersed in the film matrix. These differences in structure make the stearic acid films less flexible with more roughness and less gloss than oleic acid films. The structure also affects the WVP. In this way, for oleic acid films water barrier efficiency increased as lipid particle size decreased, whereas for films containing stearic acid, water barrier efficiency increased as lipid particle size increased.

Key words: sodium caseinate, oleic acid, stearic acid, particle size

## INTRODUCCIÓN

Un film o recubrimiento comestible consiste en una delgada capa de material protector, compuesta por varios materiales, que varían según la utilidad de éste, y que pueden ser consumidos como parte del producto. El desarrollo de films y recubrimientos comestibles a base de sustancias naturales de grado alimentario y biodegradables, puede ofrecer un envase que permita reemplazar los clásicos envases poliméricos sintéticos (Gontard y Guilbert, 1994). Para conseguir una funcionalidad óptima de los recubrimientos, es especialmente importante la selección de los materiales que los forman, ya que sus propiedades están fuertemente afectadas por la naturaleza de sus componentes, composición y estructura final.

Las caseínas son unas de las proteínas utilizadas para la formación de films y recubrimientos comestibles debido a que su estructura en forma de micelas estables les proporciona unas propiedades adecuadas como agentes formadores de recubrimientos. Además, son solubles y resistentes a la desnaturalización térmica y/o coagulación, lo que significa que los films permanecen estables en un amplio rango de pH, temperatura y concentración de sal (Kinsella, 1984; Khwaldia et al., 2004). La precipitación de las caseínas a pH 4.6 y la posterior adición de hidróxido sódico da lugar al caseinato sódico (NaCas). Los recubrimientos de caseína y caseinatos suelen ser frágiles si no se les adicionan compuestos plastificantes como el glicerol. Este componente actúa sobre los puentes de hidrógeno de los complejos proteicos relajando su estructura y mejorando la flexibilidad de los films.

La adición de ácidos grasos a los films formulados a base de proteínas o polisacáridos mejora sus propiedades barrera frente a la humedad. De esta forma, un aumento en el contenido lipídico del recubrimiento, reduce su permeabilidad al vapor de agua (WVP). No obstante, el ratio de reducción depende de varios parámetros como son la longitud de la cadena del ácido graso, el número de insaturaciones o el tamaño de partícula en el film (Pérez-Gagó y Krochta, 2001; Morillon et al., 2002). Los ácidos esteárico y oleico poseen una misma longitud de cadena (18 átomos de C), pero distinto grado de insaturación, ya que el primero es un ácido graso saturado, mientras que el segundo presenta una insaturación en el C-9. Esto les confiere la capacidad de organizarse de distinta manera en el film. Estudios previos muestran que, mientras que el ácido esteárico forma bicapas, las partículas de ácido oleico no poseen esa capacidad de asociación (Fabra et al., 2009a).

Los films pueden estar constituidos por capas separadas de hidrocoloide(s) y lípido (films bicapa), o por una única capa en la que el lípido está disperso en la matriz de hidrocoloide(s). En los films bicapa, la transferencia de vapor de agua está mucho más limitada que cuando el film está formando a partir de una emulsión estable (Kamper y Fennema, 1984a y b; Kester y Fennema, 1989), ya que en este caso, el lípido forma una capa continua a lo largo de todo el recubrimiento e impide la transmisión de vapor. Sin embargo, es muy fácil que se produzca la separación de las capas debido a la alta energía superficial entre los materiales polares y no polares (Kamper y Fennema, 1984a y b). Debido a esto, los films que se utilizan normalmente se forman a partir de emulsiones lipídicas dispersas en una matriz de proteínas y/o polisacáridos. En general, los films emulsionados son menos eficientes frente a la transferencia al vapor de agua que los films bicapa. En ocasiones es posible obtener una

bicapa a partir de una emulsión considerando el tamaño de partícula del lípido disperso. Con este estudio se pretende analizar el efecto del tamaño de partícula de los ácidos oleico y esteárico en las propiedades físicas de films a base de caseinato sódico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Preparación de las formulaciones y obtención de los films**

Se prepararon ocho formulaciones a base de caseinato sódico (Alanate-110 Industrias de Suministros Llorella, S.A., España), glicerol (Panreac Química, S.A, Barcelona, España) y ácidos grasos. Cuatro de las formulaciones se prepararon con ácido esteárico (pureza mínima 96 %, Panreac Química, S. A.) y las cuatro restantes se formularon con ácido oleico (pureza mínima 98 %, Panreac Química, S.A). La relación proteína:plastificante:lípido se fijó en 1:0.3:0.15. Las formulaciones se elaboraron 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 formulaciones se calentaron en un baño a 85 °C, se añadió el ácido esteárico a las emulsiones correspondientes y posteriormente se homogeneizaron. Las emulsiones preparadas con ácido oleico se enfriaron a temperatura ambiente antes de añadir el lípido y posteriormente se homogeneizaron. Para homogeneizar las emulsiones se siguieron cuatro técnicas: las formulaciones (A) se homogeneizaron durante 3 minutos en un ultraturrax (Janke y Kunkel, Alemania) a 9500 rpm; las formulaciones (B) se homogeneizaron con ultraturrax durante 1 minuto a 13500 r.p.m. y 3 minutos a 20500 rpm.; las formulaciones (C) se homogeneizaron durante 10 minutos a 20500 rpm en el ultraturrax, se desgasificaron con una bomba de vacío (Diaphragm vacuum pump, Wertheim, Alemania) a temperatura ambiente y por último se pasaron por un microfluidizador (Microfluidics M110P CF, Newton, Massachusetts, EEUU) 2 veces a una presión de 15000 PSI. Las formulaciones (D) se prepararon igual que las formulaciones (C), pero con 3 pases por el microfluidizador.

Los films se obtuvieron pesando y vertiendo una cantidad controlada de disolución en una placa de teflón de 150 mm de diámetro. Se trabajó con una cantidad fija de sólidos totales vertidos (2 g) para todas las formulaciones. Tras el vertido, las muestras se dejaron secar durante 24 horas a una humedad relativa de  $45 \pm 2$  % y a una temperatura de  $22 \pm 1$ °C. Tras el secado, los films se despegaron de las placas de teflón y se almacenaron en un desecador con una humedad relativa controlada del 58 % generada por una disolución saturada de nitrato magnésico (Panreac química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona, España). Los desecadores se mantuvieron en una cámara a una temperatura controlada de 10 °C.

