

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
AGRÓNOMOS



**DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS
COMESTIBLES A BASE DE CASEINATO SÓDICO Y/O
CÁLCICO, ÁCIDO OLEICO Y CERA DE ABEJA**

Trabajo fin de carrera

Alumno:

Marcos Yanini Badenas

Director Académico:

Dr. Pau Talens Oliag

Director Experimental:

M^a José Fabra Rovira

Valencia, Julio de 2007



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



**ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE
INGENIEROS
AGRÓNOMOS**

Anexo 4

Autorización del director/a, codirector/a
o tutor/a

Datos del trabajo de fin de carrera

Autor: Marcos Yanini Badenas

DNI: 45796106R

Título: Diseño y optimización de recubrimientos comestibles a base de caseinato sódico y/o cálcico, ácido oleico y cera de abeja

Área o áreas de conocimiento a las que corresponde el trabajo: Tecnología de Alimentos

Titulación: Ingeniero Agrónomo (Especialidad: Industrias)

A cumplimentar por el director/a, codirector/a o tutor/a del trabajo

Nombre y apellidos: Pau Talens Oliag

Departamento: Tecnología de Alimentos

En calidad de: X director/a

codirector/a

tutor/a

Autorizo la presentación del trabajo de fin de carrera cuyos datos figuran en el apartado anterior y certifico que se adecua plenamente a los requisitos formales, metodológicos y de contenido exigidos a un trabajo de fin de carrera, de acuerdo con la normativa aplicable en la ETSIA.

(Firma)* Pau Talens Oliag

Valencia, 12 de Junio de 2007

En el caso de codirección, han de firmar necesariamente los que sean profesores de esta Escuela; si existe tutor o tutora, tiene que ser éste quien firme esta autorización.

DIRECCIÓN DE LA ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE
INGENIEROS
AGRÓNOMOS

Anexo 5

Ficha resumen del Trabajo Fin de
Carrera

Datos personales

Nombre y apellidos: Marcos Yanini Badenas

Datos del trabajo de fin de carrera

Título del TFC:	Diseño y optimización de recubrimientos comestibles a base de caseinato sódico y/o cálcico, ácido oleico y cera de abeja	
Lugar de realización:	Departamento de Tecnología de Alimentos	Fecha de lectura: Julio 2007
Titulación:	Ingeniero Agrónomo	
Especialidad:	Industrias	
Director:	Pau Talens Oliag	
Director Experimental:	M ^a José Fabra Rovira	

Resumen

Actualmente existe una demanda creciente por el consumo de alimentos sanos, como es el caso de las frutas y las verduras mínimamente procesadas. La utilización de la tecnología de recubrimientos comestibles constituye una herramienta que ayuda a aumentar la calidad de este tipo de productos. El objetivo del presente trabajo es diseñar y optimizar recubrimientos comestibles formulados a base de caseinato sódico, cálcico, o mezclas de ambos, plastificante y material lipídico (ácido oleico, cera de abeja o mezcla de éstos), con el fin de obtener films cuya estructura proporcione unas adecuadas propiedades mecánicas y unas buenas propiedades barrera frente al vapor de agua. Para ello se realizaron dos estudios. El primer estudio orientado a discernir las propiedades de cada caseinato y el segundo, en el que se pretende aprovechar los puntos fuertes de cada caseinato mediante una mezcla de ambos en proporciones óptimas. Los resultados obtenidos en el primer estudio muestran que los films formulados a partir de caseinato sódico presentan mejores propiedades mecánicas que los formulados con caseinato cálcico. En cambio, estos últimos presentan mejores propiedades barrera al vapor de agua. La mezcla de ambos caseinatos permite aprovechar las cualidades de cada uno. La incorporación de caseinato cálcico, por debajo del 50 %, y la adición de cera de abeja en la fracción lipídica proporciona films con mejores propiedades barrera y unas óptimas propiedades mecánicas. De este modo, los films elaborados con una relación NaCas:CaCas 2:1, manteniendo una relación proteína:plastificante:lipido de 1:0.3:0.5 y una proporción ácido oleico:cera de abeja 70:30 son los que mejores propiedades presentan.

Palabras clave

Film, caseinato sódico, caseinato cálcico, glicerol, ácido oleico, cera de abeja, propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua, tamaño de partícula.

Resum

Actualment existeix una creixent demanda pel consum d'aliments sans, com ara fruites i verdures mínimament processades. La utilització de la tecnologia de recobriments comestibles constitueix una eina que ajuda a augmentar la qualitat d'aquest tipus de productes. L'objectiu d'aquest treball es dissenyar i optimitzar recobriments comestibles formulats a base de caseïnat sòdic, càlcic o mescles de tots dos, plastificant i material lipídic (àcid oleic, cera d'abella o mescla d'aquests), amb la finalitat d'obtindre films amb una estructura que dona lloc a unes adequades propietats mecàniques i unes bones propietats barrera al vapor d'aigua. Es realitzaren dos estudis. Un primer estudi orientat a discernir les propietats de cada caseïnat i un segon, en el que es pretenen aprofitar els punts forts de cada caseïnat mitjançant una mescla d'ambdós en proporcions òptimes. Els resultats obtinguts al primer estudi mostren que els films formulats a partir de caseïnat sòdic presenten millors propietats mecàniques que els formulats amb caseïnat càlcic. En canvi, estos últims presenten millors propietats barrera al vapor d'aigua. La mescla d'ambdós caseïnats permet aprofitar les qualitats de cadascú. La incorporació de caseïnat càlcic, inferior al 50 %, i l'adició de cera d'abella a la fracció lipídica proporciona films amb millors propietats barrera i unes òptimes propietats mecàniques. D'aquesta forma els films elaborats amb una relació NaCas:CaCas 2:1, mantenint una relació proteïna:plastificant:lipíd de 1:0.3:0.5 i una proporció àcid oleic:cera d'abella 70:30 son els que millors propietats presenten.

Paraules clau

Film caseïnat sòdic, caseïnat càlcic, glicerol, àcid oleic, cera d'abella, propietats mecàniques, permeabilitat al vapor d'aigua, grandària de partícula.

Abstract

Nowadays a growing demand exists for the consumption of healthy food, like minimally processed fruits and vegetables. Using edible film technology constitutes a helpful tool to increase the quality of this kind of products. The objective of this work was design and optimizes edible films formulated by sodium caseinate, calcium caseinate or both mixtures, plasticizer and lipidic material (oleic acid, beeswax or mixtures of them), with the purpose to obtain films with a good structure which provides a suitable mechanical properties and good water vapour permeability properties. Two studies were carried out. The first one was orientated to discern each caseinate properties and the second one, where was pretended to use the hardest points of each caseinate using a mixture of them in the optimal ratio. The first study results show that sodium caseinate based films present better mechanical properties than the calcium caseinate formulated ones. On the other hand, these lastest films show better water vapor barrier properties. Both caseinates mixture allows use the qualities of every one. Incorporating calcium caseinate, fewer than 50 %, and adding beeswax to the lipidic fraction provides films with good vapor water properties and optimal mechanical properties. Thus, the NaCas:CaCas 2:1 ratio films, keeping a protein:plasticizer:lipid 1:0.5:0.3 relationship and oleic acid:beeswax 70:30 ratio were the films with the best properties.

Key words

Film, sodium caseinate, calcium caseinate, glycerol, oleic acid, beeswax, mechanical properties, water vapor permeability properties, particle size.

Justificación e interés del trabajo

I. Introducción.....	1
I.1. Definición de film y recubrimiento comestible.....	1
I.2. Materiales formadores de recubrimientos comestibles.....	2
I.2.1. Proteínas.....	2
I.2.2. Polisacáridos.....	3
I.2.3. Lípidos.....	3
I.2.4. Plastificantes.....	4
I.3. Las proteínas lácteas como materiales formadores de recubrimientos.....	4
I.3.1. Caseínas y caseinatos.....	5
I.3.1.1. Propiedades de α y β -caseína.....	7
I.3.2. Proteínas del suero de la leche.....	8
I.4. Influencia de la composición del film.....	9
I.4.1. Efecto del plastificante y la humedad relativa.....	10
I.4.2. Efecto del tipo y cantidad de lípido.....	11
I.4.3. Efecto del entrecruzamiento y pH.....	12
I.5. Aplicaciones de recubrimientos comestibles.....	12
I.5.1. Recubrimientos comestibles a base de caseinato sódico y/o cálcico.....	14
II. Objetivos y plan de trabajo.....	17
II.1. Objetivos.....	17
II.1.1. Objetivo general.....	17
II.1.2. Objetivos específicos.....	17
II.2. Plan de trabajo.....	18
III. Materiales y métodos.....	19
III.1. Diseño y preparación de las formulaciones.....	19
III.2. Obtención de los films.....	21

III.3. Análisis realizados.....	22
III.3.1. Tamaño de partícula.....	22
III.3.2. Espesor.....	23
III.3.3. Propiedades mecánicas.....	23
III.3.4 Permeabilidad al vapor de agua.....	25
III.3.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	27
IV. Resultados y discusión.....	29
IV.1 Efecto del tipo de caseinato sobre las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua.....	29
IV.1.1. Tamaño de partícula.....	30
IV.1.2. Propiedades mecánicas.....	33
IV.1.3. Permeabilidad al vapor de agua.....	38
IV.1.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	40
IV.2. Estudio de mezclas de caseinato sódico y cálcico sobre las propiedades mecánicas del film y de permeabilidad al vapor de agua.....	45
IV.2.1. Tamaño de partícula.....	46
IV.2.2. Propiedades mecánicas.....	48
IV.2.3. Permeabilidad al vapor de agua.....	55
V. Conclusiones.....	59
VI. Bibliografía.....	61

Figura IV.1. Distribución del tamaño de partícula de los films elaborados a base de caseinato sódico (a) y caseinato cálcico (b), manteniendo una relación proteína:glicerol:lipido contante (1.0.3:0.5) y distintas relaciones OA:BW.....	31
Figura IV.2. Valores de los parámetros mecánicos (EM, TS y E) de los films control y films elaborados con caseinato (sódico o cálcico):glicerol:lipido (relación 1:0.3:0.5) y distintas relaciones ácido oleico-cera de abeja.....	35
Figura IV.3. Gráfico de interacciones (con intervalos LSD al 95%) entre el factor relación tipo de caseinato (sódico o cálcico) y proporción ácido oleico:cera de abeja para los diferentes parámetros mecánicos analizados.....	36
Figura IV.4. Valores de permeabilidad al vapor de agua de los films control y films elaborados con caseinato (sódico o cálcico):glicerol:lipido (relación 1:0.3:0.5) y distintas relaciones ácido oleico-cera de abeja.....	40
Figura IV.5. Micrografías de la sección transversal de los films a base de caseinato sódico (x1000).....	43
Figura IV.6. Micrografías de la sección transversal de los films a base de caseinato cálcico (x1000).....	44
Figura IV.7. Distribución del tamaño de partícula de los films elaborados con mezclas de caseinato sódico y cálcico (a) 3:1 (b) 2:1 (c) 1:1 (d) 1:3 y distintas relaciones OA:BW (100:0; 70:30; 50:50).....	48
Figura IV.8. Valores de los parámetros mecánicos (EM, TS y E) de los films control (sin material lipídico) elaborados con distintas relaciones NaCas:CaCas	50

Figura IV.9. Valores del módulo de elasticidad (EM) de los films control y films elaborados con distintas relaciones NaCas:CaCas	51
Figura IV.10. Valores de tensión de fractura (TS) de los films control y films elaborados con distintas relaciones NaCas:CaCas y distintos ratios ácido oleico:cera de abeja.....	52
Figura IV.11. Valores de deformación hasta el punto de fractura (E) de los films control y films elaborados con distintas relaciones NaCas:CaCas y distintos ratios ácido oleico:cera de abeja.....	53
Figura IV.12. Valores de los parámetros mecánicos de los films formulados en el segundo estudio.....	54
Figura IV.13. Gráficos de interacciones de los valores de permeabilidad al vapor de agua de los films elaborados con distintas relaciones NaCas:CaCas.....	56

Tabla III.1. Composición de las distintas formulaciones elaboradas en el primer estudio.....	20
Tabla III.2. Composición de las distintas formulaciones elaboradas en el segundo estudio.....	21
Tabla IV.1. Valores del tamaño medio de la partícula D _{4,3} (mm) y D _{3,2} (mm) de los distintas emulsiones formadoras de recubrimiento.....	31
Tabla IV.2. Valores de los parámetros mecánicos EM, TS y E de los films elaborados con caseinato (sódico o cálcico):glicerol:lípido (relación 1:0.3:0.5).....	37
Tabla IV.3. Valores de permeabilidad al vapor de agua de los films estudiados.....	40
Tabla IV.4. Valores del tamaño medio de la partícula D _{4,3} (mm) y D _{3,2} (mm) de los distintas emulsiones formadoras de recubrimiento	46
Tabla IV.5. Valores de permeabilidad al vapor de agua de los films formulados con relaciones NaCas:CaCas 3:1, 2:1, 1:1 y 1:3.....	55

JUSTIFICACIÓN E INTERÉS DEL TRABAJO

La creciente demanda por parte de los consumidores de consumir productos naturales y beneficiosos para la salud ha hecho que la producción y consumo de frutas con procesado mínimo, como es el caso de frutas cortadas, se haya visto incrementado en los últimos años. Sin embargo, la obtención de estos productos lleva consigo una serie de operaciones que pueden desencadenar cambios en la calidad del producto final. Encontrar métodos que ayuden a frenar este deterioro constituye uno de los principales objetivos de los sectores involucrados en la producción y conservación de frutas cortadas. En este sentido, los recubrimientos comestibles constituyen una estrategia potencial para reducir los efectos perjudiciales que inflige el procesado mínimo en los tejidos vegetales de frutas frescas cortadas, constituyendo un campo innovador en el área de la conservación de alimentos frescos. Se trata de una película transparente que envuelve el alimento y que actúa de barrera a la humedad y al oxígeno. Además puede ser usado como soporte de aditivos para conservar las propiedades del producto o simplemente para mejorar su apariencia. Por un lado, contribuyen a prolongar la vida útil de los alimentos de forma saludable, y por otro, contribuyen a reducir el impacto ambiental que causan los envases no biodegradables utilizados generalmente para la conservación de alimentos. Este trabajo se centra en diseñar y optimizar formulaciones formadoras de recubrimientos a base de caseinato sódico y/o cálcico, glicerol y material lipídico (ácido oleico-cera de abeja) con buenas propiedades barrera al agua así como con adecuadas propiedades mecánicas, para su posible aplicación sobre productos frescos. La aplicación de films a base de caseinatos resulta interesante debido a su alta calidad nutricional, excelentes propiedades sensoriales y adecuada protección de los productos alimenticios del medio que los rodea. Se trata de films transparentes, incoloros, insípidos y suaves. No obstante, su carácter hidrofílico limita su acción barrera al agua. Algunos estudios demuestran que la WVP de los films de caseinato cálcico es menor que cuando se emplea caseinato sódico o potásico lo cual se atribuye a las diferencias electrostáticas y al entrecruzamiento con el calcio. Con este estudio se pretende aprovechar la ventaja que aportan cada uno de los caseinatos más comunes en la industria de alimentos (sódico y cálcico) con el fin de obtener films con adecuadas propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua. La introducción de mezclas

lipídicas tiene por objetivo modificar la hidrofobicidad del recubrimiento. El efecto que ejercen los lípidos en la disminución de la transferencia de vapor de agua, depende de distintos factores como el estado físico del lípido, la longitud de cadena del lípido, la cantidad de lípido adicionado, la forma de adicionar el lípido (fundido, disuelto en solvente, etc.) o la distribución que alcancen los componentes lipídicos en la estructura final. Es por ello, que se ha decidido trabajar con mezcla de dos lípidos con propiedades físico-químicas diferentes, ácido oleico y cera de abeja.

I.INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. RECUBRIMIENTOS Y FILMS COMESTIBLES

La gran cantidad de residuos sólidos que se generan y la escasez de reservas de petróleo producidas en los últimos años, ha hecho que se disparen las propuestas por reducir la polución del medioambiente producida por los envases no biodegradables. Ello ha motivado al sector científico hacia el estudio y la obtención de films poliméricos biodegradables provenientes de fuentes biológicas que puedan reducir el empleo de envases poliméricos sintéticos. La utilización de biopolímeros tales como proteínas, polisacáridos y lípidos, pueden ejercer una protección adicional de los productos frescos y procesados para intentar paliar los problemas que derivan de la elaboración y almacenamiento de estos productos (desarrollo de microorganismos, desecación, pardeamiento, cambios texturales, desarrollo de olores y sabores extraños, entre otros). Aunque estas técnicas no pueden reemplazar totalmente los envases sintéticos, pueden ser utilizados como un envase complementario. En este sentido, la protección de los alimentos del entorno que les rodea hasta su consumo es una de las preocupaciones más importantes en la conservación de alimentos debido a que las características nutricionales y organolépticas del producto pueden verse alteradas por las interacciones generadas entre el alimento y el entorno. Un recubrimiento y un film comestible pueden ser definidos como una delgada capa de material protectora, compuesta por varios componentes, que varían según la utilidad de éste, y que pueden ser consumidos como parte del producto. Las películas o recubrimientos comestibles deben actuar como barreras a la transferencia de materia, controlando la transferencia de humedad, gases, lípidos, flavor y aroma entre los distintos componentes de un alimento o entre éste y el ambiente que le rodea (Guilbert, 1986; Gennadios & Weller, 1990; Debeaufort, Quezada-Gallo & Voilley, 1998; Krochta, 2002). Por tanto, el interés de este tipo de conservación presenta principalmente dos puntos clave: la biodegradabilidad y la comestibilidad (Kester & Fennema, 1986; Gennadios & Weller, 1990; Gontard & Guilbert, 1994; Guilbert, Gontard & Gorris, 1996; Krochta & De-Mulder-Johnston, 1997; Khwaldia *et al.*, 2004b).

I.2. MATERIALES FORMADORES DE RECUBRIMIENTOS

Los principales materiales formadores de films o recubrimientos comestibles pueden clasificarse en 3 grandes grupos: proteínas, polisacáridos y lípidos derivados de los animales o vegetales. También se pueden adicionar plastificantes, para reducir la fragilidad del film o recubrimiento, agentes emulsionantes que contribuyen a la formación del film o recubrimiento y sustancias antioxidantes y antimicrobianas que mejoran la efectividad del film o recubrimiento.

Por un lado, las proteínas y polisacáridos presentan buena barrera al O₂, CO₂, aroma y lípidos principalmente a bajas humedades relativas; la mayoría también tienen adecuadas propiedades mecánicas que los hacen útiles para mejorar la integridad estructural de productos frágiles (Donhowe & Fennema, 1994). Sin embargo, poseen pobres propiedades barrera al vapor de agua debido a su naturaleza hidrófila (Kester & Fennema, 1986; Gennadios & Weller, 1990). Por otro, los lípidos debido a su baja polaridad, no se adhieren a superficies hidrófilas y son utilizados como barrera al vapor de agua (Hagenamier & Shaw, 1990, 1992), para retardar la respiración y también para conferirles un mayor brillo, como ocurre en la industria de productos cítricos (Baldwin *et al.*, 1997), mejorando la apariencia visual de los mismos.

I.2.1. Proteínas

Las proteínas pueden agregar un valor nutricional a los alimentos que recubren (Baldwin *et al.*, 1995), aunque el empleo de proteínas de origen animal puede no ser adecuado para ciertos grupos de personas, como vegetarianas o personas que presentan intolerancia a las proteínas de la leche. Se caracterizan por poseer buenas propiedades para la obtención de films transparentes y homogéneos. Presentan la capacidad de adherirse fácilmente a superficies hidrófilas, aunque en la mayoría de casos, debido a su carácter polar, no ofrecen buena resistencia a la difusión de vapor de agua (Gennadios & Weller, 1990). Modificaciones de la estructura nativa de la proteína puede dar lugar a films con mejores propiedades, así por ejemplo, Pérez-Gago *et al.*, (1999) reportaron que la desnaturalización térmica de la proteína del suero de la leche da lugar a films con mejores propiedades de tensión a la rotura que los obtenidos con la misma proteína sin desnaturalizar.

I.2.2. Polisacáridos

Los polisacáridos son agentes hidrófilos formadores de películas con un amplio rango de viscosidad, permeabilidad a los gases relativamente baja, pero con una escasa resistencia a la transferencia de vapor de agua. Los más utilizados en la formulación de films son: la celulosa y sus derivados, el almidón y derivados (almidón crudo, almidón modificado, pregelatinizado, dextrinas y maltodextrinas), pectinas, extractos de algas (agar, alginatos, carragenatos), gomas exudadas (goma arábiga) y gomas de fermentación microbiana (Chantan y chitosan) (Nisperos– Carriedo, 1994). La mayoría de los polisacáridos imparten buenas propiedades mecánicas a los films que los hacen útiles para mejorar la integridad estructural de productos frágiles (Donhowe & Fennema, 1994). Además, pueden combinarse con proteínas modificando las propiedades mecánicas del films (Arvanitoyannis *et al.*, 1996, 1997, 1998a y b).

I.2.3. Lípidos

Los lípidos suelen ser empleados como agentes de brillo y con frecuencia forman parte de la composición de soluciones filmógenas basadas en polisacáridos y proteínas con el objeto de mejorar sus propiedades barrera al vapor de agua, aunque su uso en los films trae consigo problemas de opacidad, fragilidad e inestabilidad (rancidez) (Donhowe & Fennema, 1994; Guilbert *et al.*, 1996) dependiendo de la proporción en que son empleados. Los lípidos en estado líquido ofrecen menos resistencia a la difusión de gas y vapor que si están en estado sólido. Muchos lípidos existen en la forma cristalina. Los cristales individuales son altamente impermeables a los gases y al vapor de agua, sin embargo, éstos pueden penetrar a través de los huecos que quedan entre los cristales. Esta es la razón por la que las propiedades barrera de los lípidos dependen tanto de la orientación como del empaquetamiento de los lípidos cristalinos (Grenner & Fennema, 1989; Kester & Fennema, 1989b; Martín-Polo *et al.*, 1992).

