



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

# Estudio de la dinámica de cristalización de tres aceites de interés industrial, y caracterización de su microestructura final.

**Dr. Luis Puente Díaz**

Patrocinante y Director

Doctor en Tecnología de los Alimentos

Universidad de Chile

**Dr. Alejandro Marangoni**

Director

Doctor en Química de los Alimentos

University of Guelph

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS

**Rodrigo Andrés Benvenuto Ardiles**

Santiago, Chile

2017

*Dedico este trabajo a todos aquellos que me apoyaron durante esta etapa de mi vida, mi madre, mi novia y amigos, hermanos y abuelos, en especial a ti Tata, que ya no estás en cuerpo, pero si tu nombre impreso en esta memoria, en la mía y en la de muchos más.*

## **Agradecimientos**

Agradezco primero que todo a mi abuelo, quien fue mi figura paterna desde mis inicios hasta su despedida, a quien extraño y en quien pensé para darme las fuerzas de terminar mi carrera.

A mi madre que ha puesto todo su esfuerzo y sacrificio en entregarme todo lo que he necesitado para poder llegar a ser un profesional.

A mi padre Carlos, con quien he contado siempre que lo he requerido, y además a mi familia, hermanos, primos, abuelas y tíos, por estar siempre, por creer en mí, y por el apoyo incondicional en los momentos difíciles.

Agradecer también a mis amigos de siempre y a los nuevos, a quienes me han entendido y me quieren por quien soy.

A Jennifer, por tu increíble apoyo, por levantarme y por ser mi compañera de vida.

A cada uno de los profesores quienes me han enseñado, y aquellos que han ido más allá y me han querido y apoyado, en especial a mi profesor guía Luis Puente y a quien fue como mi madre en tierras lejanas, profesora Fernanda Peyronel y que recuerdo con tanto cariño. Sin olvidar por supuesto, la tremenda persona y profesional que es el Profesor Alejandro Marangoni, a quien admiro.

A la Universidad de Guelph y todos los colaboradores del Laboratorio de Grasas y Aceites, por el calor con el que me recibieron, su colaboración que fue de gran ayuda en el desarrollo del presente trabajo, y los amigos que dejé.

A cada uno de las personas, que gracias a su labor han contribuido en el logro de este objetivo, muchas gracias.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
4. Antecedentes Generales.....	6
4.1 Aceites y grasas en la alimentación humana.....	6
4.2 Introducción a la cristalización de grasas.....	7
4.2.1 <i>Jerarquía estructural de una red cristalina de grasas.....</i>	7
4.2.2 <i>Dinámica de cristalización de un sistema graso.....</i>	8
4.2.3 <i>Microestructura de un sistema graso.....</i>	13
4.3 Caracterización de estructura química de sistemas grasos utilizados.....	17
4.3.1 <i>Grasas y hardstocks.....</i>	17
4.3.2 <i>Aceite de soya.....</i>	28
4.3.3 <i>Aceite de girasol alto oleico.....</i>	18
4.3.4 <i>Estearina de Palma.....</i>	19
4.4 Cristalización de aceites en la Industria.....	20
5. Hipótesis.....	22
6. Objetivos.....	23
7. Materiales y métodos.....	24
7.1 Materiales.....	24
7.1.1 Preparación de Muestras.....	24
7.2 Metodología de trabajo.....	24
7.2.1 <i>Contenido de sólidos (SFC).....</i>	24
7.2.2 <i>Punto de fusión y de cristalización mediante         Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....</i>	26
7.2.3 Tipo de polimorfismo.....	26
7.2.4 <i>Viscosidad dinámica.....</i>	27
7.2.5 <i>Diferencia de potencial químico de supersaturación.....</i>	28
7.2.6 <i>Microscopía de luz polarizada.....</i>	30
7.2.7 <i>Dimensiones fractales (Conteo por cajas).....</i>	31

7.2.8 <i>Análisis estadísticos</i> .....	31
8. Diagrama de Bloques de Metodología.....	32
9. Resultados.....	33
9.1 Perfiles del desarrollo de sólidos.....	33
9.2 Termogramas por Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	38
9.3 Tipos de polimorfismo.....	40
9.4 Viscosidad dinámica de los sistemas grasos.....	42
9.5 Cinéticas de cristalización y trayectoria de fases.....	44
9.6 Microestructura y dimensiones fractales.....	52
10. Conclusiones.....	57
11. Resultados futuros.....	58
12. Nomenclatura.....	59
13. Bibliografía.....	60
14. Anexos.....	65

## Resumen

### Estudio de la dinámica de cristalización de tres aceites de interés industrial, y caracterización de su microestructura final

Los ácidos grasos forman parte importante de los nutrientes que contienen los alimentos, otorgándoles propiedades sensoriales únicas, que a su vez son determinadas por las condiciones de cristalización del sistema graso.

La predicción de la cristalización de un sistema graso a través de modelamientos matemáticos, podría tener innumerables y novedosas aplicaciones en la industria alimentaria, sin embargo, los modelos que existen actualmente requieren de datos complejos y difíciles de obtener, lo que genera la necesidad de simplificarlos según las variables que controlen la cristalización.

En este trabajo, un enfoque simple fue utilizado para estudiar la dinámica de la cristalización de un sistema graso, considerando viscosidad y el cambio en el potencial químico de supersaturación como las variables que principalmente influenciaron el comportamiento cristalino, obteniendo gráficos de trayectoria de fases que representan el estado dinámico del sistema graso, los cuales se relacionaron con la estructura final obtenida.

La dinámica de cristalización de tres sistemas grasos: 40% Estearina de palma en aceite de soya (PS-SO), 20% Aceite de soya full hidrogenado en aceite de soya (FHSO-SO) y 20% Aceite de soya full hidrogenado en aceite de girasol alto oleico (FHSO-HOSFO) fue estudiada, analizando el perfil cristalino de las muestras, el tipo de microestructura, la viscosidad, el comportamiento térmico y el polimorfismo, mediante Microscopia, Reometría, Calorimetría Diferencial de Barrido y Difracción de rayos X.

Se obtuvieron las trayectorias de fase para cada sistema graso mediante un modelo desarrollado por el doctor Alejandro Marangoni, y los resultados mostraron una relación entre la morfología de los cristales y los perfiles de cristalización obtenidos. Diferentes comportamientos de cristalización y respectivas microestructuras fueron encontrados para diferentes tasas de enfriamiento, cuyas relaciones fueron observadas y discutidas.

## **Abstract**

### Study of the crystallization Dynamic of three fat systems of industrial interest, and the characterization of its final microstructure

Fatty acids are an important part of the nutrients in food, they influence significantly the sensory properties of a food containing them. The sensory characteristics in turn are defined by the crystallization conditions of the fat system.

The prediction of a fat system crystallization through mathematical modeling, could have many applications in the Food Industry.

The current models existing require of complex data, hard to obtain, generating the need to simplify them, according to the variables that control the crystallization.

In this work, a simple approach was used to study the dynamics of the crystallization of the fat system, considering viscosity and the change in the chemical potential of supersaturation as the variables that will mainly influence the crystalline behavior, obtaining phase trajectory graphs that represent the dynamic state of the system fat, which were related to the final structure obtained.

The dynamic of crystallization on 3 systems: 40% Palm stearin in soybean oil (PS-SO), 20% Fully hydrogenated soybean oil in soybean oil (FHSO-SO) and 20% Fully hydrogenated soybean oil in high oleic sunflower oil (FHSO-HOSFO) were investigated, analyzing the crystalline profile of the samples, microstructure, viscosity, crystal thermal behavior and polymorphism was investigated by light microscopy, rheometry, differential scanning calorimetry (DSC and, X-ray diffraction (XRD).

Phase trajectories were obtained for each fat system studied, through a model developed by Dr. Alejandro Marangoni, and the results showed a relation between crystal morphology and crystallization profiles obtained. Different crystallization behaviour and microstructures were found for different cooling rates, whose relations were observed and discussed.

## 1. Introducción

Un sistema graso comestible es aquel compuesto por un mínimo de un 95% de moléculas de triacilglicéridos (TAG), que son compuestos orgánicos de cadenas de hidrocarburos alifáticos llamados ácidos grasos, unidos a una molécula de glicerol, también pueden contener mono y diglicéridos, fosfolípidos y componentes menores (Gunstone F. , 1997).

Las grasas, son parte imprescindible en la dieta humana, corresponden a más del 30% promedio de la ingesta calórica diaria y aportan atributos sensoriales esenciales, como sabor y textura a un amplio rango de productos alimenticios. Éstas, existen en forma de diferentes tipos de estructuras cristalinas, las cuales exhiben propiedades físicas diferentes (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010).

Los ácidos grasos pueden tener largos de cadena que varían desde 4 carbonos sin dobles enlaces como el ácido butírico, hasta ácidos grasos de más de 22 carbonos como el ácido docosahexaenoico (DHA) con 6 dobles enlaces. Tanto la variación en el largo de cadena, como el grado de saturación de estas, juega un importante papel en las características físicas y finalmente en la funcionalidad nutricional de los TAG. Podemos básicamente entender que TAGs saturados y/o cadenas largas de ácidos grasos, tendrán puntos de fusión más altos que TAGs compuestos en su mayoría de cadenas más cortas y/o insaturadas. Según su punto de fusión, podemos entonces diferenciar aceites de grasas, siendo las grasas aquellas que se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente (Marangoni, et al., 2012).

A nivel industrial, el comportamiento de cristalización de grasas y lípidos tiene grandes implicaciones en las características de los productos finales hechos a partir de cristales de sistemas grasos, tales como la textura y temperatura de fusión del chocolate, untabilidad de mantequillas y margarinas, características de grasas de horneado (*shortenings*), entre otros, junto con su uso en la separación de grasas específicas y lípidos desde las materias primas. De ahí la importancia en el estudio de las condiciones de cristalización y su efecto en las propiedades físicas finales de



un sistema graso, que determinarán las características sensoriales del alimento y por ende la aceptación o rechazo del consumidor (Kiyotaka, 2001).

Durante la cristalización ocurren principalmente dos fenómenos, la nucleación de cristales y el crecimiento cristalino. A medida que un sistema graso cristaliza, la formación de cristales y la nucleación de estos ocurre simultáneamente, haciendo de éste, un sistema dinámico, donde su estado se encuentra en constante cambio con respecto al tiempo (Marangoni A. , 2005).

La fuerza impulsora de la cristalización termodinámica del sistema graso es la supersaturación, que va a estar definida por la diferencia de concentraciones entre la máxima saturación alcanzada a la temperatura final de equilibrio y la concentración de saturación en el tiempo  $t$  (Garside, 1987).

Otro factor esencial que afecta a la nucleación, así como al crecimiento cristalino es la difusión de los TAGs a los centros de nucleación. Al ser la difusión de moléculas inversamente proporcional a la viscosidad del sistema, ésta se puede determinar a partir de la viscosidad, un parámetro que puede ser medido experimentalmente de forma sencilla (Ashim, 2002) y ha demostrado relacionarse con parámetros termodinámicos que pueden ser obtenidos a partir de una relación viscosidad-temperatura (Ojovan, Travis, & Hand, 2007) .

Se han desarrollado muchas técnicas experimentales para estudiar la cristalización termodinámica de un sistema graso (Fouber, Dewettinck, & Vanrollegheem, 2003). Narine y Marangoni (2001) concluyeron que la espectroscopia de resonancia magnética nuclear es el mejor método para caracterizar el proceso de cristalización. Sin embargo, mientras ocurre la cristalización de un sistema graso, la dinámica de este, es decir la evolución en el tiempo de la cristalización y los factores involucrados, no puede ser fácilmente estudiada, debido al hecho que cuando las mediciones son realizadas, el sistema ya está moviéndose a otro estado dinámico.

El fisicoquímico Philippe Rousset, comparó diferentes modelos actualmente utilizados para predecir el comportamiento de cristalización de sistemas grasos y desarrolló uno basado en el tiempo, la temperatura y la trayectoria del sistema

graso, presentando muy buenas correlaciones, sin embargo, requiere de una colección de muchos datos experimentales, antes de ser aplicado (Rousset P. , 2002).

Este trabajo de investigación busca a través de un enfoque simple, el uso de los datos de viscosidad y de la diferencia en el potencial químico de supersaturación (obtenida a partir de un modelo desarrollado por el Dr. Alejandro Marangoni) para un sistema graso, para obtener gráficos de trayectoria de fases en dos dimensiones, y con estos relacionar la trayectoria obtenida con la estructura final que tendrá un sistema graso bajo ciertas condiciones de cristalización.

Estos gráficos permitirían obtener una especie de huella digital del sistema graso cristalizado y deberían relacionarse con las características morfológicas del sistema graso comestible.

Los gráficos de trayectoria de fases serán obtenidos para tres sistemas grasos diferentes en composición: Estearina de palma en aceite de soya (PS-SO), Aceite de soya full hidrogenado (FHSO) en aceite de girasol alto oleico(HOSFO) y Aceite de soya full hidrogenado (FHSO) en aceite de soya (SO).

Además, los sistemas grasos se cristalizarán a dos diferentes tasas de enfriamiento, una rápida y una lenta.

## **4. Antecedentes Generales**

### **4.1 Aceites y grasas en la alimentación humana**

Las grasas y aceites en la nutrición humana juegan un papel muy importante, siendo incluso una de las principales áreas de interés e investigación en el campo de la ciencia de los alimentos.

Existen varias razones por las que el estudio de las grasas y aceites en la alimentación es tan importante, entre ellas, la ingesta de grasas y/o aceites para la mayoría de los adultos va desde un mínimo recomendado de un 15%, pudiendo alcanzar hasta el 35% de la ingesta calórica para un adulto que realiza actividad física, por lo que un tercio de la ingesta calórica diaria recomendada depende del consumo de grasas y/o aceites.

Además, durante los últimos años se ha evidenciado a nivel mundial un aumento en la tasa de obesidad y de enfermedades cardiovasculares, relacionado principalmente a una mala alimentación con exceso de grasas.

De la estructura química de los triacilgliceroles que componen al sistema graso, dependen los efectos en la salud de quien los consume.

Estudios de la Organización mundial de la salud han concluido que los ácidos grasos saturados (láurico, mirístico y palmítico), elevan los niveles de colesterol y de las lipoproteínas de baja densidad en el suero (LDL), aumento asociado a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares debido a su facilidad de unirse a las paredes arteriales. Su consumo no debería ser mayor al 10% de ingesta calórica total (OMS, 2008).

Por otro lado, los ácidos grasos insaturados, son una fuente de energía más saludable, estos se caracterizan por poseer dobles o triples enlaces en su estructura. A diferencia de los ácidos grasos saturados, estos ayudan a disminuir el colesterol en la sangre y algunos son llamados ácidos grasos esenciales, debido a que diversos estudios reflejan una disminución en el riesgo de enfermedades

coronarias del corazón y aún más importantes para el crecimiento y desarrollo normal del feto y lactantes (Grasas y ácidos grasos en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos. (Estudio FAO Alimentación y Nutrición - 91), 2008)

## **4.2 Introducción a la cristalización de grasas**

### **4.2.1 Jerarquía estructural de una red cristalina de grasas**

El comportamiento, los atributos sensoriales e incluso la vida útil de los sistemas grasos, tales como el chocolate, mantequilla, margarina y muchos más, están determinados principalmente por su estructura física (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010).

En tecnología de alimentos, el concepto de estructura se refiere a la organización de un número de elementos similares o disimilares uniéndose unos a otros en una unidad, incluyendo las relaciones entre sus elementos individuales o sus grupos (Raeuber & Nikolaus, 1980).

Una grasa se diferencia de un aceite por su estado físico, el cual va a depender de la temperatura en la que se encuentre el sistema. Cuando una grasa cristaliza, el aceite queda atrapado entre los cristales sólidos, creando una red cristalina de grasa.

Se puede entender que un sistema alimentario consta de una jerarquía en los elementos que componen su estructura, y esta estructuración juega un papel importante en las propiedades finales del alimento, siendo fundamentalmente responsable, la microestructura de este. En el Anexo 1, se puede observar la jerarquía estructural propuesta por Dra. *Peyronel* (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010).

A nivel molecular, los sistemas grasos se constituyen por triacilglicérolos que progresivamente tienden a asociarse en una estructura característica en forma de silla, formando bicapas llamadas lamelas, donde las cadenas alifáticas se organizan quedando paralelas unas de otras, según la forma en que se organicen, será el estado polimórfico alcanzado (Clarkson & Malkin, 1934). El largo de estas cadenas

puede ser de dos, tres o cuatro ácidos grasos y el ángulo de acoplamiento entre las cadenas puede variar (Small, 1966).

Estas lamelas, se unen en diferentes capas para formar un siguiente nivel estructural, el cual es llamado “cristal individual”, que es la base del nivel micro estructural, el cual se construye por moléculas poliméricas o discontinuidades de fase y puede variar en tamaño entre 0.5 y 200  $\mu\text{m}$ . Este nivel es fundamental e influye importantemente en las propiedades macroscópicas de la red cristalina (De Man & Beers, 1987).

Los cristales individuales se asocian unos a otros por fuerzas intermoleculares, formando flóculos que luego se unen en grandes aglomerados formando así una red cristalina continua (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010).

Con diferentes estudios realizados sobre la estructura de aceites y grasas es que se ha propuesto que la estructura jerárquica de una red cristalina de grasas es responsable de la formación e interacción de elementos que afectan las propiedades finales de una red cristalina tridimensional y por lo tanto las propiedades sensoriales de los alimentos que contengan aquella red (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010).

Es así que la untabilidad de las mantequillas y margarinas, la dureza del chocolate y la grasa de leche, el sabor y textura en general de los alimentos que contienen grasas, serán determinadas por las características estructurales de la red de cristales que lo componen (Narine & Marangoni, 1999b) (De Man & Beers, 1987).

Entender la organización estructural presente en los sistemas grasos y su efecto en las propiedades macroscópicas es fundamental, debido a que este conocimiento puede llevar al desarrollo de características específicas deseadas en alimentos manufacturados.