## Caracterización de las emulsiones formadoras de films

### TAMAÑO DE PARTÍCULA

La distribución del tamaño de las partículas en volumen ( $D_{4,3}$ ) y la media del tamaño de la distribución de partículas en superficie ( $D_{3,2}$ ) se determinaron usando un analizador de tamaño de partícula *Mastersizer 2000* (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido), basado en la técnica de difracción láser. Esta técnica se basa en la medida de la intensidad de dispersión de la luz que causan las partículas dispersas en la emulsión. El análisis se realizó diluyendo las emulsiones en agua destilada hasta una concentración de un 1-2 % aproximadamente. La medida del diámetro medio se basa en una partícula hipotética que representa el total de las partículas presentes en la muestra. La distribución del tamaño de las partículas en volumen ( $D_{4,3}$ ) es la media del tamaño basada en el peso por unidad de partículas. La media del tamaño de la distribución de partículas en superficie ( $D_{3,2}$ ) representa el tamaño medio de una superficie específica por unidad de volumen. Estos diámetros medios de la partícula se definen por las ecuaciones 1 y 2 donde  $n_i$  es el número de partículas de cada tamaño y  $d_i$  es el diámetro de la partícula.

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (1)$$

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (2)$$

### REOLOGÍA

El comportamiento reológico de las formulaciones formadoras de recubrimientos se analizó usando un reómetro rotatorio (HAAKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Alemania), donde las muestras se mantuvieron a temperatura de 25 °C durante los ensayos. Para cada emulsión se determinó por triplicado la correspondiente curva de flujo: se realizaron dos barridos de gradiente de velocidad ( $\dot{\gamma}$ ), ascendente y descendente, entre 0 a 512 s<sup>-1</sup>, cada uno de 5 minutos de duración.

### Caracterización de los films

#### ESPESOR DE LOS FILMS

El espesor de los films se determinó en seis puntos distintos de los mismos utilizando un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona) con una precisión de 0.001 mm. Estos espesores se utilizaron posteriormente para el cálculo de las propiedades mecánicas y de la permeabilidad al vapor de agua.

## 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 (ASTM 2001). Para cada formulación se cortaron muestras rectangulares (25 mm de ancho por 100 mm de largo) y se equilibraron al 58 % de humedad relativa y una temperatura de  $10 \pm 1$  °C. Los films se montaron en unas pinzas para ensayos de tensión (modelo ATG, 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. A partir de este ensayo se caracterizaron los films mediante su módulo de elasticidad (EM), su tensión de fractura (TS) y su deformación hasta el punto de fractura (E).

## 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 (Mc Hugh et al., 1993), para un gradiente de humedad relativa 58-100 % y una temperatura de 10 °C. Las muestras (6 por formulación) fueron montadas entre la base y la tapa de una copa de aluminio de 3.5 cm de diámetro (Payne, elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica). En el interior de la copa de permeabilidad se añadieron 5 mL de agua destilada. Las copas fueron introducidas en un desecador equilibrado con una disolución saturada de nitrato magnésico (humedad relativa del 58 %) junto con un ventilador (CPU Y.S.TECH 12V.) colocado en la parte superior, con el fin de homogenizar la atmósfera y asegurar una resistencia despreciable en la superficie del film. Los desecadores se mantuvieron en una cámara a una temperatura controlada de 10 °C. El estudio de la permeabilidad se realizó mediante controles de peso de cada copa con una balanza electrónica ( $\pm 0.00001$  g) (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 2 horas durante un periodo de tiempo de 24 horas.

## PROPIEDADES ESTRUCTURALES

Para analizar las propiedades estructurales de los films, se estudió, por un lado, la topografía superficial de las muestras mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y, por otro, la distribución de los componentes a través de la microestructura superficial y transversal los films mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para el estudio de la topografía se utilizó un Nanoscope IIIa, Scanning Probe Microscope, versión 5.30r2 (Digital Instruments, Veeco Metrology Group). En cada muestra se realizó un barrido superficial, utilizando el modo tapping, sobre un área de  $50 \times 50 \mu\text{m}$ , con un límite vertical máximo de  $6 \mu\text{m}$  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 3).

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |Z_j| \quad (3)$$

- Rugosidad media cuadrática ( $R_q$ ): raíz cuadrada del promedio de las desviaciones de altura desde un plano medio ( $Z_1$ ) al cuadrado (Ecuación 4).

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N Z_j^2}{N}} \quad (4)$$

Para el estudio de la microestructura de los films se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL®, modelo JSM-5410. Las muestras se montaron en un soporte de cobre y se cubrieron de oro con el fin de hacerlas conductoras. Después fueron observadas directamente con un voltaje de aceleración de 10 KV.

## 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  $R_\infty$  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 5 a 7, 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 8.

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  $10^\circ$  e iluminante D65. Las determinaciones se realizaron sobre la cara en que se estableció la interfase líquido-aire durante el secado.

$$R_\infty = a - b \quad (5)$$

$$a = \frac{1}{2} \left( R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right) \quad (6)$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (7)$$

$$T_i = \sqrt{(a - R_0)^2 - b^2} \quad (8)$$

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.

## 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 %.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de las emulsiones formadoras de los films

#### TAMAÑO DE PARTÍCULA

Las Tablas 1 y 2 muestran los valores de  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  obtenidos para las emulsiones formuladas con ácido oleico (AO) y ácido esteárico (AE) respectivamente. La media del tamaño de la distribución de partículas en superficie ( $D_{3,2}$ ) representa el tamaño medio basado en la superficie específica por unidad de volumen, y permite caracterizar las partículas pequeñas y de forma esférica. La media de tamaño de la distribución de partículas en volumen ( $D_{4,3}$ ) representa el tamaño medio basado en la unidad de peso de las partículas, y representa las partículas de mayor tamaño y formas irregulares, tales como los agregados. Tanto los valores de  $D_{4,3}$  como los valores de  $D_{3,2}$  muestran que al aumentar la intensidad del tratamiento de homogenización, el tamaño de partícula disminuye significativamente, obteniéndose los menores tamaños de partícula para las emulsiones preparadas utilizando el microfluidizador (C y D). Para crear una emulsión, es necesario aplicar una energía mecánica en el sistema y el tamaño de partícula de la emulsión formada es función de esta energía aplicada, de forma que a mayor cantidad de energía, menor tamaño de partícula (Hunter, 1989, Pérez-Gagó y Krochta, 2001). De todas las técnicas empleadas para realizar la homogeneización, el ultraturrax combinado con el microfluidizador es la que más energía aporta al sistema, por lo que es la que proporciona el menor tamaño de partícula de las emulsiones.