I.2.4. Plastificantes

Los plastificantes son componentes de baja volatilidad, los cuales pueden ser añadidos para impartir flexibilidad al film polimérico. Ejemplos de buenos plastificantes son polioles, tales como, glicerol, sorbitol, manitol, sucrosa, propilenglicol y

polietilenglicol (Kester & Fennema, 1986). La incorporación de plastificantes mejora la flexibilidad y extensibilidad de los films, haciéndolos menos quebradizos y más resistentes al rasgado y al impacto. La causa de este efecto se debe a la disminución de las fuerzas intermoleculares entre las cadenas del polímero, lo que aumenta su movilidad, dando lugar a una disminución de la fuerza de fractura a la tensión y de la temperatura de transición vítrea (Sears & Darby, 1982). Aunque las propiedades mecánicas del film se ven mejoradas, se ha observado que en función del tipo, cantidad y peso molecular de los agentes plastificantes adicionados, pueden disminuir la efectividad de la película o recubrimiento como barrera al agua, gases, aromas o lípidos (Gontard *et al.*, 1993). El agua también es un agente plastificante de los films de proteínas. Así pues, el contenido en humedad del film, alterada por la humedad relativa ambiental (HR), ejerce un importante efecto sobre las propiedades del film.

I.3 LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS COMO MATERIALES FORMADORES DE RECUBRIMIENTOS

Las proteínas lácteas presentan un gran valor nutricional y son una fuente muy aprovechable y barata, debido a la condición de subproducto que cumplen en distintas actividades de la industria láctea. Las características físico-químicas de estas proteínas lácteas las convierten en agentes idóneos para la formación de films comestibles. La buena capacidad emulsionante de las proteínas de la leche, principalmente las caseínas y caseinatos, permite la formulación de films o recubrimientos comestibles emulsionados con distintos lípidos lo que contribuye a deprimir la permeabilidad al vapor de agua. Así pues, Krochta fue uno de los pioneros en formular films a base de proteínas del suero de la leche o caseinatos con diferentes lípidos y estudiar la viabilidad de estos recubrimientos sobre distintos productos alimenticios.

En la literatura existe una extensa revisión bibliográfica de los films o recubrimientos basados en proteínas lácteas (Avena-Bustillos & Krochta, 1993; Gennadios *et al.*, 1994; McHugh & Krochta, 1994b; Chen, 1995; Avena-Bustillos *et al.*, 1997; Chick & Ustunol, 1998; Sothornvit & Krochta, 2000; Chen, 2002; Barreto *et al.*, 2003; Khwaldia *et al.*, 2004a y b; Audic & Chaufer, 2005).

I.3.1. Caseínas y caseinatos

Las caseínas representan la fracción proteica mayoritaria de la leche y se organizan formando micelas (se estima que alrededor de un 95 % de la caseína de la leche las forma). El concepto de micela de caseína se refiere al complejo coloidal formado por fosfato cálcico y los centros de fosfato de las propias caseínas. Las funciones principales de éstas están relacionadas con la asimilación de calcio, principalmente en las primeras etapas del desarrollo de los mamíferos. Se trata de un grupo homogéneo de proteínas formado esencialmente por α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína en un ratio 4:1:4:1, muy variable en función de la genética del propio animal, la época del año, etc. Las α , β y κ -caseínas, unidas, forman micelas coloidales estables, las cuales son estabilizadas mediante puentes calcio-fosfato, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Las micelas se componen a su vez de otras submicelas. En ellas es la κ -caseína se encuentra en la superficie, dando estabilidad al complejo. El fosfato cálcico actúa como cementante, uniendo entre sí a las submicelas. La β -caseína mantiene un equilibrio dinámico entre su concentración en estado coloidal y su concentración en los alrededores, pasando de una fase a la otra de forma reversible. La resolución de la estructura primaria de las caseínas ayuda a clasificarlas en función de su estructura química. La presencia uniforme de prolina en las cadenas dificulta la formación de estructuras secundarias en forma de α -hélices estables. Sólo una pequeña parte del orden alcanzado en la estructura primaria es conservado en posteriores estructuras, haciendo, así de las caseínas una familia proteica altamente evolucionada. Las secuencias hidrofóbicas, por el contrario, permanecen bien conservadas. Los aminoácidos formadores de caseínas son ricos en iones negativos, como fosfatos, grupos carboxilos terminales, sulfhidrilos, lo cual favorece la tendencia a unirse con cationes como el calcio, bario, magnesio, sodio, etc. En ocasiones, consecuencia de esta afinidad, particularmente al Ca^{2+} , se produce la formación de agregados y precipitados. La sensibilidad a precipitación por la acción del Ca^{2+} decrece en el orden α_{s1} , α_{s2} , β y κ -caseína, resultando incluso no afectada esta última.

Las fracciones de caseína son fácilmente digeribles, gracias a su estructura abierta en estado natural, lo que asegura su aprovechamiento nutritivo. Las caseínas son ricas en lisina (aminoácido esencial poco frecuente en las proteínas de origen vegetal) y una importante fuente de calcio. A pesar de que las caseínas se consideran hidrofílicas, las β

y κ -caseínas son anfipáticas, con terminaciones hidrofóbicas e hidrofílicas, lo cual les confiere buenas propiedades emulsificantes. En el caso de la κ -caseína esta propiedad le permite ser la estabilizadora principal de las micelas de caseína, exponiendo su terminal C al medio acuoso y su terminal N al interior de la micela. Los complejos caseínicos se desintegran y precipita la proteína a pH 4.6 y 30°C (Chen, 2002). Los contenidos en aminoácidos determinan también el comportamiento de las proteínas como formadoras de films. Bajos contenidos en cisteína resultan en pocas interacciones disulfuro, y de este modo, una estructura aleatoria abierta. En comparación con la proteína del suero de la leche la caseína tiene un alto contenido de prolina. Como resultado, la caseína tiene mejores propiedades emulsificantes. Éstas son solubles y resistentes a la desnaturalización térmica y/o coagulación, lo que significa que los films permanecen estables en un rango mayor de pH, temperatura y concentración de sal (Kinsella, 1984; Khwaldia *et al.*, 2004b).

La precipitación de las caseínas a pH 4.6 mediante la adición de un ácido mineral o por conversión de la lactosa de la leche en ácido láctico y posterior adición de una solución alcalina hasta pH 7.0 da lugar a los caseinatos. Dependiendo de la solución alcalina utilizada se puede obtener caseinato sódico (NaCas), caseinato cálcico (CaCas), caseinato magnésico (MgCas) y caseinato potásico (KCas), siendo los dos primeros los más comunes. Cuando se utiliza hidróxido sódico para ajustar el pH, el producto que se forma es el caseinato sódico que cuando se dispersa en agua contiene moléculas de caseínas individuales y algunos pequeños agregados de caseína (Lucey *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 1999). Cuando el pH se ajusta adicionado hidróxido cálcico, se obtiene caseinato cálcico. Debido a la alta sensibilidad de las caseínas al calcio (Swaisgood, 1992; Srinivasan *et al.*, 1999), este producto contiene agregados de caseína de varios tamaños (Moughal *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2000). En este sentido, como el estado de agregación de las proteínas influye considerablemente en sus propiedades emulsionantes, existen notables diferencias entre la capacidad emulsionante de ambos caseinatos. Una de las principales diferencias de los dos tipos de caseinatos más abundantes en la industria de alimentos es la composición en las fracciones caseínicas y, más concretamente, el contenido en aminoácidos. Si bien α - y β -caseínas son las dos fracciones predominantes en estos caseinatos, algunos estudios demuestran que la primera se adsorbe preferentemente sobre el caseinato cálcico mientras que es la

β -caseína la que se encuentra en mayor proporción en el caseinato sódico (Srinivasan *et al.*, 1999). Ambos caseinatos se caracterizan por presentar una alta capacidad emulsionante frente a otras proteínas debido al alto contenido en prolina (Chen, 2002; Khawladia *et al.*, 2004b), sin embargo el contenido en prolina es ligeramente inferior en la fracción α -caseína (Gennadios *et al.*, 1994a), lo que podría justificar la menor capacidad emulsionante del caseinato cálcico.

Ho, (1992) comparó la permeabilidad al vapor de agua (WVP) de los films plastificados con glicerol (ratio 4:1) preparados con los distintos tipos de caseinatos y concluyó que los valores de WVP disminuían en el siguiente orden: caseinato potásico, caseinato sódico, caseinato cálcico y caseinato magnésico. Las diferencias en los valores de permeabilidad pueden explicarse tanto por la formación de entrecruzamientos como por el tamaño del catión. Por un lado, los iones divalentes pueden facilitar el entrecruzamiento dando lugar a una estructura más compacta y menos permeable. Por otro, el tamaño molecular del catión tiene un papel relevante en las diferencias observadas entre las permeabilidades del caseinato sódico y potásico o entre las permeabilidades de caseinato cálcico y magnésico. Los cationes de menor tamaño pueden interferir menos en la red proteica, aportando consistencia estructural y, por tanto, menores valores de permeabilidad al vapor de agua.

I.3.1.1. Propiedades de α - y β -caseínas

La α_{s1} -caseína está compuesta por un componente mayor y otro menor. Ambos presentan la misma secuencia de aminoácidos, aunque el componente menor tiene un residuo fosforilado de serina más. La α_{s1} -caseína tiene cinco variantes genéticas. Estas son la variante A, B, C, D y E. La más extendida es la variante B, compuesta por 199 aminoácidos. La cadena de α_{s1} -caseína está compuesta por dos zonas predominantemente hidrofóbicas (aminoácidos 1 a 44 y 90 a 199) y una zona altamente polar (aminoácidos 45 a 89). En la leche pueden estar presentes unas pequeñas cadenas denominadas λ -caseínas, que son el resultado de la proteólisis de la α_{s1} -caseína por la enzima plasmina. En la α_{s2} -caseína son cinco los componentes que la forman, todos ellos con la misma estructura primaria de aminoácidos, si bien éstos resultan translocados posteriormente. Las variantes genéticas son cuatro: A, B, C y D. La variante A está formada por 207 aminoácidos. Su estructura es marcadamente dipolar,

existiendo concentración de cargas negativas cerca de los terminales N y positivas en los terminales C.

La β -caseína es, junto a la α_{s1} -caseína, la más abundante de las caseínas de la leche. Está formada por ocho componentes menores, los cuales son fragmentos proteolíticos de un componente mayor, del cual existen siete variantes genéticas (A^1 , A^2 , A^3 , B, C, D y E). La β -caseína A^2 consta de 209 aminoácidos. El extremo terminal N está cargado negativamente, es hidrofílico y estabiliza al suero frente al calor. El resto de la cadena tiene carga neutra. El extremo carboxílico permanece unido a la micela. La acción de la plasmina sobre este extremo da lugar a las γ_1 , γ_2 , y γ_3 -caseína, presentes en la leche. La β -caseína es menos sensible al Ca^{2+} que las α -caseínas, si bien se ve más afectada por el calor (Holt, 1993).

I.3.2. Proteínas del suero de la leche

Las proteínas del suero de la leche representan el 20% del total de las proteínas lácteas, entre las cuales cabe destacar α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúminas, inmunoglobulinas y proteoasas-peptonas (Bruner, 1977). Industrialmente se obtienen dos tipos de proteínas del suero. Por un lado, los concentrados de proteína del suero de la leche (WPC) con un 25-80% de proteína, sin desnaturalización proteica y mediante ultrafiltración y diafiltración (Morr & Ha, 1993; Khwaldia *et al.*, 2004b). Por otro, el aislado de proteínas del suero (WPI) con una concentración proteica sobre el 90% y cuyo coste de producción aumenta considerablemente debido al proceso de separación y purificación. Su capacidad para formar films está influenciada por la composición en aminoácidos, distribución y polaridad, los cuales afectan a la formación de puentes de hidrógeno; puentes disulfuro (S-S) intra- e inter- moleculares y enlaces iónicos entre los grupos amino y carboxilo. Las proteínas del suero de la leche son proteínas globulares que contienen la mayoría de grupos hidrofóbicos y SH en el interior de las moléculas. La formación de films a base proteína del suero de la leche requieren de la desnaturalización de la proteína en disolución acuosa. El tratamiento térmico modifica estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los grupos hidrofóbicos y SH (Shimada & Cheftel, 1998) y facilitando la formación de puentes S-S e interacciones hidrofóbicas durante el secado (Mc Hugh & Krochta, 1994b). La desnaturalización por calor por encima de 65°C abre

la estructura de la β -lactoglobulina, expone los grupos sulfhidrilo e hidrofóbicos, e induce la oxidación de los sulfhidrilos libres, las uniones disulfuro y las uniones hidrofóbicas cambian (Brunner, 1977; Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989; Shimada & Cheftel, 1989; Adrian & Frangne, 1991; Khwaldia *et al.*, 2004b). Estas reacciones pueden ser usadas para formar films comestibles insolubles en agua (McHugh & Krochta, 1994b; Banerjee *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995, 2000; Khwaldia *et al.*, 2004b), frente a los films de caseinato, que son solubles. Pérez-Gagó *et al.*, (1999) observó que proteínas del suero que no han sido desnaturalizadas previamente también presentan alta capacidad para la formación del film. Dado que las proteínas nativas (sin ser desnaturalizadas previamente) mantienen su estructura globular con la mayoría de los grupos SH e hidrofóbicos dispuestos en el interior de la molécula, los films formulados con la proteína sin desnaturalizar, poseen una estructura más aleatoria en la cual la cohesión depende principalmente de los puentes de hidrógeno. Por contra, las fuerzas intermoleculares que promueven la cohesión de los films elaborados a base de proteína del suero desnaturalizada son los puentes disulfuro (S-S) y las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de proteínas. En cualquier caso, los films son transparentes y poseen valores de permeabilidad al vapor de agua similares; sin embargo, poseen diferentes propiedades mecánicas y solubilidad. Los films elaborados a partir de la proteína del suero de la leche previamente desnaturalizada se vuelven más insolubles y produce films más fuertes y que se resisten a mayores deformaciones.

I.4. INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DEL FILM

Los films y recubrimientos comestibles deben reunir ciertas propiedades funcionales para lograr mantener la calidad y estabilidad del producto que recubren. Estas propiedades se ven seriamente afectadas por la naturaleza de sus componentes, la tecnología utilizada en su preparación, la elección del plastificante, la naturaleza del solvente, la velocidad de evaporación del solvente, la técnica de aplicación y su espesor (Guilbert. 1986).

I.4.1 efecto del plastificante y la humedad relativa

Los films de caseína y caseinatos suelen ser frágiles si no se le adicionan plastificantes, lo que limita su utilización (Chen, 1995). Los plastificantes actúan sobre los puentes de hidrógeno, relajando la estructura y mejorando la flexibilidad de los films proteicos. Aunque las propiedades mecánicas del film se ven mejoradas, se ha observado que en función del tipo, cantidad y peso molecular de los agentes plastificantes adicionados, pueden disminuir la efectividad de la película o recubrimiento como barrera al agua, gases, aromas o lípidos (Gontard *et al.*, 1993). El agua también es un agente plastificante de los films de proteínas. Así pues, el contenido en humedad del film, alterada por la humedad relativa ambiental (HR), ejerce un importante efecto sobre las propiedades del film. Tomasula *et al.*, 1998 mostró que para preparar films de caseína adecuados para medir propiedades mecánicas se necesita una concentración mínima de 20% de glicerol. Siew *et al.*, (1999) observaron que los films de caseína plastificados con glicerol tenían una permeabilidad al vapor de agua más baja que los films plastificados con polietilenglicol (PEG), lo cual lo atribuyeron a la mayor capacidad de hidratación del PEG y al efecto que ejercen sobre la conformación de la proteína. Los films de caseinato plastificados con glicerol tenían un mayor porcentaje de estructura en α -hélice y menor de estructura aleatoria. Chick & Ustunol (1998), observaron que los films de caseína plastificados con sorbitol son más efectivos como barrera a la humedad y poseen mayor tensión a la rotura que los plastificados con glicerol. Esto se explica por el mayor carácter hidrofílico del glicerol y por el tamaño de las moléculas. Si el tamaño de la molécula es menor, mayor es la interacción sobre la matriz proteica y, por tanto, reduce el número de puentes de hidrógeno de la matriz. Maté & Krochta (1996) estudiaron el efecto de la cantidad de glicerol sobre la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y la permeabilidad al oxígeno (OP) para los films formulados con proteína del suero de la leche (WPI) y β -lactoglobulina. Se observó que la permeabilidad al vapor de agua aumenta al aumentar la cantidad de glicerol. Sin embargo, a pesar de la diferentes estructuras moleculares (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro S-S) entre los dos tipos de proteínas, no se observaron diferencias significativas ni en la WVP ni en la OP.

Debido a la naturaleza hidrofílica de las proteínas, el agua plastifica los films a base de esta proteína, por lo que es de esperar que se produzcan incrementos en la permeabilidad al vapor de agua a medida que aumenta el contenido en humedad. McHugh *et al.*, (1994a) estudiaron el efecto de la HR en la WVP y OP de films a base de proteínas del suero de la leche. Los resultados de este estudio mostraron una relación exponencial entre las WVP y HR y entre OP y HR para los films formulados a base de proteínas del suero de la leche.

I.4.2 efecto del tipo y cantidad de lípido

Los lípidos suelen ser empleados como agentes de brillo y con frecuencia forman parte de la composición de soluciones filmógenas basadas en polisacáridos y proteínas con el objeto de mejorar sus propiedades barrera al vapor de agua, aunque su uso en los films trae consigo problemas de opacidad, fragilidad e inestabilidad (rancidez) (Donhowe & Fennema, 1994; Guilbert *et al.*, 1996) dependiendo de la proporción en que son empleados. En general, la transferencia de agua a través de un film lipídico aumenta cuanto menor es la longitud de la cadena hidrocarbonada y mayor número de insaturaciones (Kamper & Fennema, 1984b, 1985). Además, la resistencia que ofrece el film lipídico a la humedad se relaciona inversamente con la polaridad de los lípidos. En este sentido, las ceras tales como la cera de abeja son más eficientes como barrera a la transferencia de masa que los monoglicéridos acetilados o el ácido esteárico. Cabe añadir, que la menor eficiencia como barrera al vapor de agua de los lípidos más hidrofílicos (ácidos grasos) reside en que los grupos polares atraen las moléculas de agua facilitando su transporte (Fennema *et al.*, 1994). Algunos autores han estudiado la efectividad de los lípidos emulsionados en reducir la permeabilidad al vapor de agua de las proteínas del suero de la leche (Avena-Bustillos & Krochta, 1993; Mc Hugh & Krochta, 1994 a y b). Estas proteínas del suero tienen una alta capacidad emulsionante. El ácido palmítico y el ácido esteárico reducen la permeabilidad al vapor de agua de los films elaborados con proteína del suero, pero no tanto como la cera de abeja. Sin embargo, las emulsiones no son completamente estables y además se produce parcialmente una bicapa durante el secado de los films (Mc Hugh & Krochta, 1994b).

I.4.3. Efecto del entrecruzamiento y el pH

Un aumento de la cohesión entre las cadenas polipeptídicas mejora las propiedades barrera de los films. El pI (punto isoeléctrico) de la caseína, la agitación mecánica así como la presencia de iones calcio o transglutaminasa son algunos de los factores que facilitan las interacciones proteína-proteína. Kester & Fennema, (1986) mostraron que el tratamiento con iones calcio no afecta a las propiedades barrera al vapor de agua de los films proteicos pero los tratamientos ácidos aumentan la resistencia a la difusión de agua a través de estos films. Así mismo, la cohesión del films también puede aumentar provocando el entrecruzamiento de los caseinatos con transglutaminasa (Motoki *et al.*, 1987). Sin embargo, el alto coste de producción y la limitada disponibilidad de transglutaminasa, limita su aplicación en los alimentos. Los tratamientos físicos, tales como la irradiación, aumentan la cohesión de la proteína por formación de entrecruzamientos. Como se ha mencionado anteriormente, los iones divalentes también favorecen el entrecruzamiento aumentando la cohesión y disminuyendo la permeabilidad al vapor de agua. Así pues, la inmersión de los films de caseinato en disoluciones con sales cálcicas reduce la solubilidad y la WVP (Krochta *et al.*, 1990).

I.5. APLICACIONES DE RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

Los recubrimientos comestibles vienen usándose desde muy antiguo. En el siglo XII ya se usaba cera, en China, para prevenir la deshidratación de las frutas (Guilbert & Biquet, 1986; Debeaufort, Quezada-Gallo & Voilley, 1998). Desde el siglo XVI se recubre la carne con distinto tipo de grasas para evitar su desecamiento (Kester & Fennema, 1986; Debeaufort, Quezada-Gallo & Voilley, 1998). La sacarosa se utiliza para recubrir distintos frutos secos, y así preservar su conservación al tiempo que se les añade valor, desde el siglo XIX. Desde los años 30 se vienen haciendo emulsiones a partir de ceras o aceites y agua para su aplicación sobre la superficie de frutas, mejorando así su aspecto externo y mejorar el control de la madurez y la pérdida de agua. Más recientemente se han venido desarrollando recubrimientos a base de distintos polisacáridos comestibles (alginatos, carragenatos, éteres de celulosa, pectina, derivados de almidón...) para mejorar la calidad de la carne durante su almacenamiento y

distribución (Contreras-Medellin & Labuza, 1981; Debeaufort, Quezada-Gallo & Voilley, 1998).

