

EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE FILMS A BASE DE HIDROXI- PROPIL-METILCELULOSA (HPMC)

MASTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

Alberto Jiménez Marco

Pau Talens Oliag

Amparo Chiralt Boix

M^a José Fabra Rovira

E.T.S.I.A.

EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE FILMS A BASE DE HIDROXI-PROPILOMETILCELULOSA (HPMC)

Jiménez Marco, A.; Fabra, M.J.; Talens.; P.¹; Chiralt, A.²

RESUMEN

En el presente trabajo se analiza la influencia del tipo de ácido graso en las propiedades mecánicas, ópticas y de barrera al vapor de agua de films a base de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), para su posible aplicación en productos alimentarios haciendo especial hincapié en el efecto de la estructura del film sobre las mismas. Por un lado, se estudiaron las emulsiones formadoras de films y por otro lado, se analizaron las propiedades de los films secos. Las formulaciones fueron caracterizadas en base al tamaño de partícula y su comportamiento reológico. Las propiedades mecánicas de los films se analizaron a 58% HR y la permeabilidad al vapor de agua a un gradiente de HR 58-100. La opacidad o transparencia de los films fue estudiada a través del coeficiente de Kubelka-Munk obtenido del espectro de reflexión del film y el brillo se midió a distintos ángulos (20, 60 y 85°). Todas las emulsiones formadoras de films presentaron comportamiento newtoniano. Las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua de los films dependen de la presencia/ausencia de ácidos grasos y del tipo ácido graso (saturado o insaturado) y de la longitud de la cadena hidrofóbica en el caso de ácidos grasos saturados. El film control, junto con el que incorpora ácido oleico, son los más transparentes y los que exhiben las mejores propiedades de brillo, coherentemente con el desarrollo de una estructura superficial más lisa y con menor rugosidad. La incorporación de ácidos grasos saturados, principalmente los de cadena más corta, implica una mayor opacidad y menor brillo, consecuencia de la formación de una microestructura laminar con superficie más rugosa que da lugar a una mayor dispersión de luz.

Palabras clave: Film, HPMC, ácidos grasos saturados, ácido oleico, propiedades físicas.

RESUM

En el present treball s'analitza la influencia del tipus d'àcid gras en les propietats mecàniques, òptiques i de barrera al vapor d'aigua de films a base de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), per a la possible aplicació en

1 *pautalens@tal.upv.es. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. 46022 Valencia, España.

2 *dchiralt@tal.upv.es. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. 46022 Valencia, España.

productes alimentaris, considerant l'efecte de l'estructura del film sobre estes propietats. Per una banda, s'estudiaren les emulsions formadores de films y per altra, s'analitzaren les propietats dels films secs. Les formulacions foren caracteritzades en base a la grandària de partícula i el seu comportament reològic. Les propietats mecàniques dels films s'analitzaren a 58% HR i la permeabilitat al vapor d'aigua un gradient de HR 58-100. L'opacitat o transparència dels films fou avaluada mitjançant el coeficient de Kubelka-Munk obtingut de l'espectre de reflexió del film i el brillo es va mesurar a 20, 65 i 85°. Totes les emulsions formadores de films presentaren un comportament newtonià. Les propietats mecàniques i la permeabilitat al vapor d'aigua dels films depenen de la presència/absència d'àcids grassos, tipus d'àcid gras (saturat o insaturat) i de la llargària de la cadena hidrofòbica en el cas d'àcids grassos saturats. El film control, junt amb que incorpora àcid oleic, són els més transparents i els que exhibeixen millors propietats de brillo, coherentment amb el desenvolupament d'una estructura més llisa i amb menor rugositat. La incorporació d'àcids grassos saturats, principalment quant més curta es la cadena hidrofòbica, implica una major opacitat i menor brillo, conseqüència d'una estructura més heterogènia i rugosa que provoca una major dispersió de llum.

Paraules clau: Film, HPMC, àcids grassos saturats, àcid oleic, propietats físiques.

ABSTRACT

The objective of this work was to analyse the effect of different fatty acids on the mechanical behaviour, optical properties and water vapour permeability of hydroxy-propyl-methylcellulose-lipid edible films, aiming to their application to different foods. The effect of the water content and the structure of the films on their properties were thoroughly discussed. Both the film-forming emulsions and the cast films were studied. The particle size and rheological behaviour of the emulsions were examined. The mechanical properties of the films were tested at 58% RH, and the water vapour permeability was measured at 58-100 % RH gradient. The transparency of the films was quantified by measuring their reflection spectra and applying the theory of Kubelka-Munk. Gloss was measured at different angles (20, 60 and 85°). Film-forming emulsions showed Newtonian behaviour. Mechanical properties and water vapour permeability of the films depended on the presence and kind of fatty acids and hydrophobic chain length in case of saturated fatty acids. The films without lipid and those with oleic acid were the most transparent and glossy, accordingly to their smooth surfaces. The addition of fatty acids, highly when chain length is shorter, promoted the opacity and reduced the gloss of the films, due to the heterogeneity and roughness producing light dispersion to a greater extent.

Key words: Film, HPMC, saturated fatty acids, oleic acid, physical properties.

1. INTRODUCCIÓN

Un film o recubrimiento comestible es una fina lámina constituida a partir de componentes aptos para el consumo alimentario que puede ingerirse como parte del alimento al que protege. Bien sea de la acción de las condiciones ambientales o bien limitando la transferencia de materia entre el alimento y el ambiente.

Los principales componentes de un film o recubrimiento son generalmente hidrocoloides o sustancias de origen lipídico como las ceras. Los recubrimientos formulados a partir de hidrocoloides se caracterizan por formar films con buenas propiedades mecánicas y de barrera a gases y aromas, mientras que constituyen una pobre barrera frente a la transferencia de agua. Por su parte los films formados a partir de lípidos son más frágiles y menos transparentes que los obtenidos a partir de hidrocoloides, pero reducen en gran medida la permeabilidad al vapor de agua en comparación con éstos.

En el grupo de los hidrocoloides se distingue entre proteínas y polisacáridos. El gluten, la zeína, la gelatina, la proteína de soja y las proteínas de la leche son las sustancias proteicas más comúnmente utilizadas en la formulación de recubrimientos (Pérez-Gago y Krochta, 2001; Albert y Mittal, 2002; Mecitoğlu *et al.*, 2007; Gómez-Estaca *et al.*, 2009; Monedero *et al.*, 2009).

Respecto a los polisacáridos, siempre de origen vegetal, distintos investigadores han trabajado con almidón y derivados (Mathew y Abraham, 2008; Albert y Mittal, 2002), alginatos, carragenatos y, en mayor medida si cabe, con los derivados de la celulosa. Los films formulados a partir de estos componentes presentan una buena resistencia mecánica y unas propiedades de barrera a los gases que son muy adecuadas en atmósferas modificadas. De ahí que su utilización permita aumentar la vida del producto sin crear condiciones anaeróbicas (Baldwin *et al.*, 1995ab). En contraposición, y debido a su naturaleza hidrofílica, los films a base de polisacáridos muestran pobres propiedades barrera al vapor de agua (Ben y Kurth, 1995) aunque suponen una barrera efectiva al intercambio de gases, grasas y aromas.

Entre las sustancias celulósicas más empleadas destacan la metilcelulosa (MC), la carboximetilcelulosa (CMC) y la hidroxipropil-metilcelulosa (HPMC) siendo esta última una de las más estudiadas (Albert y Mittal, 2002; Villalobos *et al.*, 2006; Sánchez-González *et al.*, 2009).

