

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA



**EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE SUERO DE
MANTEQUILLA EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE FILMS
COMESTIBLES DE ALMIDÓN DE MAÍZ**

MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

Presentado por:
Olga Moreno Marro

Directoras académicas:
Amparo Chiralt Boix
Lorena Atarés Huerta

Directora Experimental:
Clara Pastor Navarro

EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE SUERO DE MANTEQUILLA EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE FILMS COMESTIBLES DE ALMIDÓN DE MAÍZ

Olga Moreno Marro, Lorena Atarés Huerta, Amparo Chiralt Boix, Consuelo González Martínez, Clara Pastor Navarro, Justine Muller

Resumen: Se elaboraron films comestibles utilizando almidón de maíz (AM) y suero de mantequilla (SM) en diferentes proporciones (100:0, 75:25, 50:50 y 60:40), con glicerol como plastificante. Se caracterizaron las propiedades más relevantes de las formulaciones formadoras de recubrimiento (Tamaño de partículas dispersas, potencial zeta, comportamiento reológico), así como de los films obtenidos por extensión y secado (microestructura, propiedades mecánicas, de barrera al vapor de agua, ópticas y actividad antioxidante) en los films equilibrados a 53% de humedad relativa (HR) y 25°C. La incorporación de suero de mantequilla provocó un descenso del tamaño medio de partículas, un incremento de su carga superficial y un descenso de su viscosidad aparente en las dispersiones formadoras de film. La microestructura de los films reflejó falta de compatibilidad entre el almidón y los componentes del SM (básicamente la seroproteína) lo que llevó a separación de fases: una rica en almidón y otra en proteína y a la formación de una estructura heterogénea. Esto comportó la pérdida de resistencia mecánica de los films, de transparencia y de brillo, así como un amarilleamiento progresivo al aumentar la proporción de SM. La permeabilidad al vapor de agua de los films no se modificó significativamente por la adición de SM, excepto cuando esta fue del 60% cuando también los films aumentaron mucho su higroscopicidad y capacidad de adsorción de agua. Tanto el SM como los films que contenían el mismo presentaron actividad antioxidante.

Palabras clave: films comestibles, almidón de maíz, suero de mantequilla.

Resum: S'elaboraren films comestibles emprant midó de dacsà (AM) i sèrum de mantega (SM) a diferents proporcions (100:0, 75:25, 50:50 y 60:40), amb glicerol com a plastificant. Es caracteritzaren les propietats més rellevant de les formulacions formadores de recobriment (mida de partícules disperses, potencial zeta, comportament reològic), així com dels films obtinguts per extensió i secat (microestructura, propietats mecàniques, de barrera al vapor d'aigua, òptiques i activitat antioxidant) als films equilibrats a 53% d'humitat relativa y 25°C. La incorporació de sèrum de mantega va provocar un descens de la mida de partícula, un increment de la seua càrrega superficial i un descens de la seua viscositat aparent a les dispersions formadores de film. La microestructura dels films va reflectir falta de compatibilitat entre el midó i els components del SM (bàsicament la seroproteïna), el que va conduir a la separació de fases: una rica en midó i altra en proteïna, i a la formació d'una estructura heterogènea. Açò va comporta la pèrdua de resistència mecànica dels films, de transparència i brillantor, així com un engrogiment progressiu al augmentar la proporció de SM. La permeabilitat

al vapor d'aigua dels films no es va modificar significativament debut a l'adició de SM, exceptuant quan aquesta va ser del 60%, quan també els films van augmentar molt la seua higroscopicitat i capacitat d'absorció d'aigua. Tant el SM com els films que contenien el mateix, van presentar capacitat antioxidant.

Paraules clau: films comestibles, midó de dacsa, sèrum de mantega.

Abstract: Corn starch and buttermilk in different proportions (100:0, 75:25, 50:50 and 60:40) and glycerol as plasticizer, were used to formulate edible films. The coating forming dispersions were characterized (particle size, z-potential, rheological behaviour), as well as the films obtained by casting and stored at 53%RH and 25°C (microstructure, mechanical properties, water vapour permeability, optical properties and antioxidant activity). In the film forming dispersions, the incorporation of buttermilk resulted in a decrease in the average size of the particles, an increase of their surface charge and an apparent viscosity decrease. The microstructural studies of the films showed the incompatibility of starch and buttermilk (whose main component is whey protein), leading to the separation of two phases (starch and protein) and a heterogeneous structure. This resulted in films with little mechanical resistance, high opacity and little gloss, as well as higher yellowness, as the buttermilk proportion was increased. Water vapour permeability of the films was not significantly modified by buttermilk addition, except at the highest proportion (60%), when the films became highly hygroscopic. Both buttermilk and the films containing it exhibited antioxidant capacity.

Key words: edible films, corn starch, buttermilk.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la gran mayoría de los materiales plásticos utilizados son materiales derivados del petróleo (Saiah et al., 2009). Además, se estima que alrededor de la tercera parte de la producción mundial de plástico se destina al envasado de productos alimentarios (Wiles, 2005). La utilización de estos materiales no biodegradables representa un importante problema medioambiental a nivel mundial (Azeredo, 2009), ya que algunos de estos materiales son altamente contaminantes, y su reciclado supone un elevado coste energético (Sánchez-García et al., 2008). Ante esta situación, numerosas investigaciones recientes se han centrado en la sustitución de los plásticos sintéticos por polímeros biodegradables (biopolímeros) obtenidos a partir de recursos renovables (Saiah et al., 2009), cuya utilización podría minimizar el impacto medioambiental de los plásticos procedentes del petróleo (Sánchez-García et al., 2008).

De entre los materiales biológicos capaces de formar films, los polisacáridos representan la fuente más abundante (Carvalho, 2008). El almidón es ampliamente utilizado debido a importantes ventajas como su bajo coste, fácil accesibilidad en el mercado y gran disponibilidad (Cuq et al., 1997, Carvalho, 2008). El almidón nativo, previo tratamiento con plastificantes bajo calentamiento, adquiere propiedades termoplásticas

similares a las de los polímeros sintéticos comunes. El material así obtenido recibe el nombre de almidón termoplástico (thermoplastic starch, TPS).

En el ámbito alimentario, el desarrollo de materiales de envase con propiedades bioactivas, que sean además biodegradables y tengan adecuadas propiedades físicas (mecánicas y de barrera a la humedad y a los gases) ha cobrado especial relevancia en los últimos años por diversos motivos, incluyendo tanto razones medioambientales como la demanda, por parte del consumidor, de productos más seguros y de mejor calidad. La incorporación de compuestos activos en los envases aumenta la eficacia de éstos en la conservación de los alimentos convirtiendo al envase en un vehículo de compuestos de interés para la conservación del alimento e incluso mejorando las propiedades nutricionales del mismo cuando se trata de compuestos con funciones nutracéuticas para el consumidor.

Se han realizado numerosos e importantes esfuerzos en cuanto al desarrollo y caracterización de films elaborados a partir de almidón de diferentes orígenes, a las cuales se habían incorporado diferentes ingredientes bioactivos (Pyla et al., 2010; Kechichian et al., 2010; Shen et al., 2010; Mathew & Abraham, 2008).

