

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE ESPUMAS POR MEDIO DEL PROCESAMIENTO SEMI-AUTOMATICO DE IMAGENES

STUDY OF FOAM STABILITY BY USING A SEMI-AUTOMATIC IMAGE PROCESSING TECHNIQUE

H. Ferrari, P. Sceni, J. Wagner and G. Ortega*

Departamento de Ciencia y Tecnología - Universidad Nacional de Quilmes - CONICET
R. S. Peña 352, B1876BXD -Bernal - Argentina
e-mail: gortega@unq.edu.ar

Recibido 28/02/11; aprobado 15/08/11

El objetivo del presente trabajo es estudiar la estabilidad de una espuma usando únicamente imágenes obtenidas con un microscopio óptico. Presentamos una forma alternativa y más económica de obtener resultados de importancia para el área de alimentos como ser el estudio del proceso de desestabilización de una espuma con una composición variable de proteínas. Se han usado dispersiones acuosas de caseinato de sodio (4-10 % m/m) para comprobar los efectos estabilizantes de esta proteína. Nuestros resultados confirman los estudios anteriores llevados a cabo por medios más costosos y de esta forma muestran los beneficios de desarrollar este tipo de algoritmos. Se discute las posibilidades de implementar un algoritmo *en tiempo real* para este tipo de estudios.

Palabras Claves: Espumas, burbujas, análisis de imágenes, alimentos

This paper studies the stability of foam using only optical microscope images. We introduce here an alternative low cost way to obtain qualitative, but relevant information in the food industry, such as the main properties in the destabilization process of a foam with a variable composition of proteins. Sodium caseinate, as a medium dispersed, has been used in water (4-10% w/w) to check the stabilizing effects of this protein over the foam. Our results confirm previous studies carried out by more elaborate, precise and expensive techniques and show the benefits in developing these kinds of algorithms. The possibility of implementing a real time methodology for this type of study is discussed.

Key Words: Foams, bubbles, image analysis, foods

I. INTRODUCCIÓN

Se define una espuma como un gas disperso en un líquido, donde el gas, en forma de burbujas, es la fase dispersa. Las propiedades espumantes de una proteína⁽¹⁾ están caracterizadas por el volumen inicial de gas incorporado o volumen inicial de espuma (*capacidad espumante*) y los cambios en las características de la espuma en función del tiempo (*estabilidad*). El proceso de desestabilización de una espuma está caracterizado por tres mecanismos concurrentes, conocidos como drenaje, desproporción y colapso. Debido a ellos la espuma evoluciona en función del tiempo de forma tal de ir perdiendo su capacidad de retener el gas inicialmente incorporado.

En la ciencia e ingeniería de los alimentos las espumas (y también las emulsiones) son de vital importancia. El uso de proteínas, principalmente derivadas de la leche son ampliamente usadas para la estabilización de las propiedades iniciales de estos sistemas coloidales⁽²⁾. Un ejemplo de estas proteínas es el caseinato de sodio⁽³⁾. No obstante, el estudio de la

desestabilización generalmente involucra una gran cantidad de técnicas y equipos, como ser determinaciones volumétricas, pérdida del área de interface, conductividad y espectroscopía por onda difusa⁽³⁾ y que, en la mayoría de los casos, nunca dan una información completa sobre todo el proceso en sí. Debido a lo anterior, es importante desarrollar técnicas simples que permitan estudiar, al menos desde un punto de vista exploratorio, el proceso de desestabilización de una espuma, para que, en el caso que lo merezca, realizarlo en forma precisa usando las técnicas más adecuadas.

Teniendo en cuenta lo anterior, hemos desarrollado un algoritmo semiautomático de detección y análisis de micrografías de espumas, por lo que sólo es necesario un microscopio óptico, una cámara y una computadora. El uso de técnicas de reconocimiento de patrones⁽⁴⁾ y algoritmos de uso corriente sobre las imágenes digitalizadas nos permite rápidamente obtener las características más importantes del proceso de desestabilización y evaluar la posibilidad y los costos de realizar estudios más exhaustivos. En el presente trabajo mostramos cómo es posible realizar dicho estudio en la

* Autor a quién debe dirigirse la correspondencia.

desestabilización de una espuma con diferentes concentraciones de caseinato de sodio y las propiedades de esta proteína como estabilizante. Dicho estudio ya fue realizado usando dispersión múltiple de luz (*multiple light scattering*)⁽³⁾. Se propone finalmente la posibilidad de automatizar completamente todo el proceso.

