Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Propiedades fisicoquímicas de microemulsiones estabilizadas con caseinato de sodio

Huck Iriart, Cristián

2013-11-20

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Huck Iriart, Cristián. (2013-11-20). Propiedades fisicoquímicas de microemulsiones estabilizadas con caseinato de sodio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Huck Iriart, Cristián. "Propiedades fisicoquímicas de microemulsiones estabilizadas con caseinato de sodio". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-11-20.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Propiedades fisicoquímicas de microemulsiones estabilizadas con caseinato de sodio

Tesis Presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física.

Cristián Huck Iriart

Directores de Tesis: Dr. Roberto J. Candal

Dra. Maria Lidia Herrera

Consejero de Estudios: Dr. Daniel H. Murgida

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2013

Resumen

Propiedades fisicoquímicas de microemulsiones estabilizadas con caseinato de sodio

Los sistemas lipídicos (sólidos o líquidos) o dispersos en la forma de emulsiones acuosas son de importancia superlativa en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética, entre otras. La estabilidad cinética de una emulsión depende de factores muy diversos. Los procesos de desestabilización física principales son cremado, floculación, coalescencia, coalescencia parcial, inversión de fase y el madurado de Ostwald. Tanto la naturaleza de las fases continua como dispersa y variables termodinámicas como temperatura y composición determinan los mecanismos por los cuales la dispersión se desestabilizará. Uno de los emulsificantes más empleados en la actualidad es el caseinato de sodio (NaCas). Se lo utiliza extensamente, en conjunto con azúcares, en la preparación de emulsiones grasas de aplicación en muchos tipos de alimentos y en la encapsulación de aceites y grasas. A lo largo del presente trabajo de tesis se abordó el estudio de la estabilidad cinética de emulsiones formuladas con caseinato de sodio a diversas escalas espaciales utilizando técnicas no invasivas. En esta tesis se vincularon las manifestaciones macroscópicas de la desestabilización de las emulsiones cuantificadas por dispersión de luz visible y microscopias ópticas con la nanoestructura del sistema determinada por dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS). La interpretación de los resultados de SAXS se discutió en términos de modelos teóricos adecuados para describir este tipo de sistemas, con énfasis en explicitar la consistencia fisicoquímica de los modelos propuestos. Se analizó la influencia de aditivos (azúcares) y de las transiciones de fase (cristalización de la fase grasa) sobre la estabilidad de la emulsión, la estabilización de la fase dispersa en la dispersante por una transición emulsión-gel inducida por acidificación controlada y la validez de las técnicas experimentales empleadas.

Palabras clave: emulsiones, estabilidad, caseinato de sodio, Turbiscan, SAXS, nanopartículas, geles.

Abstract

Physicochemical properties of sodium caseinate microemulsions

Fats and oils dispersed in aqueous media are known as emulsions. These complex systems are relevant in food, pharmaceutical and cosmetic industries (among others). Emulsions are thermodynamically unstable systems. The most frequent destabilization mechanisms are creaming, flocculation, coalescence, partial coalescence, phase inversion and Ostwald ripening. The chemical composition of disperse as much as continuous phase and thermodynamical variables as temperature, external pressure, composition, etc. will lead to different destabilization mechanisms. Sodium Caseinate (NaCas) is one the favorite ingredients in emulsion formulation and stabilization. In food systems, it is usually employed with other surfactants and sugars. The emulsion stability is strongly affected by droplet size and interactions among components. In this thesis the kinetic stability of NaCas emulsions was analyzed using non-invasive techniques which includes static and dynamic light scattering, optical microcopies and small angle x-ray scattering (SAXS). The macroscopic manifestation of emulsion destabilization was quantified by optical microcopies and light scattering. These results were related with the nanostructure obtained by Small angle X-ray Scattering (SAXS). The interpretation of the SAXS results was discussed in terms of appropriate theoretical models to describe these systems, with emphasis on explicit physicochemical consistency of the proposed models. In this thesis, the influence of additives (sugar) and phase transitions (crystallization of the fat phase) on emulsion stability, the stabilization of the dispersed phase in the continuous phase by emulsion-gel transition induced by controlled acidification, and validity of the experimental techniques employed was discussed.

Key words: emulsions, stability, sodium caseinate, Turbiscan, SAXS, nanoparticles, gels.

Agradecimientos

A todos los que me acompañaron a lo largo de estos años en este camino. Cada cual ha aportado, desde lo intelectual y/o humano, su grano de arena y por lo que no poseo más que agradecimientos.

A Lidia y Roberto, por dejarme volar y saber cuando bajarme a tierra. Gracias por estos años. Y por la invalorable oportunidad de crecer.

A los profesores Iris y Cristiano que me han brindado una ayuda inmensa en la interpretación y modelado de datos de SAXS y me han contagiado la fascinación por la técnica.

A mis padres por todo lo que me han brindado, a mis hermanas por los momentos lindos y por sus peleas. Al resto de mis familiares por haberme forjado en la persona que soy hoy.

A Chuky por estos maravillosos años juntos. Gracias por la compañía, confianza, apoyo y amor en todo momento.

A mi abuela Eva por haberme regalado mi primer juego de química cuando era pequeño, siempre estarás en nuestros recuerdos. A mi nona por todo lo lindo que es escuchar sus historias, su cariño y por el interés que pone en todos sus nietos.

A mi abuelo Jorge, que su recuerdo es una huella tan fuerte en sus seres queridos, que sin haberlo conocido, es una gran influencia y modelo a seguir.

A mis amigos de la facu: Sil, Maty, Andy, Ithu, Dott y Dieguito. Que no solo han sido una compañia invaluable en el estudio, también fuera del mismo.

A mis amigos del barrio que han sido una parte importante en los momentos de ocio, el cual permite la sana desconección de la rutina diaria.

A los profesores Daniel Laria y Roberto Fernandez Prini que con su entusiasmo en la fisicoquímica han predido la chispa del enstusiasmo y el asombro en la disciplina.

A Javier Rodriguez por las charlas y sugerencias en los algoritmos de optimización.

A los chicos del laboratorio de Materiales del INQUIMAE, a los chicos de la oficina T33A y T25, a los chicos del pabellón de industrias, a la gente de la Universidad de San Martin. Tantas son las personas que sería una tesis extra agradecerle individualmente a cada uno. Pero en todos los que me conocen y participan o participaron de mi vida diaria dejo mis agradecimientos.

A la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, al Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física y al Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE) por brindarme la posibilidad de realizar mi trabajo de Tesis de Doctorado.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires por financiar este trabajo a través de los subsidios que nos otorgaron.

Al Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS) por asignarnos los turnos en las líneas SAXS 1 y SAXS 2 que nos permitieron hacer una parte muy importante de los experimentos que se describen en este trabajo de tesis.

Al *Honorable Senado de la Nación* por declarar de interés público el proyecto *Alternativas a las grasas trans* (VSP-703/11, Buenos Aires, 27 de Julio de 2011) en el que se enmarca este trabajo de tesis.

A mi familia,

A Daniela

Indice

1 Introducción 1

1.1 Emulsiones 2

1.2 Surfactantes, espesantes y coadyuvantes 5

1.3 Caseinato de Sodio (NaCas) 7

1.4 Aceite de Girasol 10

1.5 Métodos no Perturbativos 11

1.5.1 Dispersión elástica de radiación electromagnética. 12

1.5.2 Dispersión Dinámica de Luz (DLS) 17

1.5.3 Dispersión Estática de Luz y Estabilidad de Suspensiones 20

1.5.4 Dispersión de Rayos X a bajos Ángulos (SAXS) 24

1.5.5 Resonancia Magnética Nuclear (NMR) 34

2 Objetivos 39

2.1 Objetivos Generales 40

2.2 Objetivos específicos 41

3 Métodos experimentales 42

3.1 Preparación de emulsiones 43

3.2 Determinaciones 44

3.2.1 Determinación de tamaño de gota 44

3.2.2 Estabilidad de las emulsiones 48

3.2.3 Dispersión de Rayos X a bajos Angulos..... 57

3.2.4 Microestructura..... 65

3.2.5 Movilidad molecular y sólidos totales 69

3.2.6 Análisis estadístico 70

4 Estabilidad de emulsiones líquidas preparadas con NaCas 71

4.1 Introducción..... 72

4.1.1 Estabilidad de Emulsiones..... 72

4.1.2 Azúcares en medios heterogéneos 76

4.1.3 Estudio de proteínas de leche en medio continuo y heterogéneo 78

4.2 Materiales y Métodos particulares..... 80

4.2.1 Materiales..... 81

4.2.2 Estabilidad de emulsiones..... 84

4.2.3 Microestructura..... 85

4.2.4 Tensión superficial en interfase líquido-líquido..... 85

4.2.5 Densidad y viscosidad..... 88

4.2.6 Dispersión de Rayos X a Bajos Ángulos (SAXS) 89

4.3 Resultados 97

4.3.1 Efectos de la concentración de Caseinato de sodio..... 97

4.3.2 Variando la composición de la fase dispersa..... 108

4.3.3 Emulsiones formuladas con disacáridos y polisacáridos..... 115

4.3.4 Una mirada en la nanoescala. 142

4.4 Discusión y Conclusiones Parciales 153

5 Coalescencia parcial y cristalización..... 163

5.1 Introducción 164

5.1.1 Nucleación de triglicéridos..... 164

5.1.2 Polimorfismo y Difracción de Rayos X..... 168

5.1.3 Grasa de Leche 170

5.1.4 Componentes minoritarios..... 171

5.1.5 Coalescencia Parcial 172

5.2 Materiales y métodos particulares 173

5.2.1 Materiales 173

5.2.2 Contenido de Grasa Sólida (SFC) 174

5.3 Resultados 181

5.3.1 Fase grasa homogénea..... 181

5.3.2 Emulsiones y Grasas..... 196

5.3.3 Emulsiones Finas (EF) 207

5.4 Conclusiones..... 208

6 Estructuración de emulsiones por gelificación ácida del NaCas..... 211

6.1 Introducción 212

6.1.1 Geles y Gelificación 212

6.1.2 Gelificación del Caseinato de Sodio 213

6.1.3 Acidificación homogénea 214

6.2 Materiales y Métodos particulares 215

6.2.1 Materiales 215

6.2.2 Tiempo de relajación longitudinal T_2 (NMR) 216

6.2.3 Reología 220

6.2.4 Dispersión de Rayos X a Bajos Ángulos (SAXS) 221

6.3 Resultados 222

6.3.1 Gelificación de suspensiones de caseinato de sodio 222

6.3.2 Gelificación de emulsiones de caseinato de sodio 233

6.4 Conclusiones 254

7 Conclusiones generales y perspectivas 258

8 Anexos 264

8.1 Anexo 1. Cálculo de velocidades de cremado 265

8.2 Anexo 2. Cuadrados mínimos lineales y no lineales 268

8.3 Anexo 3. Suavizado de curvas y errores 271

8.4 Anexo 4. Método de Montecarlo para ajuste de funciones 273

8.4.1 Algoritmo usual para interpretar datos de SAXS 273

8.4.2 El algoritmo propuesto 274

9 Referencias 277

9.1 Artículos científicos, capítulos de libros y libros. 278

9.2 Páginas Web 308

1 Introducción

1.1 Emulsiones

El término emulsión se emplea para definir a los sistemas formados por la dispersión fina de una fase líquida en otra en la cual es inmiscible o parcialmente inmiscible. Estas dispersiones pueden contener más de una fase líquida dispersa, pero habitualmente son sistemas de dos componentes líquidos. Las fases habituales son típicamente agua y un solvente orgánico o aceite. Cuando el agua es la fase dispersante se denomina emulsión “aceite/agua”. Si la fase dispersante es el aceite la emulsión es “agua/aceite”. El estudio de estos sistemas representa un desafío muy interesante desde el punto de vista académico debido a la riqueza de los procesos fisicoquímicos (principalmente de superficie) involucrados tanto en su síntesis como en los cambios temporales que experimentan que es lo que habitualmente se cuantifica cuando se describe su estabilidad. Las estrategias de preparación a las que se debe recurrir para obtener productos de las características deseadas son bastas e involucran el uso de agentes emulsificantes y/o estabilizantes. La relación entre estos agentes y las fases dispersantes y dispersas, como así también las condiciones de preparación (temperatura, rampas de calentamiento/enfriamiento, velocidad de agitación, entre otras) son complejas y requieren de un cuidadoso diseño del procedimiento a utilizar (actualmente se emplea el término “síntesis” de emulsiones por la complejidad que presentan). Las emulsiones poseen aplicaciones tanto médicas como industriales: encapsulación, distribución (*delivery*) de componentes activos, lubricación, modificación de propiedades organolépticas, etc.

Dentro de la síntesis de emulsiones convencionales hay variables a tener en cuenta para controlar las propiedades físicas como su estabilidad (Figura 1.1), reología, propiedades ópticas, encapsulación, fluidez. Las características principales se enumeran como: [McClemens 2012].

- Características de la fase dispersa: composición, concentración, distribución de tamaños.
- Características superficiales: espesor de la interfase, carga eléctrica, polaridad, grado de cubrimiento por adsorción de moléculas, partículas. macromoléculas.
- Características de la fase continua: densidad, viscosidad, tensión superficial, índice de refracción, conductividad.

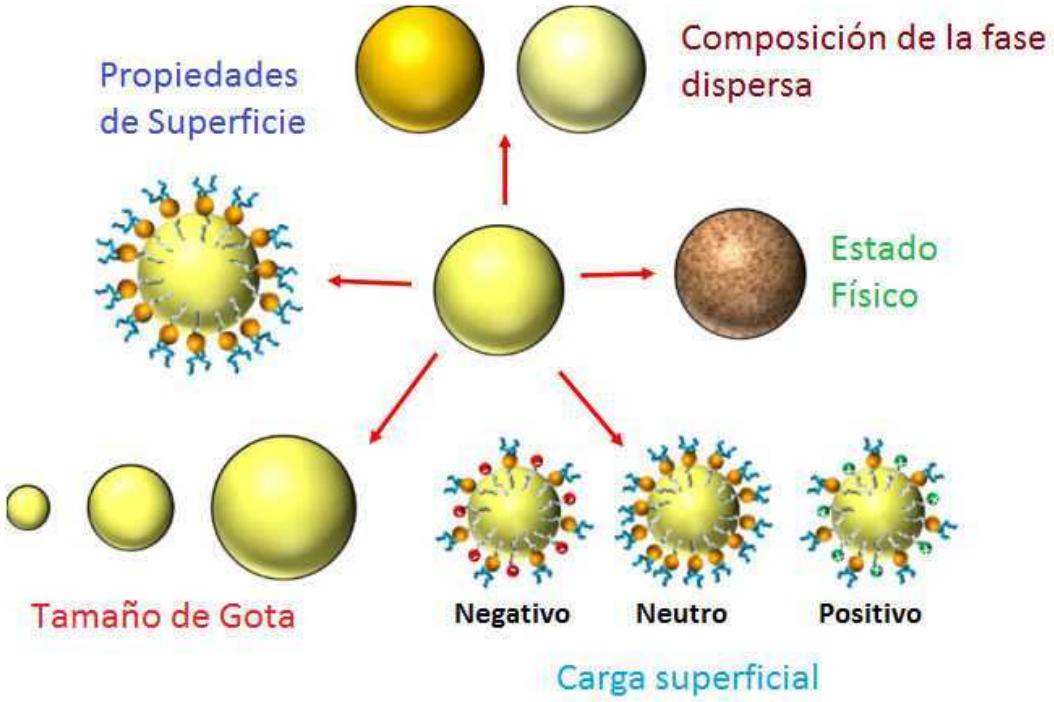

Figura 1.1. Propiedades que caracterizan la fase dispersa. [McClements 2012]

Las emulsiones se clasifican habitualmente según su tamaño de gota en “emulsiones”, denominación empleada para aquellas dispersiones líquidas,

generalmente esféricas, con distribución de diámetros entre 200 nm a 100 μm y en "nano-emulsiones" a aquellas con tamaños característicos entre los 20 y 200 nm. La preparación de ambas puede obtenerse aplicando una perturbación mecánica (agitación, ondas mecánicas, presión sobre válvulas o membranas) sobre un sistema bifásico, mientras que la formación de nano-emulsiones puede estar gobernada también, por el surfactante mediante una inversión de fase (en fases bicontinuas o lamelares) [Solans et al. 2005].

Más allá del interés académico, existen infinidad de emulsiones que encuentran uso en la vida cotidiana y como materias primas para la elaboración de productos fundamentales en la sociedad actual. Dentro de estos usos están aquellos relacionados con la industria de la alimentación. Muchos productos alimenticios que se consumen diariamente, como aderezos, cremas y helados, están basados en emulsiones. En otros casos se emplean emulsiones en alguna etapa de elaboración (como es el caso de los productos de panadería). La importancia estratégica y económica de estos sistemas en Argentina y en la Región es evidente por tratarse de un país productor de alimentos.

Las emulsiones que se aplican en la industria alimentaria son termodinámicamente inestables. Su duración en el tiempo está gobernada por la cinética de los procesos que tienen lugar durante su almacenamiento. El término estabilidad se refiere a la capacidad de una emulsión de resistir los cambios en sus propiedades fisicoquímicas en el tiempo. Se puede considerar una emulsión cinéticamente estable si su velocidad de desestabilización es suficientemente menor al tiempo de vida media deseado. Algunas emulsiones son etapas

intermedias en un proceso de manufactura y sólo es necesario que sean estables un tiempo corto (horas), por ejemplo productos de panadería, mientras que otras deben ser estables por tiempos largos que pueden ser meses o años como es el caso de mayonesa o aderezos para ensalada. La producción de otros alimentos involucra una desestabilización controlada de una emulsión durante el proceso de manufactura como por ejemplo es el caso de cremas batidas y helados. Los procesos de desestabilización física principales son cremado, floculación, coalescencia, coalescencia parcial, inversión de fase y el madurado de Ostwald [McClemens 2005]. El desarrollo de una estrategia efectiva para evitar cambios indeseables en una emulsión alimentaria depende del mecanismo responsable de los cambios. En la práctica dos o más de estos mecanismos pueden tener lugar simultáneamente [Huck-Iriart et al. 2011a]. Por ello es necesario identificar la importancia relativa de cada mecanismo, la relación entre ellos y los factores que tienen influencia sobre los mismos para poder controlar la estabilidad fisicoquímica del alimento.

1.2 Surfactantes, espesantes y coadyuvantes

Las emulsiones alimentarias tienen su origen en la evolución de las especies animales. La leche posee membranas naturales que permiten la dispersión de las gotas de aceite en un medio acuoso. La funcionalidad de un surfactante es notoria. Se puede dispersar hasta un 80% de aceite en agua sin que se produzca inversión de fases. Los emulsificantes naturales y comerciales son frecuentemente mezclas complejas lo que acentúa aún más el carácter complejo de las

emulsiones alimentarias. La formulación de emulsiones comenzó como un arte basado en la experiencia. El desarrollo de técnicas analíticas como microscopía electrónica, resonancia magnética nuclear y cromatografía gaseosa asociada a espectroscopia de masa permitieron transformar este arte en ciencia [Hasenhuettl 2011]. Los emulsificantes son aditivos funcionales muy útiles ya que sin ellos no se podrían fabricar numerosos productos. Típicamente actúan en sistemas con más de una fase cumpliendo un rol principal permitiendo que dos fases inmiscibles se combinen dando un sistema quasi-homogéneo capaz de mantenerse estable por largo tiempo.

La formulación de un producto puede ser muy compleja y en raras ocasiones puede ser simplificado a un sistema aceite/agua/surfactante. Entre las estrategias de estabilización de una emulsión se pueden mencionar la correcta elección del surfactante, coadyuvantes que mejoren la calidad del solvente (alcoholes y azucares simples) y espesantes que modifiquen la viscosidad del medio continuo (polisacáridos) [Antonov, van Puyvelde & Moldenaers 2009]. Estos aditivos pueden llegar a tener un rol fundamental en el mecanismo de desestabilización y en la microestructura del producto final [Spyropoulos, Portsch & Norton 2010; Huck-Iriart et. al. 2013]. El surfactante no solo interviene disminuyendo la tensión superficial entre las fases y facilitando la formación de dispersiones pequeñas (áreas superficiales grandes) sino que puede estar directamente relacionado con el mecanismo de desestabilización de la dispersión [Huck-Iriart et al. 2011a]. Las proteínas al igual que otros materiales particulados [Binks 2002] poseen regiones anfifílicas que le confieren el rol de surfactante [McClements 2004]; de hecho,

dentro de los organismos vivos, existen varios tipos de proteínas que poseen la función de transportadores o *carriers* de moléculas hidrofóbicas a lo largo del torrente sanguíneo [McClements 2013] debido a que poseen regiones lipofílicas donde alojan a las moléculas insolubles en agua y regiones hidrófílicas que le permiten permanecer suspendidas en solución acuosa sin coagular. Poseen un volumen excluido considerable que interviene en la repulsión estérica y adquieren carga neta dependiendo del pH (repulsión electrostática). A razón de que el producto final es una emulsión alimentaria, las proteínas proveen una alternativa natural, no tóxica y nutritiva para la formulación de productos.

1.3 Caseinato de Sodio (NaCas)

Las caseínas son productos naturales derivados de la leche de mamíferos. Están constituidas por un conjunto de heteroproteinas secretadas por las glándulas mamarias de las hembras [Treweek 2012]. Dentro de la industria alimenticia se destacan como fuentes de caseína los productos lácteos vacunos y de cabra. Argentina como país agro/ganadero posee una industria láctea fuerte con leche vacuna como principal materia prima para la preparación de cremas, yogurt, quesos, etc.

La leche vacuna posee de 2 a 3 %p/p de caseínas (CN) donde las proteínas principales se denominan α_1-CN, α_2-CN, β-CN y κ-CN. Las α caseínas se suelen encontrar en proporciones mayores al 50% del total seguidas de las β caseínas que representan un 30%. [Farrell et al. 2006]. Se organizan de manera natural en micelas esféricas de diámetros variables (entre 50 y 500 nm). La forma de la

micela se debe a la presencia de interacciones hidrofóbicas y a la formación de puentes calcio-fosfato en las κ-CN ubicadas en la superficie de la micela [Livney 2010] como se ejemplifica en la Figura 1.2. Las características de auto-ensamblado que poseen las CNs las convierte en un sistema muy interesante para su estudio. La función biológica de las micelas de caseína es proveer un nutriente concentrado en proteínas, calcio y fosfatos a los neonatos sin causarle patologías a la madre tales como calcificación o amiloidosis en las glándulas mamarias mediante la formación de micelas estables [Ossowski et al. 2012]. Es por ello que el estudio estructural de las micelas de caseína ha tenido gran importancia en las últimas décadas siendo aun un tema de debate [Dalgleish 2011]. Sin embargo, se suele adoptar un modelo submicelar de partículas esféricas (proteínas globulares) autoensambladas por interacciones débiles (puente de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, etc) y por puentes de fosfato de calcio [Kruif et al. 2012].

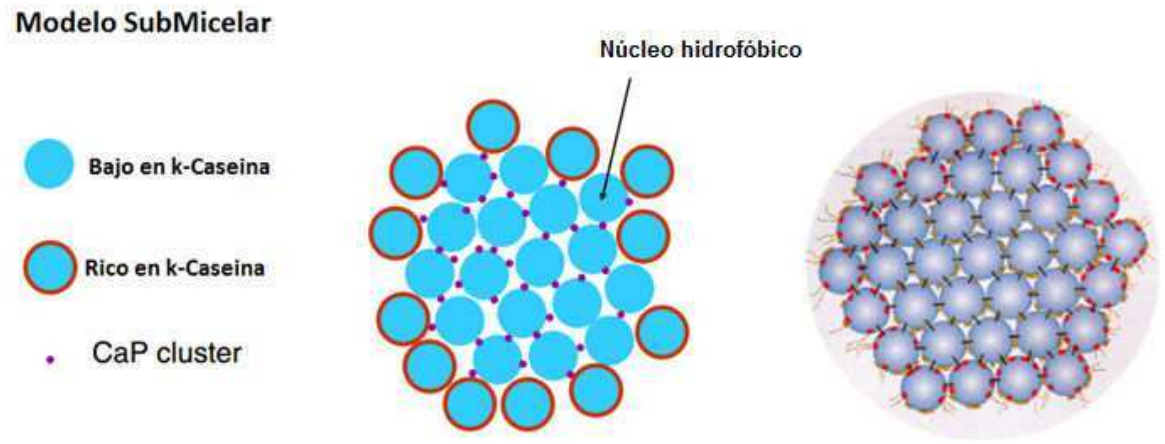

Figura 1.2. Modelo micelar de la caseína [Kruif et al. 2012]

El caseinato de sodio (NaCas) es el resultado del reemplazo a escala industrial del fosfato de calcio por sodio. En solución acuosa se presenta como agregado coloidal donde las submicelas de caseínas suelen tener diámetros entre 10 y 20 nm y la extensión de los agregados o estructuras supramoleculares y su forma dependerán de la composición de los monómeros que la compongan, pH, fuerza iónica y la concentración de calcio [Dickinson 2006]. Es un producto muy versátil que dependiendo de las condiciones del medio puede modificar su estructura, complejar diferentes analitos y/o macromoléculas, afectar la tensión superficial aire-liquido, liquido-liquido (en sistemas inmiscibles) y gelificar dando matrices estructuradas [Livney 2010]. Es un compuesto favorito en la industria de alimentos por su producción masiva, bajo costo, alto valor nutricional, y propiedades superficiales. En particular, en la literatura, numerosos autores consideran que el caseinato de sodio es el emulsificante natural más efectivo para estabilizar emulsiones de lípidos y agua [Hogan et al. 2001].

La flexibilidad en la estructura secundaria de las CNs le brinda a los agregados coloidales de NaCas propiedades reomórficas únicas. Siendo un grupo de proteínas que se adapta al medio en el cual están disueltas [Dickinson 2006]. Posee la cualidad de formar complejos con disacáridos y polisacáridos siendo un emulsionante muy versátil a la hora de sintetizar alimentos polifásicos estructurados [Spyropoulos, Portsch & Norton 2010]. Más aun, bajo las condiciones adecuadas de temperatura, concentración y pH el NaCas gelifica irreversiblemente [Belyakova et al. 2003]. El control y optimización de la síntesis de los geles de NaCas a partir de emulsiones es una alternativa viable en el

reemplazo de grasas saturadas y *trans* así como también un campo de investigación muy activo en el área de síntesis de materiales y plásticos comestibles.

1.4 Aceite de Girasol

El girasol, *Helianthus annuus L.*, es una especie originaria de América del Norte introducida en Europa como planta ornamental en el siglo XVI, y que adquirió importancia como oleaginosa a comienzos del siglo XVIII. Es la cuarta fuente de aceite vegetal en el mundo siguiendo a los aceites de soja, palma y canola [Huck-Iriart & Herrera 2011b]. Ingresó a la Argentina desde Rusia, en el siglo XIX, y su cultivo se expandió hasta convertir a nuestro país en uno de los productores más importantes. El complejo aceitero argentino es uno de los sectores de la industria alimenticia que ha evidenciado mayor crecimiento. En las últimas décadas, Argentina ha mostrado un aumento sostenido de las áreas sembradas y de los rendimientos de los principales granos oleaginosos, lo que ha permitido disponer de mayores volúmenes de materia prima para procesar. Este proceso fue acompañado además por un importante crecimiento de la capacidad de procesamiento. Por la magnitud de su producción, el aceite de girasol es en nuestro país el segundo en importancia después del de soja. La industria nacional de aceite de girasol procesa más de 3.0 millones de toneladas de semilla por año para obtener alrededor de 1.5 millones de toneladas de aceite crudo, siendo nuestro país uno de los principales productores y exportadores de este producto.

Por otra parte, la industria local se destaca por su avanzada tecnología y alta competitividad [Baümler 2009].

El girasol que se planta en Argentina posee un alto contenido del ácido graso linoleico, nutricionalmente bueno [Bockisch 1998], y es fuente abundante de vitamina E, de probada acción antioxidante. Además de su uso hogareño puro o en mezclas, se utiliza ampliamente en la elaboración de emulsiones como mayonesas, margarinas, aderezos y conservas por lo que es importante pensar en su empleo en productos elaborados con valor agregado y no en su sola venta como materia prima a granel.

El aceite de girasol es un aceite de origen vegetal que se extrae del prensado de las semillas de la planta y la variedad alto linoleico está constituida en más de un 85% por ácidos grasos insaturados: 7% palmítico, 5% esteárico, 19% oleico, 68% linoleico y 1% linolénico [Kodali 2005]. Los ácidos linoleico y linolénico, en especial, son *esenciales*, es decir que deben incorporarse en la dieta dado que no son sintetizados por el organismo. La composición química de la variedad argentina resulta muy beneficiosa a nivel alimenticio, a la vez que genera un desafío para su manipulación y almacenamiento dada la baja estabilidad oxidativa que presentan los ácidos grasos no saturados.

1.5 Métodos no Perturbativos.

La naturaleza misma de una medición implica una perturbación sobre el sistema observado debido a que resulta imposible evaluar un sistema sin

interactuar, de alguna manera, con el objeto de estudio. En el marco de las suspensiones coloidales denominaremos “no perturbativo” a aquellos métodos de análisis que no ejercen una acción mecánica sobre el sistema ni alteran su estado químico. Dentro de este grupo de técnicas nos enfocaremos en la caracterización de emulsiones por dispersión elástica de radiación electromagnética (luz visible y rayos X), difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear.

1.5.1 Dispersión elástica de radiación electromagnética.

El resultado de la interacción entre ondas electromagnéticas y la materia puede descomponerse en diferentes contribuciones [Tsang, Kong & Ding 2000]: Asumamos un paquete de ondas planas que se propagan en el vacio e inciden con intensidad I_0 sobre la materia. Las mismas pueden ser reflejadas, transmitidas, ser absorbidas, o bien, dispersadas como se ejemplifica en la Figura 1.3.

