

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN LAS PROPIEDADES MECÁNICAS, PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA Y MICROESTRUCTURA DE FILMS COMESTIBLES DE CASEINATO SÓDICO

María Jeannine Bonilla Lagos, Lorena Atarés Huerta, Amparo Chiralt Boix

Resumen: Se elaboraron films comestibles de caseinato sódico (SC) con aceite esencial de canela (C) o jengibre (G) (proporción respecto a la proteína de 1:0.025 y 1:0.075) y glicerol como plastificante (1:0.3). Se caracterizaron en sus propiedades mecánicas, barrera al vapor de agua y microestructura. Se determinó la capacidad antioxidante de los aceites aislados y de los films. No se observó efecto del aceite en las propiedades mecánicas, probablemente debido a la baja proporción añadida. La presencia de aceite redujo la permeabilidad al vapor de agua ligeramente. Los fenómenos de desestabilización durante la etapa de secado provocaron irregularidades en la estructura de los films con aceite de jengibre, mientras que los formulados con aceite de canela mostraron un aspecto homogéneo, al igual que los films sin lípido. El carácter antioxidante del aceite de canela fue marcadamente superior que el determinado para el aceite de jengibre. Todos los films supusieron barreras efectivas frente a la oxidación lipídica, sin hallarse una relación directa entre el poder antioxidante de los films y el de los aceites aislados.

Palabras clave: films comestibles, caseinato sódico, aceites esenciales

Resum: S'elaboraren films comestibles de caseïnat sòdic (SC) amb olis essencials de canella (C) o gingebre (G) (proporció respecte de la proteïna de 1:0.025 i 1:0.075) i glicerol com a plastificant (1:0.3). Se caracteritzaren en les seues propietats mecàniques, barrera al vapor d'aigua i microestructura. Se va determinar la capacitat antioxidant dels olis aïllats i dels films. No es va observar cap efecte de l'oli en les propietats mecàniques, probablement per la baixa proporció present. La presència d'oli va reduir la permeabilitat al vapor d'aigua lleugerament. Els fenòmens de desestabilització durant la etapa de secat provocaren irregularitats a l'estructura dels films amb oli de gingebre, mentres que aquells formulats amb oli de canella mostraren un aspecte homogeni, al igual que els films sense lípid. El caràcter antioxidant de l'oli de canella va ser marcadament superior al de l'oli de gingebre. Tots els films foren eficaços com a barrera a la oxidació lipídica, i no se va trobar una relació directa entre el poder antioxidant dels films i el dels olis aïllats.

Paraules clau: films comestibles, caseïnat sòdic, olis essencials

Abstract: Sodium caseinate (SC) edible films were elaborated and incorporated with cinnamon (C) or ginger (G) essential oils (ratio to protein 1:0.025 and 1:0.075) and plasticized with glycerol (1:0.3). They were characterized in their mechanical properties, water vapour permeability and microstructure. Additionally, the antioxidant activity of the oils and the films

were analyzed. Oil addition did not affect the mechanical properties of the SC films, probably because of the low oil content. Water vapour permeability was slightly reduced by the lipid addition. Destabilizing phenomena taking place during the drying step may be responsible for the irregularities found in the films with ginger oil. On the other hand, those formulated with cinnamon oil were as homogeneous as films without lipid. The antioxidant activity of the cinnamon oil was markedly higher than that of the ginger oil. All films were efficient barriers to lipid oxidation, and no direct link was found between the antioxidant capacity of the films and that of the essential oils.

Key words: edible films, sodium caseinate, essential oils

INTRODUCCIÓN

Los films o recubrimientos comestibles se definen como finas capas de material apto para el consumo alimentario, que actúan como barrera frente a diferentes agentes (tales como vapor de agua, lípidos y aromas) aumentando así la vida útil del producto (Guilbert *et al.*, 1996). Su utilización supone una alternativa prometedora en el campo de la conservación de alimentos, posibilitando la disminución de residuos plásticos. Adicionalmente, estos recubrimientos ofrecen la posibilidad de incorporar aditivos de interés, tales como aromas, agentes antimicrobianos o antifúngicos, y antioxidantes (Baldwin *et al.*, 1996).

Los principales componentes de los films comestibles son proteínas (gluten de trigo, zeína de maíz, colágeno, gelatina, keratina, caseína, soja, cacahuete) polisacáridos (derivados hidrosolubles de la soja, almidones, alginatos, pectinas, carragenano) y lípidos (ceras, aceites, triglicéridos, ácidos grasos) (Quezada-Gallo *et al.*, 2000). Proteínas y polisacáridos suelen formar films de buenas características mecánicas pero, debido a su carácter hidrofílico, suponen barreras poco efectivas frente a la transferencia de vapor de agua. Por el contrario, los films lipídicos representan mayor resistencia a dicho transporte pero son normalmente opacos y relativamente inflexibles. Por lo tanto, se pueden obtener films de características mejoradas a partir de sistemas multicomponente donde proteínas o polisacáridos forman una red continua y los lípidos aportan las propiedades barrera (Quezada-Gallo *et al.*, 2000).

El caseinato sódico (SC) es un polímero soluble en agua obtenido mediante la precipitación ácida de la caseína, la proteína mayoritaria en la leche de vaca (Audic y Chaufer, 2005). Según Chen (1995), los caseinatos comerciales se obtienen precipitando la leche descremada a pH 4.6 y 20°C; las caseinas coaguladas en medio ácido se solubilizan a pH 6.7 utilizando hidróxido de sodio, potasio, calcio o magnesio; finalmente, se pasteuriza la dispersión y se somete a un secado por aspersión para obtener los productos de caseinato. Debido a la estructura y la composición en aminoácidos de las caseínas, es probable que la formación de films de estos materiales sea el resultado de la actuación de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, y fuerzas hidrofóbicas (McHugh y Krochta, 1994). Los films de SC presentan importantes ventajas, como son sus

excelentes propiedades sensoriales y su capacidad de proteger los productos alimentarios de su entorno adecuadamente (Schou *et al.*, 2005).

Han y Gennadios (2005) utilizaron el calificativo “inferior” para describir las propiedades barrera al vapor de agua de films de caseinato sódico plastificados con glicerol. Esta característica se ha mejorado en diversos trabajos a través de la adición de diferentes lípidos. Fabra *et al.* (2008) redujeron la permeabilidad al vapor de agua de films de SC a través de la incorporación de ácido oleico y cera de abeja, en proporciones proteína lípido comprendidas entre 1:0.25 y 1:0.75.

La adición de lípidos sólidos en los films, como cera candelilla, cera de abeja, cera carnauba... puede causar cierto rechazo en el consumidor. Por este motivo, convendría tener en cuenta la utilización de lípidos más atractivos para el público, como los aceites esenciales. Al igual que con otros lípidos, adicionando estos aceites se pueden modificar las propiedades barrera al vapor de agua de los films, además de obtenerse ventajas adicionales como la protección frente al crecimiento microbiano y la oxidación lipídica (Gutiérrez *et al.*, 2008; Ahn *et al.*, 2008). Ante estas ventajas, se plantea el reto de encontrar formulaciones apropiadas para retardar la oxidación de lípidos fácilmente oxidables en productos con alto contenido graso.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la adición de dos aceites esenciales (canela y jengibre) sobre las propiedades mecánicas, barrera al vapor de agua y microestructurales de films de SC. Adicionalmente, se determinó el poder antioxidante de ambos aceites a través de un método espectrofotométrico, y la capacidad de protección de los films frente a la oxidación lipídica con un método acelerado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Actividad antioxidante de los aceites esenciales

Se determinó la capacidad antioxidante de los aceites esenciales a través de un método espectrofotométrico descrito por Re *et al.* (1998). Este método está basado en comparar la actividad antioxidante de la sustancia analizada con la de un patrón antioxidante, el trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), derivado de la vitamina E (FIGURA 1 (a)). Con este fin, se utiliza el ABTS (ácido 2'2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]) previamente oxidado al radical catiónico ABTS^{•+}, de coloración azul. La estructura química del ABTS se muestra en la FIGURA 1 (b).