El uso de films o recubrimientos comestibles en la actualidad está presente en distintos sectores del campo de la alimentación, atendiendo en cada uno de ellos a las particularidades propias de la conservación de cada alimento. La mayor parte de las aplicaciones de los films comestibles se orientan a controlar la transferencia de vapor de agua, si bien también son usados para encapsular compuestos aromáticos (Deasy, 1984; Debeaufort & Voilley, 1994; Reineccius, 1994; Debeaufort, Quezada-Gallo & Voilley, 1998), antioxidantes, agentes antimicrobianos (Rico-Peña & Torres, 1991; Debeaufort, Quezada-Gallo & Voilley, 1998), pigmentos, evitar reacciones de pardeamiento (Mazza & Qi, 1991; Debeaufort, Quezada-Gallo & Voilley, 1998), o preservar nutrientes como por ejemplo las vitaminas (Avena-Bustillos & Krochta, 1993; Debeaufort, Quezada-Gallo & Voilley, 1998).

En cualquier caso, las características de los films dependen directamente de los requerimientos del alimento susceptible de adulterarse, al que van a recubrir. Por ejemplo los alimentos ricos en grasas polinsaturadas necesitan protección frente a la permeabilidad de oxígeno, los productos vegetales requieren control de transferencia de masa selectivo que permita la respiración y limite la pérdida de agua (El Ghaout *et al.*, 1991; Debeaufort, Quezada-Gallo & Voilley, 1998) o evitar la ganancia de solutos en deshidratación osmótica (Kurte, Del Valle & Aguilera, 1994; Debeaufort, Quezada-Gallo & Voilley, 1998). Uno de los campos de mayor interés en la actualidad es la aplicación de films o recubrimientos comestibles sobre alimentos elaborados y heterogéneos. Este interés radica en la imposibilidad de introducir plásticos u otros envoltorios no comestibles en el interior de un producto alimentario, para ser consumido de forma indivisible, como por ejemplo, entre la pasta de tomate y la pasta de una torta, ó entre sustancias con un bajo contenido en agua, como cereales, galletas, frutos secos, frutas deshidratadas y un medio rico en agua, en el que éstas deben ser introducidas, como sopas, yogur, crema, puré, etc.

I.5.1 recubrimientos a base de caseinato sódico y/o cálcico

En varios trabajos se ha estudiado la combinación de caseinatos con diferentes lípidos y su aplicación sobre productos alimenticios. Avena-Bustillos *et al.*, (1994a)

reportaron la efectividad de los “recubrimientos emulsionados” formulados con caseinato sódico y cálcico con distintos lípidos (1:1 ratio, y 2% de sólidos totales) sobre la resistencia al vapor de agua, “*white blush*”, y la tasa de respiración de zanahorias cortadas y peladas. Todos los recubrimientos, excepto los de caseinato sódico-monoglicéridos acetilados, aumentaron la resistencia al vapor de agua de forma significativa. El recubrimiento formado por caseinato cálcico y cera de abeja ofreció la máxima resistencia al vapor de agua, pero tenía una apariencia blanquecina indeseable, lo que se atribuyó a la cristalización de la cera. Una de las formulaciones con caseinato sódico y ácido esteárico fue la más efectiva para retardar el “*white blush*” de las zanahorias durante su almacenamiento. Algunos de estos recubrimientos provocaron un descenso significativo en la tasa de respiración de las zanahorias.

Avena-Bustillos *et al.*, (1994b) estudiaron la aplicación de recubrimientos comestibles sobre calabacines para minimizar la pérdida de agua y mejorar la calidad de los mismos. Los recubrimientos formulados estaban compuestos por caseinato y monoglicéridos acetilados. La mayor resistencia al vapor de agua se observó con una mayor proporción de caseinato sódico con respecto a la cantidad de monoglicéridos acetilados. Los recubrimientos formulados con caseinato cálcico no afectaron a la concentración interna de CO₂ y etileno, o a las propiedades ópticas de la superficie del alimento.

Recubrimientos con los mismos componentes fueron aplicados sobre manzana y apio entero (Avena-Bustillos *et al.*, 1997) observando que la resistencia al vapor de agua en los apios era óptima cuando las proporciones eran 1.5% caseinato cálcico, 1.5% de monoglicéridos acetilados. Sin embargo, la aplicación de estos recubrimientos sobre las manzanas enteras no modificó la resistencia al vapor de agua, el ratio de respiración o la producción de etileno. Además, señalaron que el tipo de caseinato, el entrecruzamiento con calcio o la presencia de sorbato potásico no modificó la resistencia al vapor de agua (Avena-Bustillos *et al.*, 1997).

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II.1. OBJETIVOS

II.1.1. Objetivo general

Diseñar y optimizar formulaciones formadoras de recubrimientos a base de caseinato sódico, caseinato cálcico o mezclas de ambos caseinatos, glicerol y material lipídico con buenas propiedades barrera al agua así como adecuadas propiedades mecánicas y analizar la influencia de la composición en las mismas.

II.1.2. Objetivos específicos

- Diseñar formulaciones formadoras de recubrimiento a base de caseinato sódico y material lipídico utilizando agua como disolvente.
- Diseñar formulaciones formadoras de recubrimiento a base de caseinato cálcico y material lipídico utilizando agua como disolvente.
- Diseñar formulaciones formadoras de recubrimiento a base de mezclas de ambos caseinatos (sódico y cálcico) y material lipídico utilizando agua como disolvente.
- Estudio del tamaño de partícula de las disoluciones formadoras de recubrimiento.
- Analizar el efecto del tipo de caseinato predominante en la emulsión (caseinato sódico y/o caseinato cálcico) en las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua.
- Analizar el efecto del tipo de material lipídico (ácido oleico y/o cera de abeja) en las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua del film.

- Analizar la influencia de la microestructura del film en las propiedades mecánicas y de barrera.

II.2. PLAN DE TRABAJO

- Revisión bibliográfica
- Diseño y preparación de diversas formulaciones formadoras de recubrimiento a base de caseinato sódico y/o caseinato cálcico, glicerol y material lipídico utilizando agua como disolvente.
- Estandarización de la metodología de preparación de formulaciones.
- Análisis del tamaño de partícula de las emulsiones formadoras de recubrimiento.
- Obtención de films, a partir de las distintas disoluciones formadoras de recubrimiento, fijando el contenido en sólidos totales.
- Análisis del espesor de los films
- Análisis de las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua de los films.
- Análisis de la microestructura de los films.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

III. 1. DISEÑO Y PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES

Para lograr los objetivos propuestos en el presente trabajo se han llevado a cabo dos estudios. En el primer estudio se prepararon 9 formulaciones de caseinato en agua al 8% (p/p). Las seis primeras formulaciones se elaboraron con caseinato sódico (Alanate-110, Industrias de Suministros Llorella, S. A.) y las cuatro restantes con caseinato cálcico (Alanate-310, Industrias de Suministros Llorella, S. A.). Con ambos caseinatos, se elaboraron como formulaciones control, disoluciones en agua al 8% (p/p) incorporando glicerol (Panreac Química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona, España), como material plastificante. En ambos casos la relación proteína:plastificante se mantuvo constante en 1:0.3. Las cinco y tres formulaciones restantes de caseinato sódico y caseinato cálcico, respectivamente, se elaboraron incorporando lípidos a la formulación. En todos los casos la relación proteína:plastificante:lípido se mantuvo constante en 1:0.3:0.5. Los lípidos utilizados fueron cera de abeja (Brillocera, S. A., Valencia) y ácido oleico (pureza mínima 98%, Panreac Química, S. A.) o mezcla de ácido oleico y cera de abeja en distintas proporciones (100:0, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100). La tabla III.1 muestra la composición (relación proteína:plastificante:lípido, tipo de proteína y de lípido) de las formulaciones elaboradas en el primer estudio. Como se observa en la tabla no pudieron obtenerse formulaciones de caseinato cálcico:glicerol:lípido para las mezclas de lípidos 50:50, 30:70 y 0:100 ya que se formaban agregados en la emulsión formadora de recubrimiento.

En el segundo estudio se prepararon 16 formulaciones distintas. En todas ellas se mantuvo la misma relación proteína:plastificante:lípido utilizada en el primer estudio (1:0.3:0.5). Como material proteico se usaron mezclas de caseinato sódico y caseinato cálcico, y como material lipídico mezclas de ácido oleico y cera de abeja en distintas proporciones. En este sentido se elaboraron 3 formulaciones control con distintas relaciones caseinato sódico:caseinato cálcico (3:1, 2:1, 1:1, 1:3) al 8% (p/p) de proteína total en agua. Las restantes 10 formulaciones se elaboraron manteniendo las mismas relaciones entre caseinatos e incorporando material lípido en una proporción proteína:lípido constante (1:0.5) pero con distintas relaciones entre ácido oleico:cera de

abeja (100:0, 70:30, 50:50, 30:70, 0:100). La tabla III.2 muestra la composición (relación proteína:plastificante:lípido, tipo de proteína y de lípido) de las formulaciones elaboradas en el segundo estudio. Como se observa en la tabla no pudieron obtenerse formulaciones para las mezclas de lípidos 30:70 y 0:100, ya que se formaban agregados en la emulsión formadora de recubrimiento.

Tabla III.1. Composición de las distintas formulaciones elaboradas en el primer estudio.

Formulación	ratio proteína:gly:lípido	tipo y % de proteína		Tipo y % material lipídico	
		Caseinato sódico	Caseinato cálcico	ácido oleico	cera de abeja
1	1:0.3:0.5	100			
2	1:0.3:0.5	100		100	0
3	1:0.3:0.5	100		70	30
4	1:0.3:0.5	100		50	50
5	1:0.3:0.5	100		30	70
6	1:0.3:0.5	100		0	100
7	1:0.3:0.5		100		
8	1:0.3:0.5		100	100	0
9	1:0.3:0.5		100	70	30

La metodología de preparación de las formulaciones fue estandarizada. Para las formulaciones control de cada uno de los estudios, se prepararon disoluciones acuosas al 8% (p/p) de la proteína (caseinato sódico, caseinato cálcico o mezcla de ambos caseinatos) y glicerol, con una relación proteína:plastificante fija de 1:0.3. Las formulaciones fueron homogenizadas durante 1 minuto a 13500 r.p.m. y 3 minutos a 20500 r.p.m. utilizando un ultraturrax a vacío (Janke & Kunkel, Germany), y desgasificadas con un bomba de vacío (Diaphragm vacuum pump, Wertheim, Germany) a temperatura ambiente. Las formulaciones que contenían cera de abeja en su composición se introdujeron, previamente a la homogenización, en una baño termostataado a 85 °C hasta alcanzar dicha temperatura. Una vez alcanzada la temperatura se rectificó la cantidad de agua evaporada durante el calentamiento para cada una de las formulaciones, añadiendo a continuación la cantidad de cera de abeja determinada, según la formulación (tabla III.1. y 2). Después de la fusión del material lipídico, se homogeneizó la muestra durante 1 minuto a 13500 r.p.m y 1 minuto a 20500 r.p.m.

Posteriormente, la disolución se enfrió hasta temperatura ambiente, manteniendo en todo momento la emulsión en agitación, y finalmente, se añadió la cantidad de ácido oleico necesaria (tabla III.1 y 2) y se procedió a la homogeneización de la muestra durante 2 minutos más a 20500 r.p.m.

Tabla III.2. Composición de las distintas formulaciones elaboradas en el segundo estudio.

Formulación	ratio proteína:gly:lípido	tipo y % de proteína		Tipo y % material lipídico	
		NaCas	CaCas	ácido oleico	cera de abeja
1	1:0.3:0.5	3	1		
2	1:0.3:0.5	3	1	100	0
3	1:0.3:0.5	3	1	70	30
4	1:0.3:0.5	3	1	50	50
5	1:0.3:0.5	2	1		
6	1:0.3:0.5	2	1	100	0
8	1:0.3:0.5	2	1	70	30
9	1:0.3:0.5	2	1	50	50
10	1:0.3:0.5	1	1		
12	1:0.3:0.5	1	1	100	0
13	1:0.3:0.5	1	1	70	30
14	1:0.3:0.5	1	3		
15	1:0.3:0.5	1	3	100	0
16	1:0.3:0.5	1	3	70	30

III. 2. OBTENCIÓN DE LOS FILMS

Los films se obtuvieron pesando y vertiendo una cantidad controlada de disolución en una placa de teflón de 150 mm de diámetro. Se trabajó manteniendo fija para todas las formulaciones la cantidad de sólidos totales vertidos (2 g). Tras el vertido, las muestras se dejaron secar durante 24 horas a un $45\% \pm 2$ de HR y a una temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Una vez extraídos de las placas, los films fueron almacenados en desecadores a 58% de humedad relativa utilizando una disolución saturada de nitrato de magnesio 6-hidrato y en nevera a 5°C . A los films obtenidos se les caracterizaron su espesor, propiedades mecánicas, propiedades ópticas y permeabilidad al vapor de agua.

III. 3. ANÁLISIS REALIZADOS

III. 3.1. Tamaño de partícula

La distribución del tamaño de las partículas en volumen ($D_{4,3}$) y la media del tamaño de la distribución de partículas en superficie ($D_{3,2}$) se determinaron usando un analizador de tamaño de partícula *Mastersizer 2000* (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK), basado en la técnica de difracción láser. Esta técnica se basa en la medida de la intensidad de dispersión de la luz que causa las partículas dispersas en la emulsión. El equipo consta de un banco óptico y una unidad de dispersión por vía húmeda (Hidro MU). El banco óptico contiene una fuente de luz láser principal de HeNe (633 nm), otra fuente de luz azul, una célula de medida y unos detectores. La fuente de luz azul, con un máximo a 466nm (longitud de onda menor que la incluida en la fuente de luz láser principal), permite aumentar la intensidad de luz sobre la célula de medida respecto al laser estándar de HeNe, el cual produce intensidades de luz muy bajas, permitiendo detectar y analizar de una manera mucho más eficaz partículas extremadamente pequeñas. La unidad de dispersión por vía húmeda, permite realizar el análisis diluyendo la muestra a una concentración de un 1-2% aproximadamente.

El ángulo de luz difractada es función del tamaño de la partícula, la forma y la longitud de onda de la luz incidente. El ángulo de difracción es inversamente proporcional al tamaño de la partícula. Esto conlleva a que se asuma que las partículas dispersas en la emulsión sean esféricas, las cuales generan patrones de dispersión simétricos y cuantificables matemáticamente. Las emulsiones se diluyeron en un medio acuoso para evitar efectos de dispersión múltiple y se midieron manteniendo el sistema en continua agitación para que las muestras fuesen homogéneas.

La medida del diámetro medio se basa en una partícula hipotética que representa el total de las partículas presentes en la muestra. La distribución del tamaño de las partículas en volumen ($D_{4,3}$) es la media del tamaño basada en el peso por unidad de partículas, mientras que la media del tamaño de la distribución de partículas en superficie ($D_{3,2}$) representa el tamaño medio de una superficie específica por unidad de volumen. Estos diámetros medios de la partícula se definen por las ecuaciones III.1 y III.2.

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

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

Donde:

- n_i : número de partículas de cada tamaño
- d_i : diámetro de la partícula.

La distribución del tamaño de las partículas se presenta a través de la curva de frecuencia que permite ver los picos y comparar los resultados de las diferentes medidas. El eje x representa el logaritmo del tamaño de partícula. El eje y es una escala lineal, y representa la fracción de volumen relativo en porcentaje de partícula que pertenece a una clase de tamaño dado. El volumen relativo (φ) se define como muestra la ecuación III. 3.

$$\varphi(\%) = (v_i / V) \times 100 \quad (\text{III.3})$$

Donde:

- v_i : volumen de las partículas con un tamaño de particular determinado
- V : volumen total de partículas en la emulsión.

III. 3.2. Espesor del film

El espesor de los films se determinó en cuatro puntos distintos del mismo utilizando un micrómetro electrónico digital Palmer (0-25 ± 0.001 mm).

III. 3.3. Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas de los films se determinaron haciendo uso de una prensa universal Stable Micro Systems (SMS) modelo TA.XTplus (Haslemere, England) de

acuerdo al método estándar D882 (ASTM 1992). Las muestras (8 por cada film) se cortaron en forma rectangular con dimensiones de 25 mm de ancho y de 100 mm de largo. Posteriormente se equilibraron a 58% de humedad relativa en un desecador utilizando una disolución de nitrato de magnesio-6-hidratado (Panreac Química, S.A., Castellar del Vallés, Barcelona, España) a una temperatura de 5 °C. Antes del ensayo de tensión se determinó el espesor de los films en distintos puntos y se calculó un promedio del mismo. Los films se montaron en unas pinzas para ensayos de tensión (modelo A/TG, Stable Micro System, Haslemere, England). La separación inicial de las pinzas y la velocidad de elongación del film fueron de 50 mm y 50 mm·min⁻¹, respectivamente.

Las curvas fuerza-distancia obtenidas en el ensayo se transformaron en curvas de tensión (σ)-deformación de Henky (ε_H) (ecuaciones III.4 y III.5).

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{S(t)} = \frac{F(t) \cdot (L_0 - l(t))}{b \cdot h \cdot L_0} \quad (\text{III.4})$$

$$\varepsilon_H = \ln \frac{(L_0 + d(t))}{L_0} \quad (\text{III.5})$$

Donde:

- L_0 : longitud de la muestra (m).
- b : base de la muestra rectangular (m).
- h : espesor de la muestra rectangular (m).
- $d(t)$: 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 cada curva de esfuerzo (σ)-deformación de Henky (ε_H) se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Módulo de elasticidad o modulo de Young (EM) (pendiente de la zona lineal de la curva), expresado en MPa.
- Tensión de fractura (TS), expresado en MPa.

- Deformación hasta el punto de fractura (E), expresado en porcentaje.

III. 3.4. Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua de los films se determinó a partir de una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (Mc Hugh *et al.*, 1993), para un gradiente de humedad relativa: 58-100%. Antes del ensayo se determinó el espesor de los films en distintos puntos y se calculó un promedio del mismo. Las muestras (6 por cada film) fueron montadas entre la base y la tapa de una copa de aluminio de 35 mm de diámetro (Payne, elcometer SPRL, Hermelle /s Argenteau, Bélgica). En el interior de la copa de permeabilidad se depositó el agua destilada. Para asegurar la hermeticidad del sistema (la correcta unión entre la tapa y la base) se colocó un obturador de caucho y tres soportes de sujeción. Las copas de permeabilidad fueron introducidas en un soporte con un ventilador (CPU Y.S.TECH 12V.) colocado en la parte superior, con el fin de homogenizar la atmósfera y asegurar una resistencia despreciable en la superficie del film. Cada copa de permeabilidad con su respectivo soporte, fue colocada en un desecador de vidrio equilibrado con una disolución saturada de nitrato magnésico 6-hidratado. Finalmente, los desecadores fueron introducidos en una cámara Hotcold UL, Selecta, mantenida a 5°C, realizándose controles de peso de cada copa de permeabilidad con una balanza electrónica (modelo ER-182A, Pozuelo, Madrid) de precisión 0,0001 g a intervalos de 2 horas durante un periodo de tiempo de 24h.

Según el método ASTM E96-92, el procedimiento para evaluar la permeabilidad al vapor de agua, requiere la determinación de la velocidad de transmisión de vapor de agua (ecuación III.6). Para ello, se emplea la 1ª ley de Fick para la difusión en condiciones estacionarias, asumiendo que el vapor de agua atraviesa un material no poroso y homogéneo, en el cual se produce un gradiente lineal.

$$VTVA = \frac{n}{t \cdot A} \quad (\text{III.6})$$

Donde:

- VTVA= velocidad de transferencia de vapor de agua (g/día·m²).
- n/t = pendiente de curva de pérdida de peso en el tramo lineal (g/día).

- A = área efectiva del film a la transferencia de vapor de agua (m²).

Utilizando la diferencia de presiones parciales como fuerza impulsora del proceso de permeación, de acuerdo a la ley de Henry, se determina un parámetro denominado permeanza (ecuación III.7)

$$\text{Permeanza} = \frac{VTVA}{(P_{w1} - P_{w2})} \quad (\text{III.7})$$

Donde:

- P_{w1} = Presión parcial de vapor de agua en la superficie del film hacia el interior de la copa (Pa).

- P_{w2} = Presión parcial de vapor de agua en la superficie del film hacia el exterior de la copa (Pa).

El método ASTM E96-92 establece que la resistencia al transporte de agua, a través de un espacio de aire entre la superficie del agua y el film, es despreciable (P_{w0}=P_{w1}). Sin embargo, para los films hidrofílicos, esto no se cumple y puede inducir a errores en la permeabilidad calculada. Por esta razón Mc Hugh *et al.*, (1993) y Gennadios *et al.*, (1994b) han propuesto diferentes métodos para calcular P_{w1}. Según Mc Hugh *et al.*, (1993) la ecuación III.8 permite calcular la correcta presión parcial de vapor de agua en la superficie del film hacia el interior de la copa (P_{w1}) de los films hidrofílicos.

$$WVTR = \frac{P \cdot D \cdot \ln \left[\frac{(P - P_{w1})}{(P - P_{w0})} \right]}{R \cdot T \cdot \Delta z} \quad (\text{III.8})$$

Donde:

- P = Presión total (Pa).

- D = difusividad del agua a través del aire a 5°C.

- R = constante de los gases (82.057·10⁻³ m³atm/kgmol·K).