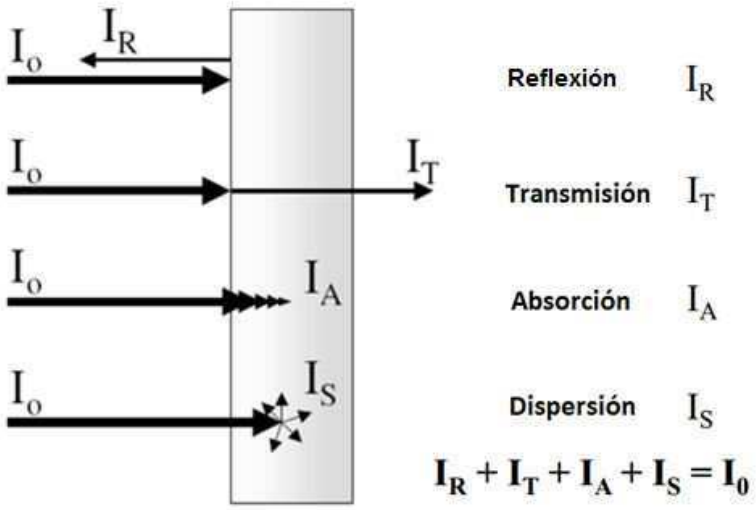

Figura 1.3. Esquema ilustrativo de desacoplamiento de la intensidad de la radiación electromagnética incidente sobre una muestra.

La contribución asociada a la absorción de radiación electromagnética puede ser despreciada cuando se emplea una longitud de onda (λ) de trabajo adecuada. No obstante, en técnicas basadas en dispersión de luz hay que tener en cuenta que parte de la radiación puede ser reflejada por el portamuestras y que parte se transmite.

1.5.1.1 Vector de dispersión y Momento Transferido

Supongamos que una onda monocromática plana $\mathbb{K}_0$ (definiremos las magnitudes vectoriales con letras sin relleno) se propaga con un número de onda $|\mathbb{K}_0|=4\pi/\lambda$ en el espacio y es dispersada por una inhomogeneidad puntual, de manera tal que la onda resultante conserve su módulo (dispersión elástica pura). Se define al vector de dispersión como $\mathbb{q}=\mathbb{K}-\mathbb{K}_0$ donde su módulo (o momento transferido) es $|\mathbb{q}|=q=(4\pi/\lambda)\sin(\theta)$ (según el origen histórico de cada técnica dispersiva el momento transferido puede variar sutilmente en su definición; el ángulo dispersado se puede tomar como θ o 2θ) [Feigin & Svergun 1987; Pecora 1985].

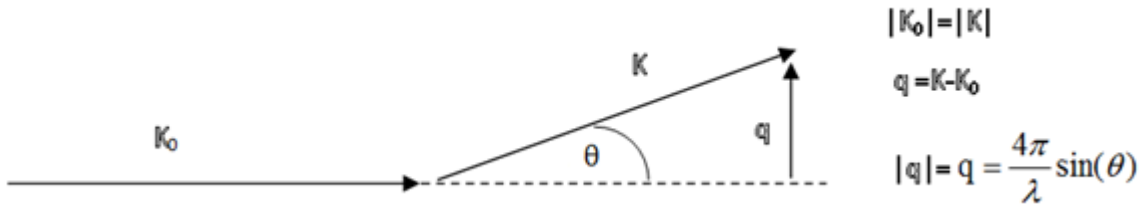

Figura 1.4. Representación geométrica del vector de dispersión $\mathbb{q}$ debido a la dispersión elástica de un frente de onda plano causada por una inhomogeneidad puntual.

1.5.1.2 Dispersión de Luz por Partículas

El fenómeno de dispersión obedece a leyes recíprocas. Es decir, hay una relación inversa entre el tamaño de la partícula y el ángulo al cual dispersa (en unidades de “q”) [Feigin & Svergun 1987]. La selección de la longitud de onda de trabajo que se realice dependerá de cuales sean las frecuencias espaciales que se quieran estudiar.

El fenómeno de dispersión de la luz por pequeñas partículas se conoce desde la época de Lord Rayleigh en el siglo XIX. Este autor propuso una expresión para la dispersión provocada por partículas cuyo tamaño es al menos un décimo menor a la longitud de onda incidente con índices de refracción similares al del medio continúo. Más adelante, Gustav Mie desarrolló una solución formal que interpreta la dispersión de la radiación electromagnética por esferas a través de las ecuaciones de Maxwell (Conocida como solución Mie-Lorentz o Mie-Lorentz-Debye) [Tsang, Kong & Ding 2000]. El formalismo puede extenderse a otros cuerpos centro-simétricos (cilindros, esferas multicapas, discos, etc). No obstante, la simetría esférica resulta una buena aproximación para varios sistemas coloidales incluidas las emulsiones [Lindner, Fritz & Glatter 2001]. En la Figura 1.5 se observa la dependencia angular de la intensidad dispersada para una esfera con un componente real de índice de refracción 1.47 (índice de refracción de la trioleina a 20ºC) [Lindner, Fritz & Glatter 2001] inmersa en un medio continuo cuya componente real del índice de refracción es de 1.33 (agua a 20ºC). A las esferas también se le asignó un índice de refracción imaginario muy pequeño de 10^{-8} para

desestimar la absorción. Los cálculos de intensidad en función del ángulo fueron realizados por el programa MiePlot [web: MiePlot] utilizando una longitud de onda monocromática de 850 nm que corresponde al infrarojo cercano. Los gráficos se muestran en coordenadas polares y expresadas en escala logarítmica.

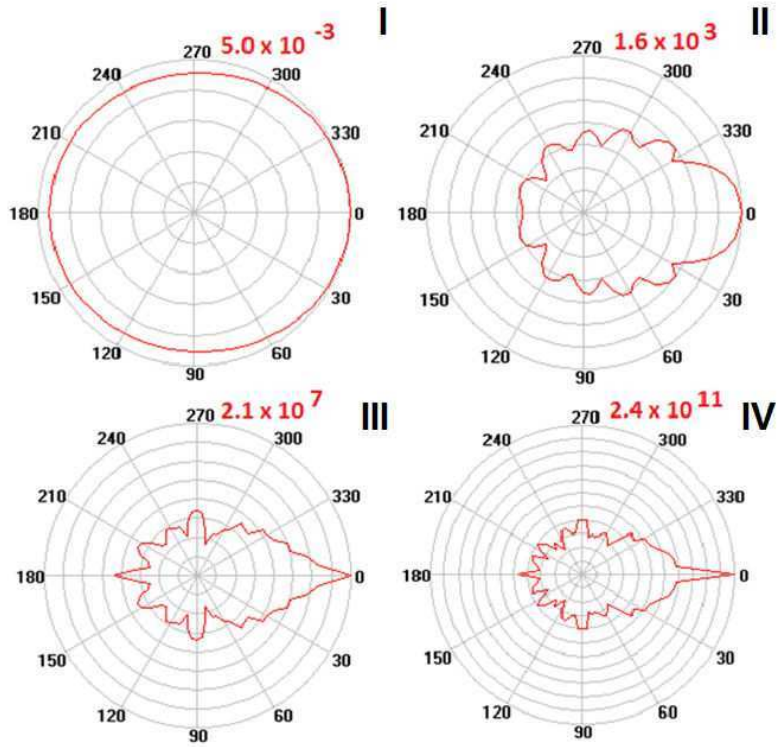

Figura 1.5. Intensidad de la luz dispersada por partículas esféricas (círculo rojo) en coordenadas polares vs angulo (los números rojos representan el valor del circulo exterior). Donde I) 0.1 µm, II) 0.85 µm , III) 10 µm y IV) 100 µm. Se tomó el índice de refracción del aceite como 1.47 y el del agua que es el medio continuo como 1.33, ambos a 20ºC y la longitud de onda empleada fue de 850 nm (infrarrojo cercano). Se consideró el término de absorción despreciable por lo que las diferencias entre las intensidades están dadas por las diferencias entre las secciones geométricas de cada esfera.

La aproximación de Rayleigh muestra que para radios menores a la longitud de onda, el perfil de dispersión es simétrico como se aprecia en la Figura 1.5I siendo la intensidad del backscattering (dispersión medida a 180º) comparable con la intensidad transmitida (intensidad registrada a 0º). A medida que el diámetro de

la esfera aumenta se observa una asimetría en la dispersión. A relaciones grandes de radio/λ resulta más preponderante la intensidad registrada a ángulos bajos como demuestran las Figura 1.5II, III y IV donde hay varios órdenes de magnitud entre el backscattering y la intensidad transmitida (notar que la escala es logarítmica).

Las técnicas basadas en la interacción de la radiación electromagnética con la materia son bastas y van desde equipos de uso cotidiano a facilidades multinacionales. Dependiendo del arreglo experimental puede obtenerse información muy útil sobre un sistema de estudio como:

- Estimar la distribución de tamaños y/o la forma de objetos dispersantes
- Investigar si dichos elementos poseen algún orden local o de largo alcance.

Las técnicas basadas en la dispersión de la radiación electromagnética que se aplican a soluciones se pueden dividir en dos grandes grupos: dispersión estática y dispersión dinámica. La diferencia principal entre ambas reside en la forma en la que se adquieren los datos empleándose en los dos casos arreglos experimentales diferentes. La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) o también conocida como espectroscopia de correlación se basa en el análisis de las fluctuaciones de intensidad de luz dispersada originada por el movimiento Browniano de las partículas suspendidas. Mientras que en la

dispersión estática se integra la intensidad media dispersada en un intervalo finito de tiempo.

1.5.2 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz es conocida también como espectroscopia de correlación de fotones o dispersión cuasi-elástica de luz y sus denominaciones son debidas a que se analiza la fluctuación de la intensidad debida al movimiento de pequeñas partículas inmersas en un fluido con temperatura [Pecora 1985]. La expresión más simple que permite interpretar la difusión de partículas esféricas es a través de la relación de Stokes-Einstein (Ecuación 1.1):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \qquad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde la constante de difusión (D) es proporcional a la constante de Bolztmann (k_B) y la temperatura (T) e inversamente proporcional a la viscosidad del fluido (η) y al radio hidrodinámico de la partícula (R_H). Es decir que las partículas más pequeñas (comparables con el tamaño de las moléculas de solvente) difunden a mayor velocidad y generan fluctuaciones de mayor frecuencia que las partículas de radios mayores (Figura 1.6). La señal resultante es procesada con correladores que pueden ser electrónicos y/o bien a través de software específicos para dicha tarea [Ford Jr. 1985].

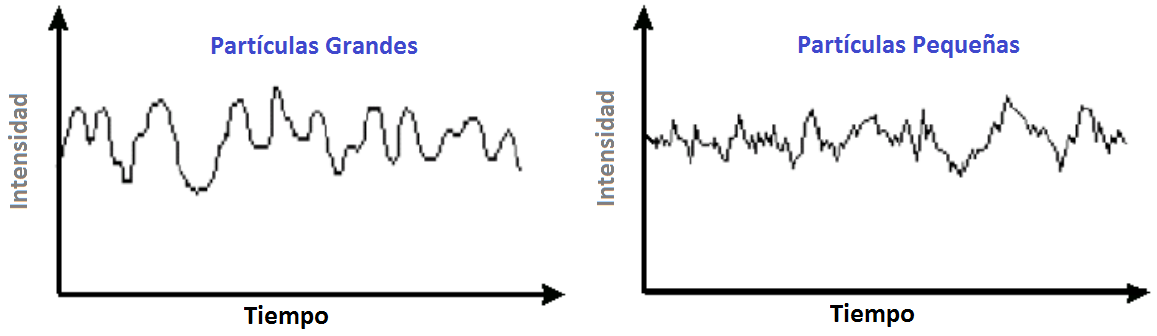

Figura 1.6. Fluctuaciones de la luz dispersada debidas a partículas grandes (izquierda) y partículas pequeñas (derecha)

1.5.2.1 Función de Correlación

Sean dos funciones f y g. Una correlación es una función matemática que se define como:

$$C_{f-g}(x) = \lim_{T\to\infty} \frac{1}{T} \int_0^T f(\xi) g^*(\xi - x) d\xi \qquad \text{Ecuación 1.2}$$

donde $C_{f\text{-}g}$ es la correlación de f y g. Para el caso de que g = f la función se denomina autocorrelación de f. En el caso de que f y g sean funciones periódicas, la integral posee límites de integración finitos. Esta función, que al igual que la convolución, han sido campo de estudio teórico en varias ramas de la matemática y la física como la mecánica cuántica [Sakurai & Napolitano 2011], óptica [Born & Wolf 1980] o en otras disciplinas que utilicen transformadas de Fourier [Bracewell

2000], posee propiedades cuya descripción se puede encontrar en los libros clásicos de análisis de funciones complejas.

1.5.2.2 Distribución de diámetros

En emulsiones, la fase dispersa puede ser aproximada por cuerpos esféricos, donde las fluctuaciones son debidas, principalmente, a la traslación de las partículas, despreciando las contribuciones por rotación o flexión de los glóbulos. Las oscilaciones en la intensidad de luz pueden modelarse en el espacio recíproco con curvas Lorentzianas de la forma:

$$P(\varpi) = \frac{2Dq^2/\pi}{\varpi^2+(2Dq^2)^2} \qquad \text{Ecuación 1.3}$$

Donde la función de autocorrelación resultante de P (que es función de la frecuencia de oscilación “ω”) es una exponencial decreciente:

$$C_{P-P}(x) = 1 + \exp[-2Dq^2x] \qquad \text{Ecuación 1.4}$$

En muestras mono-dispersas obtener un radio hidrodinámico a través de la constante de difusión cuando se controlan variables como temperatura, índice de refracción, viscosidad, etc, es relativamente sencillo. Una vez obtenida la curva de autocorrelación se realiza un ajuste no lineal usando la Ecuación 1.4 con algún algoritmo adecuado y se despeja el valor de D del argumento de la exponencial. Desafortunadamente, las emulsiones no suelen ser monodispersas sino que

poseen una distribución de diámetros (en el mejor de los casos es mono-modal). En dicho caso la expresión para hallar la distribución de radios viene dada por:

$$C(x) = K_1 + \left[\int K_2(t)\exp\left[-2D(t)q^2x\right]dt\right]^2 \qquad \text{Ecuación 1.5}$$

Con K_1 y K_2 parámetros de la integración que dependen del radio (r) de cada esfera. Como la sección geométrica crece con r^2, el peso con que cada partícula contribuye a la intensidad, a un valor fijo de "q", es diferente como se ilustró en la Figura 1.5 utilizando la solución de Mie. Analizando las fluctuaciones correlacionadas en un arreglo angular se pueden obtener los coeficientes de difusión de las partículas diluidas (para evitar scattering multiple) que componen el sistema en estudio. Resultando así ser una técnica adecuada para hallar las distribuciones de tamaños de coloides esféricos a través de dichos coeficientes de difusión. Dado que una emulsión es un sistema ideal por su simetría esférica, los algoritmos integrados en los equipos convencionales suelen ser suficientes y no son necesarios tratamientos numéricos extras.

1.5.3 Dispersión Estática de Luz y Estabilidad de Suspensiones

En esta tesis se empleó un método novedoso que ha sido descripto hace poco más de una década [Mengual et al. 1999a] y que permite seguir en el tiempo los procesos físicos en los cuales las suspensiones suelen evolucionar a fin de disminuir su energía libre. El método discrimina entre fenómenos difusivos

(sedimentación/cremado) a través de cambios de concentración de partículas y fenómenos de agregación que involucran la variación de tamaño de la unidad dispersora (floculación/coalescencia). Con ese objeto se necesita registrar la intensidad de luz a dos angulos fijos: 0º (T) o transmisión y 135º que llamaremos Backscattering (BS).

Mengual y colaboradores (1999a) trabajaron con esferas de latex de tamaño variable pero controlado y luego corroboraron los resultados teóricamente utilizando la solución de Mie asumiendo simetría esférica para las partículas empleando simulaciones de Monte Carlo. En los experimentos se analizaron los efectos de los cambios en la concentración y el tamaño de las partículas en la intensidad transmitida y en el BS para suspensiones monodispersas. En estos cálculos Mengual y colaboradores (1999a y 1999b) tuvieron en cuenta la sección del laser empleado, la simetría del portamuestras y aproximaron la solución para coloides no absorbentes. Es decir, analizaron la luz transmitida, dispersada y tuvieron en cuenta la reflexión dada por el vidrio del tubo contenedor.

En la Figura 1.7 se muestra los efectos de la concentración de partículas expresados en fracción volumétrica (ϕ) en función de la intensidad registrada en T y BS para esferas no absorbentes de 1.9 µm utilizando una longitud de onda de 850 nm en una celda cilíndrica de 1 cm de paso óptico. Los resultados exhiben una dependencia exponencial de la transmisión con la concentración de partículas siguiendo una ley del tipo Lambert-Beer:

$$\frac{T}{T_0} = exp\left[-\epsilon\ l\ \frac{\emptyset}{d}\right] \qquad \text{Ecuación 1.6}$$

El argumento está compuesto por una constante "ε" que involucra términos ópticos que dependen del objeto y la longitud de onda empleada, "*l*" es el paso óptico y "*d*" el diámetro de las esferas.

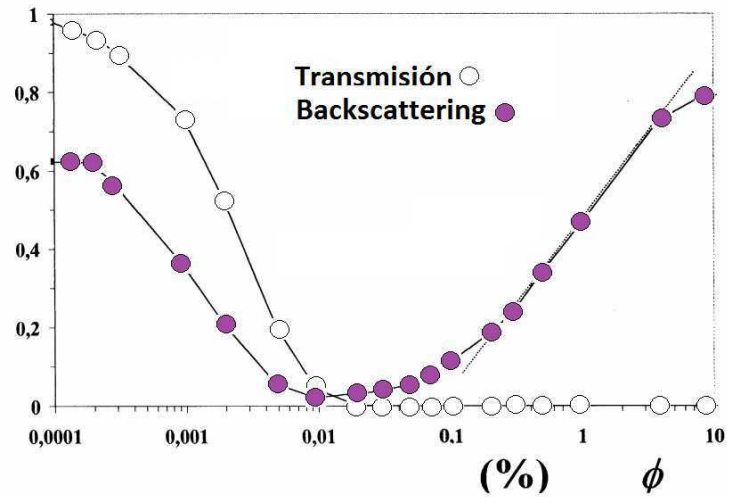

Figura 1.7. Transmitancia (0º) y Backscattering (135º) para esferas simuladas de 1.9 µm con una longitud de onda de 850 nm en una celda cinlindrica [Mengual et al. 1999b]

El BS y la T se registraron simultáneamente. El resultado exhibe inicialmente una caída de la intensidad con la concentración. Luego a partir de cierta fracción volumétrica, la transmisión se anula. Finalmente a fracciones aún mayores la intensidad dispersada aumenta según la relación empirica:

$$BS \propto \left(\frac{\emptyset}{d}\right)^n \qquad \text{Ecuación 1.7}$$

Con 0.4< n< 0.6 dependiendo del material.

Como se mencionó anteriormente en los sistemas coloidales los cambios de tamaño son importantes. Por esta razón los autores continuaron los experimentos dejando la fracción volumétrica fija y variando el diámetro de la suspensión como se muestra en la Figura 1.8.

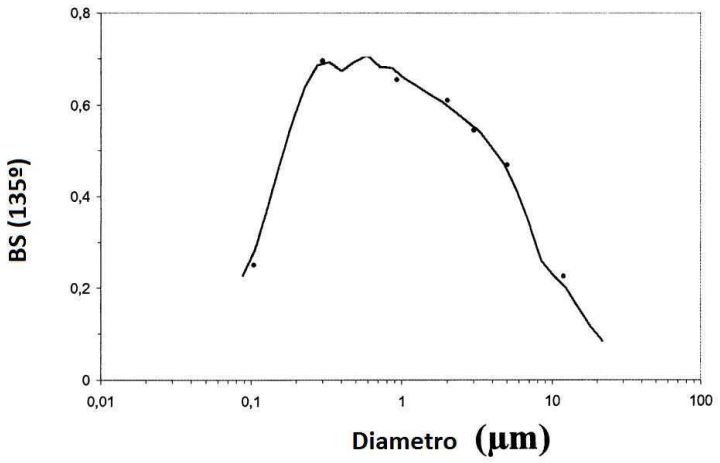

Figura 1.8. Backscattering en función del diámetro para esferas de Látex con un radiación incidente de 850 nm [Mengual et al. 1999b].

Cuando se midió la intensidad en las mismas condiciones ópticas realizadas en la experiencia de la Figura 1.7, fijando el valor de ϕ en 1% se encontró que la intensidad dispersada creció para radios menores al de la longitud de onda y decreció para diámetros de partícula mayores a λ, siguiendo en este caso la relación BS vs d que se expresa en la Ecuación 1.7.

Los fenómenos de migración de partículas en condiciones estancas están debidos principalmente al empuje por gravedad dentro de un fluido ejercido por la diferencia de densidades entre la fase continua y dispersa [Mills & Snabre 1994]. Midiendo simultáneamente la intensidad de la T y del BS de manera axial se

pueden cuantificar los cambios de concentración de partículas a lo largo del recipiente contenedor (en nuestro caso será un tubo cilíndrico), la cinética de cremado o sedimentación (ver sección Materiales y Métodos) y los cambios de tamaño de los elementos dispersores debido a fenómenos de coalescencia y/o floculación.

1.5.4 Dispersión de Rayos X a bajos Ángulos (SAXS)

La dispersión de rayos X a bajos ángulos es una poderosa herramienta para la descripción de materiales nanoestructurados [Craievich 2005]. Es una técnica cuya resolución espacial se encuentra en el orden de los nanómetros y es muy utilizada para caracterizar proteínas de relevancia biológica en solución [Silva et al. 2011], polímeros [Bonk et al. 2010], aleaciones metalicas [Ferragut et al. 2003], emulsiones y coloides [Riello et al. 2008] y actualmente se emplea también en la ciencia de alimentos [Silva et al. 2009; Gibaud et al. 2012].

Un sistema condensado está compuesto por átomos y moléculas con frecuencia espacial entre los mismos en el orden del $Å^{-1}$ (las distancias entre átomos y moléculas son cortas). Si este sistema discreto tuviera además simetría traslacional se observaría a altos ángulos patrones de interferencia o lo que comúnmente se conoce como difracción de cristales. Estos patrones de interferencia pueden ser interpretados según la ley de Bragg [Hukins 1981]. A bajos valores de “q”, o lo que es lo mismo a frecuencias espaciales del orden de nm^{-1}, una fase condensada se observa como un medio continuo (cristalino o no), por lo que el fenómeno de dispersión en sistemas nano-estructurados y coloides

se debe a la diferencia de densidades electrónicas entre las fases. SAXS es una técnica de dispersión estática de baja resolución espacial (~nm) donde se registra la intensidad emitida integrada en un intervalo de tiempo; la exposición se realiza por un tiempo suficiente como para obtener una buena estadística.

1.5.4.1. Fuentes de Rayos X

Desde 1895 que Roentgen descubrió los Rayos X las fuentes y utilidades de los mismos fueron en aumento exponencial. Las fuentes clásicas para generar radiación X son anódicas donde se bombardea electrones sobre un target metálico y este emite radiación de longitudes de onda discretas características del elemento que compone el ánodo. Las fuentes clásicas son las de Mo (K_α=0.71Å), Cu (K_α=1.54Å), Co (K_α=1.79 Å) y Fe (K_α=1.94 Å) [Bearden 1967]. Poseen la ventaja de que son accesibles y son de uso cotidiano en un laboratorio. La principal desventaja de estas fuentes es la baja intensidad. Existe un límite en el número de fotones emitidos dado por la temperatura de fusión del material. Se han implementado algunas soluciones prácticas para incrementar la emisión mejorando la refrigeración del ánodo (como el uso de ánodo rotatorio [Wittry 1979]), sin embargo, aún con estas mejoras las intensidades de estas fuentes son bajas y una medición puede llevar mucho tiempo (~ hora) siendo imposible seguir la evolución de las transformaciones morfológicas y estructurales de la materia que suelen ser de intervalos cortos de tiempo (ej: transformaciones polimórficas). Han aparecido en el mercado difractómetros y equipos de SAXS de laboratorio que utilizan un ánodo de un metal líquido (Ej: galio liquido K_α=1.34 Å) que permite

elevar varios órdenes de magnitud el brillo del haz [Harding & David 2003]. A pesar de todos los intentos, estas tecnologías solo permiten barrer un limitado y discreto paquete de longitudes de ondas. Una solución alternativa que brinda un pool continuo en energías de radiación electromagnética y de alta intensidad son los sincrotrones. En la Figura 1.9 se ejemplifica la emisión de diversas fuentes en función de la longitud de onda y el número de fotones emitidos. En la misma se observa que el sol (sun) posee un espectro continuo en el visible (al nivel del mar), las fuentes anodicas (tube) poseen energias de emisión discretas y de baja cantidad de fotones emitidos. Tambien se muestra que el empleo de sincrotrones (bending magnet) permite obtener un amplio espectro continuo de frecuencias electromagnéticas al mismo tiempo que la radiación es altamente intensa.

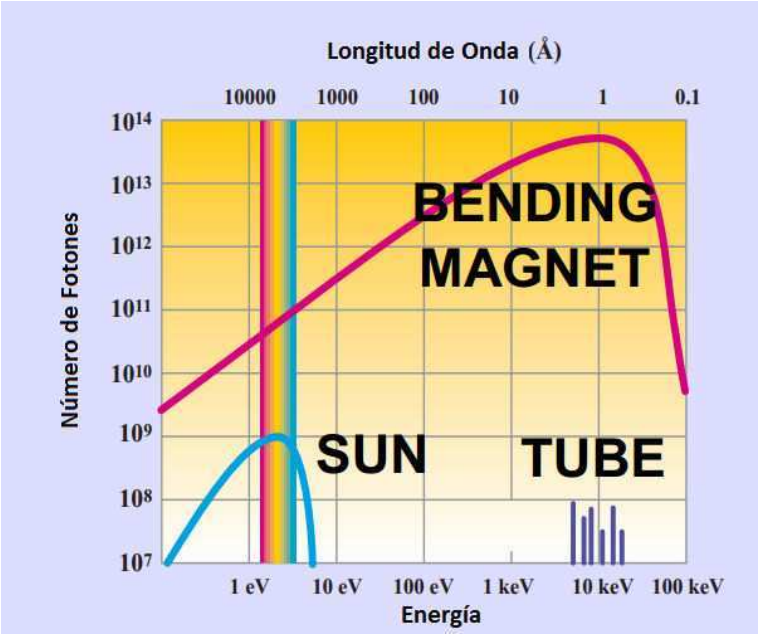

Figura 1.9. Esquema de las intensidades en función de la longitud de onda que emiten el sol a nivel del mar (sun), los tubos anódicos (tube) y la radiación sincrotrón (Bending magnet)

Una fuente brillante (entiéndase por brillo a la relación entre la sección del haz y su divergencia) de rayos X de gran auge es la radiación sincrotrón que se obtiene de acelerar partículas cargadas a velocidades relativistas o lo que es lo mismo decir cercanas a la velocidad de la luz [Kim 2009]. La primera observación de radiación sincrotrón fue registrada en 1947 en General Electric donde construyeron un sincrotrón de 70 MeV con la idea de testear la estabilidad de fase de los electrones en un acelerador (betatrón). Por fortuna, la cobertura del tubo era transparente y los técnicos pudieron observar un arco brillante de luz. Luego de más de 60 años desde su primera observación la construcción de estas grandes facilidades, que muchas veces involucran varias naciones, ha crecido debido a las utilidades y a la aceptación por la comunidad científica general. Las facilidades han sido ordenadas históricamente por sus usos y capacidades tecnológicas en 4 grupos [Robinson 2009]:

1- Primera Generación: con posterioridad a la observación de la radiación sincrotrón se llevaron a cabo la construcción de una serie de sincrotrones (especialmente en la década de los 70') donde el objetivo principal era la investigación de los fenómenos que involucraban la aceleración de electrones. Eran equipos destinados al estudio de física de partículas. Sin embargo sus aplicaciones eran de interés para el resto de la comunidad científica y de ahí nace una segunda generación.
2- Segunda Generación: A partir de 1981 con la apertura del sincrotrón de Daresbury, Reino Unido nace una nueva era de sincrotrones dedicados a líneas de luz para aplicaciones específicas (difracción de

monocristales o de polvo, SAXS, absorción de Rayos X, etc). Estas facilidades involucraban grandes anillos que permitían acelerar electrones con energías entre 1-3 GeV y obtener haces brillantes con los que se lograban resultados en pocos segundos.

3- Tecera Generación: La tercera generación nace en 1994 de la mano del sincrotrón de Grenoble, Francia de 6 GeV. En estas facilidades el objetivo principal era mejorar el brillo de las fuentes antiguas logrando incluso cierta coherencia espacial de la radiación emitida. Estos anillos se caracterizan por sus grandes diámetros (más de 100 m generalmente) y que permiten no solo tener líneas de luz brillantes sino que además muchas estaciones de trabajo en el mismo predio.

4- Cuarta Generación: La última generación de sincrotrones son los *Free Electron Lasers* (FEL). En estos equipos mediante aceleradores lineales a base de supercoductores con longitudes de varios km de largo se generan láseres coherentes con un brillo un billón de veces superior a un sincrotrón ordinario. El objetivo principal de estas fuentes es las determinaciones ultra rápidas (fs) para aplicaciones de punta como la determinación estructural de macro proteínas y virus en molécula única (sin cristalizar).

En el mundo existen actualmente unos 73 sincrotrones [web: lightsources] dispersos por América, Europa, Asia y Oceanía, siendo Brasil el único país en América latina que posee este tipo de facilidades (Figura 1.10). Esta fuente de radiación de luz sincrotrón de segunda generación está localizada en Campinas,

San Pablo la cual posee un anillo de unos 30 m de diámetro y una energía de 1.37 GeV. Si bien es una fuente de segunda generación, la intensidad es suficiente para realizar cualquier medición de rutina en corto tiempo y gran parte de las experiencias de última generación que se realizan actualmente. No obstante, Brasil tiene proyectado la construcción de un sincrotrón de 3ra generación para fines de esta década que contará con una energía de 3 GeV. Esta facilidad podría convertirse en una de las fuentes más brillantes del mundo.