#### ***4.2.2 Dinámica de cristalización de un sistema graso***

Cuando la temperatura de una grasa desciende por debajo de su máxima temperatura de fusión, entonces la fase líquida se vuelve sobre saturada en los TAG

de mayor punto de fusión, lo que ocasiona que estos triacilgliceroles tiendan a cristalizar, para así disminuir su potencial químico. Esta condición de los triacilgliceroles es necesaria para que un sistema graso comience a cristalizar y es llamada subenfriamiento o supersaturación, dependiendo del enfoque utilizado en el estudio de la cristalización (Garside, 1987).

La diferencia entre la concentración máxima de saturación alcanzada a la temperatura final de equilibrio y la concentración de saturación en el tiempo t, es la supersaturación, representada por la ecuación 1.

$$\ln \beta_i = \ln\left(\frac{C}{C_s}\right) \quad (\text{Ec. 1})$$

*Donde,*

*C= Concentración del compuesto (TAG) en la solución*

*C<sub>s</sub>= Concentración de saturación del compuesto (TAG) en la solución a la misma temperatura*

Para que ocurra la cristalización, C debe ser siempre mayor que la concentración de saturación a la misma temperatura (C<sub>s</sub>). Siendo las unidades, generalmente molalidades o molaridades para las concentraciones de los triacilgliceroles en el sistema graso.

Ahora, si se desea evaluar el efecto de la temperatura sobre la cristalización de triacilgliceroles en un sistema graso, existe también un parámetro muy usado en literatura, este es el subenfriamiento, que es la diferencia entre la temperatura a la cual se encuentra la grasa y su máxima temperatura de fusión, necesaria para que exista un cambio en el estado físico de las grasas.

El subenfriamiento es considerado una fuerza impulsora de la cristalización, y representa también la fuerza motriz del cambio de líquido a sólido, la cual debe ser entre 5 y 10 °C antes de que comience a cristalizar (Toro-Vazquez et al, 2001).

El parámetro de subenfriamiento es llamado en inglés “supercooling” y es representado en la ecuación 2.

$$\text{Subenfriamiento} = T_f - T_s \quad (\text{Ec. 2})$$

*T<sub>f</sub>: Temperatura de fusión del sistema graso*

*T<sub>s</sub>: Temperatura de enfriamiento o de calentamiento del sistema.*

En este estudio, ambos parámetros son usados para explicar los resultados obtenidos, sin embargo, debido a que el enfoque utilizado es el de una cristalización desde una solución (triacilgliceroles de alto punto de fusión en un aceite líquido a temperatura ambiente), sólo se utiliza la supersaturación en este estudio en términos termodinámicos.

#### *a) Nucleación*

Una vez alcanzada una supersaturación o subenfriamiento suficiente para que ocurra cristalización, la grasa alcanza un estado metaestable, en el cual debe pasar barreras de energía para comenzar a formar los primeros centros de nucleación.

El cambio de estado de la grasa genera una interface solido líquido que contribuye positivamente al cambio de energía libre de Gibbs, es decir, va en contra de la espontaneidad. Esta energía es representada matemáticamente por la ecuación de Gibbs-Thomson. En la *Ecuación 3* se puede observar el cambio de energía libre para una sustancia pura asociada con nucleación homogénea, como resultado de una combinación de cambios en área y volumen de los embriones de nucleación, siendo:

$$\Delta G_n = A_n \delta - V_n \frac{\Delta \mu}{V_m^s} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde

*ΔG<sub>n</sub>: Dif. de energía libre de Gibbs asociada a la formación de un embrión de nucleamiento*

$\delta$ : Energía libre de superficie por unidad de área     $\Delta\mu$ : Dif. De potencial químico sólido-liquido

$A_n$ : superficie de área de un núcleo

$V_m^s$ : Volumen molar del sólido

$V_n$ : Volumen de un núcleo

Por otro lado, la formación de los primeros cristales lleva a una disminución en la diferencia del potencial químico de supersaturación (directamente proporcional con la diferencia de energía libre de Gibbs) (Marangoni A. , 2005).

Así, en este estado metaestable, los centros de nucleación llamados “embriones de nucleamiento”, se forman y desaparecen continuamente, hasta que un radio estable sea alcanzado, el cual se obtiene al aumentar el valor de la “diferencia en el potencial químico de supersaturación” $\Delta\mu$ . Una vez alcanzado el radio crítico de los embriones de nucleamiento, el cambio de energía libre de Gibbs sólo disminuye, los centros de nucleación comienzan a ser estables y el cristal formado continúa creciendo (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010).

#### *b) Crecimiento cristalino*

El desarrollo de cristales continúa mientras moléculas de TAG se agrupan y difunden a los centros de nucleación, donde crecen capa por capa uniéndose sobre la red cristalina.

La tasa de crecimiento depende de diversas variables, siendo directamente proporcional al subenfriamiento y supersaturación, y variando inversamente proporcional con la viscosidad del sistema (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010).

El subenfriamiento y la supersaturación representan también la tasa de unión de las moléculas al creciente cristal, al relacionarse directamente con esta tasa (Boistelle, 1998). A medida que este delta aumenta, la tasa de crecimiento aumenta también hasta un máximo. Junto con influenciar en la tasa de crecimiento, el  $\Delta\mu$  y delta de supersaturación van a influir en la estructura cristalina, obteniendo grandes cristales para bajos deltas y cristales más pequeños para deltas más grandes (Akoh & Min, 2002).



Por otro lado, a medida que la temperatura disminuye en el sistema, la viscosidad aumenta, disminuyendo la difusión molecular y por ende el crecimiento cristalino.

c) Fuerza termodinámica de la cristalización

Desde un punto de vista termodinámico, la fuerza motriz de la cristalización considera la diferencia de potencial químico, que incluye otros factores además de concentraciones (Soo Na & Joong Oh, 1996), y esta puede ser expresada como una diferencia en los potenciales químicos de saturación, como se indica en ecuación 4, incluyendo el factor de actividad, que es una medida de la concentración efectiva de la solución, y que es representada por la supersaturación, la ecuación queda cómo:

$$\Delta\mu = \mu - \mu^* = R * T * \ln\left(\frac{a}{a^*}\right) \quad \text{Ec. 4}$$

Utilizando el modelo propuesto por el doctor Alejandro Marangoni (Marangoni A., 2015), se introdujo la supersaturación en la ecuación 4, representando así el cambio en el potencial químico de supersaturación ( $\Delta_{ss}$ ), siendo éste el pre-requisito de la cristalización.

Una vez alcanzada esta diferencia, entonces el sistema graso cumple las condiciones termodinámicas para comenzar su cristalización, la cual ocurre a través la nucleación y el crecimiento cristalino (Akoh & Min, 2002).

Se verá en detalle esta ecuación, al presentar los resultados obtenidos.

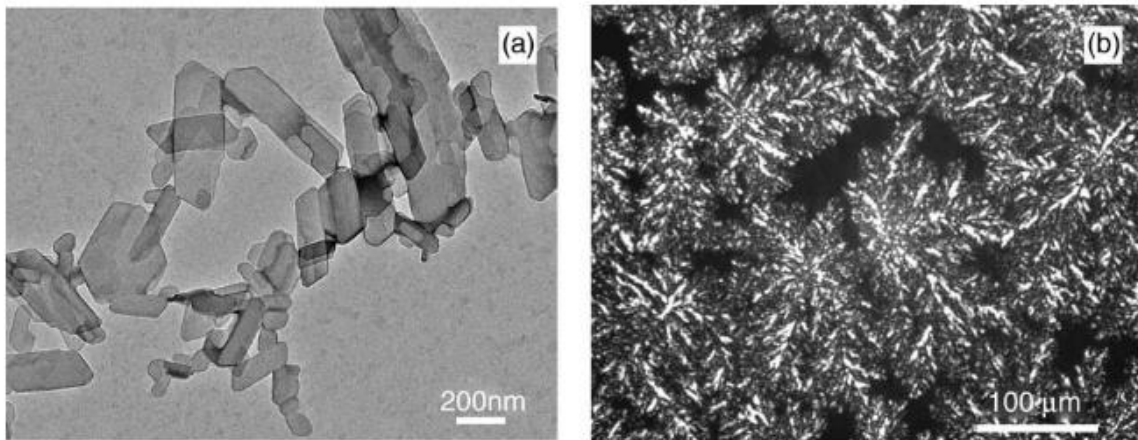
### 4.2.3 Microestructura de un sistema graso

El nivel microestructural de la red cristalina de un sistema graso puede estar definido por aquellas estructuras de largo entre aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$ .

Estas estructuras abarcan desde los cristales individuales hasta la agrupación de estos cristales en cada vez más cristales, hasta formar grandes aglomerados. Un entendimiento básico de la relación entre la composición química de los cristales, las condiciones de cristalización y las propiedades físicas finales de un producto, requiere una descripción de los diferentes aspectos de la microestructura de redes cristalinas de grasas (Heertje, Leunis, Van Zeyl, & Berends, 1987).

Este nivel de estructura ha demostrado tener una enorme influencia sobre las propiedades reológicas macroscópicas de la red, tales como la capacidad de untabilidad de la grasa, su viscosidad, su textura y características sensoriales finales del alimento (De Man & Beers, 1987).

Mediante el uso de criomicroscopía electrónica, se puede observar al más bajo límite de este nivel, cristales individuales (Fig. 1.a), así como, al más alto, agregados de cristales (Fig. 1.b) (clusters o floculos) son reconocibles.



**Figura 1:** Imágenes obtenidas por (a) Criomicroscopía electrónica (Cryo-TEM) mostrando estructuras correspondientes a cristales individuales y (b) Microscopía por luz polarizada mostrando agregados microestructurales para una mezcla de aceite full hidrogenado de canola y aceite de girasol alto oleico en polimorfismo  $\beta$ . (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010).

De Man y varios investigadores han notado que la microestructura de un sistema graso puede ser fácilmente cambiada por las condiciones de cristalización o

interesterificación (De Man & Beers, 1987) (Heertje, van Eendenburg, & al., 1988) (Marangoni A. , Structure-function analysis of edible fats, 2012) . Varios de estos estudios sobre la microestructura de redes cristalinas de sistemas grasos describen cualitativamente como las condiciones de proceso cambian el tamaño y la morfología de los aglomerados de cristales y las propiedades reológicas del sistema graso, a destacar se encuentran los estudios de Van den tempel (Van Den Tempel, 1979) quien propuso que la microestructura de redes grasas cristalinas tiene un efecto considerable sobre las propiedades reológicas macroscópicas de la red.

También, De Man y Beers (De Man & Beers, 1987) enriquecieron más el conocimiento del efecto de la microestructura sobre la dureza macroscópica, examinando grasa de leche. Otros investigadores han demostrado la importancia de la microestructura en la reología de redes cristalinas de grasas y el hecho que estas pueden ser modificadas cambiando las condiciones de procesamiento de cristalización, así como con interesterificación (Marangoni & Rousseau, 1996) (Small, 1966) (deMan & deMan, 2002).

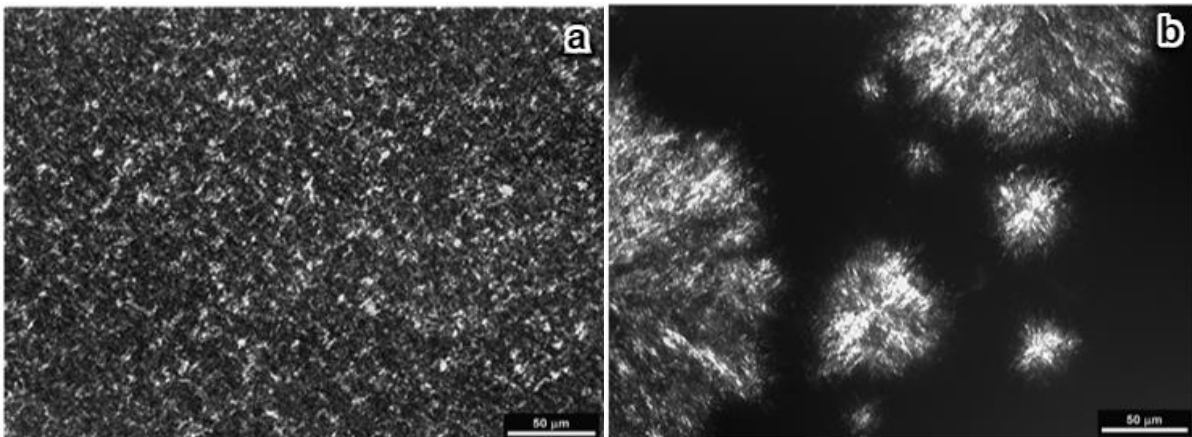
Trabajos previos en el campo han determinado también la influencia de diferentes variables tales como la temperatura, el polimorfismo, la composición química y el contenido de sólidos (SFC) sobre la forma y el tamaño de los aglomerados (clusters) de cristales. (Awad, Rogers, & Marangoni, 2004), (Heertje, Leunis, Van Zeyl, & Berends, 1987) (Herrera & Hartel, 2000) (Marangoni & Rousseau, 1996) (Martini, Herrera, & Hartel, 2002).

Las técnicas utilizadas para visualizar redes cristalinas de grasas son variadas, pero la más ampliamente usada es la microscopía por luz polarizada. Al ser los cristales de grasas divergentes, ellos parecen brillar entre dos filtros polarizadores, así como el aceite líquido permanece oscuro, siendo esta técnica, una herramienta de alto valor para estudiar la relación entre microestructura, condiciones de procesamiento y propiedades físicas en grasas (Ver *Figura 1.b*)

a) *Relación entre la microestructura y su dinámica de cristalización*

Las condiciones de cristalización para un sistema graso influirán en la forma en que se desarrollan los cristales, las tasas de nucleación y de crecimiento, por ende, su microestructura, y según su microestructura, serán las propiedades físicas finales de éste.

Por ejemplo, para una grasa de leche cristalizada a altos grados de supercooling o supersaturación, se esperaría una diferencia de energía de nucleación baja y una tasa de nucleación más alta, así llevando a la formación de un gran número de centros de nucleación a la temperatura de fusión, obteniendo nucleación instantánea. Así, la tasa de crecimiento sería alta, teniendo como resultado final una microestructura granular compuesta por un gran número de pequeños cristales, lo cual se representa en la *Figura 2.A* (Christian, 1965).



**Figura 2:** Micrografías de grasa de leche cristalizada isotérmicamente a 5°C (A) y a 25°C.

Por el otro lado, para grasa de leche cristalizada a bajos grados de supercooling, se esperarían mayores diferencias de energía de nucleación y bajas tasas de nucleación, así llevando a la formación de un bajo número de centros de nucleación (nucleación esporádica) y a una baja tasa de crecimiento cristalino. Esto finalmente llevaría a la formación de “clusters” en la microestructura, compuesta por un pequeño número de cristales grandes (*Figura 2.B*).

*b) Caracterización de la microestructura de un sistema graso por dimensiones fractales*

Un objeto fractal se define como aquel que exhibe una estructura similar no importa el nivel de magnificación utilizado (Narine & Marangoni, 1999b).

Otra característica importante de los objetos fractales es que las propiedades específicas de estos, son proporcionales a su tamaño en escala de dimensiones.

Se ha comprobado que los sistemas grasos presentan propiedades fractales en su microestructura, lo que ha demostrado ser muy útil, ya que un solo número puede dar información sobre la complejidad de la geometría de una estructura, en este caso, información sobre la estructura del sistema graso y de la red cristalina que lo compone (Vreeker, Hoekstra, den Boer, & Agertof, 1992).

Se han estudiado varias técnicas para determinar una dimensión fractal en redes cristalinas de grasas, tales como dispersión de luz a fracciones de grasa sólida muy bajas, (Vreeker, Hoekstra, den Boer, & Agertof, 1992) reología de baja deformación (Marangoni & Rousseau, 1996) y microscopia de luz polarizada (Narine & Marangoni, 1999b), siendo esta última la más utilizada.

Mediante tratamiento de datos de las imágenes obtenidas por un microscopio óptico de luz polarizada, las microscopías proveen el valor de la dimensión fractal e información sobre como el espacio es ocupado.

Este valor de dimensión fractal será más bajo si hay más espacios vacíos en la red cristalina y será más alto si los espacios se encuentran más uniformemente ocupados, por lo que los valores de dimensión fractal obtenidos permiten cuantificar en un número, el tipo de organización estructural que posee un sistema graso (Marangoni A. , 2005).

### **4.3 Caracterización de estructura química de sistemas grasos utilizados**

#### **4.3.1 Grasas y *hardstocks***

El desempeño de las grasas en productos alimenticios depende de sus características físicas, incluyendo punto de fusión, de cristalización y polimorfismo, las que son determinadas por la composición química de las grasas, sin duda alguna, principalmente por sus triacilgliceroles (TAG) (Timms, 1984).

Según su composición química, las grasas y aceites son preferidas en ciertos productos alimenticios. Muchos productos alimenticios sólidos conteniendo grasas y/o aceites, por ejemplo, productos de grasas para horneado o “shortenings” y margarinas, requieren mezclas específicas de grasas y aceites para obtener las características deseadas. El componente de grasa (en estado sólido a temperatura ambiente) es referida como grasa de partida dura, o simplemente “hardstock”, y es ampliamente utilizado en industria mezclado con aceites vegetales para crear productos alimenticios finales que a temperatura ambiente se mantengan sólidos, para obtener texturas que gusten al consumidor final y sin el uso de grasas de origen animal (Yang, 1988).

Las características deseadas de un material hardstock son:

- Punto de fusión alto (generalmente entre 35 y 70°C)
- Capacidad de formar un producto con una textura moldeable cuando es mezclado con los aceites deseados
- Obtener una matriz estable de aceite/grasa a temperatura ambiente, con una estructura cristalina específica.

Con el fin de que los estudios realizados en este proyecto sean de interés industrial es que se ocuparán hardstocks comúnmente usados en industria, tales como Aceite de soya full hidrogenado y estearina de palma.

Los hardstocks se mezclan con aceites vegetales para dar la matriz grasa del producto alimenticio, en el estudio se ocuparán dos aceites vegetales, Aceite de

soya y aceite de girasol alto oleico, a continuación, se revisarán algunos aspectos en su composición química y propiedades.