**TABLA 1.** Caracterización de las emulsiones formuladas con ácido oleico

Formulación	Tamaño de partícula		Reología	
	$D_{3,2}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{4,3}$ ( $\mu\text{m}$ )	n	$\mu$ (Pa·s)
NaCas-Gly-AO (A)	22.8 (0.2) <sup>a</sup>	37 (1) <sup>a</sup>	1	0.0380 (0.0012) <sup>a</sup>
NaCas-Gly-AO (B)	0.747 (0.009) <sup>b</sup>	0.99 (0.05) <sup>b</sup>	1	0.0291 (0.0008) <sup>b</sup>
NaCas-Gly-AO (C)	0.382 (0.005) <sup>c</sup>	0.477 (0.004) <sup>c</sup>	1	0.0189 (0.0007) <sup>c</sup>
NaCas-Gly-AO (D)	0.236 (0.001) <sup>d</sup>	0.402 (0.001) <sup>d</sup>	1	0.0142 (0.0004) <sup>d</sup>

(<sup>a-d</sup>) Diferentes índices en una columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

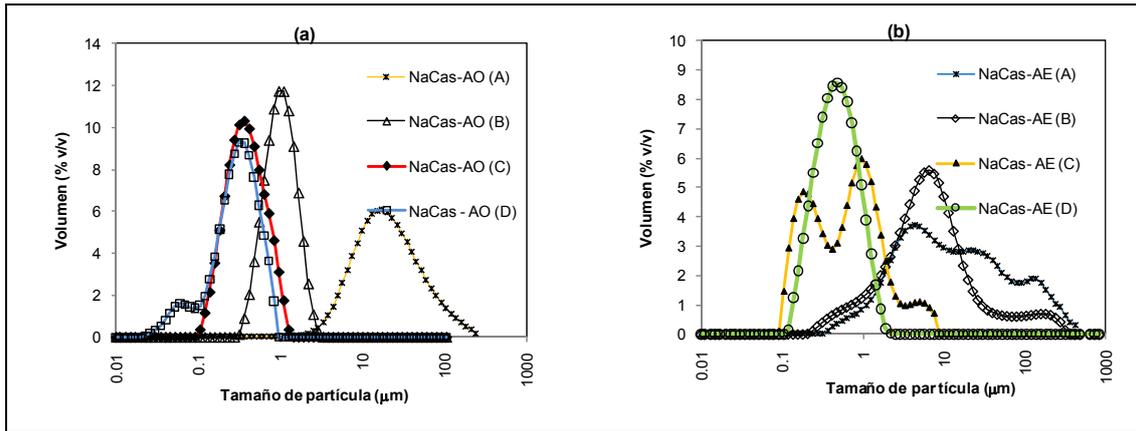
**TABLA 2.** Caracterización de las emulsiones formuladas con ácido esteárico

Formulación	Tamaño de partícula		Reología	
	D <sub>3,2</sub> (µm)	D <sub>4,3</sub> (µm)	n	µ (Pa·s)
NaCas-Gly-AE (A)	3.4 (0.2) <sup>a</sup>	21 (1) <sup>a</sup>	0.418	0.0681 (0.0005) <sup>a</sup>
NaCas-Gly-AE (B)	3.18 (0.03) <sup>b</sup>	19 (2) <sup>b</sup>	0.789	0.0545 (0.0002) <sup>b</sup>
NaCas-Gly-AE (C)	0.45 (0.04) <sup>c</sup>	1.26 (0.03) <sup>c</sup>	1	0.0159 (0.0002) <sup>c</sup>
NaCas-Gly-AE (D)	0.73 (0.02) <sup>d</sup>	1.01 (0.02) <sup>d</sup>	1	0.0103 (0.0005) <sup>d</sup>

<sup>(a-d)</sup>Diferentes índices en una columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Al comparar las distintas emulsiones formuladas con ambos ácidos grasos, se observa que a excepción de las formulaciones A, el tamaño de partícula fue significativamente menor en las emulsiones que incorporan ácido oleico. En general, se observa una mayor similitud en los valores de D<sub>3,2</sub> y D<sub>4,3</sub> en las formulaciones que incorporan ácido oleico (principalmente B, C y D) lo que pone de manifiesto la homogeneidad en el tamaño de las gotas, obteniéndose en estos casos partículas de menor tamaño y con formas esféricas. En cambio, en las emulsiones formuladas con ácido esteárico, las diferencias entre los parámetros D<sub>3,2</sub> y D<sub>4,3</sub> son mayores, aunque éstas se reducen al pasar las muestras por el microfluidizador, obteniéndose así partículas más pequeñas y de tamaños más homogéneos y uniformes. El comportamiento observado para ambos ácidos grasos con respecto al tamaño de partícula podría atribuirse a que el AO permanece en estado líquido a temperatura ambiente, lo que favorece la reducción del tamaño de partícula, así como una mayor homogeneización de la emulsión. Por el contrario, el ácido esteárico se organiza formando micelas en los sistemas acuosos debido a su baja afinidad con este medio y esto da lugar a partículas de mayor tamaño (Fabra et al., 2009a).

En la Figura 1 se observa la distribución del tamaño de partículas de todas las formulaciones estudiadas. Todas las formulaciones que incorporan ácido oleico son monomodales aunque la amplitud y situación del máximo es dependiente de la intensidad del tratamiento de homogenización, de modo que la formulación A presenta una distribución más ancha en coherencia con las mayores diferencias observadas en los parámetros D<sub>3,2</sub> y D<sub>4,3</sub>. A medida que aumenta la intensidad de la homogenización, la distribución se hace más estrecha y se desplaza hacia tamaños de partícula menores. Por el contrario, las emulsiones formuladas con ácido esteárico presentan una distribución más amplia, consecuencia de la presencia de partículas de distinto tamaño. Esta distribución se estrecha a medida que se obtienen tamaños de partícula menores, alcanzando una distribución monomodal y con tamaños de partícula más homogéneos para la formulación D.



**FIGURA 1.** Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones formadoras de recubrimiento. (a) Emulsiones con ácido oleico, (b) emulsiones con ácido esteárico.