El suero de mantequilla o mazada es un producto lácteo que se obtiene del batido de la nata para obtener mantequilla. Tras su secado por atomización, se obtiene un producto en polvo cuyos componentes mayoritarios son lactosa, proteínas, grasa y sales minerales. La ruptura de la membrana del glóbulo graso durante el proceso libera al suero una importante cantidad de proteínas y péptidos de membrana que tienen propiedades antioxidantes y otras propiedades fisiológicas (Affolter et al. 2010; Michalski & Januel, 2006). Diversos estudios previos han señalado el papel antioxidante de la mazada, tal y como ha sido descrito por Wong & Kitts (2001, 2003) y de diferentes péptidos lácteos (Pihlanto, 2006).

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la incorporación de suero de mantequilla en las propiedades físicas más relevantes de films elaborados a partir de almidón de maíz (propiedades mecánicas, de barrera al vapor de agua, ópticas y microestructurales). Adicionalmente se estudió el efecto de la composición sobre diversas propiedades de las dispersiones formadoras de recubrimiento (tamaño de partícula, propiedades reológicas y potencial z), ya que las propiedades de estas dispersiones tienen un gran impacto en las propiedades de los films. Así mismo, se analizó la capacidad antioxidante del suero de mantequilla y de los films obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y preparación de los films

Se dispersó almidón de maíz (AM), (Roquette, Laisa España S.A.) al 3% (p/p) en agua destilada y se agitó durante 10 minutos. Esta dispersión se llevó a calentamiento en baño termostático a 90°C durante 30 minutos. Al finalizar el calentamiento, se enfrió en un baño de agua y hielo, se añadió glicerol en una proporción 1:0.25 respecto al almidón, y se adicionó agua

para ajustar la concentración. La dispersión se homogeneizó en un equipo rotor-estator (Yellow Line DL 25 Basic, IKA, Janke & Kunkel, Alemania) a 13,500 rpm durante 4 minutos y se desgasificó a vacío. Por otro lado, se preparó una solución de suero de mantequilla (SM) , (Lactotecnia S.L.) al 3% (p/p) en agua destilada, se añadió glicerol en una proporción 1:0.25 respecto al SM y se continuó agitando durante 1 hora. Los componentes mayoritarios del suero de mantequilla son lactosa (51%), proteínas (31%), grasa (7%) y sales minerales (7%).

Se mezclaron las dos dispersiones preparadas en diferentes proporciones para obtener las diferentes formulaciones formadoras de recubrimiento: AM_{1.00}, AM_{0.75}:SM_{0.25}; AM_{0.50}:SM_{0.50}; AM_{0.40}:SM_{0.60}.

Para obtener los films, se vertió en placas de teflón de 150 mm de diámetro. La masa de sólidos totales (1g) 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)°C. Tras el secado, los films se despegaron de las placas de teflón y se almacenaron a 25°C en desecadores de plástico al 53% de humedad relativa utilizando disoluciones saturadas de Mg(NO₃)₂ (Panreac química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona).

Caracterización de las dispersiones formadoras de recubrimiento

TAMAÑO DE PARTÍCULA

Se utilizó un analizador de tamaño de partícula Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, Reino Unido), compuesto de un banco óptico y una unidad de dispersión por vía húmeda (Hidro MU) que permite realizar el análisis mediante la dilución de la muestra. Esta técnica se basa en la medición de la intensidad de luz dispersada por las partículas presentes. La luz incidente es transmitida a la muestra y el equipo detecta el patrón de difracción producido por las partículas. Este patrón depende del tamaño y forma de éstas, así como de la longitud de onda de la luz incidente. A partir del patrón de difracción se determina la distribución de tamaños y los diámetros promedio. Se obtuvieron diámetro medio en superficie (d_{3,2}) que representa el diámetro de una partícula esférica con la misma relación volumen/superficie que el total de la emulsión (ec. 1) y el parámetro d_{4,3} que es el tamaño medio en volumen (ec. 2).

$$d_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (1)$$

$$d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2)$$

Donde: n_i = número de partículas de cada tamaño; d_i = diámetro de la partícula

COMPORTAMIENTO REOLÓGICO

El comportamiento reológico de las dispersiones formadoras de films se analizó a 25°C en un reómetro rotatorio (HAAKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Alemania) con un sensor de cilindros concéntricos (Z34DIN Ti). Se determinó la curva de flujo de cada formulación por triplicado. Se realizaron dos barridos de gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$), ascendente y descendente, entre 0 y 512 s⁻¹, cada uno de 5 minutos de duración, registrándose el esfuerzo cortante (σ) a intervalos de 3s.

POTENCIAL Z

El potencial z de las dispersiones se analizó utilizando el equipo Zetasizer Nano-Z (Nano series modelo Zen 2600, Marvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) basado en tecnología electroforética de dispersión de la luz para medir la movilidad electroforética de las partículas. La movilidad de las gotas se transformó en valores de potencial Z, utilizando el modelo de Smoluchowsky. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Caracterización de los films

MICROESTRUCTURA

Utilizando la microscopía electrónica de barrido (SEM), se obtuvieron imágenes transversales de los films obtenidos con un microscopio JEOL®, modelo JSM-5410. Las muestras se prepararon por criofractura mediante inmersión en nitrógeno líquido, se montaron sobre portas de cobre y se recubrieron con oro. El voltaje utilizado fue 10kV.

Se observó la morfología superficial de los films estudiados, previamente desecados con P₂O₅, utilizando microscopía de fuerza atómica (AFM) con un microscopio Multimode 8, Bruker AXS, (Santa Barbara, California) con un control electrónico NanoScope® V. 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 (ec. 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_j) al cuadrado (4)

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

Se obtuvieron también las imágenes mediante el modo Phase Imaging, derivado del Tapping Mode, que permite detectar variaciones superficiales en composición, adhesión, fricción, viscoelasticidad y otras propiedades a partir de los datos topográficos.

PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de los films se determinaron con una prensa universal de ensayos mecánicos (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, Inglaterra) de acuerdo al método estándar ASTM D882. Para cada formulación se cortaron 9 muestras rectangulares (25 mm por 100 mm). Éstas se equilibraron a la humedad relativa al 53% de HR y 25 °C. Antes del ensayo mecánico se determinó el espesor de cada film en cuatro puntos utilizando un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona). 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 (5) y (6)

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{S(t)} = \frac{F(t) \cdot (L_0 + d(t))}{b \cdot e \cdot L_0} \quad (5)$$

$$\epsilon_H = \ln\left(\frac{L_0 + d(t)}{L_0}\right) \quad (6)$$

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

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

HUMEDAD DE EQUILIBRIO Y PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP)

Para determinar la humedad de los films equilibrados a 53% de HR, se siguió un método gravimétrico. Se eliminó la humedad de los mismos por un procedimiento en dos etapas: desecación en estufa a 60°C durante 24h y almacenamiento en desecadores con P₂O₅, hasta masa constante.