- T = Temperatura absoluta (278.15 K).

- Δz = espacio de aire estancado (z_{final} - z_{original})/2.

- P_{w0} = Presión parcial de vapor de agua en la superficie de la disolución sobresaturada (Pa).

- P_{w1} = Presión parcial de vapor de agua en la superficie del film hacia el interior de la copa (Pa).

La ecuación III.9 permite calcular el valor de permeabilidad al vapor de agua real (WVP) para un film, multiplicando la correcta permeanza por la media del espesor,

$$\text{Permeabilidad} = \text{permeanza} \cdot \text{espesor} \quad (\text{III.9})$$

III. 3.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Un film de cada una de las formulaciones del primer estudio se almacenó en P_2O_5 y se cortaron muestras rectangulares de 6mm de largo por 1 mm de ancho y muestras cuadradas de 5x5 mm, con el fin de analizar la distribución de los componentes en su microestructura utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL®, modelo JSM-5410. Las muestras se montaron en un soporte de cobre de tal forma que permita observar el perfil a través de su grosor y la superficie. Éstas se cubrieron de oro y fueron observadas directamente con un voltaje de aceleración de 10 KV.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.1. EFECTO DEL TIPO DE CASEINATO SOBRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS Y DE PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA.

El primer estudio de este trabajo se centra en el diseño y optimización de disoluciones formadoras de recubrimientos a base de caseinato sódico o cálcico, utilizando agua como disolvente y glicerol como material plastificante. En general los caseinatos son bastante solubles en agua, hecho que puede atribuirse a la estructura aleatoria que adoptan y a su capacidad para formar puentes de hidrógeno, electrostáticos e hidrofóbicos intermoleculares, que permiten aumentar la cohesión intercadena (Ho, 1992; Avena-Bustillo & Krochta, 1993; Mc Hugh & Krochta, 1994b; Brault *et al.*, 1997), sin embargo, esta solubilidad puede ser modificada por cambios en el pH o por la formación de entrecruzamientos (Ikura *et al.*, 1980; Motoki *et al.*, 1987; Krochta *et al.*, 1990). En 1992 Ho comparó la permeabilidad al vapor de agua de films plastificados con glicerol (ratio 4:1) preparados con diferentes caseinatos comerciales y concluyó que los valores de permeabilidad al vapor de agua tenían un orden decreciente al trabajar con caseinato potásico, caseinato sódico, caseinato cálcico y caseinato magnésico. Estudios posteriores refuerzas estos resultados indicando que la permeabilidad al vapor de agua de films a base de caseinato cálcico son menores que cuando se emplea caseinato sódico o potásico (Banerjee & Chen, 1995a; Li & Chen, 2000) lo cual se atribuye a las diferencias electrostáticas y al entrecruzamiento que provoca la presencia del calcio. En este punto se pretende comparar el efecto que producen el caseinato sódico y caseinato cálcico (los dos caseinatos más utilizados en la industria de alimentos), sobre las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua, en films emulsionados con ácido oleico y/o cera de abeja. Dado que los films a base de caseína y caseinatos son muy frágiles (Chen, 1995; Tomasula *et al.*, 1998), requieren de la incorporación de un plastificante para relajar la estructura y mejorar su flexibilidad. De los distintos plastificantes usados comúnmente en la elaboración de films o recubrimientos comestibles, uno de los más utilizados es el glicerol (McHugh & Krochta, 1994c; Siew *et al.*, 1999; Cheuk-Hang *et al.*, 2005; Audio & Chaufer, 2005; Sothornvit & Krochta, 2005). En base a ello y a estudios previos con films a base de

caseinato sódico (Martínez-Cubells, 2006; Gómez-Ábalos, 2006), en este trabajo se decidió trabajar con una relación caseinato (sódico o cálcico):glicerol constante de 1:0.3. Dado que los films a base de proteínas son muy permeables al agua (Chen, 2002), a los films también se les incorporó material lipídico tratando en todo momento de buscar films con adecuadas propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua. Se trabajaron con mezclas de ácido oleico:cera de abeja en distintas proporciones (100:0, 70:30, 50:50, 30:70 y 0:100). Para ello, se elaboraron 9 formulaciones distintas. Dos formulaciones control, compuestas por caseinato (sódico o cálcico) y glicerol con una relación 1:0.3 y 7 formulaciones incorporando material lipídico, fijando en todos los casos una relación proteína:glicerol:lípido de 1:0.3:0.5 (tabla III.1).

IV.1.1. Tamaño de partícula

El estudio del tamaño y distribución de las partículas dispersas en las emulsiones formadoras de film es interesante ya que pueden afectar a las propiedades del film. En la tecnología de difracción láser, el diámetro medido corresponde al de una esfera de igual volumen que la partícula. Este valor es el diámetro de una partícula hipotética que representa el total de partículas de la muestra. Sin embargo, en la emulsión existe una distribución de tamaños de lípidos, con partículas más grandes y más pequeñas que el valor medio de la partícula. Para facilitar la interpretación de los resultados estos se dan como el diámetro de la partícula predominante. En cualquier caso, en algunas ocasiones es necesario conocer la distribución del tamaño de la partícula con el fin de poder correlacionarlo con las propiedades del film resultante. En la tabla IV.1 se presentan los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ y en la figura IV.1 se muestran las distribuciones de las distintas formulaciones formadoras de recubrimiento. La media del tamaño de la distribución de partículas en superficie ($D_{3,2}$) representa el tamaño medio basado en la superficie específica por unidad de volumen y permite caracterizar las partículas pequeñas y de forma esférica. La media de tamaño de la distribución de partículas en volumen ($D_{4,3}$) representa el tamaño medio basado en la unidad de peso de las partículas y representa las partículas de mayor tamaño con formas irregulares como son los agregados. Tanto los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ como la distribución del tamaño de partículas (figura IV.1) reflejan el diferente comportamiento de las disoluciones a base de caseinato sódico y caseinato cálcico. Para evaluar la influencia del tipo de lípido (ácido oleico y/o cera de

abeja) sobre el tamaño de la partícula de las emulsiones se ha efectuado un análisis de varianza factorial considerando el factor $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ conjuntamente. Para discernir entre las medias se ha utilizado el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD), con un nivel de confianza del 95%. En la tabla IV.1 se muestran los grupos homogéneos que resultan del análisis.

Tabla IV.1. Valores del tamaño medio de la partícula $D_{4,3}(\mu\text{m})$ y $D_{3,2}(\mu\text{m})$ de los distintas emulsiones formadoras de recubrimiento.

AO:BW ratio	NaCas		CaCas	
	$D_{4,3}(\mu\text{m})$	$D_{3,2}(\mu\text{m})$	$D_{4,3}(\mu\text{m})$	$D_{3,2}(\mu\text{m})$
100:0	0.985 ± 0.048^a	0.749 ± 0.012^a	5.33 ± 0.21^c	0.904 ± 0.012^d
70:30	2.854 ± 0.010^b	1.694 ± 0.013^b	18.3 ± 0.8^e	2.91 ± 0.05^f
50:50	2.617 ± 0.007^b	1.535 ± 0.010^b		
30:70	2.634 ± 0.002^b	1.520 ± 0.003^b		
0:100	2.567 ± 0.002^b	1.506 ± 0.013^b		

a-f: grupos homogéneos

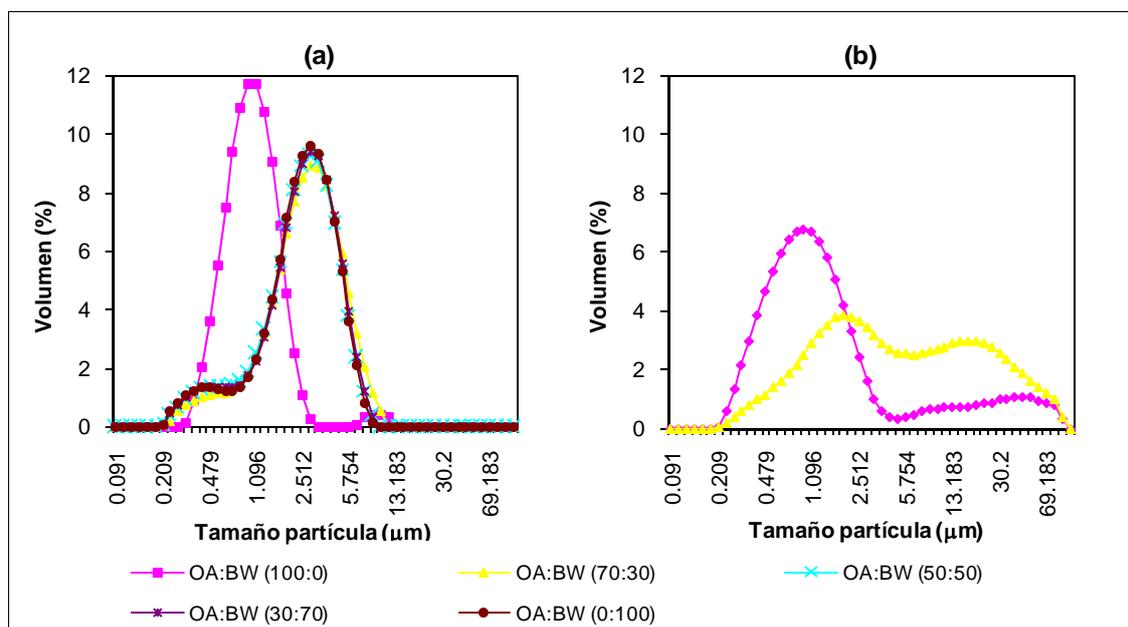


Figura IV.1. Distribución del tamaño de partícula de los films elaborados a base de caseinato sódico (a) y caseinato cálcico (b), manteniendo una relación proteína:glicerol:lípido contante (1:0.3:0.5) y distintas relaciones OA:BW.

Por lo que respecta a las formulaciones a base de caseinato sódico se observa que la incorporación de cera de abeja provoca un aumento significativo ($\alpha < 0.05$) en el tamaño medio de las partículas con respecto a las emulsiones formuladas únicamente con ácido

oleico, aunque no se llega a apreciar diferencias significativas ($\alpha > 0.05$) en el tamaño medio de la partícula independientemente de la relación entre lípidos (AO:BW) utilizada. Las diferencias observadas entre los valores $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ son más significativas en las emulsiones que incorporan cera de abeja que en las que están formadas únicamente por ácido oleico lo que indica que la cera de abeja contribuye a que en la emulsión se formen partículas de mayores tamaños y con formas más irregulares que en el caso del ácido oleico. La similitud de los resultados obtenidos cuando la fase lipídica la compone únicamente el ácido oleico pone de manifiesto la homogeneidad en el tamaño de las gotas, obteniéndose en estos casos partículas de menor tamaño y con formas esféricas. En la figura IV.1 (a) se observa que la distribución en todos los casos es monomodal, aunque la distribución es ligeramente distinta cuando la fase dispersa la compone únicamente el ácido oleico a cuando hay presente en la emulsión cera de abeja. La adición de cera de abeja provoca un desplazamiento de la curva, debido al mayor tamaño de partícula promedio observado, y la aparición de una pequeña población de tamaño de partícula similar al obtenido para las formulaciones que incorporan 100% de ácido oleico. Este comportamiento se observa tanto si se utiliza sólo cera de abeja como combinada con ácido oleico.

En el caso de los films a base de caseinato cálcico, los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ reflejan un aumento evidente en el tamaño de partícula de la emulsión al incorporar la cera de abeja. Las diferencias observadas entre los valores $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ para una misma relación entre lípidos indica que las gotas dispersas tienden a unirse entre sí favoreciéndose la formación de agregados, efecto que puede atribuirse al calcio, el cual posiblemente actúe de puente de unión entre las gotas dispersas, llegando a observarse una distribución bimodal para la formulación 70:30 (figura I.V.1b). Estos resultados se refuerzan en el hecho de que no fue posible obtener emulsiones de caseinato cálcico con una relación AO:BW igual o superior a 50:50, ya que se formaban agregados en las emulsiones, efecto que puede atribuirse a la menor capacidad emulsionante del caseinato cálcico frente al sódico que se hace más significativa a medida que aumenta la cantidad de cera de abeja en la emulsión. Las diferencias observadas entre estos dos caseinatos podrían justificarse por la fracción de caseína predominante y la composición en aminoácidos de cada uno de ellos. Si bien α - y β -caseínas son las dos fracciones predominantes en estos caseinatos, algunos estudios demuestran que la primera se

adsorbe preferentemente sobre el caseinato cálcico mientras que es la β -caseína la que se encuentra en mayor proporción en el caseinato sódico (Srinivasan *et al.*, 1999). Ambos caseinatos se caracterizan por presentar una alta capacidad emulsionante frente a otras proteínas debido al alto contenido en prolina (Chen, 2002; khawladia *et al.*, 2004a), sin embargo el contenido en prolina es ligeramente inferior en la fracción α -caseína (Gennadios *et al.*, 1994a), lo que podría justificar la menor capacidad emulsionante del caseinato cálcico. Por otro lado la carga proteica de las emulsiones de caseinato cálcico es mayor que en las emulsiones de caseinato sódico, debido a la mayor cantidad de residuos cargados y menores residuos hidrofóbicos que presenta la fracción α -caseína frente a la fracción β -caseína, permitiendo que sea más soluble en ausencia de calcio (Dalgleish, 1989). La gran cantidad de grupos fosforilados presentes en la α -caseína con respecto a otras fracciones de caseína, son los responsables de su alta sensibilidad al calcio. Los entrecruzamientos del calcio con la proteína cubierta de gotas de aceite provocarían una agregación de gotas en la emulsión (Dickinson *et al.*, 1992; Agboola & Dalgleish, 1995; Ye & Singh, 2001). Esto explica el distinto comportamiento observado en el tamaño de partícula. Mientras el caseinato sódico presenta un comportamiento preferentemente modomodal, no ocurre lo mismo con el caseinato cálcico que presenta una distribución bimodal, con un mayor tamaño de partícula medio. Estos resultados corroboran el comportamiento observado en ambos caseinatos por otros autores quienes atribuyen las diferencias a la formación de un mayor número de agregados en el caso de caseinato cálcico, principalmente cuanto mayor es la concentración de proteína en la emulsión (Srinivasan *et al.* 1999).

IV.1.2 Propiedades Mecánicas

El módulo de elasticidad (EM), la tensión de fractura (TS) y la deformación hasta el punto de fractura (E) son parámetros útiles para describir las propiedades mecánicas de los films y se relacionan estrechamente con su estructura química (Ninnemann, 1968; Mc Hugh & Krochta, 1994a). El módulo de elasticidad se obtiene del cociente entre el esfuerzo de tensión y la deformación producida en el film, y por lo tanto es una medida de la tensión que hay que aplicar al film para lograr deformarlo e informa indirectamente de la rigidez o dureza del film. La tensión de fractura es la máxima

tensión que puede aplicarse sobre el film antes de provocar su rotura, relativo a la superficie inicial del film. La deformación hasta el punto de fractura es la máxima deformación que el material puede soportar antes de la rotura, y por tanto es una medida de la capacidad para alargarse o estirarse del film.

En la figura IV.2 se presentan los valores del módulo de elasticidad, tensión de fractura y deformación hasta el punto de fractura de los films control (films elaborados con caseinato sódico o caseinato cálcico en agua al 8% (p/p) y glicerol fijando una relación proteína:plastificante de 1:0.3), y de los films elaborados incorporando a la formulación control material lipídico en una relación proteína:lípido 1:0.5 (tabla III.1). Como se ha comentado en el punto IV.1, no fue posible obtener films de caseinato cálcico con una relación AO:BW igual o superior a 50:50, ya que se formaban agregados en la emulsión formadora de recubrimiento. Se observa que los films elaborados a base de caseinato cálcico presentan mayores valores de módulo de elasticidad y tensión de fractura y menores valores de deformación hasta el punto de fractura que los films elaborados a base de caseinato sódico, lo que se traduce en que los films que incorporan caseinato cálcico son films menos elásticos y deformables, efecto que podría asociarse a las diferencias electrostáticas y los posibles entrecruzamientos generados por el ión calcio en la matriz del film. Los iones divalentes podrían promover el entrecruzamiento limitando la movilidad del polímero y los espacios intermoleculares (Avena-Bustillo & Krochta, 1993; Li & Chen, 2000).

La incorporación de ácido oleico y/o cera de abeja, tanto trabajando con caseinato sódico como con caseinato cálcico, provoca un descenso en el módulo de elasticidad y tensión de fractura, y un aumento en la deformación hasta el punto de fractura lo que da lugar a films más flexibles y deformables, efecto que puede ser atribuido a la mayor heterogeneidad generada por el material lipídico en la matriz del film, que contribuye a su debilitamiento. Este efecto ha sido observado por otros autores trabajando en similares condiciones con caseinato sódico y ácido oleico-cera de abeja (Martínez-Cubells, 2006) y caseinato sódico, alginato y/o λ -carragenato y ácido oleico-cera de abeja (Gómez-Ábalos, 2006).

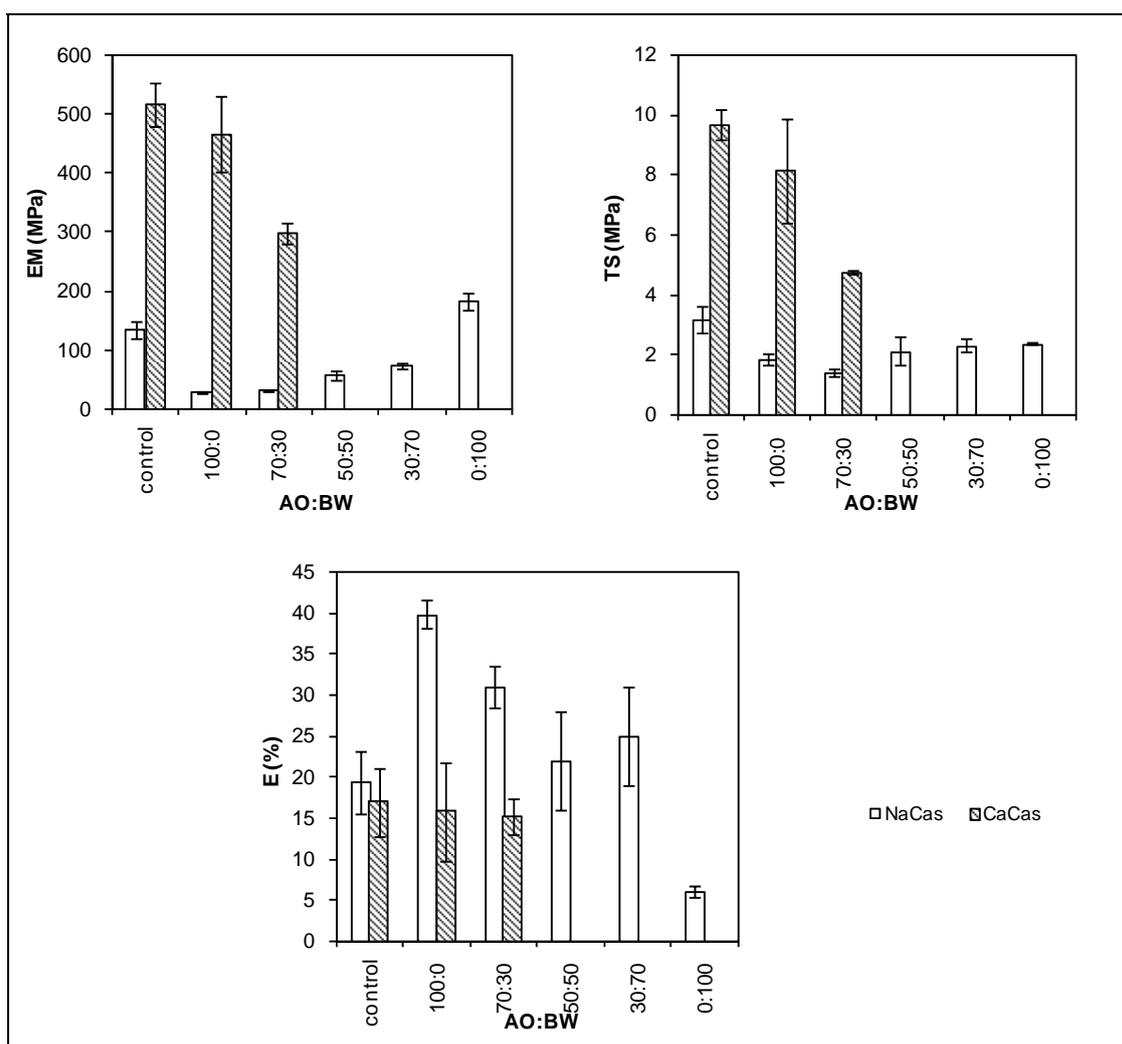


Figura IV.2. Valores de los parámetros mecánicos (EM, TS y E) de los films control y films elaborados con caseinato (sódico o cálcico):glicerol:lípido (relación 1:0.3:0.5) y distintas relaciones ácido oleico-cera de abeja.

Para evaluar el efecto que tiene en las propiedades mecánicas el tipo de caseinato utilizado (sódico o cálcico) y la proporción de ácido oleico:cera de abeja presente en el film, se ha efectuado un análisis de varianza factorial a cada uno de los parámetros mecánicos con los factores tipo de caseinato y proporción ácido oleico:cera de abeja. Para discernir entre las medias se ha utilizado el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD), con un nivel de confianza del 95%. La figura IV.3 muestra el gráfico de interacciones y la tabla IV.2 muestra los valores y los grupos homogéneos para los parámetros mecánicos analizados. Para el factor tipo de caseinato se observan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) para los tres parámetros analizados. En

todos los casos, los films de caseinato cálcico presentan valores de módulo de elasticidad y tensión de fractura mayores y valores de deformación hasta el punto de fractura menores respecto a los formulados con caseinato sódico. Estos resultados sugieren que los films formulados con caseinato cálcico son menos elásticos y extensibles, lo que puede atribuirse a que el calcio favorece la formación entrecruzamientos, aumentando la rigidez y limitando la deformación del film.