#### **4.3.2 Aceite de soya**

Este es el aceite más usado para freír en el mundo y el segundo aceite vegetal más producido después del aceite de palma (Dijkstra, 2016).

Se caracteriza por una composición alta en ácidos grasos del tipo poli-insaturado, siendo ácido linoleico (C18:2) el más alto con un 56.6% en composición, seguido por ácido palmítico (C16:0) y linolénico (C18:3) (*Tabla 1*).

Según el uso final del aceite, el aceite puede ser sometido a procesos de modificación (hidrogenación, interesterificación o fraccionamiento), como es el caso para aceites utilizados en margarinas, donde generalmente es hidrogenado.

El punto de fusión encontrado en literatura del aceite de soya sin hidrogenar es cercano a los -16 °C (Nor Hayati, Che Man, Tan, & Aini, 2009), y su punto de fusión aumenta hasta los 69°C cuando es hidrogenado, ya que sus TAGs insaturados, pasan a ser en su mayoría ácido esteárico (C18:0) siendo sólido a temperatura ambiente (Kellens, 2000). Esto es relevante ya que en este estudio se utilizaron ambos, el aceite de soya sin hidrogenar y el completamente hidrogenado, por lo que es necesario notar claramente las diferencias entre uno y otro, ya que su composición química cambia importantemente.

La mezcla entre aceites y hardstocks, logra productos alimenticios con mejores perfiles grasos y estabilidad en almacenamiento, siendo el aceite de soya uno de los más utilizados como fase líquida en productos alimenticios (Dijkstra, 2016)

#### **4.3.3 Aceite de girasol alto oleico**

En el aceite de girasol no modificado, los ácidos grasos predominantes son el ácido linoleico (62-70%) y el ácido oleico (15-25%), sin embargo, semillas modificadas de girasol permiten hoy en día la producción de aceite de girasol alto oleico, donde el contenido de ácido linoleico desciende a un 2-17% y el oleico aumenta a un 75-91%, aumentando su estabilidad, con una menor velocidad de oxidación por su

menor contenido de ácidos grasos poli insaturados (Ángeles, Dobarganes, Ruiz-Mendez, & Mancha, 2003).

Este aceite es principalmente utilizado como aderezo de ensaladas y como aceite de cocina.

Ácido graso	Hardstock		Aceite	
	PS <sup>a</sup>	FHSO <sup>b</sup>	SO <sup>b,c</sup>	HOSFO <sup>d,e,f</sup>
<b>C12:0</b>	0.1-0.3			
<b>C14:0</b>	1.1-1.7	0.12		
<b>C16:0</b>	49.8-68.1	11.5	8.00-13.30	3.8-5
<b>C16:1</b>		0		
<b>C18:0</b>	3.9-5.6	86.62	2.40-5.40	3.8-4.1
<b>C18:1</b>	20.4-34.4	0.11	17.70-26.10	80.2-88
<b>C18:2</b>	5.0-8.9	0.18	49.80-57.10	3-9.5
<b>C18:3</b>	0.1-0.5	0	5.50-9.50	0-0.3
<b>C20:0</b>	0.3-0.6	0.74	<0.5	0-0.4
<b>C20:1</b>		0	<0.4	
<b>C22:0</b>		0.53	<0.6	0.9-1.1
<b>C24:0</b>		0.19	<0.4	
<b>SFA</b>	<b>55.2-76.3</b>	<b>99.7</b>	<b>10.4-20.6</b>	<b>8.5-10.6</b>
<b>MUFA</b>	<b>20.4-34.4</b>	<b>0.11</b>	<b>17.7-26.1</b>	<b>80.2-88</b>
<b>PUFA</b>	<b>5.1-9.4</b>	<b>0.18</b>	<b>55.3-66.6</b>	<b>3.0-9.8</b>

**Tabla 1:** Composición de ácidos grasos de aceites a utilizar en investigación. SFA: Ácidos grasos saturados, MUFA: Ácidos grasos mono insaturados. PUFA: Ácidos grasos poli insaturados. Fuentes: a) (Lung, 1990), b) (Ribeiro, Grimaldi, Gioielli, & Gonçalves, 2009) c) (Nor Hayati, Che Man, Tan, & Aini, 2009), d) (Ángeles, Dobarganes, Ruiz-Mendez, & Mancha, 2003), e) (Salas, Bootello, & Garcés, 2015), f) (Gunstone, Harwood, & Dijkstra, 2007).

Su punto de fusión se encuentra entre -15 y -17 °C y depende de la variedad utilizada y de su perfil de ácidos grasos.

En productos industriales, el aceite de girasol alto oleico toma un valor extra cuando es usado como fuente de ácido oleico en margarinas y productos para horneado (shortenings), como ingrediente en formulaciones para niños y bebés, las cuales



requieren estabilidad, sabores suaves y una composición específica de ácidos grasos, que este aceite satisface completamente. Además, su alta estabilidad oxidativa y perfil de ácidos grasos es de alto valor para la industria cosmética y farmacéutica (Sánchez-Muniz, Bastida, & Benedí, 2016).

#### **4.3.4 Estearina de palma**

La estearina de palma es un hardstock obtenido por fraccionamiento en seco de aceite de palma refinado, blanqueado y desodorizado (Costales-Rodríguez, Gibon, & Verhé, 2009).

Su perfil de ácidos grasos muestra un alto contenido de ácido palmítico (49,8-68,1%), por lo que su punto de fusión es bastante alto, cual se acerca a los 51,85 °C (Lung, 1990).

Se ha mostrado también, que la nucleación de estearina de palma es cinéticamente más favorecida que la nucleación en aceite de palma, lo que ocurre debido a que se necesita un tiempo menor de inducción (Lung, 1990), también mejora la tolerancia a altas temperaturas, la morfología de la red cristalina y la estabilidad. Debido a estas características y a su amplio uso en la industria, es que también será utilizada como hardstock en este estudio.

#### **4.4 Cristalización de aceites en la Industria**

Debido a la complejidad molecular de los triacilglicéridos y lo determinante de sus propiedades físicas en las condiciones de cristalización, se requieren profundos conocimientos sobre la cristalización de aceites para optimizar los procesos industriales.

Así, las propiedades funcionales de un sistema alimenticio asociadas con el uso de aceites vegetales (por ejemplo, características organolépticas, untabilidad, textura, estabilidad de emulsión) dependerán de: la capacidad de los TAGs en el aceite para desarrollar una fase sólida, su perfil de temperatura de fusión/cristalización, tipo de polimorfismo y organización fractal del TAG cristalizado en el aceite según las

condiciones de tiempo y temperatura, siendo estas últimas enfatizadas, debido a que la organización de los TAGs es un proceso termodinámico (Larsson, 1994).

A nivel industrial, la cristalización de aceites se utiliza en innumerables procesos, tales como: la producción de chocolates, mantequillas, margarinas, productos de pastelería, golosinas y entre otros.

Debido a la complejidad de los sistemas grasos, la Industria ocupa la cristalización de TAGs como un proceso para:

- Eliminar pequeñas cantidades de compuestos de alto punto de fusión desde un aceite para mejorar su apariencia y atracción visual al consumidor a ambientes de baja temperatura (por ejemplo, winterización).
- Obtener fracciones de TAG desde aceites o grasas a través de un proceso conocido como fraccionamiento
- Modificar la textura de sistemas alimenticios (Toro-Vazquez, Dibildox-Alvarado, Herrera-Coronado, & Charo-Alonso, 2001).

## **5. Hipótesis**

El estado dinámico de un sistema graso es influenciado directamente por la supersaturación y la viscosidad. La construcción de perfiles cristalinos considerando estas dos variables, en gráficos de trayectoria de fases, representará cualitativamente el estado final del sistema.

## **6. Objetivos**

### **6.1. Objetivo General**

Estudiar la relación entre el comportamiento de cristalización de tres sistemas grasos y sus diagramas de trayectoria de fases, construidos en base a modelo que considera variación del potencial químico de supersaturación y viscosidad, como las variables que definirán estructura final del sistema graso.

### **6.2. Objetivos específicos**

- Obtener los perfiles de cristalización de tres diferentes sistemas grasos por análisis del contenido de sólidos y comportamiento térmico, a diferentes tasas de enfriamiento.
- Analizar los perfiles de viscosidad-temperatura obtenidos para cada sistema graso.
- Caracterizar la microestructura final obtenida (polimorfismo e imágenes de los cristales formados).
- Analizar dinámica de cristalización mediante la construcción de gráficos de trayectoria de fases con los datos de perfiles de viscosidad y perfiles de cristalización.
- Relacionar resultados de la estructura final obtenida, la dinámica de cristalización del sistema graso y los gráficos de trayectoria de fase construidos.

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1 Materiales:

Tres sistemas fueron estudiados:

- 1) Estearina de palma (*Palm Oil Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur, Malaysia*) en aceite de soya (*Bunge Canada, Toronto, Canadá*) (PS-SO).
- 2) Aceite de soya full hidrogenado (FHSO) (*Bunge Canada, Toronto, Canadá*) en aceite de girasol alto oleico (HOSFO) (*Acatris, Toronto, Canada*).
- 3) Aceite de soya full hidrogenado (FHSO) en aceite de soya (SO).

#### 7.1.1 Preparación de Muestras

Las muestras fueron preparadas usando las siguientes proporciones:

- 40-60% de estearina de palma en aceite de soya.
- 20-80% de full hidrogenado de aceite de soya en aceite de girasol alto oleico
- 20-80%, de full hidrogenado de aceite de soya en aceite de soya.

La preparación de muestras fue realizada en vasos precipitados de 100 ml, mediante masaje en balanza electrónica. El tratamiento posterior de las muestras dependió del análisis a realizar.

### 7.2 Metodología de trabajo:

#### 7.2.1 Contenido de solidos (SFC)

Las muestras fueron fundidas a 80°C durante 15 minutos en una incubadora (*Echoterm In30, Torrey Pines Scientific, USA*) para borrar cualquier memoria cristalina. Luego, en triplicado, aproximadamente 3.0 gramos de cada muestra fundida fueron introducidas por pipeta en tubos de vidrio para espectroscopia de resonancia magnética nuclear ( $\varnothing=10.00$  mm, 1.0 mm de espesor y 180 mm de altura) según método *Cd IGb-93* desarrollado por la "American Oil Chemists' Society" (AOCS, 1993).

Dos tasas de enfriamiento fueron utilizadas, una tasa de enfriamiento rápida ( $\sim\Delta T=30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) fue alcanzada utilizando baños de agua (Fisher Scientific, USA), siendo agua el medio de enfriamiento y una tasa de enfriamiento lento ( $\sim\Delta T=5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) fue alcanzada usando una incubadora (Echoterm In30, Torrey Pines Scientific, USA), siendo aire el medio de enfriamiento.

La temperatura a la cual el sistema fue cristalizado es la temperatura a la que fue dejado constante el medio de enfriamiento.

Esta temperatura se eligió dependiendo del sistema, según su variación en subenfriamiento, y después de realizar prueba y error de la forma de los gráficos de trayectoria de fases obtenidos (que se explican más adelante). Eligiendo como temperaturas: 20, 40 y  $30^{\circ}\text{C}$  para los sistemas 40/60% PS-SO, 20/80 FHSO-HOSFO y 20/80% FHSO-SO respectivamente.

Las lecturas de SFC fueron realizadas cada 40 segundos aproximadamente durante la primera hora y cada cinco minutos durante la segunda hora. Además, para determinar si hubo cambios en el contenido de sólidos a largo plazo, el contenido de sólidos fue medido cada 12 horas durante tres días de almacenamiento a la temperatura de cristalización del sistema.

Las medidas del contenido de sólidos fueron tomadas en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear de Bruker Corp, 20 MHz (0.47 T) mq 20 series bench-top (Bruker Corp., Milton, ON, Canadá). Siendo esta técnica ampliamente utilizada para medición de sólidos en sistemas grasos (Putte & Enden, 1973), siguiendo el método *Cd I Gb-93* desarrollado por la “American Oil Chemists' Society” (AOCS, 1993).

Junto con la medición del contenido de sólidos se efectuó la medición de temperatura del sistema graso, las cuales fueron medidas cada dos segundos en otro tubo de NMR (espectroscopia de resonancia magnética nuclear) con una termocupla dentro de la muestra, este tubo fue apartado de las muestras en análisis y sólo utilizado para medir la temperatura de la muestra en el medio de enfriamiento. Cabe destacar que, para poder correlacionar la temperatura de la muestra en este

tubo con la temperatura de las muestras en el triplicado, el tubo de medición de temperatura fue sacado del medio de calentamiento en los mismos intervalos en los que los tubos de muestras fueron sacados del medio de enfriamiento.

### **7.2.2 Punto de fusión y de cristalización mediante Calorimetría diferencial de barrido**

El comportamiento térmico para cada muestra fue estudiado con el uso del instrumento de Calorimetría diferencial de barrido (DSC) Mettler DSC 1 STARe System (Mettler Toledo, Mississauga, ON).

Cada muestra fue pesada dentro de un portador de aluminio, considerando que la muestra pese entre 5 y 10 miligramos, sus pesos fueron registrados. Se siguió el procedimiento elaborado por Rodrigo Campos para DSC (Campos R. , 2005).

Los experimentos fueron conducidos usando una tasa de enfriamiento y calentamiento de  $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  con un flujo de nitrógeno de  $20\text{ ml min}^{-1}$ , primero incrementando la temperatura hasta  $80^{\circ}\text{C}$  para obtener el perfil de calentamiento y subsecuentemente enfriando la muestra hasta  $-10^{\circ}\text{C}$  para obtener el perfil de cristalización.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante integración de los termogramas para obtener las temperaturas de fusión y de cristalización de los sistemas estudiados, usando el programa Stare Software v8.0.1 (Mettler Toledo, Mississauga, ON).

### **7.2.3 Tipo de polimorfismo**

El tipo de polimorfismo de las muestras fue determinado mediante el uso del difractómetro de rayos X Rigaku multiflex (Rigaku, Japan).

Las mismas muestras usadas para construir el perfil de cristalización en la medición de sólidos grasos fueron utilizadas para la determinación del polimorfismo obtenido, para asegurar que el polimorfismo determinado corresponde a las muestras cristalizadas bajo las mismas condiciones.

La platina de muestra fue precalentada a la temperatura a la cual se dejaron las muestras cristalizar (específica para cada muestra), una vez precalentada, se colocó la muestra del sistema graso en la platina de manera que la muestra ocupó todos los espacios de la platina sin sobrepasar la altura de esta, ya que esto llevaría a ángulos erróneos de difracción de los rayos X en la muestra (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010).

Durante el análisis se usó un sistema de control de temperatura, conformado por una placa acoplada debajo de la platina con la muestra, que está conectada a un baño térmico.

Las temperaturas utilizadas en el control térmico fueron de 20, 30 o 40°C para 40/60% PS-SO, 20/80% FHSO-SO y 20/80% FHSO-HOSFO respectivamente. Medidas fueron tomadas en triplicado siguiendo el método ya descrito por Dra. Peyronel (Peyronel, 2010).

Los datos recopilados, entregan la distancia entre los dos diferentes planos atómicos de la subcelda según la teoría “Powder” versus la intensidad recibida, cuyos resultados fueron comparados con la data de Souza (Souza, deMan, & J.M., 1990), que indican las distancias características para cada estructura polimórfica, siendo de 4,2 y 3,8 Å para la forma  $\beta'$  y 4,6 Å para la forma  $\beta$ .

#### **7.2.4 Viscosidad dinámica**

Esta propiedad reológica fue determinada mediante el uso del reómetro Anton Paar MCR302 (Anton Paar, Saint Laurent, QC), equipado con una unidad de control de temperatura y un módulo de medición de viscosidad de cilindros concéntricos CC17/T200/AL (Anton Paar, Saint Laurent, QC).

Curvas de viscosidad fueron construidas con intervalos de medición de temperatura de 5°C a través de una tasa de enfriamiento descendente desde 80°C hasta la temperatura en la cual la muestra será puesta a cristalizar, las cuales son 20, 30 y 40°C para PS-SO, FHSO-HOSFO y FHSO-SO respectivamente.



Para las muestras analizadas, las concentraciones de grasa sólida (hardstocks) fueron de 0% (asumiendo que la totalidad del hardstock fue disuelto en el aceite). También fueron analizadas muestras de aceite con un porcentaje de grasa sólida igual al porcentaje de sólidos disueltos en el aceite en equilibrio, determinado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sólidos en disolución} = \% \text{ Sólidos totales del hardstock (SFC}_{neat}) - \% \text{ Sólidos del sistema en equilibrio (SFC}_{max}) \quad (\text{Ec.5})$$

Para cada medición, la muestra se mantuvo a la misma temperatura durante al menos 10 minutos antes de medir viscosidad. Todas las medidas fueron tomadas a una tasa de agitación de 100 s<sup>-1</sup>.

Los resultados de viscosidad de ambos aceites utilizados (aceite de soya y aceite de girasol alto oleico), fueron usados para construir las trayectorias de fase.

Además, una curva de viscosidad fue determinada para 13% PS-SO, 8,7% FHSO-HOSFO and 5% FHSO-SO, donde cada valor corresponde a SFC ~ 0%, indicando que el porcentaje de Hard-stock estaba completamente disuelto en el aceite.

### **7.2.5 Diferencia de potencial químico de supersaturación**

Debido a que los sistemas grasos utilizados en este estudio están compuestos cada uno de dos familias de TAGs notoriamente diferentes, es que se utilizará el modelo de Cristalización en solución, de la recopilación en los estudios de *Rousset*, de seis modelos que describen el comportamiento de nucleación y crecimiento, sujetos a diferentes teorías cinéticas (Rousset P. , 2002).

Este modelo considera al sistema graso como dos componentes separados que son inmiscibles en el estado sólido. Los TAGs con el punto de fusión más bajo componen la solución, y los TAGs con el punto de fusión más alto son considerados el soluto (Rousset P. , 2002).

Como ya se mencionó en los antecedentes, en este trabajo de investigación se utiliza el enfoque de la supersaturación como la fuerza motriz de la cristalización de los sistemas grasos estudiados.