Para determinar la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los films se utilizó una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (McHugh *et al.*, 1993) para un gradiente de humedad relativa 53-100%. Se cortaron tres muestras circulares por formulación, seleccionando films sin defectos visibles, y se determinó el espesor en seis puntos aleatorios utilizando un micrómetro electrónico digital (modelo Palmer, Comecta, Barcelona). 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%). La cara del film en contacto con el aire durante el secado se colocó en cada caso hacia el exterior de la copa. 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 53% de HR, obtenida con una disolución saturada de nitrato de magnesio. Los desecadores se almacenaron a 25°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 curva de 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 (p₂) se obtuvo con el método propuesto por McHugh *et al.* (1993), para corregir el efecto del gradiente de concentración establecido en el espacio de cabeza de la copa (ec. 7)

$$VTVA = \frac{P \cdot D \cdot \ln \left[\frac{(P - p_2)}{(P - p_1)} \right]}{R \cdot T \cdot \Delta z} \quad (7)$$

Donde: P = presión total (atm); D = difusividad del agua en aire a 25°C (m²/s); R = constante de los gases (82.057*10⁻³ m³ atm kmol⁻¹ K⁻¹); T = temperatura (K); Δz = altura media del espacio de cabeza (m), considerando su altura inicial y final; p₁ = presión de vapor de agua en la superficie de la solución (atm); p₂ = presión de vapor corregida en la cara interior del film.

Utilizando la ecuación (8); la WVP se calculó a partir de p₂ y la presión de vapor de agua en la cara exterior del film (p₃).

$$WVP = \frac{VTVA}{(p_2 - p_3)} \cdot \text{espesor} \quad (8)$$

PROPIEDADES ÓPTICAS: TRANSPARENCIA, COLOR Y BRILLO

Las propiedades ópticas de los films se determinaron tras equilibrarlos a 53% de HR. Se utilizó un espectrocolorímetro Minolta modelo CM-3600d (Minolta CO. Tokyo) para obtener los espectros de reflexión de los films sobre fondo blanco (R) y fondo negro (R_0) entre 400 y 700nm, así como el espectro del fondo blanco (R_g). A partir de éstos, y mediante las ecuaciones (9)-(11), se calcularon los espectros de R_∞ (reflectancia de una lámina infinita de muestra cuyo grosor fuera suficiente como para anular el efecto del fondo), utilizando la teoría de Kubelka - Munk de dispersión múltiple (Hutchings, 1999).

$$a = \frac{1}{2} \left(R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right) \quad (9)$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (10)$$

$$R_\infty = a - b \quad (11)$$

Se analizaron tres films por formulación, y se tomaron tres medidas por film. Las mediciones se realizaron sobre la cara que había estado en contacto con el aire durante el secado.

La transmitancia interna (T_i), como indicador de la transparencia, de los diferentes films fue evaluada mediante la ecuación (12):

$$T_i = \sqrt{(a - R_0)^2 - b^2} \quad (12)$$

A partir de los espectros de R_∞ , se determinaron las coordenadas de color en el espacio CIE- $L^*a^*b^*$ (CIE, 1986), utilizando como sistema de referencia observador 10° e iluminante D65. El tono (h_{ab}^*), el croma (C_{ab}^*) y el índice de blancura (WI) se calcularon mediante las ecuaciones (13) - (15):

$$h_{ab}^* = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (13)$$

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (14)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (15)$$

El brillo de los films se midió con un brillómetro Multi.Gloss 268 (Minolta, Alemania) a diferentes ángulos de incidencia respecto a la normal: 20, 60 y 85°. Los films se colocaron sobre una superficie de color negro mate, de acuerdo con la norma ASTM D523 (ASTM, 1999). Se realizaron diez mediciones por formulación y ángulo, en la cara del film que había estado en contacto con el aire durante el secado. Las medidas se expresaron en

unidades de brillo relativas a una superficie de vidrio negro con un valor próximo a 100.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la capacidad antioxidante del suero de mantequilla y de los films redisueltos 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).

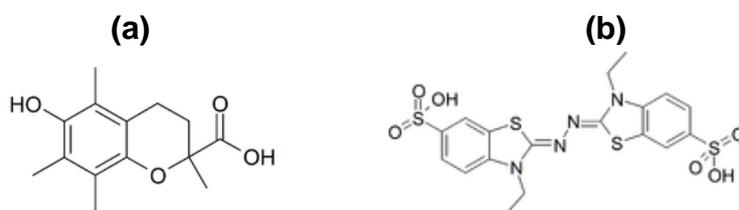


FIGURA 1. Estructura química del trolox (a) y del ABTS (b).

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 734 nm (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. Para preparar las muestras de SM y de films, se mezclaron 0.1g de muestra con 10 ml de agua bidestilada y se agitó durante 16h. Antes de la medición, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10min a 4°C. Las muestras así preparadas (100 μ l) se mezclaron con la dilución de ABTS^{•+} (900 μ l) y se registró el valor de la absorbancia a los 6 minutos (A_6). Se realizaron tres repeticiones por determinación. El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó con la ecuación (16):

$$\% \text{reducción} A = \frac{A_0 - A_6}{A_0} \cdot 100 \quad (16)$$

Se repitió el procedimiento con diferentes diluciones de trolox como agente antioxidante (0mg/l hasta 50mg/l), para obtener una recta de calibrado que relacionara el porcentaje de reducción de A con la concentración de agente antioxidante presente a los 6 minutos. La capacidad antioxidante del suero de mantequilla y los films en equivalentes de trolox (TEAC: *trolox equivalent antioxidant capacity*) se determinó comparando el correspondiente porcentaje de reducción de la absorbancia con la curva patrón.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por medio de análisis de varianza (ANOVA), utilizando Statgraphics Plus para Windows 5.1 (Manugistics Corp., Rockville, Md.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de las formulaciones formadoras de recubrimiento

TAMAÑO Y CARGA DE LAS PARTÍCULAS

La TABLA 1 muestra los resultados obtenidos para los diámetros $d_{3,2}$ y $d_{4,3}$ en las formulaciones ensayadas.