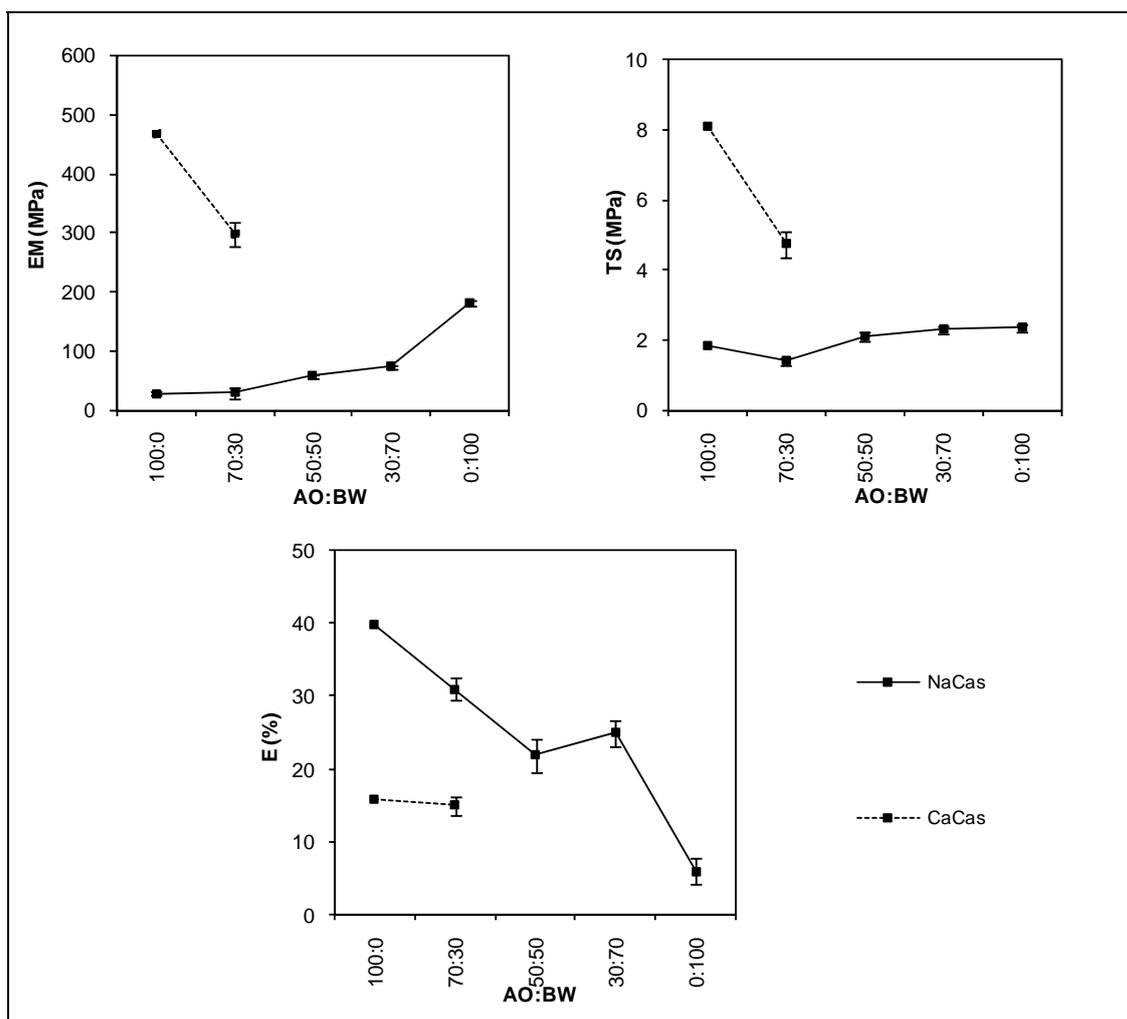


Figura IV.3. Gráfico de interacciones (con intervalos LSD al 95%) entre el factor relación tipo de caseinato (sódico o cálcico) y proporción ácido oleico:cera de abeja para los diferentes parámetros mecánicos analizados.

Tabla IV.2. Valores de los parámetros mecánicos EM, TS y E de los films elaborados con caseinato (sódico o cálcico):glicerol:lípido (relación 1:0.3:0.5).

Tipo de caseinato	AO:BW	EM (MPa)	TS (MPa)	E(%)
NaCas	100:0	27.3 ± 3.0 ^a	1.8 ± 0.2 ^a	39.8 ± 1.7 ^a
	70:30	29.7 ± 2.3 ^a	1.4 ± 0.1 ^c	31.0 ± 2.6 ^b
	50:50	56.8 ± 8.9 ^b	2.1 ± 0.5 ^{ab}	21.9 ± 6.1 ^c
	30:70	72.6 ± 4.3 ^c	2.3 ± 0.2 ^b	24.9 ± 6.0 ^b
	0:100	181.3 ± 13.1 ^d	2.36 ± 0.04 ^b	6.0 ± 0.7 ^d
CaCas	100:0	465.9 ± 64.4 ^e	8.1 ± 1.7 ^c	15.8 ± 6.0 ^e
	70:30	297.4 ± 17.8 ^f	4.7 ± 0.1 ^d	15.0 ± 2.2 ^e
	50:50			
	30:70			
	0:100			

a-f: grupos homogéneos

Para el factor proporción ácido oleico:cera de abeja, el comportamiento depende del tipo de caseinato utilizado en la formulación. Mientras que para los films formulados con caseinato sódico se encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) en los tres parámetros analizados, en los films que incorporan caseinato cálcico no se encontraron diferencias significativas ($\alpha > 0.05$) en el parámetro deformación hasta el punto de fractura pero si se encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) en los parámetros módulo de elasticidad y tensión de fractura. En este sentido, en ambos casos se observa que la presencia de material lipídico provoca un descenso en los parámetros de carga (EM y TS) lo que se traduce en films más flexibles y elásticos. No obstante, se observan ligeras diferencias en el comportamiento de estos parámetros en función del tipo de caseinato. En el caso de los films formulados con caseinato sódico, se observa un incremento progresivo en el módulo de elasticidad y tensión de fractura a medida que aumenta la cantidad de cera de abeja en el film. En el caso de los films formulados con caseinato cálcico la influencia de la adición de ácido oleico es menor, aunque las fluctuaciones en el comportamiento siguen la misma tendencia que para el caseinato sódico. La reducción en el módulo de elasticidad y tensión de fractura no son significativas cuando el film se formula con 100% de ácido oleico pero se acentúa para relaciones ácido oleico:cera de abeja 70:30. Respecto a la deformación hasta el punto de fractura, el comportamiento depende del caseinato utilizado en la formulación. Mientras

que para los films formulados con caseinato sódico, se observa un descenso progresivo de este parámetro ($\alpha < 0.05$) a medida que la cantidad de cera de abeja aumenta, no se observan cambios significativos ($\alpha > 0.05$) para los films que incorporan caseinato cálcico. Estos resultados indican que en el caso de los films elaborados con caseinato cálcico, es posible obtener films más flexibles combinado ácido oleico y cera de abeja que si toda la fracción lipídica está formada por ácido oleico, situación que puede atribuirse a que la combinación de ambos componentes puede generar mayor discontinuidad en la matriz que el oleico por separado. En cambio, para los films formulados con caseinato sódico, se obtienen films más flexibles y elásticos con la adición de ácido oleico (tanto sólo como combinado con cera de abeja) que si toda la fracción lipídica está compuesta únicamente por cera de abeja. Por otra parte, se observa que cuanto más rica en ácido oleico es la fracción lipídica presente en el film más deformable es el mismo. Situación que puede atribuirse al estado físico en que se encuentran los distintos lípidos durante el ensayo de tensión, líquido el ácido oleico y sólida la cera de abeja, efecto que es mucho más notorio para los films formulados con caseinato sódico. En resumen parece ser que la incorporación de caseinato cálcico proporciona films menos elásticos y extensibles existiendo unas diferencias que, si bien se ven reducidas a medida que se añade material lipídico y se aumenta la proporción de cera de abeja, en todos los casos son más rígidos que los films obtenidos a base de caseinato sódico. Del mismo modo, los films de caseinato sódico soportan, en general, una mayor deformación hasta el punto de fractura que los films a base de caseinato cálcico.

IV.1.3 Permeabilidad al vapor de agua

La tabla IV.3 muestra los valores de permeabilidad al vapor de agua de los films estudiados. La figura IV.4 muestra el gráfico de interacciones obtenido de un análisis de varianza factorial con los factores tipo de caseinato (sódico o cálcico) y proporción ácido oleico:cera de abeja. En ambos casos se encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$). En relación al tipo de caseinato se observa que la permeabilidad al vapor de agua disminuye para los films formulados con caseinato cálcico, efecto que puede atribuirse al entrecruzamiento favorecido por la presencia de iones calcio, lo que puede

favorecer las interacciones entre moléculas que limitan la movilidad del polímero y disminuyen el espacio intermolecular. Krochta et al., 1990 observaron una reducción de la solubilidad y de la permeabilidad al vapor de agua de films a base de caseinato cálcico y a base de caseinato sódico inmersos en disoluciones con sales cálcicas. En este estudio se concluye que el tratamiento de los films de caseinato sódico con iones calcio parece reducir más la permeabilidad al vapor de agua que la formación de recubrimientos con caseinato cálcico. No obstante, cabe señalar el cambio de espesor que experimentan los films inmersos en disoluciones cálcicas comparados con los formulados directamente con caseinato sódico o cálcico. En este sentido, estos datos no son comparables dado que una reducción en el espesor provoca cambios significativos en las propiedades del film. Los resultados mostrados en la figura IV.4 ponen de manifiesto que la eficacia del efecto barrera al agua depende de la hidrofobicidad del recubrimiento y el tipo de lípido utilizado (Kester & Fennema, 1989a; Donhowe, 1992; Hagenmaier & Shaw, 1992; Koelsch & Labuza, 1992; Shellhammer y Krochta, 1997a) ya que tanto para el factor presencia/ausencia de lípido como relación AO:BW se encuentran diferencias significativas ($\alpha < 0.05$). Así pues, se observa que la permeabilidad al vapor de agua disminuye con la presencia de material lipídico (ácido oleico, cera de abeja o mezcla de ambos). En relación a la proporción de ácido oleico:cera de abeja, en ambos casos (con CaCas y con NaCas) se observa que el valor de permeabilidad al vapor de agua disminuye a medida que aumenta la cantidad de cera de abeja respecto al ácido oleico, efecto que puede atribuirse a que la cera de abeja se encuentra en estado sólido siendo más efectiva como barrera a la humedad, que el ácido oleico que se encuentra en estado líquido (Kamper & Fennema, 1984a; Martín-Polo *et al.*, 1992b; Shellhammer & Krochta, 1997a). Cabe resaltar el incremento en la permeabilidad al vapor de agua observado para los films formulados con alta cantidad de cera de abeja en relación al ácido oleico y a base de caseinato sódico. Este efecto ha sido observado por otros autores en films elaborados con caseinato sódico, λ -carragenato y ácido oleico-cera de abeja (Gómez-Ábalos, 2006) y en films a base de caseinato sódico y grasa láctea anhidra (Khwaldia *et al.*, 2004a), atribuyéndose a la distribución heterogénea de los glóbulos de grasa dentro de la matriz proteica que afecta a la cohesión de la matriz proteica y la estabilidad de la emulsión, provocando un

aumento de la permeabilidad al vapor de agua (Debeaufort & Voilley, 1995), y por otro lado a que la agregación de glóbulos de grasa disminuye la tortuosidad del film aumentando la transferencia de agua a través del film (Khwaldia *et al.*, 2004a).

Tabla IV.3. Valores de permeabilidad al vapor de agua de los films estudiados.

NaCas:CaCas	AO:BW	WVP (g-mm/kPa-h-m ²)	
		promedio	Desviación
1:0	control	6.2	0.9
	100:0	4.4	0.3
	70:30	2.9	0.4
	50:50	2.7	0.1
	30:70	4.3	0.2
	0:100	3.7	0.5
0:1	control	3.9	0.5
	100:0	3.1	0.5
	70:30	1.51	0.03

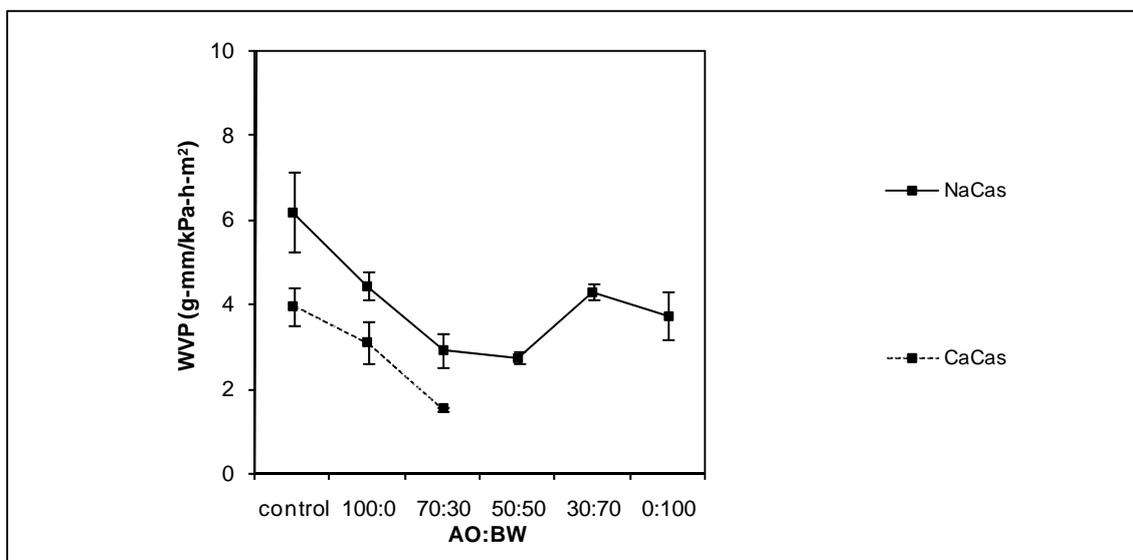


Figura IV.4. Valores de permeabilidad al vapor de agua de los films control y films elaborados con caseinato (sódico o cálcico):glicerol:lípido (relación 1:0.3:0.5) y distintas relaciones ácido oleico-cera de abeja.

IV.1.4. Microestructura electrónica de barrido (SEM).

Las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua de los films a base de caseinato sódico y cálcico muestran un comportamiento claramente dependiente del tipo de caseinato empleado en la disolución formadora de recubrimiento. Con el estudio

de la microestructura de los films se pretende esclarecer los mecanismos involucrados en los fenómenos de transporte molecular que pueden afectar a las propiedades barrera así como proporcionar información sobre la estructura interna que evidencien sus propiedades mecánicas. En este sentido, la estructura interna de los films a base de caseinato sódico y cálcico se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido. Las figuras IV.5 y IV.6 muestran las micrografías transversales de los films a base de caseinato sódico y cálcico, respectivamente. Se muestran las micrografías del film control y los films elaborados con distintas proporciones ácido oleico:cera de abeja.

Se observa que la estructura es más compacta y uniforme en los films control que en los films que incluyen material lipídico los cuales muestran una estructura más abierta, probablemente debido a que el material lipídico (ácido oleico y/o cera de abeja) interrumpe la matriz proteica. Respecto a los films que incorporan material lipídico, se observa que, independientemente de tipo de caseinato empleado en la formulación, la presencia de lípido provoca un aumento de la heterogeneidad de la matriz, pero con ligeras diferencias según el tipo de lípido predominante en la formulación. La presencia de cera de abeja proporciona una estructura con una superficie más heterogénea, con formación de estructuras en relieve y con aspecto esponjoso. Aunque los films formulados con 100% de ácido oleico son los que presentan una estructura más compacta respecto a los que incorporan cera de abeja, la mayor polaridad del oleico respecto a la cera conlleva que estos films presenten una mayor permeabilidad con respecto a los que incorporan cera de abeja. Al comparar los films elaborados con la misma relación ácido oleico:cera de abeja es posible identificar una estructura más compacta cuando el film está formulado a base de caseinato cálcico, lo que se traduce en films menos permeables y, a su vez, menos elásticos. En base a estas micrografías, la microestructura de los films depende de su composición poniendo de manifiesto la formación de matrices con distinto grado de porosidad y tamaño de elementos estructurales que permiten explicar el comportamiento observado en las propiedades mecánicas y de barrera al vapor al agua. En este sentido, no es de extrañar que los valores de permeabilidad al vapor de agua de los films a base de caseinato cálcico y con 100% de ácido oleico presenten una permeabilidad equiparable a los films elaborados con caseinato sódico y con una relación ácido oleico:cera de abeja 70:30 tanto por la mayor uniformidad de la estructura de los primeros como por la presencia de grandes

huecos en la matriz de los segundos. En base a estas observaciones parece ser que las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua son muy dependientes de la estructura que adoptan los componentes del film así como de la polaridad de los mismos. En este sentido, los films que muestran menores valores de permeabilidad al vapor de agua son aquéllos que han sido formulados con caseinato cálcico y una relación ácido oleico:cera de abeja 70:30 correspondiéndose con la matriz más compacta de todos los films formulados.

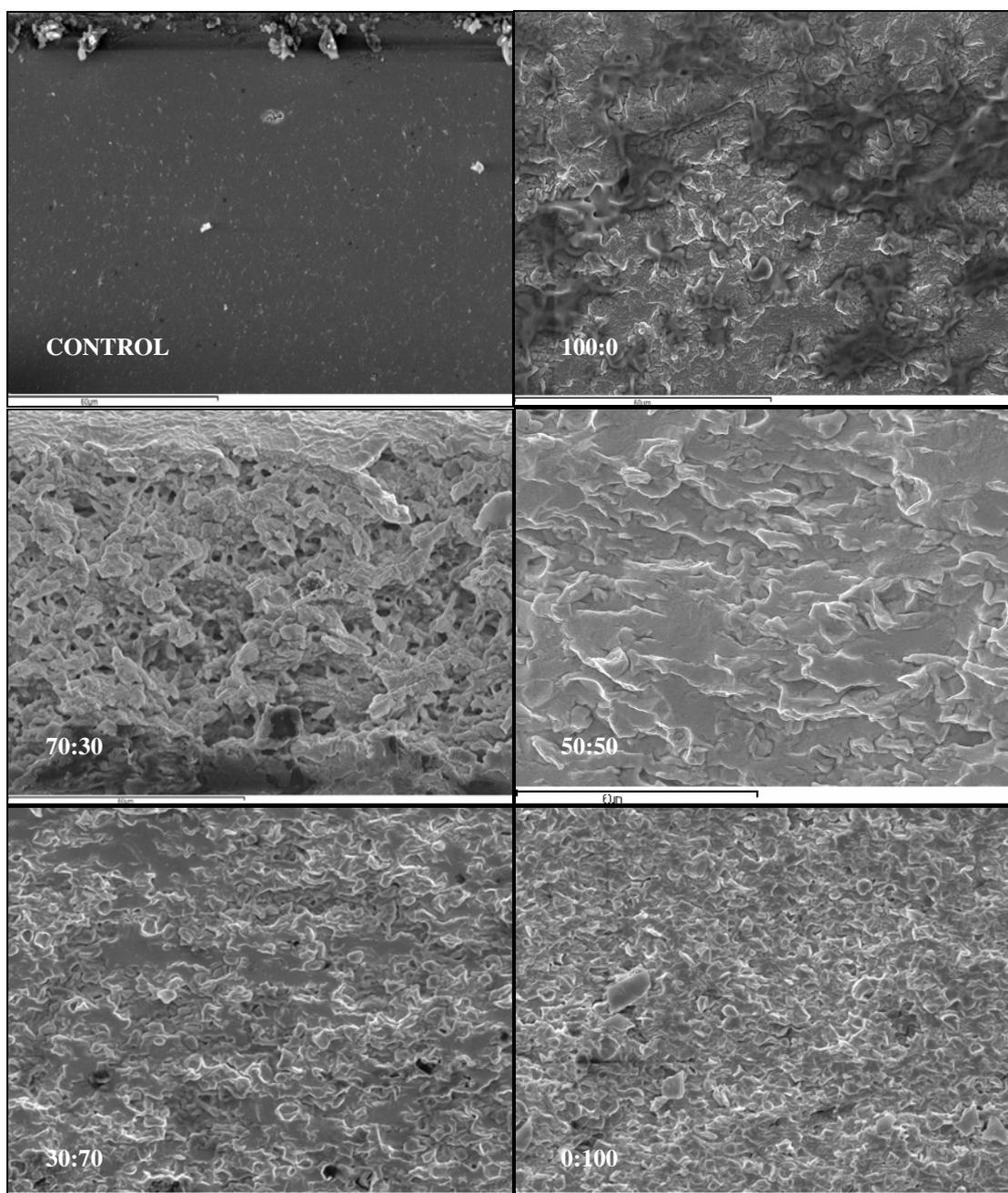


Figura IV.5. Micrografías de la sección transversal de los films a base de caseinato sódico (x1000).