La HPMC es, químicamente, un éter hidroxipropílico de metilcelulosa. Tiene mayor solubilidad en agua que la celulosa y presenta excelentes propiedades para formar recubrimientos (Villalobos *et al.*, 2006). Se caracteriza además por ser un polisacárido con propiedades termoplásticas. Estas características han propiciado que incluso algunos investigadores hayan seleccionado esta matriz como base para formular films con capacidad antimicrobiana. (Sánchez-González *et al.*, 2009).

Respecto a los lípidos como material formador de recubrimientos, los primeros en ser utilizados en la obtención de recubrimientos fueron las ceras. Se utilizaban principalmente para dar brillo a la fruta y limitar la

actividad respiratoria (Baldwin *et al.*, 1997) además de evitar la pérdida de peso del producto por evaporación de agua. Desde hace unos años se trata de eliminarlas como formadoras de recubrimientos y de sustituirlas por otros componentes igualmente hidrofóbicos pero que tengan una mayor aceptación por parte de las autoridades sanitarias y los consumidores, como es el caso de los ácidos grasos.

En las dos últimas décadas distintos investigadores han utilizado ácidos grasos como material lipídico en la obtención de films comestibles. La adición de los mismos se realiza con el objetivo de mejorar las propiedades barrera al vapor de agua de films a base de proteínas (Fernández *et al.*, 2006; Fabra *et al.*, 2009) y a base de polisacáridos (Hagenmaier y Shaw, 1990; Koelsch y Labuza, 1992).

Los ácidos grasos se dividen en saturados y en insaturados dependiendo de la presencia o no de dobles enlaces, lo que les confiere propiedades muy distintas como son la reactividad y el estado físico a temperatura ambiente. Ambos han sido utilizados en la formulación de recubrimientos, otorgando distintas propiedades a los films dependiendo de su estado físico y de la longitud de la cadena hidrocarbonada, en el caso de ácidos grasos saturados. Tanto es la influencia de los ácidos grasos en las propiedades de los films que incluso pueden actuar como plastificante, como se ha observado en films a base de caseinato sódico y ácido oleico (Fabra *et al.*, 2008).

La incorporación de sustancias lipídicas a los films de hidrocoloides da lugar a los films llamados composite, bien sean films bicapa u obtenidos a partir de una emulsión. Además de hidrocoloides y lípidos, existen otros componentes que suelen formar parte de las formulaciones de films. Éstas sustancias son plastificantes, tensoactivos, emulsificantes, antioxidantes y antimicrobianos que permiten mejorar, tanto el manejo de las formulaciones como su aplicación en los alimentos para incrementar la vida útil del producto, evitando incluso el desarrollo de microorganismos indeseables.

El objetivo de la presente tesina de master es estudiar el efecto de la incorporación de distintos ácidos grasos en las propiedades físicas de films a base de hidroxipropilmetilcelulosa y su relación con algunas propiedades de las emulsiones formadoras de los films.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño y preparación de las formulaciones

Se prepararon seis formulaciones a base de agua destilada y HPMC (Fluka, Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany). La formulación control se obtuvo disolviendo HPMC al 4% (p/p). Las cinco emulsiones restantes se formularon incorporando distintos materiales lipídicos a la disolución acuosa de HPMC. En todas ellas, la relación polisacárido:lípido fue 1:0.15. Los lípidos empleados (pureza mínima 96%) en las formulaciones fueron: ácido láurico (AL), ácido mirístico (AM), ácido palmítico (AP), ácido esteárico (AE) y ácido oleico (AO); todos suministrados por Panreac Química, S. A.

(Castellar del Vallés Barcelona, España). A excepción de la formulación con ácido oleico, el resto de soluciones se atemperaron a 85 °C en un baño termostático previamente a la homogeneización, para asegurar la fusión del lípido y favorecer así la estabilidad del sistema. La cantidad de agua evaporada se rectificó tras el calentamiento. La homogeneización se llevó a cabo con un ultraturrax (Janke y Kunkel, Germany), durante 1 minuto a 13500 rpm y 3 minutos a 20500 rpm y posteriormente se desgasificó la emulsión a 7 mbar y temperatura ambiente con una bomba de vacío (Wertheim, Germany).

2.2. Obtención de los films

Los films se obtuvieron vertiendo una masa determinada de emulsión en placas de teflón de 150 mm de diámetro. La masa de sólidos totales (2g) se mantuvo constante para todas las formulaciones. Tras el vertido, las muestras se dejaron secar durante 24 horas a una humedad relativa de 45 (± 2) % y a una temperatura de 22 (± 1) °C. Tras el secado, los films se despegaron de las placas de teflón y se almacenaron en desecadores a 58 % de humedad relativa, utilizando una disolución saturada de nitrato de magnesio 6-hidrato (Panreac química, S.A) y a una temperatura de 10 °C.

2.3. Caracterización de las emulsiones formadoras de films

2.3.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA

El tamaño de partícula de las emulsiones formadoras de recubrimiento se determinó con un analizador de tamaño de partícula *Mastersizer 2000* (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK), que utiliza la técnica de difracción láser, basada en la medida de la dispersión de la luz causada por las partículas en la emulsión.

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 1 y 2.

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

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

Donde:

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

2.3.2. REOLOGÍA

El comportamiento reológico de las formulaciones formadoras de recubrimientos se analizó usando un reómetro rotatorio (HAAKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Alemania), donde las muestras se mantuvieron a 25 °C durante los ensayos. Para cada emulsión se determinó, por triplicado, la correspondiente curva de flujo: se realizaron dos barridos de gradiente de velocidad ($\dot{\gamma}$), ascendente y descendente, entre 0 a 512 s⁻¹, cada uno de 5 minutos de duración. A intervalos de 3s se registró el esfuerzo cortante (σ) para cada gradiente de velocidad aplicado, y dichos datos se ajustaron a la ley de Newton para determinar la viscosidad de las emulsiones.

2.4. Caracterización de los films

2.4.1. ESPESOR

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

2.4.2. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de los films se determinaron con una prensa universal de ensayos mecánicos (Stable Micro Systems, TA.XT plus, Haslemere, England) de acuerdo al método estándar D882 (ASTM, 1992). Para cada formulación, se cortaron 12 muestras rectangulares (25 mm por 100 mm). Posteriormente 6 muestras de cada formulación se equilibraron a 58 % de humedad relativa a una temperatura de 10 (± 1) °C. 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) que permitieron obtener los parámetros mecánicos módulo de elasticidad (EM), tensión de fractura (TS) y deformación hasta el punto de fractura (ϵ).

2.4.3. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

La permeabilidad al vapor de agua de los films se determinó según una modificación del método gravimétrico ASTM E96-95 (Mc Hugh *et al.*, 1993),

para un gradiente de humedad relativa 58/54-100 % y temperaturas de 10 y 20 °C. Las muestras (6 por formulación) fueron montadas entre la base y la tapa de una copa de aluminio de 3.5 cm de diámetro (Payne, elcometer SPRL, Hermelle/s Argenteau, Bélgica). En el interior de la copa de permeabilidad se añadieron 5 mL de agua destilada. Las copas fueron introducidas en un desecador equilibrado con una disolución saturada de nitrato magnésico (humedad relativa del 58 % a 10 °C) junto con un ventilador (CPU Y.S.TECH 12V.) colocado en la parte superior, con el fin de homogenizar la atmósfera y asegurar una resistencia despreciable en la superficie del film. Los desecadores se mantuvieron en una cámara a una temperatura controlada de 10 °C y 20 °C respectivamente. El estudio de la permeabilidad se realizó mediante controles de peso de cada copa con una balanza electrónica (± 0.00001 g) (ME36S Sartorius, Alemania) a intervalos de 2 horas durante un periodo de tiempo de 24 horas, según el método descrito por Fabra *et al.* (2008).