TABLA 1: Valores de las propiedades (diámetros promedio de partículas, potencial zeta, índice de consistencia, índice de comportamiento al flujo, viscosidad aparente y pH) de las dispersiones formadoras de film. (Desviación estándar de los valores entre paréntesis)

	AM _{1.00}	AM _{0.75} :SM _{0.25}	AM _{0.50} :SM _{0.50}	AM _{0.40} :SM _{0.60}
d_{32} (μm)	5.43 (0.11) ^d	3.62 (0.17) ^c	3.39 (0.13) ^b	3.04 (0.07) ^a
d_{43} (μm)	34 (8) ^a	29 (3) ^b	27 (3) ^c	25.2 (1.9) ^c
ζ (mV)	-3.0 (0.6) ^a	-5.5 (0.9) ^b	-17.1 (2.0) ^c	-17 (2) ^c
K (Pa.s) ⁿ	0.0218 (0.0002) ^d	0.0113 (0.0002) ^c	0.0040 (0.0002) ^b	0.0030 (0.0002) ^a
n	0.8706 (0.0009) ^a	0.9090 (0.0008) ^b	0.990 (0.003) ^c	1.007 (0.008) ^d
η_{ap} a 100s ⁻¹ (Pa.s)	0.0120 (0.0002) ^d	0.0074 (0.0002) ^c	0.0039 (0.0002) ^b	0.0031 (0.0002) ^a
pH	6.25 (0.02) ^d	6.15 (0.02) ^a	6.22 (0.02) ^c	6.21(0.02) ^b

La coincidencia de superíndices indica la pertenencia a grupos homogéneos sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

El incremento de la proporción de SM en las formulaciones resultó en un descenso de los diámetros promedio d_{32} y d_{43} . El hecho de que la formulación AM_{1.00} presente tamaños de partícula medibles con el equipo utilizado sugiere la formación de agregados de amilosa, cuya concentración en el sistema es inferior a la concentración crítica de gelificación, lo cual no impide la asociación de las cadenas lineales de amilosa a un determinado nivel. A medida que el almidón va siendo sustituido por suero de mantequilla en la dispersión, el diámetro promedio se reduce, probablemente por el efecto del descenso de la concentración efectiva de amilosa y la presencia de otros componentes que dificultan los procesos de agregación. A partir de un 50 % de SM, el tamaño no cambia significativamente y, considerando la carga neta de las partículas en este caso, deducida de los valores del potencial zeta (TABLA 1), podrían tratarse de partículas lipídicas cubiertas

de proteína de suero. Los valores del potencial zeta de la dispersión del almidón son ligeramente negativos y son el resultado de la adsorción de iones del medio sobre las cadenas neutras de almidón. Al incorporar el SM, las proteínas dan lugar a una carga neta negativa mayor de las partículas presentes, ya que se encuentran disociados los grupos carboxilo de los aminoácidos al pH del medio (alrededor de 6), superior al punto isoelectrico de las proteínas lácteas (Pelegri y Gaspareto, 2005).

COMPORTAMIENTO REOLÓGICO

Las curvas de flujo obtenidas experimentalmente para las diferentes dispersiones (FIGURA 2) muestran un comportamiento pseudoplástico para todas las muestras, con relaciones esfuerzo-gradiente de velocidad crecientes a medida que aumenta la proporción de almidón. Éstas se ajustaron con la ley de Ostwald de Waale (ec. 17):

$$\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (17)$$

Donde: σ es el esfuerzo cortante (Pa), K es el índice de consistencia (Pa.sⁿ), $\dot{\gamma}$ es el gradiente de velocidad (s⁻¹) y n es el índice de comportamiento al flujo.

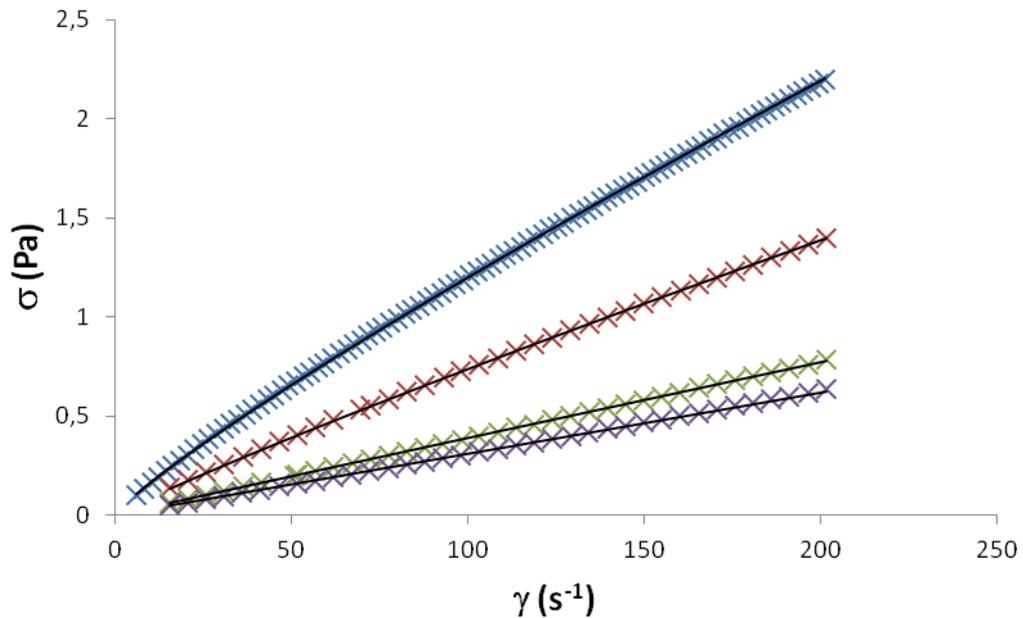


FIGURA 2. Curvas de flujo típicas, a 25°C, de todas las formulaciones y ajuste a la ley de Ostwald de Waale (línea continua).). AM_{1.0} (X); AM_{0.75}:SM_{0.25} (X); AM_{0.50}:SM_{0.50} (X); AM_{0.40}:SM_{0.60} (X)

La TABLA 1 muestra los valores de estos parámetros junto al valor de la viscosidad aparente a 100s⁻¹. Puede observarse el comportamiento pseudoplástico de las formulaciones de almidón AM_{1.00} y el incremento

progresivo del parámetro n a medida que aumenta la proporción de SM en la mezcla. La formulación con la mayor proporción de SM ($AM_{0.40}:SM_{0.60}$) presentó carácter newtoniano.

El aumento en la proporción de SM se reflejó también en un descenso progresivo de la viscosidad aparente a $100s^{-1}$. Puesto que todas las formulaciones tenían el mismo contenido de sólidos, este fenómeno puede atribuirse al descenso en el peso molecular promedio de los sólidos (el componente con mayor peso molecular del SM es la seroproteína, cuyo tamaño molecular es inferior al de las cadenas de almidón) y el consecuente descenso del volumen hidrodinámico de las cadenas poliméricas. La falta de formación de los agregados de amilosa mencionados en el punto anterior, cuando aumenta la proporción de SM, puede también contribuir a la caída observada de viscosidad.

Caracterización de los films

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

La FIGURA 3 muestra imágenes obtenidas por SEM, de la sección transversal de los films obtenidos.