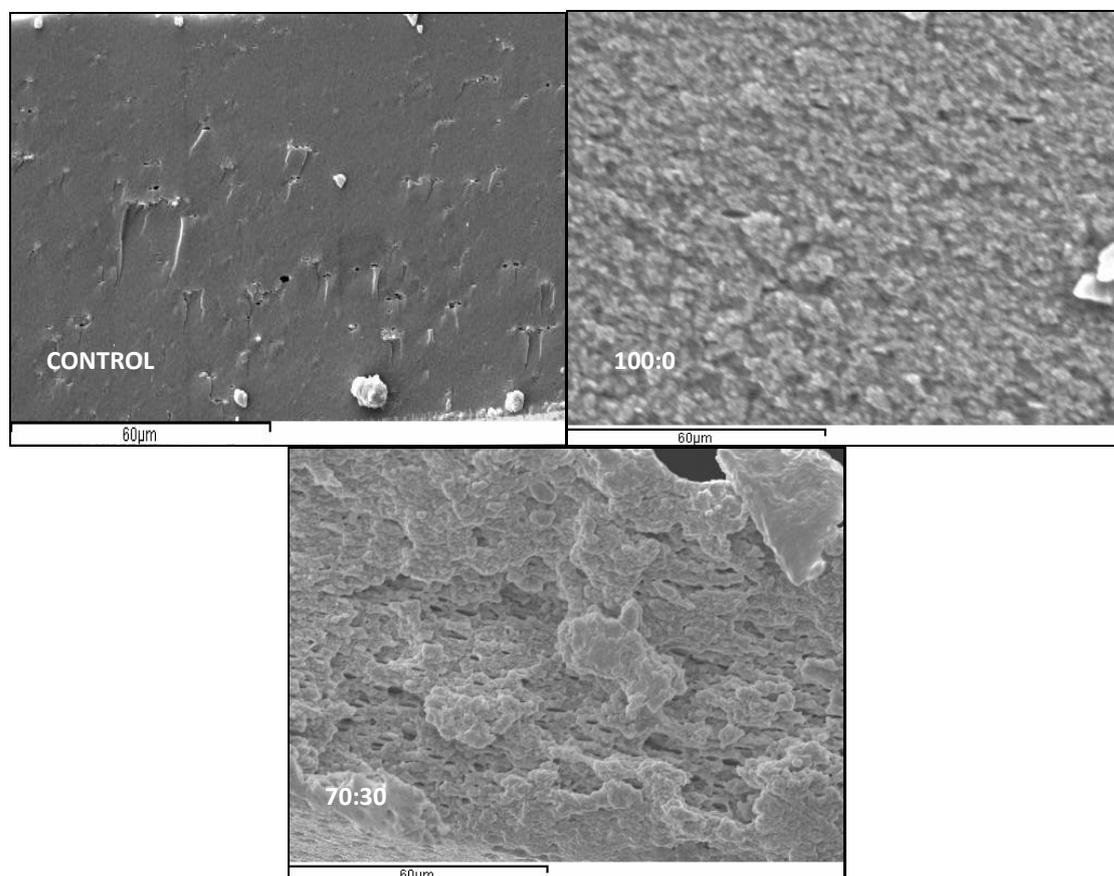


Figura IV.6. Micrografías de la sección transversal de los films a base de caseinato cálcico (x1000).

IV.2. ESTUDIO DE MEZCLAS DE CASEINATO SÓDICO Y CÁLCICO SOBRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS Y DE PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA.

El primer estudio del presente trabajo muestra que el caseinato cálcico da lugar a films con mejores propiedades barrera al agua que el caseinato sódico aunque con peores propiedades mecánicas. La adición de material lipídico al film mejora su flexibilidad, de forma que si se combina ácido oleico con cera de abeja se obtienen films más flexibles, tanto si son formulados con caseinato sódico como con caseinato cálcico. No obstante, la peor capacidad emulsionante del caseinato cálcico respecto al sódico impide obtener films con relaciones ácido oleico:cera de abeja iguales o superiores a 50:50. En relación a la permeabilidad al vapor de agua se deduce que ésta mejora considerablemente para los films elaborados a base de caseinato cálcico y material lipídico, obteniendo los menores valores de permeabilidad al vapor de agua para relaciones ácido oleico:cera de abeja de 70:30. La microestructura de los films pone de manifiesto la formación de matrices con distinto grado de uniformidad y tamaño de elementos estructurales que permiten explicar el comportamiento observado en las propiedades mecánicas y de barrera al vapor al agua.

El segundo estudio del presente trabajo se centra en el diseño y en la optimización de disoluciones formadoras de recubrimientos a base de mezclas de caseinatos (sódico y cálcico) y material lipídico (cera de abeja y/o ácido oleico), utilizando agua como disolvente y glicerol como material plastificante. Se ha estudiado el efecto del tipo y cantidad de caseinato en las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua. Dado que parece ser que el caseinato cálcico contribuye a mejorar las propiedades barrera al vapor de agua del film pero da lugar a films menos elásticos y extensibles que utilizando caseinato sódico en el segundo estudio se elaboraron mezclas combinando ambos caseinatos con el fin de aprovechar la ventaja que aporta cada uno de ellos por separado. Para ello, se elaboraron films manteniendo fija la relación de proteína:glicerol (1:0.3) con y sin material lipídico (ácido oleico y/o cera de abeja) en distintas proporciones (100:0, 70:30, 50:50, 30:70 y 0:100). Como material proteico se utilizaron mezclas de caseinato sódico:caseinato cálcico a distintas proporciones 3:1, 2:1, 1:1 y 1:3 (tabla III.2).

IV.2.1. Tamaño de partícula

La tabla IV.4 muestra los valores $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las disoluciones formadoras de recubrimientos elaborados con distintas relaciones entre caseinatos (3:1, 2:1, 1:1 y 1:3 caseinato sódico:caseinato cálcico). Como se ha comentado en el punto IV.1.1, la media del tamaño de la distribución de partículas en superficie ($D_{3,2}$) permite caracterizar las partículas pequeñas y esféricas mientras que la media de tamaño de la distribución de partículas en volumen ($D_{4,3}$) representa las partículas de mayor tamaño con formas irregulares. Los datos muestran que para una misma cantidad y relación de material lipídico se produce un incremento progresivo tanto en los valores $D_{3,2}$ como $D_{4,3}$ a medida que aumenta la cantidad de caseinato cálcico presente en el film. Además, las diferencias observadas entre los valores $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$, son más significativas tanto al aumentar la cantidad de caseinato cálcico como al aumentar la cantidad de cera de abeja en la disolución formadora de recubrimiento. Estos resultados confirman la posible formación de agregados a medida que aumenta la cantidad de caseinato cálcico influyendo considerablemente en sus propiedades emulsionantes, existen notables diferencias entre la capacidad emulsionante de ambos caseinatos. Este comportamiento también explicaría el que no sea posible obtener films con relaciones ácido oleico:cera de abeja superiores a 50:50 debido principalmente a la menor capacidad emulsionante del caseinato cálcico.

Tabla IV.4. Valores del tamaño medio de la partícula $D_{4,3}(\mu\text{m})$ y $D_{3,2}(\mu\text{m})$ de los distintas emulsiones formadoras de recubrimiento

NaCas:CaCas ratio	tamaño partícula	OA:BW ratio		
		100:0	70:30	50:50
3:1	$D_{4,3}(\mu\text{m})$	1.195 ± 0.501	6.894 ± 0.518	6.758 ± 0.822
	$D_{3,2}(\mu\text{m})$	1.171 ± 0.002	1.849 ± 0.048	1.509 ± 0.040
2:1	$D_{4,3}(\mu\text{m})$	2.137 ± 0.006	9.169 ± 0.089	9.133 ± 0.908
	$D_{3,2}(\mu\text{m})$	1.656 ± 0.003	2.008 ± 0.004	1.494 ± 0.018
1:1	$D_{4,3}(\mu\text{m})$	2.301 ± 0.103	9.160 ± 0.580	
	$D_{3,2}(\mu\text{m})$	1.6295 ± 0.0005	1.901 ± 0.012	
1:3	$D_{4,3}(\mu\text{m})$	8.307 ± 0.204	9.152 ± 0.604	
	$D_{3,2}(\mu\text{m})$	3.012 ± 2.65	2.648 ± 0.143	

La figura IV.7 muestra la distribución de tamaño de partícula de las emulsiones formadoras de recubrimiento. Se observa que existe un comportamiento monomodal

cuando el caseinato sódico junto con el ácido oleico son los componentes mayoritarios de la disolución. En este sentido, para relaciones caseinato sódico:caseinato cálcico 3:1, 2:1 y 1:1 y relaciones ácido oleico:cera de abeja 100:0 y 70:30, las disoluciones presentan un comportamiento preferentemente monomodal. En cambio, en las disoluciones formadoras de recubrimiento cuya fracción proteica está compuesta principalmente por caseinato cálcico (1:3) se observa una distribución claramente bimodal, independientemente de la relación OA:BW. Estos resultados confirman las observaciones realizadas a lo largo del primer estudio, mientras el caseinato sódico presenta un comportamiento preferentemente monomodal, en el caseinato cálcico la alta sensibilidad de las caseínas al calcio hace que en la emulsión se formen agregados de caseína de varios tamaños mostrando una distribución bimodal y con tamaño de partícula mayor. En este sentido, el aumento de caseinato cálcico en la disolución formadora de recubrimiento se refleja en un aumento del tamaño de partícula. Es de destacar que para una misma relación entre caseinatos, la presencia de cera de abeja presenta un comportamiento similar, incrementando el tamaño de partícula respecto a las formulaciones que incorporan 100% de ácido oleico pero sin observarse cambios significativos para las distintas relaciones OA:BW (70:30, 50:50). Este comportamiento fue observado previamente para las disoluciones a base de caseinato sódico (véase apartado IV.1).

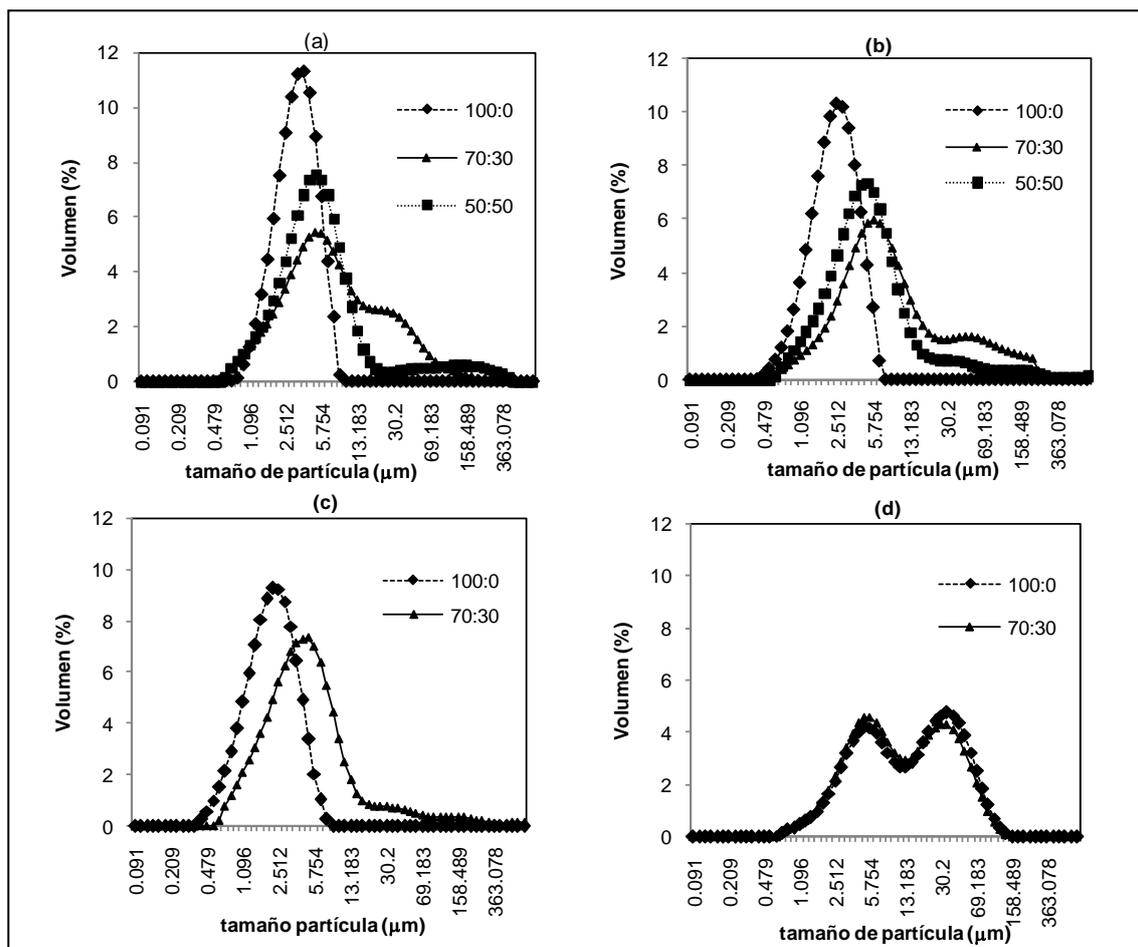


Figura IV.7. Distribución del tamaño de partícula de los films elaborados con mezclas de caseinato sódico y cálcico (a) 3:1 (b) 2:1 (c) 1:1 (d) 1:3 y distintas relaciones OA:BW (100:0; 70:30; 50:50).

IV.2.2 Propiedades Mecánicas

La figura IV.8 muestra los parámetros mecánicos (EM, TS y E) de las formulaciones control (sin material lipídico) con distintas relaciones entre caseinatos (1:0, 3:1, 2:1, 1:1, 1:3, 0:1 NaCas:CaCas ratio). En base a los resultados obtenidos para los films elaborados únicamente con caseinato sódico o cálcico (apartado IV.1), cabría esperar que el aumento de caseinato cálcico en los films elaborados con mezclas de ambos caseinatos (3:1, 2:1, 1:1, 1:3) se reflejara en un aumento de EM y TS. En este sentido, el film con mayor proporción de CaCas (1:3, NaCas:CaCas ratio) debería presentar una rigidez próxima a la obtenida para el film a base de caseinato cálcico. No obstante, para los films control no se observan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) al aumentar el contenido en caseinato cálcico en ninguno de los tres parámetros

estudiados. Las figuras IV.9, IV.10 y IV.11 representan los valores del módulo de elasticidad, tensión de fractura y deformación hasta el punto de fractura de los films elaborados fijando la relación proteína:glicerol:lípido en 1:0.3:0.5 y utilizando agua como disolvente. Como proteína se utilizó caseinato sódico y cálcico en distintas proporciones (3:1, 2:1, 1:1 y 1:3) y como material lipídico se empleó el ácido oleico y cera de abeja en distintas proporciones (100:0; 70:30; 50:50; 30:70; 0:100). Estas figuras muestran también los valores de los parámetros mecánicos (EM, TS y E) de los films control (sin material lipídico). Estas figuras permiten analizar el efecto que produce el material lipídico sobre la matriz del film, para cualquier relación entre caseinatos (NaCas:CaCas). Se observa que la presencia de material lipídico (ácido oleico, cera de abeja o mezcla de ambos) provoca un descenso en el módulo de elasticidad y tensión de fractura con respecto al film control. En cambio, la deformación hasta el punto de fractura experimenta un incremento en los valores de este parámetro mecánico, dependiendo este comportamiento del tipo de lipídico predominante en la formulación. En este sentido, el film con mayor contenido en ácido oleico (100:0), es el que mayor valor de deformación hasta el punto de fractura presenta, y ésta disminuye a medida que aumenta la cantidad de cera de abeja presente en el film. Estos resultados indican que la incorporación de material lipídico da lugar a films con mayor flexibilidad, elasticidad y extensibilidad que si únicamente se elaboran con proteína (caseinato sódico, cálcico o mezcla de ambos), agua y glicerol (muestras control), a excepción de los films elaborados con una relación caseinato sódico:caseinato cálcico 1:3 donde parece ser que prevalece las interacciones entre el caseinato cálcico y el material lipídico, lo que conlleva a la obtención de films menos elásticos y extensibles, principalmente con presencia de cera de abeja. En cualquier caso, este aumento en la flexibilidad y movilidad del film observado principalmente en presencia de altas cantidades de ácido oleico puede atribuirse a la discontinuidad que el ácido oleico y la cera de abeja generan en la matriz proteica del film. Éstos interrumpen la matriz debilitando la estructura del film y provocando que éste sea más fácilmente deformable que si carece de lipídico en su composición. Por contra, la cera de abeja parece que da lugar a films más flexibles pero limita la capacidad de extensión de los mismos, llegando a obtenerse films menos extensibles a medida que aumenta la cantidad de cera de abeja en relación al ácido oleico.

Para el factor de relación ácido oleico:cera de abeja, se encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) en los tres parámetros analizados, módulo de elasticidad, tensión de fractura y deformación hasta el punto de fractura, independientemente del tipo de proteína predominante en la formulación. Se observa un incremento progresivo en los valores del módulo de elasticidad y tensión de fractura, y un ligero descenso en los valores de deformación hasta el punto de fractura, a medida que aumenta la cantidad de cera de abeja presente en el film llegando a obtenerse los valores más bajos cuando se formula el film únicamente con cera de abeja como material lipídico. Situación que puede atribuirse al estado físico en que se encuentran los distintos lípidos durante el ensayo de tensión, líquido el ácido oleico y sólida la cera de abeja.

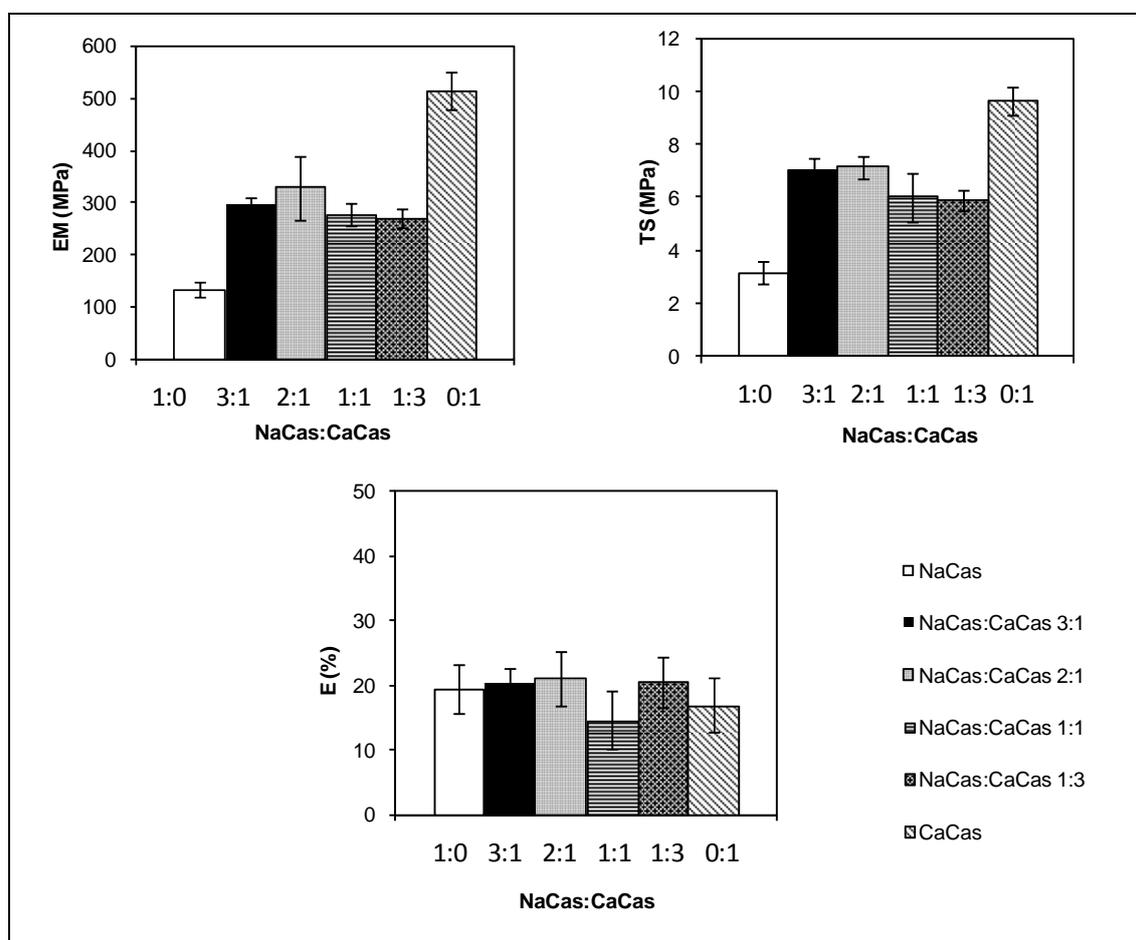


Figura IV.8. Valores de los parámetros mecánicos (EM, TS y E) de los films control (sin material lipídico) elaborados con distintas relaciones NaCas:CaCas.