2.4.4. PROPIEDADES MICROESTRUCTURALES

El análisis de la microestructura de los films se realizó a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM). Un film de cada una de las formulaciones se almacenó en P_2O_5 y se cortaron muestras rectangulares de 6x1 mm y muestras cuadradas de 5x5 mm para SEM y muestras cuadradas de 1x1 cm para AFM.

Con el fin de analizar la distribución de los componentes en los films se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL®, modelo JSM-5410. Las muestras se montaron en un soporte de cobre de tal forma que permitían observar el perfil a través de su grosor y la superficie. Éstas se cubrieron de oro con el fin de hacerlas conductoras y fueron observadas directamente con un voltaje de aceleración de 10 KV.

La topografía superficial de los films se estudió en un Nanoscope IIIa, Scanning Probe Microscope (Digital Instruments, Veeco Metrology Group), versión 5.30r2. La imagen tridimensional de la superficie de cada muestra fue analizada por el software incluido en el equipo para cuantificar sus parámetros superficiales. Los parámetros de rugosidad obtenidos fueron la rugosidad promedio (R_a : promedio aritmético de los valores absolutos de las desviaciones de las alturas superficiales medido a partir de un plano medio), la rugosidad media cuadrática (R_q : raíz cuadrada del promedio de las desviaciones de altura desde un plano medio) y el factor de rugosidad (r : porcentaje de área superficial tridimensional al área superficial bidimensional producida por la proyección sobre un plano).

2.4.5. PROPIEDADES ÓPTICAS

La opacidad de los films se determinó aplicando la teoría de Kubelka-Munk de dispersión múltiple a los espectros de reflexión (Judd y Wyszecski, 1975; Hutchings, 1999). Esta teoría se basa en que la luz que incide en un producto traslúcido puede ser absorbida o dispersada en función del coeficiente de absorción (K) de dispersión (S) del material. La transmitancia

interna de los films puede determinarse a partir de la ecuación 3. En esta ecuación R_0 es la reflectancia de la muestra determinada sobre un fondo negro ideal. Los parámetros a y b se calculan según las ecuaciones 4 y 5 siendo R la reflectancia de la muestra determinada sobre un fondo blanco de reflectancia conocida R_g .

Los espectros de reflexión sobre fondo blanco y fondo negro se determinaron con un espectrocolorímetro MINOLTA, modelo CM-3600d (Minolta CO. Tokyo, Japan). Las determinaciones se realizaron sobre la cara del film que había estado en contacto con el aire durante el secado, y los análisis se realizaron por triplicado.

$$T_i = \sqrt{(a - R_0)^2 - b^2} \quad (3)$$

$$a = \frac{1}{2} \left(R + \frac{R_0 - R + R_g}{R_0 R_g} \right) \quad (4)$$

$$b = (a^2 - 1)^{1/2} \quad (5)$$

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

2.5 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) usando el programa Statgraphics Plus 5.1 (Manugistics Corp., Rockville, MD). Para discernir entre las medias se utilizó el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95 %.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de las emulsiones formadoras de films

3.1.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA

Estudiar el tamaño de las partículas dispersas, así como su distribución, en las emulsiones formadoras de films o recubrimientos, resulta interesante por su relación con propiedades de los mismos tales como la permeabilidad al vapor de agua y la tensión de fractura (Pérez-Gago y Krochta, 2001). La Figura 1 muestra la distribución de tamaños de partícula de las dispersiones objeto de estudio y la Tabla 1 los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ de las formulaciones estudiadas.

La adición de distintos ácidos grasos saturados tiene una influencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$. Ambos parámetros disminuyen a medida que se incrementa la longitud de la cadena

hidrocarbonada de los ácidos grasos y también con la presencia de insaturaciones. De este modo, entre las formulaciones que incorporan ácidos grasos saturados, son aquellas que contienen ácido láurico, las que presentan las partículas más grandes con distribución más ancha.

TABLA 1. Valores del tamaño medio de la partícula $D_{3,2}$ (μm) y $D_{4,3}$ (μm) en las distintas emulsiones formadoras de recubrimiento. Valores medios (desviación estándar).

Film	$D_{3,2}$ (μm)	$D_{4,3}$ (μm)
HPMC-AL	53.0 (2.2) ^a	84 (3) ^a
HPMC-AM	4.73 (0.05) ^b	14.9 (0.2) ^b
HPMC-AP	3.67 (0.07) ^b	13.0 (0.6) ^b
HPMC-AE	1.91 (0.04) ^c	5.8 (0.9) ^c
HPMC-AO	1.253 (0.005) ^c	1.427 (0.006) ^d

^{a, b, c, d} Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$)

La similitud entre los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ para la formulación correspondiente al ácido oleico indica que las partículas presentes en la dispersión son pequeñas y esféricas y por tanto más homogéneas que en el caso de las formulaciones que incorporan ácidos grasos saturados.

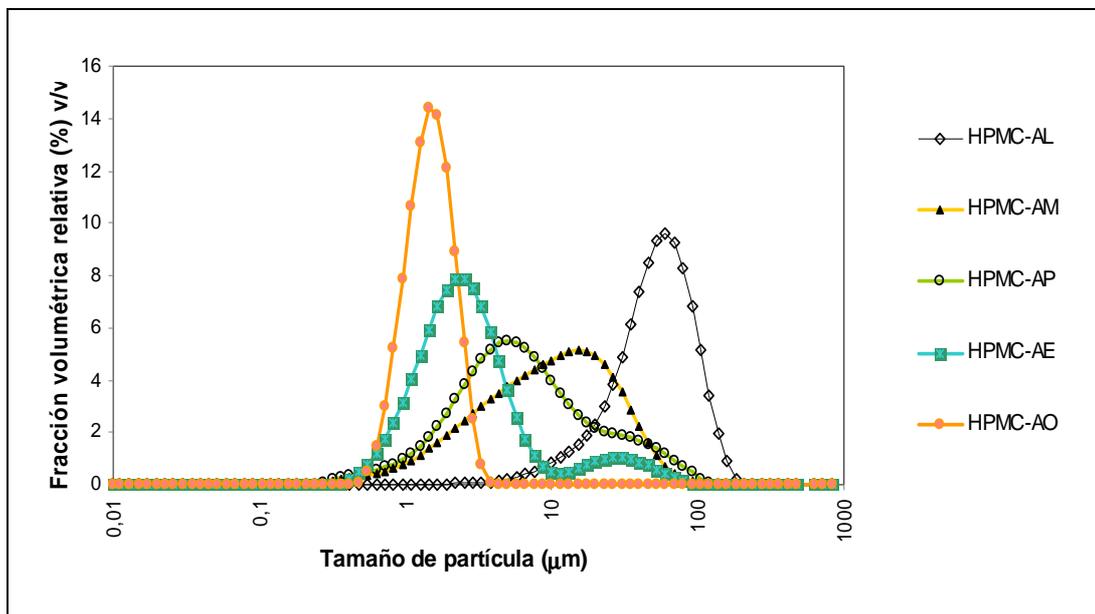


FIGURA 1. Distribución del tamaño de partículas de las emulsiones formadoras de recubrimiento.