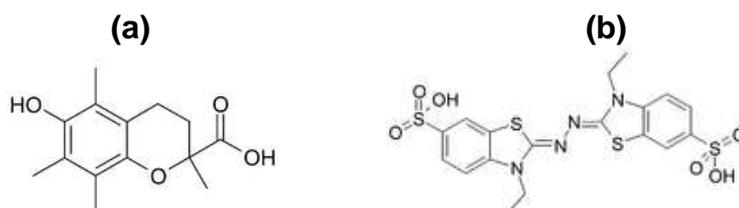


FIGURA 1. Estructura química del trolox (a) y del ABTS (b).

Se preparó una disolución acuosa de ABTS (7 mM) y persulfato potásico (2.45 mM), que permaneció en oscuridad durante unas 16h, obteniéndose el radical catiónico coloreado. Se diluyó en etanol hasta una absorbancia inicial de 0.70 (± 0.02) a 734nm (A_0). Todas las determinaciones se realizaron con un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 730, utilizando etanol como blanco, y a esa misma longitud de onda. Se diluyeron los aceites esenciales de modo que al mezclar 990 μ l de la dilución de ABTS^{•+} con 10 μ l de la dilución del aceite esencial se obtuviera una reducción de A_0 de entre 15% y 70% a los 6 minutos. Se registró el valor de A cada minuto obteniéndose finalmente A_6 . Se realizaron cinco repeticiones por determinación. El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó con la ecuación (1):

$$\% \text{reducción A} = \frac{A_0 - A_6}{A_0} \cdot 100 \quad (1)$$

Se repitió el procedimiento con diferentes diluciones de trolox como agente antioxidante (60mg/l hasta 500mg/l), para obtener una recta de calibrado que relacionara el porcentaje de reducción de A con la concentración de agente antioxidante presente para diferentes tiempos (1, 3 y 6 minutos). La capacidad antioxidante de los aceites esenciales en equivalentes de trolox (TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity) se determinó comparando el correspondiente porcentaje de reducción de la absorbancia con la curva patrón.

Diseño experimental y preparación de los films

Se dispersó SC (Llorella, Barcelona) al 8% (p/p) en agua destilada. Se añadió glicerol (Panreac Química, Castellar del Vallés, Barcelona), en proporción másica respecto a la proteína 1:0.3. Para obtener las emulsiones, se añadió aceite de canela o jengibre en dos proporciones másicas respecto a la proteína: 1:0.025 ($C_{0.025}$, $G_{0.025}$) y 1:0.075 ($C_{0.075}$, $G_{0.075}$). Se homogeneizó en ultraturrax a vacío (Janke y Kunkel, Alemania) a 13500rpm durante 3 minutos, y se desgasificó a vacío.

Para obtener los films, se vertió en placas de teflón de 150 mm de diámetro. La masa de sólidos totales (2g) se mantuvo constante para todas las formulaciones. Las muestras se dejaron secar durante 24 horas a una humedad relativa de 45 (± 2)% y a una temperatura de 22 (± 1) $^{\circ}$ C. Tras el secado, los films se despegaron de las placas de teflón y se almacenaron a 25 $^{\circ}$ C en desecadores de plástico al 33, 53 o 75% de humedad relativa utilizando disoluciones saturadas de $MgCl_2$, $Mg(NO_3)_2$ o NaCl respectivamente (Panreac química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona).

Caracterización de los films

ESPESOR

El espesor de los films se determinó utilizando un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona) con una precisión de 0.001mm.

Estas medidas se utilizaron para el tratamiento de resultados en los ensayos de propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua.

PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de los films se determinaron con una prensa universal (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, Inglaterra) de acuerdo al método estándar ASTM D882. Para cada formulación y humedad relativa (33 y 53%) se cortaron 9 muestras rectangulares (25 mm por 100 mm). Éstas se equilibraron a la humedad relativa correspondiente con soluciones saturadas de cloruro magnésico y nitrato magnésico 6-hidratado (Panreac Química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona, España) a 25 °C. Antes del ensayo de tensión se determinó el espesor de cada film en cuatro puntos. 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 50mm y 50mm·min⁻¹, respectivamente.

Las curvas de fuerza frente a distancia obtenidas en el ensayo se transformaron en curvas de tensión (σ) frente a deformación de Henky (ϵ_H) con las ecuaciones (2) y (3)

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{S(t)} = \frac{F(t) \cdot (L_0 + d(t))}{b \cdot e \cdot L_0} \quad (2)$$

$$\epsilon_H = \ln\left(\frac{L_0 + d(t)}{L_0}\right) \quad (3)$$

Donde: L_0 = longitud inicial del film (m); b = base de la muestra rectangular (m); e = espesor del film (m); $d(t)$ = incremento de la longitud de la muestra a cada tiempo (m); $S(t)$: área transversal de la muestra (m²); $F(t)$ = fuerza de tensión en cada tiempo (N).

De las curvas σ vs. ϵ_H se obtuvieron los parámetros TS (tensión de fractura, en MPa), EM (módulo de elasticidad o modulo de Young, pendiente de la zona lineal de la curva, en MPa) y E (deformación hasta el punto de fractura, expresado en porcentaje respecto a L_0).

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP)

Se estudió el efecto de tres variables (HR, T y formulación) sobre WVP para valorar las posibles interacciones entre éstas. Se utilizó una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993) para tres gradientes de humedad relativa: 33-53%, 53-75% y 53-100%. Se cortaron tres muestras circulares por formulación, seleccionando films sin defectos visibles, y se determinó el espesor en seis puntos aleatorios. Estas muestras se acoplaron sobre copas de aluminio (3.5 cm diámetro, Payne, elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica) en cuyo interior se había depositado 5ml de agua destilada (HR 100%), solución saturada de NaCl

(HR 75%), o solución saturada de nitrato magnésico 6-hidratado (HR 53%). La cara del film en contacto con el aire durante el secado se colocó en cada caso hacia el ambiente con HR 53%. Para asegurar la hermeticidad del sistema, se colocó un anillo de caucho y tres mordazas. Las copas se introdujeron en un soporte con un ventilador, y éstos en desecadores de vidrio equilibrados al 33% o al 53% con soluciones saturadas de cloruro magnésico o de nitrato magnésico 6-hidratado. Los desecadores se almacenaron a diferentes temperaturas (5, 25 y 35°C) en una cámara Hotcold UL (Selecta), y se monitorizó la masa de las copas con una balanza analítica (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 3-6 horas durante un periodo de tiempo de 24-48h.