II. MÉTODOS

Preparación de la espuma

Se preparó una dispersión acuosa con caseinato de sodio, entre 4-10% m/m, de acuerdo a lo expuesto en el trabajo de Sceni y Wagner⁽³⁾. Dicha dispersión posteriormente fue introducida en una probeta y se formó la espuma usando un homogeneizador a cuchillas a 8000 rpm durante 2,5 minutos a 25 °C. Inmediatamente luego de formada la espuma, esta se colocó en un portaobjetos y fue cubierta con un cubreobjeto de 22 x 22 mm². La microestructura de la espuma fue analizada con un microscopio óptico de contraste de fase Leica DMLB (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Germany) a 100X. Se tomaron micrografías a los tiempos indicados para cada concentración de caseinato, con una cámara fotográfica digital Leica DC100 adaptada al microscopio. Se obtuvieron imágenes de las espumas para los siguientes tiempos, de acuerdo con la proporción de caseinato usado:

4% a tiempos 0, 1, 2, 3, 4 (minutos)

6% a tiempos 0, 1, 2, 3, 4 (minutos)

8% a tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (minutos)

10% a tiempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 (minutos)

Las cuales llamaremos a partir de ahora como "04", "06", "08" y "10" respectivamente.

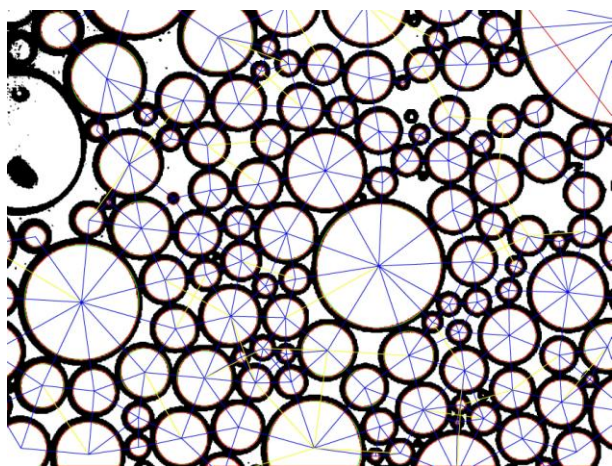


Figura 1. Micrografía de la espuma con la detección de burbujas (caso 6% a 0 minutos).

Reconocimiento automático de burbujas.

Una vez digitalizadas las imágenes, se empleó un algoritmo de detección desarrollado por nuestro grupo. Dicho algoritmo lee la imagen y la convierte a una escala de grises. Luego se mejora el contraste con una ecualización adaptativa sobre el histograma de intensidades para reescalar las intensidades utilizando

todo el rango dinámico. Finalmente se selecciona un umbral para convertir la imagen a una en blanco y negro.

Con la imagen en blanco y negro se seleccionan los bordes de las figuras analizando la conectividad a los primeros ocho vecinos de cada pixel, para luego estudiar la morfología de los contornos encontrados y seleccionar los contornos correctos basados en su morfología (perímetro, área, excentricidad, solidez, etc), comparadas con la de un círculo, figura usada como referencia. Básicamente el algoritmo ajusta un círculo a cada imagen de burbuja. Finalmente se guardó la información de los centros de cada burbuja detectada junto con los radios, espesores de las burbujas como también la cantidad de burbujas que están en contacto con la burbuja detectada. En la Fig. 1 podemos observar la imagen ya digitalizada y procesada de una espuma por medio del algoritmo automático (6% a 0 minutos). Se puede observar lo aptas que son las imágenes de las burbujas para ser ajustadas con círculos, como también la detección de los centros de cada burbuja, su radio y la información de los vecinos próximos, la cual es almacenada para su posterior procesamiento. Por último, puede observarse que existen algunas imágenes de burbujas que no se detectan automáticamente, debido a dos causas principales. Por un lado el ruido existente dentro de la burbuja, por ejemplo en la parte superior izquierda y por otro el apartamiento de su forma circular. No obstante, como puede observarse en dicha figura el algoritmo de detección de burbujas puede detectar en la mayoría de los casos arriba del 95% de las burbujas existentes. Luego de una inspección ocular de las fotos con la detección de centros y radios, se completó la información faltante en forma manual, simplemente seleccionando las burbujas faltantes sobre la pantalla de la computadora.