Las distribuciones de la Figura 1 muestran una tendencia hacia el descenso del tamaño promedio, como se ha comentado, y al estrechamiento de la distribución cuando aumenta la longitud de la cadena del ácido graso saturado. Este resultado no es esperable inicialmente ya que el tamaño de

las micelas de los ácidos grasos en medio acuoso tiende a ser mayor a medida que aumenta el carácter hidrofóbico de la molécula (longitud de la cadena hidrocarbonada). Los resultados obtenidos deben atribuirse a las interacciones de los ácidos grasos con el hidrocoloide, lo que podría afectar a la cinética de crecimiento micelar al dificultar la movilidad de las moléculas, tanto más cuanto mayor es su tamaño molecular. Un fenómeno parecido ha sido observado en formulaciones basadas en caseinato sódico, donde los ácidos láurico y palmítico formaban partículas de mayor tamaño que las correspondientes al ácido esteárico (Fabra *et al.*, 2009).

Respecto al ácido oleico, debido a la presencia del doble enlace y por tanto, a las dificultades estéricas de empaquetamiento molecular, no es esperable que forme micelas en condiciones de alta movilidad molecular como es en la dispersión acuosa. Las dificultades para el crecimiento micelar a mayor tamaño de la cadena hidrocarbonada, asociadas a la presencia del hidrocoloide, son esperables que se acrecienten durante el proceso de secado del film, donde la mayor concentración alcanzada por los solutos y fase dispersa incrementa la viscosidad del medio dificultando la movilidad molecular.

3.1.2. REOLOGÍA

El estudio del comportamiento reológico de una emulsión formadora de recubrimiento, y la determinación de su viscosidad cuando su comportamiento es newtoniano, permite establecer la existencia de interacciones entre los componentes del sistema. Dicho análisis ofrece además información concreta para seleccionar la tecnología de aplicación de la emulsión sobre el alimento que resulte más adecuada en cada caso. En este trabajo, se estudiaron las propiedades reológicas de las distintas formulaciones a través del análisis de sus curvas de flujo (esfuerzo cortante - gradiente de velocidad) obtenidas a 25°C.

El comportamiento de todas las emulsiones analizadas resultó ser newtoniano. Sin embargo, la adición de ácidos grasos saturados de cadena más corta (láurico, mirístico y palmítico) aumentó significativamente ($p < 0,05$) la viscosidad respecto de la formulación control. La incorporación de ácido oleico y esteárico en la dispersión de HPMC no tuvo un efecto significativo como se puede apreciar en la Tabla 2. Este hecho se correlaciona directamente con el tamaño de partícula existente en dichas formulaciones, según el cual, cuando las partículas de material lipídico son más grandes, la viscosidad es significativamente mayor.

Cabe destacar que el comportamiento reológico de una emulsión formadora de recubrimiento depende tanto de los componentes de la misma, como de las interacciones entre ellos. Tanto es así que el ácido esteárico, que en este caso no altera siquiera la viscosidad respecto del control, puede dar lugar a un comportamiento pseudoplástico cuando se trabaja con otro hidrocoloide como es el caseinato sódico (Fabra *et al.*, 2009) aun siendo el ratio hidrocoloide:lípido el mismo (1:0,15).

TABLA 2. Viscosidad de las emulsiones de comportamiento newtoniano. Valor medio (desviación estándar).

Film	Viscosidad (Pa.s)
HPMC	0.0678 (0.0004) ^a
HPMC-AL	0.079 (0.005) ^b
HPMC-AM	0.081 (0.002) ^b
HPMC-AP	0.0789 (0.0001) ^b
HPMC-AE	0.0684 (0.0002) ^a
HPMC-AO	0.0685 (0.0003) ^a

^{a, b} Diferentes superíndices indican que existen diferencias significativas entre las formulaciones ($p < 0.05$)

3.2. Caracterización de los films

3.2.1. PROPIEDADES MECÁNICAS

La determinación de una serie de parámetros que se relacionen directamente con la facilidad de manejo de los films, la fragilidad de los mismos, o simplemente con su elasticidad; resulta muy interesante no solo desde un punto de vista tecnológico, sino también desde el punto de vista de la percepción del consumidor del producto recubierto. De este modo, el análisis de las propiedades mecánicas de los films aislados resulta de gran utilidad para prever el comportamiento de los mismos una vez estén aplicados sobre el alimento en cuestión.

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 (Mc Hugh y Krochta, 1994).

La Tabla 3 muestra los valores de los parámetros mecánicos obtenidos para cada una de las formulaciones objeto de estudio. Los valores del módulo de elasticidad pueden considerarse elevados si se comparan con los valores obtenidos con otro tipo de hidrocoloides como proteínas de leche (Pérez-Gago y Krochta, 2001; Fabra *et al.*, 2009) o con el propio HPMC en presencia de otros tensoactivos (Sánchez-González *et al.*, 2009). La adición de ácidos grasos produce un descenso significativo ($p < 0,05$) en dicho módulo debido a la introducción de discontinuidades en la estructura del film seco lo que se traduce, a efectos prácticos, en una menor resistencia a la rotura. Sánchez-González *et al.* (2009) observaron que el módulo de elasticidad disminuía también al añadir aceite esencial de árbol de té sobre una matriz de la misma naturaleza.

Si se comparan los valores correspondientes a las formulaciones que incorporan material lipídico (Tabla 3), puede observarse que la reducción del módulo de elasticidad se produce en mayor medida cuando la cadena hidrocarbonada no presenta insaturaciones y es más corta (ácido láurico). La incorporación de ácidos grasos saturados de cadena más larga produce un descenso de EM menos acusado, sin observarse diferencias significativas

entre éstos. Un hecho similar ha sido observado por Fabra *et al.* (2009) al utilizar ácidos grasos saturados de distinta longitud de cadena hidrocarbonada y caseinato sódico como hidrocoloide.

TABLA 3. Valores de los parámetros mecánicos del film control y de los films elaborados con material lipídico y acondicionados 58% de humedad relativa. Valores medios (desviación estándar).

Film	EM (MPa)	TS (Mpa)	ε (%)
HPMC	2550.9 (52.1) ^a	54.7 (4.8) ^a	6.8 (1.9) ^a
HPMC-AL	1382 (24) ^b	17.4 (1.6) ^b	1.54 (0.17) ^b
HPMC-AM	1794 (55) ^{cd}	26.93 (2.07) ^c	1.95 (0.34) ^{bc}
HPMC-AP	1929.1 (124.3) ^d	32.7 (2.5) ^d	3.2 (0.6) ^{bc}
HPMC-AE	1867 (212) ^d	33.6 (3.2) ^d	3.85 (0.61) ^c
HPMC-AO	1676.3 (77.3) ^c	46.4 (6.6) ^e	13.7 (2.9) ^d

^{a, b, c, d} Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$)

Respecto a la tensión de fractura cabe destacar que se corresponde con la tensión que se aplica en el film justo en el momento en que se produce la fractura y que informa, por tanto, de la fuerza que hay que aplicar para romper el film. El comportamiento observado en el estudio para este parámetro es similar al del módulo de elasticidad, a excepción del ácido oleico. La adición de este ácido graso produce sólo una ligera disminución del valor del parámetro respecto del film control. Este hecho puede deberse a que el ácido oleico es líquido a la temperatura de ensayo. Su movilidad en la estructura es mayor, y por tanto las discontinuidades producidas actuarían amortiguando las tensiones producidas; no ocurriendo esto cuando se utilizan ácidos grasos saturados sólidos.

La presencia de ácidos grasos saturados en los films reduce significativamente ($p < 0,05$) la deformabilidad de los mismos respecto del film control, como se extrae de los valores de deformación hasta el punto de fractura de la Tabla 3. Entre éstos, el film que incorpora ácido láurico es el menos deformable, debido probablemente a la diferente magnitud de los agregados formados en el film seco y a su particular microestructura. El ácido oleico, por su parte, incrementa de modo significativo la deformabilidad en comparación con el control. Este hecho queda explicado por la gran capacidad de deformación de las gotas del lípido durante la extensión del film y a un posible efecto plastificante ya observado en films a base de otros hidrocoloides (Fabra *et al.*, 2008). El comportamiento del ácido oleico respecto a las propiedades mecánicas de los films sugiere la presencia de interacciones con las moléculas de HPMC, hecho que no ocurre de forma evidente cuando el ácido graso empleado es saturado.