En condiciones de supersaturación, fue propuesto por *Dr. Marangoni*, que el estado físico-químico de un sistema graso podría estar definido por la ecuación 6 (Marangoni A. , 2012) :

$$\Delta\mu_{ss} = RT \ln\left(\frac{c_i}{c_i^*}\right) = RT \ln(\beta_i) \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura del sistema (en este estudio, la temperatura a la cual el sistema está siendo cristalizado) y  $\beta_i$  es el coeficiente de solubilidad, dado por la relación entre la solubilidad del sistema a un tiempo y temperatura específica ( $c_i$ ) y la solubilidad a la condición de supersaturación ( $c_i^*$ ).

Como se ha indicado anteriormente, la supersaturación es la fuerza impulsora de la cristalización del sistema graso, y está definida en la *ecuación 6* por el logaritmo natural del coeficiente de solubilidad.

Debido a que la solubilidad de cualquier sustancia es medida como la máxima concentración de solutos que pueden ser disueltos en un solvente específico a cierta temperatura (Rogers & Stovall, 2000),  $c_i$  podría ser representado por el contenido puro de sólidos del “hard-stock” (el cual es constante), menos el contenido de sólidos medido con respecto al estado dinámico del sistema (tiempo-temperatura).

El factor  $c_i^*$  representa la solubilidad del “hard-stock” en el aceite a la condición final de supersaturación, el cual será definido por el contenido puro de sólidos ( $SFC_{neat}$ ) menos el máximo contenido de sólidos alcanzado durante la cristalización ( $SFC_{max,sol}$ ).

Quedando finalmente el coeficiente de solubilidad representado por:

$$\beta_i(T, t) = \frac{[c_i(T, t)]}{[c_i^*]} = \frac{x \cdot SFC_{neat} - SFC_{sol}^{T(t)}}{x \cdot SFC_{neat} - SFC_{max,sol}} \quad (\text{Ec.7})$$

Para alcanzar cristalización, el valor de  $[c_i(T, t)]$  debe ser siempre mayor al valor de  $[c_i^*]$ .

### **7.2.6 Microscopía de luz polarizada**

Microscopía de luz polarizada fue utilizada como método para obtener imágenes de las redes de cristales formadas por los sistemas grasos al nivel microestructural (0.5-200  $\mu\text{m}$ ), y posteriormente, las imágenes fueron analizadas cuantitativamente con el uso de dimensiones fractales.

Las muestras son calentadas hasta 80°C por 15 minutos, junto con sus respectivas platinas para microscopía, los cubreobjetos y una pipeta pasteur. Inmediatamente retiradas las muestras de la incubadora, usando la pipeta mencionada anteriormente, se añadió una gota (10 $\mu\text{L}$ ) sobre las platinas de microscopía pre calentada platina de microscopía y finalmente los respectivos cubreobjetos puestos cuidadosamente encima de las muestras.

Con el fin de replicar el perfil de cristalización realizado para las muestras en el análisis de contenido de sólidos se ocupó un plato de calentamiento/enfriamiento de platinas para microscopía, *TPP 93 programador de temperaturas LTS-350 hot/cold Linkham stage* (LinkamScientific Instruments Ltd. Surrey, England) para mantener el perfil de temperaturas que las muestras mostraron en el análisis de contenido de sólidos.

Este programador de temperaturas fue colocado inmediatamente debajo de los objetivos de lectura de un microscopio Leica (CTR DM RXA2 con cámara digital Hammamatsu C11440) y utilizado a través de un software computacional (Volocity software © v6.3, Germany).

Durante cristalización de las muestras, imágenes fueron capturadas cada 5 minutos usando microscopía de campo claro y magnificación de x10. Después de dos horas de análisis para cada muestra, éstas, fueron almacenadas a las temperaturas finales de equilibrio (20, 30 o 40°C según la muestra utilizada).

Luego de una semana de almacenamiento, se tomaron nuevamente imágenes, esta vez usando microscopía de luz polarizada a diferentes magnificaciones (x20 y x40), las cuales fueron utilizadas para los resultados de caracterización de micro

estructura, en este estudio. Cabe destacar se siguieron recomendaciones de metodología de este análisis, según literatura (Abramowitz et al, 2005).

### **7.2.7 Dimensiones fractales (Conteo por cajas)**

Este método está basado en el conteo del número de cristales dentro de “cajas” cuadradas de radio creciente  $R$ , creadas con un software sobre las imágenes obtenidas con microscopía de luz polarizada y apropiadamente modificadas con un “threshold”, que permite separar a los cristales (en blanco) y el aceite líquido (en negro). Cada caja “ $i$ ” da un  $N_i$  número de microestructuras (Ver Anexo 2).

Un sistema es fractal cuando su estructura se repite a diferentes escalas, entonces un gráfico del logaritmo de  $N_i$  versus el logaritmo de  $R_i$  debería dar una línea recta. La pendiente de la regresión corresponde al valor de la dimensión fractal 2-D de la estructura, llamado “ $D_b$ ”.

El software Benoit 1.3 (Truesoft Int'l, St. Petersburg, FL, USA, [www.trusoft-international.com](http://www.trusoft-international.com)) fue usado para determinar la dimensión fractal 2-D.

El propósito del “Thresholding” es convertir las imágenes obtenidas en escala de grises en imágenes binarias (en sólo blanco y negro). Esta técnica, junto con el equilibrio de las imágenes, fue realizada con el software Adobe Photoshop v10.0 (Adobe System Incorporated). El nivel de threshold utilizado fue el cual permitió se viera más similar a la imagen original polarizada.

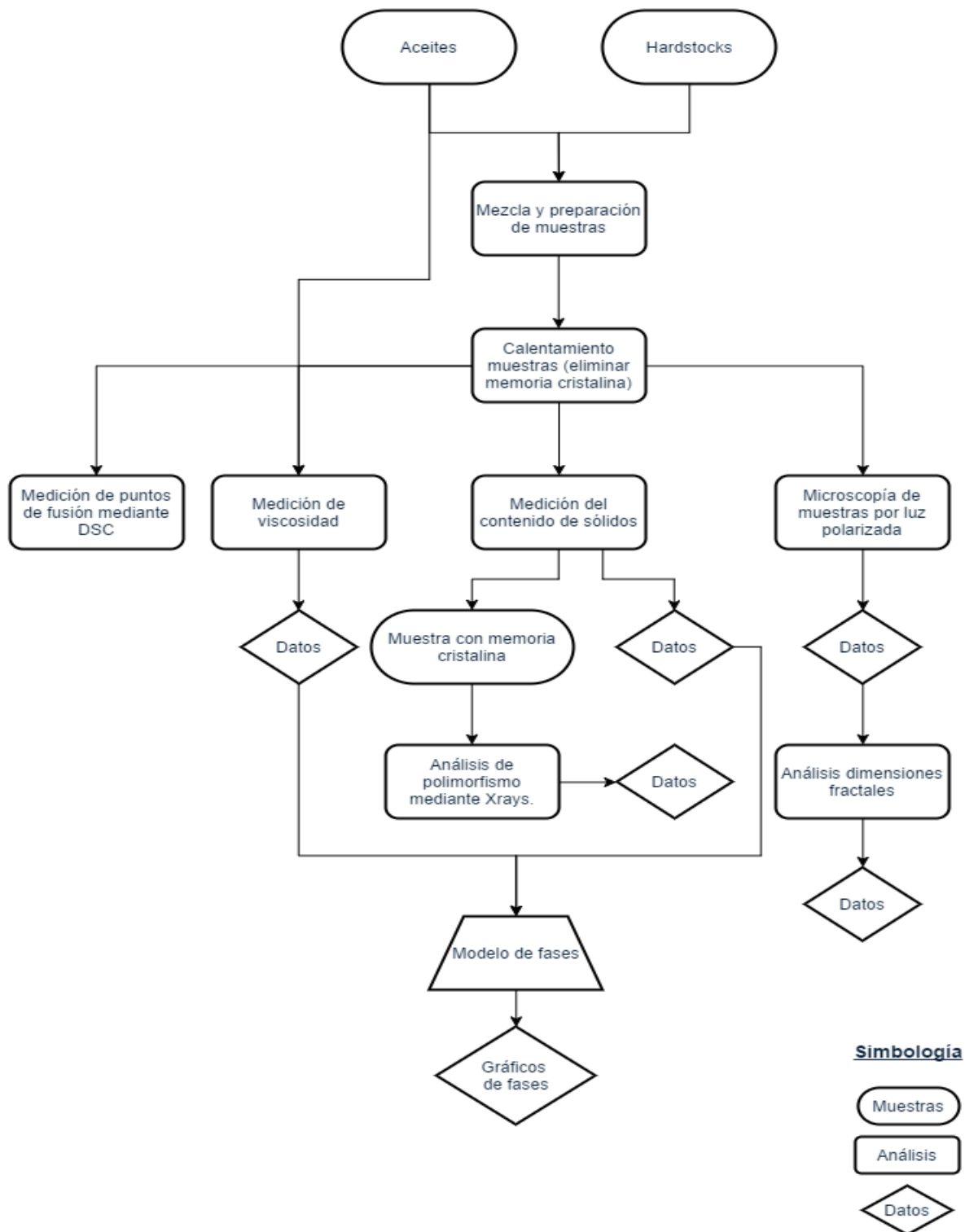
### **7.2.8 Análisis estadísticos**

El test estadístico de ANOVA de una vía fue utilizado para determinar diferencias significativas entre los resultados obtenidos. El software utilizado fue GraphPad Prism versión 5 para Windows (Prism GraphPad, 2003).

Diferencias entre los promedios fueron consideradas significativas para un  $p$ -valor < 0.05. Todos los datos son calculados con un promedio de a lo menos dos replicados.

## 8. Diagrama de Bloques de Metodología

El siguiente diagrama presenta las etapas de la metodología aplicada para la obtención de datos del presente trabajo de investigación



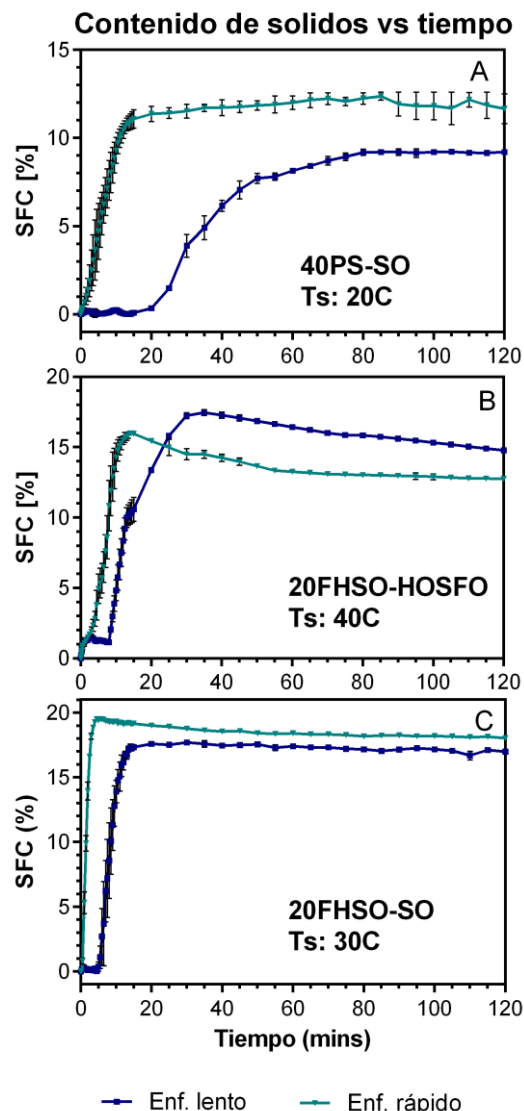
## 9. Resultados

### 9.1 Perfiles del desarrollo de solidos

Los resultados del contenido de solidos (SFC) versus el tiempo de cristalización para cada muestra fueron comparados con su tasa de enfriamiento rápida y lenta según muestra *Figura 3*, y las temperaturas de las tasas de enfriamiento tabuladas en *Tabla 1*.

Las temperaturas de enfriamiento de cada sistema graso ( $T_s$ ), fueron elegidas de acuerdo a una diferencia de 10 o 20 grados menos que su temperatura de fusión, debido a que ya a estas temperaturas las muestras inician rápidamente cristalización y aún se permite obtener una óptima resolución de los datos obtenidos (Herrera, Gatti, & Hartel, 1999), (Toro-Vazquez et al, 2001).

Al observar *Figura 3* se notan diferencias significativas en el perfil de SFC obtenido en un sistema para cada tasa. Además, se observa que la forma de las curvas es similar para las mismas tasas de enfriamiento. Estos resultados eran esperables y han sido observados en previas investigaciones, que demuestran que la diferencia en la rapidez de la transferencia de calor entre el medio de calentamiento y la muestra, (y por ende la tasa de disminución de la temperatura del sistema graso), es crucial en el desarrollo de sólidos (Campos, Narine, & Marangoni, 2002), (Rousset P. , 2002).



**Figura 3:** Curvas de contenido de solidos (SFC) versus perfil de temperaturas para los sistemas grasos 40% PS-SO (A), 80%FHSO-SO (B) y 80% FHSO-HOSFO (C) usando dos diferentes tasas de enfriamiento.

Las tasas de enfriamiento para cada sistema se muestran en la Tabla 2, se observa de esta que los sistemas con FHSO como grasa dura (hardstock) presentaron tasas similares.

El instantáneo desarrollo de cristales observado en la *Figura 3* para enfriamiento rápido, se explica debido a que se alcanza rápidamente una temperatura menor al punto de fusión, organizándose así, los TAGs en estructuras menos estables que requieren bajas energías de activación, lo que permite el desarrollo casi instantáneo de cristales en un crecimiento que parece ser lineal hasta llegar a un máximo (Grotenhuis, van Aken, van Malssen, & Schenk, 1999).

Por el contrario, para el enfriamiento lento, se obtuvieron tiempos de inducción, estos son resultado de una tasa de nucleación más lenta, ya que, al usar una tasa de enfriamiento más lenta, a nivel molecular la difusión de los TAGs es más lenta también. Esto permite a los TAGs organizarse en estructuras más estables, con cinéticas más lentas de cristalización, resultando en un menor número de cristales y de mayor tamaño, lo que se observa más adelante, en la *Figura 9* (Toro-Vazquez, Dibildox-Alvarado, Herrera-Coronado, & Charo-Alonso, 2001).

	PS-SO	FHSO-HOSFO	FHSO-SO
Temperatura del medio (°C)	20	40	30
Tasa Enf rápido (°C/min)	25,5	18,5	19,5
Tasa Enf. lento (°C/min)	5,6	2,3	2,5

**Tabla 2:** Temperaturas de cristalización de medios de enfriamiento (incubadora y baño de agua) y tasas de enfriamiento.

Estudios han demostrado que cuando la fuerza motriz de la cristalización es alta (tasas de enfriamiento más rápidas o mayores supersaturaciones), la tasa de nucleación aumenta debido a que menores energías libres de nucleación se tienen que alcanzar, siendo así los tiempos de inducción menores y resultando en una nucleación instantánea (Campos, Narine, & Marangoni, 2002) (Wright, Hartel, Narine, & Marangoni, 2000).

Es muy importante de destacar que los tiempos de inducción y subsecuentemente las tasas de nucleación, son resultado de un aumento en la viscosidad en un efecto combinado con la supersaturación y la tasa de enfriamiento utilizada, que determinan la magnitud del tiempo de inducción, como lo muestran los estudios de Toro (Toro-Vazquez et al, 2001).

Durante la cristalización, aquellos TAGs con puntos de fusión medios-altos son los que inician la nucleación y el desarrollo de cristales, ya que tienen una mayor diferencia en el potencial de supersaturación, y son rápidamente cristalizados, desarrollándose los primeros sólidos dentro de la fase líquida.

Así, el rápido aumento en el SFC, resulta en un rápido aumento en la viscosidad y por ende una progresiva disminución en la transferencia de masa, limitando finalmente la difusión, hasta llegar a un peak máximo alcanzado varios minutos antes que para la tasa de enfriamiento lenta. (Toro-Vazquez, Dibildox-Alvarado, Herrera-Coronado, & Charo-Alonso, 2001).

Se observa también que todos los sistemas llegan a un máximo de SFC el cual varía levemente hasta el equilibrio. Este “plateau” es común de ver en curvas de SFC para sistemas grasos, teniendo en este punto, la concentración más alta de sólidos (Herrera, Gatti, & Hartel, 1999).

El tipo de curvas obtenidas es de tipo sigmoide para la tasa de enfriamiento lenta, excepto para el sistema con HOSFO como fase líquida (Fig.4B), cuya curva tiene dos fases, una de crecimiento lineal y luego de forma sigmoide como en los otros dos sistemas.

Es interesante observar que, para dos de los tres sistemas investigados, se obtuvo un mayor contenido de sólidos al usar la tasa de enfriamiento rápida en vez de la lenta, exceptuando el sistema FHSO-HOSFO. Esto se explica debido a cambios en la microestructura obtenida según la temperatura y viscosidad del sistema graso. Cuando la tasa de cristalización es rápida, los TAGs se organizan en cristales más pequeños, obteniéndose un mayor número de cristales. Al ser los cristales más pequeños, estos logran adsorber más grasa líquida en la superficie, llevando a



menos grasa líquida en la fase continua y resultando así en lecturas más altas de contenido de sólidos (Boudreau & Saint Amant, 1985).

En cuanto a las diferencias obtenidas entre los sistemas grasos utilizados, es difícil comparar entre estos, debido a que cada sistema tiene una composición química diferente (Ver *tabla 1*), con una alta cantidad de componentes, lo que hace a los sistemas grasos, sistemas complejos.

A simple vista en *Figura 3*, se puede observar que los tiempos de inducción de ambas tasas de enfriamiento para el sistema PS-SO son menores que para los otros dos sistemas, esto se explica debido a que el tiempo de inducción de la cristalización de un sistema graso está directamente relacionado con su complejidad en estructura química (Ng, 1990).