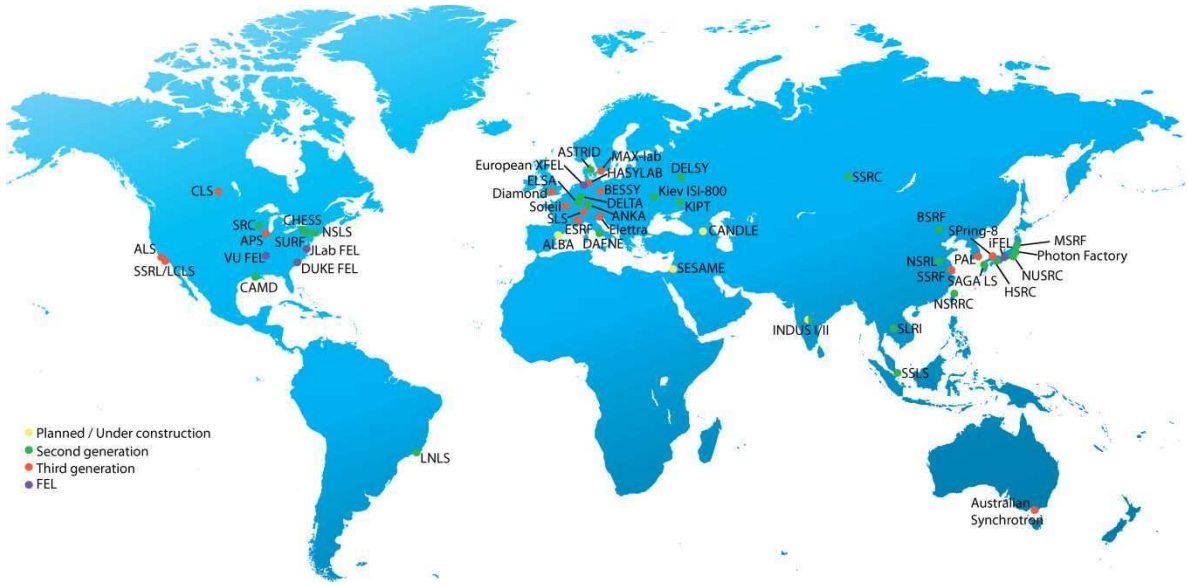

Figura 1.10. Distribución de Sincrotrones en el planisferio. En América Latina el sincrotrón de Campinas, San Pablo, Brasil (LNLS) es la única facilidad de esta clase. [web: Diamond]

1.5.4.2. SAXS en Sistemas Diluidos

La dispersión de rayos X en átomos es debida principalmente a los electrones, siendo la contribución del núcleo despreciable. La amplitud resultante de un electrón libre derivado del electromagnetismo clásico es proporcional al cuadrado de su carga en el vacio “e” e inversamente proporcional a su masa “m” como se expresa en la Ecuación 8 [de Oliveira Neto et al. 2008]

$$A_e = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_o c^2 m}$$ Ecuación 1.8

Donde “c” y “ε_0” representa la velocidad de la luz y la permitividad en el vacío respectivamente. El poder dispersante de un átomo aumenta linealmente con su número atómico. Para sistemas bifásicos la amplitud de la onda dispersada (A) se puede expresar empleando la teoría cinemática y despreciando dispersión multiple y absorción como una integral de volumen [Craievich 2005]:

$$A(\mathbb{q}) = \int_V \rho(\mathbb{r})\mathrm{A_e}\exp\,[-i.\mathbb{q}.\mathbb{r}]dv$$ Ecuación 1.9

Donde $\mathbb{r}$ representa las coordenadas en el espacio real y “$\rho(\mathbb{r})$” la densidad electrónica del objeto. A_e es la amplitud del electrón libre (Ecuación 1.8). La amplitud no es otra cosa que una transformada de Fourier de la densidad electrónica del objeto dispersante.

El problema principal de las técnicas de dispersión y difracción es que en el detector se registran intensidades. Se cuenta el número de fotones pero no se registra su fase. La intensidad se puede expresar con la siguiente expresión: $I(q)=|A(q)|^2$. Al medir la intensidad y perderse la fase de la onda dispersada lo que se pierde es la información del objeto como se demuestra en el ejemplo clásico de la Figura 1.11 [web: Fourier], donde se realiza la transformada de Fourier de un pato y un gato descomponiéndose las funciones forma del objeto en amplitud y

fase. Luego se suma la fase del pato con la amplitud del gato y la amplitud del pato con la fase del gato para realizar una transformación inversa. Al regenerar la imagen en el espacio real se demuestra que en ambos casos la información de la imagen está principalmente contenida en la fase. Es por ello que antes de interpretar un patrón de dispersión hay que tener una noción previa del sistema objeto de estudio.

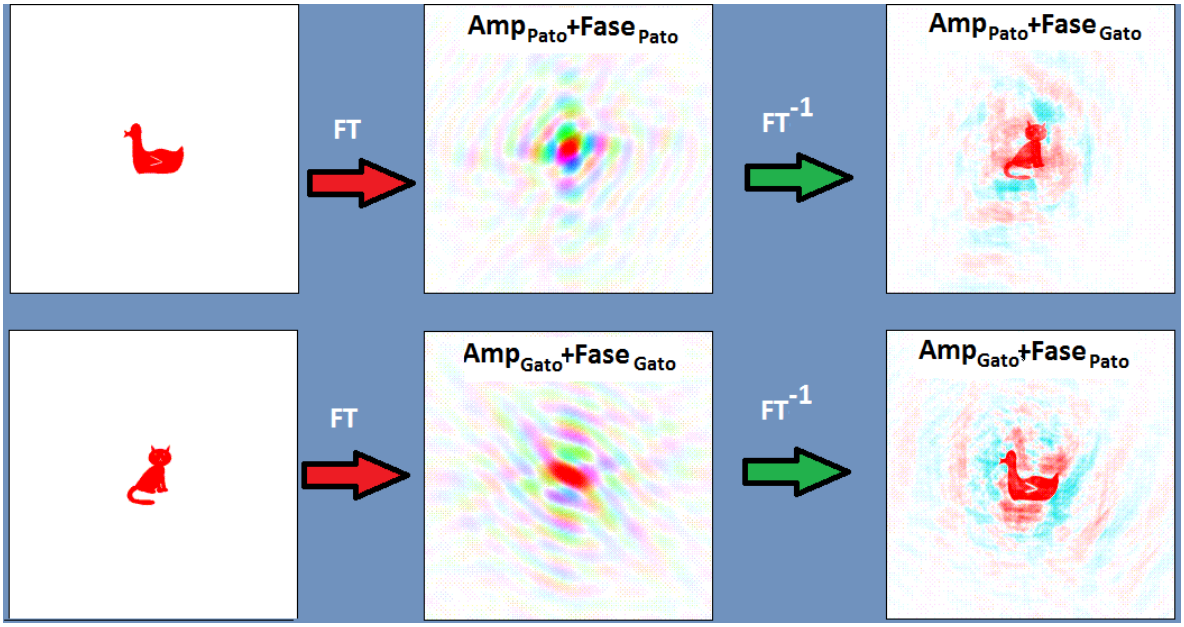

Figura 1.11. Transformación de Fourier (FT) de dos imágenes monocromáticas y reconstrucción (FT^{-1}) de las mismas luego de mezclar la fase y amplitud de ambas figuras.

En SAXS el cuadrado del módulo de la amplitud de un objeto se lo conoce como factor de forma, y como su nombre lo indica está relacionado con la geometría del elemento dispersor y se lo caracteriza con la letra P: $P(q)=|A(q)|^2$. En sistemas diluidos la intensidad dispersa es proporcional a la cantidad de dispersores (n) y al cuadrado de la diferencia de densidades electrónicas ($\Delta\rho$) entre el medio continuo y el objeto [Oliveira 2011].

$$I(q) \propto n\,\Delta\rho^2\,P(q)$$ Ecuación 1.10

SAXS es una técnica de dispersión de luz estática, es decir se observa la intensidad media registrada en un lapso de tiempo. Generalmente los coloides suspendidos en una solución tienen libre traslación y rotación. La primera no afecta a la intensidad total (es un invariante de la transformada de Fourier) pero la rotación se ve reflejada en la intensidad media registrada. A las muestras sin restricciones en los grados de libertad rotacionales y traslacionales se las denomina isotrópicas dado que el detector registra la intensidad proveniente de todas las posibles configuraciones. En la Figura 1.12 se simula un detector bidimensional utilizando el programa gratuito SASfit (de libre empleo) [web: SASfit] y se exhibe la intensidad representada en un mapa de colores (en rojo se registra la señal más intensa y en azul la de menor intensidad), de dos muestras geométricamente anisotrópicas similares. En la primera el movimiento es libre mientras que en la segunda están restringidos los grados de libertad rotacionales. Se simularon cilindros de 50 nm de largo por 10 nm de radio, analizando siempre muestras diluidas. La longitud de onda empleada fue de λ=1.54 Å equivalente a la línea K_α del cobre [Bearden 1967]. Como la relación tamaño/λ es del orden de 10^2 la intensidad dispersada se encuentra a bajos ángulos y es por ello que se estableció una distancia de la muestra al detector (256 x 256 pixeles de 0.25 mm^2 de área cada uno) de 2 metros. En muestras isotrópicas las diferencias en la intensidad se miden radialmente tomando el punto de incidencia del haz como centro. Este procedimiento tiene la ventaja que se puede reducir la imagen que

registra el detector a un gráfico unidimensional realizando una integración angular (ver sección materiales y métodos), mientras que las muestras que son anisotrópicas poseen un patrón bidimensional definido que no puede ser expresado unidimensionalmente y por esta razón se trabaja directamente sobre la imagen.

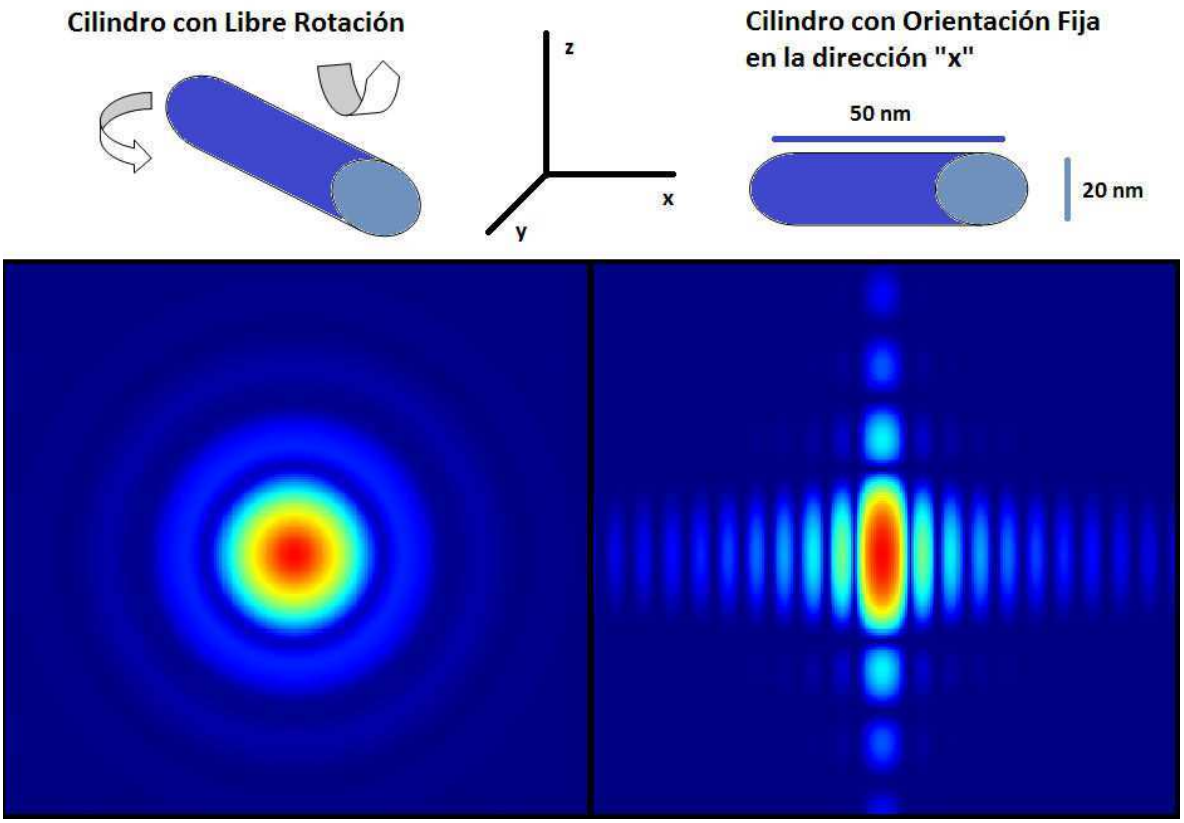

Figura 1.12. curvas simuladas de patrones de dispersión de rayos X a bajos angulos para suspensiones cilíndricas monodispersas y diluidas de 10 nm de radio y 50 nm de largo a la derecha se muestra un sistema con orientación libre (isotrópica) y a la izquierda un sistema orientado. Detector a 2 metros, 256 pixeles de 0.5 mm de lado con una longitud de onda de 1.54 A.

1.5.4.1 SAXS en Sistemas concentrados

Cuando la concentración de las partículas es tal que el camino libre medio entre los objetos es comparable con la dimensión de los mismos, o bien, estos

objetos forman parte de alguna estructura jerárquica mayor aparecen patrones de interferencia en los diagramas de dispersión que se caracterizan agregando un factor de estructura S(q) [Pedersen 2001] que está relacionado con la transformada de Fourier de la función de distribución radial en sistemas isotrópicos. Para sistemas bifásicos monodispersos la intensidad es proporcional a:

$$I(q) \propto n\,\Delta\rho^2\,P(q)S(q) \qquad \text{Ecuación 1.11}$$

La interpretación de los diagramas de dispersión puede ser muy variada y con diferentes grados de complejidad dependiendo de si la muestra posee además una distribución de tamaños. La interpretación de los patrones de SAXS no es unívoca por lo que cada sistema tiene que ser abordado de manera adecuada.

1.5.5 Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

Las técnicas basadas en resonancia magnética nuclear son de uso habitual en química y biología estructural de moléculas pequeñas como de macromoléculas [March et al. 2012; Hong, Zhang & Hu 2012]. Es habitual hallar en bibliografía específica trabajos donde se analiza el desplazamiento químico de un cierto isótopo con momento de spin no nulo bajo un campo magnético intenso (2-15 T). Sin embargo, hay fenómenos colectivos que pueden ser cuantificados a campos bajos (~0.5 T) y que dan información de la movilidad molecular.

1.5.5.1 Principios básicos

Una muestra no magnética, con momento de spin no nulo, bajo la influencia de un campo estacionario $\mathbb{B}_0$, presenta una ruptura en la degeneración de estados de spines nucleares con una diferencia de energía proporcional al campo aplicado y a propiedades intrínsecas del núcleo (Efecto zeeman). La distribución de número de estados puede interpretarse con una distribución de Bolztmann. Esta distribución de estados puede verse perturbada por la presencia de un campo rotatorio o por la incidencia de un pulso de radio frecuencias (RF) sintonizada a la longitud de onda de resonancia del nucleo [Macombers 1998]. Luego de aplicar un pulso en la frecuencia de resonancia a un angulo θ respecto del eje principal paralelo al campo (eje z) sobre la muestra (Figura 1.13) pueden reconocerse dos fenómenos de relajación diferentes que reestablecen las condiciones iniciales: La relajación spin-red, caracterizada por un tiempo T_1 (Conocida como relajación longitudinal: relaja en el eje z) y la relajación spin-spin, caracterizada por un tiempo T_2 (relajación transversal: relaja en el plano x,y). El tiempo T_1 corresponde a los procesos en los cuales se reestablece la distribución Bolztmanniana de los estados de spin bajo el campo magnético B_0 mientras que T_2 corresponde a la perdida de coherencia de fase en el núcleo [Ruan & Chen 1998], siendo T_2 menor o igual a T_1. Las mediciones suelen realizarse con la aplicación de pulsos consecutivos de 90, 180 y 270º respecto al eje principal.

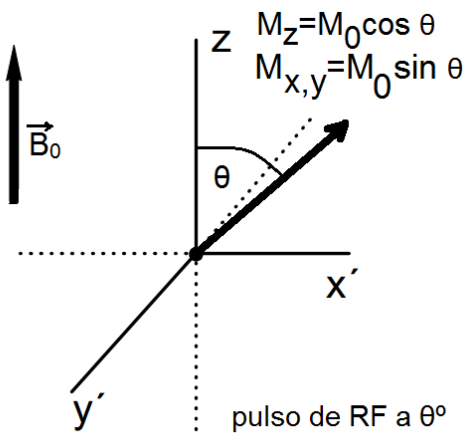

Figura 1.13. Una muestra bajo un campo magnético B_0 orientada en el eje preferencial "z" luego de aplicarle un pulso en la frecuencia de resonancia del nucleo a un angulo θ. La flecha indica el vector magnetización orientado en la dirección del pulso y se descompone según su proyección en el eje principal "M_z" y la componente del plano x,y "$M_{x,y}$"

1.5.5.2 Tiempo de Relajación Longitudinal (T_1)

El tiempo de relajación longitudinal, o también llamado relajación spin-red es debido a la interacción del momento dipolar de los núcleos con las fluctuaciones estocásticas del campo magnético causado por los movimientos de los dipolos del medio. La energía del núcleo resonante es transferida hacia los componentes de la matriz en forma de energía cinética (rotaciones, traslaciones y vibraciones) hasta establecer el equilibrio térmico. Debido a que la magnetización a lo largo del eje z es difícil de detectar, las mediciones de T_1 suelen estar acompañadas de pulsos consecutivos con diferentes orientaciones. La relación entre T_1 y el tiempo sigue un decaimiento exponencial de la forma:

$$M_z(\tau) = M_0\left(1 - 2\exp\left[-\frac{\tau}{T_1}\right]\right) \qquad \text{Ecuación 1.12}$$

1.5.5.3 Tiempo de relajación transversal (T_2)

El tiempo de relajación transversal o spin-spin es un proceso adiabático (no intercambia energía con el medio). Es causado por intercambio mutuo de los estados de spines vecinos. Existen propuestos varios mecanismos por los cuales la relajación T_2 tiene lugar; siendo el más importante el acoplamiento entre dipolos de dos núcleos cercanos y está básicamente gobernado por la segunda ley de la termodinámica. Esto quiere decir que en ausencia de fuerzas externas, el sistema relajará a fin de maximizar la entropía sujeta a condiciones de vínculos [Macombers 1998]. La curva de decaimiento se la denomina FID (*free induction decay*) y es posible obtenerla con un simple pulso de 90º respecto al eje principal sin problemas (siempre que el campo magnético sea perfectamente homogéneo) [Colquhon & Goodfellow 1994]. La Ecuación 1.13 muestra la dependencia del tiempo con la magnetización del plano (x,y).

$$M_{x,y}(\tau) = M_0\, exp\left[-\frac{\tau}{T_2}\right] \qquad \text{Ecuación 1.13}$$

1.5.5.4 Tiempos de Relajación: Aplicaciones

Más allá del detalle estructural a nivel atómico que pueda extraerse de los espectros de NMR empleando campos altos, la medición de los tiempos de relajación en campos bajos ha ido creciendo dentro de la comunidad científica (aunque su difusión aun no es masiva). Los tiempos de relajación spin-spin se asocian a la movilidad molecular de los protones (para NMR de ^1H) y se ha utilizado para caracterizar el agua asociada a proteínas en solución [Ruan & Chen

1998], en microemulsiones [Acharya & Hartley 2012], u ocluida en geles [Liu et al. 2013]. Por otro lado, el tiempo de relajación T_2 decrece con la viscosidad del medio siendo menor para sistemas sólidos que para sistemas líquidos. Esta técnica analítica resulta adecuada para medir contenido de sólidos en muestras heterogéneas como grasas y aceites, tanto en *bulk* como en emulsiones [AOCS 1989; Huck-Iriart, Candal & Herrera 2009].

Los tiempos de relajación T_1 no están tan directamente relacionados con la movilidad molecular (más allá de que sus mecanismos de relajación principales sean disipativos). No obstante, en aspectos generales, crece con la viscosidad. Dado que la medición requiere más tiempo y estadística que la obtención del tiempo de relajación T_2, no es tan empleado como el segundo, sin embargo hay autores que empiezan a correlacionar el tiempo de relajación T_1 con propiedades interesantes como el tamaño cristalino en sistemas grasos [Adam-Berret et al. 2009].

2 Objetivos

2.1 Objetivos Generales

Estudiar los mecanismos físicos de desestabilización de emulsiones de aceite en agua, formuladas con caseinato de sodio como emulsificante: floculación, coalescencia, coalescencia parcial, cremado, gelificación.

2.2 Objetivos específicos

Emulsiones de caseinato de sodio:

- Estudiar la relevancia de la composición de la fase continua, fase dispersa y el procesamiento de la muestra sobre su estabilidad.
- Caracterizar la estructura y evolución temporal a diferentes escalas espaciales del caseinato de sodio en Solución y en emulsiones mediante técnicas no perturbativas.

Cristalización en la fase dispersa:

- Estudiar el efecto de la cristalización de la fase lipídica en la desestabilización de las emulsiones de caseinato de sodio por coalescencia parcial.
- Estudiar el efecto de aditivos sobre la nucleación de la fase grasa en emulsiones.

Transición emulsión-gel:

- Obtener condiciones de formación de geles por acidificación homogénea a partir de emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio.
- Caracterizar la evolución estructural de las emulsiones durante las etapas de gelificación.

3 Métodos experimentales

3.1 Preparación de emulsiones

Todas las emulsiones estudiadas fueron del tipo aceite en agua (O/W) es decir la fase continua fue acuosa y la fase dispersa hidrofóbica. Esta última consistió en aceite y/o grasa. Esas fases inmiscibles se pre-equilibraron entre 40 y 50ºC. De esta forma la fase dispersa fue siempre un líquido y en el caso en el que se empleó aceite la homogenización fue más eficiente a alta temperatura. Luego de pre-calentar las fases se emulsionaron utilizando un agitador Ultra-Turrax (UT) T18 (paleta S 18N-5G, IKA Labortechnik, Janke & Kinkel, GmbH &Co., Staufen, Alemania) operado a 20000 rpm realizando tres repeticiones de un minuto continuo con un intervalo de un minuto de reposo. Estas emulsiones las denominaremos *emulsiones groseras* (EG) debido a que el diámetro medio de gota de la función de distribución expresada en volumen ($D_{4,3}$) supera los 10 µm. Una fracción de las EG se sonica durante veinte minutos en un equipo de ultrasonido para procesamiento de líquidos Vibra Cell, VCX modelo 750 (Sonics & Materials. Inc., Newtown, CT, USA), obteniéndose emulsiones de menor diámetro cuyo $D_{4,3}$ está por debajo del micrón. Estas emulsiones serán denominadas *emulsiones finas* (EF). En el proceso de sonicado se utilizó una celda de vidrio termostatizada a 15ºC con control de temperatura que interrumpe el proceso cuando la temperatura de la emulsión alcanza 50 ± 1 ºC para evitar sobrecalentamientos y desnaturalización del caseinato de sodio (NaCas). El estudio dinámico y estructural de las emulsiones se realizó tanto en EG como en EF como lo ilustra la Figura 3.1.

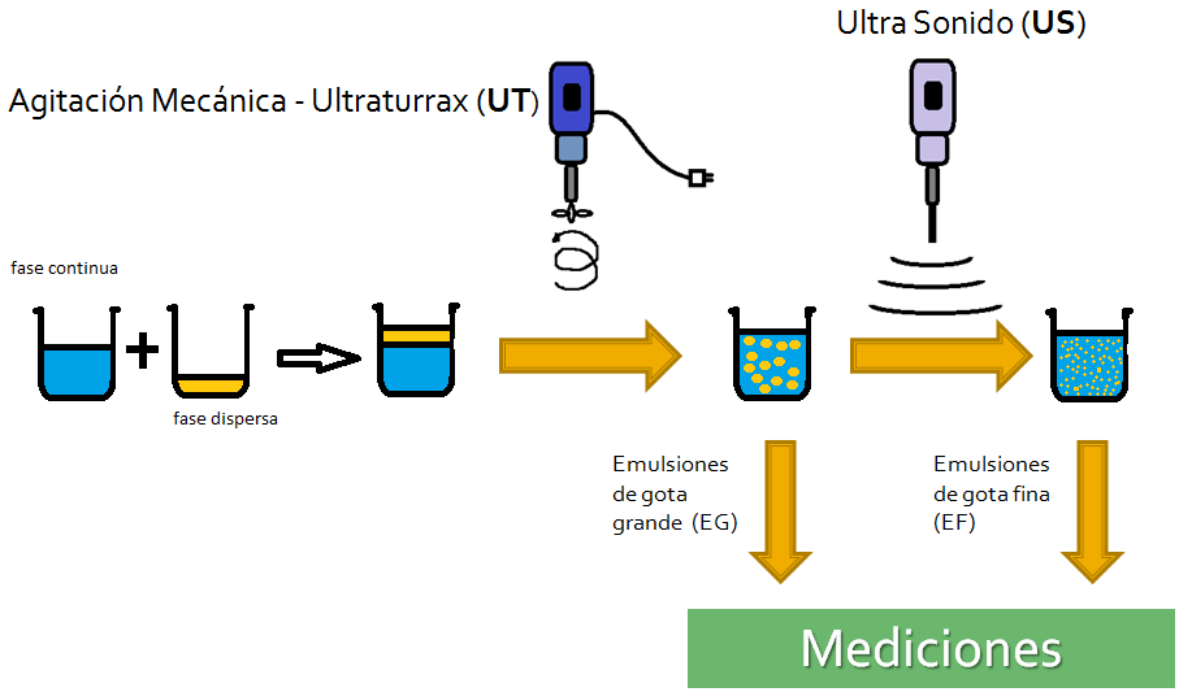

Figura 3.1. Esquema de preparación de Emulsiones.

3.2 Determinaciones

3.2.1 Determinación de tamaño de gota

La distribución de tamaño de gota de las emulsiones fue determinada inmediatamente después de la preparación de las mismas utilizando un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) Mastersizer 2000 (Figura 3.2) con una unidad de dispersión Hydro 2000MU (Malvern Instruments Ltd., UK). Se utilizaron un índice de refracción de la fase dispersa de 1,488 y su parámetro de absorción (índice de refracción imaginario) de 0,001.La velocidad de la bomba fue fijada en 1800 rpm.

Figura 3.2. Equipo de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) Mastersizer 2000

Este equipo no trabaja en condiciones estancas, sino que mide las fluctuaciones del laser incidente dentro de un fluido en movimiento. La interpretación de las fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada es analizada según la difusión de partículas en dicho fluido. A fin de evitar *multiple-scattering* se diluye un volumen pequeño de emulsión en un vaso de precipitado con agua bidestilada hasta llegar a concentraciones tales como para medir con buena estadística. El amplio rango de detección de tamaños (0.02-2000 μm) se logra utilizando dos láseres simultáneos (Rojo: He-Ne y Azul: Laser de estado sólido) y múltiples detectores. En la Figura 3.3 se esquematiza el paso óptico del equipo. La difracción por material particulado o defectos ópticos previos a la ubicación del porta-muestra se elimina mediante lentes y filtros espaciales. La radiación láser incide sobre una cubeta interna transparente por donde circula la emulsión diluida. La intensidad se registra con un arreglo de detectores obteniendo un amplio patrón angular de luz dispersada con una buena sensibilidad. El software incorporado en el equipo traduce este patrón en la correspondiente distribución de tamaño de partícula. Al ser las emulsiones suspensiones de gotas esféricas no fue necesario realizar tratamientos numéricos posteriores.

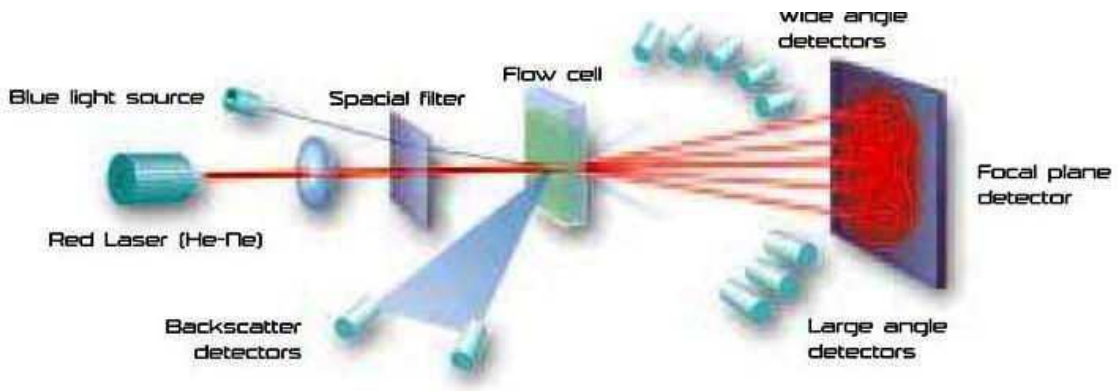

Figura 3.3. Esquema de funcionamiento del Mastersizer 2000

Debido a que las formas de las curvas de distribución de tamaño de partícula resultan muy diversas, habitualmente se emplean tres parámetros para caracterizar y comparar las muestras entre sí: el promedio, el ancho de distribución y el sesgo. Los efectos de migración son marcados en partículas grandes (escala con el cuadrado del diámetro "D") siendo conveniente presentar la distribución en número "F(D)" pesadas por el volumen "V(D)" de las partículas esféricas. El promedio de la distribución en volumen normalizada es:

$$D_{4,3} = \frac{\int_0^\infty F(D)V(D)\ D\ dD}{\int_0^\infty F(D)V(D)dD} = \frac{\int_0^\infty F(D)D^4\ dD}{\int_0^\infty F(D)D^3 dD} \approx \frac{\sum N_j\ D_j^4}{\sum N_j\ D_j^3}$$ Ecuación 3.1

Donde la integral numérica se realiza con sumatoria sobre el número de partículas N_j que poseen un diámetro D_j. La polidispersidad se infiere a partir del ancho de la curva por una diferencia de percentiles en la función de distribución volumétrica.

$$W = [d(v, 0.9) - d(v, 0.1)] \qquad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde d (v, 0.9) y d (v, 0.1) representan los volúmenes correspondientes a los percentilos 90 y 10% de la población, respectivamente. Los sesgos de la distribución se pueden analizar calculando el área de la curva normalizada correspondiente a partículas mayores a 1 μm de diámetro. Para el $D_{4,3}$ los valores de desviación estándar fueron menores al 2%. Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se promediaron. En la Figura 3.4 se ejemplifica los tres parámetros empleados para caracterizar la distribución de tamaños de las emulsiones. Las curvas habitualmente presentan sesgo y en varias ocasiones poseen más de un máximo.