3.2.2. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA

La determinación de la permeabilidad al vapor de agua es un análisis que permite establecer la idoneidad o no de aplicación de un determinado

recubrimiento sobre un alimento. El gradiente de humedad relativa de trabajo es de 54/58 – 100 % y trata de simular la fuerza impulsora existente en un alimento de alta actividad de agua expuesto a la humedad ambiente.

La Figura 2 muestra los valores de permeabilidad al vapor de agua obtenidos para la matriz de HPMC y para los films que incorporan ácidos grasos.

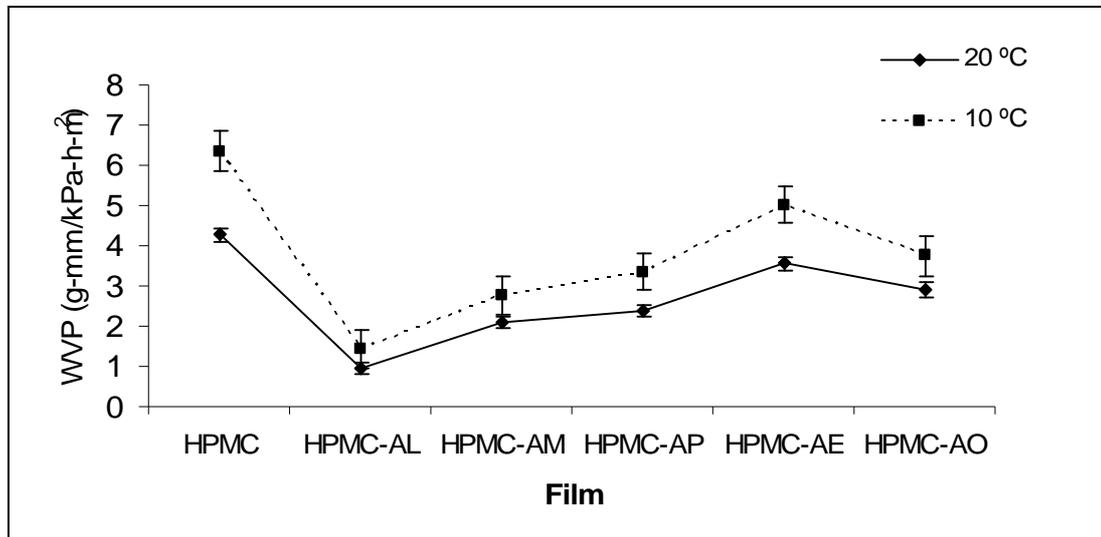


FIGURA 2. Valores de permeabilidad al vapor de agua de los films estudiados.

Cuanto menor es la temperatura de ensayo la permeabilidad al vapor de agua generalmente también lo es como consecuencia del aumento en la movilidad molecular. Así ocurre cuando distintos ácidos grasos se adicionan en una matriz de caseinato sódico (Fabra *et al.*, 2009). No obstante, en este caso se observa que cuando la temperatura de ensayo es menor, la permeabilidad al vapor de agua aumenta, contrariamente a lo que cabría esperar a priori, para todas las formulaciones estudiadas. Este hecho resulta contradictorio ya que un incremento de temperatura supone una mayor movilidad molecular. En cualquier caso este hecho podría quedar explicado según la naturaleza de los fenómenos de adsorción-difusión que tienen lugar en los films durante el transporte. La adsorción molecular está favorecida a bajas temperaturas debido al carácter exotérmico de ésta, hecho que podría justificar los valores observados. El hecho de que la mayor diferencia de permeabilidad debida a la temperatura corresponda al film control (mayor cantidad de hidrocoloide) permite deducir que es la adsorción molecular en la matriz polar el fenómeno controlante de la transferencia de vapor de agua puesto que la adsorción sobre el hidrocoloide es mayor que sobre los ácidos grasos.

Independientemente de la temperatura que se considere, el film control es aquel que menor resistencia a la transferencia de vapor de agua presenta. Como cabría esperar, la adición de ácidos grasos disminuye la permeabilidad al vapor de agua respecto de la matriz pura al aumentar la hidrofobicidad de los films. Igualmente ocurre al incorporar otro tipo de

material lipídico sobre una matriz de HPMC (Sánchez-González *et al.*, 2009) o al incorporar ácidos grasos sobre una matriz proteica (Kamper y Fennema, 1984; Fabra *et al.*, 2009).

Considerando los ácidos grasos saturados, la permeabilidad obtenida es menor cuanto mayor es el tamaño micelar, lo que sugiere que durante el secado de los films se desarrollan estructuras laminares más o menos grandes que dificultan el transporte a través del film. Existe una relación potencial negativa significativa ($r^2 = 0,980$ y $0,947$) entre la permeabilidad al vapor de agua y el tamaño promedio de las micelas de la dispersión ($D_{4,3}$ y $D_{3,2}$ respectivamente) para los ácidos grasos saturados. Teniendo esta correlación en cuenta, al film que incorpora ácido oleico le correspondería, según su tamaño de partícula, una permeabilidad menor al valor determinado. Este hecho nuevamente sugiere la existencia de una interacción entre este ácido graso y las moléculas de HPMC que se traduce en un incremento de la hidrofobicidad. Resultados similares han sido observados en films a base de caseinato sódico por Fabra *et al.* (2009).

Cabe destacar que los resultados no son acordes con los obtenidos por otros autores. Kamper y Fennema (1984) obtuvieron valores de permeabilidad menores con ácido esteárico que con ácido oleico sobre una base de HPMC, aunque los resultados no son totalmente comparables por tratarse de films bicapa.

3.2.3. PROPIEDADES MICROESTRUCTURALES

El estudio de la microestructura de los films se llevó a cabo en ausencia total de agua. Por ello, las muestras fueron previamente almacenadas con pentóxido de fósforo (P_2O_5).

La información obtenida a través del estudio microestructural permite conocer la disposición de los distintos componentes de la emulsión inicial cuando ha finalizado totalmente el secado de los films. Las partículas lipídicas pueden verse sometidas a procesos de floculación, coalescencia y cremado durante dicho secado (Sánchez-González *et al.*, 2009) y es posible correlacionar esta información con otras propiedades tanto de las emulsiones (tamaño de partícula) como de los films (propiedades barrera, propiedades ópticas, etc.).

La Figura 3 muestra secciones transversales de los distintos films obtenidas tras ser criofracturados con nitrógeno líquido y observados mediante microscopía electrónica de barrido.

En el film control se observa una sección muy homogénea como cabría esperar, puesto que no existe ningún tipo de material lipídico que introduzca discontinuidades en la estructura. En el resto de micrografías se distinguen irregularidades producidas por la adición de los ácidos grasos.

Teniendo en cuenta las micrografías correspondientes a aquellas muestras que incorporan ácidos grasos saturados, se pueden distinguir estructuras laminares, formadas durante el secado de los films, como consecuencia de la disposición de los componentes de la emulsión inicial. Las estructuras laminares existentes son más acusadas cuanto menor es la longitud de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos saturados, lo que

se correlaciona directamente con el tamaño de partícula observado y los valores de permeabilidad al vapor de agua. Una disposición similar en láminas fue observada por Fabra *et al.* (2009) para films con ácidos grasos saturados y caseinato sódico.