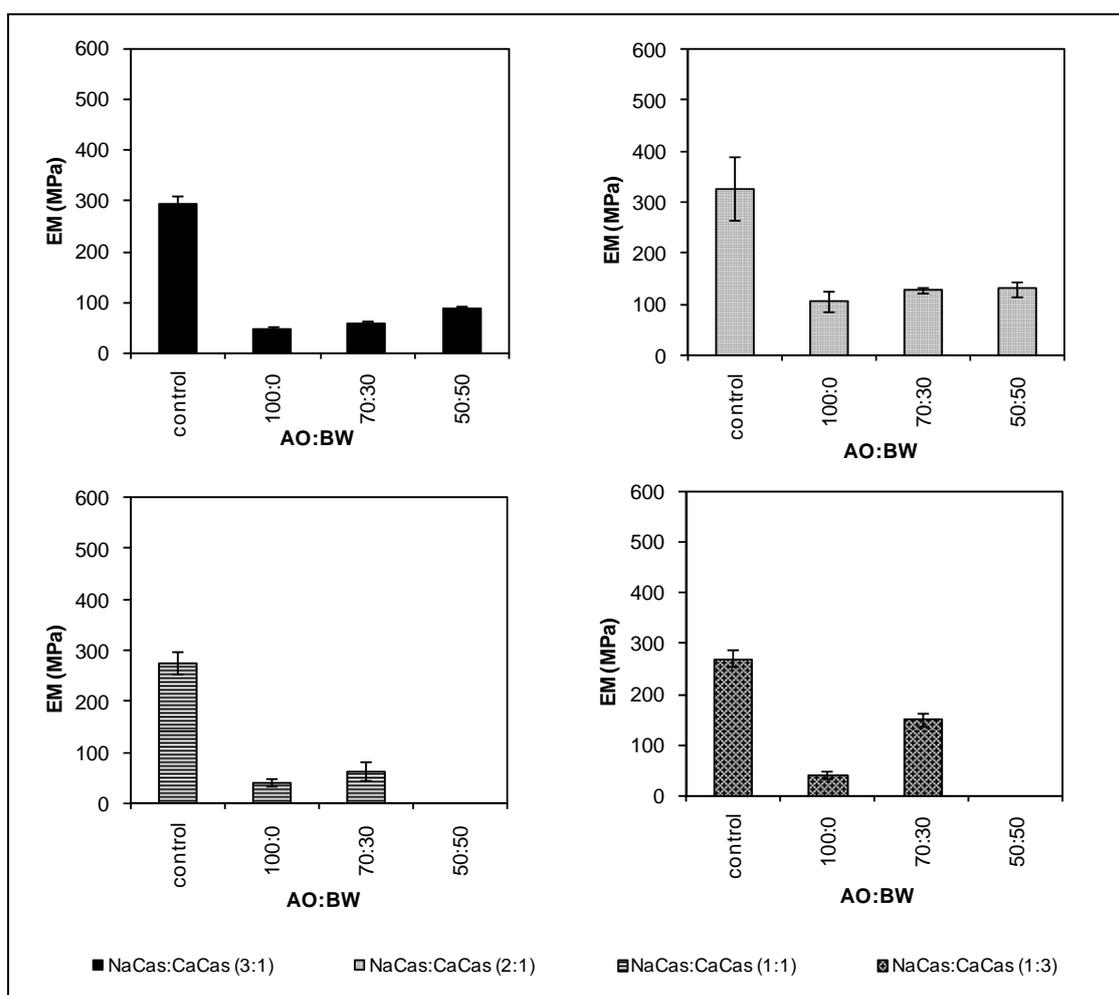


Figura IV.9. Valores del módulo de elasticidad (EM) de los films control y films elaborados con distintas relaciones NaCas:CaCas.

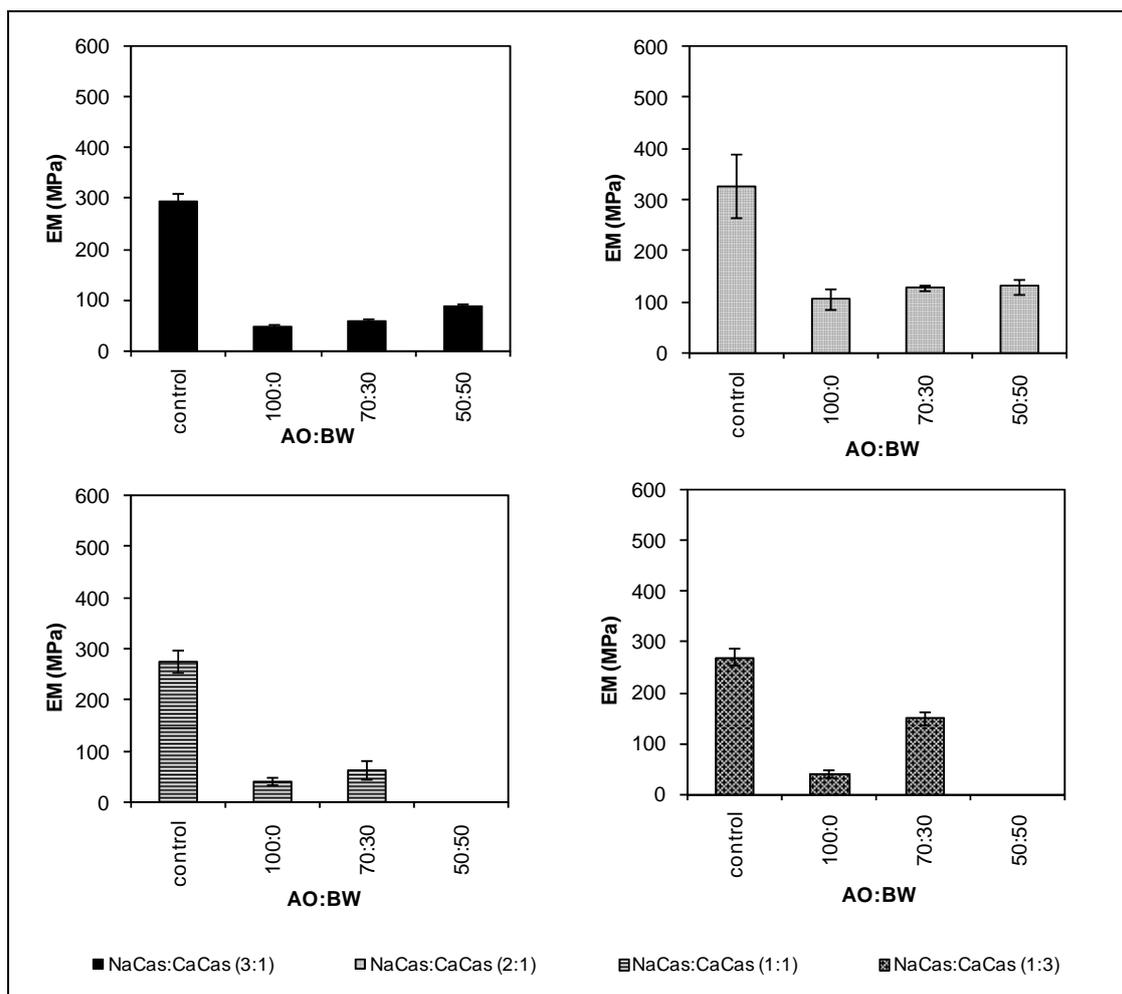


Figura IV.10. Valores de tensión de fractura (TS) de los films control y films elaborados con distintas relaciones NaCas:CaCas y distintos ratios ácido oleico:cera de abeja.

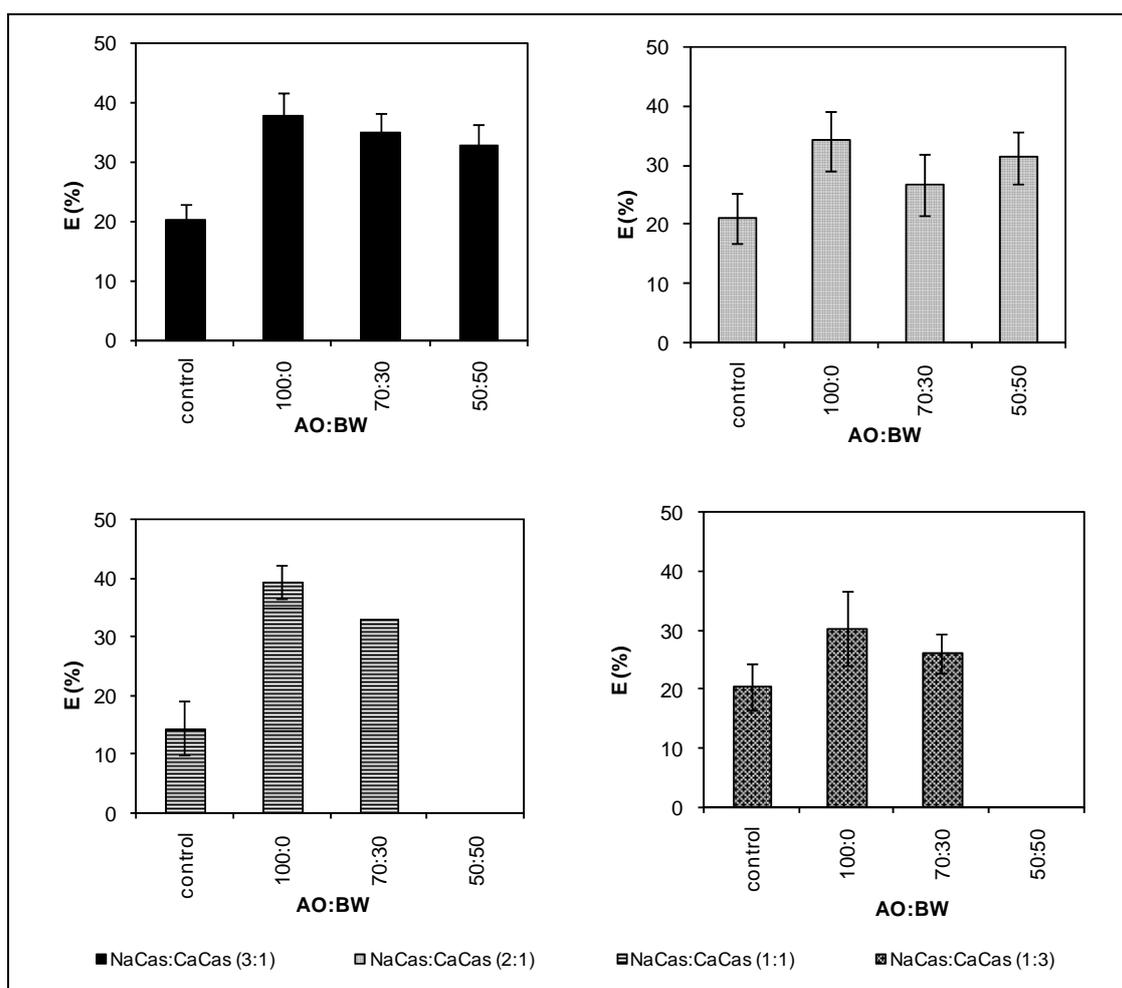


Figura IV.11. Valores de deformación hasta el punto de fractura (E) de los films control y films elaborados con distintas relaciones NaCas:CaCas y distintos ratios ácido oleico:cera de abeja.

La figura IV.12 permite comparar el comportamiento de los parámetros mecánicos de los films elaborados en el segundo estudio. Para el factor de relación caseinato sódico:caseinato cálcico, se observan diferencias significativas para los tres parámetros analizados, de modo que al aumentar la cantidad de caseinato cálcico se observa un incremento progresivo en el módulo de elasticidad y tensión de fractura mientras que la deformación disminuye hasta alcanzar el valor más bajo para los films formulados con una relación caseinato sódico:caseinato cálcico (1:3) y con cera de abeja como único material lipídico. Cabe señalar que estas diferencias son más evidentes al incrementar la cantidad de cera de abeja presente en el film. En este sentido, mientras que no se observan diferencias significativas en los films formulados con ácido oleico puro, éstas

empiezan a ser más evidentes a medida que aumenta la cantidad de cera de abeja en el film, obteniéndose films menos flexibles y elásticos a medida que aumenta la cantidad de caseinato cálcico en el film. Las diferencias observadas entre los films formulados con ácido oleico y los que incorporan cera de abeja pueden atribuirse a que la menor capacidad emulsionante del caseinato cálcico podría evidenciarse a medida que aumenta la cantidad de cera provocando la agregación de las partículas dispersas y potenciando la mayor compactación de la red proteica como consecuencia del entrecruzamiento originado por los iones calcio. Ambos, el estado sólido de la cera de abeja junto con el entrecruzamiento intermolecular originarían la mayor rigidez de la fase dispersa.

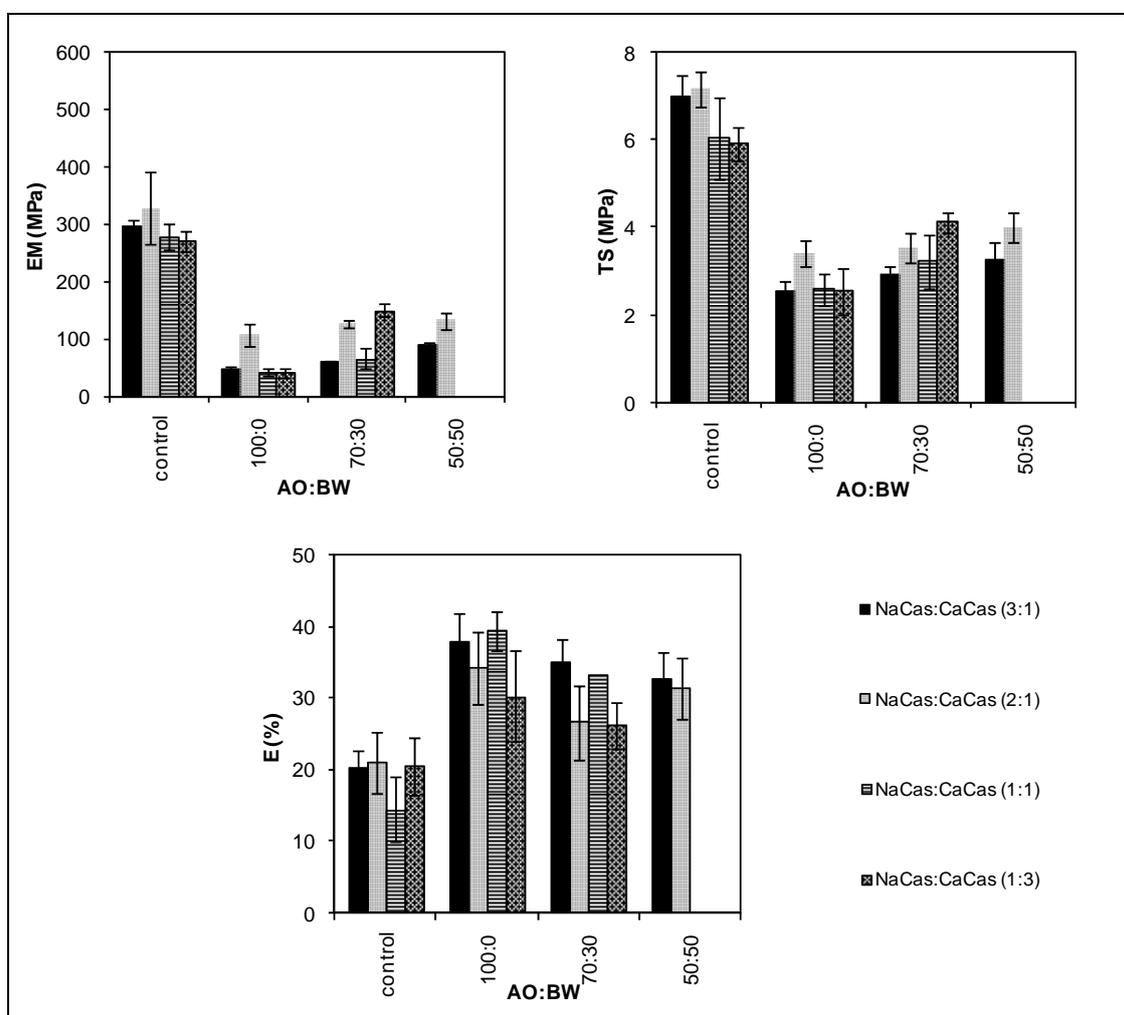


Figura IV.12. Valores de los parámetros mecánicos de los films formulados en el segundo estudio.

IV.2.3 Permeabilidad al vapor de agua

La tabla IV.5 muestra los valores de permeabilidad al vapor de agua de los films elaborados con distintas relaciones caseinato sódico:caseinato cálcico (3:1, 2:1, 1:1 y 1:3), con o sin material lipídico (ácido oleico y/o cera de abeja). La figura IV.13 muestra el gráfico de interacciones para los valores de permeabilidad al vapor de agua de los films obtenidos de un análisis de varianza factorial con los factores relación caseinato sódico:caseinato cálcico y proporción ácido oleico:cera de abeja. Se observa que la eficacia del efecto barrera al vapor de agua depende de la composición del film. En este sentido, en los films control (sin material lipídico) se observa un descenso significativo ($\alpha < 0.05$) en la permeabilidad al vapor de agua a medida que aumenta la cantidad de caseinato cálcico en la formulación, lo que corrobora que el caseinato cálcico ofrece una mayor resistencia a la transferencia al vapor de agua, permitiendo alcanzar mejores permeabilidades que los films formulados con caseinato sódico, pero no tan barrera como los films en los que el caseinato cálcico representa la totalidad de la fase proteica (figura IV.4 y IV.13).

Tabla IV.5. Valores de permeabilidad al vapor de agua de los films formulados con relaciones NaCas:CaCas 3:1, 2:1, 1:1 y 1:3.

NaCas:CaCas	AO:BW	WVP (g-mm/kPa-h-m ²)	
		promedio	Desviación
3:1	control	7.15	0.10
	100:0	3.9	0.5
	70:30	2.6	0.3
	50:50	3.0	0.5
2:1	control	6.41	0.04
	100:0	3.49	0.45
	70:30	2.02	0.54
	50:50	3.57	0.29
1:1	control	4.1	0.1
	100:0	4.29	0.31
	70:30	3.69	0.31
1:3	control	4.3	0.9
	100:0	4.7	0.4
	70:30	4.3	0.7

En los films que incorporan material lipídico se observa un descenso significativo ($\alpha < 0.05$) en la permeabilidad al vapor de agua con la presencia de ácido oleico y/o cera

de abeja cuando la cantidad de caseinato cálcico presenta menos del 50% de la totalidad de la fase proteica (relaciones NaCas:CaCas 3:1 y 2:1). Este efecto es más acusado al aumentar la cantidad de cera de abeja en los films, comportamiento que puede atribuirse a que la cera de abeja se encuentra en estado sólido siendo más efectiva como barrera a la humedad, que el ácido oleico que se encuentra en estado líquido (Kamper & Fennema, 1984a; Martín-Polo *et al.*, 1992b; Shellhammer & Krochta, 1997a). Para una misma relación ácido oleico:cera de abeja, se observa que para el factor de proporción NaCas:CaCas, se produce un descenso significativo ($\alpha < 0.05$) en los valores de WVP de los films formulados con una relación 2:1 con respecto a los que presentan una relación NaCas:CaCas 3:1. Este comportamiento corrobora el mayor efecto barrera al vapor de agua del caseinato cálcico frente al sódico.

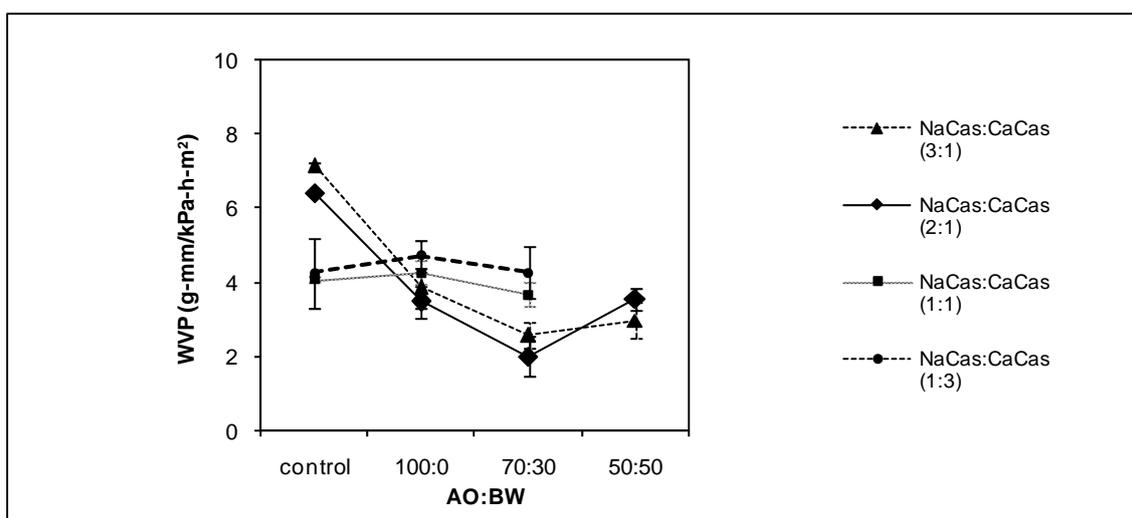


Figura IV.13. Gráficos de interacciones de los valores de permeabilidad al vapor de agua de los films elaborados con distintas relaciones NaCas:CaCas.

Por lo que respecta a los films que se formulan con relaciones NaCas:CaCas 1:1 ó 1:3 se observa un incremento en la permeabilidad al vapor de agua con la presencia de material lipídico aunque existe un descenso significativo ($\alpha < 0.05$) a medida que aumenta la cantidad de cera de abeja presencia en el film. En cualquier caso, estos films son más permeables que aquéllos en los que el caseinato cálcico representa menos del 50% de la totalidad de la fase proteica (relaciones NaCas:CaCas 3:1 ó 2:1). En este sentido, entre los films formulados con mezclas de ambos caseinatos se observa que los

films más permeables son los que contienen una mayor proporción de caseinato cálcico (1:3). Este comportamiento puede atribuirse a la estructura que adopta la matriz en cada caso. La presencia de caseinato cálcico parece favorecer la formación de agregados, incrementándose el tamaño de los mismos al aumentar la proporción de este caseinato. En este sentido, para una misma relación entre caseinatos, la incorporación de ácido oleico y/o cera de abeja reduce la permeabilidad al vapor de agua con respecto al film control pero la presencia de estos agregados impide la distribución efectiva del lípido en la matriz proteica lo que provocaría que a medida que aumenta la cantidad de caseinato cálcico, la eficacia del efecto barrera disminuya.