Estabilidad de la espuma.

Los mecanismos responsables de la desestabilización de una espuma son tres: drenaje, desproporción y colapso. A efectos de estudiar la dinámica de desestabilización de esta espuma en particular, hemos estudiado cada uno de estos mecanismos por separado de la siguiente forma:

Drenaje

Durante el proceso de drenaje, el líquido en el coloide deja la espuma, fundamentalmente debido a efectos de la gravedad, adelgazando las lamelas, lo que hace más inestables a las burbujas. Esta pérdida de líquido puede ser cuantificada a primer orden calculando el aire encerrado en las burbujas. Estimaremos esta pérdida de líquido a través de las imágenes bidimensionales, lo que ciertamente no es correcto pero servirá como aproximación. De esta forma tendremos, para cada imagen con N burbujas, que el volumen de líquido V_L será:

$$V_L = V_T - V_A$$

$$V_A = \sum_{i=1}^N S_i \quad (1)$$

Donde V_A es el “volumen de aire” y S_i es el área del sector circular del círculo dentro de los límites de la micrografía. V_T es el “volumen” de la superficie cuadrada de la foto.

Desproporción

Durante este proceso, también conocido como *Ostwald Ripening*, el gas de las burbujas difunde entre burbujas cercanas, de la de radio más pequeño hacia la de radio más grande, debido a la diferencia de presiones existentes entre el interior y exterior de las burbujas

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{r} \quad (2)$$

Donde ΔP es la diferencia entre presión interior y exterior en una burbuja, σ es la tensión superficial del líquido y r el radio de la burbuja. Debido a la desproporción, la distribución del tamaño de las burbujas varía en función del tiempo, aumentando el número de burbujas de radios mayores a costa de la disminución del número de burbujas de radios menores. Estudiaremos este proceso para cada una de las fotos, estimando la función de distribución de los datos por medio del método de núcleos (*kernel density estimate*). También calcularemos el tamaño promedio de las burbujas por medio del diámetro de Sauter⁽⁵⁾ d_{32} :

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^N d_i^3}{\sum_{i=1}^N d_i^2} \quad (3)$$

Donde d_i son los diámetros de cada una de las burbujas y N el número de burbujas en la foto.

Colapso

El resultado neto de los dos procesos antes mencionados es producir burbujas más grandes y con una lamela más fina y que tienen por efecto final hacer las burbujas mucho más inestables y de fácil rotura por lo que, finalmente, el último proceso asociado a la inestabilidad de la espuma es el colapso de las burbujas. Una estimación del efecto del colapso de las burbujas será la disminución del número de ellas en función del tiempo.

III. RESULTADOS

Estabilidad de la espuma.

Drenaje

En la Fig. 2 se puede ver la estimación del líquido en la espuma a las distintas concentraciones.

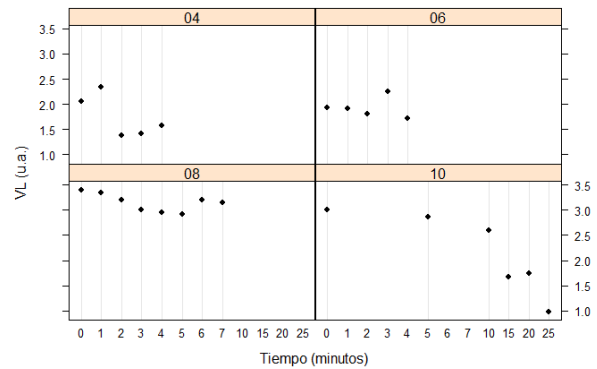


Figura 2. Estimación de la cantidad de líquido en la espuma en función del tiempo, para las diferentes concentraciones de caseinato. El acrónimo u.a. significa “unidades arbitrarias”.