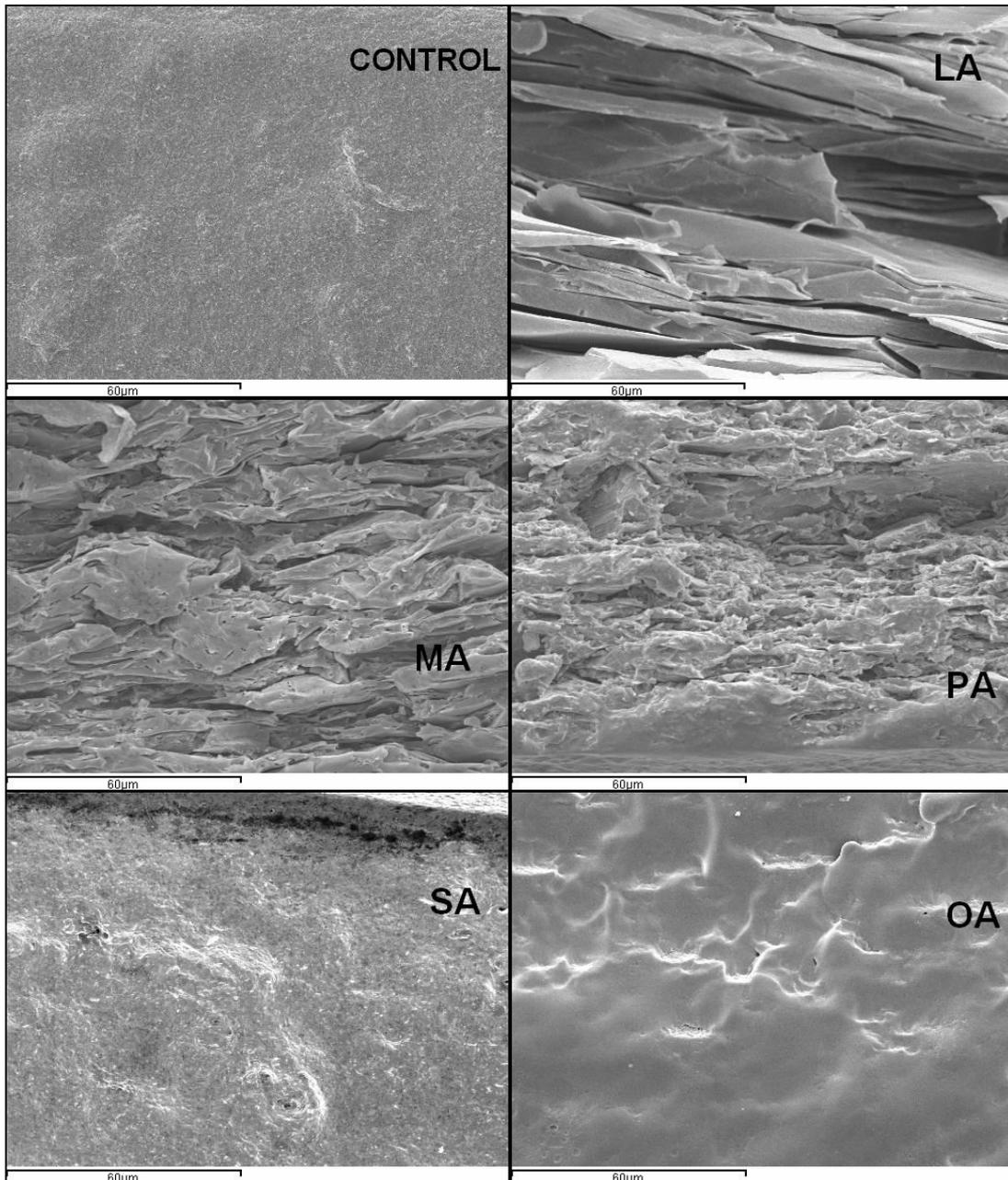


FIGURA 3. Micrografías de la sección transversal del film control y los films que incorporan material lipídico: ácido láurico (AL), ácido mirístico (AM), ácido palmítico (AP), ácido esteárico (AE) y ácido oleico (AO) (x1000).

Las láminas se distinguen claramente en el film correspondiente al ácido láurico, y van siendo menos marcadas cuando se incrementa la longitud de la cadena hidrocarbonada. Esto indica que durante el secado existe una

mayor movilidad molecular de los ácidos grasos de cadena más corta, que favorece el crecimiento de las micelas bicapa, que en los de cadena más larga, que se ve muy afectada por la viscosidad del medio y el mayor tamaño molecular. En el caso del ácido esteárico ya no es posible distinguir siquiera láminas como tales, sino que la matriz de HPMC se ve interrumpida en determinados puntos por la presencia del ácido graso. Este hecho sugiere un mínimo crecimiento de micelas del lípido durante el periodo de secado del film.

La presencia de multicapas muy extendidas a lo largo del film dificulta el transporte de agua a su través, ya que las moléculas han de atravesar capas hidrofóbicas con muy baja afinidad. Esto produce un comportamiento frente al transporte de agua similar al que presentan los films bicapa polímero-lípido, aunque el proceso de obtención de éstos sea distinto.

Respecto al film que incorpora ácido oleico se observa una estructura muy homogénea como en el caso del film de HPMC puro, pero con una textura distinta. Se observa, y de modo muy difuso, un número muy reducido de gotas de material lipídico, lo que indica que se produce una muy buena integración del ácido graso con la matriz. Las interacciones existentes entre hidrocoloide y lípido justificarían los valores de permeabilidad al vapor de agua obtenidos y que, como se decía, no se correspondían con el valor esperado al considerar su tamaño de partícula en la dispersión inicial.

La Figura 4 muestra la topografía superficial correspondiente a una sección de 50x50 μm de los films estudiados. El film control muestra una superficie casi totalmente lisa con alguna pequeña irregularidad que puede estar causada por la presencia de partículas de polvo. Se observa que la introducción de ácidos grasos en la formulación incrementa la rugosidad superficial de los films. La incorporación de ácido oleico incrementa en menor medida la rugosidad que los ácidos grasos saturados y, entre éstos, ocurre que cuanto menor es la longitud de la cadena hidrocarbonada mayor es la rugosidad observada.

La Tabla 4 muestra los valores de rugosidad promedio (R_a), rugosidad media cuadrática (R_q) y el factor de rugosidad. Una de las críticas que se hace de estos parámetros es que no reflejan la esencia de la topografía de la superficie ya que dos muestras pueden tener los mismos valores y, sin embargo, mostrar una frecuencia espacial de las irregularidades muy diferente (Brown y Shipulski, 1999). Los parámetros R_a y R_q presentan un comportamiento paralelo mientras que el factor de rugosidad no proporciona información coherente con estos. Según los valores de la Tabla 4 el film control es el que presenta una menor rugosidad mientras que la adición de ácidos grasos incrementa significativamente ($p < 0.05$) la rugosidad promedio y la rugosidad media cuadrática. Entre los films formulados con ácidos grasos saturados, el ácido láurico es el que produce los films más rugosos (mayores valores de R_a y R_q) seguido del ácido mirístico, palmítico y finalmente esteárico. Este hecho es coherente con las observaciones realizadas mediante SEM y con los valores obtenidos de permeabilidad al vapor de agua. Respecto al factor de rugosidad, No ocurre así al considerar los valores de brillo, que generalmente se correlacionan bien con los parámetros de rugosidad. El menor valor se corresponde con el film control,

seguido del que incorpora ácido oleico pero sin existir diferencias significativas ($p < 0.05$) lo que hace a este parámetro menos determinante en la diferenciación de los films.