## REOLOGÍA

Las Tablas 1 y 2 muestran los valores de viscosidad obtenidos para todas las emulsiones formadoras de films. En el caso de los fluidos no newtonianos, el valor de viscosidad dado corresponde a la viscosidad aparente para un gradiente de velocidad de  $100 \text{ s}^{-1}$ . En el estudio reológico de las emulsiones se observa que todas las formulaciones preparadas con ácido oleico presentan un comportamiento newtoniano ( $n=1$ ). Por el contrario, las emulsiones que incorporan ácido esteárico presentan un comportamiento pseudoplástico ( $n<1$ ) para mayores tamaños de partícula (formulaciones A y B;  $k=2.24$  y  $0.135 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$  respectivamente), mientras que el comportamiento es newtoniano cuando estas emulsiones se obtienen empleando el microfluidizador. El carácter pseudoplástico de estas emulsiones se podría atribuir a que el ácido esteárico se organiza en formas de micelas que van rompiéndose a medida que aumenta el gradiente de velocidad aplicado, por lo que la viscosidad disminuye al aumentar el gradiente de velocidad (Fabra et al., 2009a). Sin embargo, el microfluidizador es capaz de romper las micelas de ácido esteárico, por lo que las emulsiones C y D preparadas con este ácido graso ya presentan un comportamiento newtoniano. Los resultados muestran que para las emulsiones homogeneizadas sólo con el ultraturrax (A y B), la viscosidad de las formulaciones que incorporan ácido esteárico es mayor que las formuladas con ácido oleico, probablemente debido a la organización en micelas de las primeras. No obstante, para las emulsiones homogeneizadas con el ultraturrax y el microfluidizador, la viscosidad de las formulaciones de ácido oleico es mayor que la de las formulaciones de ácido esteárico. Esto podría explicarse por la capacidad del ácido oleico de interactuar mejor con las moléculas de disolvente y con el caseinato sódico, por lo que éste queda más inmovilizado y da lugar a una emulsión más viscosa (Nylander, 2004; Fabra et al., 2009b).

## Caracterización de los films

### PROPIEDADES MECÁNICAS

Las Tablas 3 y 4 muestran los parámetros relacionados con las propiedades mecánicas de los films formulados con ácido oleico y ácido esteárico respectivamente. Los resultados ponen de manifiesto que los films formulados con ácido esteárico son menos elásticos y flexibles (mayor módulo de elasticidad y tensión de fractura) y menos extensibles (menor deformación hasta el punto de fractura) que los films que incorporan ácido oleico. Esto podría atribuirse al diferente estado físico de ambos lípidos, ya que, mientras que el ácido esteárico es sólido a temperatura ambiente, el ácido oleico es líquido y puede fluir durante el ensayo de tensión (Fabra et al., 2009a). Por otro lado, estudios recientes muestran que el ácido oleico es capaz de interactuar con los grupos hidrofóbicos de la proteína produciendo un efecto plastificante, lo que conlleva a un aumento de la flexibilidad de los films (Fernández et al., 2006, Fabra et al., 2009b).

**TABLA 3.** Propiedades mecánicas y WVP de los films con AO.

Formulación	Propiedades mecánicas			Permeabilidad (g·mm/kPa·h·m <sup>2</sup> )
	EM (MPa)	TS (MPa)	E (%)	
NaCas-Gly-AO (A)	283 (14) <sup>a</sup>	8.6 (0.1) <sup>ab</sup>	36.0 (0.5) <sup>a</sup>	8.7 (0.2) <sup>a</sup>
NaCas-Gly-AO (B)	274 (39) <sup>a</sup>	9.5 (0.8) <sup>b</sup>	35 (3) <sup>a</sup>	8.8 (0.7) <sup>a</sup>
NaCas-Gly-AO (C)	347 (33) <sup>b</sup>	7.4 (0.4) <sup>a</sup>	18 (5) <sup>b</sup>	6.8 (0.4) <sup>b</sup>
NaCas-Gly-AO(D)	352 (17) <sup>b</sup>	8.6 (0.8) <sup>ab</sup>	28 (7) <sup>ab</sup>	6.5 (0.2) <sup>b</sup>

<sup>(a-b)</sup>Diferentes índices en una columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**TABLA 4.** Propiedades mecánicas y WVP de los films con AE.

Formulación	Propiedades mecánicas			Permeabilidad (g·mm/kPa·h·m <sup>2</sup> )
	EM (MPa)	TS (MPa)	E (%)	
NaCas-Gly-AE (A)	448 (21) <sup>a</sup>	5.5 (0.4) <sup>a</sup>	2.8 (0.7) <sup>a</sup>	5.9 (0.4) <sup>a</sup>
NaCas-Gly-AE (B)	579 (30) <sup>b</sup>	8.1 (0.3) <sup>b</sup>	2.1 (0.2) <sup>b</sup>	6.8 (0.4) <sup>b</sup>
NaCas-Gly-AE (C)	684 (35) <sup>c</sup>	10.7 (0.2) <sup>c</sup>	3.7 (0.1) <sup>c</sup>	8.4 (0.6) <sup>c</sup>
NaCas-Gly-AE (D)	954 (58) <sup>d</sup>	13.5 (0.4) <sup>d</sup>	2.9 (0.1) <sup>a</sup>	8.2 (0.3) <sup>c</sup>

<sup>(a-d)</sup>Diferentes índices en una columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Se observa que al disminuir el tamaño de partícula, aumenta el módulo de elasticidad (EM) de los films, es decir, para producir una misma deformación en los films, es necesario realizar un mayor esfuerzo en aquellos que contienen un menor tamaño de partícula. Esto podría atribuirse a que al disminuir el tamaño de partícula del ácido graso, aumenta la superficie de interfase, lo que hace que el esfuerzo que hay que aplicar para deformar el film sea mayor (Pérez-Gagó y Krochta, 2001). Este efecto es mucho más notable en los films formulados con ácido esteárico, probablemente debido a la estructura laminar que forma dicho ácido graso, de modo que cuanto mayor sea la lámina más puntos de ruptura. Como se comentará más adelante, al reducir el tamaño de

partícula, el ácido esteárico pasa de formar una estructura laminar, en la que las moléculas del lípido forman una bicapa y con poca superficie de interfase lípido-proteína, a formar una estructura de partículas dispersas, en la que las moléculas de ácido esteárico se distribuyen a lo largo de todo el film. En este último caso, la superficie de interfase con el caseinato sódico aumenta, lo que conlleva la formación de films más rígidos. En cambio, en los films formulados con ácido oleico, nunca se llega a formar una estructura laminar, ya que este lípido permite una mejor homogeneización que da lugar a una estructura de partículas dispersas, por lo que el efecto de inmovilización de la proteína al reducir el tamaño de partícula no es tan destacado.