Claramente podemos observar el efecto del drenaje en función del tiempo para las distintas concentraciones. La estimación del volumen de líquido no es muy buena, y los resultados no son coincidentes con los expuestos en el trabajo de Sceni y Wagner⁽³⁾ debido fundamentalmente a que: a) Estamos estimando volúmenes a partir de imágenes bidimensionales y b) en las muestras el líquido drenado y no drenado permanecen en el portaobjeto durante las medidas y el efecto de la gravedad es mucho menor.

Desproporción

En la Fig. 3 hemos ajustado, por medio del método de núcleos, funciones de distribución empíricas a las frecuencias relativas de las correspondientes a burbujas con diferentes radios. Podemos observar cómo, para una concentración determinada, la distribución comienza a ensancharse hacia valores de radios más grandes, debido justamente a la desproporción.

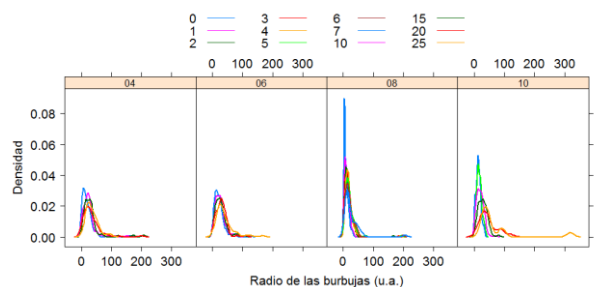


Figura 3. Estimación de las funciones de distribución del número de burbujas de acuerdo al radio de las mismas. Para las diferentes concentraciones de caseinato. El acrónimo u.a. significa “unidades arbitrarias”. La escala de colores arriba de la figura representa los tiempos de las fotos.

Un cálculo más preciso, que está fuera del alcance del presente trabajo, sería estimar que tipo de funciones de distribución ajustan mejor a las empíricas calculadas. En principio una distribución de tamaños de burbujas tendría que aproximarse muy bien con una distribución Log-normal o de Weibull⁽⁶⁾.

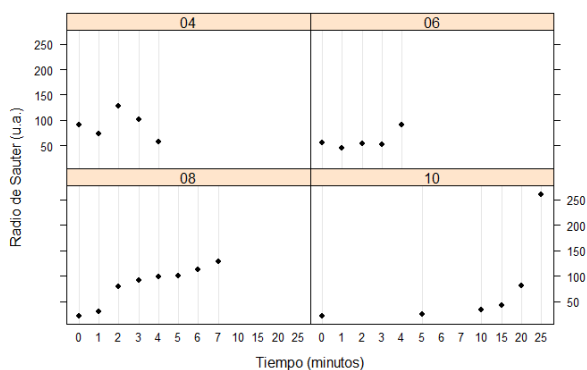


Figura 4. Estimación del diámetro de Sauter, Eq. (3) en función del tiempo para las distintas concentraciones. El acrónimo u.a. significa "unidades arbitrarias"

Por su parte, podemos ver el efecto de la desproporción calculando el diámetro de Sauter para los distintos casos, como lo muestra la Fig. 4. Se puede observar que para las distintas concentraciones de caseinato hay un aumento del tamaño medio. Para el caso de menor concentración, 04, la tendencia no es clara, lo cual se justifica por ser una espuma con burbujas de gran tamaño aun en el estado inicial. Por el contrario, de las espumas 06 a 10, a medida que aumenta la concentración, se puede observar el aumento del tamaño de las burbujas debido justamente a la desproporción.

Colapso

Como dijimos en la introducción, los dos procesos anteriores de inestabilidad desembocan en el rompimiento o colapso de las burbujas, debido a la pérdida de líquido en la superficie de las burbujas y al aumento de tamaño de las mismas. En la Fig. 5 hemos calculado el número de burbujas en función del tiempo para cada una de las concentraciones. Podemos observar el descenso en el número de burbujas para todos y cada uno de los casos estudiados, lo que verifica la inestabilidad de la espuma.