Los resultados mostraron que muestras hechas con FHSO respondieron llegando al contenido de equilibrio de sólidos en los primeros 120 minutos de cristalización, comparado con el estado de equilibrio obtenido después de casi 3 días de almacenamiento, esto se debe a que el contenido total de sólidos de las muestras eran el mismo de un 20%p/p de Hardstock. Sin embargo, cabe destacar que el contenido de sólidos máximo y final alcanzado es mayor para el sistema FHSO-SO en ambas tasas de enfriamiento, obteniendo una diferencia en el SFC final de 5 puntos para la tasa de enfriamiento rápida. Esto coincide con literatura, que indica que diferencias de temperatura de subenfriamiento (supercooling) mayores, implican en mayor contenido de sólidos (Ver *Tabla 3*) (Herrera & Hartel, 2000)

La diferencia en el valor de SFC máximo obtenido según la tasa de enfriamiento usada se hace mucho mayor para el sistema graso 40% PS-SO que, para los otros sistemas, el cual mantiene una diferencia de 2 puntos en el contenido de sólidos, incluso después de dos días de almacenamiento. Asumimos que esto no pasó para el sistema graso 40% PS-SO debido al perfil más complejo de ácidos grasos y sus característicos tiempos de cristalización más largos para la estearina de palma (Lung, 1990).

A excepción de los sistemas con SO como fase líquida, el sistema graso FHSO-HOSFO presenta una curva de contenido de sólidos diferente a la obtenida para los otros sistemas.

Donde, para la tasa de enfriamiento lenta se observan dos pasos en la curva, primero, un crecimiento igual de sólidos con el enfriamiento rápido hasta un 1% aproximadamente y luego presenta una curva de tipo sigmoide, mantenido el 1% de SFC hasta el minuto 7 donde continúa el desarrollo de sólidos.

Es interesante notar también que, para este sistema, alcanzados 25 minutos de cristalización, el SFC para el enfriamiento lento supera el SFC para la tasa rápida, y se mantiene mayor durante todo el experimento, acercándose hasta una diferencia de apenas 1 punto en el contenido de sólidos en equilibrio.

Este comportamiento es diferente al observado en los otros sistemas, donde se observa siempre un contenido menor de sólidos para la tasa lenta.

Las diferencias obtenidas para este sistema, asumimos se deben al tener un potencial de subenfriamiento distinto al obtenido para los otros sistemas, el cual es 10 puntos menor que para los sistemas con FHSO (*Tabla 3*). Esto sugiere la existencia de diferentes mecanismos de cristalización dependiendo del grado de supercooling. Estos resultados concuerdan con *Peyronel et al* (Peyronel, Pink, & Marangoni, 2014) que habían mostrado diferencias en la microestructura obtenida por agregación de nanoplatelas de cristales cuando la tasa de enfriamiento 1 °C/min fue usada en vez de 30 °C/min en cristalización de 20% tri estearina en trioleina tristearin in triolein.

Cambios adicionales en los cristales pueden ocurrir mediante recristalización, dando origen a cristales meta estables mediante transformaciones en el polimorfismo de estos (Boistelle, 1998). Es por esto que se dio un tiempo de 3 días para observar si hubo recristalización alguna, habiendo para todos los sistemas cambios solamente pequeños en el SFC.

Las transformaciones ocurridas una vez cristalizado el aceite tomarán lugar siempre en la dirección de mayor estabilidad (Campos, Narine, & Marangoni, 2002), por lo que se sugiere que los cambios ocurridos las siguientes horas permitieron obtener estructuras más estables.

Los resultados obtenidos en el contenido de sólidos fueron utilizados en la en las *Ecuaciones 4 y 5* para obtener los cambios en el potencial de supersaturación y la elaboración de los gráficos en relación a la viscosidad mostrados más adelante.

## 9.2 Termogramas por Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

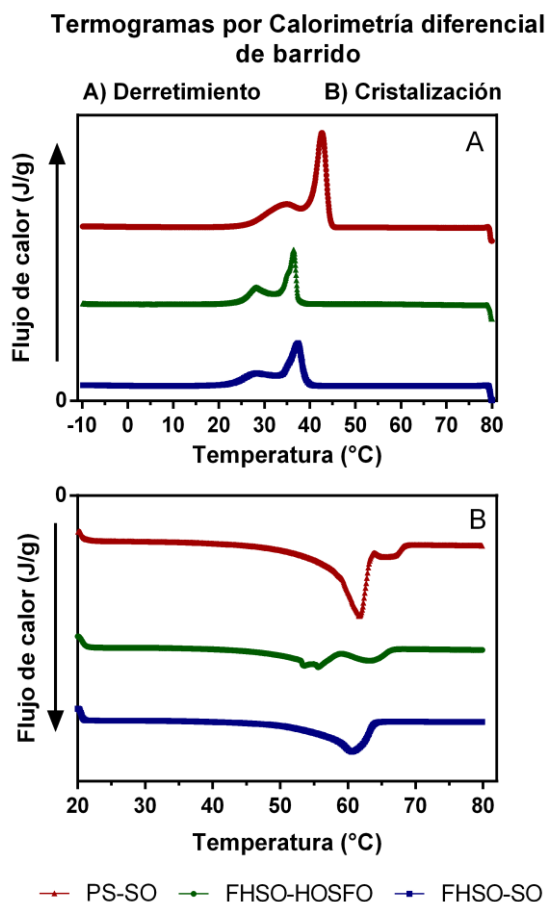
La *Figura 4* muestra el comportamiento térmico de cada muestra estudiada.

Observando los termogramas de fusión (Fig. 4.A), se puede notar de derecha a izquierda que para los tres sistemas grasos analizados se notan dos peaks, esto indica la presencia de dos fracciones.

El primer peak identifica a los TAGs de menor punto de fusión (Lung, 1990), es decir, aquellos triacilglicéridos que al calentar las grasas, se derriten primero. El segundo peak identifica a los TAGs de mayor punto de fusión.

Este estudio de comportamiento térmico permite identificar las temperaturas de fusión ( $T_f$ ) y de Cristalización ( $T_c$ ) de los sistemas grasos analizados, mediante la integración de las áreas bajo los peaks de fusión.

Las temperaturas de fusión obtenidas fueron usadas para definir las temperaturas a las cuales se cristalizarán los sistemas grasos, es decir, la temperatura a la que se encontrará el sistema de enfriamiento (incubadora o baño de agua) para cada sistema, definida en este trabajo como  $T_s$  y presentadas en *Tabla 3*.



**Figura 4:** Termogramas de cristalización (A) y derretimiento (B) para los sistemas grasos 40/60% PS-SO, 20/80% FHSO-HOSFO y 20/80% FHSO-SO. Tasas de enfriamiento y de calentamiento de 5°C/min. El máximo error fue de menos que un 0.1%.

Debido a que un objetivo de este trabajo de investigación es analizar y discutir diagramas que logren mostrar el comportamiento de cristalización de cada sistema graso, se utilizaron las temperaturas de fusión de estos para así con este dato obtener las diferencias de subenfriamiento (introducidas en Ecuación 2).

Utilizando diferencias de subenfriamientos similares, se esperan comportamientos de cristalización similares (reflejado después en los gráficos de fases), siendo la diferencia de subenfriamiento la fuerza motriz de la cristalización al igual que la diferencia en supersaturación (Rousset P. , 2002).

Los resultados mencionados pueden ser observados en *Tabla 3*, donde el subenfriamiento resultante fue de 24.76, 14.16 y 24.78 °C para 40/60% PS-SO, 20/80% FHSO-HOSFO y 20/80% FHSO-SO respectivamente.

Sistema	Supercooling (Tf-Ts) [°C]	Ts [°C]	Temperatura de Derretimiento Tf [°C]	Temperatura de Cristalización [°C]
40/60 PS-SO	24.76	20	44.76± 6.38	19.63±0.3
20/80 FHSO-HOSFO	14.16	40	54.16± 2.22	37.39±0.1
20/80 FHSO-SO	24.78	30	54.78± 3.49	39.13±0.2

**Tabla 3.** Temperaturas de Cristalización y fusión (Onset y peak) para los sistemas grasos 40/60% PS-SO, 20/80% FHSO-SO y 20/80% FHSO-HOSFO. Las tasas de enfriamiento y calentamiento fueron de 5°C/min para todas las muestras.

Se puede notar en la tabla 3, que el segundo sistema correspondiente a 20/80% FHSO-HOSFO tiene un supercooling diferente al de las otras dos muestras. Esto se debe a que, al cristalizar este sistema graso a temperaturas de Ts menores, se obtenían curvas de contenido de sólidos de muy baja resolución, es decir, el sistema cristalizaba muy rápido para incluso la tasa de enfriamiento lenta.

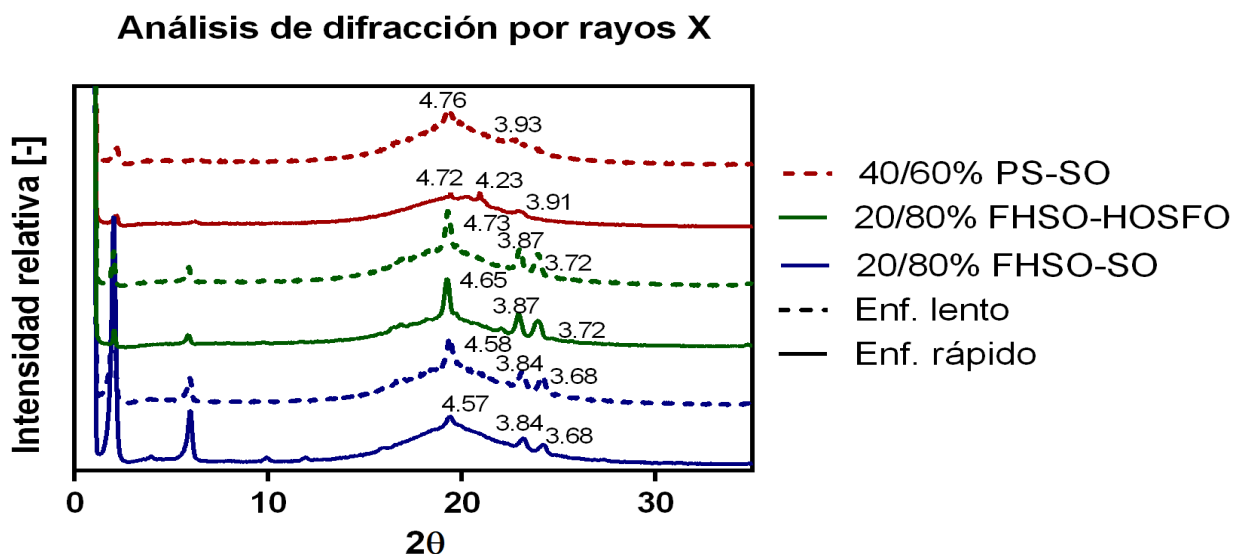
Al presentar este sistema un patrón de cristalización similar a los otros dos sistemas, a una temperatura de cristalización escogida (Ts) de 40°C, se decidió mantener esta temperatura, obteniendo un subenfriamiento 10 grados menor que para los otros dos sistemas.

### 9.3 Tipo de polimorfismo

Los cristales en un sistema graso, una vez formados, pueden tener diferentes formas, llamados “habititos cristalinos” o morfologías del cristal.

Son referidos como sólidos polimórficos, aquellos sólidos que, siendo de la misma composición química, pueden existir en más de una geometría estructural. De acuerdo con estudios previos, existen tres estados polimórficos que predominan en un sistema graso, estos son en creciente orden de estabilidad termodinámica,  $\alpha$ ,  $\beta'$  y  $\beta$  (deMan & deMan, 2002). La diferencia en el desarrollo de los cristales, entre aquellos cristales en un estado estable y otros en un estado de menor estabilidad termodinámica (metaestables) se influencia en el tipo de polimorfismo desarrollado y este dependerá de las condiciones de cristalización, especialmente en la fuerza motriz de esta (Akoh & Min, 2002). La supersaturación disminuye a medida que los cristales crecen, y esta reducida supersaturación resulta en un requerimiento de estabilidad para los cristales más grandes, debido a que los cristales bajo un cierto tamaño crítico, retornarán a la solución en estado líquido. El polimorfismo de cada sistema graso estudiado, fue analizado en equilibrio, para caracterizar el estado final de estos.

En la *Figura 5* se muestran los patrones de intensidad detectada por difracción de rayos X en las muestras de los tres sistemas grasos estudiados, donde  $2\theta$  es



**Figura 5:** Espectro de rayos X mostrando los picos de intensidad observados para los sistemas grasos 40/60% PS-SO, 20/80% FHSO-SO y 20/80% FHSO-HOSFO.

dos veces el ángulo entre el rayo incidente en la muestra y el rayo refractado, la intensidad relativa es la intensidad de la señal obtenida y los valores sobre los peaks son las distancias interplanares de los cristales formados obtenidas según Ley de Bragg, que establece que dos ondas están en fase si las longitudes de las trayectorias difieren en cualquier múltiplo de la longitud de la onda (Ver Anexo X) (Campos R. , 2005).

Al observar Figura 5, es interesante observar la obtención de un polimorfismo  $\beta'$  para el sistema 40/60% PS-SO al ocupar la tasa de enfriamiento rápida, y uno  $\beta$  al ocupar la lenta, ya que literatura indica que un sistema compuesto por estearina de palma y aceite de soya alcanzan un estado polimórfico estable en  $\beta$  (Hong Yap, deMan, & deMan, 1989).

De acuerdo a Metin y Gartel (Metin & Hartel, 2005), junto a Kloeck y colaboradores (Kloek, Walstra, & van Vliet, 2000), la persistencia de cristales  $\beta'$  en casos donde la estabilización es preferencialmente  $\beta$ , probablemente resulta de la formación de cristales mixtos, es decir, por la formación de cristales de diferentes microestructuras, los cuales podrían haber sido favorecidos por la composición de la mezcla y por la tasa de enfriamiento usada, especialmente si la tasa de enfriamiento usada fue rápida.

Marangoni y McGauley (McGauley & Marangoni, 2002) respaldan esto y agregan dos factores que se relacionan con este fenómeno: la configuración desfavorable de moléculas de TAGs resultantes de una nucleación rápida o el rápido incremento de viscosidad, lo cual limita transferencia de calor y masa y dificulta la organización molecular. Por lo tanto, la presencia de cristales  $\beta'$  puede estar asociada a la rápida cristalización ocupada para este sistema y su composición molecular de la mezcla PS-SO.

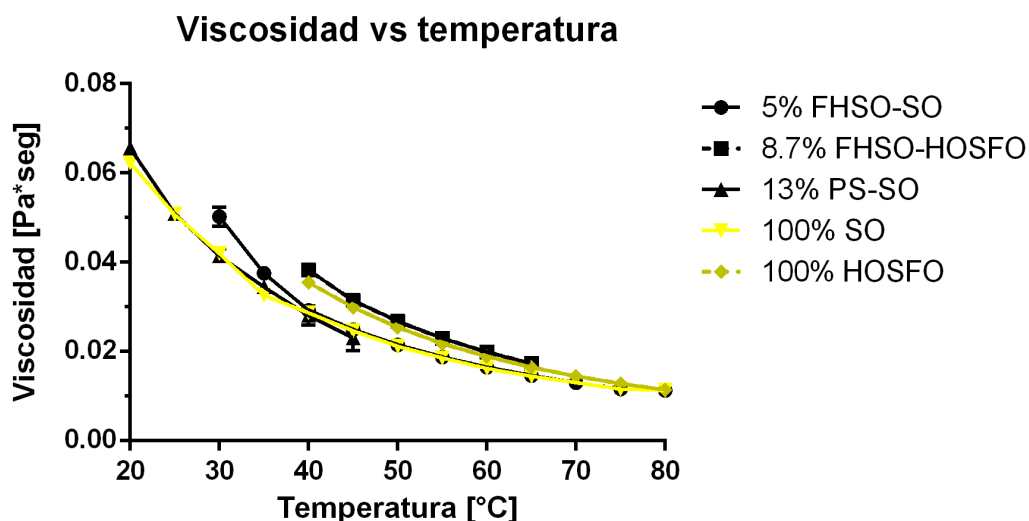
En espectros de difracción por rayos X como la Figura 5, son varios los factores que afectan la intensidad de un determinado peak. Algunos de estos son intrínsecos al material en estudio, y algunos son peculiares a la forma en que se monta la muestra en el difractómetro, por lo que se procuró una orientación aleatoria al montar la muestra (Peyronel, Pink, & Marangoni, 2014).

Para el sistema PS-SO se obtuvieron menores intensidades en los peaks resultantes, lo cual se fundamenta con su bajo contenido de sólidos en comparación a las otras muestras, ya que un mayor contenido de sólidos está relacionado con una mayor intensidad de señal detectada (Hong Yap, deMan, & deMan, 1989).

Mezclas de FHSO-SO y FHSO-HOSFO tienen conocida tendencia a cristalizar en el polimorfismo “betha” ( $\beta$ ), que es el más estable. Esto, asociado con la baja diversidad de composición en ácidos grasos y relativa similitud de su composición en TAGs, lo cual se observa en los resultados obtenidos. (Wiederman, 1978) (Gunstone, Harwood, & Dijkstra, 2007).

#### 9.4 Viscosidad de los sistemas grasos

En aceites vegetales la viscosidad decrece de manera exponencial al aumentar la temperatura, este comportamiento se observa para todos los sistemas grasos en la *Figura 6*.



**Figura 7:** Viscosidad vs temperatura para los aceites 5% FHSO-SO, 8,7% FHSO-HOSFO, 13% PS-SO, 100% SO y 100% HOSFO.

Las viscosidades obtenidas en la *Figura 6* corresponden a la viscosidad de los aceites (en amarillo) y la viscosidad de los tres sistemas grasos usados en el estudio con una concentración igual al contenido de sólidos disuelto en el aceite al alcanzar el equilibrio.

Estas concentraciones fueron obtenidas a partir de la resta entre el contenido puro de sólidos (SFCneat) y el contenido máximo de sólidos (SFCmax) según *Ecuación 5* y observados en *Tabla 4*.