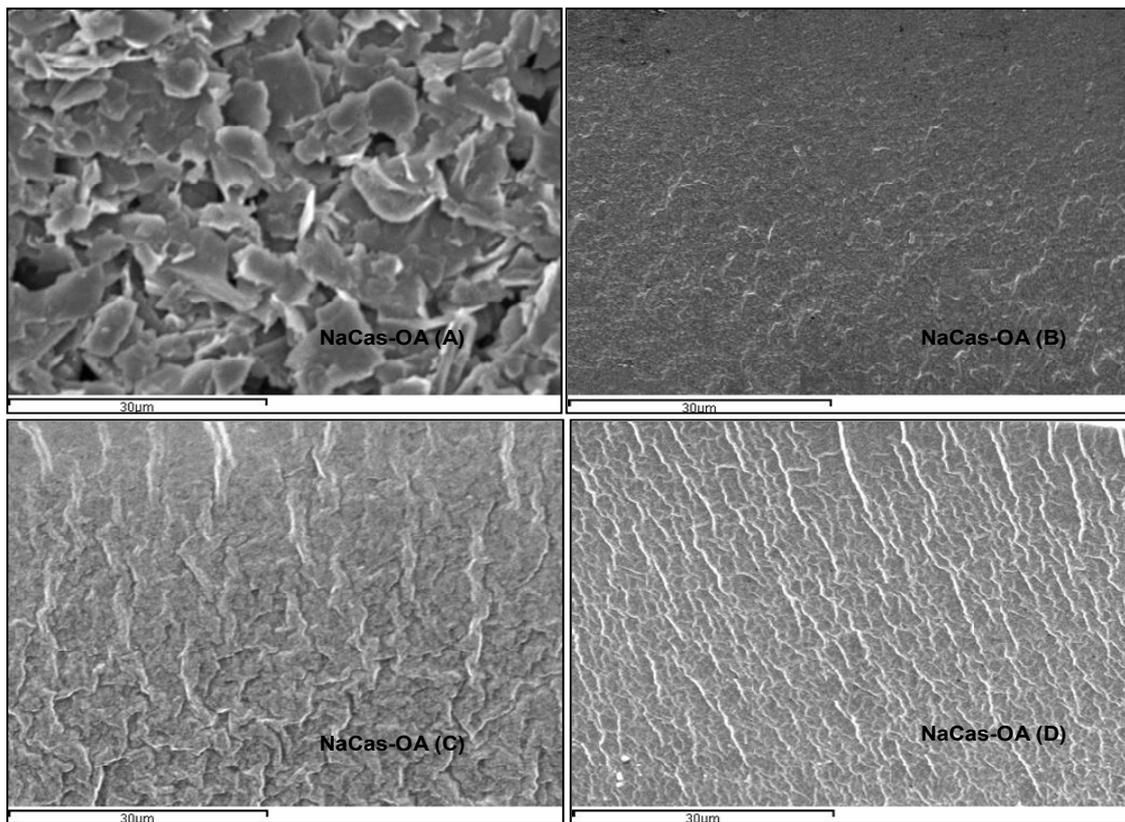
## PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

En las Tablas 3 y 4 se muestran los datos de permeabilidad al vapor de agua (WVP) para los films formulados con ácido oleico y ácido esteárico, respectivamente. Se observa un efecto contrario en el comportamiento de los dos ácidos grasos. Al disminuir el tamaño de partícula, la WVP de los films formulados con ácido oleico disminuye, mientras que la permeabilidad de los films que incorporan ácido esteárico aumenta. Esto podría atribuirse a que el ácido esteárico forma estructuras laminares y, por tanto, cuanto mayor sea la lámina menor será la permeabilidad al vapor de agua. Al aumentar la intensidad de la homogeneización y disminuir el tamaño de partícula del lípido, estas láminas se rompen y dan lugar a una estructura de partículas dispersas entre las cuales aparecen espacios sin lípido que aumentan la permeabilidad al vapor de agua. Efectos similares fueron observados previamente en films comestibles a base de caseinato sódico y distintos ácidos grasos saturados e insaturados (Fabra et al., 2009a). Por el contrario, el ácido oleico nunca forma estructuras laminares y, en este caso, cuanto menor sea el tamaño de partícula, ésta se distribuye de forma más homogénea en el film aumentando la resistencia al paso de vapor de agua. Este comportamiento fue observado en films a base de proteínas de suero de la leche y cera de abeja (Pérez-Gagó y Krochta 2001).

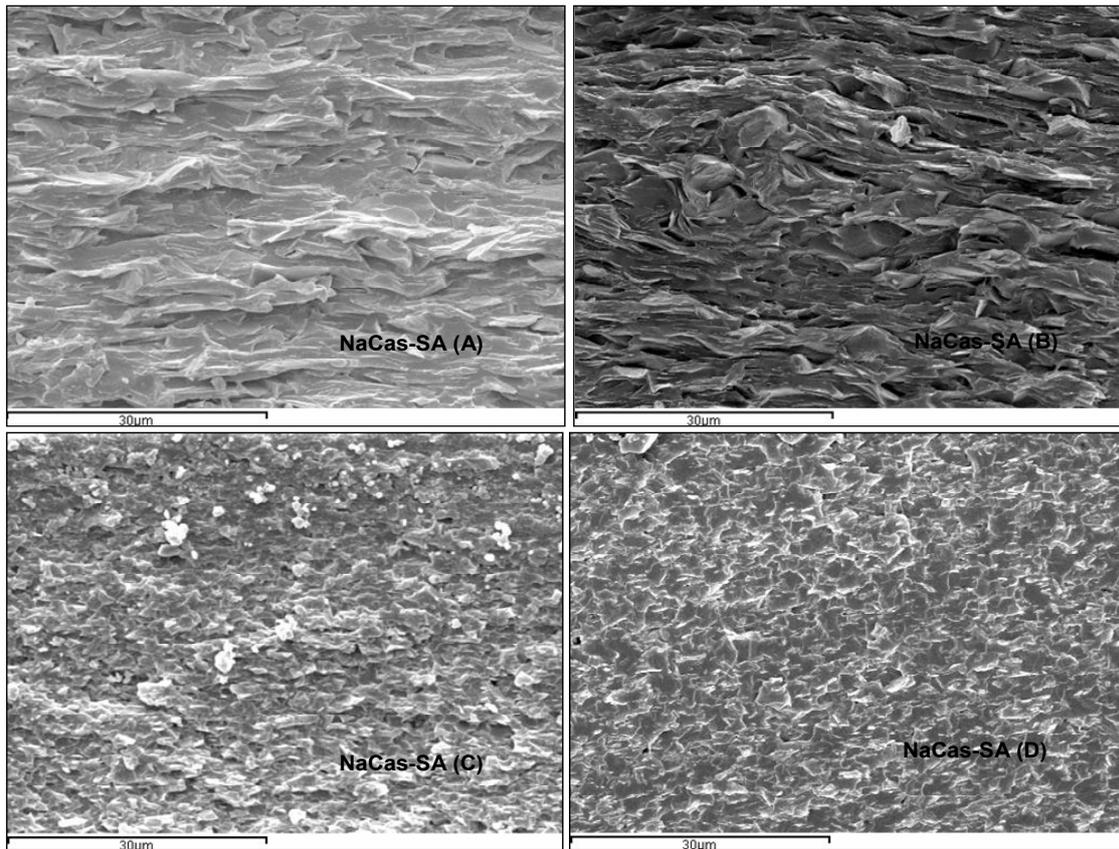
## PROPIEDADES ESTRUCTURALES

La estructura de los films está afectada por la organización de los distintos componentes de la emulsión y por las interacciones que se dan entre ellos durante el secado. El análisis microestructural de los films aporta información relevante sobre la organización de los distintos componentes que lo forman y ayuda a comprender los mecanismos de transferencia al vapor de agua a través de los films, así como las interacciones con la luz que determinan las propiedades ópticas. La estructura interna y el aspecto superficial de los films fueron caracterizados cualitativamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las Figuras 2 y 3 muestran, respectivamente las micrográficas transversales de los films estudiados con ácido oleico y ácido esteárico. En general, el ácido esteárico forma estructuras laminares, mientras que las partículas de ácido oleico quedan distribuidas homogéneamente en la matriz de proteína, más finamente distribuidas al disminuir el tamaño de las mismas (formulación C y D) y con agregados más grandes para tamaño de partícula mayores. Esta estructura no es tan efectiva como barrera al transporte de