La pendiente de la representación de la pérdida de masa frente al tiempo, se dividió entre el área expuesta para calcular la velocidad de transferencia del vapor de agua (VTVA). La presión de vapor de agua en la cara interior del film (p_2) se obtuvo con el método propuesto por McHugh *et al.* (1993), para corregir el efecto de gradientes de concentración establecidos en el espacio de cabeza de la copa (4)

$$VTVA = \frac{P \cdot D \cdot \ln \left[\frac{(P - p_2)}{(P - p_1)} \right]}{R \cdot T \cdot \Delta z} \quad (4)$$

Donde: P = presión total (atm); D = difusividad del agua en aire a 25°C (m^2/s); R = constante de los gases ($82.057 \cdot 10^{-3} m^3 atm kmol^{-1} K^{-1}$); T = temperatura (K); Δz = altura media del espacio de cabeza (m), considerando su altura inicial y final; p_1 = presión de vapor de agua en la superficie de la solución (atm); p_2 = presión de vapor corregida en la cara interior del film. Utilizando la ecuación (5), WVP se calculó a partir de p_2 y la presión de vapor de agua en la cara exterior del film (p_3).

$$WVP = \frac{VTVA}{(p_2 - p_3)} \cdot \text{espesor} \quad (5)$$

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Se obtuvieron imágenes longitudinales y transversales de los films con un microscopio electrónico de barrido JEOL®, modelo JSM-5410. Las muestras para observaciones transversales se prepararon por criofractura mediante inmersión en nitrógeno líquido. Pequeñas porciones de los films se montaron sobre portas de cobre y se recubrieron con oro. El voltaje utilizado fue 10kV.

MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

Se observó la morfología superficial de los films estudiados, previamente equilibrados al 33% de HR, utilizando un microscopio de fuerza atómica (Nanoscope III.a, Scanning Probe Microscope, Digital Instruments, Inc. Santa Barbara, California). Se cortaron tres muestras cuadradas de 1x1 cm por formulación, y se realizó un barrido superficial utilizando el modo tapping,

sobre un área de 50x50 μm y con un límite vertical máximo de 6 μm impuesto por el equipo. De acuerdo con el método ASME B46.1 (1995), se calcularon los siguientes parámetros estadísticos relacionados con la rugosidad de la superficie en cada imagen tridimensional obtenida:

Rugosidad promedio (R_a): promedio aritmético de los valores absolutos de las desviaciones de la altura respecto a un plano medio (6)

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |Z_j| \quad (6)$$

Rugosidad media cuadrática (R_q): raíz cuadrada del promedio de las desviaciones de altura desde un plano medio (Z_j) al cuadrado (7)

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N Z_j^2}{N}} \quad (7)$$

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para evaluar el efecto protector de los films frente a la oxidación lipídica, se siguió un método acelerado (Osés *et al.*, 2008). Se perforó el lateral de celdas de metacrilato y se bloqueó la perforación con un septum (6mm de diámetro). Se selló con silicona para evitar fugas. Cada celda se llenó de aceite de girasol (20g), dejando un espacio de cabeza de 15.65 cm^3 , y se cubrió con el correspondiente film (SC, SC-C_{0.075}, SC-G_{0.075}). Dos celdas se cubrieron con papel de aluminio (17 μm de espesor) para comparar la eficacia de los films con éste. Se garantizó el sellado del sistema con anillos de goma y metacrilato, vaselina, tornillos y tuercas. Se hizo pasar una corriente de nitrógeno para desplazar el oxígeno del espacio de cabeza. Se incluyeron dos celdas más sin ningún tipo de cobertura. Todas las celdas se almacenaron a 40°C en el interior de recipientes con soluciones saturadas de cloruro magnésico (32% HR). Adicionalmente, se almacenó un recipiente completamente lleno de aceite de girasol (control), herméticamente cerrado, que fue analizado al final del experimento. En intervalos de 10-12 días durante un total de 50 días, se tomó a través del septum 1ml de aceite del interior de cada celda con una jeringuilla. Para mantener la presión interna constante, se introdujo 1ml de nitrógeno simultáneamente a la extracción de cada muestra. El índice de peróxidos (IP) se determinó siguiendo la norma UNE 55-023, y los resultados se expresaron en meq de oxígeno por kg de aceite. Cada test se realizó por triplicado.

Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó a través de análisis de varianza (ANOVA) utilizando Statgraphics Plus para Windows 5.1 (Manugistics Corp., Rockville, Md.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antioxidante de los aceites esenciales

El método descrito permite cuantificar la capacidad antioxidante de una gran variedad de compuestos, midiendo la reducción del radical catiónico coloreado $ABTS^{\bullet+}$ a través de la disminución de A_{734} . Este método fue propuesto por Re *et al.* (1993) como una optimización del ensayo TEAC original, basado en la activación de la metamioglobina con H_2O_2 en presencia de ABTS para obtener $ABTS^{\bullet+}$, en presencia o ausencia de antioxidantes. El método mejorado evita que los antioxidantes de acción más rápida participen en la reducción del radical ferrilmioglobina. Esta técnica puede producir resultados que no siempre son directamente comparables con los obtenidos con el método original (Re *et al.*, 1993), y ha sido utilizada para analizar la capacidad antioxidante de diversos compuestos como uvas muscadina (Pastrana-Bonilla *et al.*, 2003), extracto de romero, aceite esencial de ajenuz, ácido carnósico, ácido rosmarínico y sesamol (Erkan *et al.*, 2008). Re *et al.* (1993) lo compararon con el método tradicional ensayando la capacidad antioxidante de un amplio grupo de compuestos: ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido cafeico, quercetina, quemferol, luteolina, naringenina, delphinidina, malvidina, cianidina, ácido ascórbico, α -tocoferol, glutatión, ácido úrico, β -caroteno, licopeno y zumo de naranja.

En la FIGURA 2. se presenta la reducción de A_{734} en función del tiempo para diferentes concentraciones de trolox (a), y la curva concentración-respuesta correspondiente a 6 minutos desde la mezcla de reactivos (b). Se obtuvo una buena correlación de ambas variables ($R^2 > 0.99$).

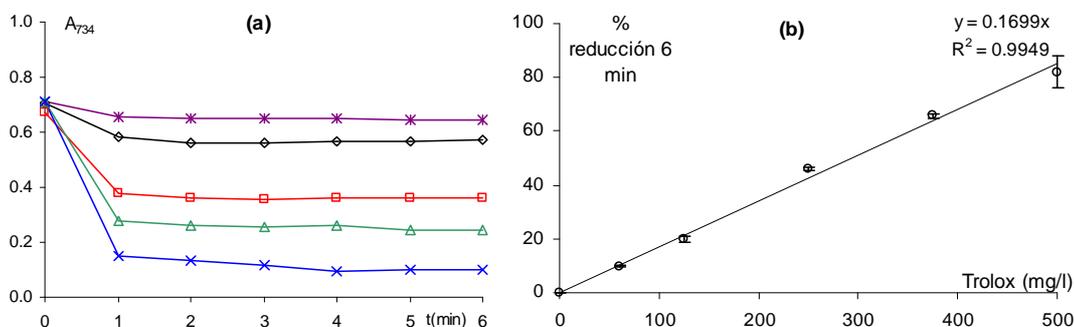


FIGURA 2. Reducción de A_{734} a diferentes concentraciones de trolox (× 60 mg/l, ○ 125 mg/l, □ 250mg/l, △ 375 mg/l, × 500mg/l) (a). Recta de calibrado a los 6 minutos de la mezcla de ABTS y trolox (b)

El ensayo de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales se llevó a cabo diluyéndolos en etanol previamente. Las proporciones de dilución fueron 1:200 para el aceite de canela y 1:20 para el aceite de jengibre. La dilución de aceite de canela proporcionó porcentajes de reducción de A_0 comprendidos entre el 61 y el 70% a los 6 minutos, mientras que con la dilución de aceite de jengibre A_0 solamente se vio reducida en porcentajes de entre 17 y 23% para el mismo tiempo de reacción. En la TABLA 1. se

recogen los resultados de la actividad antioxidante de ambos aceites esenciales en equivalentes de trolox (TEAC), definidos como la concentración de trolox (mM) cuya actividad antioxidante equivale a la del extracto.