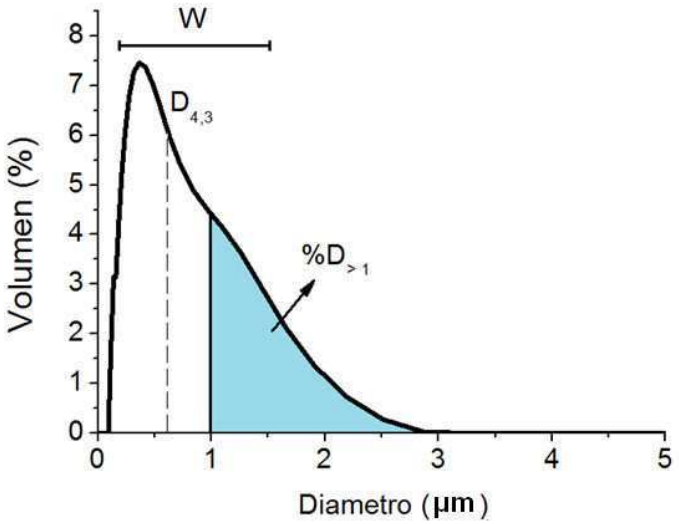

Figura 3.4. Representación de una distribución en volumen normalizada y los tres parámetros estadísticos que se utilizarán para caracterizar la polidispersidad: Un diámetro promedio $D_{4,3}$, el ancho de la curva (W) determinado por la diferencia entre los percentiles 0.9 y 0.1 de la distribución y el porcentaje de partículas mayores a 1 µm.

3.2.2 Estabilidad de las emulsiones

El análisis de la estabilidad de emulsiones y dispersiones se realizó utilizando un analizador óptico vertical Turbiscan® MA 2000 (Formulaction, Toulouse, France) (Figura 3.5) que permite el seguimiento de los procesos físicos que ocurren comúnmente en una dispersión coloidal como son la migración (sedimientación/cremado) o formación de agregados (floculación/coalescencia).

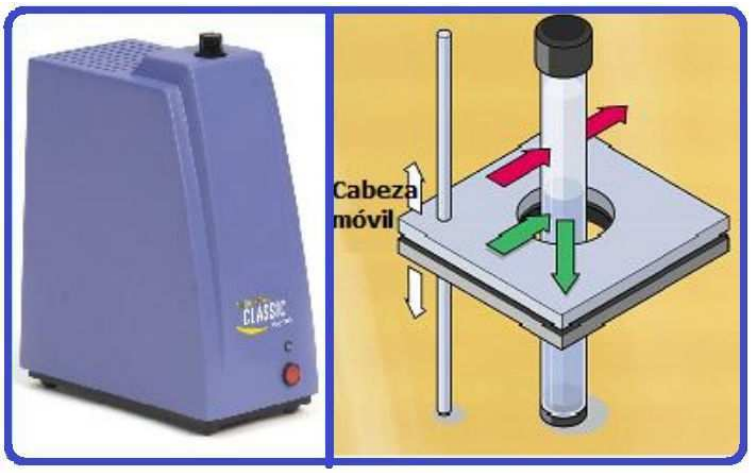

Figura 3.5. Equipo Turbiscan MA 2000 a la izquierda. A la derecha se encuentra un esquema del tubo que contiene la muestra y la detección a lo largo del tubo porta-muestra.

Este equipo permite la caracterización óptica en el tiempo de cualquier tipo de dispersión coloidal [Mengual et al. 1999b]. El mismo está constituido por un cabezal con desplazamiento axial paralelo a una celda cilíndrica de fondo plano de un centímetro de paso óptico, donde se encuentra la muestra como ejemplifica la Figura 3.5. El cabezal consta de una fuente de luz pulsada de infrarrojo cercano (NIR λ = 850 nm) y dos detectores sincronizados. Un detector registra la transmisión a través de la muestra (0º) mientras que otro detector registra la intensidad de luz dispersada a 135º. La detección simultanea se realiza barriendo 80 mm de la longitud del tubo contenedor. Para observar cremado o espuma la altura de muestra dentro del tubo no debe superar los 60 mm.

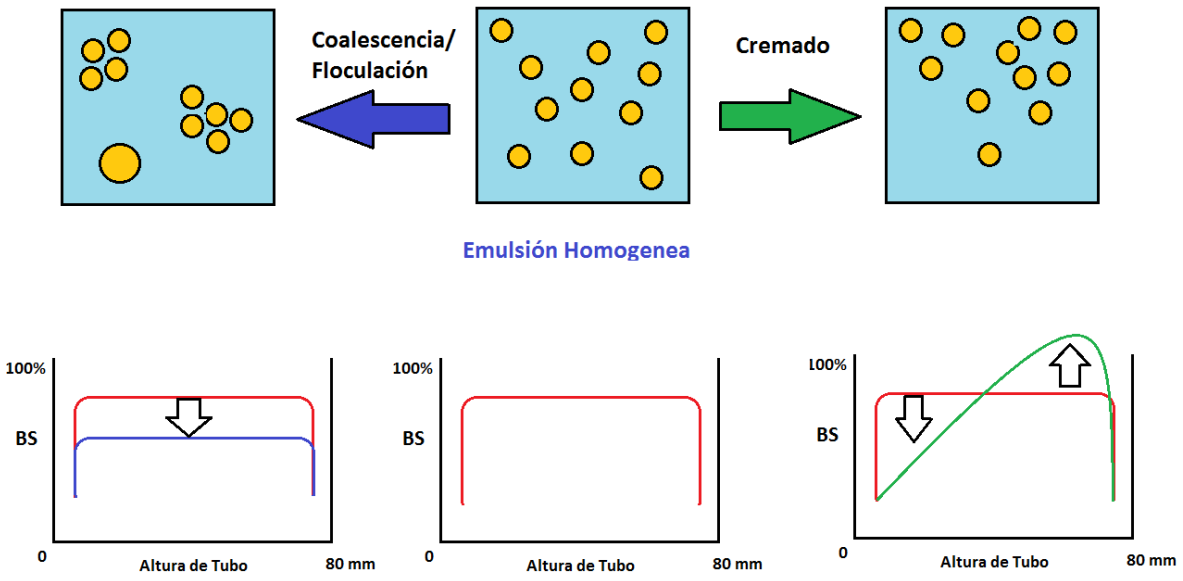

Figura 3.6. Esquema de funcionamiento del Turbiscan ®, En el ejemplo se muestra una emulsión concentrada homogéneamente distribuida (centro) a lo largo de un tubo la cual puede desestabilizarse por coalescencia/floculación (izquierda) o por cremado (derecha). La flecha denota el transcurso del tiempo.

Los principios físicos que rigen el funcionamiento del equipo fueron descriptos en la Introducción sección: 1.5.3. Si bien el equipo es capaz de detectar simultáneamente la transmisión y el backscattering de una muestra, la primera decae rápidamente para una emulsión concentrada (Ecuación 8) por lo que en este caso se seguirán principalmente los cambios en BS para describir su comportamiento. El esquema de la Figura 3.6 ejemplifica el accionar del analizador vertical en una emulsión homogénea que se desestabiliza o bien por coalescencia/floculación o por cremado unicamente. Un coloide homogéneamente suspendido registra una intensidad de luz dispersada similar a lo largo del tubo. Ante un cambio en el tamaño del elemento dispersante, ya sea porque hay coagulación, o bien porque hay coalescencia de las partículas (sin cremado), el BS decae de manera homogénea en todo el tubo (para partículas mayores a la

longitud de onda). Mientras que en los procesos de migración (cremado para emulsiones alimentarias) hay un gradiente de concentración a lo largo del tubo. El aumento de partículas en el sobrenadante se refleja en un aumento de la luz dispersada en la parte superior del tubo acompañado de una disminución en la intensidad en el fondo del tubo debida a la disminución de la concentración de partículas o lo que es lo mismo una clarificación en esa zona.

Los perfiles de dispersión (BS) y transmisión (T) en función de la altura del tubo fueron estudiados en condiciones de reposo a 22.5ºC (hasta una altura del tubo de 60 mm). Esto permitió monitorear la evolución física del proceso de desestabilización con buena precisión y reproducibilidad. [Mengual et al. 1999]. Las mediciones se realizaron inmediatamente después de haber preparado las muestras y se repitieron durante periodos regulares de tiempo por lapsos variables dependiendo de la vida media esperada en cada experimento. Las mediciones de BS mostraron buena reproducibilidad entre los duplicados [Bordes et al. 2001]. En todos los casos, los valores no difirieron en más de un 0.2%.

3.2.2.1 Cinéticas de Cremado y Floculación

La dinámica de desestabilización de las emulsiones puede ser estudiada en detalle realizando mediciones en el tiempo. La determinación de estos perfiles permite la estimación de las velocidades de cremado, sedimentación, y separación de las fases, como así también el seguimiento de los procesos de floculación o coalescencia. Para tal fin, se debe sustraer el perfil de BS a tiempo inicial (t=*0)* del perfil a tiempo t: $\Delta BS_t = BS_t - BS_0$ (comúnmente denominado “modo referencia”).

En la Figura 3.7 se muestran dos emulsiones que desestabilizan una por cremado y otra por floculación tanto en modo normal como en modo referencia. Cuando se trata de una cinética de migración pura, las curvas se caracterizan por poseer un punto isosbéstico. Sin embargo, los mecanismos pueden ocurrir simultáneamente.

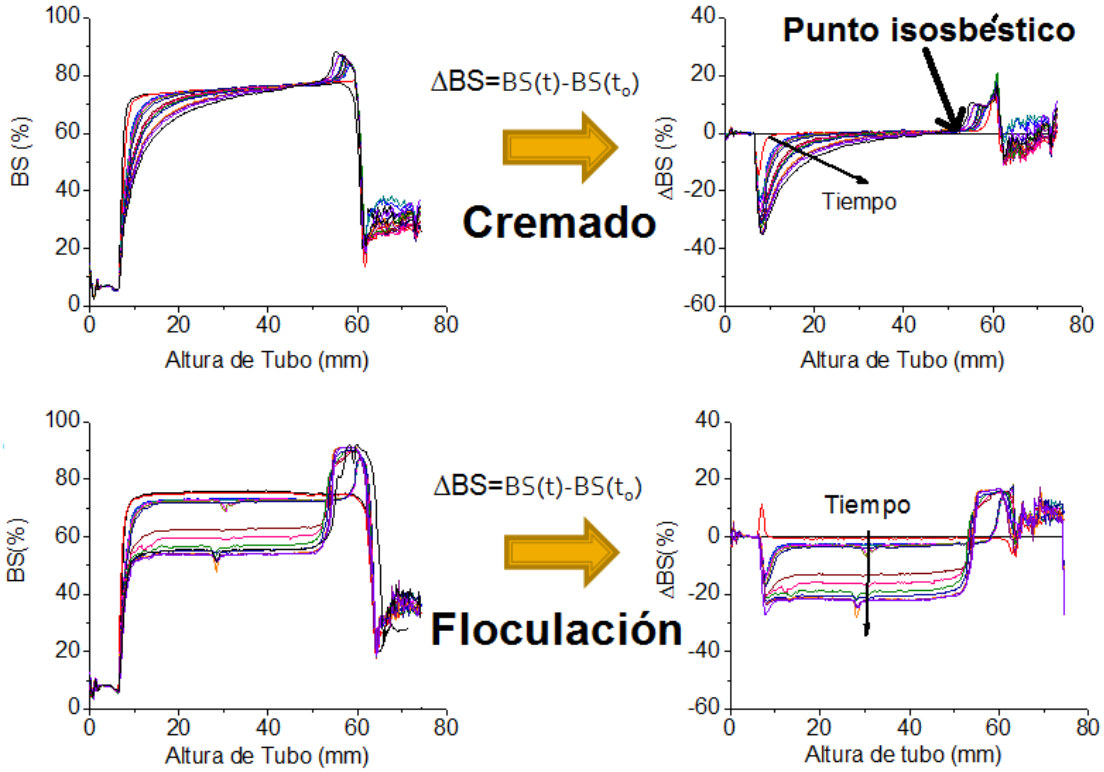

Figura 3.7. Ejemplo de cinética de cremado (parte superior) y floculación (parte inferior de la imagen) en modo normal (BS) y modo referencia (BS). La flecha insertada en el gráfico ΔBS en función de la altura de tubo denota la evolución temporal. Para cinéticas de migración pura se observa la presencia de un punto isosbéstico.

La cuantificación de la cinética de migración se realiza sobre los cambios en la concentración de partículas en la zona de clarificación del tubo (0-20 mm) debido a que en la parte superior del tubo puede formarse espuma. En la Figura

3.8 I se muestran típicos perfiles de cremado. Al restarle a los mismos la curva inicial (Figura 3.8 II), los perfiles resultantes exhiben una forma acampanada y cóncava en la zona inferior del tubo. Esta forma de presentar los perfiles se denomina modo referencia. A medida que el desplazamiento de partículas ocurre por una diferencia de densidades entre la fase continua y dispersa (Ecuación 3.3) la campana se hace más ancha. Graficando el ancho del pico formado en la zona 0-20 mm (medido a partir de los perfiles expresados en modo referencia) en función de la altura del tubo a diferentes alturas de pico (Figura 3.8 III) se encuentra un comportamiento lineal debido a que las partículas muestran una velocidad límitada por la viscosidad del medio. En la Figura 3.8 IV se grafica la pendiente de las rectas en función del porcentaje de retrodispersion (BS) calculado respecto del mínimo del pico formado en la zona 0-20 mm. Solo hay un factor dos entre la constante de la recta correspondiente a una altura del 30% respecto del mínimo y la de la calculada a una altura del 60%. Habitualmente en la literatura se emplea de manera arbitraria la constante de cremado que se obtiene de la pendiente de la recta resultante de medir el ancho de campana en función de la altura de tubo a una altura de pico del 50% del mínimo. Las diferencias entre las cinéticas de migración en las muestras pueden llegar a ser de órdenes de magnitud (ejemplo Figura 3.9). Esto permite hacer estudios comparativos entre las mismas.

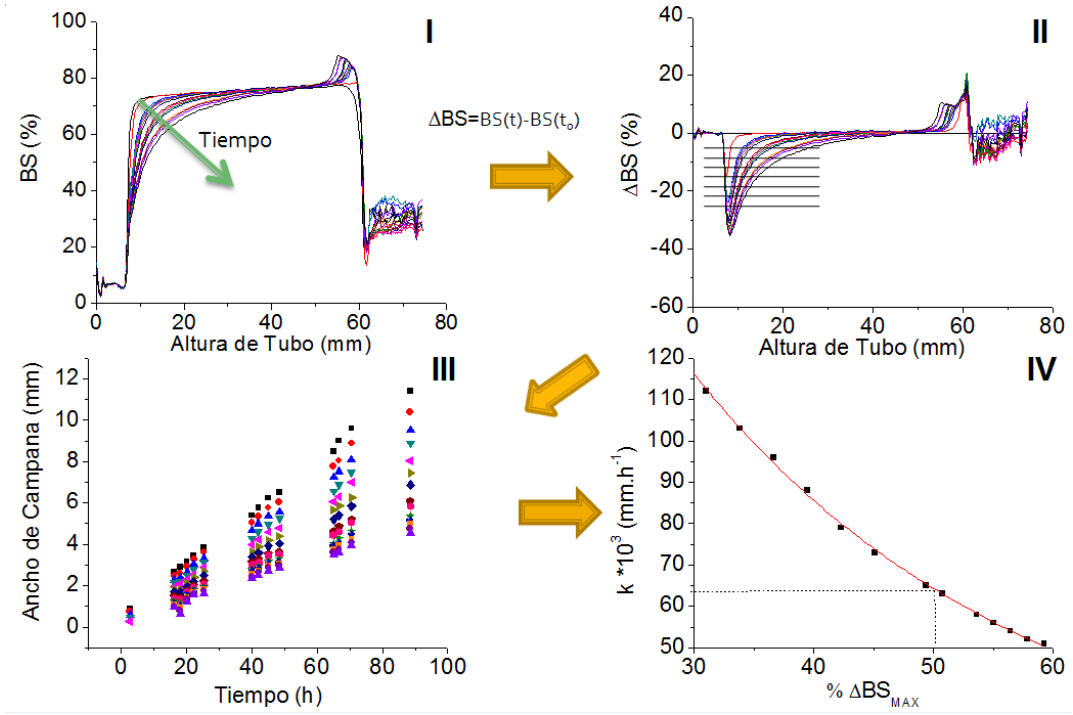

Figura 3.8. Esquema de trabajo para obtener constantes cinéticas de migración de partículas en el caso particular de desestabilización por cremado

Para suspensiones de esferas rígidas de diámetro "d" y fracción de volumen "ϕ" la cinética de migración debida a una diferencia de densidades "ρ" puede interpretarse según una expresión de Stokes modificada [Mills & Snabre 1994]:

$$K_{migración}(\emptyset, d) = \frac{\left|\rho_{dispersa} - \rho_{continua}\right| g\, d^2}{18\, \eta\, \rho_{continua}} \; \frac{1-\phi}{1 + {4.6\phi}/{(1-\phi)^3}} \qquad \text{Ecuación 3.3}$$

Esta ecuación es válida para suspensiones que alcanzan la velocidad límite ($K_{migración}$) debida a la viscosidad del medio continuo "η" donde "g" es la aceleración de la gravedad. En la Figura 3.9 se muestra como ejemplo dos emulsiones de aceite de girasol (~10% v/v) en agua con una diferencia de

densidades de 0,05 g/cm^3 a 22ºC con una viscosidad del medio continuo de 1cp. Se obtiene para cada emulsión una constante de migración de la pendiente como se ejemplificó en la Figura 3.8 y a través de la Ecuación 3.3 se estima el diámetro medio "d_{stokes}". Se observa que el orden de magnitud obtenido correlaciona con el diámetro medio calculado mediante DLS. Si bien por medio de DLS se calcula la distribución de diámetros a través de la difusión de partículas, este valor considera las traslaciones debidas al movimiento Browniano (ver sección 1.5.2) mientras que el diámetro medio obtenido por turbiscan se calcula a partir de los cambios en la concentración de partículas generados por la difusión causada por el empuje del medio continúo. Comparando ambas técnicas corroboramos que los valores calculados de la constante cinética de migración poseen un sentido físico y esto nos permite comparar muestras con mayor confianza.

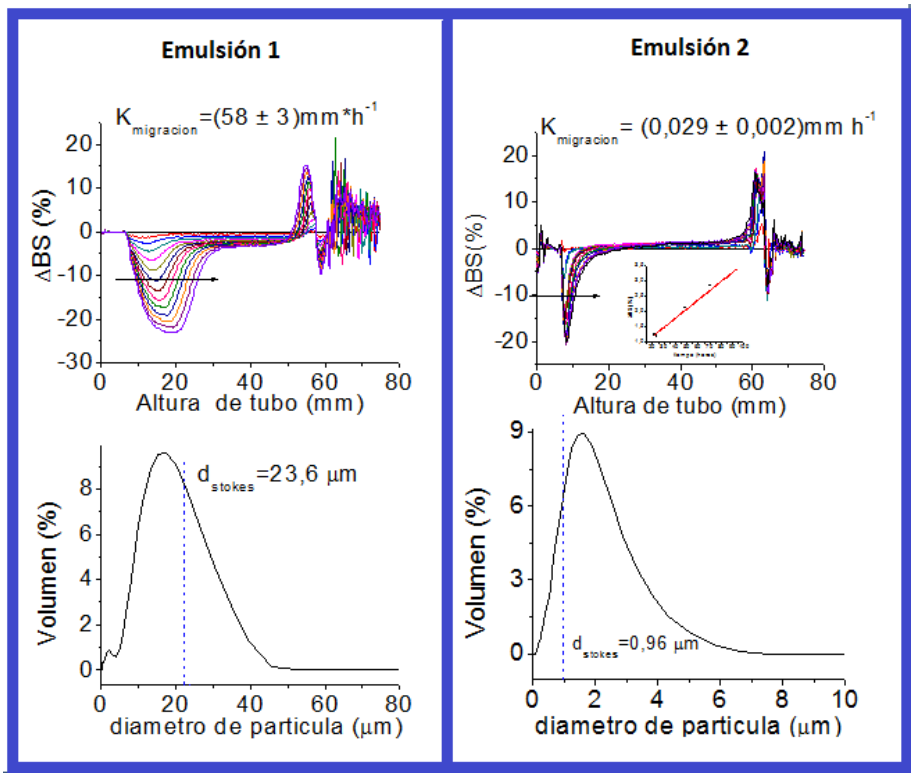

Figura 3.9. Cuantificación de la cinética de cremado de dos emulsiones alimentarias cuyos diámetros poseen un orden de magnitud de diferencia. La fracción volumétrica es del 10% con una viscosidad del medio continuo acuoso de 1 cp y una diferencia de densidades de 0.05 g/cm3 a 22ºC.

Cuando el fenómeno de desestabilización física de la emulsión es la floculación de los glóbulos los cambios en el BS ocurren a lo largo del todo el tubo. La cinética de formación de entidades mayores se logra promediando la intensidad en un intervalo de alturas de tubo (20-50 mm) en función del tiempo. Se suelen obtener perfiles del tipo exponencial decreciente [Alvarez-Cerimedo et al. 2010]. El cálculo de las constantes de cremado se desarrolla de manera más acabada en el anexo 1.

3.2.3 Dispersión de Rayos X a bajos Angulos

Los experimentos de dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS) se realizaron en el Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS), Campinas, San Pablo, Brasil. Esta facilidad posee un sincrotrón de segunda generación de 1.37 GeV y un anillo de 30 m de diámetro por donde circulan los electrones. El laboratorio posee dos estaciones destinadas a la dispersión a bajos ángulos (SAXS1 y SAXS2). Las mismas poseen diferentes características. Un esquema general del *setup* experimental se muestra en la Figura 3.10. La fuente de radiación proviene del anillo donde los electrones son acelerados a velocidades relativistas y al desacelerarse en las curvas del anillo emiten un espectro continuo de radiación electromagnética (sección 1.5.4). Los materiales tienen un índice de refracción para los rayos X cuya parte real es ~1 (similar al vacío) por lo que resulta imposible enfocar y colimar a través de un sistema de lentes [Yanagihara & Yamashita 2004]. La forma de seleccionar la longitud de onda de trabajo es a través de espejos curvos (la radiación se refleja a partir de un ángulo crítico que es función de la longitud de onda) o a través de monocristales por refracción de Bragg [Yanagihara & Yamashita 2004] y se recorta finalmente la sección del haz con rendijas. La radiación monocromática incide sobre la muestra y los fotones dispersados se los colecta en un detector bidimensional. Debido a que muy pocos fotones son dispersados, la intensidad transmitida se la filtra con un *beamstopper* que evita el daño del detector.

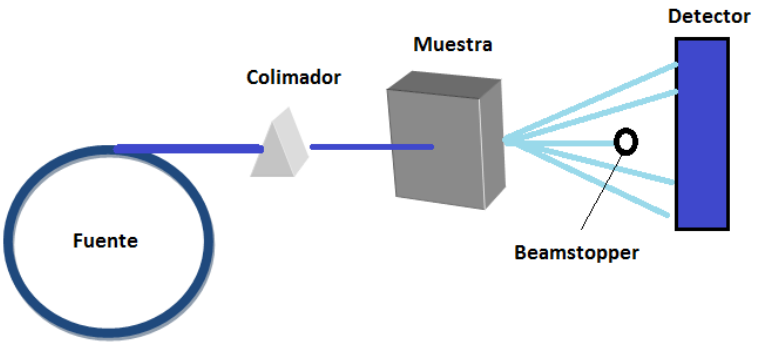

Figura 3.10. Esquema básico del setup experimental para dispersión de rayos X a bajos ángulos.

3.2.3.1 *SAXS1 y SAXS2*

El LNLS cuenta con dos estaciones de trabajo de diferentes especificaciones técnicas para realizar experimentos. En la Tabla 3.1 se enumeran las especificaciones principales de las dos líneas de luz destinadas a experimentos de SAXS. SAXS 1 (Figura 3.11) es una estación que posee un haz brillante y si bien su sección es menor a la del haz de SAXS 2 (Figura 3.12) tiene la ventaja que permite enfocar puntualmente. Esta estación además posee la flexibilidad de anexar un segundo detector para barrer ángulos más grandes de manera simultánea (Wide Angle X-Ray Scattering: WAXS) y otros suplementos adicionales como reómetro o calorímetro diferencial de barrido (DSC).

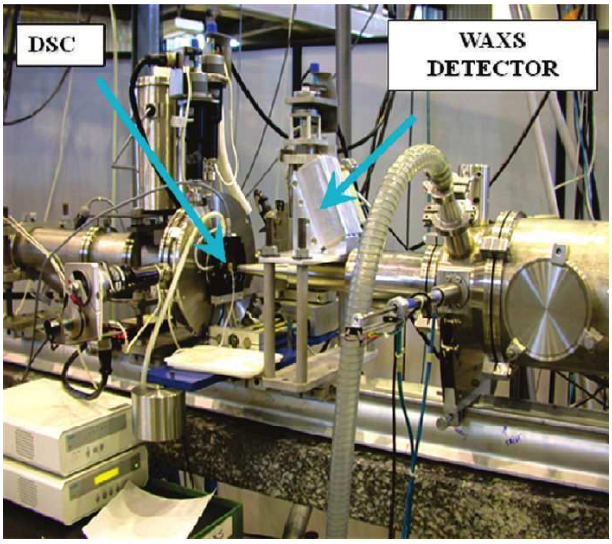

Figura 3.11. Fotografia del set up experimental de la estación SAXS 1

El detector Pilatus-300K es un contador de fotones que permite filtrar los mismos por energías, por ende, la detección de *scattering* elástico no se ve afectada por radiación de fondo u otros factores como fluorescencia de la muestra que se emite a longitudes de onda diferentes a las de la radiación incidente. Por otro lado el SAXS 2 permite barrer un amplio rango de ángulos debido a que el área del detector es mayor. Esta línea cuenta con porta muestras específicos para muestras líquidas permitiendo la caracterización de macromoléculas en solución como proteínas o liposomas [Gralle et al. 2002; Cavalcanti et al. 2005; Ramos et al. 2008]. El Detector, basado en CCD MAR-165, tiene la desventaja de que la radiación que colecta se ve afectada por la de fondo. Esto es algo que hay que tener en cuenta cuando se evalúan los datos.

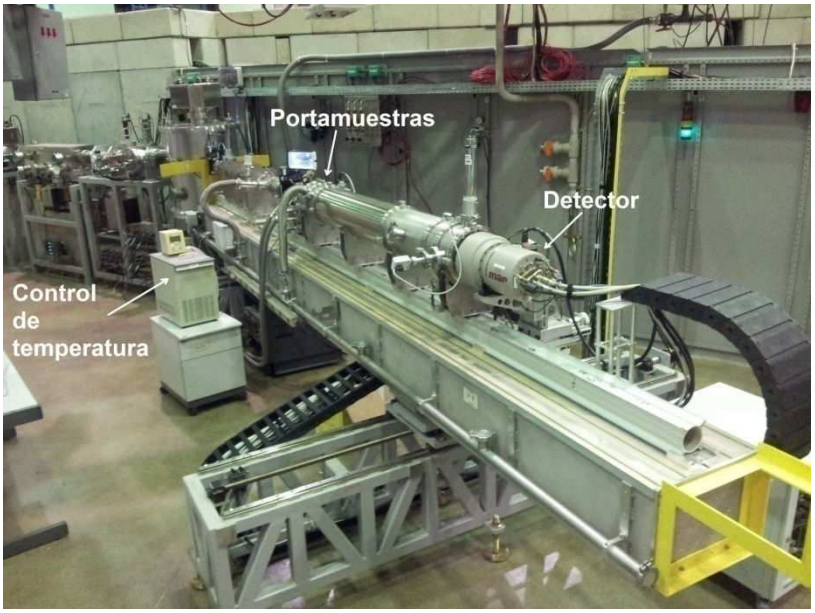

Figura 3.12. Fotografia del set up experimental de la estación SAXS 2

Tabla 3.1. Especificaciones generales de las estaciones SAXS 1 y SAXS 2 del LNLS.

	SAXS 1	SAXS 2
Rango de Energía (keV)	8,0	6,0-11,0
Resolución de Energía (ΔE/E)	0,1	0,1-0,8
Ancho del haz en la muestra (mm)	1.5 (horizontal) y 0.5 (vertical)	3 (horizontal) y 2 (vertical)
Flujo de fotones (fotones/seg) (1.37 GeV y 250 mA)	1012	1011
Óptica	Espejo toroidal multicapas (W/B4C) en un sustrato de silicio	Sustrato de silicio (1,1,1) y un espejo cilíndrico flexible con un recubrimiento de Rh.
Detector principal	Pilatus 300K: Contador de fotones individuales multimodular. Con un tamaño de 84x 107 mm de pixeles de 172x170 µm y una frecuencia de 200Hz.	MAR-165: Detector CCD integrador de modulo simple de 165 mm de diámetro y pixeles de 79x79 µm con una frecuencia de 1 Hz

3.2.3.2 Evaluación de Datos

En sistemas coloidales, donde la diferencia de intensidades se registra de manera radial tomando como centro el punto de incidencia del haz, es habitual contar con muestras isotrópicas (como se enunció en la sección 1.5.4). En la Figura 3.13 se ejemplifica la imagen que se forma con la información que llega al detector cuando la muestra es isotrópica. Se puede apreciar que se tiene una superficie con una escala de colores. Estos datos se pueden transformar en curvas de intensidad en función de "q" utilizando el programa libre Fit2D [Hammersley 1996] que permite integrar angularmente la intensidad como se indica en la figura de la izquierda dando la curva roja que se muestra a la derecha de la Figura 3.13.