Se puede observar que estos resultados confirman lo que muestran estudios previos (Santos, Santos, & Souza, 2005), (Small, 1966), (Gunstone, Harwood, & Dijkstra, 2007) que apoyan que la viscosidad del aceite en un sistema graso en cristalización va a ser similar a aquella del aceite más los cristales desarrollados, es decir, del sistema graso completo cristalizando.

Esto indica también, que los cristales disueltos en el aceite no resultan en un aumento en la viscosidad del sistema graso, lo que permite utilizar los datos de viscosidad del aceite de soya y del aceite de girasol alto oleico para el desarrollo de los gráficos de trayectoria de fases (*Figura 8*).

La nucleación y el crecimiento de cristales en sistemas grasos está influenciado por muchos factores, entre ellos la composición molecular y todos aquellos involucrados en las condiciones de cristalización (temperatura, tasa de enfriamiento, difusión, agitación) (Santos, Santos, & Souza, 2005). Entre estos factores, el doctor A. Marangoni propone que la viscosidad, junto con la diferencia de potencial químico de supersaturación, son las variables que dominan la cristalización y por ende, la microestructura final obtenida y características funcionales, (Marangoni A, The phase space of fat crystallization, 2015).

Sistema	Concentración Hardstock [%p/p]	SFCneat [%]	Ts	SFCmax		SFC en solución [%]
				Enf. Rápido [%]	Enf. Lento [%]	
<b>PS-SO</b>	40	24.35	20°C	12.58	10.01	13,06
<b>FHSO- HOSFO</b>	20	19.84	40°C	10.98	11.36	8,67
<b>FHSO-SO</b>	20	19.84	30°C	16.44	15.36	3,94

**Tabla 4:** Contenido de sólidos del hard-stock y el máximo obtenido después de alcanzado el equilibrio.



Debido a que la difusión molecular y de aglomerados de cristales está relacionada fuertemente con la viscosidad (Rao, 1999), junto con que la agitación no afectará la viscosidad del medio líquido por ser un fluido newtoniano (Diamante & Lan, 2014) y agregando también que la viscosidad depende directamente de la temperatura (Abramovič & Klofutar, 1998), (Rao, 1999), es que en este trabajo se considera a la viscosidad como una variable que controla la cristalización.

Es interesante destacar que estudios previos realizados por Dr. Michael Ojovan y colaboradores, establecieron una relación entre la viscosidad, la temperatura y los parámetros termodinámicos de materiales cristalinos, pudiendo determinar estos parámetros cuantitativamente a través del modelo de Doremus (Ojovan, Travis, & Hand, 2007). Estos resultados fundamentan también el uso de la viscosidad como variable que influye en los cambios termodinámicos que involucran la cristalización de un sistema graso.

Cabe destacar, los datos de viscosidad, fueron utilizados para construir los gráficos de trayectorias de fase mostrados en *Figura 8*. Además mediciones de viscosidad se realizaron sólo para el rango de temperaturas en el cual cristalizaron los respectivos sistemas grasos.

### **9.5 Cinéticas de cristalización y trayectoria de fases.**

El comportamiento en la cristalización de un sistema graso puede ser explicado a través de sus diagramas de fase.

Y se vio que el papel de la viscosidad en la cristalización de un sistema graso y cómo el uso de este parámetro fácilmente medible puede darnos información de la dinámica de cristalización.

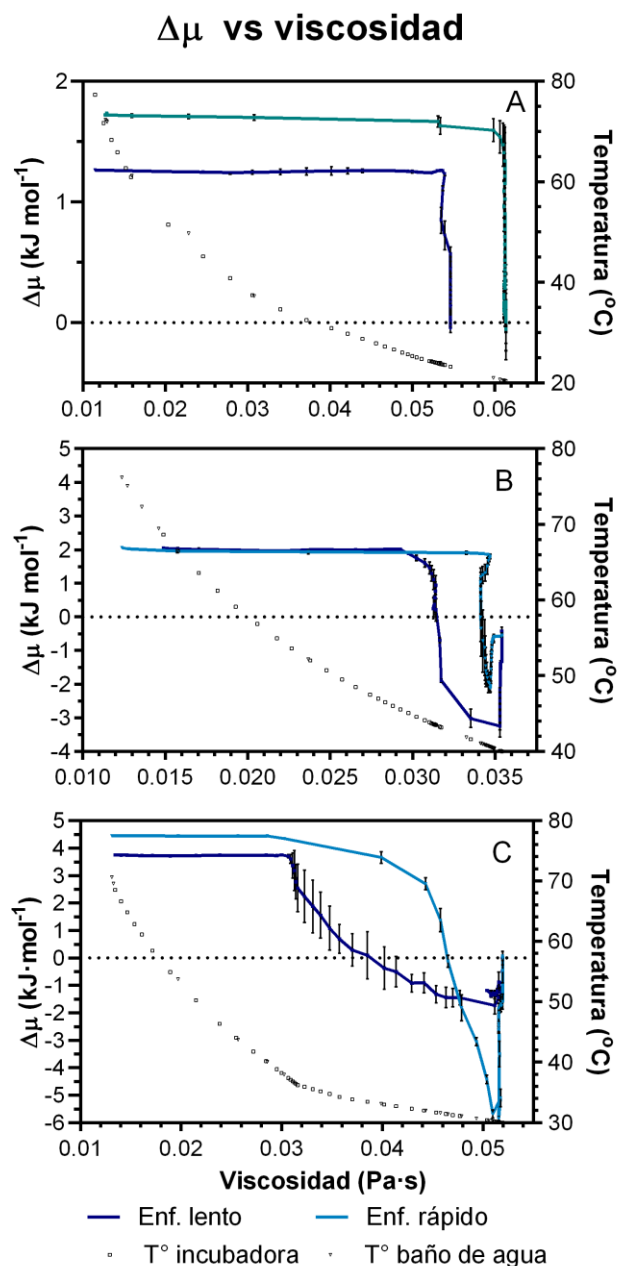
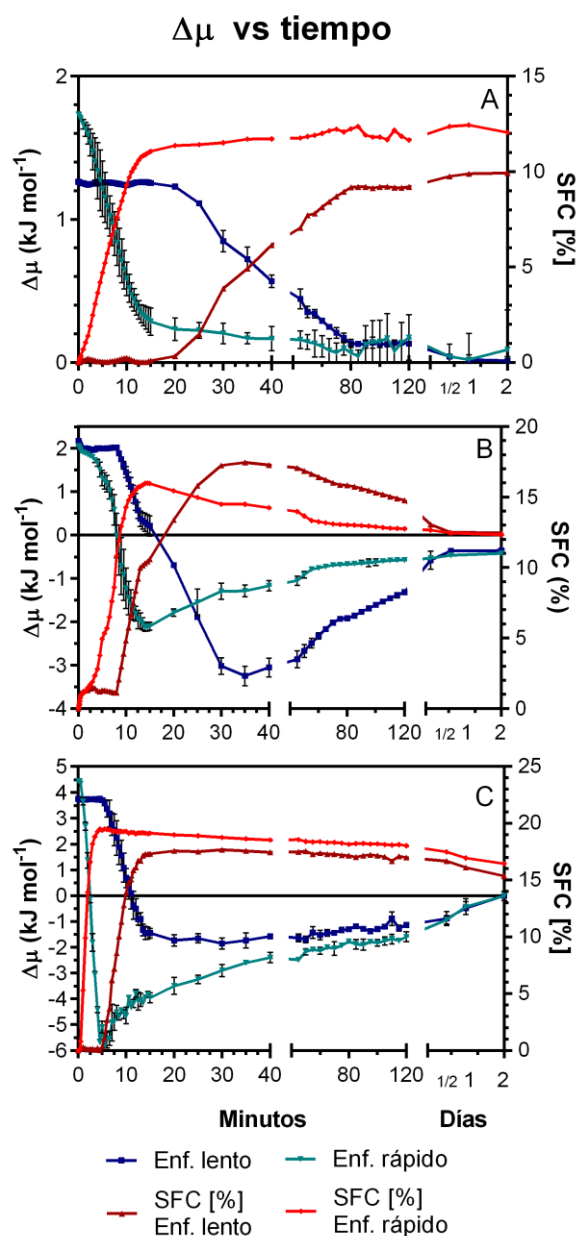
Si bien la viscosidad influye fuertemente en la difusión y el crecimiento cristalino, el sistema graso no cristalizará si no hay una diferencia en concentraciones entre el soluto (en nuestro caso, los TAGs con mayor punto de fusión, llamados “hardstock”) y el líquido (el aceite ocupado), lo cual en una solución es llamado la supersaturación, que es la fuerza motriz de la cristalización cuando un sistema

graso es estudiado como una solución de dos fases (Marangoni A. , The phase space of fat crystallization, 2015).

La supersaturación, obtenida a partir del contenido de sólidos de los sistemas grasos, según ecuaciones 4 y 5, permite la obtención del parámetro termodinámico de la diferencia de potencial químico de supersaturación.

Como se puede observar en las siguientes figuras, se propone que el estado dinámico de un sistema graso es influenciado directamente por la supersaturación

y la viscosidad. Estos resultados de diferencia de potencial fueron graficados con respecto al tiempo y con respecto a la viscosidad, observados en las *Figuras 8 y 9*, mostradas a continuación.



**Figura 8:** Cambio en el potencial químico de supersaturación versus el tiempo (min) para los sistemas grasos 40/60% PS-SO (A), 20/80% FHSO-HOSFO (B) y 20/80% FHSO-SO (C) en ambas tasas de enfriamiento.

**Figura 9:** Gráficos de fase (potencial químico vs viscosidad) para los sistemas grasos 40/60% PS-SO (A), 20/80% FHSO-HOSFO (B) y 20/80% FHSO-SO (C) en ambas tasas de enfriamiento.

La *Figura 8*, representa las cinéticas de cristalización de los tres sistemas grasos investigados, mostrando el cambio en el potencial químico de supersaturación a cada punto en el tiempo.

Cada valor de potencial químico, corresponde a una temperatura  $T$ , correlacionada a una viscosidad y un tiempo  $t$ .

El cambio en el potencial químico de supersaturación debe ser entendido como la energía disponible del sistema para cristalizar (Marangoni, et al., 2012), entonces una baja en el cambio de potencial químico significa una pérdida de energía del sistema, relacionado con un incremento en el contenido de sólidos. Esto se observa al comparar las curvas de contenido de sólidos extraídas de la *Figura 3* e introducidas en el segundo eje de la *Figura 8* con la diferencia en el potencial químico observada en el primer eje.

Se puede observar en la *Figura 9* que todos los sistemas comienzan con un cambio en el potencial químico de supersaturación positivo para tiempo cero, que varía según el sistema graso utilizado, entre +2 y +4 [kJoules/mol], este cambio en el potencial tiene un tiempo de inducción antes de disminuir para el enfriamiento lento, en cambio, para el enfriamiento rápido comienza a disminuir apenas comienza la cristalización.

Los tiempos de inducción observados para todos los sistemas grasos con la tasa de enfriamiento lenta, se justifican de acuerdo a las observaciones realizadas para el contenido de sólidos, que en resumen, son efecto de una mayor organización estructural de los TAG, provocando cinéticas más lentas en su cristalización (Toro-Vazquez, Dibildox-Alvarado, Herrera-Coronado, & Charo-Alonso, 2001). Además, al observar la *Figura 4*, se nota una relación inversamente proporcional al contenido de sólidos en el tiempo  $t$  con respecto al cambio, en el potencial químico obtenido en la *Figura 8*.

Cabe destacar, que el valor inicial en el cambio del potencial químico de supersaturación depende del contenido de sólidos puro (SFC<sub>neat</sub>) y del máximo en equilibrio (SFC<sub>max</sub>), los cuales varían según el hardstock y la tasa de enfriamiento

utilizados, respectivamente. Estos valores se observan en la *Tabla 4*. El potencial químico está determinado por la naturaleza de las sustancias y de los parámetros que caracterizan las condiciones de los alrededores del componente, y cómo se indicó anteriormente, el contenido de sólidos depende de los TAGs que lo componen (Toro-Vazquez, Dibildox-Alvarado, Herrera-Coronado, & Charo-Alonso, 2001) y las condiciones de cristalización (Campos, Narine, & Marangoni, 2002).

A partir de la misma *Tabla 4* se puede notar una diferencia de al menos 2 puntos en el contenido de sólidos máximos en equilibrio obtenido para el sistema FHSO-SO, en comparación con el sistema FHSO-HOSFO, teniendo ambos el mismo hardstock, pero un  $\Delta s_e$  diferente en 10 grados (*Tabla 4*), siendo menor para el sistema FHSO-HOSFO.

Estas diferencias explican un cambio en el potencial químico mayor para el sistema FHSO-SO, debido a que como se mencionó anteriormente, una mayor cercanía entre la temperatura del sistema y la temperatura de fusión del sistema graso, implica una mayor supersaturación del sistema, traducido en una mayor diferencia en el cambio en el potencial químico de supersaturación.

Si bien en *Figura 3* se observaba un peak en el contenido de sólidos para los sistemas grasos FHSO-HOSFO y FHSO-SO, en la *Figura 8* se observa un mínimo en el cambio del potencial químico de supersaturación. Este mínimo se pronuncia más aún en el enfriamiento rápido.

Se debe entender, que un cambio en el potencial químico de supersaturación negativo ( $\Delta\mu_{ss}$ ), nos indica que el sistema graso ha perdido toda su energía que promueve la cristalización del sistema graso, esto se debe a la menor diferencia en solubilidades entre la solubilidad al tiempo  $t$  y la solubilidad del sistema en equilibrio, junto a las limitaciones de una mayor viscosidad, resultantes en una menor difusión de los cristales a los centros de nucleación, con tasas de nucleación más bajas.

Este  $\Delta\mu_{ss}$  negativo ocurre a los pocos minutos de cristalización para los sistemas FHSO-HOSFO y FHSO-SO, mientras que para el sistema PS-SO, se mantiene positivo durante toda la cristalización.

Al analizar la *Ecuación 4*, se observa que un  $\Delta\mu_{ss}$  negativo es resultado de un contenido de sólidos al tiempo  $t$ , mayor al contenido de sólidos máximo alcanzado en equilibrio. Esto quiere decir que, alcanzado un peak en el contenido de sólidos, el cual para los sistemas FHSO-HOSFO y FHSO-SO es alcanzado en los primeros 20 minutos de cristalización, luego existe una disolución progresiva de cristales al medio líquido mientras se alcanza el equilibrio.

El  $\Delta\mu_{ss}$  evoluciona a medida que el crecimiento cristalino procede, y la fase líquida se vuelve menos supersaturada. Esta reducción en la supersaturación resulta en una estabilidad para los cristales más grandes, y los más pequeños, que en un principio se formaron en un estado metaestable (Fouber, Dewettinck, & Vanrolleghem, 2003), retornarán al estado líquido o a la solución, al no haber alcanzado el radio crítico requerido para su formación en un cristal estable (Marangoni A. , 2012), estos cristales solubilizados reflejan la disminución del contenido de sólidos y el aumento progresivo del cambio en el potencial químico de supersaturación hasta llegar a cero (Rousset P. , 2002).

Finalmente, una vez obtenido un  $\Delta\mu_{ss}$  igual a cero, indica que el sistema graso ha alcanzado el equilibrio, lo cual se traduce en una forma cristalina estable, un contenido de sólidos finales y una estructura definitiva a esas condiciones de presión y temperatura.

Si bien, las cinéticas de cristalización observadas en *Figura 8*, entregan información sobre cómo varía la fuerza motriz de la cristalización con respecto al tiempo para los diferentes sistemas y tasas de enfriamiento, esta figura no entrega información sobre la trayectoria de fase en cada punto de tiempo, en cambio, la *Figura 9* sí, al involucrar la viscosidad en el eje X, estando ésta relacionada a una temperatura y contenido de sólidos específico.

A diferencia de los estudios realizados por el Fisicoquímico Philippe Rousset, presentados en el capítulo “Modelando las cinéticas de cristalización de triacilglicérol”, quien presentó el modelamiento de triacilglicérol mediante una

trayectoria de Tiempo, Temperatura y Trayectoria, llamados, curvas de TTT, los gráficos mostrados en la *Figura 9*, involucran al tiempo no directamente en las curvas de trayectoria de fase, usando al cambio en el potencial químico de supersaturación y la viscosidad como aquellas variables que definirán la trayectoria de fase del sistema graso (Rousset P. , 2002) (Rousset & Rappaz, 1996) (Marangoni A. , 2015).

Cabe resaltar que la supersaturación es el parámetro más decisivo para los procesos de cristalización, esta muestra una tremenda influencia en los mecanismos ocurriendo durante el desarrollo de cristales, aglomeración, agregación, primera y secundaria nucleación (Löffelmann & Mersmann, 2002). Por lo que las características finales del sistema, como, morfología del cristal y distribución de los cristales del sistema graso, si pueden ser definidas mediante la medición y control de la supersaturación durante el completo proceso de cristalización.

La *Figura 9* muestra el cambio en el potencial químico de supersaturación de acuerdo al cambio en la viscosidad. Las curvas comienzan con una diferencia de potencial químico positiva la cual se mantiene casi recta a medida que la viscosidad del sistema disminuye para todos los sistemas y tasas de enfriamiento. Esto hasta un punto en el cual el cambio en el potencial químico decrece drásticamente. Este punto crítico, se puede entender como el punto en el cual el sistema pierde toda su energía, y esto ocurre a una viscosidad crítica, cuya viscosidad se propone, será característica de cada sistema, a las condiciones de cristalización aplicadas (tasa de enfriamiento, temperatura de cristalización del sistema, composición química de sus TAG).

Cabe recordar que cada punto de viscosidad está relacionado con un punto en el tiempo y una temperatura específica.

En el segundo eje de la *Figura 9*, esta graficada la temperatura, así se puede observar fácilmente a que temperatura, se alcanzó la viscosidad crítica en cada sistema.

Las viscosidades críticas observadas fueron tabuladas en la *Tabla 5*.