TABLA 1. Actividad antioxidante de los aceites esenciales (TEAC). Valores promedio y desviaciones estándar en paréntesis

Actividad antioxidante TEAC (mM)			
Aceite esencial	1 min	3 min	6 min
Canela	263 (13)	288(16)	309 (18)
Jengibre	5.1 (0.8)	7.3 (1.3)	9.7 (1.5)

El aceite de canela exhibió una capacidad antioxidante significativamente superior a la del aceite de jengibre, resultados coherentes con Mantle *et al.* (1998). Estos autores determinaron el poder antioxidante de diversos extractos vegetales con diferentes métodos, entre ellos el procedimiento TEAC original, y observaron que el aceite de canela se encontraba entre los extractos de mayor actividad antioxidante. Tal capacidad se debe al alto contenido en componentes fenólicos de esta especie. Shan *et al.* (2005) estudiaron la capacidad antioxidante de 26 especias y la correlacionaron con el contenido en fenoles, obteniendo un coeficiente de correlación superior a 0.96. Estos mismos autores señalaron los siguientes componentes fenólicos mayoritarios en la canela: ácidos fenólicos, aceites fenólicos volátiles (2-hidroxicinamaldehído, cinamil aldehído, derivados) y 3-flavanoles. El aceite de jengibre tiene una ligera actividad antioxidante, debido a la presencia de aceites fenólicos volátiles en menor proporción que en el aceite de canela.

Caracterización de los films

PROPIEDADES MECÁNICAS

La FIGURA 3. muestra dos curvas de tensión típicas de films de SC a diferentes humedades relativas, y la TABLA 2. recoge los resultados de los parámetros mecánicos EM, TS y E de todas las formulaciones estudiadas, previamente equilibradas a dos niveles de humedad relativa (33 y 53%).

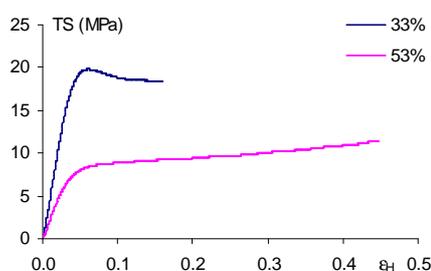


FIGURA 3. Curvas típicas de esfuerzo deformación de los films de SC determinados a dos niveles de humedad relativa: 33% y 53%.

TABLA 2. Parámetros mecánicos de los films estudiados, previamente equilibrados a 33 o a 53% de humedad relativa. Valores promedio y desviaciones estándar en paréntesis.

Formulación	33%			53%		
	EM (MPa)	TS (MPa)	E (%)	EM (MPa)	TS (MPa)	E (%)
SC	546 (82) ^a	21 (3) ^a	13 (6) ^a	180 (45) ^a	11 (2) ^a	67 (17) ^a
SC-C _{0.025}	573 (68) ^a	22 (3) ^a	13 (6) ^a	156 (44) ^a	10.2 (1.6) ^a	67 (19) ^a
SC-C _{0.075}	579 (85) ^a	24 (5) ^a	22 (17) ^a	160 (33) ^a	11.4 (1.8) ^a	76 (21) ^a
SC-G _{0.025}	578 (66) ^a	22 (2) ^a	18 (11) ^a	154 (55) ^a	10 (2) ^a	57 (24) ^a
SC-G _{0.075}	559 (98) ^a	22 (4) ^a	16 (11) ^a	170 (37) ^a	11.6 (1.7) ^a	72 (28) ^a

La humedad relativa tuvo un efecto muy relevante sobre las propiedades mecánicas. Al incrementarse esta variable desde 33% hasta 53%, EM y TS se redujeron en un factor comprendido entre 2 y 4. La extensibilidad también se vio ampliamente afectada, multiplicándose por un factor de entre 3 y 5. Estos resultados ponen de manifiesto el notable efecto plastificante del agua sobre los films de SC, de naturaleza hidrofílica. Según Chen (1995) el agua es el plastificante más común y la humedad relativa ambiental afecta en gran medida a las propiedades mecánicas del film. Las moléculas de agua pueden interactuar con las proteínas a través de puentes de hidrógeno (Audic y Chaufer, 2005) suavizando la estructura y proporcionándole un mayor nivel movilidad molecular, por lo que se obtienen materiales menos rígidos, menos resistentes y más extensibles que a niveles de humedad reducidos. El efecto plastificante del agua sobre films de caseinato sódico ha sido observado por diversos autores (Audic y Chaufer, 2005; Fabra *et al.*, 2009; Arvanitoyannis y Biliaderis, 1998).

La presencia, tipo y proporción de los aceites esenciales no tuvo un efecto significativo sobre los parámetros mecánicos, probablemente debido a la pequeña proporción adicionada. Según Chen (1995) los films proteicos son más fuertes y extensibles que aquéllos a los que se les ha adicionado un componente lipídico. Sin embargo, en la bibliografía se han encontrado efectos muy diversos de la adición de lípidos sobre las variables mecánicas. Por lo general, estos estudios se refieren a films con una proporción lipídica muy superior a las utilizadas en el presente estudio, donde la incorporación de aceites esenciales como único agente lipídico fue limitante, debido al fuerte olor del aceite de canela y a la intensa coloración amarilla que proporciona a los films.

En estudios previos, la adición de aceite de canela en las mismas proporciones afectó a las propiedades mecánicas de films de proteína de soja (SPI) haciéndolos más resistentes y extensibles. En el presente estudio estas proporciones de aceite parecen insuficientes para llegar a afectar al comportamiento mecánico, lo que podría deberse a las diferencias estructurales de ambas proteínas. Los films de SPI, plastificados con glicerol (1:0.3) y previamente equilibrados al 33% HR fueron significativamente menos rígidos, menos resistentes y menos extensibles que los films de SC

($p < 0.01$). En conclusión, la estructura de la matriz de SC, siendo más rígida, resistente y extensible que la de SPI, no se ve significativamente afectada por la presencia del lípido en las proporciones ensayadas.

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP)

La TABLA 3. recoge los resultados de WVP de todas las formulaciones en cada combinación de temperatura- gradiente de HR ensayada. El análisis estadístico de los resultados se realizó para cada gradiente de HR por ser esta variable, entre las tres ensayadas (HR, temperatura y formulación), la que tuvo un mayor impacto sobre los valores de WVP ($p = 0.00$).