En base a los resultados observados se puede afirmar que las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua dependen de la composición del film. Entre los films que no incorporan material lipídico (ácido oleico y/o cera de abeja), la presencia de caseinato cálcico mejora las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua respecto a los films a base de caseinato sódico. Con la incorporación de ácido oleico y/o cera de abeja se reduce la permeabilidad al vapor de agua con respecto a los films control (sin material lipídico). Se observa que el caseinato cálcico es más efectivo en la reducción de la permeabilidad al vapor de agua cuando se encuentra en cantidades inferiores al 50% del totalidad de la fase proteica, siendo las formulaciones más eficaces como barrera al vapor de agua, aquéllas que presentan una relación NaCas:CaCas 2:1. Cuando el caseinato cálcico se encuentra en concentraciones superiores al 50% provoca una mayor discontinuidad de la matriz proteica lo que podría impedir una distribución homogénea del material lipídico en la matriz y, consecuentemente, una estructura más abierta y con mayores valores de permeabilidad. De esto se deduce que la presencia de caseinato cálcico junto con ácido oleico y cera de abeja mejoran las propiedades barrera del film siempre que la concentración de caseinato cálcico sea inferior al 50% de la totalidad de la fase proteica. Los films elaborados con una relación NaCas:CaCas 2:1, manteniendo una relación proteína:lípido 1:0.5 y una proporción ácido oleico:cera de abeja 70:30 son los que mejores propiedades presentan. Si bien el caseinato cálcico reduce ligeramente la elasticidad y flexibilidad de estos films con respecto a los formulados con 100% de caseinato sódico, las propiedades barrera al vapor de agua del film mejoran considerablemente.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES.

- Las formulaciones a base de caseinato sódico presentan un comportamiento preferentemente monomodal mientras que las obtenidas a base de caseinato cálcico presentan una distribución bimodal, con un mayor tamaño de partícula medio.
- La adición de cera de abeja en films a base de caseinato sódico provoca que aumente la proporción de partículas irregulares y de mayor tamaño respecto a films formulados únicamente con ácido oleico. En el caso de caseinato cálcico el efecto de la adición de cera es mucho más notable, dando lugar a mayores tamaños de partícula provocando la formación de agregados para formulaciones que incorporan un 50% o más de cera de abeja respecto al ácido oleico.
- El caseinato cálcico proporciona films menos elásticos y extensibles que el caseinato sódico. Si bien las diferencias entre ambos se ven reducidas a medida que se añade material lipídico y se aumenta la proporción de cera de abeja, en todos los casos los films a base de caseinato cálcico son más rígidos y menos deformables que los obtenidos a base de caseinato sódico.
- En relación a la permeabilidad al vapor de agua se deduce que ésta mejora considerablemente para los films elaborados a base de caseinato cálcico y material lipídico, obteniendo los menores valores de permeabilidad al vapor de agua para relaciones ácido oleico:cera de abeja de 70:30.
- La microestructura de los films pone de manifiesto la formación de matrices con distinto grado de uniformidad y tamaño de elementos estructurales. El caseinato cálcico da lugar a estructuras más compactas que el caseinato sódico, lo que explica las mejores propiedades barrera al vapor de agua y la menor elasticidad de los films.
- Respecto a los films formulados a base de mezclas de caseinato sódico y caseinato cálcico las formulaciones presentan una distribución del tamaño de partícula preferentemente monomodal cuando el caseinato sódico y el ácido oleico son predominantes, mientras que a medida que aumenta el contenido en caseinato cálcico y cera de abeja la tendencia es presentar distribuciones bimodales.
- La menor capacidad emulsionante del caseinato cálcico repercute en la formación de agregados de distinto tamaño, que dan lugar a un aumento del tamaño de partícula medio en las disoluciones formadoras de films. Del mismo modo, la adición de cera de

abeja da lugar a un aumento del tamaño de partícula, si bien, el aumento de la concentración de ésta no presenta variaciones significativas en el tamaño de partícula.

- Las propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua dependen de la relación entre caseinatos utilizada. La presencia de caseinato cálcico junto con ácido oleico y cera de abeja proporciona films con mejores propiedades barrera y óptimas propiedades mecánicas siempre que la concentración de caseinato cálcico sea inferior al 50% de la totalidad de la fase proteica.

- Los films elaborados con una relación NaCas:CaCas 2:1, manteniendo una relación proteína:lípido 1:0.5 y una proporción ácido oleico:cera de abeja 70:30 son los que mejores propiedades presentan. Si bien el caseinato cálcico reduce ligeramente la elasticidad y flexibilidad de estos films con respecto a los formulados con 100% de caseinato sódico, las propiedades barrera al vapor de agua del film mejoran considerablemente.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA.

- Adrian, J. & Frangne, R. (1991). Influence des traitements physiques et chimiques sur la structure des proteines (en particulier des proteines laitieres). *Med. Et Nutr.*, 27:119–128.
- Agboola, S. O. & Dalgleish, D. G. (1995). Calcium-induced destabilization of oil-in-water emulsions stabilized by caseinate or by β -lactoglobulin. *Journal of Food Science*, 60:399-403.
- ASTM (1992). Standard methods for tensile properties of thin plastic sheeting. In: Annual book of American Standard Testing Methods. D882-91. Philadelphia, Pa:ASTM
- ASTM. (1995). Standard test methods for water vapor transmission of materials. standard designation. E96-95. En: Annual Book of ASTM. Philadelphia, P. A. pp. 406-413.
- Arvanitoyannis, I.; Psomiadou, E. & Nakayama, A. (1996). Edible Films made from Sodium Caseinate, Starches, Sugars or Glycerol. Part I, *Carbohydrate Polymer*, 31: 179-192.
- Arvanitoyannis, I.; Psomiadou, E.; Nakayama, A.; Aiba, S. & Yamamoto, N. (1997). Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols. Part 3. *Food Chemistry*, 60: 593-604.
- Arvanitoyannis, I.; Nakayama, A. & Aiba, S. (1998a). Edible Films made from Hydroxypropyl Starch and Gelatin and Plasticized by Polyols and Water. *Carbohydrate Polymer*, 36: 105-119.
- Arvanitoyannis, I.; Nakayama, A. & Aiba, S. (1998b). Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties, *Carbohydrate Polymer*, 37: 371-382.
- Audic, J. L & Chaufer, B. (2005). Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal* 41: 1934-1942.
- Avena-Bustillos, R. J. & Krochta, J. M. (1993). Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium cross-linking and lipid content. *Journal of Food Science*, 58: 904-907.

- Avena-Bustillos, R. J.; Cisneros-Zevallos, L. A.; Krochta, J. M. & Saltveit, Jr., M. E. (1994a). Application of casein-lipid edible film emulsion to reduce white blush on minimally processed carrots. *Postharvest Biol. Technology*, 4: 319-329.
- Avena-Bustillos, R. J.; Krochta, J. M.; Saltveit, Jr., M. E.; Rojas-Villegas, R. J. & Saucedo-Pérez, J. A. (1994b). Optimization of edible coating formulations on zucchini to reduce water loss. *Journal of Food Engineering*, 21: 197-214.
- Avena-Bustillos, R. J.; Krochta, J. M. & Saltveit, Jr., M. E. (1997). Water vapor resistance of red delicious apples and celery sticks coated with edible caseinate-acetylated monoglyceride Films. *Journal of Food Science*, 62: 351-354.
- Baldwin, E. A.; Nisperos-Carriedo, M. O. & Baker, R. A. (1995). Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*, 30: 35.
- Baldwin, E.A.; Nisperos M.O.; Hagenmaier, R. D. & Baker, R.A. (1997). Use of lipids in coatings for food products. *Food Technology*, 51 (6), 56-62.
- Banerjee, R., Chen, H., Hendricks, G., and Levis, J.E. 1994. Impact of microfluidization on mechanical and water vapor barrier properties of milk protein based edible films. *J. Dairy Sci.*, 77(Suppl. 1):24
- Banerjee, R. & Chen, H. (1995a). Functional properties of edible films using whey protein concentrate. *Journal Dairy Science*, 78: 1673-1683.
- Barreto, P. L. M.; Roeder, J.; Crespo, J. S.; Maciel, G. R.; Terenzi, H.; Pires, A. T. N. & Soldi, V. (2003). Effect of concentration, temperatura and plasticizer content on rheological properties of sodium caseinate and sodium caseinate/sorbitol solutions and glass transition of their films. *Food Chemistry* 82: 425-431.
- Brault, D.; D'Aprano G. & Lacroix, M. (1997). Formation of freestanding sterilized edible films from irradiated caseinates. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45:2964–2969.
- Brunner, J.R. (1977). Milk proteins. In: Whitaker, J.R., and Tannenbaum, S.R. Eds. *Food protein*. Westport: Avi Publishing Co., 175–208.
- Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal Dairy Science*, 78: 2563-2583.
- Chen, H. (2002). Formation and properties of casein films and coatings. In: Gennadios A, editor. *Protein-based films and coatings*. CRC PRESS. New York. pp. 181-211.

- Chen, H.; Banerjee, R. & Limoge, E.J. (2000, 1995). Testing mechanical strength of edible films. Proc. Food Pres. Integrating Processing, Packaging and Consumer Research. Sci. Technol. Corp., Hampton, VA.
- Cheuk-Hang Wan, V.; Kim, M. S. & Lee, S. Y. (2005). Water vapor permeability and mechanical properties of soy protein isolate edible films composed of different plasticizer combinations. *Journal of Food Science*, 70(6): 387-391.
- Chick, J. & Ustunol, Z. (1998). Mechanical and barrier properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. *Journal of Food Science*, 63: 1024–1027.
- Contreras-Medellin, R. & Labuza, T. P. (1981). Prediction of moisture protection requirements for foods. *Cereal Food World*, 26(7): 335.
- Dalglish, D. G. (1989). Milk proteins-chemistry and physics. In: Food Proteins, J. E. Kinsella & W. G. Soucie, eds. Champagne, IL: American Oil Chemists Society, pp: 155-178.
- Deasy, P.B. 1984. Microencapsulation and related drug processes. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Debeaufort, F. & Voilley, A. (1994). Aroma compound and water vapor permeability of edible films and polymeric packagings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (12): 2871-2875.
- Debeaufort, F. & Voilley, A. (1995). Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films, *International Journal of Food Science and Technology*, 30: 183–190.
- Debeaufort, F.; Quezada-Gallo, J. A. & Voilley, A. (1998). Edible films and coating: tomorrow's packagings: a Review. *Critical Reviews in Food Science*, 38(4): 299-313.
- Dickinson, E.; Hunt, J. A. & Horne, D. S. (1992). Calcium induced flocculation of emulsions containing adsorbed (β -casein or phosvitin). *Food Hydrocolloids*, 6, 359-370.
- Donhowe, I. G. (1992). Water vapor and oxygen permeability of wax films. *American Chemical Society Edible Films Symposium*, St Louis, MO, August.
- Donhowe, I. G. & Fennema O. (1994). Edible Films and Coatings: Characteristics, Formations, Definitions and Testing Methods. In J. M. Krochta, E. A. Baldwin and M.

O. Nisperos-Carriedo, editors. *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, Technomic Publishing CO., Lancaster, PA. pp. 1-24.

- El Ghaout, A.; Arul, J.; Ponnampalam, R. & Boulet, M. (1991). Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberry. *Journal of Food science*, 56(6), 1618.

- Fennema, O., Donhowe, I. G., & Kester, J. J. (1994). Lipid type and location of the relative humidity gradient influence on the barrier properties of lipid to water vapor. *Journal of Food Engineering*, 22: 225-239.

- Gennadios, A. & Weller, C. L. (1990). Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 44(10): 63-69.

- Gennadios, A.; McHugh, T. H.; Weller, C. L. & Krochta, J. M. (1994a). Edible coatings and films based on proteins in edible coatings and films to improve food quality. In: J. M. Krochta, E. A. Baldwin & M. O. Nisperos-Carriedo, editors. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, Inc. pp. 201-277.

- Gennadios, A.; McHugh, T. H.; Weller, C. L. & Krochta, J. M. (1994). Edible coatings and films based on proteins in edible coatings and films to improve food quality. In: J. M. Krochta, E. A. Baldwin and M. O. Nisperos-Carriedo, editors. Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, Inc. pp. 201-277.

- Gontard, N.; Guilbert, S. & Cuq, J. L. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapour barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58 (1): 206-211.

- Gontard, N. & Guilbert, S. (1994). Biopackaging technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. Mathlouthi, M. Ed. Blackie Academic and Professional, London. pp.159.

- Gómez-Ábalos, Ana M^a. (2006). Efecto del alginato y λ -carragenato en las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua en recubrimientos a base de caseinato sódico, cera de abeja y/o ácido oleico Trabajo final de carrera. Universidad Politécnica de Valencia.

- Greener, I. K. & Fennema, O. R. (1989). Barrier properties and surface characteristic of edible bilayer films. *Journal of Food Science*, 54: 1393-1399.

- Guilbert, S.; Gontard, N. & Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29: 10.
- Guilbert, S. and Biquet, B. (1986). Technology and application of edible protective films. In: *Food Packaging and Preservation*. Mathlouthi, M., Ed. Elsevier Applied Science Publishers, London, U. K., 1986, 371.
- Guilbert, S. (1986). Technology and application of edible films. In *Food Packaging and Preservation*. Mathlouthi, M. Ed. Elsevier Applied Science Publishers: New York. pp. 371-394.
- Hagenmaier, R. D. & Shaw, P. E. (1990). Moisture permeability of edible films made with fatty acid and (hydroxypropyl) methylcellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(9), 1799-1803.
- Hagenmaier, R. D. & Shaw, P. E. (1992). Gas permeability of fruit coating waxes. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 117: 105-109.
- Ho, B. (1992). Water vapor permeabilities and structural characteristics of casein films and casein-lipid emulsion films. M. S. Thesis, University of California, Davis, CA, USA.
- Holt, C. (1993). Structure and function of the casein micelle. Fundamental Aspects. *Milk Proteins Congress 93*.
- Ikura, K.; Kometani, T.; Yoshikawa, R.; Sasaki, R. & Chiba, H. (1980). Crosslinking casein components by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44:1567-1573.
- Kamper, S. L. & Fennema, O. R. (1984a). Water vapor permeability of an edible, fatty acid, bilayer films. *Journal of Food Science*, 49: 1482-1485.
- Kamper, S. L. & Fennema, O. R. (1984b). Water vapor permeability of edible bilayer films. *Journal of Food Science*, 49: 1478-1481.
- Kamper, S. L. & Fennema, O. R. (1985). Use of an edible film to maintain water vapour gradients in foods. *Journal of Food Science*, 50: 382-384.
- Kester, J.J. & Fennema, O.R. (1986). Edible films and coatings: A review. *Food Technol.*, 40(12):47-59.
- Kester, J. J. & Fennema, O. R. (1989a). Resistance of lipid films to water vapor transmission. *Journal of the American Oil Chemists Society* 66, 1139-1146.

- Kester, J. J. & Fennema, O. R. (1989b). The influence of polymorphic form on oxygen and water vapour transmission through lipid films. *Journal of the American Oil Chemists Society* 66, 1147-1153.
- Khwaldia, K.; Banon, S.; Desabury, S. & Hardy, J. (2004a). Mechanical and barrier properties of sodium caseinate-anhydrous milk fat edible films. *International Journal Food Science and Technology*, 39: 403-411.
- Khwaldia, K.; Perez, C.; Banon, S.; Desobry, S. & Hardy, J. (2004b). Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4): 239-251.
- Kinsella, J.E. (1984). Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21(3):197–262.
- Koelsch, C. M. & Labuza, T. P. (1992). Functional, physical and morphological properties of methyl cellulose and fatty acid-based edible films. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 25: 404-411.
- Krochta, J.M. & Mulder-Johnston, C. (1997). Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities. *Food Technology*, 51 (2): 61-74.
- Krochta, J. M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: Aristippos Gennadios, editor. Protein-based films and coatings. Boca Raton, London, New York, Washington DC: CRC PRESS. pp 1-32.
- Krochta, J. M.; Pavlath, A. E. & Goodman, N. (1990). Edible films from casein-lipid emulsions for lightly-processed fruits and vegetables. In: Engineering and Food, vol 2. Preservation Processes and Related Techniques. Eds., W.E.L. Spiess and H. Shubert, London: Elsevier Applied Science. pp. 329-340.
- Kurte, P.; Del Valle, J. M. & Aguilera, J. M. (1994) Transport properties of edible films for osmotic dehydration. Paper presented at the *International Symposium On the Properties Of Water ISOPOW- Practium II*, June 19-24yh, Puebla, Mexico.
- Li, J & Chen, H. (2000). Unpublished data. University of Vermont, Burlington, VT, USA.
- Lucey, J. A.; Srinivasan, M.; Singh, H. & Munro, P. A. (2000). Characterization of commercial and experimental sodium caseinates by multiangle laser light scattering and size exclusion chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1610–1616.

- Martin-Polo, M. O.; Voilley, A.; Bolnd, G.; Colas, B.; Mesnier, M. & Ploquet, N. (1992). Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 2. Influence of the physical state. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 40: 413-418.
- Martínez-Cubells, B. (2006). Propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua de films comestibles a base de caseinato sódico y material lipídico. Trabajo final de carrera. Universidad Politécnica de Valencia.
- Maté, J.I. and Krochta, J.M. 1996. Whey protein coating effect on the oxygen uptake of dry roasted peanuts. *Journal of Food Science*, (61):1202–1206, 1210
- Mazza, G. & Qi. (1991). Control of after-darkening in potatoes with edible film-forming products and calcium chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 2163.
- Mc Hugh, T.H.; Avena-Bustillos, R. & Krochta, J. M. (1993). Hydrophobic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4): 899-903.
- Mc Hugh, T. H. & Krochta, J. M. (1994a). Water vapour permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71, 307-312.
- Mc Hugh, T. H. & Krochta, J. M. (1994b). Milk protein based films and coatings. *Food Technology*, 48 (1): 97-103.
- Mc Hugh, T. H. & Krochta, J. M. (1994c). Sorbitol vs glycerol plasticized whey protein edible film: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (4): 841-845.
- Morr, C.V. & Ha, E.Y.W. 1993. Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33:431.
- Motoki, M.; Aso, H.; Seguro, K. & Nio, N. (1987). α -Casein film prepared using transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51 (4): 993-996.
- Moughal, K. I.; Munro, P. A. & Singh, H. (2000). Suspension stability and size distribution of particles in reconstituted, commercial calcium caseinates. *International Dairy Journal*, 10, 683– 690.

- Ninnemann, K. W. (1968). Measurements of physical properties of flexible films. In: Sweeting, OJ, editor. Science and Technology of Polymer Films. London: Interscience., pp. 546-649.
- Nisperos-Carriedo, M. (1994). Edible coating based on polysaccharides. In: Krochta, J., Baldwin, E. & Nisperos-Carriedo, M., editors. Edible coatings and films to improve food quality. Technomic Publishing, Lancaster, 305-335.
- Pérez-Gago, M. B.; Nadaud, P. & Krochta, J. M. (1999). Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science*, 64, 1034–1037.
- Reineccius, G.A. (1994). Flavor encapsulation. In: Edible coatings and films to improve food quality, Krochta, J.M., Baldwin, E.A. & Nisperos-Carriedo, M.O., Eds., Technomic Publishing Co. Inc., Basel, 105.
- Ribadeau-Dumas, B. & Grappin, R. (1989). Milk protein analysis. *Lait*, 69:357–416.
- Rico-Peña, D. C. & Torres, J. A. (1991). Sorbic acid and potassium sorbate permeability of and edible methylcellulose-palmitic acid film: water activity and pH effects. *Journal Food Science*, 56(2):487-499.
- Sears, J. K. & Darby, J. R. (1982). The technology of plasticizers. New York: John Wiley & Sons, pp. 1166.
- Shellhammer, T. H. & Krochta, J. M. (1997a). Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *Journal of Food Science*, 62 (2): 390-394.
- Shimada, K. & Cheftel, J.C. (1989). Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat induced gelation of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37:161.
- Siew, D. C. W.; Heilmann, C.; Easteal, A. J. & Cooney, R. P. (1999). Solution and Film Properties of Sodium Caseinate/ Glycerol and Sodium Caseinate/Polyethylene Glycol Edible Coating Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3432-3440.
- Srinivasan, M.; Singh, H. & Munro, P.A. (1999). Adsorption behaviour of sodium and calcium caseinates in oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 9: 337-341.

-
- Sothornvit, R. & Krochta, J.M. (2000). Plasticizer effect on oxygen permeability of beta-lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (12): 6298-6302.
 - Sothornvit, R & Krochta, J. M. (2005). Plasticizers in edible films and coatings. In: Han JH, editors, *Innovation in food packaging*. N.Y., New York: Elsevier Publishers.
 - Swaisgood, H. E. (1992). Chemistry of the caseins. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced dairy chemistry (Vol. 1)* (pp. 63–110). London: Elsevier Applied Science Publishers.
 - Tomasula, P. M.; Parris, N.; Yee, W. & Coffin, D. (1998). Properties of films made from CO₂-precipitated casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4470-4474.
 - Ye, A.; Srinivasan, M. & Singh, H. (2000). Influence of NaCl addition on the properties of emulsions formed with commercial calcium caseinate. *Food Chemistry*, 69, 237-244.
 - Ye, A. & Singh, H. (2001). Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. *Food Hydrocolloids*, 15:195-207.