vapor de agua como la estructura laminar. Los films formulados con ácido esteárico forman estructuras laminares para tamaños de partícula mayores, sin embargo, al disminuir el tamaño de partícula con la utilización del microfluidizador, estas láminas se rompen y dan lugar a partículas dispersas (films C y D). Las láminas de lípidos que se forman en la matriz del film contribuyen a reducir la permeabilidad al vapor de agua, mejorando así las propiedades barrera al vapor de agua: cuando mayor sea la longitud de la cadena (formulación A y B), menor la WVP.



**FIGURA 2.** Micrografías de la sección transversal de los films formulados con ácido esteárico.



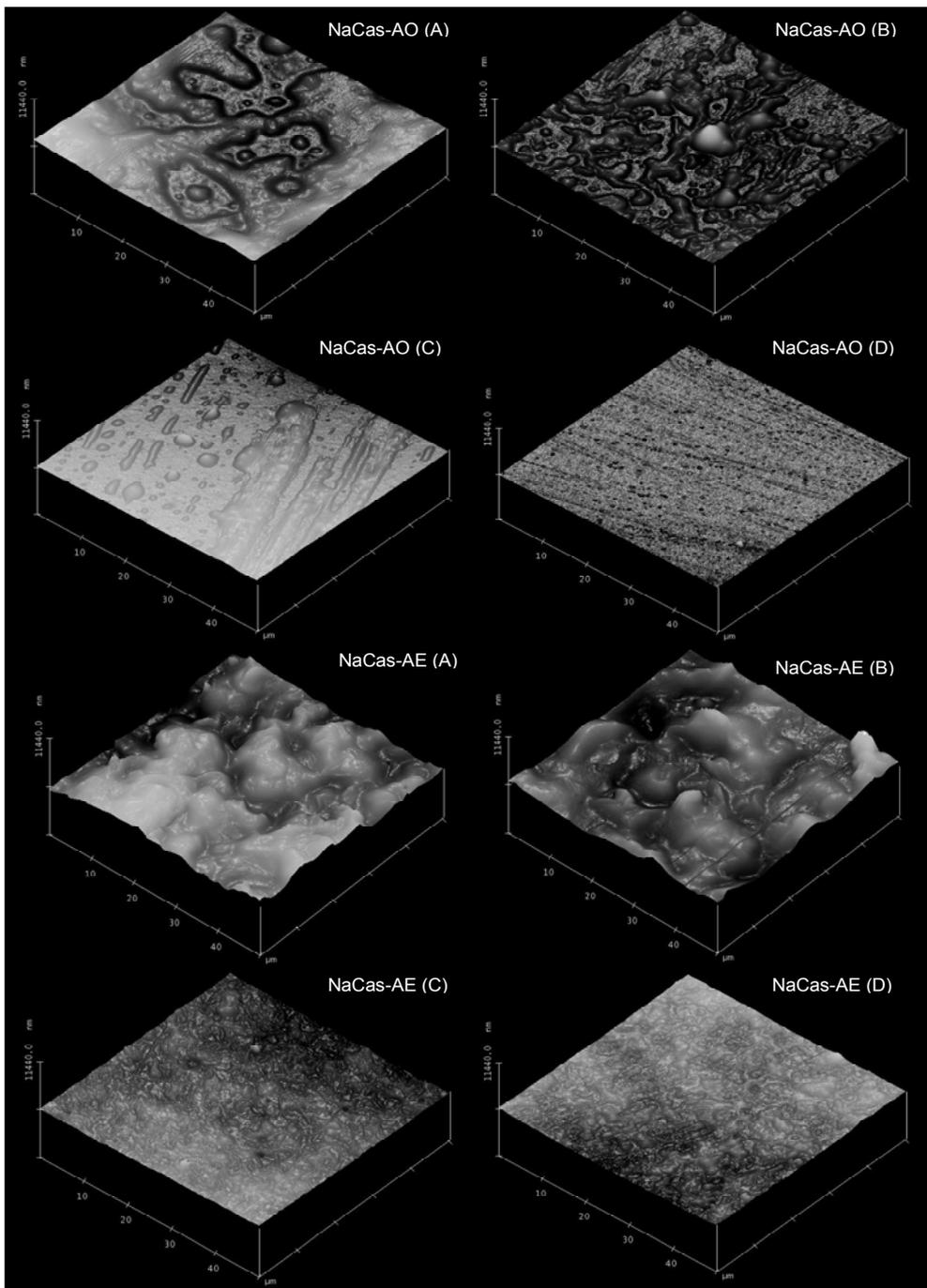
**FIGURA 3.** Micrografías de la sección transversal de los films formulados con ácido esteárico.

La estructura superficial de los films se analizó mediante la técnica de AFM. La Figura 4 muestra la topografía superficial correspondiente a una sección de 50x50 µm de los diferentes films estudiados. Se observa que el ácido oleico y el ácido esteárico imparten cierta rugosidad al film, con relieves más o menos abruptos en función del tamaño de partícula y del lípido empleado en la formulación. En general, los films formulados con ácido oleico presentan menos irregularidades que los films que incorporan ácido esteárico. Este efecto se podría atribuir a las posibles interacciones del ácido oleico con la matriz proteica y el estado líquido del mismo, lo que está asociado a una mayor homogeneidad estructural del film con respecto al films que incorpora ácido esteárico. La Tabla 5 muestra los valores de los parámetros de rugosidad ( $R_a$ ,  $R_q$ ,  $r$ ) que describen la estructura de las imágenes obtenidas por AFM para los distintos films estudiados. En este estudio, los tres parámetros aportan información complementaria, si bien los que mejor reflejan la influencia del tipo de lípido y del tamaño de partícula en la rugosidad superficial son  $R_a$  y  $R_q$ . Para ambos parámetros se observa una relación directa con el tamaño de partícula mientras que  $r(\%)$  diferencia únicamente los films preparados con el ultraturrax (formulaciones A y B) de los films preparados con el microfluidizador (C y D). Como se observa en las imágenes de la estructura superficial de los films, para una misma homogenización, el ácido esteárico proporciona mayor rugosidad que el ácido oleico consecuencia de un mayor tamaño de partícula.