TABLA 3. WVP ($\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) para todos los films y condiciones experimentales. Valores promedio y desviaciones estándar en paréntesis. Los superíndices ^{abc} denotan grupos homogéneos en función de la temperatura (horizontalmente) y ^{xyz} en función de la formulación (verticalmente)

HR	Film	5°C	25°C	35°C
33-53%	SC	0.58 (0.18) ^{a,x}	0.48 (0.08) ^{ab,x}	0.362 (0.011) ^{b,x}
	SC-C _{0.025}	0.54 (0.19) ^{a,x}	0.64 (0.14) ^{a,y}	0.407 (0.006) ^{a,y}
	SC-C _{0.075}	0.71 (0.17) ^{a,x}	0.57 (0.11) ^{ab,xy}	0.39 (0.04) ^{b,xy}
	SC-G _{0.025}	0.70 (0.18) ^{a,x}	0.57 (0.06) ^{a,xy}	0.381 (0.013) ^{b,xy}
	SC-G _{0.075}	0.65 (0.19) ^{a,x}	0.52 (0.09) ^{ab,x}	0.40 (0.02) ^{b,y}
53-75%	SC	3.2 (0.4) ^{a,x}	1.8 (0.2) ^{b,x}	3.1 (0.3) ^{a,x}
	SC-C _{0.025}	2.2 (0.4) ^{a,y}	2.14 (0.13) ^{a,x}	2.3 (0.3) ^{a,y}
	SC-C _{0.075}	2.6 (0.4) ^{a,y}	1.7 (0.3) ^{b,x}	2.7 (0.2) ^{a,xy}
	SC-G _{0.025}	2.29 (0.10) ^{a,y}	2.1 (0.3) ^{a,x}	2.65 (0.07) ^{b,y}
	SC-G _{0.075}	2.6 (0.3) ^{a,y}	1.8 (0.4) ^{b,x}	2.39 (0.10) ^{ab,y}
53-100%	SC	3.7 (0.2) ^{a,x}	3.4 (0.8) ^{a,x}	4.0 (0.5) ^{a,x}
	SC-C _{0.025}	2.9 (0.8) ^{a,x}	3.5 (0.2) ^{a,x}	3.2 (0.4) ^{a,y}
	SC-C _{0.075}	3.2 (0.4) ^{a,x}	2.9 (0.5) ^{a,x}	3.4 (0.3) ^{a,xy}
	SC-G _{0.025}	2.9 (0.7) ^{a,x}	3.6 (0.4) ^{a,x}	3.2 (0.4) ^{a,y}
	SC-G _{0.075}	3.2 (0.3) ^{a,x}	2.9 (0.8) ^{a,x}	3.2 (0.4) ^{a,y}

Los resultados de la TABLA 3. revelan que los films de SC son altamente permeables al vapor de agua, coherentemente con el carácter hidrofílico de la proteína (McHugh, 2002). Han y Gennadios (2005) hicieron una extensa revisión de las características más relevantes de diferentes materiales, en la que las propiedades barrera al vapor de agua de varias proteínas (SC, caseinato cálcico, proteína de suero de leche, proteína de soja, gluten de trigo) fueron clasificadas como marginales o incluso inferiores. Nuestros resultados son similares a los encontrados en la bibliografía. Kristo *et al.*

(2007) determinó WVP (25°C, HR 53-100%) de films de SC plastificados con sorbitol (1:0.33), obteniendo como resultado $4.0 \pm 0.3 \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Schou *et al.* (2005) obtuvieron aproximadamente $3 \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ trabajando con films de SC: glicerol 1:0.32 (23°C, 50-100%). Fabra *et al.* (2008) determinaron que la WVP de films de SC:Glicerol 1:0.3 a 5°C y HR 58-100% era de $4.1 \pm 0.3 \text{ g}\cdot\text{mm}\cdot\text{kPa}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$

Como puede observarse en la TABLA 3., un incremento de la HR presente en el sistema se traduce en un importante aumento de WVP. Según Gennadios *et al.* (1994), WVP de un film es una constante que debería ser independiente del gradiente de humedad (no así de la temperatura), lo que no ocurre con films comestibles hidrofílicos donde las moléculas de agua interaccionan con los grupos polares de la película. Estos mismos autores señalan que los valores de WVP de films comestibles hallados experimentalmente a un gradiente de humedad relativa determinado, deben referirse a dicho gradiente. En condiciones de humedad relativa elevada, la rigidez del film se ve reducida por el efecto plastificante del agua. En estas condiciones, se facilita la movilidad molecular en el sistema, y por lo tanto todas las propiedades dependientes de la difusión molecular como la transferencia de materia a través del film, con el consiguiente aumento de WVP. Este efecto de HR sobre WVP de films de SC ha sido previamente expuesto por Fabra *et al.* (2009).

Según Han & Gennadios (2005), la temperatura es un factor importante en los fenómenos de transferencia de materia, dado que su aumento aporta más energía a las sustancias en migración, incrementándose así la permeabilidad. Sin embargo, en el presente estudio el efecto de la T fue variable dependiendo del gradiente de humedad aplicado. Mientras que a 33-53% un incremento de T redujo WVP ($p=0.00$), a 53-75% los films fueron más eficientes a 25°C ($p=0.00$), y a 53-100% no hubo efecto significativo de la temperatura ($p>0.05$).

Ciertamente, un aumento de T promueve la movilidad molecular, pero éste no es el único factor a tener en cuenta. La correlación negativa de T y WVP al menor gradiente de HR podría explicarse en base a un aumento de las interacciones hidrofóbicas en la matriz proteica, que reducirían el transporte de agua. A HR baja, la estructura del film es relativamente rígida y la movilidad molecular está impedida en el sistema. Probablemente en estas circunstancias WVP desciende por el efecto de la temperatura sobre las interacciones hidrofóbicas, ya que la estructura se encuentra escasamente plastificada por moléculas de agua. Además, al aumentar la temperatura se reduce la capacidad de retención de agua por parte del film, lo que a su vez reduciría la movilidad molecular. Así pues, los valores de WVP más reducidos de todos los determinados fueron aquéllos obtenidos a 33-53% de HR y 35°C. Este efecto de la temperatura sobre las propiedades barrera al vapor de agua fue previamente descrito por Fabra *et al.* (2009). Por el contrario, a HR elevada no se observa ningún efecto relevante de la temperatura sobre WVP (TABLA. 3), probablemente debido a que el efecto plastificante del agua estaría favoreciendo la movilidad y por tanto atenuando el impacto de las interacciones hidrofóbicas sobre WVP.

Para el gradiente de HR 53-75%, los films fueron más eficientes como barrera al vapor de agua a la temperatura intermedia, 25°C. Estos resultados pueden deberse al efecto conjunto de la temperatura sobre, por un lado, la movilidad molecular (correlación positiva), y por otro lado las interacciones hidrofóbicas y la capacidad de retención del agua por parte del film (correlación negativa). El comportamiento del film frente a la transferencia de moléculas de agua a su través dependerá del balance de estos dos efectos contrapuestos.

Un análisis estadístico de todos los resultados reveló la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la WVP de los films de SC y aquéllos con aceites esenciales, siendo la de éstos últimos menor, debido al carácter hidrofóbico de los lípidos. No se encontraron diferencias significativas en función del tipo o proporción de aceite. La utilización de aceites esenciales, como se ha comentado anteriormente, limitó la proporción máxima de lípido adicionado, lo que probablemente impidió observar diferencias en función de la cantidad de lípido. Según Chen (1995), existe una correlación positiva entre la proporción de lípido (monoglicérido acetilado) y las propiedades barrera al vapor de agua de films de SC.

Las diferencias en función de la formulación (presencia/ausencia de aceite) fueron más marcadas cuanto mayor fue la HR a la que se encontraban los films. Aparentemente, el incremento de la humedad ambiental promovió la movilidad molecular en los films de SC en mayor medida que en aquéllos con aceites esenciales. Así pues, el carácter hidrofílico de la proteína determinaría una mayor captación de agua y por lo tanto mayor movilidad y WVP, mientras que la adición de aceites esenciales, incluso a bajas proporciones, moderaría esta tendencia.