En base a los resultados obtenidos, se propone que este punto de cambio drástico en el potencial químico tiene que ver con la cantidad de grasa cristalizada a ese punto de tiempo y temperatura, donde a partir de ese punto, la alta viscosidad disminuye drásticamente la nucleación de los cristales, debido a una difusión más dificultada por la alta viscosidad.

Observando la *Figura 9* y la *Tabla 5*, se observa que la disminución en el cambio del potencial químico fue siempre a una mayor viscosidad para el enfriamiento rápido que para el lento. Una mayor viscosidad es obtenida para el enfriamiento rápido debido a la morfología de los cristales formados, los cuales son más pequeños y en mayor número (Toro-Vazquez, Dibildox-Alvarado, Herrera-Coronado, & Charo-Alonso, 2001), adsorbiendo mayor cantidad de grasa líquida en la superficie de estos, conllevando a un aumento en la viscosidad del medio líquido (Boudreau & Saint Amant, 1985), esto se relaciona con las discusiones de la *Figura 3* que muestran el cambio en el contenido de sólidos en el tiempo. Más análisis sobre las estructuras formadas es realizado en las próximas páginas.

<b>Sistema graso</b>	<b>Enfriamiento rápido</b>		<b>Enfriamiento lento</b>	
	Viscosidad crítica [Pa*s]	T° [°C]	Viscosidad crítica [Pa*s]	T° [°C]
40/60% PS-SO	0.060	20.5	0.053	23.72
20/80% FHSO-HOSFO	0.034	41	0.029	45.55
20/80% FHSO-SO	0.044	31.95	0.031	36.85

**Tabla 5:** Viscosidades críticas y sus temperaturas



Además, se observa en la *Figura 9*, que se alcanza un mínimo en el cambio en el potencial químico de supersaturación a cierta viscosidad, el cual es alcanzado muy cerca de la máxima viscosidad para todos los sistemas grasos y tasas de enfriamiento. En este mínimo, el sistema ha perdido todo su potencial de supersaturación. Mas estudios son necesarios para determinar si lo que lleva al cambio en el potencial químico de supersaturación a cero, es un reordenamiento en la estructura de los cristales formados, lo cual es lo que se propone en este estudio.

En base a las características presentadas para variable, se propone que el estado de nuestro sistema estará definido por estas dos variables, siendo la difusión inversamente proporcional a la viscosidad, y la supersaturación definida por el cambio en el potencial químico de supersaturación, sin embargo, más estudios son necesarios para observar si para una misma trayectoria de fase, se obtendrán mismas morfologías de cristales.

Con el fin de obtener información sobre los cristales desarrollados para cada trayectoria de fase, es que se caracterizó la microestructura de los cristales formados.

## **9.6 Microestructura y dimensiones fractales**

Como se ha indicado anteriormente, un sistema graso comestible es formado por una red grasa cristalina compleja jerarquizada en diferentes niveles de estructuras, desde los componentes moleculares (Triacilgliceroles), hasta conformar la grasa a granel (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010). La microestructura de un sistema graso puede variar desde 0.5 a 200  $\mu\text{m}$ , y tiene una enorme influencia sobre las propiedades macroscópicas de la red (De Man & Beers, 1987).

La observación visual proporciona información sobre la densidad, la morfología y la tasa de crecimiento de los granos, siempre que sean distintos y suficientemente grandes bajo el microscopio (Campos R. , 2005).

Los resultados para la microestructura de los cristales formados fueron obtenidos mediante microscopia por luz polarizada para los 3 sistemas estudiados a sus

respectivas tasas de enfriamiento, y se observan en la *Figura 10* a una magnificación de cuarenta veces (40x)

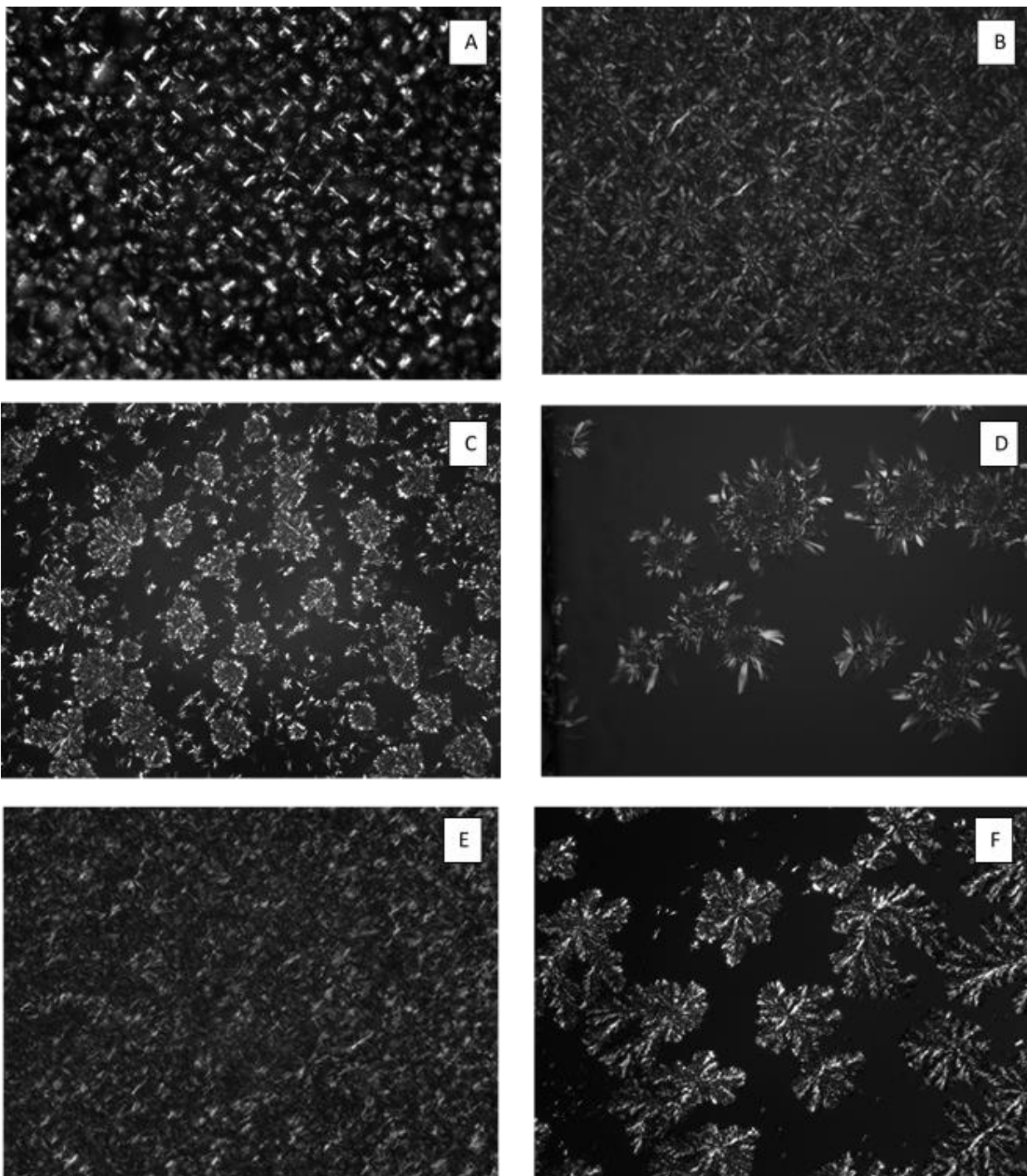
La forma de los cristales obtenidos para todas las muestras fueron esferulíticas, lo cual es normal al ocurrir con supersaturaciones sobre 0.5, lo cual es el caso para las tres muestras a ambas tasas de enfriamiento (Skoda & van der Tempel, 1967).

Una esferulita es un agregado hecho por muchas lamelas que crecen radialmente desde el mismo núcleo central (deMan & deMan, 2002). Cada una de estas lamelas pueden extenderse en ramas hacia fuera cuando el tamaño de las esferulitas incrementa, lo que ocurre al realizarse el enfriamiento lento. Moléculas líquidas son incorporadas perpendicularmente a estas lamelas, lo que también es observado en otros estudios (Boudreau & Saint Amant, 1985).

Para la tasa de enfriamiento rápida (Imágenes A, C y E de la *Figura 10*), las microestructuras obtenidas mostraron cristales más pequeños para todos los sistemas grasos. Por el contrario, para las tasas de enfriamiento lentas (Imágenes B, D y F de la *Figura 10*), los cristales fueron más grandes.

Como se ha indicado anteriormente, debido a que la transferencia de calor es mucho más rápida para la tasa de enfriamiento rápida, la nucleación toma lugar en un corto periodo de tiempo, con formación instantánea de un gran número de núcleos. Esta cristalización rápida es acompañada por un rápido incremento en viscosidad, así limitando difusión molecular y crecimiento cristalino (Dibildox-Alvarado & Toro-Vazquez, 1998), resultando en un gran número de cristales con un tamaño más pequeño.

Es interesante observar también, que al comparar el polimorfismo obtenido (*Figura 5*), se nota que para el sistema PS-SO en tasa de enfriamiento lenta, cuyo polimorfismo fue en  $\beta'$ , se obtuvo un mayor número de cristales que para los otros sistemas grasos, con una mayor ocupación de espacios vacíos.



**Figura 10:** Imágenes obtenidas por microscopía de luz polarizada para los sistemas grasos 40/60% PS-SO wb (A), in (B); 20/80% FHSO-HOSFO wb (C), in (D) y 20/80% FHSO-SO wb(E), in (F)

Observando la Figura 9 y 10 y comparando las viscosidades críticas obtenidas con las estructuras formadas en *tabla 5*, se nota que aquellos sistemas que obtuvieron una viscosidad crítica similar, obtuvieron cristales de formas similares. El análisis presentado es sólo cualitativo, pero se justifica con los valores de dimensión fractal obtenidos en Tabla 6.

Con el fin de cuantificar la distribución de los cristales en el espacio, se analizaron las imágenes, por medio de dimensiones fractales.

Las dimensiones fractales han sido usadas para la caracterización de la distribución espacial de masa en redes grasas cristalinas (Marangoni A. , 2005), bajos valores de dimensión fractal son indicativos de estructuras de baja densidad o más abiertas, por el otro lado, altos valores de dimensión fractal reflejan una estructura más abierta o de alta densidad (Ver Anexo 2).

Durante el análisis, se verificó que las imágenes estuvieran en la correcta magnificación, debido a que hay algunas escalas donde los aglomerados de grasa no son fractales. En el estudio, dos magnificaciones fueron usadas, x20 y x40, se mantuvo una relación similar para los valores de  $D_b$  entre enfriamiento lento y rápido para ambas magnificaciones, lo que indica que para estos sistemas grasos, los cristales fueron fractales no importando la magnificación usada.

Cabe destacar que las imágenes seleccionadas en Figura 10, fueron aquellas que tenían el valor de dimensión fractal más cercano al promedio calculado para cada sistema graso, este determinado mediante conteo por cajas ( $D_b$ )

Al observar Tabla 6, podemos notar que como las microestructuras obtenidas al utilizar una tasa de enfriamiento lenta tienen más espacios vacíos, es consistente que para esta tasa, se hayan obtenidos  $D_b$  más bajos que para la tasa de enfriamiento rápida, lo que se observa para los sistemas D y F.

		Magnificación				
		x40		x20		
	Ts (°C)	Enf. rápido	Enf. lento	Enf. rápido	Enf. lento	
40%PS-SO	20	<i>Db</i>	<b>1.79</b>	<b>1.82</b>	<b>1.72</b>	<b>1.77</b>
		<i>SD</i>	0.06	0.02	0.13	0.04
20%FHSO-HOSFO	40	<i>Db</i>	<b>1.69</b>	<b>1.57</b>	<b>1.77</b>	<b>1.66</b>
		<i>SD</i>	0.05	0.05	0.02	0.04
20%FHSO-SO	30	<i>Db</i>	<b>1.90</b>	<b>1.73</b>	<b>1.84</b>	<b>1.76</b>
		<i>SD</i>	0.03	0.03	0.05	0.04

**Tabla 6:** Dimensiones fractales y sus magnificaciones para dos diferentes tasas de enfriamiento.

Db: Dimensión fractal por conteo de cajas, SD: Desviación estándar

La similitud entre los valores de *Db* para el sistema 40-60% PS-SO (imágenes A y B), existe debido a que las microestructuras obtenidas para la tasa de enfriamiento lenta fueron similares a aquellas obtenidas para la tasa de enfriamiento rápida, sin mostrar diferencias significativas entre las muestras a las diferentes tasas de enfriamiento usadas. Cabe destacar que para este sistema, hubo una diferencia de polimorfismo, siendo  $\beta'$  para la tasa de enfriamiento rápida y  $\beta$  para el enfriamiento lento.

Cómo se ha visto en otros trabajos de investigación, una mejor correlación entre las imágenes obtenidas y los valores de dimensión fractal se puede obtener analizando los valores de dimensión fractal mediante análisis reológicos.

## 10. Conclusiones

La viscosidad y el cambio en el potencial químico de supersaturación, afectan directamente el estado termodinámico de un sistema graso y por lo tanto permiten analizar a través de gráficos de trayectoria de fases, las condiciones de cristalización del sistema graso.

La viscosidad del medio líquido es un parámetro que controla la difusión de cristales en la cristalización del sistema graso.

Los valores de dimensión fractal, son una buena herramienta para cuantificar el tipo de microestructura obtenida.

Los gráficos de trayectoria de fases son una excelente herramienta para en un solo gráfico, describir el comportamiento de cristalización, sin embargo, más estudios son necesarios para probar si a trayectorias de fase iguales, se obtendrá misma morfología.

## **11. Resultados futuros**

Estudios más profundos se deben realizar, específicamente, algún estudio donde se cambie la viscosidad de los sistemas afectando la nucleación, bajo las mismas temperaturas de cristalización y subenfriamiento, esperando obtener una microestructura diferente.

Sería interesante también, poder cambiar la viscosidad del aceite sin necesidad de cambiar composición, si no, cambiar la dinámica de enfriamiento del líquido, haciendo calzar su trayectoria de fase con alguna de las presentadas en este estudio. En este caso, son aplicables los conocimientos actuales en oleogeles, donde podría añadirse cierta cantidad de algún componente que aumente la viscosidad del medio líquido para desarrollar diagramas de trayectoria de fases similares a los obtenidos.

Actualmente, a la fecha de la publicación de esta memoria de título, el Laboratorio de Grasas y Aceites de la Universidad de Guelph, se encuentra trabajando en lo anteriormente señalado.

## **12. Nomenclatura**

Para facilitar la lectura se utilizarán las siguientes nomenclaturas:

FHSO: Aceite de soya Full Hidrogenado

PS: Estearina de palma

SO: Aceite de soya

HOSO: Aceite de girasol alto oleico

Hardstock: Grasa con altos puntos de fusión (sólida a temperatura ambiente)

TAGs: Triacilgliceroles

SFC: Contenido de solidos [%]

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

NMR: Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

PLM: Microscopía de luz polarizada

Db: Valor de dimensión fractal por conteo de cajas.

$\Delta\mu_{ss}$ : Variación en el potencial químico de supersaturación.



### 13. Bibliografía

- Abramovič, H., & Klofutar, C. (1998). The temperature dependence of dynamic viscosity for some vegetable oils. *Acta Chimica Slovenica*, Vol. 45, no. 1, pp. 69–77.
- Akoh, C. C., & Min, D. (2002). *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Ángeles, G., Dobarganes, M. C., Ruiz-Mendez, M. V., & Mancha, M. (2003). Chemical and physical properties of a sunflower oil with high levels of oleic and palmitic acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 130–137.
- AOCS. (1993). *American Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society, Direct Parallel NMR method (AOCS Cd I Gb-93 method, 2000)*. Champaign: AOCS Press.
- Ashim, K. (2002). *Biological and bioenvironmental Heat and Mass Transfer*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Awad, T., Rogers, M. A., & Marangoni, A. (2004). Scaling behavior of the elastic modulus in colloidal networks of fat crystals. *J Phys Chem*, 108, 171-179.
- Boistelle, R. (1998). Fundamentals of nucleation and crystal growth. En N. Garti, & K. Sato, *Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids* (págs. 189-226). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Boudreau, A., & Saint Amant, L. (1985). Butter. En J. Julien, J. Nadeau, & R. Dummais, *Dairy science and technology: principles and applications* (págs. 206-232). QC, Canada: La foundation de technologie laitiere du quebec.
- Campos, R. (2005). Experimental Methodology. En A. Marangoni, *Fat Crystal Networks* (págs. 307-314). New York: Marcel Dekker.
- Campos, R., Narine, S. S., & Marangoni, A. (2002). Effect of cooling rate on the structure and mechanical properties of milk fat and lard. *Food Res Int* 35, 971-981.
- Clarkson, C., & Malkin, T. (1934). Alternation in long-chain compounds II. An X-ray and thermal investigation of the triglycerides. *J Am Oil Chem Soc*, 666-671.
- Costales-Rodríguez, R., Gibon, V., & Verhé, R. W. (2009). Chemical and Enzymatic Interesterification of a Blend of Palm Stearin: Soybean Oil for Low trans-Margarine Formulation. *J Am Oil Chem Soc*, 681-697.
- David K. Yang, C. O. (1988). *United States Patente nº 4883684*.
- De Man, J., & Beers, A. (1987). Fat crystal networks: Structure and rheological properties. *J Text Stud*, 18, 303-318.
- deMan, J., & deMan, L. (2002). Texture of Fats. En A. Marangoni, & S. Narine, *Physical Properties of Lipids* (págs. 195-222). New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.