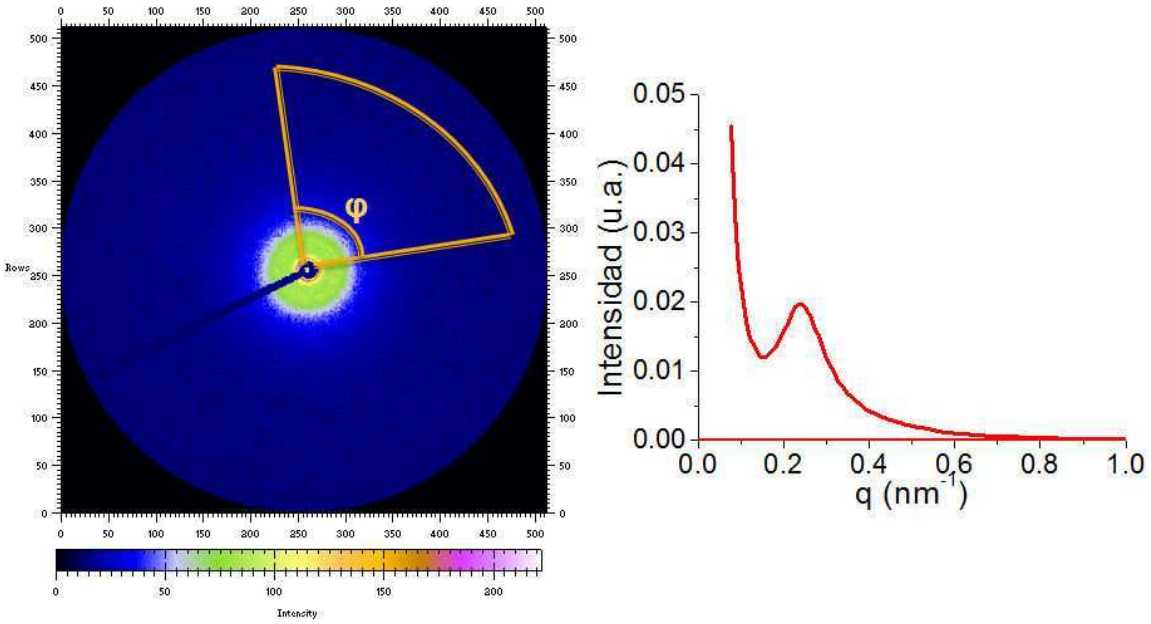

Figura 3.13. Imagen de una muestra isotrópica formada en un detector bidimensional (izquierda) y la integración angular que se realiza para obtener una curva Intensidad vs "q" utilizando el programa Fit2D (derecha)

Para obtener información del objeto dispersor es necesario descontar previamente las contribuciones del portamuestra, las interferencias generadas por la difracción de la rendija o bien aberraciones dadas por el ancho de banda del haz incidente, etc [Pedersen, Posselt & Mortensen 1990]. En la transformación de datos no se tendrán en cuenta los efectos de la rendija (se considera fuente puntual) y se aproximará el tratamiento suponiendo haz monocromático sin aberraciones ópticas y se trabajará en escala arbitraria (hay ocasiones en las que se debe trabajar en escala absoluta [Orthaber, Bergmann & Glatter 2000]). Por todo esto, la normalización de la curva unidimensional será:

$$I(q) = \frac{1}{Int_{Total}^{muestra}}[I^{muestra}(q) - BN] - \frac{1}{Int_{Total}^{Blanco}}[I^{Blanco}(q) - BN] \qquad \text{Ecuación 3.4}$$

Tanto a la muestra como al blanco se le resta la radiación de fondo (Black Noice: BN) la cual se obtiene realizando una medición en iguales condiciones que las que se emplearon para la muestra pero sin incidencia de luz (con el detector Pilatus-300K este paso es innecesario en principio). Luego se normaliza por la intensidad total “int_{total}” y se resta el blanco como se enuncia en la Ecuación 3.4.

3.2.3.3 Análisis de Datos

El estudio de los sistemas mediante SAXS puede ser variado dependiendo de la naturaleza de la muestra o el fenómeno físico estudiado. El mismo puede comprender el análisis de invariantes [Glatter & Kratky 1982] que permite el ajuste

de las curvas mediante funciones suaves (las cuales no asumen ninguna descripción previa del elemento dispersor) y se obtiene como resultado el diagrama de distribución de a pares (densidad electrónica del elemento dispersor [Fritz & Glatter 2006]. También es común determinar parámetros estructurales, como radio de giro de la partícula, que se obtiene con el empleo de funciones empíricas [Beaucage 1996; Hammouda 2010] o bien, asumiendo un modelo con sentido físico el cual requiere un conocimiento previo de la muestra [Pedersen 2001].

En la presente tesis se estudiaron dos tipos de sistemas: sistemas en fase homogénea y sistemas de dos fases en donde una fase es hidrofóbica y la otra hidrofílica. Los sistemas en fase homogénea pueden ser sólidos o parcialmente sólidos. Estos sólidos son cristalinos con celdas de distinta geometría que se identifican por señales a ángulos entre 5 y 30° y también presentan un orden de largo alcance con picos de difracción a bajos ángulos. Este es el caso de los sistemas grasos seleccionados para este estudio donde el análisis consta de la identificación y cuantificación de las fases polimórficas típicas que se detallan en la bibliografía [Cisneros et al. 2006; Ikeda et al. 2010] y la descripción de la evolución temporal de las mismas. Como sistemas de dos fases estudiamos suspensiones coloidales y geles. Estos sistemas se estabilizaron con caseinato de sodio y su descripción está fuertemente ligada a la caracterización de la estructura del caseinato de sodio en diferentes entornos la que se realiza mediante modelado de las curvas obtenidas analizando los sistemas objeto de estudio por dispersión de rayos X a bajo ángulo.

Uno de los métodos más utilizados para interpretar curvas de SAXS, mediante modelos físicos, es el empleo de rutinas de mínimos cuadrados [Pedersen 1997]. Los diagramas de dispersión suelen poseer varios órdenes de magnitud entre las intensidades a bajo ángulo y las de alto ángulo. Si se considera que la incertidumbre en cada punto experimental sigue una distribución Gaussiana, el modelado simplemente consiste en encontrar los parámetros que minimizan el χ^2 [Pedersen 2001]. Que se define como la suma de residuos ponderados por el cuadrado de la desviación estándar "σ" en cada punto.

$$\chi^2 = \frac{1}{N-M}\sum_{i=1}^{N}\frac{(I_i(q) - Im_i(q))^2}{\sigma_i^2} \qquad \text{Ecuación 3.5}$$

Donde el χ^2 está normalizado por los grados de libertad (N-M) siendo I_i y Im_i la intensidad experimental y modelada en el punto i-ésimo, respectivamente. Para obtener las varianzas en los puntos i-ésimos se programó una rutina numérica que ajusta la curva experimental con funciones continuas y derivables estimando los residuos del suavizado de las curvas (Anexo 2 y 3). El modelado posterior de los diagramas se realizó minimizando la función χ^2 bajo dos rutinas diferentes: Mínimos cuadrados no lineales (Anexo 3) y utilizando un algoritmo propuesto en esta tesis basado en simulación de Monte Carlo (Anexo 4).

3.2.4 Microestructura

El estudio estructural de emulsiones y geles comprende su caracterización a varias escalas espaciales. Las miscroscopias ópticas son una herramienta útil para obtener imágenes a escalas entre 1-1000 micrones. El problema principal para emulsiones y muestras cuasi-solidas es el bajo contraste. Es por ello que es necesario utilizar configuraciones ópticas adecuadas.

3.2.4.1 Microscopia Confocal de barrido laser

En 1961 Marvin Minsky (nacido en 1927) enunció los principios de la microscopía confocal. En los últimos 50 años, esta técnicas se han convertido en unas herramientas esenciales para la biología molecular, fisiología, histología y ciencia de alimentos [Xu 2011; Chu, Kollias & Luedtke 2011: Rincón-Cardona, Huck-Iriart & Herrera 2013b]. El arreglo óptico permite centrarse en el plano focal, filtrando el resto de la radiación emitida a través de un pequeño orificio o "*pin hole*" el cual se encuentra en el foco del objetivo. El uso de computadoras permitió el barrido a lo largo de los planos focales construyendo imágenes tridimensionales. El desarrollo de fluoróforos selectivos facilita el reconocimiento diferencial de los diferentes entornos que conforman la micro-estructura. En la Figura 3.14 se esquematiza un arreglo básico de un microscopio confocal de barrido laser. La fuente de radiación laser incide sobre un espejo dicroico (refleja la longitud de onda de excitación y es transparente a la emitida). La lente del objetivo enfoca sobre el espécimen de estudio y retorna sobre la lente. La luz filtrada por el pin

hole es detectada por un fotomultiplicador (PTM) y la información es recolectada y procesada por un ordenador.

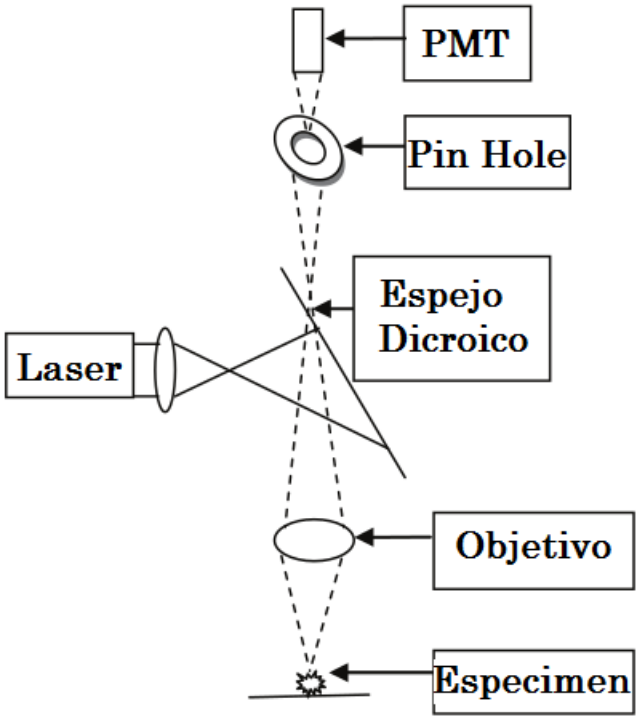

Figura 3.14. Esquema básico de un microscopio confocal.

Como se ha mencionado anteriormente, el uso de fluoróforos permitió el reconocimiento específico de entornos como sitios activos en un sistema biológico. La descripción de sistemas heterofásicos también puede realizarse utilizando la afinidad hidrofílica/lipofílica del colorante empleado. En la Tabla 2 se enumeran algunos fluoroforos que se emplean con esta técnica.

Tabla 3.2. Fluoróforos de empleo en microscopía confocal con barrido de láser y su correspondiente longitud de onda de excitación y emisión. [Rai & Dey 2011]

Fluoróforo	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Acridine yellow	470	550
Cumarina	384	470
Eritrosina	529	554
Fluoreceína	495	517
Nile Red	485	525
Pireno	341	376
Rodamina B	540	625
YOYO-3	612	631

Las imágenes que muestran la microestructura de las emulsiones estudiadas se adquirieron utilizando un microscopio confocal con barrido de láser Olympus FV300 (Olympus Ltd, London, UK) con un láser de Ar (λ = 488 nm) de 10 mW de potencia. Se usó una lente de 10x, en conjunto con objetivo de 20x, 60x y 60x con un zoom digital de 2,5 (150x). Se empleó una intensidad del láser del 20% para evitar la descomposición química del colorante. Las imágenes fueron colectadas con el software Olympus Flouview versión 3.3 provisto con el FV300 CLSM. El colorante usado para visualizar la fase grasa fue *nyle red* que es una molécula liposoluble y el laser utilizado tiene una longitud de onda cercana a la de excitación del colorante (Tabla 3.2).

3.2.4.2 Microscopía Optica de Luz Polarizada (PLM)

La primera cuantificación de la transmisión de luz polarizada por un analizador cristalino fue realizada por Étienne Louis Malus (1775-1812) quién vaticinó que este nuevo fenómeno abriría las puertas para comprender la interacción de la luz con la materia. El estudio de estos fenómenos continuó con

los trabajos de François Arago (1786-1853), Jean Baptiste Biot (1774-1862) y Henry Fox Talbot (1800-1877) entre otros [Kahr, Freudenthal & Gunn 2010]. Si bien desde los años 90 la microscopía de luz polarizada se centró principalmente en la cuantificación de la birrefringencia de la materia por luz lineal o circularmente polarizada [Vrijmoeth et al. 1998; Oldenbourg 2008], PLM ha sido una herramienta fundamental en la mineralogía y la cristalografía óptica en los últimos 200 años. Esta técnica se basa en las diferencias en la velocidad de propagación de la luz a través de los distintos ejes cristalográficos. Las propiedades ópticas que presentan los cristales están correlacionadas (si bien son diferentes) con las que se observan con la cristalografía de rayos X y su complementariedad es notable [Carlton 2011].

Figura 3.15. Esquema básico de un microscopio óptico de luz polarizada. La luz visible de la fuente se filtra con un polarizador lineal e incide sobre el portamuestras. La radiación transmitida por la muestra se amplifica con las lentes del objetivo y se filtra posteriormente con un polarizador lineal perpendicular al primero antes de ser adquirida por el observador.

En la Figura 3.15 se expone un esquema básico del funcionamiento del PLM. La fuente suele ser una lámpara halógena de tungsteno. Se colocan dos polarizadores lineales con orientación perpendicular. El primero es anterior al portamuestras y el segundo previo al observador. Cuando no hay muestra (o bien

es una muestra isotrópica) el campo se observa oscuro. Con la formación de cristales se produce la aparición de color y fenómenos de interferencia que son consecuencia de la estructura cristalográfica, y se pueden seguir fenómenos como la agregación de cristales y apreciar sus características superficiales [Rincon-Cardona et al. 2013a].

En la presente tesis se analizarán los efectos de cristalización de materias grasas y su relación con la estabilidad de emulsiones (ver capitulo 2) para lo que se utilizará un microscopio de Luz Polarizada Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipado con una plataforma dotada de un Peltier capaz de controlar la temperatura entre 5-110ºC con una precisión de 0.1ºC.

3.2.5 Movilidad molecular y sólidos totales

La movilidad molecular de los sólidos y la fase acuosa de las muestras se determinaron por medio del análisis de los tiempos de relajación T_1 (relajación longitudinal) y T_2 (relajación transversal), obtenidos mediante la técnica de resonancia magnética nuclear ^{1}H-NMR. Se empleó un equipo Bruker MiniSpec mq20 de resonancia magnético nuclear (NMR) pulsada, con un campo magnético de 0.47 Tesla, que opera a una frecuencia de resonancia de 20 MHz. Las emulsiones se pre-equilibraron a la temperatura de trabajo en un baño de agua termostático (Haake Phoenex II C35P, Alemania) antes de realizar la medición.

3.2.6 Análisis estadístico

La significancia de las diferencias entre las medias fue determinada por el test t-student con un nivel de significación de α = 0,05. Las rutinas de optimización se realizaron utilizando la función χ^2 como figura de mérito estadística.

4 Estabilidad de emulsiones líquidas preparadas con NaCas

En este capítulo se estudiará la relevancia de la composición de la fase continua, el procesamiento de la muestra y la relación estabilidad/estructura tanto a nivel microscópico como en la nanoescala.

4.1 Introducción

4.1.1 Estabilidad de Emulsiones

Las emulsiones son dispersiones coloidales de dos o más líquidos inmiscibles. Se denomina fase dispersa a las gotas o glóbulos generalmente esféricos embebidos en una fase continua. El tamaño de gota puede variar entre unos pocos nanómetros hasta los milímetros. Estos sistemas poseen una energía libre desfavorable asociada al gran área de contacto entre la fase continua y la fase dispersa. Es por ello que las emulsiones tienden a separarse y dar nuevamente las fases de partida [Schramm 2005]. Dado que una emulsión (no se tratará el caso nanoemulsiones o microemulsiones) es termodinámicamente inestable, es necesario aplicar un trabajo mecánico externo para poder dispersar una fase en otra (Figura 4.1). Los mecanismos cinéticos involucrados en la disminución posterior de su energía libre dependen de variables tales como la formulación o la temperatura.

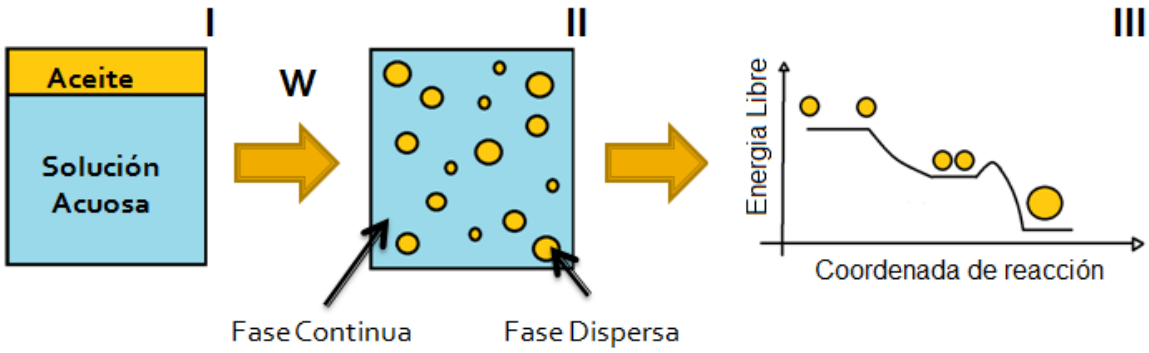

Figura 4.1. Dos fases inmiscibles (I) sometidas a un trabajo externo W pueden formar una dispersión llamada emulsión (II) en la cual las propiedades de interfase y concentración relativa determinan la naturaleza de la fase continua y dispersa. Este sistema inestable termodinámicamente evoluciona a fin de bajar la energía libre del mismo (III) y su mecanismo depende de la formulación y condiciones de almacenamiento.

Para emulsiones de gota grande (EG) la separación de fase está dominada principalmente por la gravedad debida a que los dos líquidos involucrados suelen poseer diferentes densidades. En contraste, en la dinámica de pequeñas gotas (EF) predomina el movimiento Browniano [Toro-Mendoza & Petsev 2010]. Para relajar la energía del sistema, el estadio inicial consta de la colisión de dos gotas dispersas. Esta colisión puede estar acompañada por la deformación en la superficie de contacto y la formación de un “film” delgado entre las gotas. Hay tres escenarios posibles frente a la colisión de dos partículas líquidas [Ivanov & Kralchevsky 1997] (Figura 4.2):

1- Si el film delgado es cinéticamente estable la emulsión puede formar agregados de gotas denominados: a) flóculos si la energía de estabilización es comparable con la agitación térmica y por lo tanto reversible frente a una pequeña perturbación o b) coágulos si ocurre de manera irreversible.

2- Si las fuerzas atractivas de interacción del film son inestables, una ruptura del mismo puede llevar a coalescencia de las gotas para formar una de mayor tamaño.

3- Si las fuerzas repulsivas son predominantes (o la energía cinética alta frente a las fuerzas atractivas) los dos glóbulos pueden separarse y dicha emulsión será estable.

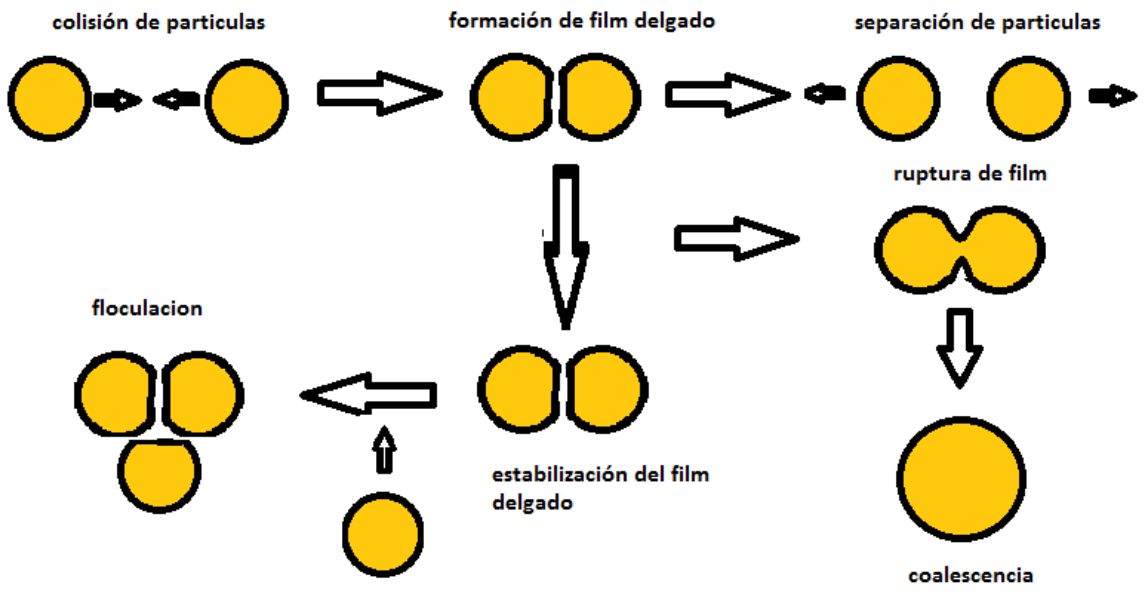

Figura 4.2. Representación de la colisión de dos partículas deformables y sus diferentes escenarios posibles [Ivanov & Kralchevsky 1997].

Los primeros modelos predictivos exitosos que explicaban la estabilidad de ciertas suspensiones fueron postulados a mediados del siglo XX con las simplificaciones a los potenciales de interacción propuestos por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (conocido más tarde como teoría de DLVO) [Adamson & Gast 1997]. Esta teoría, una vez definida la simetría del problema,

balancea el potencial de interacción de un par de partículas suspendidas en dos contribuciones opuestas:

1- Fuerzas atractivas que dependen solamente de la naturaleza del material (fuerzas dispersivas o de van der Waals).
2- Fuerzas repulsivas provocadas por la carga eléctrica superficial del coloide que provocan una estructuración local de los iones de solvente en las cercanías del mismo.

A pesar de que en el potencial repulsivo el solvente es simplificado a un medio continuo y homogéneo (se resuelve la ecuación diferencial de Poisson-Boltzmann) los resultados permiten describir la estabilidad en sistemas dispersos simples, siendo aun hoy en día una teoría vigente [Sefcik et al. 2003; Morales et al. 2013]. Las formulaciones industriales pueden llegar a ser tan complejas, que una simple descripción electrostática no basta para poder predecir de antemano su estabilidad. Se pueden sumar diversas contribuciones al potencial de interacción entre partículas, más allá de la teoría de DLVO, donde las más importantes pueden enumerarse como:

1- Hidratación: Se basa en la mutua interacción de dipolos. Se considera que hay una fuerte orientación de los dipolos del agua en la primera capa de hidratación y que al acercarse dos superficies hidratadas estas se repelen [Manciu & Ruckenstein 2001].
2- Fuerzas estructurales oscilatorias: Surgen en la nanoescala cuando los coloides están confinados a altas concentraciones entre dos superficies

(por ejemplo macromoléculas o micelas entre dos gotas de aceite). A medida que las superficies se acercan, los cambios en la presión osmótica genera alternancias en los potenciales de interacción atractivos y repulsivos [Tabor et al. 2011].

3- Efectos estéricos: Debido a la repulsión por co-volumen que generan polímeros, macromoléculas y surfactantes adsorbidos en la superficie [Sedev & Exerowa 1999].

La complejidad resultante de las contribuciones fisicoquímicas descriptas en el proceso de estabilización de coloides imposibilita, en la mayoría de los casos, el uso de métodos predictivos en el análisis de la estabilidad de emulsiones multicomponentes. No obstante, permite un análisis *a posteriori* de los fenómenos evaluados en las diferentes muestras.

4.1.2 Azúcares en medios heterogéneos

Los polisacáridos al igual que las proteínas son biopolímeros naturales de gran uso en la industria alimentaria y cosmética. Los monosacáridos y disacáridos tales como la glucosa, sacarosa, fructosa y lactosa son empleados habitualmente por sus propiedades edulcorantes [Shallenberger 1963]. Sin embargo, nuestros primeros estudios en emulsiones preparadas agregando azúcar a la fase acuosa demostraron que presentan además un rol importante en la estabilidad [Álvarez Cerimedo et al. 2010]. En otros casos, como es el de la trehalosa (disacárido que posee un poder edulcorante mucho menor que la sacarosa) es muy empleado

porque posee propiedades hidrodinámicas únicas que la convierten en un disacárido no reductor óptimo para el estudio de fluidos sobre-enfriados (vidrios) o para la encapsulación y protección de agentes activos y/o aromas [Álvarez-Cerimedo et al. 2010; Sosa 2012].

Los polisacáridos, como su nombre lo indica, están formados por cadenas poliméricas lineales y/o ramificadas de monosacáridos (generalmente ciclo-pentosas y ciclo-hexosas). Como ejemplos más relevantes se pueden mencionar: celulosa, almidón, goma guar, agar, goma xántica, goma garrofin, etc. En la ciencia de alimentos se los ha estudiado con miras a diferentes aplicaciones, entre las cuales se puede enumerar la encapsulación de sabores [Mirhosseini et al. 2008], espesante [Narchi, Vial & Djelveh 2009] y como agente gelificante [Laneuville et al. 2006]. Poseen estructuras complejas y en solución presentan alta densidad de carga eléctrica donde a ciertos pH puede ser opuesta a la carga de las proteínas que se encuentren presentes en solución [Dickinson & Pawlowsky 1997; Guzey & McClements 2006]. En la literatura se los denomina hidrocoloides y estos pueden interaccionar con otros coloides y formar complejos con proteínas tanto en fase homogénea como en la interfase generando superficies complejas alrededor de la gota oleosa [Schmitt et al. 1999; Rodríguez-Patino & Pilosof 2011; Ye, Gilliland & Singh 2011].

La utilización de estos biopolímeros en productos no solo es interesante desde el punto de vista comercial (aceptación del consumidor), sino que juegan además un papel fundamental en la fisicoquímica de sistemas fluidos complejos

siendo interesante su estudio tanto desde el punto de vista de la ciencia básica como de la aplicada.

4.1.3 Estudio de proteínas de leche en medio continuo y heterogéneo

Como se ha mencionado en la sección 1.3, las proteínas son ampliamente utilizadas como estabilizantes de emulsiones. Las mismas aumentan la presión superficial líquido-líquido (diferencia entre la tensión superficial entre la interfase del sistema inicial respecto de la del sistema con el surfactante disuelto como se expresa en la Ecuación 4.1) y estabilizan las emulsiones frente a la coalescencia por impedimento estérico y electrostático [Tcholakova et al. 2006].

$$\pi\,(m) = \gamma_0 - \gamma(m) \qquad \text{Ecuación 4.1}$$

Donde π(m) es la presión superficial, γ_0 es la tensión superficial del sistema inicial y γ(m) es la tensión superficial del sistema a una dada concentración “m” del agente tensioactivo.

Los efectos no se resumen de manera unilateral de la proteína hacia la superficie. Los aspectos estructurales y fluido-dinámicos de las proteínas se ven afectados por la presencia de la interfase. La estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas puede verse modificada al estar comprometida con la interfase liquido-líquido en una emulsión. Estudios de dicroísmo circular y espectroscopia infrarroja, realizados en diversas emulsiones estabilizadas con

proteínas provenientes de la leche (Caseinato de Sodio, β-Lactoglobulina y concentrado de suero lácteo) presentan resultados similares. Las proteínas asociadas a la superficie sufren una desnaturalización parcial de su estructura secundaria respecto a las proteínas suspendidas en solución [Tcholakova et al. 2006; Herrero et al. 2011; Zhai et al. 2010; Zhai et al. 2011]. El estudio completo de los fenómenos que intervienen en estos sistemas complejos es basto y es un desafío para la fisicoquímica actual.

El empleo de técnicas de dispersión a bajos ángulos (Dispersión de Rayos X a bajos ángulos –SAXS- y Dispersión de Neutrones a bajos ángulos –SANS-) ha sido utilizado para la descripción de la forma que adoptan las proteínas en solución (generalmente diluidas) y los complejos o estructuras cuaternarias que conforman siendo una de las técnicas predilectas a la hora de la descripción morfológica y estructural de material particulado con dimensiones características de la nano-escala [Holt et al. 2003; Mertens & Svergun 2010; Ianeselli et al. 2010; Cardinaux et al. 2011]. La micela de caseína proveniente de leche ha sido estudiada en detalle por SAXS y complementada por SANS siendo estas el alma madre de la descripción estructural que hoy día se conoce (mencionado en la sección 1.3). Se ha reportado que la micela de caseína de leche está compuesta por agregados esféricos de proteínas (que habitualmente se llaman submicelas o nanopartículas de caseína) [Holt et al. 2003, Livney 2010]. Holt y colaboradores describieron las variaciones producidas en los valores de los radios de las nanopartículas esféricas de caseinas en la micela al agregar distintas concentraciones de agua pesada (variación de contraste). Para este estudio

emplearon la técnica de SANS. Los valores calculados oscilaron entre 4.2 y 6.7 nm, con un 50% de polidispersidad [Holt et al. 2003] Otros estudios también realizados empleando la técnica de SANS mostraron subunidades de entre 7 y 8 nm de radio con 50% de polidispersidad [Hansen et al. 1996]. Esto indicaría que los sistemas naturales podrían presentar una pequeña variación en el tamaño de las nanopartículas de caseína que los forman dependiendo de la fuente de la que se obtuvo la proteína y el entorno en el que se encuentre, pero que usualmente presentarían alta polidispersidad. En la industria de alimentos es usual remover el calcio y preparar un ingrediente comercial llamado caseinato de sodio. Si bien se han estudiado las micelas naturales, el estado del arte en el sistema caseinato de sodio es diferente. Solo algún intento aislado de describir cualitativamente al NaCas en solución y en emulsión se encuentra en bibliografía pero su análisis carece de profundidad [Kalnin, Ouattara & Ollivon 2004; Kalnin et al. 2004b]. Cuantificar los cambios estructurales a través de un modelo con sentido físico en diferentes entornos y su correlación con la estabilidad cinética en la emulsión permitiría un avance significativo en el entendimiento de estos sistemas complejos.

4.2 Materiales y Métodos particulares

Se hará mención de los materiales utilizados en el presente capítulo así como consideraciones específicas no descriptas en los métodos generales (Capítulo 3).

4.2.1 Materiales

4.2.1.1 Fase dispersa o lipídica

Todas las emulsiones fueron formuladas con 10% p/p de aceite. Esta proporción arbitraria fue escogida debido a experiencia previa, la misma resulta óptima para poder discernir entre mecanismos de desestabilización física en un tiempo de medición razonable en todos los sistemas estudiados. Si bien el análisis se basará preponderantemente en emulsiones de aceite de girasol de uso comercial sin purificación adicional se describirán también algunos otros sistemas como emulsiones de aceite de oliva para lograr una interpretación más profunda del comportamiento de estabilidad. El interrogante que surge acerca de la relación entre la estabilidad del sistema y la composición química de la fase dispersa es muy relevante en el ámbito industrial. Como se mencionó en la sección 1.4 el ácido graso preponderante en el aceite que se extrae de las semillas de girasol de la variedad más habitual en Argentina es el ácido linoleico (ácido graso de 18 carbonos y 2 insaturaciones). El mismo se encuentra esterificado con glicerol formando triglicéridos. Habitualmente el triglicérido mayoritario en los aceites provenientes de todas las regiones del país posee dos ácidos linoleicos unidos al glicerol y un tercer ácido graso que es el oleico generalmente en posición 2. La preparación de emulsiones con aceite de oliva permitirá comparar la estabilidad de emulsiones de girasol respecto a las de un aceite que posee como ácido graso mayoritario el ácido oleico que es un ácido graso monoinsaturado y como triglicérido principal la trioleína. Estos sistemas preparados con aceites vegetales se compararán también con un aceite de origen animal. Se empleará un aceite de

pescado con una proporción de ácidos grasos poli-insaturados elevada, especialmente eicosapentaenoico (EPA C 20:5), docosapentaenoico (DPA C 22:5) y docosahexaenoico (DHA C 22:6), (ver Tabla 4.1, Álvarez Cerimedo et al. 2010). Los triglicéridos con estos ácidos poli-insaturados tienen geometrías moleculares mucho más complejas que la trioleína. Esta selección permitió estudiar si existía alguna relación entre el comportamiento de estabilidad y el tipo de aceite.