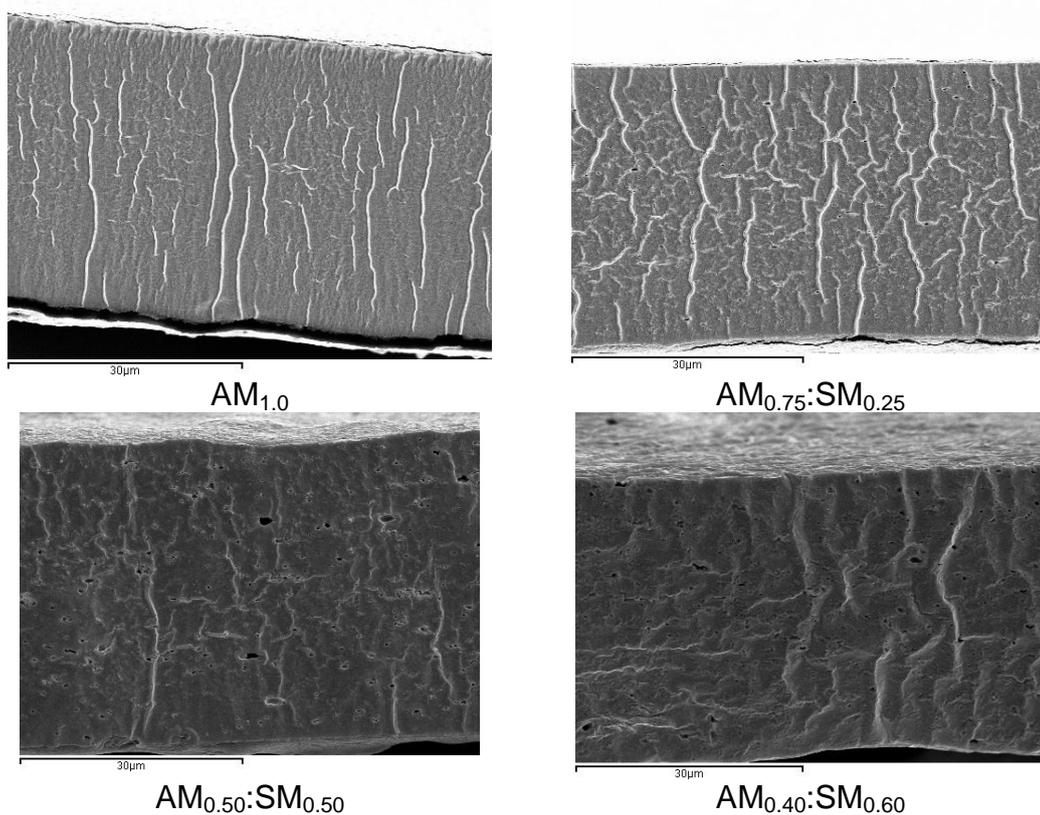


FIGURA 3 Micrografías por SEM de la sección transversal de los films equilibrados con P_2O_5 a $25\text{ }^{\circ}C$

Para los films de almidón se observa una estructura bastante homogénea con formaciones lineales en la dirección del flujo del agua durante el secado del film, que podrían atribuirse a asociaciones cristalinas de amilosa. Diferentes autores (Gelders et al. 2005; Famá et al. 2004) han demostrado la formación de formas cristalinas tipo V de la amilosa orientada en forma de hélice, las cuales se forman complejando lípidos u otras moléculas apolares que pueden ser endógenos del almidón. La formación de estos complejos helicoidales y sus agregados ya aparece reflejada en el tamaño de partículas de la dispersión inicial.

La incorporación de SM introduce una mayor heterogeneidad en la estructura, lo cual es atribuible a la falta de miscibilidad de componentes. Concretamente, los lípidos incorporados en el SM aparecen como partículas irregulares (ya que se trata de grasa láctea, sólida durante la formación del film) finamente dispersas (en muchos casos se observa el hueco que dejaron las mismas en la criofractura del film), mientras que la matriz continua presenta una fractura tanto más irregular cuanto mayor es el contenido en SM, revelando una distribución heterogénea de componentes con zonas de diferente resistencia mecánica a la fractura. Esto puede indicar la coexistencia de dos fases imbricadas: una rica en almidón y otra en proteína de suero, resultado de la falta de compatibilidad del almidón y las seroproteínas, dando lugar a separación de fases.

MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

Las FIGURAS 4 a y b presentan (a diferentes ampliaciones) la imágenes topográficas de los films obtenidas por AFM de la superficie de los mismos (modo *Phase Imaging*), donde pueden apreciarse diferencias atribuibles a una respuesta mecánica heterogénea en diferentes puntos de la superficie de cada muestra. En la muestra de almidón pueden observarse, al igual que en SEM, puntos diferenciados de diferente respuesta mecánica, que serían atribuibles a las zonas cristalinas de amilosa. En las muestras con SM, la heterogeneidad superficial aumenta a medida que aumenta la proporción de SM, indicando la presencia de fases separadas (una rica en almidón y otra rica en proteína), cada una de ellas con diferentes propiedades. Puede observarse una proporción creciente de zonas con comportamiento diferenciado a medida que aumenta la cantidad de suero en el medio, lo que hace pensar que correspondan a la fracción rica en proteína.

PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de los films se estudiaron a través de la cuantificación de tres parámetros: módulo de elasticidad (EM), tensión de fractura (TS) y extensibilidad (%E), cuyos valores se reflejan en la TABLA 2. Los resultados obtenidos para los films AM_{1.00} son del mismo rango que los publicados por Jiménez et al. (2012).

La adición de suero de mantequilla tuvo un efecto muy marcado sobre los tres parámetros mecánicos. A medida que la proporción de SM aumentó, los films se volvieron menos rígidos (menor módulo de elasticidad), menos

resistentes a la fractura y más extensibles, siendo las diferencias entre muestras estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Este comportamiento mecánico es coherente con la separación de fases observada microscópicamente. La incompatibilidad de ambos materiales hace que la integridad de la matriz de almidón se vea interrumpida, con la consiguiente reducción de su resistencia mecánica. Además, la incorporación de SM lleva asociada una alta proporción de lactosa y sales que forman parte de los sólidos totales del film, sin contribuir a la formación de red polimérica, lo que puede contribuir en gran medida a la pérdida de cohesión de la matriz.