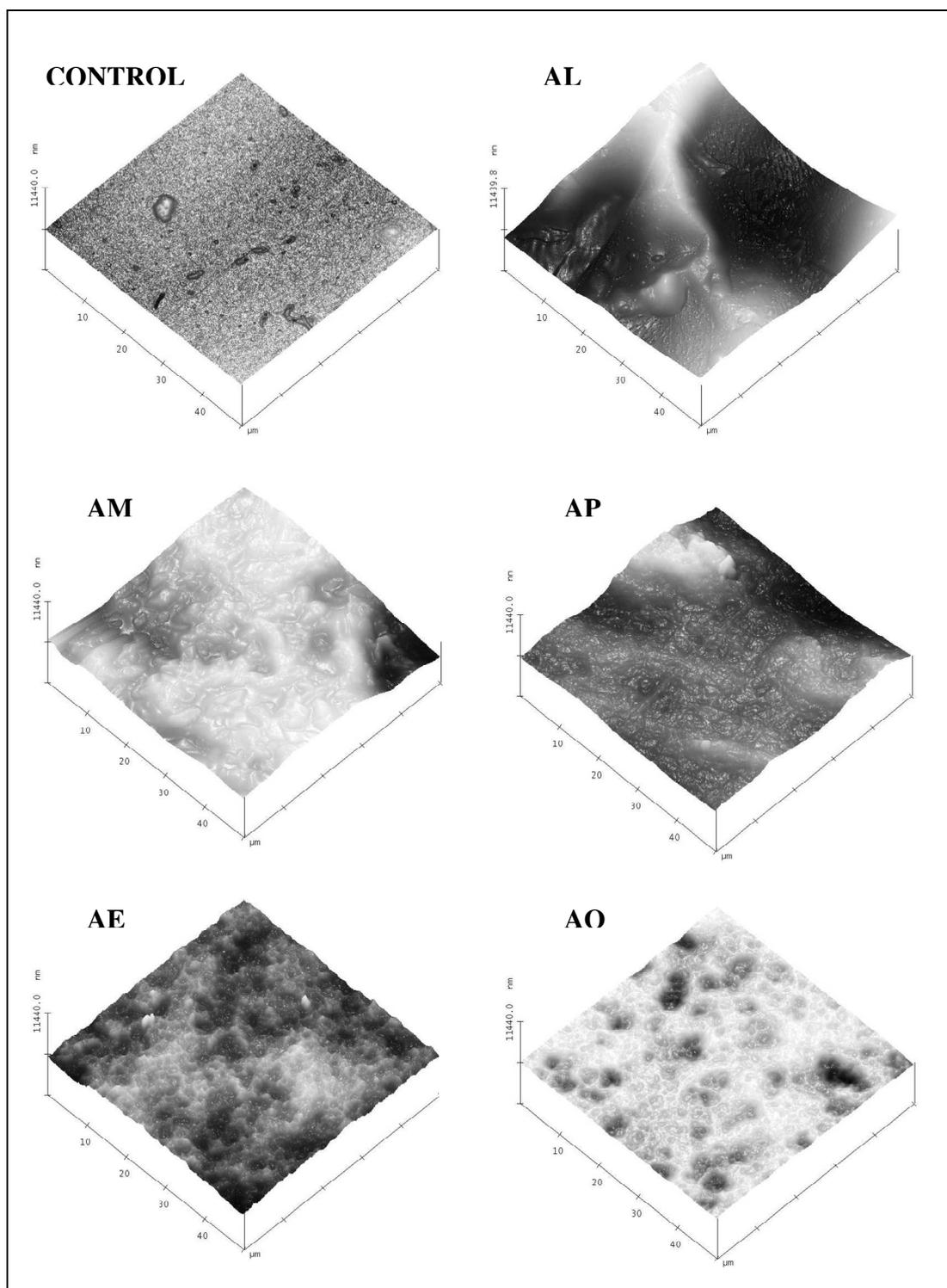


FIGURA 4. Imágenes de la topografía superficial de los films obtenidos a través de microscopía de fuerza atómica.

TABLA 4. Valores de los parámetros de rugosidad del film control y los films que incorporan material lipídico. Valor medio (desviación estándar).

Film	Ra (nm)	Rq (nm)	r (%)
HPMC	18 (9) ^a	28.09 (9.28) ^a	0.05 (0.02) ^a
HPMC-AL	563.7 (72.9) ^b	707.05 (46.81) ^b	7.3 (7.5) ^{b,c}
HPMC-AM	341.71 (39.04) ^c	433.0 (53.5) ^c	7.02 (5.62) ^c
HPMC-AP	303.52 (39.33) ^c	408.3 (86.4) ^c	2.59 (0.61) ^{a,b,c}
HPMC-AE	215 (27) ^d	270.47 (33.37) ^d	6.408 (0.324) ^{b,c}
HPMC-AO	93.93 (0.89) ^e	121.2 (1.2) ^e	0.9 (0.2) ^{a,b}

a, b, c, d Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$)

3.2.4. PROPIEDADES ÓPTICAS

Según Hutchings (1999) las propiedades ópticas de mayor relevancia a la hora de evaluar el impacto directo sobre la apreciación del color y aspecto de un producto recubierto son la transparencia u opacidad y el brillo.

Valores elevados de la transmitancia interna (Ti) se relacionan con una mayor homogeneidad del film y por tanto se corresponden con films más transparentes, mientras que valores menores en éstos se relacionan con una mayor heterogeneidad en el film y por tanto con una mayor opacidad. La Figura 5 presenta las curvas de distribución espectral del parámetro Ti para el film control y los films elaborados con una relación polisacárido:lípido 1:0.15 y acondicionados a 58% de humedad relativa.

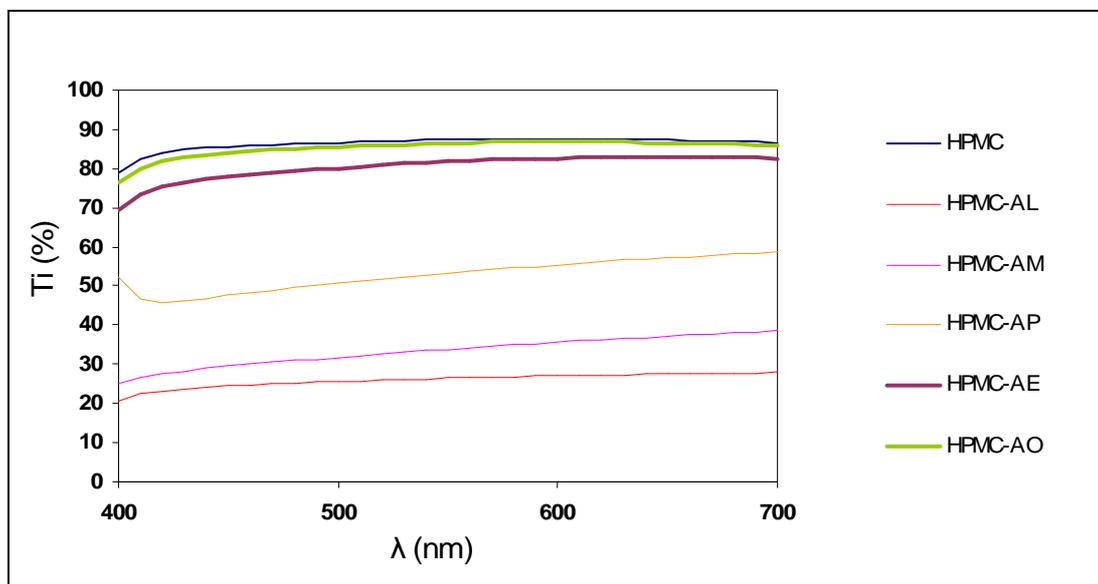


FIGURA 5. Curvas de distribución espectral del parámetro Ti para los films estudiados.