En un estudio previo se estudió la WVP de films de proteína de soja y los mismos aceites, y se observó una tendencia al incremento de WVP a bajas proporciones de aceite. Este fenómeno se podría atribuir a las discontinuidades que se crean en la red proteica de SPI cuando se adiciona un agente hidrofóbico. En el presente trabajo no se observó tal efecto, lo que sugiere diferencias estructurales entre ambas proteínas y discrepancias en las interacciones proteína-lípido.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microestructura final de los films es el resultado de las interacciones entre sus componentes y de los posibles fenómenos de desestabilización que pueden tener lugar durante la etapa de secado. El análisis de la microestructura de los films permite obtener información sobre el modo en que los componentes se encuentran organizados en el mismo, y facilita la interpretación de resultados de propiedades barrera, mecánicas, etc. En las FIGURAS 4. y 5. se presentan imágenes características de la fractura transversal y de la superficie de las cinco formulaciones estudiadas, obtenidas a 1000X y 750X, respectivamente. La microestructura de estos films se estudió de modo cualitativo, con el fin de observar el efecto de los aceites esenciales sobre la estructura de la matriz proteica.

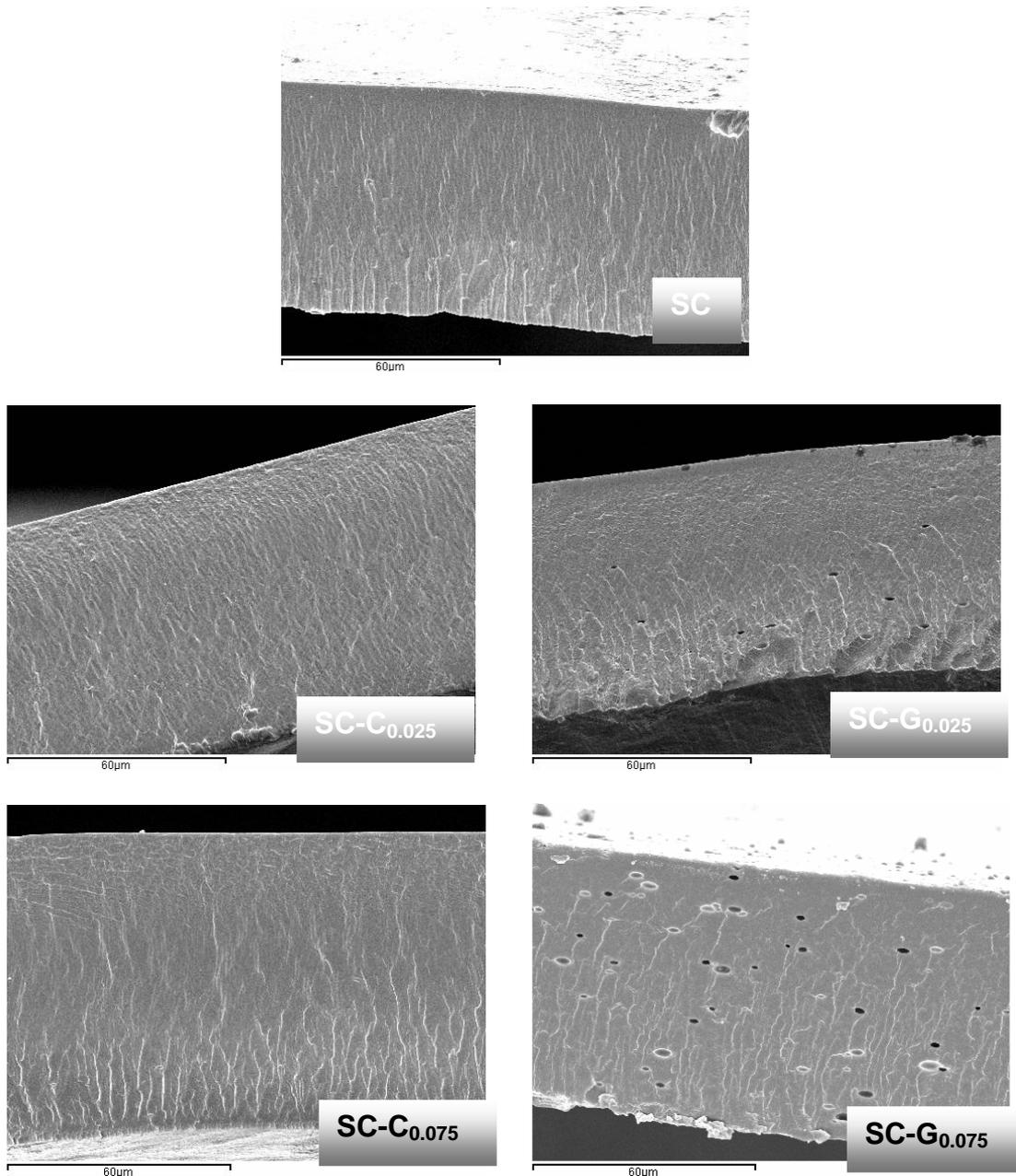


FIGURA 4. Micrografías de la sección transversal de las formulaciones estudiadas

Los films sin lípido y aquéllos con aceite de canela presentaron una fase homogénea, sin que se observaran en su estructura defectos como burbujas o gotas de aceite. Sin embargo, en los films que incorporaban aceite de jengibre se observaron huecos que fueron más numerosos cuanto mayor era la proporción de aceite en el sistema. Así pues, estas cavidades corresponderían a gotas de aceite de jengibre, de tamaño apreciable al nivel de magnificación utilizado, debido a fenómenos de floculación y coalescencia durante la etapa de secado de los films. El aspecto de estas gotas en las micrografías es cóncavo o convexo en función del efecto de la

criofractura sobre la estructura. Para ninguna formulación se observó separación de fases, y las gotas de aceite de jengibre permanecieron homogéneamente dispersas a lo largo del espesor del film. Las diferencias estructurales vienen determinadas por el comportamiento de ambos aceites durante la etapa de secado, consecuencia de las complejas interacciones lípido-lípido y proteína-lípido en el sistema.