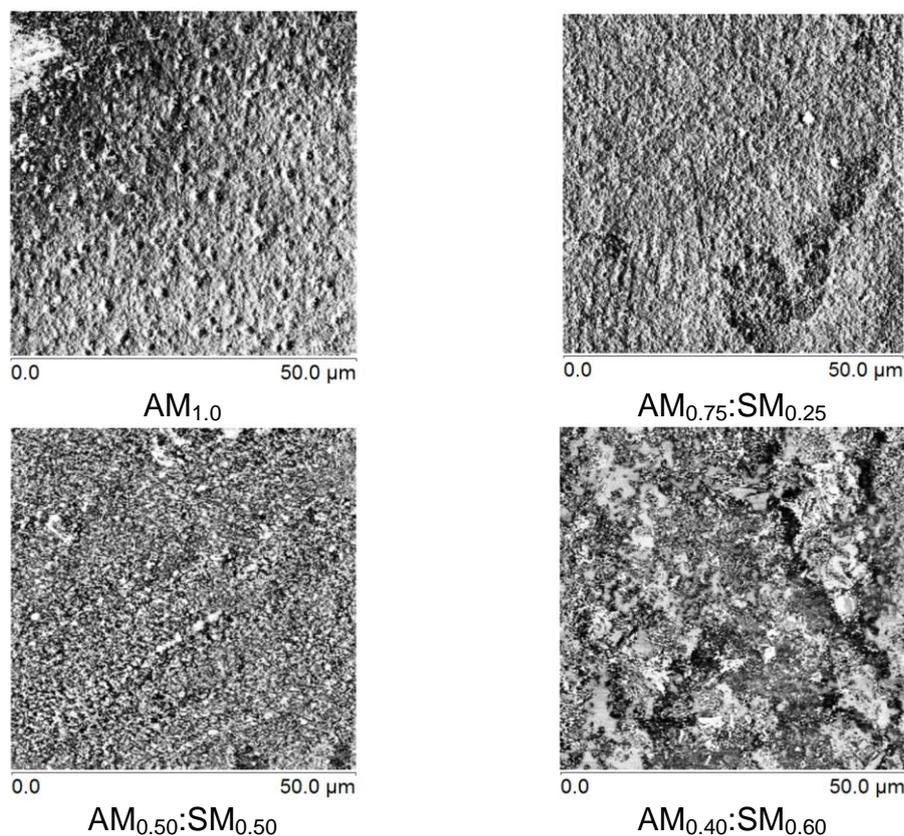


FIGURA 4a. Imágenes de la superficie de los films obtenidas por AFM de las diferentes formulaciones (observaciones de $50 \times 50 \mu\text{m}$)

Es remarcable el hecho de que la formulación con 60 % de SM presentó valores muy inferiores de resistencia mecánica, aunque fue mucho más extensible. Este comportamiento se explica por la alta proporción de lactosa en el film proveniente del SM que actúa como plastificante, así como por su elevado contenido en humedad, resultado también de la gran proporción de sólidos iónicos y polares de bajo peso molecular, incorporados desde el SM (lactosa y sales, fundamentalmente) que incrementan la capacidad de adsorción de agua de los films, como se refleja en los valores de humedad (TABLA 2). La proporción del 60% de SM parece introducir un contenido en este tipo de sólidos que es crítico para favorecer la captación de agua de los films por efecto solvente cuando se equilibran al 53% de HR (Fabra et al. 2010). El efecto plastificante de la mayor cantidad de agua adsorbida, junto

con el de la lactosa, convierte a estos films en demasiado blandos y poco resistentes aunque son muy extensibles.

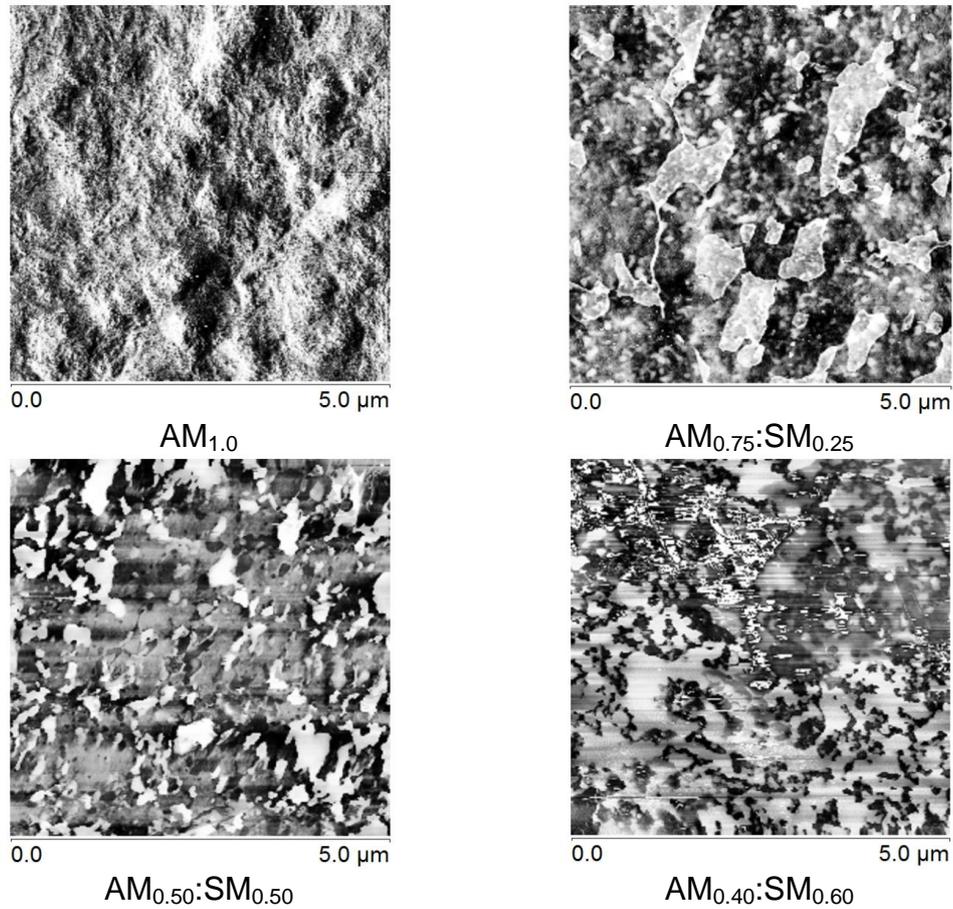


FIGURA 4b. Imágenes de la superficie de los films obtenidas por AFM de las diferentes formulaciones (observaciones de $5 \times 5 \mu m$)

TABLA 2 Parámetros mecánicos de los films (EM, TS, %E) equilibrados a 53% de HR, a $25^{\circ}C$, contenido en humedad de los mismos y valores de la permeabilidad al vapor de agua. (Desviación estándar de los valores entre paréntesis)

	$AM_{1.00}$	$AM_{0.75}:SM_{0.25}$	$AM_{0.50}:SM_{0.50}$	$AM_{0.40}:SM_{0.60}$
Espesor (mm)	0.049 (0.003) ^a	0.048 (0.003) ^a	0.048 (0.006) ^a	0.049 (0.005) ^a
EM (MPa)	1200 (300) ^d	600 (200) ^c	270 (150) ^b	11 (2) ^a
TS (MPa)	30 (6) ^d	8 (3) ^c	5 (2) ^b	0.30 (0.03) ^a
%E	2.7 (0.6) ^{ab}	1.1 (0.5) ^a	3 (2) ^b	15 (3) ^c
X_w (b.s.)	8.7 (1.2) ^a	8.13 (0.08) ^a	8.1 (0.8) ^a	17.6 (0.7) ^b
WVP (g/Pa s m)$\times 10^7$	13 (1) ^a	12,4 (0,5) ^a	15 (1) ^a	20 (4) ^b

La coincidencia de superíndices indica la pertenencia a grupos homogéneos sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP)

Los resultados de permeabilidad al vapor de agua a 25°C y un gradiente de humedad relativa 53-100% se presentan en la TABLA 2, junto con los valores de espesor correspondientes para los que no se observaron diferencias significativas. El valor de WVP encontrado para films de almidón de maíz es comparable con los publicados en otros estudios previos (Jiménez et al. 2012).