Tabla 4.1. Composición de los aceites ensayados. La notación Ca:b refiere al número "a" de carbonos del ácido graso con "b" insaturaciones.

Ácido Graso (%)	Aceite de Oliva	Aceite de Girasol	Aceite de Pescado
C14:0			11.8
C15:0			2.6
C16:0	12.1	6.7	
C16:1			2.1
C17:0 b			2.2
C17:0 l			2.4
C18:0	2.6	3.6	6.9
C18:1	78.3	21.9	
C:18:2	5.4	66.3	
C20:1			7.6
C20:2			3.7
C20:4			4.6
C20:5			10.9
C22:1			5.7
C22:5			5.2
C22:6			8.0
C24:1			2.1

4.2.1.2 Fase Continua

La fase continua en todas las emulsiones ensayadas es acuosa y se emplea agua ultrapura (18,2 mΩ), (Milli-Q Water System, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) para la síntesis de las mismas. La formación de emulsiones se realizará con concentraciones de NaCas de 0,5; 2,0; 5,0 y 7,5% p/p. El pH de las todas las emulsiones preparadas en este trabajo de tesis fue 6.66 ± 0.25. No se agregó ningún *buffer* adicional a las emulsiones.

En este capítulo se analizará el efecto de disacáridos y polisacáridos usados generalmente como aditivos funcionales y/o organolépticos en la estabilidad de emulsiones O/W. Todos los reactivos empleados fueron marca SIGMA-ALDRICH calidad grado analítico. Los disacáridos no reductores empleados son sacarosa -α-D-glucopiranosil - (1→2) - β-D-fructofuranósido- y trehalosa -α-D-glucopiranosil-α-D-glucopiranósido- en concentraciones del 20% p/p. Esta concentración es adecuada en aquellas aplicaciones de las emulsiones que requieran una matriz como es el caso de encapsulación de materiales lábiles y teniendo en cuenta el bajo poder edulcorante de la trehalosa, en este caso sería también adecuada para formular alimentos basados en emulsiones. Los polisacáridos ensayados son la goma garrofín y la goma xántica en concentraciones de 0.3 y 0.5% p/p, que son las que habitualmente se emplean en la industria de alimentos. Los resultados obtenidos para las emulsiones con un disacárido o un polisacárido en la fase acuosa se compararon con los obtenidos para las emulsiones estabilizadas con NaCas suspendido en agua empleando en cada par de muestras la misma concentración de proteína.

4.2.2 Estabilidad de emulsiones

La estabilidad de emulsiones se determinará de manera óptica utilizando el analizador óptico vertical Turbiscan TMA2000 descripto en la sección experimental (página 48). Debido a que la cinética de desestabilización de las emulsiones preparadas con Ultraturrax (EG) puede diferir en órdenes de magnitud respecto a la de las emulsiones homogeneizadas además por ultrasonido (EF) los tiempos

empleados son de órdenes muy diferentes. Las medidas de estabilidad de las EG se realizaron con lapsos de 2 minutos en un periodo de 30 minutos tanto para emulsiones formuladas en agua como en solución de disacáridos. Para las EF se midió dos veces al día durante una semana. Este mismo régimen de medición se empleó para las EG formuladas con polisacáridos debido a su mayor estabilidad.

4.2.3 Microestructura

La microestructura de las emulsiones se estudió con un microscopio óptico confocal Olympus. Se emplearon objetivos de 20x y 60x y un laser He-Ar de 488 nm de longitud de onda y una potencia máxima de 10 mW. El colorante flourescente empleado fue *Nyle-Red*. Este se coloca en la emulsión una vez sintetizada y como es de naturaleza hidrofóbica se disuelve solo en la fase lipídica. La fase acuosa no se tiñe y esto permite distinguir una fase de otra en la emulsión. Las micrografías se realizaron 24 horas después para asegurar su completa disolución en la fase lipídica.

4.2.4 Tensión superficial en interfase líquido-líquido

La evolución de la presión superficial líquido-líquido (π) y los parámetros de dilatación superficial se obtuvieron con un tensiómetro de gota PAT-1 (SINTERFACE technologies, Berlín, Alemania) combinado con métodos de gota colgante [Liu et al. 2011]. La técnica consiste en formar una gota de solución acuosa de volumen controlado (12 μl) pendiente de un túbulo capilar de

politetraflouroetileno inmerso en una cubeta con aceite. Se realizan mediciones simultáneas de la presión interna de la gota y su curvatura mediante el empleo de una cámara CCD como se muestra en la Figura 4.3. Finalmente se calcula la presión interfacial a través de la relación de Laplace (Ecuación 4.2) [Loglio et al. 2001; Grigoriev et al. 2007].

$$P_o + \Delta\rho \,.\, g.z = \gamma.\left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2}\right) \qquad \text{Ecuación 4.2}$$

Donde “P_o” es la presión capilar debido a la curvatura y el efecto de la gravedad causada por una diferencia de densidades “Δρ” de las fases involucradas; “g” es la aceleración de la gravedad y “z” la altura de la columna de agua. Del otro lado de la igualdad se encuentra la variable intensiva asociada a superficie “γ” denominada tensión superficial y r_1 y r_2 son los radios de curvatura de la gota.

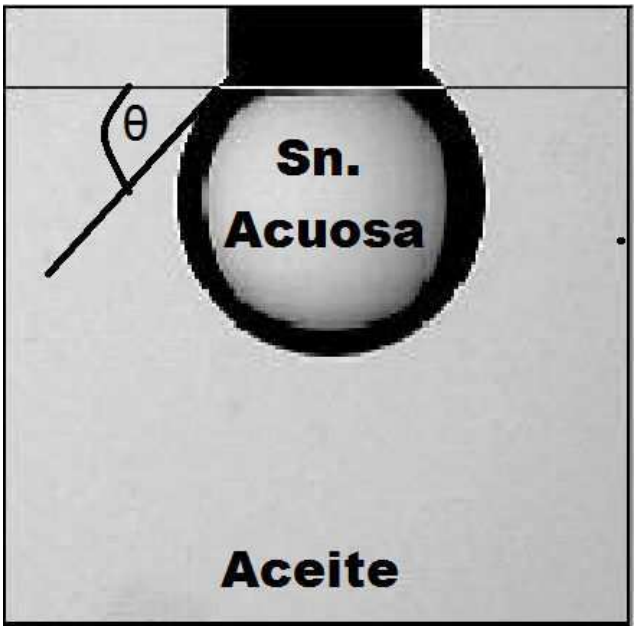

Figura 4.3. Fotografía de una gota colgante de una solución o suspensión de caseinato de sodio en una cubeta con aceite. La misma fue tomada con una cámara CCD y θ es el ángulo entre la gota y la superficie paralela a los bordes del capilar.

Los fenómenos de adsorción en la interface no ocurren instantáneamente sino que pueden estar gobernados por difusión (especialmente a bajas presiones superficiales) [Martinez et al. 2013]. Para obtener la tensión superficial líquido-líquido es necesario registrar las variaciones de presión interfacial a volumen constante a lo largo del tiempo hasta que la misma converja a un valor final.

El equipo permite estimar el módulo dilatacional de superficie (E) [Kazakov et al. 2008] que se deriva de los cambios en la tensión superficial como resultado de una pequeña variación en el área de contacto. Esta se traduce como una medida de resistencia a la deformación luego de una perturbación mecánica. El módulo dilatacional de superficie es una función compleja-$E(i\omega)=E'(\omega)+E''(i\omega)$- que involucra una perturbación periódica de frecuencia angular "ω". La interpretación física deviene en que al producirse un pequeño cambio en el área del sistema, el

mismo responde con un cambio en la tensión superficial. La parte real de la función (E') se relaciona con la elasticidad de la superficie (módulo elástico) mientras que la parte imaginaria (E") con su viscosidad (módulo viscoso). Para lograr dicha perturbación de manera reproducible se utiliza un sistema de micro-pistones controlados por una computadora que actúan según una función periódica pre-establecida por el usuario. En el presente trabajo se aplicó una perturbación en volumen de tipo sinusoidal con 3% de amplitud y 0.05 Hz como frecuencia angular. La precisión de la presión superficial del equipo ronda los 0.1 mN/m y los errores estándar de la medición son menores al 5%.

4.2.5 Densidad y viscosidad

4.2.5.1 Densidad

La densidad de los fluidos homogéneos se determinó utilizando un picnómetro de volumen conocido y pesando la masa contenida en el recipiente del líquido pre-equilibrado térmicamente. La densidad se obtiene como la relación entre la masa del fluido y el volumen ocupado.

4.2.5.2 Viscosidad

La viscosidad de los fluidos se obtuvo por el método de Ostwald. En el cual se mide el tiempo de escurrimiento del líquido pre-equilibrado térmicamente a 20ºC en un cilindro de vidrio en forma de "U" el cual posee un reservorio en la parte inferior y se calcula el tiempo en el cual escurre el fluido entre dos aforos.

Los tiempos obtenidos se comparan con un líquido de referencia de viscosidad conocida. En nuestro caso agua a 20ºC cuya densidad es ρ_{H_2O}=0.99829 g.cm^{-3} y su viscosidad η_{H_2O}= 1.002 cp [Lide 2005]. Esta relación se expresa en la Ecuación 4.3.

$$\eta_i = \frac{\tau_i \, \rho_i}{\tau_{H_2O} \, \rho_{H_2O}} \, \eta_{H_2O} \qquad \text{Ecuación 4.3}$$

Donde la viscosidad del fluido "i" se obtiene por la relación entre los tiempos de escurrimiento "τ" y densidad (ρ) del mismo respecto de los parámetros del fluido de referencia.

4.2.6 Dispersión de Rayos X a Bajos Ángulos (SAXS)

4.2.6.1 Arreglo experimental

Las mediciones fueron realizadas en la estación SAXS2 del laboratorio nacional de Luz sincrotrón en Campinas, Brasil. Se empleó un porta muestras apto para líquidos [Cavalcanti et al. 2004], en el cual el fluido se inyecta a una cámara con control de temperatura la cual posee ventanas transparentes a la radiación incidente. Se sintonizó la longitud de onda de trabajo en 1.488 Å y la distancia entre la muestra y el detector bidimensional MAR-165 fue de 2014.73 mm, lo que se traduce en un intervalo de frecuencias (en unidades del módulo de dispersión q) de 0.076-0.150 Å^{-1}. El tiempo de exposición máximo fue 30 segundos. Se eligió este valor ya que permitió obtener una señal con buena estadística sin perder el régimen lineal del detector. Las emulsiones son muestras fluidas y su patrón de

dispersión es isotrópico, se empleó el programa Fit2D para reducir el mapa de colores obtenido a curvas unidimensionales como se detalló en la sección experimental 3.2.3.2.

Se observó una pequeña contribución a la intensidad a bajos ángulos en forma de picos debida a la difracción de la rendija colimadora. Esto se originó en el hecho que el *setup* experimental empleado posee una larga distancia entre la muestra y el detector. Esta contribución no deseada se enmascaró utilizando el programa FIT2D que permite integrar angularmente sin tener en cuenta alguna región problemática lo que tiene como ventaja que no se necesitan tratamientos numéricos posteriores.

Un potencial problema a tener en cuenta en muestras biológicas es el daño que puede sufrir el material por la incidencia de radiación ionizante [Weik et al. 2000]. En capítulos anteriores se mencionó que SAXS es una técnica cuya escala de medición se encuentra en el orden de los nanómetros. A fin de evaluar o descartar la existencia de un posible cambio en la estructura provocado por la exposición a la radiación se tomaron dispersogramas consecutivos de una misma muestra y se compararon entre sí, sin encontrar variaciones significativas en la intensidad registrada en el tiempo.

4.2.6.2 Macroagregados de NaCas: Interpretación diagramas de SAXS

Limitado por los ángulos que pueden alcanzarse experimentalmente, la técnica de dispersión de rayos X a bajos ángulos no provee información de las estructuras en la microescala que puede resultar del agregado de las submicelas

de caseína o bien de las gotas de aceite que están suspendidas en solución acuosa. La distancia utilizada permite cubrir un rango de tamaños adecuado para detectar la presencia de las submicelas de caseína y otros componentes de la emulsión en un intervalo de 4 a 20 nm. Se ha dicho anteriormente que la micela de caseína natural con la estructura que tiene en la leche (caseinato de calcio) es un agregado compuesto por nanoparticulas de caseína con un radio entre 4.2 a 6.7 nm y un 50% de polidispersidad. Este modelo fue duramente criticado porque presentó una descripción vaga de la ubicación de cada caseína dentro de la micela y algunos autores consideraron además que las restricciones impuestas eran muy rígidas [Horne 2006]. Sin embargo los modelos simples permiten obtener una buena primera aproximación del comportamiento del sistema y en diferentes entornos complejos. Por esta razón elegimos un modelo simple compuesto de esferas homogéneas para interpretar el agregado de estas submicelas o nanopartículas tanto en solución de NaCas en agua o en solución de disacáridos como en emulsiones en diferentes formulaciones estabilizadas con NaCas. Describiremos a dichos agregados como un arreglo de casquetes esféricos (*Core Shell*) polidispersos (como se esquematiza en la Figura 4.4).

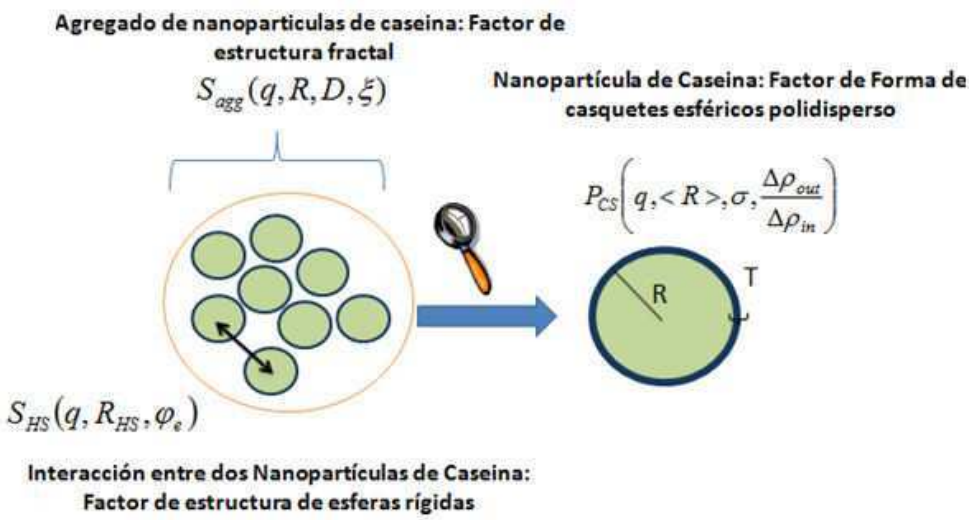

Figura 4.4. Esquema básico del modelo empleado para interpretar las intensidades registradas en los experimentos de dispersión de rayos X a bajos ángulos. Las subunidades de caseína o nanopartículas se las modeló con un casquete esférico de radio interno R y espesor de la capa T. El hecho de que estas partículas se agregan se toma en cuenta con el factor de estructura que se lo divide en dos contribuciones: Sagg para describir el agregado como un todo y el factor de estructura de esferas rígidas S_{HS} para representar la interacción a cortas distancias.

La amplitud normalizada del factor de forma del casquete esférico (cs) está dado por [Pedersen 1997]:

$$A_{cs}\left(q,R,T,\frac{\Delta\rho_{out}}{\Delta\rho_{in}}\right)=\frac{V(R+T)\frac{\Delta\rho_{out}}{\Delta\rho_{in}}A_{sph}(q,R+T)-\left(\frac{\Delta\rho_{out}}{\Delta\rho_{in}}-1\right)V(R)A_{sph}(q,R)}{V(R+T)-\left(\frac{\Delta\rho_{out}}{\Delta\rho_{in}}-1\right)V(R)} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Donde $\Delta\rho_{out}/\Delta\rho_{in}$ es la relación entre las densidades electrónicas del casquete de grosor “T” respecto a la de la esfera contenida en su interior de radio “R”. La función V(R) representa al volumen de una esfera $4/3\pi R^3$ y A_{sph} es la amplitud normalizada del factor de forma de una esfera sólida y está dada por la expresión:

$$A_{sph}(\mathrm{q},\mathrm{R}) = 3\,\frac{\mathrm{sen}(\mathrm{qR}) - \mathrm{qR}\cos(\mathrm{qR})}{(\mathrm{qR})^3}$$ Ecuación 4.5

En el modelo de casquete esférico usado en nuestros cálculos, la polidispersidad es tomada en cuenta utilizando una función de distribución D(R) incluida en la expresión final del factor de forma "P_{sc}"

$$P_{cs}\left(q, < R >, \sigma, \frac{\Delta\rho_{out}}{\Delta\rho_{in}}\right) = \int_0^{\infty} D(R, < R >, \sigma)\, V(R)^2 A_{cs}\left(q, R, T, \frac{\Delta\rho_{out}}{\Delta\rho_{in}}\right)^2 \mathrm{dR}$$ Ecuación 4.6

Para D(R) se eligió una distribución monomodal normalizada de Schulz-Zimm que pertenece a la familia de las funciones Gamma y es empleada para la descripción de polímeros [Zimm 1948]. Esta permite la inclusión de polidispersidad con varianza "σ" alrededor de una media "<R>"

$$D(R, < R >, \sigma) = A^B \frac{R^{B-1}}{\Gamma(B)} \exp(-AR)$$ Ecuación 4.7

$$A = \frac{< R >}{\sigma^2}$$

$$B = A < R >$$

La correlación entre partículas se debe expresar en términos de un factor de estructura S(q). En el presente modelo, el factor de estructura total se puede

desacoplar en dos contibuciones $S(q)=S_{HS}(q).S_{agg}(q)$. El primer factor tiene en cuenta el hecho de que las nanopartículas de caseína están cercanas entre sí al agregarse (que conlleva a una correlación posicional entre dos esferas). Este efecto se tiene en cuenta usando la aproximación de Percus-Yevick [Percus & Yevick 1958] (Es una aproximación muy utilizada en mecánica estadística la cual simplifica la interacción de varios cuerpos a la descripción de dos) cuya expresión analítica en el espacio recíproco es [Pedersen 2001]:

$$S_{HS}(q, R_{HS}, \varphi_e) = \frac{1}{1 + 24\,\varphi_e\, G(2R_{HS}q)/(2\,R_{HS}q)} \qquad \text{Ecuación 4.8}$$

Donde

$$G(w) = \alpha\,\frac{sen\,(w) - wcos(w)}{w^2} + \beta\,\frac{2w\,sen(w) + (2 - w^2)\cos(w) - 2}{w^3} + \gamma\,\frac{-w^4\cos(w) + 4[(3w^2 - 6)\cos(w) + (w^3 - 6)sen(w) + 6]}{w^5}$$

y

$$\alpha = \frac{(1 + 2\,\varphi_e)^2}{(1 - \varphi_e)^4} \quad ; \quad \beta = -6\varphi_e\frac{(1 + \varphi_e/2)^2}{(1 - \varphi_e)^4} \quad ; \gamma = \alpha\,\frac{\varphi_e}{2}$$

En este modelo R_{HS} es entendido como el radio efectivo de esferas rígidas qué componen al agregado de submicelas de caseína y φ_e es la fracción de volumen efectiva. El segundo factor multiplicativo "S_{agg}" en la expresión de factor de estructura total tiene en cuenta que las esferas o casquetes esféricos se

agregan formando estructuras supramoleculares por lo que se adopta un arreglo fractal de subunidades esféricas para modelarlo [Texeira 1988].

$$S_{agg}(q,R,D,\xi) = 1 + \frac{D\,\Gamma\,(D-1)}{(qR)^D\left[1+\frac{1}{(q\xi)^2}\right]^{\frac{D-1}{2}}} sen([D-1]\tan^{-1}(q\xi)) \qquad \text{Ecuación 4.9}$$

Aquí “D” es la dimensión fractal del arreglo de subunidades esféricas de radio R y la distancia de correlación o cutoff del fractal está representado por el parámetro ξ. En este modelo, la distancia de correlación fractal se interpreta como el tamaño promedio del arreglo supramolecular debido al agregado de las nanopartículas de caseína y la dimensión fractal es un indicativo de cómo estas submicelas se arreglan al formar dichos agregados.

La expresión final que se usa para comparar e interpretar las intensidades experimentales está dada por [Pedersen 2001]:

$$I(q) = S_s\, S_{agg}(q,R,D,\xi)\, S_{HS}(q,R_{HS},\varphi_e)\, P_{cs}\left(q,<R>,\sigma,\frac{\Delta\rho_{out}}{\Delta\rho_{in}}\right) + BACK \qquad \text{Ecuación 4.10}$$

Donde S_c es el factor de escala y BACK una constante en la cual se tiene en cuenta la señal de fondo. Estos dos parámetros son optimizados durante el ajuste.

Tabla 4.2. Parámetros estructurales. La lista incluye los parámetros fijos y a optimizar. El valor de 3Å para el espesor del casquete esférico es una aproximación aceptable para la capa de hidratación.

Parametros libres	**Descripción**
S_C	*Factor de escala*
Back	*Señal de fondo*
$<R>$	*Radio interno promedio de casquete esférico*
$\Delta\rho_{out}/\Delta\rho_{in}$	*Relación entre densidad electrónica del casquete respecto a la esfera contenida en su interior*
σ	*Varianza de la distribución de Schulz-Zimm*
φ_e	*Fracción de volumen efectivo de esferas rígidas*
$R_{HS} = 3 \times <R>$	*Radio de esferas rígidas efectivo*
D	*Dimensión fractal*
ξ	*Distancia de correlación fractal*
Parámetros fijos	**Descripción**
$T = 3Å$	*Espesor del casquete exterior esférico*

4.3 Resultados

4.3.1 Efectos de la concentración de Caseinato de sodio

4.3.1.1 *Distribución de tamaños*

Se ha mencionado que los emulsificantes o surfactantes son compuestos anfifílicos con afinidad por la interfase de dos fluidos inmiscibles. Los mismos se adsorben en la superficie y relajan la energía libre superficial hasta llegar a un punto de saturación [Dickinson & Golding 1997]. Este hecho se refleja en la distribución de tamaño de gotas obtenidas luego de un trabajo mecánico sobre el sistema. La dispersión de un fluido en otro es generalmente más favorable al bajar la tensión en la interfase. En la Figura 4.5 se graficó la distribución de tamaño de partículas expresadas en fracción de volumen para emulsiones de aceite de girasol al 10% p/p en agua con 0,5; 2,0; 5,0 y 7,5% p/p de NaCas. En la misma se incluyó las emulsiones de gota grande (EG) en la columna izquierda y las obtenidas luego de aplicar ultrasonido (EF) en la columna derecha.

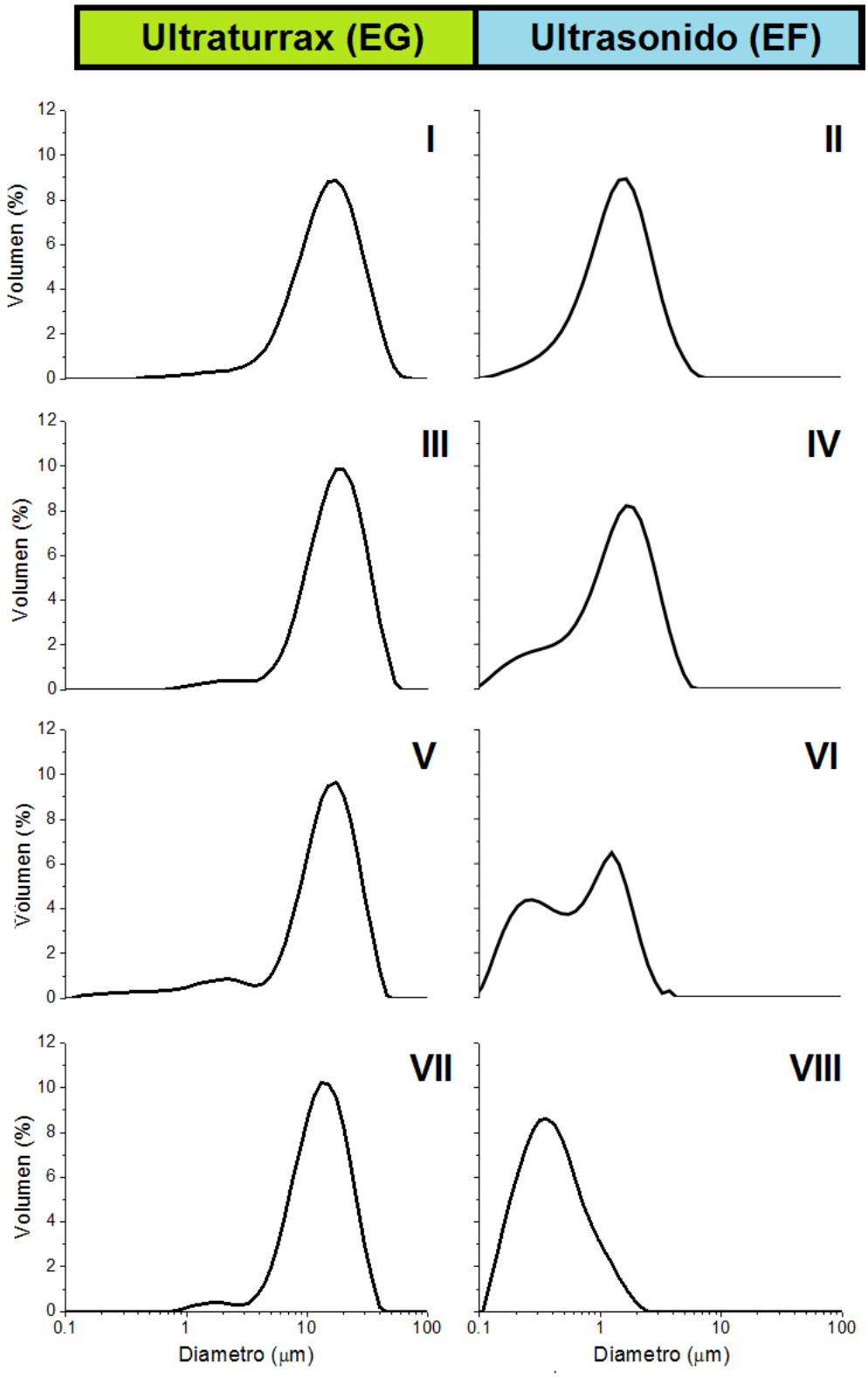

Figura 4.5. Distribución de diámetros expresada en volumen en función de la concentración de NaCas: I y II) 0,5% p/p; III y IV) 2,0% p/p; V y VI) 5,0% p/p; VII y VIII) 7,5% p/p para EG (I, III, V, VII) y EF (II, IV, VI, VIII). El eje de abscisas donde se presentan los valores del diámetro se expresa en escala logarítmica.

Para las emulsiones de gota grande (Figura 4.5: I, III, V y VII) se observó que gran parte de la población se encuentra a diámetros mayores a 10 µm (notar que el eje de las abscisas se encuentra en escala logarítmica) y la distribución se tornó más estrecha al aumentar la concentración de caseinato de sodio, en otras palabras bajó el grado de polidispersidad. Al aplicar ultrasonido en todas las muestras (II, IV, VI y VIII) el tamaño de gota decreció en un orden de magnitud. Las curvas mostraron dos poblaciones, una centrada en un diámetro de 0.35 µm y la segunda distribuida alrededor de 1.2 µm. Para la distribución estabilizada con 0,5% p/p de NaCas la población de mayor tamaño fue la de mayor peso. A medida que aumentó la concentración de proteína el peso de las poblaciones se fue invirtiendo resultando la población menor casi la única presente en la distribución de la emulsión estabilizada con 7,5% de NaCas (Figura 4.5 VIII). Hay que tener en cuenta que la distribución está expresada como la fracción de volumen de fase dispersa ocupada por las partículas de un determinado diámetro. La distribución en volumen y el diámetro $D_{4,3}$ es la forma más habitual de expresar una emulsión polidispersa. En el cálculo de $D_{4,3}$ el diámetro aparece expresado a la cuarta en el denominador y al cubo en el numerador. Por esta razón las partículas más grandes tienen un peso importante en el valor medio ($D_{4,3}$) aunque se encuentren en bajos porcentajes. Si la distribución se expresara en número en muchos casos parecería monomodal. En la Tabla 4.3 se resumieron los valores estadísticos que describen y cuantifican usualmente a las distribuciones de diámetros (ver página 44). Donde el $D_{4,3}$ es el diámetro promedio ponderado por volumen, $\%V_{d>1}$ el porcentaje de partículas por encima del micrón y por último W refiere a la diferencia entre los percentilos 0,1 y 0,9.