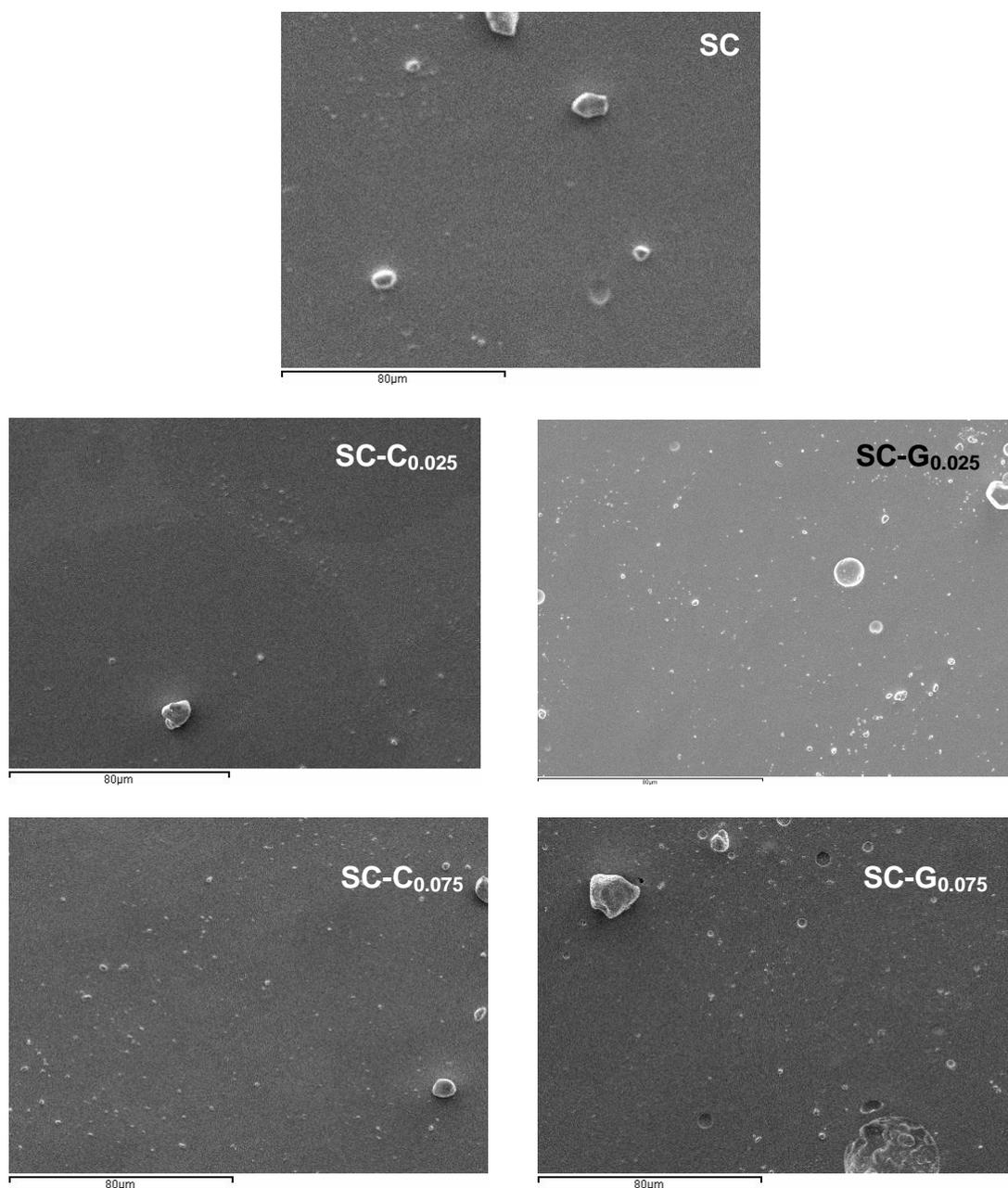


FIGURA 5. Micrografías superficiales de las formulaciones estudiadas

En los films sin lípido se observó una cierta irregularidad superficial debida a partículas de SC no dispersado. La adición de aceites en bajas proporciones no impactó de modo relevante en el aspecto superficial de los films, que podrían calificarse como relativamente lisos y regulares. A

mayores proporciones de aceite, pareció incrementarse la presencia de irregularidades en la superficie. Para cuantificar el efecto de ambos aceites sobre la topografía superficial de los films, se realizó un estudio de AFM.

MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

En la FIGURA 6. se muestran imágenes típicas de los films obtenidas por AFM, y los resultados de los parámetros de rugosidad (R_a y R_q) están representados en la FIGURA 7.

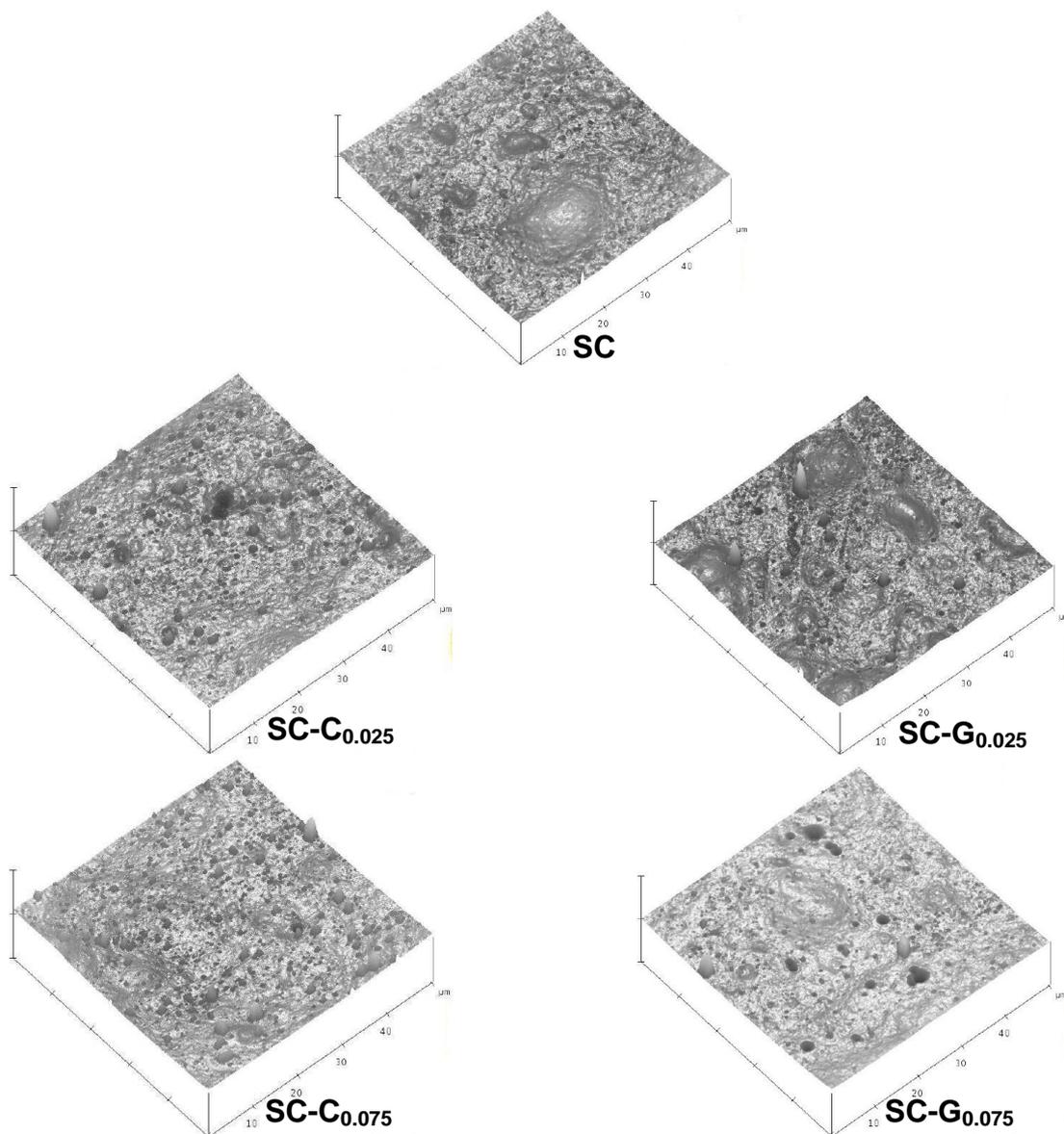


FIGURA 6. Imágenes típicas obtenidas por AFM de las films estudiados

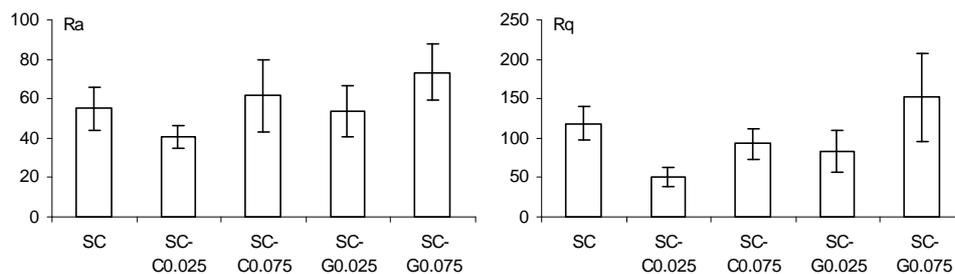


FIGURA 7. Resultados de los parámetros de rugosidad R_a y R_q .