Como puede observarse, la adición de suero de mantequilla hasta una proporción 0.5:0.5 no supuso cambios significativos en las propiedades barrera al vapor de agua de los films. La presencia de compuestos de naturaleza lipídica incorporados con el suero de mantequilla (7%), que en principio podrían suponer un agente favorecedor de las propiedades barrera, queda mitigado por la menor cohesión estructural de los films, asociada a la incompatibilidad de materiales, que favorece el transporte de masa a través de los mismos.

Coherentemente con esta hipótesis, la formulación con mayor contenido en SM, que presentó una marcada heterogeneidad estructural, fue la que presentó un valor de WVP significativamente mayor que el resto. A esto también contribuye de forma notable el mayor contenido en humedad y su efecto plastificante, lo cual potencia la movilidad molecular y la difusión de componentes a través del film.

PROPIEDADES ÓPTICAS

La TABLA 3 recoge los resultados de las mediciones de color de todas las formulaciones: luminosidad (L^*), pureza de color o croma (C_{ab}^*), tono (h_{ab}^*) e índice de blancura (WI). La incorporación de SM a los films de AM provocó un descenso de la luminosidad de los mismos, que fue significativo para la formulación con 60% de SM, un aumento de la saturación del color ($p < 0.05$) y un descenso en el tono ($p < 0.05$), lo que evidencia el amarilleamiento notable de los films. El índice de blancura se vio modificado coherentemente, y fue reduciéndose a medida que la proporción de SM aumentó.

TABLA 3. Coordenadas color (L : luminosidad, C_{ab}^* : croma y h_{ab}^* : tono) e índice de blancura (WI) de los diferentes films. (Desviación estándar de los valores entre paréntesis)

	AM_{1.00}	AM_{0.75}:SM_{0.25}	AM_{0.50}:SM_{0.50}	AM_{0.40}:SM_{0.60}
L*	79.2 (1.9) ^b	77.6 (1.3) ^{ab}	78.4 (1.1) ^b	76 (4) ^a
Cab*	2.9 (0.2) ^a	7 (2) ^b	10 (3) ^c	16 (3) ^d
hab*	249 (4) ^d	113 (7) ^c	102 (5) ^b	93 (5) ^a
WI	79.0 (2.0) ^b	76.3 (1.8) ^a	76.0 (1.3) ^a	70.7 (4.8) ^a

La coincidencia de superíndices indica la pertenencia a grupos homogéneos sin diferencias significativas ($p > 0.05$).

La FIGURA 5 muestra la distribución espectral de la transmitancia interna (T_i) de los films, como indicador de su nivel de transparencia. Puede observarse que la transmitancia interna disminuyó al aumentar el contenido en SM, principalmente a bajas longitudes de onda, lo que refleja un aumento en la opacidad de los films. Esto es coherente con la formación de una estructura heterogénea y con cambios en el índice de refracción a través del film. A mayor proporción de fase dispersa (componentes del SM), mayores cambios en el índice de refracción y mayor dispersión de luz, con la consiguiente pérdida de transparencia.

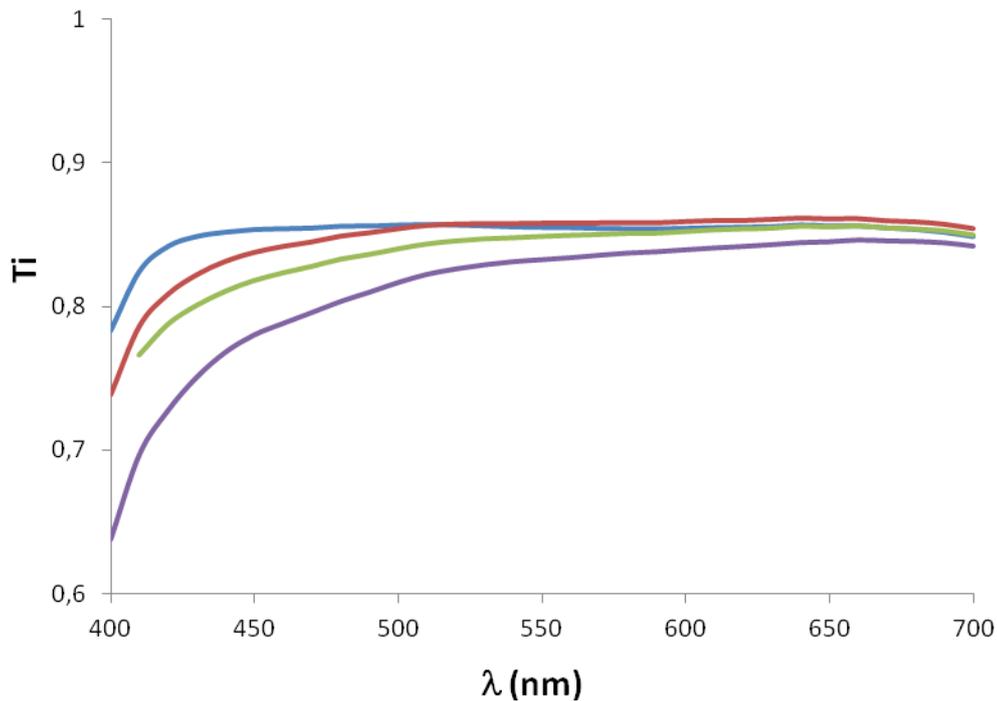


FIGURA 5: Distribución espectral de la transmitancia interna para cada formulación. AM_{1,0} (—); AM_{0,75}:SM_{0,25} (—); AM_{0,50}:SM_{0,50} (—); AM_{0,40}:SM_{0,60} (—)

Los valores obtenidos para el brillo se muestran en la TABLA 4. Se consideraron las mediciones a 60°, ángulo para el que se cumplían los requisitos establecidos en la norma, en función de la intensidad del brillo en las muestras.

Para todos los films se obtuvieron valores promedio de brillo comprendidos entre 10 y 20, por lo que los films de todas las formulaciones pueden considerarse predominantemente mate. Se encontraron diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$), dado que un aumento en la proporción de SM produjo una reducción del brillo de los films. Esta reducción es debida a la heterogeneidad estructural que se refleja también en la superficie del film dando lugar a una topografía rugosa de su superficie. La TABLA 4 presenta también los valores de rugosidad superficial obtenidos

de las imágenes de AFM y que guardan un paralelismo razonable con los valores de brillo: a mayor rugosidad superficial, menor brillo, tal como han observado diferentes autores (Villalobos et al. 2005; Fabra et al. 2009). Es remarcable la elevada rugosidad del film con 60 % de SM, que presenta también el menor valor de brillo.