Tabla 4.3. Parámetros que caracterizan a la distribución de tamaño de partícula expresada en volumen para emulsiones procesadas con ultraturrax (emulsiones EG) y emulsiones tratadas posteriormente con ultrasonido (emulsiones EF)

	Ultraturrax			Ultrasonido		
NaCas %p/p	$D_{4,3}$ (µm)	$\%V_{d>1}$	W (µm)	$D_{4,3}$ (µm)	$\%V_{d>1}$	W (µm)
0,5	19,10±0,15	99,0±0,4	27,8±0,4	1,52±0,01	61,8±0,1	2,26±0,08
2,0	17,35±0,05	98,1±0,5	27,1±0,3	1,68±0,01	65,5±0,1	2,83±0,01
5,0	16,35±0,20	95,7±0,2	26,1±0,3	0,75±0,01	39,7±0,1	1,90±0,01
7,5	15,17±0,01	99,0±0,1	19,2±0,2	0,45±0,01	7,01±0,01	0,70±0,01

En la Tabla 4.3 se ven cuantificadas algunas de las tendencias que se observaron visualmente en la Figura 4.5. Para EG el tamaño medio decreció con la concentración de NaCas y su distribución resulta más estrecha aunque en todos los casos más del 98% de las gotas tuvieron tamaños por encima del micrón. Una vez procesadas con últrasonido este parámetro decreció hasta un 7%. Para EF los parámetros calculados respetaron la tendencia visual en general. Es importante notar que cuando se emplearon concentraciones de NaCas de 5% p/p para estabilizar la emulsión la distribución de diámetro de partículas fue bimodal con pesos semejantes para las dos poblaciones formadas. En estos casos los valores de $D_{4,3}$ pueden no ser suficientes como indicadores para detallar tendencias. Por eso para una mejor descripción se complementó con otros dos parámetros que se incluyeron en la Tabla 4.3. La aparición de la segunda población de menor tamaño se reflejó en un valor de $\%V_{d>1}$ significativamente menor. Este parámetro también permitió cuantificar el crecimiento de la población de menor volumen y la

reducción considerable de la segunda población en la emulsión estabilizada con 7,5% p/p de NaCas.

4.3.1.2 Estabilidad cinética y Microestructura

Todas las emulsiones ensayadas fueron opacas a la transmisión de luz visible para el paso óptico empleado. Es decir la intensidad registrada fue nula. Bajo esta condición se puede registrar la evolución temporal del sistema coloidal con radiación laser monocromática dispersada o en inglés backscattering (BS) medida a 135º respecto al haz transmitido. Por simplicidad en el tratamiento de los datos se exhiben generalmente las curvas de intensidad en función de la altura del tubo en modo referencia (ΔBS) como se detalló en la sección de materiales y métodos experimentales generales (sección 3.2.2.1). En la Figura 4.6 se muestra las curvas de BS en función del tiempo expresadas en modo referencia tanto para las EG (columna izquierda) como para las EF (columna derecha) descriptas en la Tabla 4.3. Los valores de BS_0 calculados en la región central del tubo (20-50 mm) para las emulsiones preparadas con ultraturrax y estabilizadas con 0,5; 2,0; 5,0 y 7,5% p/p de NaCas fueron 48,3; 54,7; 55,2 y 58,2%, respectivamente, mientras que para las emulsiones preparadas empleando también ultrasonido y las mismas concentraciones de NaCas mencionadas para ultraturrax los valores de BS_0 fueron 75,2; 75,5; 75,7 y 79,5%. En la Figura 4.6 se observó que en las emulsiones tratadas con ultraturrax (EG) el mecanismo de desestabilización primario es la migración de partículas o cremado, donde el efecto se caracterizó por una disminución del ΔBS en la zona inferior del tubo (alturas entre 10 y 20 mm). Este

fenómeno fue preponderante debido a que gran parte de las gotas fueron grandes y la influencia del potencial gravitatorio predominó. El diámetro de gota promedio rondó entre 15 y 20 µm (Tabla 4.3) y, dado que son sistemas polidispersos, las emulsiones presentaron también algunos glóbulos oleosos que superan los 50 µm (Figura 4.5: I, III, V y VII).

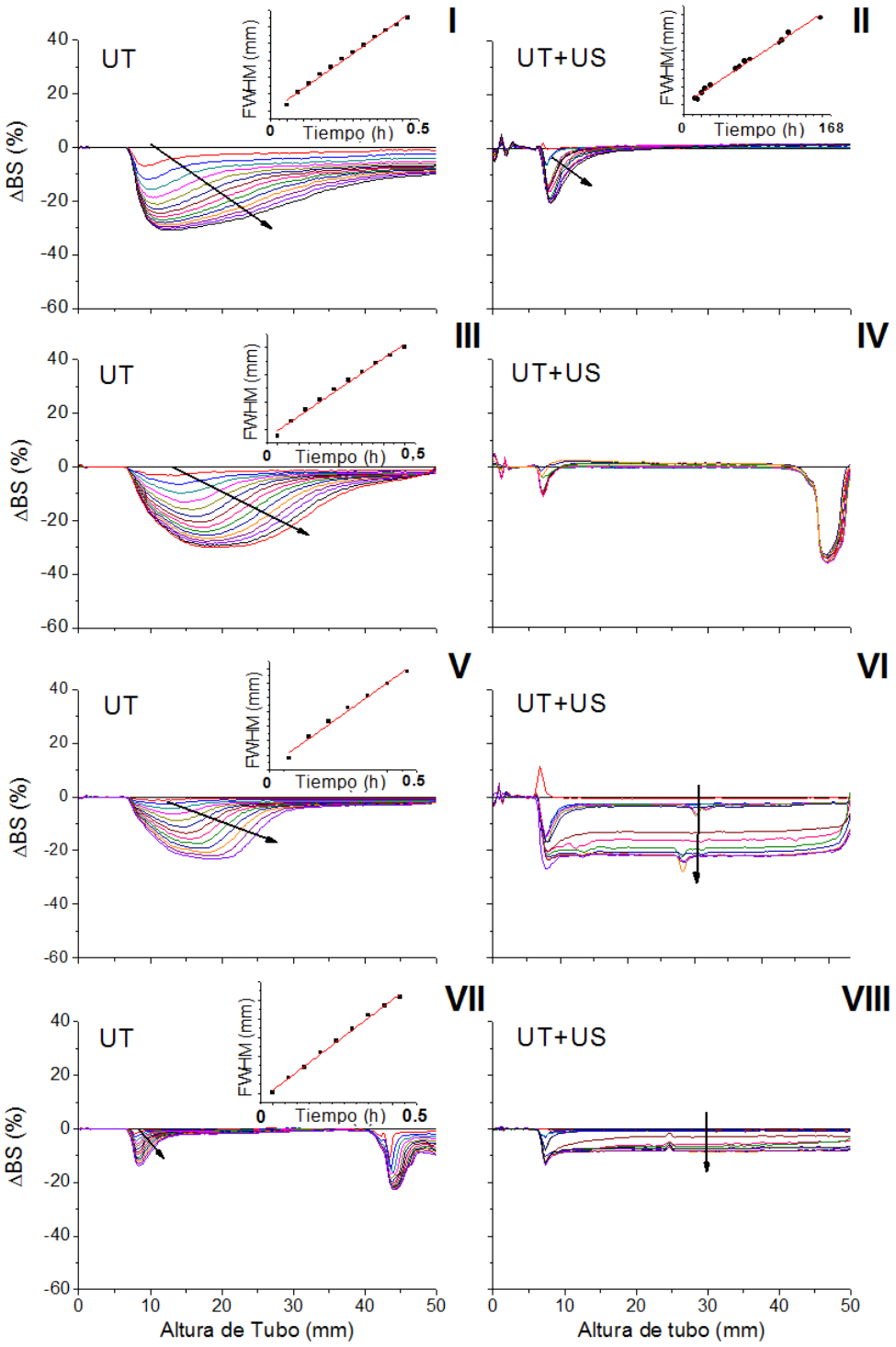

Figura 4.6. Cinética de destabilización de emulsiones de aceite de girasol formuladas con I y II) 0,5; III y IV) 2,0; V y VI) 5,0 y VII y VIII) 7,5 % p/p de NaCas evaluada a través de medidas de intensidad de luz dispersada en función de la altura del tubo. El inset de las figuras I, II, III, V y VII corresponde al valor del ancho de pico formado en la zona 0-20 mm medido a mitad de altura del pico máximo en función del tiempo. La flecha indica el paso del tiempo.

La dispersión resultante de realizar solamente agitación mecánica a bajas viscosidades del medio continuo posee una distribución de tamaño de gota que conduce a que el cremado resulte el principal mecanismo de desestabilización sin dar lugar a la manifestación de otros fenómenos que ocurrirían en otra escala temporal como sería el caso de la desestabilización por floculación. Una vez aplicado ultrasonido los tiempos de migración se tornaron considerablemente menores. Esto pudo deberse a una disminución en el tamaño medio de gota. Como se observa en la Tabla 4.3 hay una diferencia de alrededor de un orden de magnitud en los valores de $D_{4,3}$ entre las emulsiones obtenidas por Ultraturrax (EG) o por ultrasonido (EF). Así mismo, aun en condiciones de bajas concentraciones de caseinato de sodio (Figura 4.6 II) se observó que la velocidad de migración en las EG fue alrededor de tres órdenes de magnitud mayor que en las EF (Tabla 4.4). En las EF, solo en la emulsión formulada con 0,5% p/p de NaCas se encontró que el cremado fue el único proceso de desestabilización observado. Para las demás emulsiones, al incrementar la concentración de caseinato de sodio la velocidad de cremado decreció y un fenómeno de floculación o coalescencia comenzó a tener lugar. Las formulaciones estabilizadas con 2,0 % p/p de NaCas (Figura 4.6 IV) presentaron migración en muy pequeña extensión. Para 5,0 % p/p de caseinato de sodio (Figura 4.6 VI) se produjo desestabilización mayoritariamente por floculación. Este proceso, si bien fue el principal mecanismo de desestabilización, se produjo en menor proporción a concentraciones mayores (Figura 4.6 VIII). La floculación se manifiesta en la medición como una disminución homogénea de ΔBS a lo largo del tubo.

Tabla 4.4. Velocidad de cremado (mm/h) de emulsiones de gota grande (EG) y de gota pequeña (EF). Con guión se indican las velocidades que no pueden ser calculadas.

	Emulsiones groseras	Emulsiones finas
NaCas (%p/p)	Velocidad de cremado	Velocidad de cremado
0,5	66,0 ± 2,0	0,063 ± 0,002
2,0	60,0 ± 2,0	-
5,0	58,0 ±1,0	-
7,5	10,0 ±1,0	-

La pendiente de la recta resultante de graficar los valores del ancho del pico formado al expresar los perfiles en modo referencia en la zona 0-20 mm tomado a media altura del pico mayor se relaciona con la velocidad límite de migración de partículas debido al efecto de la gravedad en suspensiones con diferentes densidades dentro de un medio viscoso. Estas rectas se muestran en los *inset* de la Figura 4.6. El incremento de la concentración de NaCas disminuyó la velocidad de migración en todas las emulsiones (Tabla 4.4) al punto que para EF estabilizadas con concentraciones de NaCas de 2,0% o más el fenómeno no fue observado dentro del tiempo de medición. En la Figura 4.7 se muestran imágenes obtenidas por microscopía confocal de barrido láser de emulsiones con 0,5 % (Figura 4.7 I y II) y 5,0 % p/p (Figura 4.7 III y IV) de NaCas tanto sintetizadas con ultraturrax como procesadas posteriormente con ultrasonido. En la misma se evidenció el cambio de diámetro medio de gota con el procesamiento y con la concentración de NaCas para el caso de las EG (para EF las gotas están cerca del límite de resolución del instrumento). Como puede observarse en la Figura 4.7 (I y III) las gotas se ven homogéneamente dispersas sería esperable un proceso de desestabilización por cremado como se cuantificó en los ensayos realizados con el Turbiscan. Por otro lado corrobora que el proceso de destabilización que

tuvo lugar en las emulsiones con concentraciones de NaCas mayores a 2,0 % p/p, sin aditivos en la fase acuosa y procesadas con ultrasonido fue la floculación.

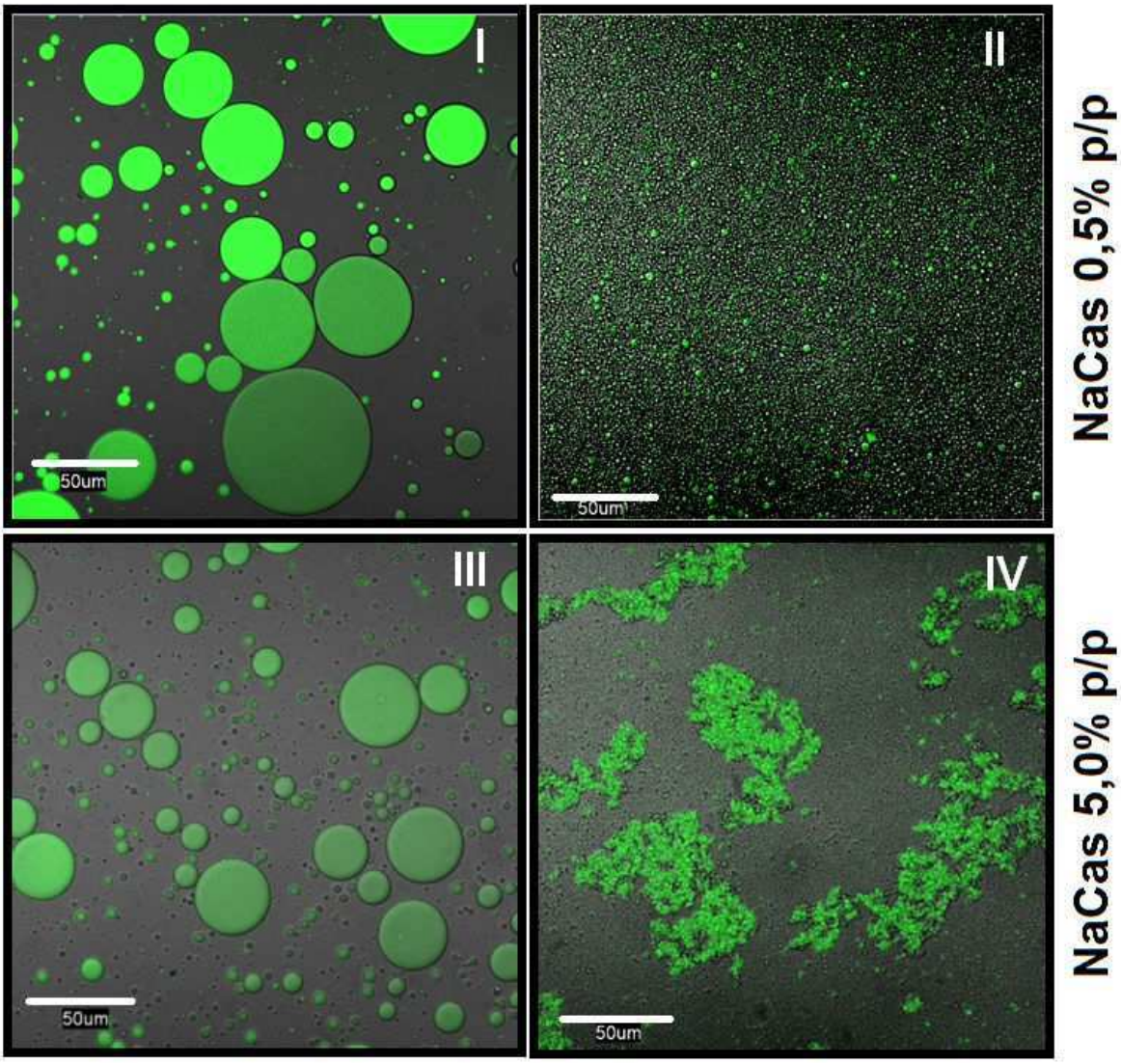

Figura 4.7. Micrografías de emulsiones a las cuales se coloreó la fase lipídica con Nyle red. I y II son emulsiones formuladas con 0,5% de NaCas y III y IV con 5,0 % de NaCas.

La formación de flóculos puede apreciarse en la Figura 4.7 IV. No se ven partículas individuales sino que se aprecian agregados. Es de esperar que en estas emulsiones predomine la floculación frente a la coalescencia, debido a que

las proteínas de leche forman un film resistente que protege las emulsiones frente a dicho mecanismo [Tcholakova et al. 2006]. En la Figura 4.8 se analiza el BS promedio registrado en la zona 30-50 mm del tubo para la muestra estabilizada con 5,0% p/p de NaCas. Como se indicó con anterioridad, la disminución homogénea de la intensidad dispersada corresponde a un aumento de tamaño del elemento dispersante a fracción de volumen constante (página 15). En el gráfico se observaron dos regímenes. Uno a tiempos cortos y otro a tiempos largos.

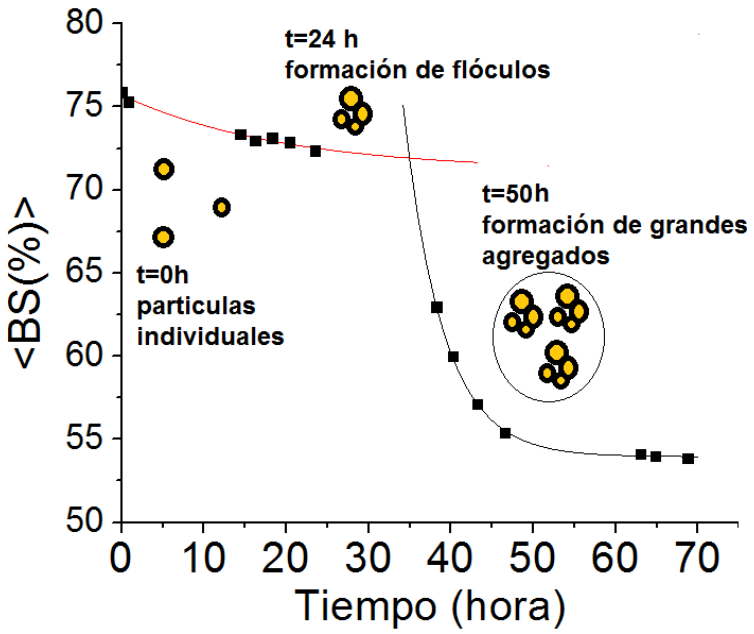

Figura 4.8. Intensidad promedio registrada de la dispersión a 135º (BS) en la región media del tubo (30-50). El doble régimen observado a tiempos cortos y largos se interpreta como una floculación de pequeñas partículas a tiempos cortos y posterior agregación de flóculos a tiempos largos.

Una vez sintetizada la emulsión todas las partículas se encuentran uniformemente distribuidas. Los primeros flóculos se forman con los coloides "vecinos" resultando en una disminución gradual de la intensidad dispersada. Luego estos flóculos difunden y pueden formar agregados superiores que

incrementan considerablemente la dimensión del elemento dispersor y se refleja en una caída abrupta de la intensidad a tiempos largos. Este comportamiento se registró en todas las emulsiones que desestabilizaron por floculación como es el caso de 7,5% p/p.

4.3.2 Variando la composición de la fase dispersa

En las EG formuladas con aceite de girasol, el mecanismo de desestabilización física primordial fue el cremado. Este comportamiento fue el esperable dado que en estos sistemas la fase dispersa presentó partículas grandes suspendidas e inmersas en un medio continuo de baja viscosidad. Podría esperarse que este efecto se registrara, en principio, en cualquier emulsión de aceite dispersado donde la velocidad de migración dependiera de su densidad y tamaño de gota. Sin embargo, el comportamiento complejo de las emulsiones cuya fase discontinua es el aceite de girasol, cuando el tamaño de gota es inferior al micrón, no resulta tan fácil de predecir (Figura 4.6). A fin de verificar si la composición de la fase oleosa juega algún rol dentro de los mecanismos físicos, se analizarán las emulsiones preparadas con aceites de pescado y oliva con concentraciones de caseinato de 0,5; 2,0 y 5,0 % p/p de NaCas, procesadas con ultrasonido.

4.3.2.1 Tamaño de gota

En la Figura 4.9 se muestran los diagramas de distribución de diámetro de partícula para emulsiones procesadas con ultrasonido de aceite de pescado (columna izquierda), aceite de oliva (columna central) y aceite de girasol (columna derecha). Las mismas se compararon con las emulsiones de aceite de girasol (columna derecha) antes descriptas. Las concentraciones de NaCas fueron 0,5; 2,0 y 5,0 % p/p. Se observa que al igual que para las emulsiones de girasol, las emulsiones de la Figura 4.9 mostradas en las columnas izquierda y central presentaron poblaciones bimodales con una tendencia similar a invertir poblaciones cuando se aumenta la concentración de caseinato de sodio. No obstante, para la emulsión con aceite de pescado y 0,5% p/p de NaCas los pesos de las dos poblaciones fueron similares (Figura 4.9 I) mientras que con aceite de oliva y girasol la moda de mayor valor de diámetro fue la preponderante (Figura 4.9 II y III). En emulsiones con aceite de pescado, al aumentar la concentración de NaCas hasta un 5,0 % p/p, la menor de las modas resultó la más importante mientras que formulando con aceite de girasol las dos poblaciones poseyeron pesos comparables. En todos los casos el aceite de oliva presenta un comportamiento intermedio entre el aceite de pescado y el de girasol.

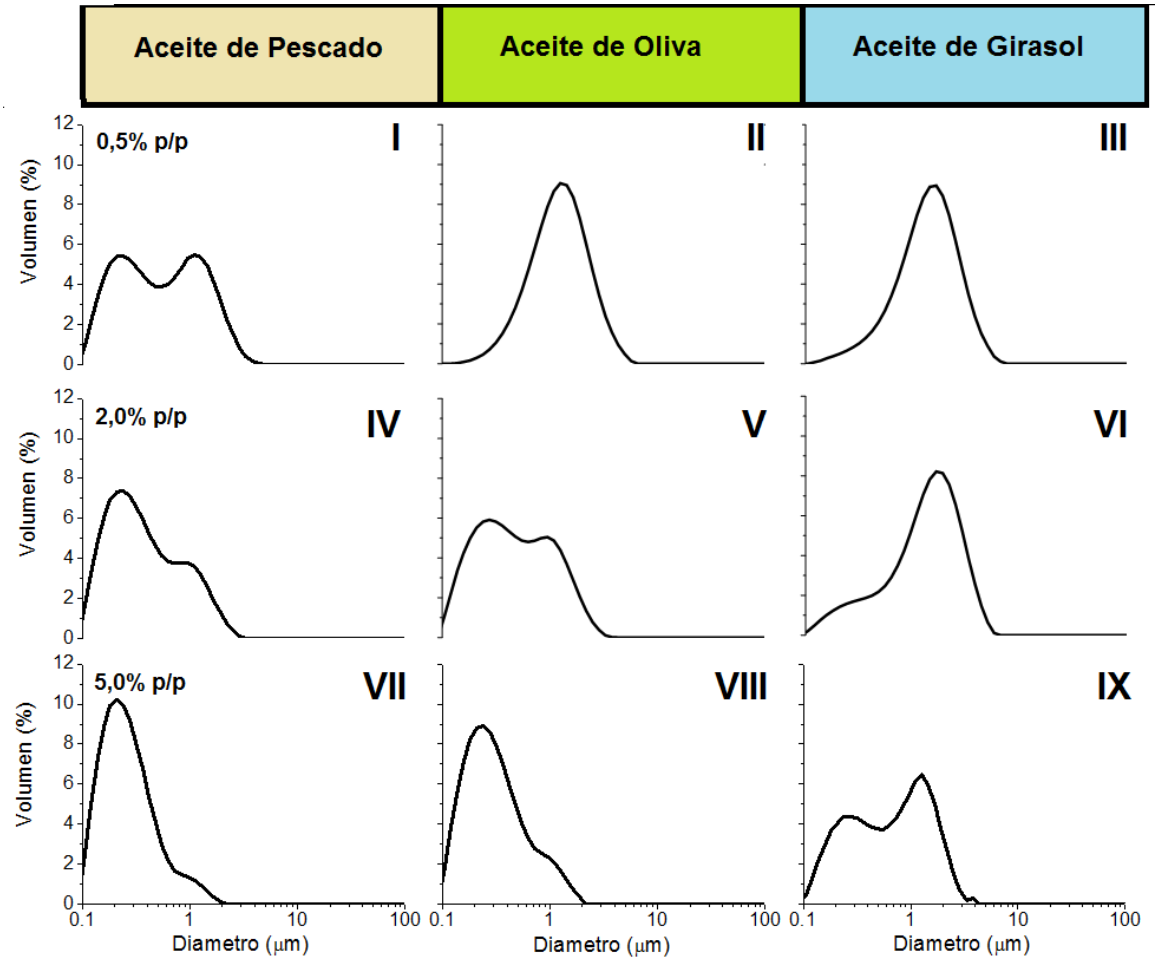

Figura 4.9. Distribución de diámetro de gota para emulsiones con 10% p/p de aceite de pescado (I, IV, VII); Aceite de Oliva (II, V, VIII) y Aceite de girasol (III, VI, IX) para muestras tratadas con ultrasonido y formuladas con 0,5; 2,0 y 5,0 % p/p de caseinato de sodio (NaCas).

En la Tabla 4.5 se resumen los parámetros que describen la distribución de tamaño de gota para aceite de pescado y aceite de oliva. El aceite de pescado que muestra su composición más compleja fue el que permitió obtener emulsiones más finas y con varianzas menores. Si bien hubo muchas similitudes entre los sistemas y los órdenes de magnitud fueron cercanos se encontró que el tipo de aceite tiene alguna influencia en el comportamiento. Esto pudo deberse a la distinta composición en triglicéridos de los mismos que corresponde a distintas

geometrías moleculares. El aceite de oliva es rico en ácido oleico (C18:1), el aceite de girasol es la variedad argentina rica en linoleico (C18:2) y el aceite de pescado empleado es rico en EPA (C20:5), DPA (C22:5), DHA (C22:6), ácidos grasos muy insaturados con geometrías complejas [Álvarez Cerimedo et al. 2010].

Tabla 4.5. Parámetros de la distribución de tamaño de gota para emulsiones de aceite de pescado y aceite de oliva procesadas con ultrasonido y estabilizadas con diferentes concentraciones de NaCas.

	Aceite de Pescado			Aceite de Oliva		
NaCas % p/p	$D_{4.3}$ (μm)	$\%V_{d>1}$	W (μm)	$D_{4.3}$ (μm)	$\%V_{d>1}$	W (μm)
0.5	1,35 ± 0,01	64,47 ± 0,01	1,87 ± 0,01	1,53 ± 0.01	61,95±0,05	2,38±0,01
2	0,73 ± 0,01	21,79 ± 0,01	1,25 ± 0,01	0,69 ± 0.01	21,0±0,1	1,51±0,01
5	0,37 ± 0,01	2,71 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,42 ± 0.01	5,8±0,1	0,71±0,01

4.3.2.2 Estabilidad de las emulsiones

En la sección anterior se describieron diferencias en el tamaño de gota que pueden atribuirse a diferentes tensiones superficiales que dependen de la composición de la fase oleosa y diferentes afinidades de la proteína por cada aceite. El interrogante que surgió inmediatamente es si estas diferencias se expresan en un cambio de mecanismo de destabilización. En la Figura 4.10 se expone el tratamiento cinético de las diferentes emulsiones de aceite de pescado y oliva utilizando el analizador vertical “Turbiscan”. Tanto para emulsiones de aceite de pescado (Figura 4.10: I, III y V) como para emulsiones de aceite de oliva (Figura 4.10: II, IV, VI) la tendencia resultó similar a la observada en aceite de

girasol. A bajas concentraciones de caseinato (Figura 4.10: I y II) la migración de partículas fue preponderante y sus constantes cinéticas de cremado se encontraron en el mismo orden de magnitud. A concentraciones intermedias (Figura 4.10: III y IV) se registró una mezcla de mecanismos entre migración y floculación.

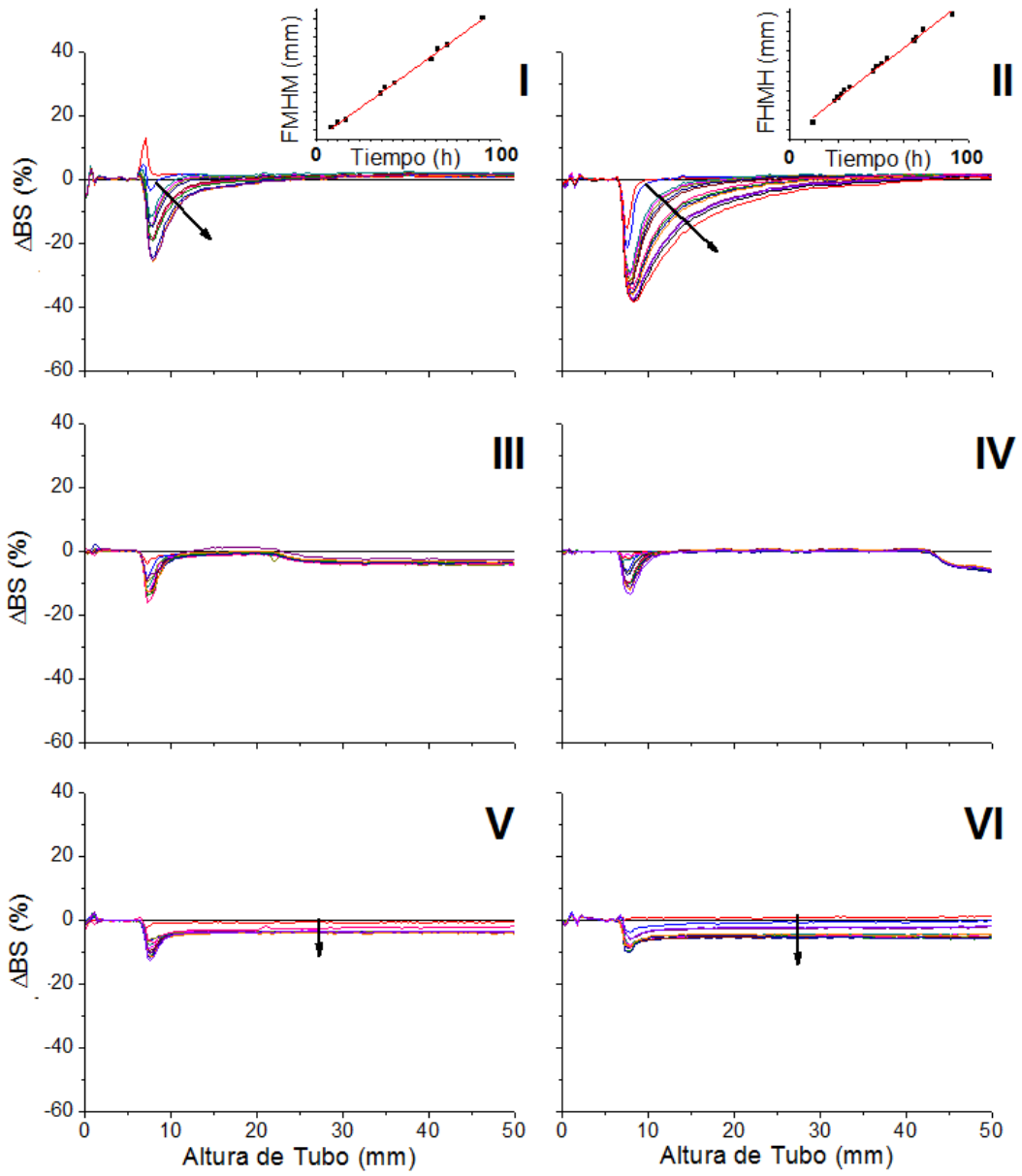

Figura 4.10. Cinética de destabilización de emulsiones de aceite de pescado (I, III, V) y aceite oliva (II, IV, VI) formuladas con 0,5, (I y II) 2,0 (III y IV) y 5,0% p/p (V y VI) de NaCas a través de medidas de intensidad de luz dispersada en función de la altura del tubo. El inset de las figuras I y II corresponden a las medidas del ancho a mitad del pico máximo en función del tiempo realizadas en la zona 0-20 mm de los perfiles expresados en modo referencia y K las velocidades de cremado. La flecha indica el paso el tiempo.