La presencia de un agente lipídico en los films de SC se reflejó en una reducción de la rugosidad superficial para films con ambos aceites, probablemente debido al estado líquido de los mismos, lo que posibilita que se dispongan rellenando irregularidades propias de la estructura proteica. Sin embargo, al incrementarse la proporción de aceite en la formulación, se promovió la formación de discontinuidades en la superficie, aumentándose así la rugosidad. En cuanto a diferencias de comportamiento entre ambos aceites, se observó cierta tendencia hacia mayores valores de rugosidad en films con aceite de jengibre, en comparación con los que tenían aceite de canela, para ambos parámetros calculados y para ambas proporciones estudiadas (1:0.025 y 1:0.075). Esta tendencia es coherente con las diferencias de comportamiento de ambos aceites durante el secado, observándose un menor grado de integración con la matriz proteica en el caso de aceite de jengibre.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La FIGURA 8. muestra la evolución temporal de IP del aceite de girasol protegido por diferentes films (SC, SC-C_{0.075}, SC-G_{0.075}), por papel de aluminio, y descubierto.

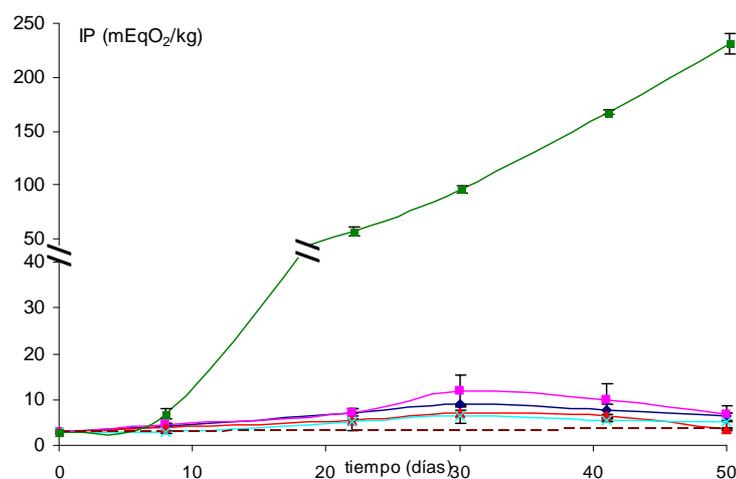


FIGURA 8. Evolución temporal de los valores de IP del aceite control (---), en celdas descubiertas (\square), cubiertas con papel de aluminio (\times) y con films de SC (\diamond), SC-C_{0.075} (\square) y SC-G_{0.075} (Δ).

Todas las formulaciones de SC supusieron barreras a la oxidación lipídica muy efectivas, ya que los valores de IP permanecieron próximos al control (recipiente de aceite sin espacio de cabeza) y a las celdas cubiertas por papel de aluminio. Por el contrario, el aceite expuesto a la atmósfera se oxidó a un ritmo muy superior. En comparación con los films de SC, la adición de aceites esenciales tuvo un efecto variable. En films con aceite de canela, IP mostró una tendencia hacia valores mayores, al contrario que con jengibre. Estos resultados sugieren que la capacidad antioxidante de los aceites aislados no está directamente relacionada con la actividad antioxidante de los films, lo que podría deberse a un efecto adicional de los aceites sobre la permeabilidad al oxígeno de las películas. La incorporación de aceite a la estructura podría promover la difusión del oxígeno a su través, lo que justificaría una tendencia hacia mayores valores de IP. A pesar de esta tendencia, todos los films ensayados serían en principio apropiados como protectores frente a la oxidación lipídica.

CONCLUSIONES

El aceite de canela exhibió un poder antioxidante marcadamente superior al del aceite de jengibre, aunque esta diferencia no se reflejó en el poder antioxidante de los films. Por el carácter hidrofílico del SC, la humedad relativa fue el factor determinante de las propiedades mecánicas y WVP. La baja proporción de aceite adicionado no permitió ver su efecto sobre las propiedades mecánicas, y limitó el impacto sobre WVP. El estudio microestructural reveló diferencias de comportamiento entre ambos aceites esenciales, permaneciendo el aceite de canela más homogéneamente distribuido en la red proteica.

REFERENCIAS

- Ahn, J.H.; Kim, Y.P.; Seo, E.M.; Choi, Y.K. y Kim, H.S. (2008). Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal of Food Engineering* 84, 327-334.
- Arvanitoyannis, I. y Biliaderis, C.G. (1998). Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends. *Food Chemistry*, 62 (3), 333-342.
- ASTM Standard test methods for water vapor transmission of materials. Standards Designations: E96-95. *Annual Book of ASTM Standards*; American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA, 1995; pp 406-413.
- ASTM Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882. *Annual Book of American Standard Testing Methods*; American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA 2001; pp 162-170.
- Audic, J.L. y Chaufer, B. (2005). Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal* 41, 1934-1942

- Baldwin, E.A.; Nisperos, M.O.; Chen, X. y Hagenmaier R.D. (1996). Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology* 9, 15-1-63
- Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science* 78: 2563-2583.
- Erkan, N.; Ayranci, G. y Ayranci, E. (2008). Antioxidante activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry* 110, 76-82.
- Fabra, M.J.; Talens, P. y Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering* 85, 393-400
- Fabra, M.J.; Jimenez, A.; Atarés, L.; Talens, P. y Chiralt, A. (2009). Effect of Fatty Acids and Beeswax Addition on Properties of Sodium Caseinate Dispersions and Films. *Biomacromolecules*, 10, 1500 – 1507.
- Gennadios, A.; Weller, C.L. y Gooding, C.H. (1994). Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering* 21, 395-409.
- Guilbert, S.; Gontard, N. y Gorris, L.G.M. (1996). Prolongation of shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29 (1,2), 10-17.
- Gutiérrez, J.; Barry-Ryan, C. & Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91-97.
- Han, J. H. & Gennadios, A. (2005). Edible films and coatings: A review. *Innovations in Food Packaging*, 239-262.
- Kristo E., Biliaderis, C.G. y Zampraka, A. (2007). Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: biopolimer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chemistry*, 101, 753-764.
- Mantle, D.; Anderton, J.G.; Falkous, G.; Barnes, M.; Jones, P. y Perry, E.K. (1998). Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comparative Biochemistry and Physiology* 121, 385-391.
- McHugh, T. H. (2002). Protein-lipid interactions in edible films and coatings. *Nahrung* 44 (3), 148-151.
- McHugh, T.H. y Krochta, J.M. (1994). Milk-protein based edible films and coatings. *Food Technology*, 48(1), 97-103.
- Mc Hugh, T. H., Avena-Bustillos, R., y 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.
- Osés, J., Fernández-Pan, I., Ziani, K. y Maté, J.I. (2008). Use of edible films based on whey protein isolate to protect foods rich in polyunsaturated fatty acids. *Eur Food Res Technol* 227, 623-628.

- Pastrana-Bonilla, E.; Akoh, C.C.; Sellappan, S. y Krewer, G. (2003). Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5497-5503.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. y Rice-Evans, C. (1998). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Schou, M.; Longares, A.; Montesinos-Herrero, C.; Monahan, F.J.; O'Riordan, D. y O'Sullivan, M. (2005). Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *LWT* 38, 605-610.
- Shan, B.; Cai, Y.Z.; Sun, M. y Corke, H (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7749-7759
- Quezada-Gallo, J.A.; Debeaufort, F.; Callegarin, F. y Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. *Journal of Membrane Science* 180, 37-46.