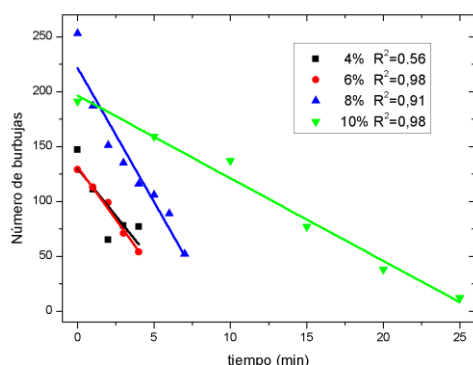


Figura 5. Número de burbujas en función del tiempo para las distintas concentraciones. Para cada caso se ha ajustado una línea recta por cuadrados mínimos, con el coeficiente de correlación entre la recta y los datos dado por R^2 .

Los resultados obtenidos son equivalentes a los informados por Sceni y Wagner (3), pero el fenómeno

del colapso se detecta a tiempos menores, lo cual indica que el estudio de la microestructura de la espuma para evaluar este proceso de desestabilización es más sensible que el de medir la disminución del volumen de la espuma en la probeta, dado que esto es un resultado de un colapso avanzado.

Efecto del caseinato en la estabilidad.

Hemos estudiado el efecto la concentración de caseinato sobre la desestabilización de la espuma. En cada uno de los procesos de desestabilización podemos observar que el efecto del caseinato es disminuir el proceso en si. Esto se puede observar en la Fig. 2, respecto al drenaje y en la Fig. 4 respecto a la desproporción. En particular, respecto al colapso, podemos observar en la Fig. 5 la gran diferencia que existe entre la más alta concentración de caseinato usada, 10% y las demás.

Hemos incluido en dicho gráfico la pendiente de la recta ajustada y los valores de correlación. Para el caso de bajas concentraciones de proteína, aunque el ajuste no es bueno para 04 ($R^2=0,58$), tanto para esta concentración como para 06, se puede observar la rápida caída del número de burbujas y además, se detecta la clara diferencia que existe entre el caso 08 y 10. Este hecho demuestra, efectivamente, que el caseinato es un buen estabilizador de la espuma, disminuyendo la velocidad de colapso de las burbujas, que puede considerarse como un efecto neto de todo el proceso de desestabilización. Un punto importante a remarcar sobre el efecto del caseinato, es el de la Fig. 4, donde puede observarse que a medida que la concentración de proteína aumenta, a tiempo inicial, el tamaño promedio de las burbujas disminuye. Esto permite que la espuma sea efectivamente mucho más estable, al almacenar un mayor número de burbujas (Fig. 5) de menor tamaño (Fig. 4).

IV. CONCLUSIONES

En el presente trabajo hemos mostrado como es posible obtener información cualitativa en el proceso de desestabilización de una espuma. Por medio de un algoritmo automático hemos detectado más del 95 % de las burbujas presentes en el coloide estudiado.

Manualmente hemos completado dicha información. Las imágenes digitalizadas nos han permitido estudiar varios aspectos, al menos en forma cualitativa, de la desestabilización y del efecto del caseinato como agente estabilizante. Todo el proceso es factible de ser automatizado en un mismo paso, de tal forma que puedan obtenerse resultados, instantes después de obtener la micrografía. Actualmente, estamos trabajando en obtener los resultados en tiempo real. Para obtener resultados cuantitativos proponemos los siguientes procedimientos:

- a. Obtener diferentes fotografías de la misma situación, tiempo y concentración de proteína, a efectos de mejorar la estadística
- b. Analizar muestras de espumas previamente dejadas a tiempos variables para que el proceso de drenado no ocurra en el portaobjeto, lo cual mejoraría la evaluación de este proceso de desestabilización.
- c. Mejorar la calidad de las tomas micrográficas.

- of Food Engineering, **36(4)**, 445-452 (1998).
- 2 - Sandrine Rouimi, Catherine Schorsch, Céline Valentini, Sophie Vaslin, Food Hydrocolloids **19**, 467-478 (2005).
- 3 - Sceni P and Wagner J.R. Food Science and Technology International, **13**, 461-468 (2007).
- 4 - Morphological image analysis: principles and applications, P. Soille, Second Edition, Srpinger, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2003).
- 5 - Pacek, Man CC, Nienow Chem Eng Sci, **52(11)**, 2005-2011 (1998).
- 6 - S.A. Magrabi, B.Z. Dlugogorski, G.J. Jameson, Chemical Engineering Science, **54**, 4007-4022 (1999).

Referencias

- 1 - Anabela Raymundo, José Empis and Isabel Sousa, Journal