TABLA 4: Valores de brillo a 60°, parámetros de rugosidad (R_a y R_q) superficial obtenidos de las imágenes AFM y capacidad antioxidante de los films. (Desviación estándar de los valores entre paréntesis)

	AM _{1.00}	AM _{0.75} :SM _{0.25}	AM _{0.50} :SM _{0.50}	AM _{0.40} :SM _{0.60}
Brillo 60°	20 (8) ^c	14 (4) ^b	13 (3) ^b	10 (2) ^a
R_q (nm)	64 (13) ^a	42 (6) ^a	62 (21) ^a	265 (21) ^b
R_a (nm)	45 (8) ^a	32 (4) ^a	45 (15) ^a	208 (11) ^b
Eq. Trolox (mg/L)	n.d.*	0.05 (0.02) ^a	0.06 (0.02) ^a	0.065 (0.012) ^a
%	n.d.*	21 (10) ^a	28 (9) ^a	29 5) ^a

* n.d., no detectado

La coincidencia de superíndices indica la pertenencia a grupos homogéneos sin diferencias significativas ($p>0.05$).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los resultados de la actividad antioxidante de los films (porcentaje de la reducción de la absorbancia a 734 nm a los 6 minutos y equivalentes de trolox) se muestran en la TABLA 4. Los films sin SM no presentaron ninguna actividad antioxidante. La respuesta obtenida para el SM puro fue significativamente mayor ($p<0.05$) que las obtenidas para los films, en coherencia con la mayor proporción de compuestos con actividad antioxidante. La actividad del SM supuso una reducción de la absorbancia de 65 (± 4)% a los 6 minutos, lo que es equivalente a 0.144 (± 0.010) mg trolox/ l. Las tres formulaciones de films que contenían diferentes proporciones de SM presentaron actividad antioxidante, que varió entre 21 y 29 %, con tendencia a aumentar con el incremento en SM en el film, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0.05$). Los resultados indican que la incorporación de SM a los films de almidón les confiere actividad antioxidante lo que aumenta su uso potencial como recubrimientos/envases por la protección frente a la oxidación de compuestos sensibles a la oxidación como grasas insaturadas.

CONCLUSIONES

La incorporación de suero de mantequilla en films de almidón tuvo un impacto significativo en las propiedades físicas de las dispersiones formadoras de films y de los films obtenidos. En las formulaciones formadoras de film, el SM dio lugar a una disminución de los agregados de almidón, disminuyendo el tamaño promedio de las partículas, a la vez que incrementó su carga superficial, reduciéndose notablemente la viscosidad de la dispersión.

La microestructura de los films reflejó falta de compatibilidad entre el almidón y los componentes del SM (básicamente la seroproteína) lo que llevó a la separación de fases: una rica en almidón y otra en proteína y a la formación de una estructura heterogénea. Esto comportó una pérdida de resistencia mecánica de los films, de transparencia y de brillo, así como un amarilleamiento progresivo al aumentar la proporción de SM. La permeabilidad al vapor de agua de los films no se modificó significativamente por la adición de SM, excepto cuando ésta fue del 60 % cuando también los films aumentaron mucho su higroscopicidad y capacidad de adsorción de agua.

Por otro lado, se comprobó la actividad antioxidante del suero de mantequilla y de los films que lo contienen, por lo que este producto podría presentar ventajas en la formulación de films comestibles en los que su compatibilidad con el material soporte fuera adecuada.

REFERENCIAS

- Affolter, M., Grass, L., Vanrobaeys, F., Casado, B., Kussmann, M. (2010). Qualitative and quantitative profiling of the bovine milk fat globule membrane proteome. *Journal of Proteomics* 73, 1079-1088.
- ASME B46.1 Surface texture: surface roughness, waviness and lay. An American National Standard; ASME: New York, 1995.
- ASTM, 1999. Standard test method for specular gloss. In: Designation (D523). Annual Book of ASTM Standards, vol. 06.01. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- ASTM Standard test methods for water vapour 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 ASTM*; American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA, 2001; pp162-170.
- Azeredo, H.M.C. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International* 42, 1240-1253.
- Carvalho, A.J.F. (2008) Starch: major sources, properties and applications as thermoplastic materials. En: *Monomers, Polymers and Composites from renewable Resources* (Ed.: Belgacem, M.N. and Gandini, A.) Elsevier Ltd., p: 321-342.
- CIE, 1986. Colorimetrie, second ed. Publication CIE 15.2. Comission Intenationale de L'Eclairage, Viena
- Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S. (1997). Thermoplastic properties of fish myofibrillar proteins: application to biopackaging fabrication. *Polymer* 38 (16), 4071-4078
- Fabra, M.J.; Talens, P.; Chiralt, A. (2009). Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid - beeswax mixtures. *Food hydrocolloids*, 23(3), 676-683
- Fabra, M.J.; P. Talens, Amparo Chiralt. (2010). Water sorption isotherms and phase transitions of sodium caseinate-lipid films as affected by lipid interactions. *Food Hydrocolloids* 24, 384–391.
- Famá, L., Rojas, A., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2005). Mechanical properties of tapioca-starch edible films containing sorbates. *LWT – Food Science and Technology*, 38 (6), 631-639.
- Gelders, G.G., Vanderstukken, T.C., Goesaert, H., & Delcour, J.A. (2004). Amylose lipid complexation: a new fractionation method. *Carbohydrate Polymers*, 56 (4), 447-458.
- Hutchings, J.B., 1999. Food colour and appearance. *Aspen Publishers, Maryland*

- Jiménez, A.; Fabra, M.J.; Talens, P.; Chiralt, A. (2012). Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 302-310
- Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P. & Tadini, C.C. (2010). Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT-Food Science and Technology* 43, 1088-1094.
- Mathew, S. & Abraham, T.E. (2008). Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids* 22, 826-835.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R., & Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapour permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4), 899–903.
- Michalski, M.C., and Januel, C. (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends in Food Science & Technology* 17, 423–437
- Pelegrine, D.H.G., Gasparetto, C.A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 38, 77–80
- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal* 16,1306–1314
- Pyla, R., Kim, T.J., Silva, J.L., Jung, Y.S. (2010). Enhanced antimicrobial activity of starch-based film impregnated with thermally processed tannic acid, a strong antioxidant. *International Journal of Food Microbiology* 137, 154-160.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237
- Saiah, R., Sreekumar, P.A., Leblanc, N. & Saiter, J.M. (2009). Structure and thermal stability of thermoplastic films based on wheat flour modified by monoglyceride. *Industrial Crops and Products* 29, 241-247.
- Sánchez-García, M.D., Giménez, E., & Lagaron, J.M. (2008). Morphology and barrier properties of solvent cast composites of thermoplastic biopolymers and purified cellulose fibers. *Carbohydrate Polymers* 71, 235-244.
- Shen, X.L., Wu, J.M., Chen, Y. & Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids* 24, 285-290.
- Villalobos, R.; Hernández, P.; Chanona, J.; Gutiérrez-López, G.; Chiralt, A. (2005) Gloss and transparency of hydroxypropylmethylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, 19, 53-61.
- Wiles, D.M. (2005). Oxo-biodegradable polyolefins in packaging. In *Biodegradable Polymers for industrial applications*. Woodhead Publishing Limited.
- Wong, P.Y.Y. & Kitts, D.D.(2001). An iron binding assay to measure activity of known food sequestering agents: studies with buttermilk solids. *Food chemistry* 72, 245-254.
- Wong, P.Y.Y. & Kitts, D.D. (2003). Chemistry of buttermilk solid antioxidant activity. *Journal of Dairy Science* 86 (5), 1541-1547.