- Diamante, L. M., & Lan, T. (2014). Absolute Viscosities of Vegetable Oils at Different Temperatures and Shear Rate Range of 64.5 to 4835 s<sup>-1</sup>. *Journal of Food Processing*.
- Dibildox-Alvarado, E., & Toro-Vazquez, J. F. (1998). Evaluation of tripalmitin crystallization in sesame oil through a modified Avrami equation. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75., 73-76.
- Dijkstra, A. (2016). Soybean Oil. *Encyclopedia of Food and Health*.
- Fouber, I., Dewettinck, K., & Vanrolleghem, P. A. (2003). *Modelling of the crystallization kinetics of fats*. Ghent, Belgium.
- Garside, J. (1987). General Principles of Crystallization. En J. Blanshar, & L. A. Press, *Food Structure and Behavior* (págs. 35-49). London.
- Ghazani, S., & Marangoni, A. (2016). Healthy Fats and Oils. *Elsevier*.
- Grotenhuis, E., van Aken, G. A., van Malsen, K. F., & Schenk, H. (1999). Polymorphism of milk fat studied by differential scanning calorimetry and real-time X-ray powder diffraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, , 76, 1031–1039.
- Gunstone, F. (1997). Epoxidised oils. En F. Gunstone, & F. Padley, *Lipid Technologies and Applications*. New York: Marcel Dekker.
- Gunstone, F. D., Harwood, J. L., & Dijkstra, A. J. (2007). *The Lipid Handbook*. New Yor: CRC Press.
- Heertje, I., Leunis, M., Van Zeyl, W., & Berends, E. (1987). Product morphology of fatty products. *Food Microstru*, 6, 1-8.
- Heertje, I., van Eendenburg, J., & al., e. (1988). The effect of processing on some microstructural characteristics of fat spreads *Food Micro-structure*. 7:189-193.
- Herrera, M. I., & Hartel, R. W. (2000). Effect of processing conditions on crystallization kinetics of a milk fat model system. *J Am Oil Chem Soc*, 77, 1197–1204.
- Herrera, M., Gatti, M., & Hartel, R. (1999). A kinetic analysis of crystallization of a milk fat model system. *Food Res Int*, 32, 289–298.
- Herrera, M., M, G. T., & Hartel, R. (1999). A kinetic analysis of crystallization of a milk fat model system. *Food Res Int*, 32, 289–298.
- Hong Yap, P., deMan, J., & deMan, L. (1989). Polymorphism of Palm Oil and Pal Oil Products. *JAOCS*, 66, 5.
- JW, C. (1965). The theory of transformations in metals and alloys:. *London: Permagon*, 471-495.
- Kellens, M. (2000). Desarrollos en la Tecnología de Modificación de las Grasas. En A. A. Aceites, *Aceites y Grasas, Libro 10° Aniversario. Recopilación de Artículos Técnicos* (págs. 246-261). Argentina: Editorial Amalevi, 2000. Tomo II.
- Kiyotaka, S. (2001). Crystallization behaviour of fats and lipids - a review. *Chemical Engineering Science*, 2255-2265.

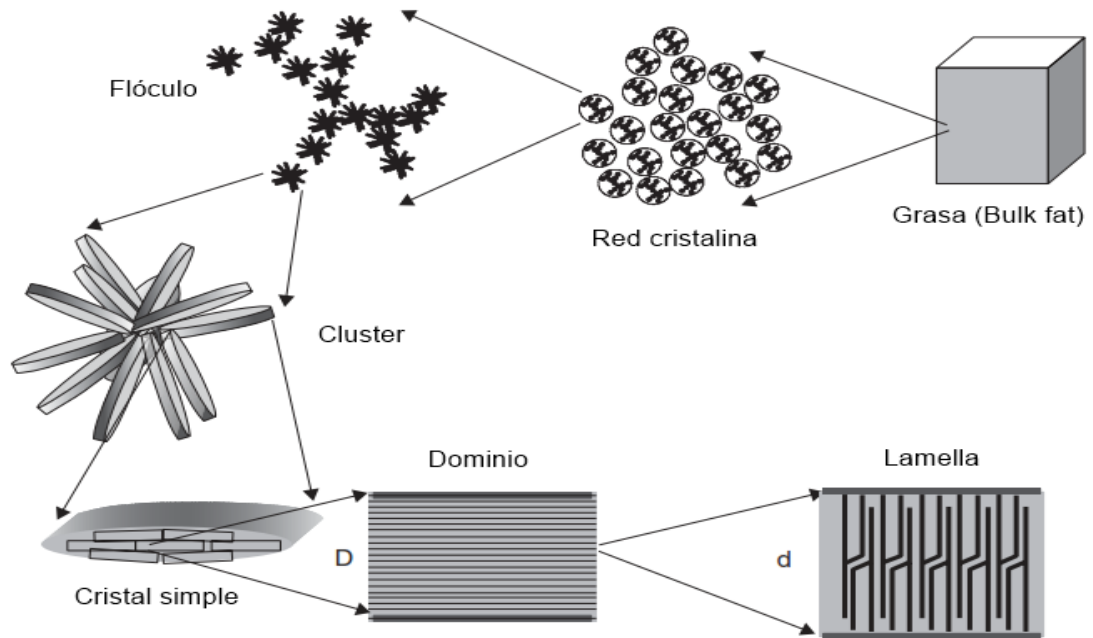
- Kloek, W., Walstra, P., & van Vliet, T. (2000). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77,48.
- Larsson, K. (1994). Tailoring Lipid Functionality in Foods. *Trends Food Sci. Technol*, 5: 311-315.
- Löffelmann, M., & Mersmann, A. (2002). How to measure supersaturation? *Chemical Engineering Science*, Volume 57, Issue 20, Pages 4301-4310.
- Lung, W. N. (1990). A Study of the Kinetics of Nucleation in a Palm Oil Melt. *JAOCS*, Vol. 67, no. 1, 879-882.
- M, A., S, B., PC, R., KR, S., BO, F., JC, L., . . . MW., D. (2005). Obtenido de Polarized light microscopy.: [www.microscopy.fsu.edu/primer/techniques/polarized/polarizedhome.html](http://www.microscopy.fsu.edu/primer/techniques/polarized/polarizedhome.html)
- Marangoni, A. (2005). The nature of fractality in fat crystal networks. En A. Marangoni, *Fat Crystal Networks*. New York: Marcel Dekker.
- Marangoni, A. (2012). Structure-function analysis of edible fats. *ACOS Press*, (págs. 25-28). Urbana.
- Marangoni, A. G., Acevedo, N., Maleky, F., Co, E., Peyronel, F., Mazzanti, G., . . . Pink, D. (2012). Structure and functionality of edible fats. *Soft Matter*.
- Marangoni, A. (July 14-17, 2015). The phase space of fat crystallization. En *6th International Symposium on Delivery of Functionality in Complex Food Systems*. Maison de la Chimie, Paris, France.
- Marangoni, A., & Rousseau, D. (1996). Is Plastic fat rheology governed by the fractal geometry of the fat crystal network? *J Am Oil Chem Soc*, 73, 991-994.
- Martini, S., Herrera, M., & Hartel, R. (2002). Effect of cooling rate on crystallization behavior of milk fat fraction/sunflower oil blends. *J Am Oil Chem Soc*, 79, 1055-1062.
- McGauley, S., & Marangoni, A. (2002). En A. Marangoni, & S. Narine, *Physical Properties of Lipids*. New York: CRC.
- Metin, S., & Hartel, R. (2005). En F. Shahidi, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. New York: Wiley Interscience.
- Narine, S. S., & Marangoni, A. (1999b). Relating structure of fat crystal networks to mechanical properties: a review. *Food Research International*, 31,227-248.
- Ng, W. L. (1990). A Study of the Kinetics of Nucleation in a Palm Oil Melt. *JAOCS*.
- Nor Hayati, I., Che Man, Y. B., Tan, C. P., & Aini, I. N. (2009). Physicochemical characteristics of soybean oil, palm kernel olein, and their binary blends. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 152-161.
- Ojovan, M. I., Travis, K. P., & Hand, R. J. (2007). Thermodynamic parameters of bonds in glassy materials from viscosity-temperature relationships. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 415107, 12pp.

- Omar, Z., Rashid, N. A., Mohamad Fauzi, S. H., Shahrim, Z., & Marangoni, A. G. (2015). Fractal dimension in palm oil crystal networks during storage by image analysis and rheological measurements. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 483-489.
- Peyronel, F., Pink, D. A., & Marangoni, A. G. (2014). *Triglyceride nanocrystal aggregation into polycrystalline colloidal networks: Ultra-small angle X-ray scattering, models and computer simulation*. Current Opinion in Colloid & Interface Science.
- Peyronel, M. F., Acevedo, N. C., & Marangoni, A. G. (2010). *Structural and mechanical properties of fats and their implications for food quality*. Guelph: University of Guelph, Canada.
- Putte, K. V., & Enden, J. V. (1973). Fully automated determination of solid fat content by pulsed NMR. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 51(7), 316-320.
- Raeuber, H., & Nikolaus, H. (1980). Structure of foods. *J Text Stud*, 11, 187-198.
- Rao, M. P. (1999). Principles and Applications. En A. M. Gaithersburg, *Rheology of Fluid and Semifluid Foods* (pág. 433 pp).
- Ribeiro, A. P., Grimaldi, R., Gioielli, L. A., & Gonçalves, L. A. (2009). Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications. *Food Research International*, 42, 401-410.
- Rogers, E., & Stovall, I. (2000). *Fundamentals of Chemistry: Solubility*. Obtenido de Gen Chem tutorials: <http://www.chem.uiuc.edu/webfunchem/genchemtutorials.htm>
- Rousset, P. (2002). Modeling Crystallization Kinetics of Triacylglycerols. En A. G. Marangoni, *Physicial Properties of Lipids* (págs. 2-3). Marcel Dekker, Inc.
- Rousset, P., & Rappaz, M. (1996). Crystallization Kinetics of the Pure Triacylglycerols Glycerol- 1,3-Dipalmitate-2-Oleate, Glycerol- 1 -Palmitate-2- Oleate-3-Stearate, and Glycerol-1,3-Distearate-2-Oleate. *JAOCS*, Vol. 73, no. 8.
- Salas, J. J., Bootello, M. A., & Garcés, R. (2015). Food Uses of Sunflower Oils. En E. Martinez-Force, N. T. Dunford, & J. J. Salas, *Sunflower, Chemistry, Production, Processing, and Utilization* (págs. 441-464). Spain: Elsevier Inc.
- Salud, O. M. (2008). *Grasas y ácidos grasos en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos. (Estudio FAO Alimentación y Nutrición - 91)*. Obtenido de Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Sánchez-Muniz, F., Bastida, S., & Benedí, J. (2016). Sunflower Oil. *Encyclopedia of Food and Health*, 217-226.
- Santos, J., Santos, I., & Souza, A. (2005). Effect of heating and cooling on rheological parameters of edible vegetable oils. *Journal of Food Engineering*, 67 401-405.
- Skoda, W., & van der Tempel, M. (1967). Grow kinetics of triglyceride crystals. *J. Cryst. Growth*, 1:207-217.
- Small, D. (1966). *Handbook of lipid research*. New York and London: Plenum Press.

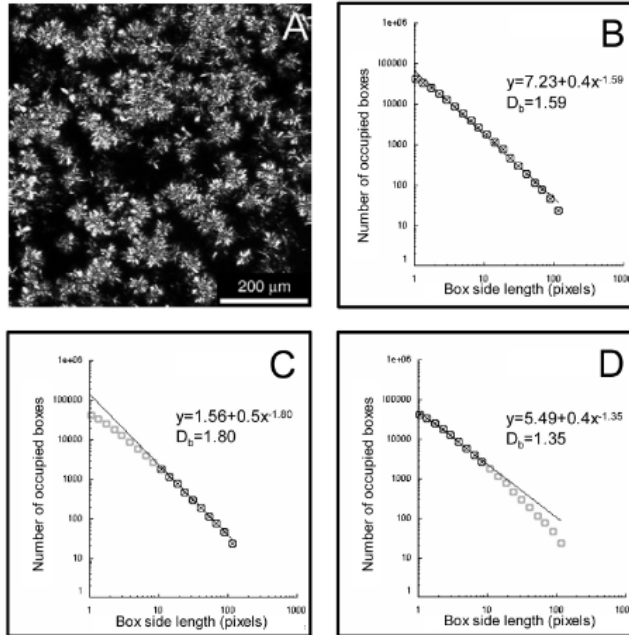
- Soo Na, H., & Joong Oh, S. (1996). A COMPARISON OF CRYSTAL GROWTH KINETICS BY USE OF CHEMICAL POTENTIAL DIFFERENCE AND CONCENTRATION DIFFERENCE. *Korean J. of Chem. Eng.*, 13(4), 343-350, 343-350.
- Souza, D., deMan, J., & J.M., & d. (1990). Short spacings and polymorphic forms of natural and commercial solid fats: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 835-843.
- Tan, C., & Che Man, Y. (2000). Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: Comparison of thermal properties and chemical composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 143-155.
- Timms, R. (1984). Phase behaviour of fats and their mixtures. *Progress Lipid Research*, 23, 1-38.
- Timms, R. E. (1985). Physical properties of oils and mixtures of oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Volume 62, Issue 2, pp 241-249.
- Toro-Vazquez, J. F., Dibildox-Alvarado, E., Herrera-Coronado, V., & Charo-Alonso, M. A. (2001). Triacylglyceride Crystallization in Vegetable Oils: Application of Models, Measurements, and Limitations. En N. Widlak, R. Hartel, & N. Suresh, *Crystallization and Solidification Properties of Lipids* (págs. 53-78). Champaign, Illinois: AOCS Press.
- Van Den Tempel, M. (1979). Rheology of concentrated suspensions. *J Colloid Interface Sci*, 71, 18-20.
- Vreeker, R., Hoekstra, L. L., den Boer, D. C., & Agertof, W. G. (1992). The fractal nature of fat crystal networks. *Colloids and Surfaces*, 65, 185e189.
- Wiederman, L. (1978). Margarine and Margarine Oil, Formulation and Control. *J. Am. Oil Chem. Soc.* , 55, 823 .
- Wright, A. J., Hartel, R. W., Narine, S. S., & Marangoni, A. G. (2000). The effect of minor components on milk fat crystallization. *Journal of the American Oil Chemists' Society* , 77, 463-475.

## 14. Anexos

**Anexo 1:** Jerarquía estructural en una red cristalina de un sistema graso (Peyronel, Acevedo, & Marangoni, 2010)

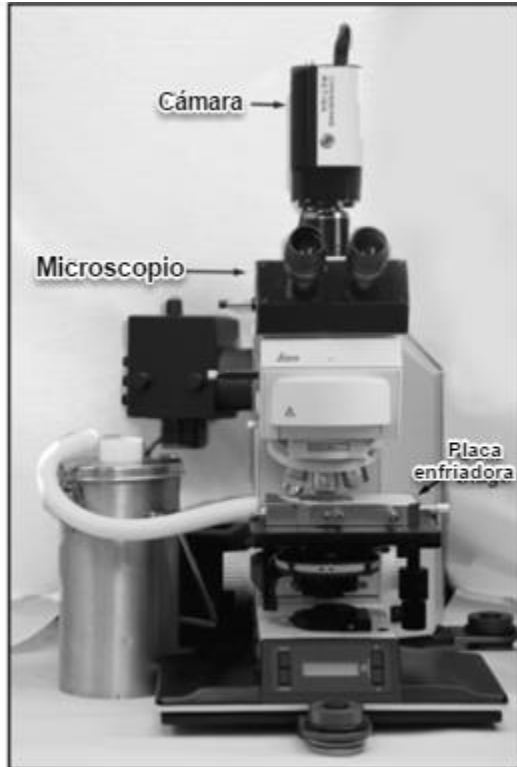


## Anexo 2: Determinación de dimensiones fractales por Conteo de cajas

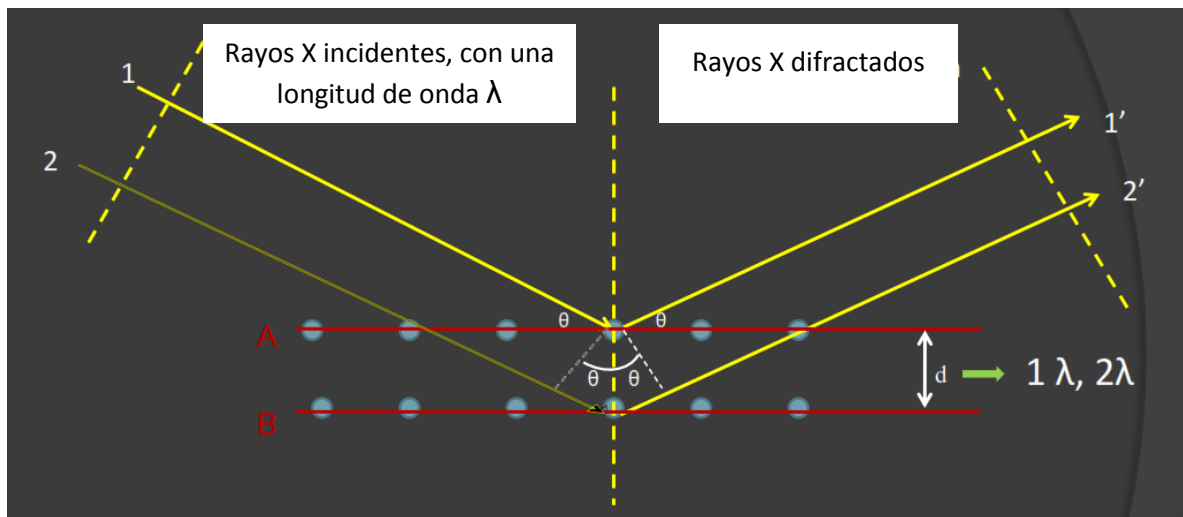


El esquema anterior muestra cómo se determina el valor de la dimensión fractal mediante microscopía de luz polarizada usando el método de conteo de cajas de partículas. Una imagen en escala de grises (A) de la red de cristal graso se invierte en colores, obteniendo (B). En esta imagen, mediante uso de software, se cuenta el número de partículas de cristal dentro de las cajas de tamaños crecientes colocados sobre la imagen de umbral (C). La dimensión fractal será la pendiente de la gráfica (D) del logaritmo del número de partículas ( $N_p$ ) en función del tamaño de la caja ( $R$ ) (Marangoni A. , The nature of fractality in fat crystal networks, 2005).

### Anexo 3: Microscopía con placa enfriadora



**Anexo 4:** Ley de Bragg dice que dos ondas están en fase si las longitudes de camino



$$\lambda = 2 d \sin(\theta)$$