**TABLA 5.** Valores de los parámetros de rugosidad y brillo.

Formulación	AO			AE		
	Ra (nm)	Rq (nm)	r (%)	Ra (nm)	Rq (nm)	r (%)
NaCas-Gly-AG (A)	115 (31) <sup>a</sup>	121 (9) <sup>a</sup>	0.9 (0.1) <sup>a</sup>	329 (15) <sup>a</sup>	402 (21) <sup>a</sup>	3.36 (0.05) <sup>a</sup>
NaCas-Gly-AG (B)	55 (20) <sup>b</sup>	82 (17) <sup>b</sup>	0.7 (0.1) <sup>a</sup>	285 (7) <sup>b</sup>	360 (10) <sup>b</sup>	3.3 (0.1) <sup>a</sup>
NaCas-Gly-AG (C)	39 (9) <sup>c</sup>	47 (14) <sup>c</sup>	0.4 (0.1) <sup>b</sup>	49.2 (0.8) <sup>c</sup>	63 (1) <sup>c</sup>	0.5 (0.1) <sup>b</sup>
NaCas-Gly-AG (D)	8 (1) <sup>d</sup>	10 (2) <sup>d</sup>	0.06 (0.01) <sup>c</sup>	41.2 (0.4) <sup>d</sup>	55 (1) <sup>d</sup>	0.6 (0.06) <sup>b</sup>

(a-d) Diferentes índices en una columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

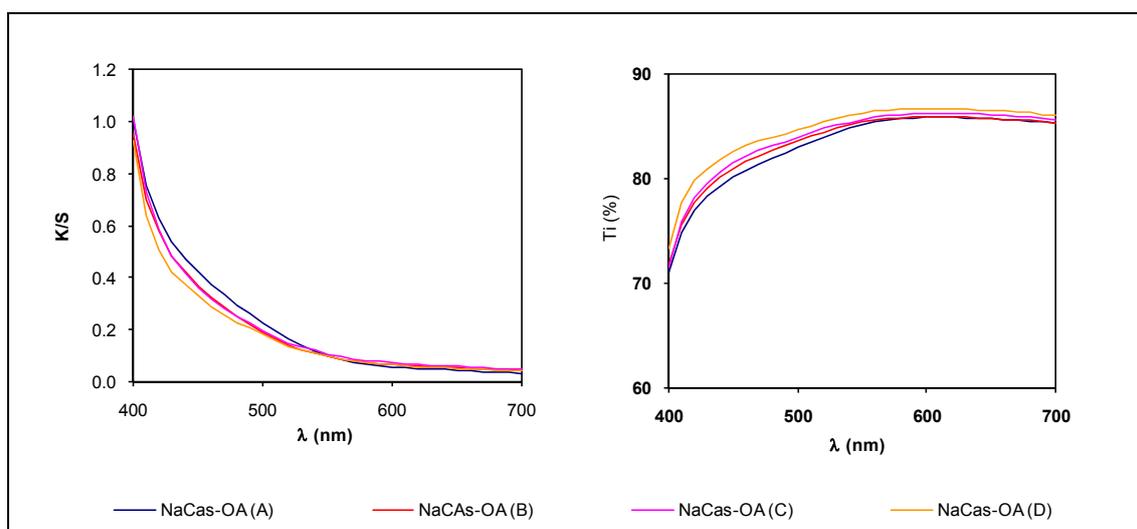


**FIGURA 4.** Imágenes de la topografía superficial de los films formulados.

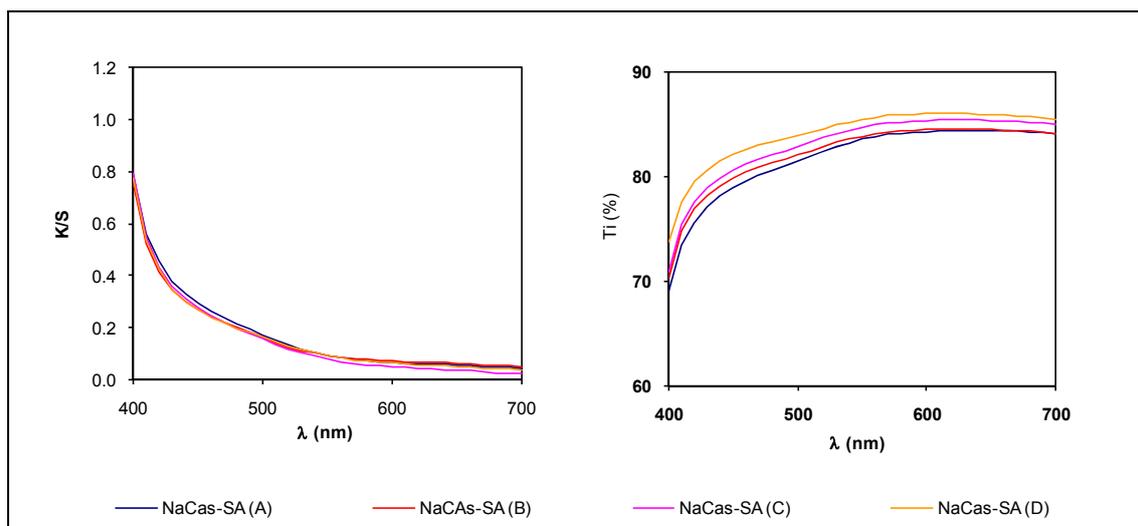
## PROPIEDADES ÓPTICAS

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 de los coeficientes de Kubelka-Munk  $K/S$  y la transmitancia interna  $T_i$ . Un aumento en el cociente  $K/S$  y  $T_i$  se relacionan con aumentos en la homogeneidad del film y, por tanto se corresponde con films más transparentes. Sin embargo, descensos en estos valores se relacionan con una mayor heterogeneidad en el film y, por tanto, con aumentos de opacidad. Las Figuras 5 y 6 presentan las curvas de distribución espectral de estos parámetros para los films formulados con ácido oleico y ácido esteárico respectivamente. Se observa que los films que contienen ácido oleico presentan valores de  $K/S$  y  $T_i$  más elevados a las distintas longitudes de onda lo que indica que estos films son más homogéneos y, por tanto, más transparentes. Como se ha visto en los apartados anteriores, el ácido esteárico confiere una mayor heterogeneidad al film, lo que conlleva a una mayor dispersión de la luz y, por tanto, aumenta la opacidad. En ambos casos, apenas se observan diferencias en los valores de  $K/S$  para los distintos tamaños de partícula obtenidos aunque sí que se observa un ligero aumento de  $T_i$  a medida que disminuye el tamaño de partícula, ya que a menor tamaño de partícula, mayor homogeneidad de la estructura y mayor  $T_i$ .