La Figura 5 muestra claramente que el film control y aquel que incorpora ácido oleico presentan espectros muy similares lo que indica que la adición de oleico no produce un descenso significativo en la transparencia respecto de la matriz pura. Respecto a los espectros de los films en cuya formulación se añaden ácidos grasos saturados es destacable que la transparencia de los mismos es menor cuanto menor es la longitud de la cadena hidrocarbonada de éstos, es decir, cuanto mayor es el crecimiento micelar. La formación de estructuras laminares durante el secado produce una estructura en la que las capas de naturaleza lipídica facilitan la dispersión de luz, confiriendo opacidad a los films. Estos resultados son acordes con el tamaño de partícula obtenido y con las observaciones obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido.

La Tabla 5 muestra los valores de brillo obtenidos para los films con y sin ácidos grasos para los distintos ángulos de incidencia.

TABLA 5. Valores de brillo del film control y los films que incorporan ácidos grasos, medidos a 20, 60 y 85°

Film	20°	60°	85°
HPMC	70.4 (3.9) ^a	86.5 (6.2) ^a	92.7 (8.3) ^a
HPMC-AL	3.13 (0.09) ^b	16.4 (1.5) ^b	12.3 (1.9) ^b
HPMC-AM	1.27 (0.05) ^b	5.93 (0.24) ^c	16.3 (2.3) ^b
HPMC-AP	0.77 (0.09) ^b	4.6 (0.2) ^c	19.9 (2.7) ^b
HPMC-AE	0.4 (0.0) ^b	4.37 (0.66) ^c	18.03 (4.43) ^b
HPMC-AO	1.27 (0.46) ^b	12.63 (1.27) ^b	32.8 (7.5) ^c

a, b, c Diferentes superíndices dentro de una columna indican diferencias significativas entre formulaciones ($p < 0.05$)

Se observa que los valores de brillo obtenidos para el film control son considerablemente elevados. Esto indica que la matriz pura forma una superficie muy lisa sin apenas rugosidad superficial. Por otra parte, la adición de cualquier tipo de ácido graso disminuye el brillo respecto del film control. La agregación de los lípidos y los fenómenos de cremado promueven la presencia de partículas lipídicas en la interfase film-aire, dando lugar a una superficie heterogénea (Villalobos *et al.*, 2005) durante el secado. La rugosidad superficial de los films y la disminución en el brillo vienen dados por el fenómeno anterior. La adición de ácidos grasos disminuyó también el brillo de films a base de caseinato sódico y glicerol (Fabra *et al.*, 2009) del mismo modo que la adición de otro tipo de material lipídico disminuyó dichos valores en films de HPMC (Sánchez-González *et al.*, 2009). La longitud de la cadena hidrocarbonada no tiene influencia sobre los valores de brillo ya que apenas se observan diferencias significativas ($p > 0.05$). El film que incorpora ácido oleico presenta unos valores de brillo significativamente mayores que los que ofrecen los films que incorporan ácidos grasos saturados. Este hecho puede explicarse en función al estado físico del mismo. A la temperatura de trabajo el ácido oleico se encuentra en estado líquido, lo que le permite ocupar huecos en la superficie rugosa, rellenándolos y produciendo una superficie más lisa y por tanto más brillante.

4. CONCLUSIONES

Las propiedades de los films a base de HPMC y ácidos grasos están afectadas por el tamaño de partícula de la emulsión inicial, que a su vez es dependiente de la longitud de cadena en los ácidos grasos saturados, y por la presencia de insaturaciones. Este tamaño y la estructura de las partículas afecta en gran medida a la disposición de los distintos componentes o microestructura en el film seco. Los ácidos grasos saturados desarrollan estructuras laminares durante el secado que son más grandes cuanto menor es la longitud de la cadena hidrocarbonada y su movilidad está menos afectada por la viscosidad de la dispersión. Estas estructuras mejoran las propiedades barrera a la humedad, originan films más frágiles y menos flexibles y les confieren opacidad, reduciendo además el brillo. La adición de ácido oleico, por su parte, permite formar films con mejores propiedades mecánicas sin introducir opacidad y limitando la permeabilidad al vapor de agua debido a la presencia de interacciones con la matriz y a que es el único ácido graso líquido a temperatura ambiente.

5. REFERENCIAS

- Albert, S. y Mittal, G. S. (2002). Comparative evaluation of edible coatings to reduce fat uptake in a deep-fried cereal product. *Food Research International*, 35, 445-458.
- ASTM (1992). Standard methods for tensile properties of thin plastic sheeting. In: Annual book of American Standard Testing Methods. D882-91. Philadelphia, Pa:ASTM
- Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O. y Baker, R. A. (1995a). Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*, 30, 35-38.
- Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O. y Baker, R. A. (1995b). Use of Edible Coatings to preserve Quality of Lightly (and Slightly) Processed Products. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 35 (6), 509-524.
- Baldwin, E.A., Nisperos M.O., Hagenmaier, R. D. y Baker, R.A. (1997). Use of lipids in coatings for food products. *Food Technology*, 51 (6), 56-62.
- Ben, A. y Kurth, L.B. (1995). Edible film coatings for meats cuts and primal. Meat'95, the Australian Meat Industry Research Conference, CSIRO, September 10-12 1995.
- Brown, C. A y Shipulski, E. M. (1999). Current engineering design of surface roughness using scale area analysis. *Manufacturing Sci. and Eng. Book N° G0930A*. 68(1),155-159.
- Fabra, M.J., Talens, P., y Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapour permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85, 393-400.
- Fabra, M.J., Jiménez, A., Atarés, L., Talens, P. y Chiralt, A. (2009). Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10, 1500-1507.
- Fernández, L., Díaz de Apodaca, E., Cebrián, M., Villarán, M.C. y Maté, J. I (2006). Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of WPI-based edible films. *European Food Research and Technology*, 224 (4), 415-420.
- Gómez-Estaca, J., Giménez, B., Montero, P. y Gómez-Guillén, M.C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering*, 92, 78-85.
- Hagenmaier, R. D. y 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.
- Hutchings, J.B. (1999). Food and Colour Appearance, Second Edition. Gaithersburg, Maryland: Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication.

- Judd, D. B. y Wyszecski, G. (1975). *Colour in Business, Science and Industry*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Kemper, S. L. y Fennema, O. R. (1984). Water vapor permeability of an edible, fatty acid, bilayer films. *Journal of Food Science*, 49, 1482-1485.
- Koelsch, C. M. y 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.
- Mathew, S. y Abraham, E. (2008). Characterisation of ferulic acid incorporated starch-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 22, 826-835.
- Mc Hugh, T.H., Avena-Bustillos, R. y Krochta, J. M. (1993). 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. y Krochta, J. M. (1994). Water vapour permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71, 307-312.
- Mecitoğlu G. Ç., Yemenicioğlu A. y Arslanoğlu A. (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, 40, 80-91.
- Monedero, F. M., Fabra, M. J., Talens, P. y Chiralt, A. (2009) Effect of oleic acid-beeswax mixtures on mechanical, optical and barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering*, 91 (4), 509-515.
- Pérez-Gago, M. B. y Krochta, J. M. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 996-1002.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. y Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23 (8), 2102-2109.
- Villalobos, R., Chanona, J., Hernández, P., Gutiérrez, G. y Chiralt, A. (2005). Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, 19, 53-61.
- Villalobos, R., Hernández-Muñoz, P. y Chiralt, A. (2006). Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Food Hydrocolloids*, 20, 502-509.