La Tabla 6 muestra los valores de brillo de los films estudiados, medidos a tres ángulos distintos. En general, al disminuir el tamaño de partícula se observa un aumento significativo en el brillo. La pérdida de brillo está atribuida a la presencia de irregularidades en el superficie de film, cuanto mayor la rugosidad, menor el brillo (Fabra et al., 2009a). Estas irregularidades superficiales resultan del crecimiento del tamaño y cremado de las partículas de lípido que ocurre con mayor facilidad al aumentar el tamaño de partícula inicial de la emulsión. Además, dado que el ácido oleico es un lípido polar, presenta una mayor compatibilidad con la proteína lo que está asociado a una mayor homogeneidad estructural del film con respecto a los films que incorporan ácido esteárico.



**FIGURA 5.** Curvas de distribución espectral de los parámetros  $K/S$  y  $T_i$  para los films formulados con AO.



**FIGURA 6.** Curvas de distribución espectral de los parámetros K/S y Ti para los films formulados con AE.

**TABLA 6.** Valores de brillo de los films.

Formulación	AO			AE		
	20°	60°	85°	20°	60°	85°
<b>NaCas-Gly-AG (A)</b>	1.1 (0.3) <sup>a</sup>	15 (2) <sup>a</sup>	28 (6) <sup>a</sup>	1.1 (0.3) <sup>a</sup>	12.6 (1.8) <sup>a</sup>	17.6 (1.6) <sup>a</sup>
<b>NaCas-Gly-AG (B)</b>	1.9 (0.6) <sup>a</sup>	17 (4) <sup>a</sup>	38 (17) <sup>a</sup>	1.9 (0.6) <sup>a</sup>	16.7 (4.2) <sup>a</sup>	25 (5) <sup>b</sup>
<b>NaCas-Gly-AG (C)</b>	1.5 (0.4) <sup>a</sup>	16 (3) <sup>a</sup>	38 (7) <sup>a</sup>	2.7 (0.9) <sup>b</sup>	16.7 (1.4) <sup>a</sup>	35 (2) <sup>c</sup>
<b>NaCas-Gly-AG (D)</b>	4.4 (1.5) <sup>b</sup>	41 (7) <sup>b</sup>	47 (9) <sup>b</sup>	4.4 (2) <sup>c</sup>	35.3 (7.5) <sup>b</sup>	50 (7) <sup>d</sup>

<sup>(a-d)</sup>Diferentes índices en una columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

## CONCLUSIONES

El tipo de lípido, el tamaño de partícula y la microestructura de la emulsión inicial y de la organización de los componentes del film seco influyen considerablemente en las propiedades de films a base de caseinato sódico. Las moléculas de ácido esteárico se asocian formando bicapas en las emulsiones formadoras de recubrimientos y estas estructuras crecen y permanecen en el film seco. Por el contrario, las partículas de ácido oleico no poseen esta capacidad de asociarse en forma de bicapas debido a la presencia del doble enlace y las partículas quedan dispersas en la matriz del film. Si bien el ácido oleico proporciona films más flexibles y elásticos que el ácido esteárico, en ambos casos, la flexibilidad de los films disminuye al reducir el tamaño de partícula. Mientras que en los films formulados con ácido oleico, el tamaño de partícula se relaciona de forma directa con la permeabilidad (mayor tamaño, mayor permeabilidad), la formación de estructuras laminares por parte del ácido esteárico disminuye la permeabilidad al vapor de agua cuanto mayor sea el tamaño de partícula. La rugosidad de los films aumenta con el tamaño

de partícula correspondiéndose con films ligeramente más opacos y con menos brillo debido a la estructura alcanzada en el film.

## AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a Pau, por confiar tanto en mí otra vez y a María José por estar ahí siempre que la necesito. También me gustaría dar las gracias a Regina y Jordi, por haber compartido la experiencia de este master conmigo y haber hecho que este año sea más fácil. Por último, gracias a mi familia, por apoyarme y ayudarme siempre.

## REFERENCIAS

- ASTM (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882. In: Annual book of American Standard Testing Methods (pp 162-170). D882. Philadelphia:ASTM.
- ASTM (1995). Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standards Designations: E96-95. In: Annual Book of ASTM Standards (pp. 406-413); American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA,°
- Fabra, M.J.; Jiménez, A.; Atarés, L.; Talens, P. y Chiralt, A. (2009a). Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10 (6), 1500-1507.
- Fabra, M.J.; Talens, P. y Chiralt, A. (2009b). Water sorption isotherms and phase transitions of sodium caseinate-lipid films as affected by lipid interactions. *Food Hydrocolloids* (enviado)
- Fernández, L.; Díaz de Apodaca, E.; Cebrián, M.; Villarán, M. C.; Matè, J. I. *Eur. Food Res. Technol.* (2006), 224 (4), 415-420.
- Gontard, N.; Guiltbert, S. (1994). *Biopackaging Technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin.* Mathlouthi, M. Ed. Blackie Academic and Professional, London. pp. 159.
- Hunter, J.R. *Emulsions.* In *Foundations of Colloid Science*; Hunter, J.R., Ed.: Oxford Science Publications: Oxford, U.K., 1989; Vol. II, pp 963-944.
- Hutchings, J.B. (1999). *Food and Colour Appearance, Second Edition.* Gaithersburg, Maryland: Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication.
- Kamper, S. L., Fennema, O. R. (1984a). Water vapour permeability of an edible, fatty acid, bilayer films. *Journal Food Science*, 49, 1482-1485.
- Kamper, S. L., Fennema, O. R. (1984b). Water vapour permeability of edible bilayer films. *Journal Food Science*, 49, 1478-1481, 1485.
- Kester, J. J., Fennema, O. R. (1989). Resistance of lipid films to water vapour transmission. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 66, 1139-1146.
- Khwaldia, K.; Perez, C.; Banon, S.; Desobry, S.; Hardy, J. (2004). Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 239-251.
- Kinsella, J.E. (1984). Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21(3), 197-262.
- Mc Hugh, T.H.; Avena-Bustillos, R. & Krochta, J. M. (1993). Hydrophobic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4): 899-903.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A review. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 42(1), 67-89.
- Nylander, T. In *Food emulsions*, 4th ed.; Friberg, S. E., Larsson, K., Sjöblom, J., Eds.; Marcel Dekker: New York, 2004, Chapter 4.
- Pérez-Gago, Maria B; Krochta, J.M. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 996-1002.