Finalmente a 5,0 % p/p de caseinato (Figura 4.10: V, VI) la floculación se volvió preponderante independientemente de la distribución de tamaños. Es decir,

el mecanismo estuvo regido por la concentración de NaCas en las condiciones ensayadas (sin aditivos en la fase acuosa). En conclusión, los mecanismos por lo que las emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio evolucionaron a fin de bajar su energía potencial no dependen de la naturaleza del aceite. Sin embargo existen ligeras diferencias en las cinéticas de cremado (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Velocidades de cremado para muestras procesadas con ultrasonido en los tres aceites ensayados.

NaCas (% p/p)	Aceite de Girasol	Aceite de Pescado	Aceite de Oliva
0,5	0,063 ± 0,002	0,040 ± 0,001	0,060 ± 0,002
2,0	NM	NM	0,02 ± 0,01
5,0	NM	NM	NM

NM significa que no pudo ser calculado en esas muestras

En la Tabla 4.6 se expresan las velocidades de migración que se obtuvieron para emulsiones de aceite de girasol, pescado y oliva procesadas con ultrasonido. Solamente en el caso de emulsiones estabilizadas con bajas concentraciones de caseinato de sodio se pudo calcular una velocidad de migración. Si bien, en el caso de las emulsiones con 2,0% de caseinato de sodio se observó una pequeña disminución del ΔBS(%) en la parte inferior del tubo, la cinética resultó lo suficientemente lenta como para que las curvas obtenidas al medir el ancho de pico a mitad de altura en función del tiempo fueran muy dispersas. En aceite de oliva pudo obtenerse un valor pero el error de la velocidad obtenida se encuentra en el orden del valor calculado.

4.3.3 Emulsiones formuladas con disacáridos y polisacáridos

Dentro de la industria de alimentos el empleo de aditivos para modificar propiedades organolépticas de los mismos y de coadyuvantes para lograr determinadas propiedades físicas es de uso común. Se analizó el empleo de hidrocoloides llamados corrientemente gomas y de disacáridos. Estos aditivos pueden o bien favorecer o bien ir en desmedro de la estabilidad de la emulsión.

4.3.3.1 Viscosidad del medio continuo

Uno de los factores que afectan la movilidad de un coloide inmerso en una solución es la viscosidad del medio continuo. En la Figura 38 se representa en un gráfico de barras las viscosidades a 20ºC de agua, una solución de sacarosa al 20% p/p y de las gomas garrofin y xántica al 0,3% p/p normalizadas frente a la viscosidad del agua pura η_{H20}.

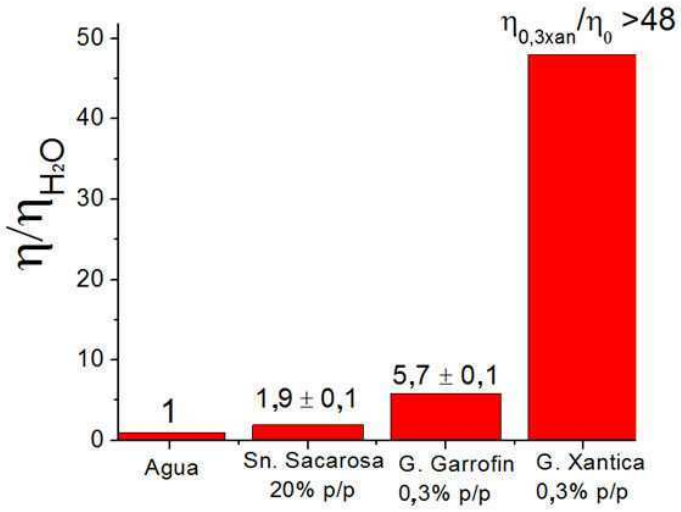

Figura 4.11. Viscosidad de distintas soluciones normalizadas por la viscosidad del agua a 20ºC.

En la Figura 4.11 se refleja que el agregado de sacarosa al 20% p/p aumentó en un factor dos la viscosidad del medio mientras que una pequeña cantidad de goma (0.3% p/p) aumentó la viscosidad en mucho mayor medida. Para la solución con goma garrofin el incremento de viscosidad fue del orden de seis veces respecto del agua mientras que para la solución de goma xántica hubo un aumento notable que no pudo ser evaluado con el método empleado. El incremento pudo deberse a que estos polisacáridos forman geles o entramados cohesivos en solución [Katzbauer 1998].

La presencia de coloides y proteínas también afecta la viscosidad del sistema. En la Figura 4.12 se grafica la viscosidad normalizada por la viscosidad del medio continuo (a concentración de proteína nula) de la solución de caseinato en agua o en 20% p/p de azúcar en función de la concentración de caseinato de sodio. Las mediciones demostraron que la viscosidad crece con el agregado de caseinato de sodio obteniéndose valores similares en agua o en solución de sacarosa al 20% p/p.

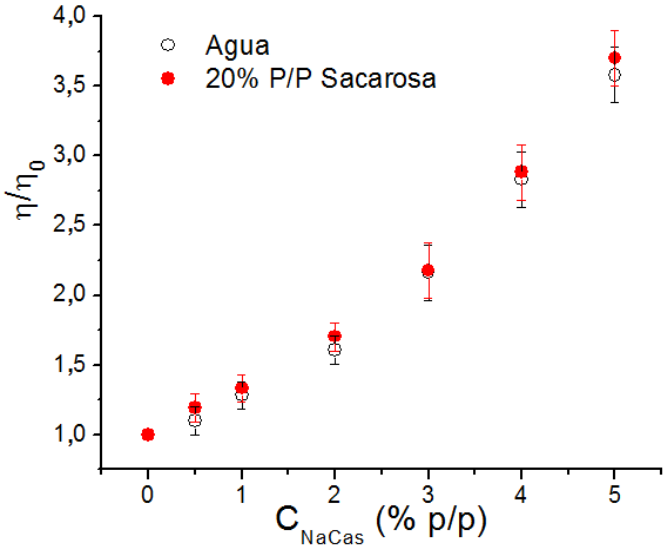

Figura 4.12. Dependencia de la viscosidad de la solución de caseinato de sodio (NaCas) en agua o en 20% p/p de sacarosa con la concentración de NaCas normalizada por la viscosidad del medio continúo a concentración nula de proteína. Símbolo vacio (negro) para proteína en agua y símbolo lleno (rojo) para proteína en solución de sacarosa al 20% p/p.

El análisis en dispersiones de polisacárido no se realizó por las carencias del instrumento empleado. Pero como resultado parcial se espera que en todos los casos el aumento en la viscosidad conlleve a una disminución en la movilidad de las partículas y por lo tanto mayor estabilidad de las emulsiones por disminución de la velocidad de migración. La viscosidad estuvo afectada en mayor medida por la presencia de polisacáridos (PS) que por la presencia de disacáridos (DS) o caseinato de sodio. Es esperable entonces que en el mecanismo de estabilización de los PS la viscosidad juegue un rol muy importante.

4.3.3.2 Tensión superficial

Una pregunta previa al análisis de la estabilidad de emulsiones con aditivos es si los mismos afectan la tensión superficial (energía libre superficial) y por lo tanto favorecen la dispersión del aceite en agua.

Tabla 4.7. Tensión superficial fase hidrofílica/aceite de girasol para muestras de agua, solución de sacarosa, goma xántica y las mismas con la presencia de 5% p/p de NaCas.

Fase hidrofílica	γ (FH/aceite) [mN /m]
Agua (1)	23,6 ± 0,7
20% p/p sacarosa (2)	11,03 ± 0,09
0,3% p/p goma xántica (3)	20,8 ± 0,8
(1)+ 5,0% p/p NaCas	7,6 ± 0,1
(2)+5,0% p/p NaCas	4,30 ± 0,08
(3)+ 5,0% p/p NaCas	7,9 ± 0,1

En la Tabla 4.7 se exhiben las tensiones superficiales calculadas por el método de gota colgante para la interfase solución acuosa/aceite de girasol. La presencia de un disacárido como la sacarosa disminuyó significamente la tensión superficial con respecto al agua pura indicando un efecto tensioactivo del azúcar. Cuando el azúcar se encontró en presencia de la proteína la tensión superficial disminuyó en un factor dos. Este resultado no había sido informado en la literatura para estos sistemas y apoya la hipótesis de que el azúcar interacciona con la proteína aunque se trate de un disacárido y no un polímero. Como era de esperar la tensión superficial de las emulsiones disminuyó apreciablemente con la concentración de NaCas. No hubo diferencias significativas entre la tensión superficial de la suspensión de proteína y la de proteína más PS, lo que indica que estos últimos no actúan como tensioactivos. La menor tensión superficial se logra

por combinación de DS y proteína indicando que el DS debería cumplir un rol importante en la estabilidad de la emulsión.

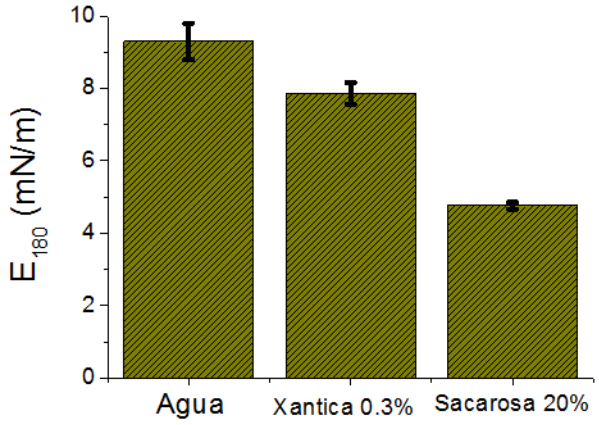

Figura 4.13. Módulo elástico de la interfase solución acuosa/aceite de girasol para suspensiones de 5,0% p/p de NaCas. Los porcentajes son en p/p.

En la Figura 4.13 se graficó el módulo elástico superficial (solución acuosa/aceite) para suspensiones de 5,0 % p/p de NaCas. Se observó que la elasticidad de la interfase luego de la inclusión de goma xántica fue apenas menor respecto a la misma concentración de proteína en agua. Mientras que con la inclusión de 20% p/p de sacarosa la superficie resultó apreciablemente menos elástica. Este resultado pudo deberse a la adsorción de disacáridos junto con la proteína en la interfase la que se vió acompañada de un decrecimiento de la tensión superficial (Tabla 4.7). No hubo efectos apreciables debido a la inclusión de polisacárido tanto en la energía libre como en la reología superficial.

4.3.3.3 Empleo de polisacáridos: Tamaño de partícula y estabilidad

Los resultados mostrados en la sección anterior presuponen que la adición de polisacáridos como goma garrofin y goma xántica estabilizarían la emulsión principalmente por aumento de la viscosidad, dado que no afectan la tensión superficial de la interfase aceite/agua. En la Figura 4.14 se describe el efecto del agregado de polisacáridos sobre la distribución de tamaño de partículas, tanto en muestras procesadas con ultraturrax (columna izquierda) como en las posteriormente tratadas con ultrasonido (columna derecha). Se observó una moda principal cercana a los valores presentados en secciones anteriores pero en todas las gráficas hay alguna pequeña población de partículas que supera en un orden de magnitud a la misma. Este efecto fue más marcado para las muestras preparadas con goma xántica que para las que contenían goma garrofin. Si bien en principio estos hidrocoloides no poseen actividad superficial, la preparación de las emulsiones se efectúa mediante un trabajo mecánico. La elevada viscosidad, y en especial para las emulsiones formuladas con goma xántica, va en detrimento de la formación de pequeñas partículas.

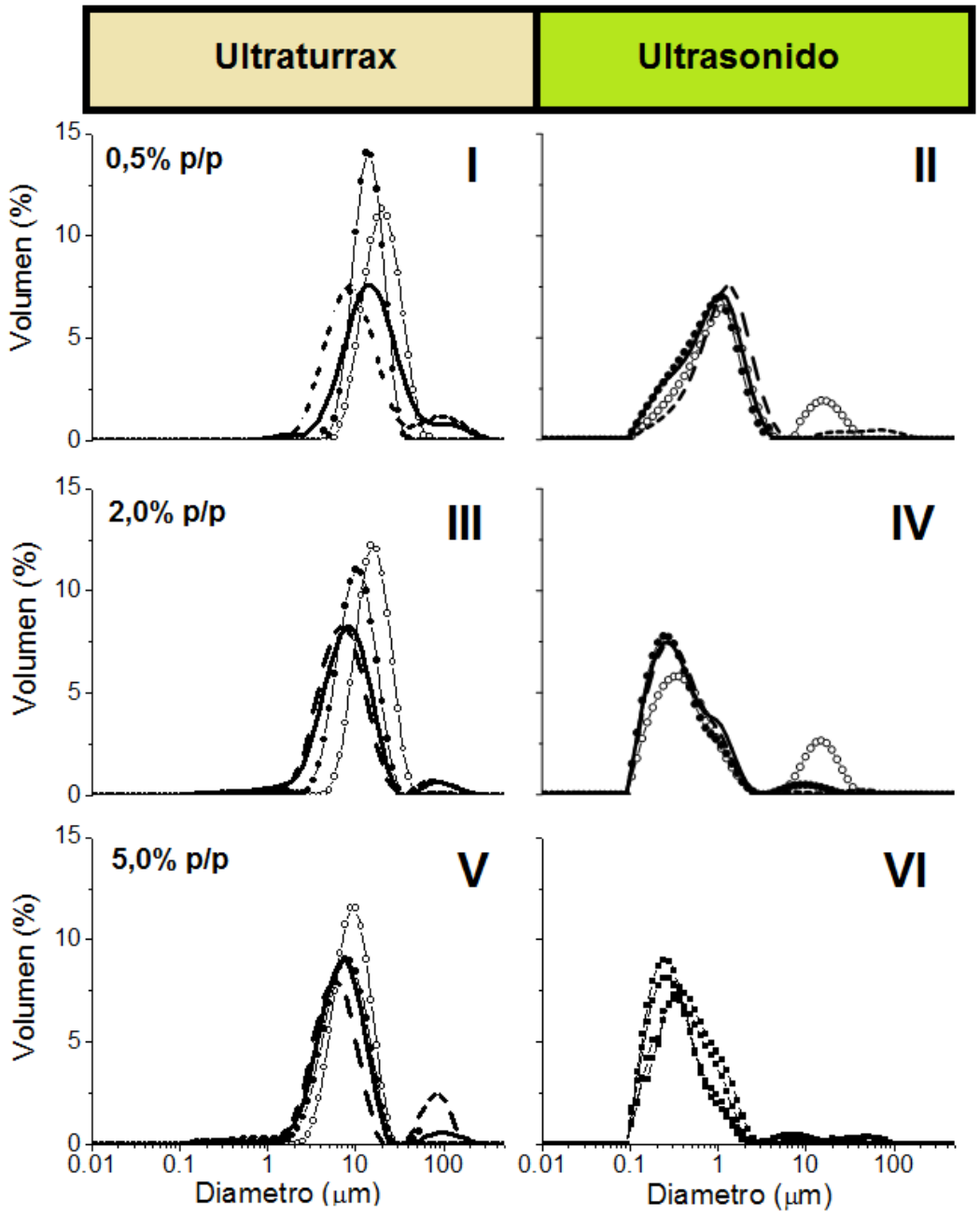

Figura 4.14. Distribución de tamaño de partícula de emulsiones de aceite de girasol formuladas con 0,5 (I,II), 2,0 (III,IV) y 5,0 % p/p (V, VI) de caseinato de sodio y polisacáridos. Goma garrofin: línea continua para una concentración de 0.3% p/p y línea cortada para 0,5% p/p. Goma xántica: símbolo lleno para una concentración de 0,3% p/p y símbolo vacío para 0,5% p/p.

En la Tabla 4.8 se detallan los parámetros que caracterizaron a las distribuciones analizadas en la Figura 4.14. No se observó una tendencia clara en

los valores del diámetro promedio de la distribución expresada en volumen ($D_{4,3}$) con respecto a los tabulados en la Tabla 4.3. Las diferencias puntuales encontradas pudieron deberse a las partículas de tamaños mayores a 100 µm que se observaron en las muestras preparadas con ultraturrax (Figura 4.14: I, III, V) y mayores a los 10 µm para aquellas procesadas posteriormente con ultrasonido (Figura 4.14: II, IV, VI). Más allá de su alta viscosidad, las emulsiones preparadas con goma xántica mostraron valores de $D_{4,3}$ menores a los de goma garrofin a pesar de que en la Figura 4.14 la moda principal de las emulsiones que contenían goma xántica se presente corrida a diámetros mayores respecto de la goma garrofin. Esta discrepancia tiene su sustento en que las poblaciones secundarias tuvieron mayor peso para la emulsión formulada con goma garrofin que con goma xántica, a pesar de tener una viscosidad menor. La viscosidad medida en estas emulsiones es estática. No se han realizado mediciones dinámicas como para entender este fenómeno. Este es otro ejemplo donde se demuestra que emplear solo los parámetros de distribución habituales no es suficiente para describir estas emulsiones. Las mismas deben analizarse junto con su curva de distribución correspondiente.

Tabla 4.8. Parámetros de distribución de tamaño de partícula para emulsiones formuladas con 0,5; 2,0 y 5,0 % p/p de NaCas y con polisacáridos. Los valores de los parámetros se expresan hasta la primera cifra significativa de su incertidumbre.

	Ultraturrax			Ultrasonido		
Muestra	$D_{4.3}$ (µm)	$V_{\%d>1}$	W (µm)	$D_{4.3}$ (µm)	$V_{\%d>1}$	W (µm)
G. Xántica 0,3% p/p						
NaCas 0,5%p/p	15,69	100,0	14,595	1,044	38,56	1,817
2,0% p/p	12,1	99,97	13,9	0,966	12,53	1,103
5,0% p/p	14,0	98,21	15,0	0,773	10,04	0,962
G. Xántica 0,5% p/p						
NaCas 0,5% p/p	23,17	100,0	26,4	4,47	53,91	16,893
2,0 % p/p	17,9	99,87	19,2	4,08	28,11	11,7
5,0% p/p	10,6	100	11,7	0,404	4,6	0,629
G. Garrofin 0,3% p/p						
NaCas 0,5% p/p	26,0	99,68	42,0	1,178	46,7	2,09
2,0 % p/p	16,1	97,1	18,2	0,532	15,45	1,004
5,0 % p/p	13,0	99,38	12,9	0,550	9,99	1,0
G.Garrofin 0,5% p/p						
NaCas 0,5% p/p	28	99,99	69	7,4	60,15	3,6
2,0 % p/p	15,2	97,59	16	1,45	13,3	1,043
5,0 %p/p	17	96,21	14,0	2,1	14,5	1,12

En la Figura 4.15 se exhiben los perfiles de luz dispersada en modo referencia obtenidos al emplear el analizador vertical “Turbiscan” en muestras tratadas con ultraturrax para emulsiones formuladas con 0,3 y 0,5% p/p de goma garrofín durante los primeros treinta minutos luego de sintetizada la muestra. En las emulsiones compuestas con 0,3% p/p de goma garrofin (Figura 4.15: I, III, V) se observó que el cremado y la floculación ocurrieron simultaneamente siendo menos evidente el primero a medida que se aumenta la concentración de NaCas. Por otro lado, con un aumento de polisacárido (Figura 4.15: II, IV, VI) la migración se suprimió, dentro del tiempo de medición. La emulsión preparada con 0,5 % p/p de NaCas se mantuvo estable durante el tiempo de medición y las emulsiones

estabilizadas con 2,0 y 5,0 % p/p de NaCas se desestabilizaron mayoritariamente por floculación. Al igual que en emulsiones analizadas previamente la desestabilización por floculación se incrementó al aumentar la concentración de proteína. La emulsión preparada con 2,0% p/p de NaCas y 0,5% de goma garrofín se desestabilizó principalmente por floculación a diferencia de lo ocurrido con la emulsión estabilizada con la misma concentración de proteína pero sin aditivos en la fase acuosa. Es decir, el tipo de mecanismo cambió con el agregado de goma garrofín. El aumento de viscosidad producido por el agregado del hidrocoloide suprimió o lentificó la migración y por eso el mecanismo de floculación que es más lento y necesita de un tiempo inicial para producirse fue el que ocurrió.

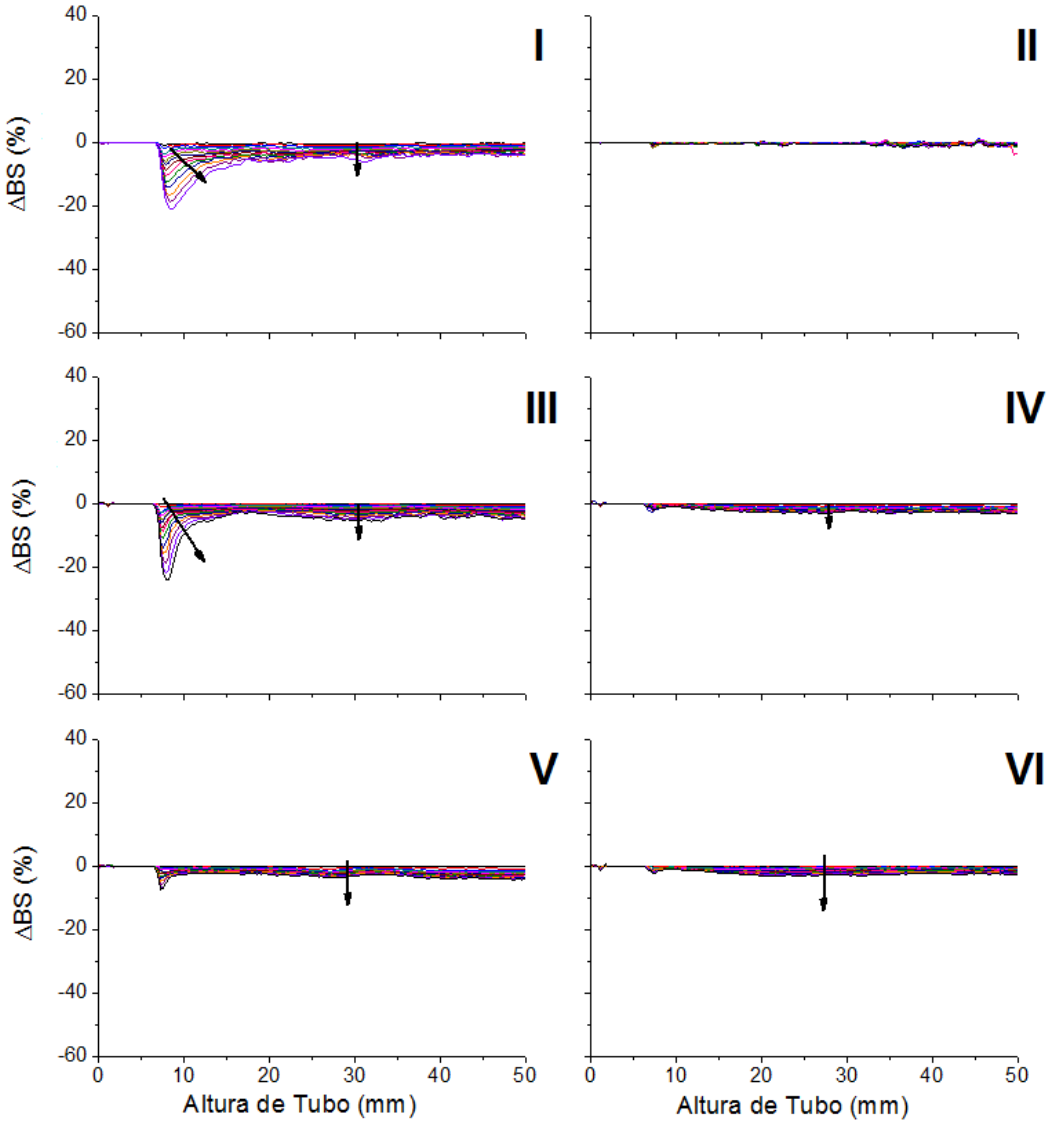

Figura 4.15. Perfiles de dispersión de luz registrados a 135º en modo referencia (ΔBS) en función de la altura de tubo para emulsiones procesadas con ultraturrax y formuladas con 0,3 (I, III, V) y 0,5% (II, IV, VI) de goma garrofin y 0,5 (I y II); 2,0 (III y IV) y 5,0 % p/p (V y VI) de NaCas.

En la Figura 4.16 se grafica el mismo intervalo temporal analizado en la Figura 4.15 para las emulsiones procesadas con ultraturrax y sintetizadas con 0,3 y 0,5% p/p de goma xántica. En la Figura 4.16 se observa que para la emulsión con 0,3% p/p de goma xántica y 0,5% p/p de NaCas (Figura 4.16 I) no se

registraron cambios en los perfiles en los tiempos de medida empleados. Para las otras concentraciones de NaCas no se registró migración a cortos periódos y la floculación aumentó con la concentración de proteína. En las emulsiones con 0,5% p/p de goma xántica (Figura 4.16: II, IV, VI) no se produjo desestabilización en el tiempo de medición seleccionado probablemente debido a un aumento drástico de la viscosidad. Es interesante destacar que el agregado de hidrocoloides produjo cambios en el mecanismo de desestabilización en las emulsiones de gota grande. Las emulsiones cuya fase acuosa no contenía hidrocoloides se desestabilizaron por cremado fundamentalmente. En las mismas la baja viscosidad del medio continuo facilitó la migración de gotas. Al ser la floculación un proceso más lento solo tuvo lugar cuando la migración se vio impedida.

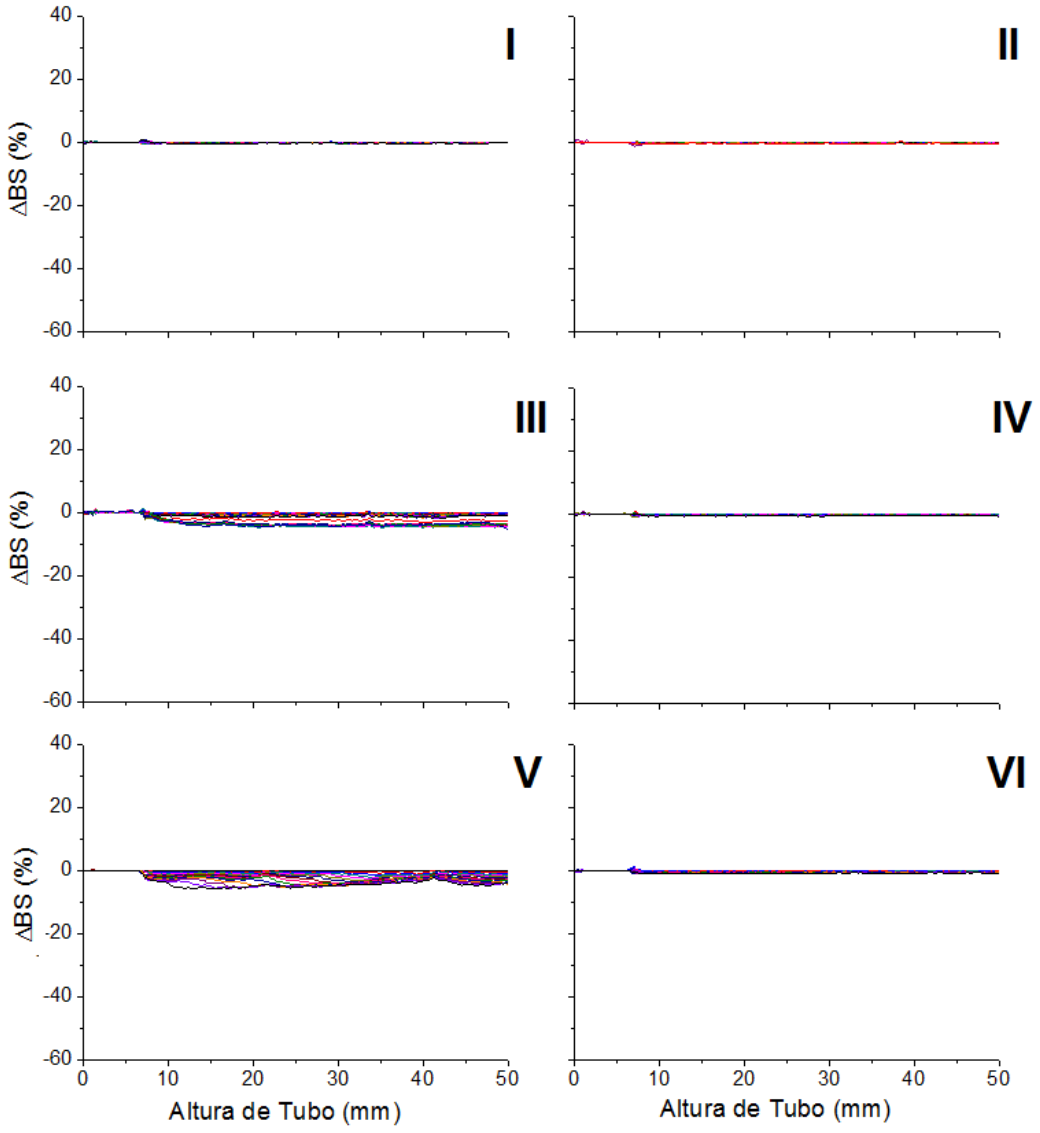

Figura 4.16. Perfiles de dispersión de luz registrados a 135º en modo referencia (ΔBS) en función de la altura de tubo para emulsiones procesadas con ultraturrax y formuladas con 0,3 (I, III, V) y 0,5% (II, IV, VI) de goma xántica y 0,5 (I y II); 2,0 (III y IV) y 5,0% p/p (V y VI) de NaCas.

La cinética de formación de agregados puede seguirse calculando la intensidad media en la zona central del tubo (20-50 mm) la que se encuentra menos afectada por el fenómeno de migración de gotas. En la Figura 4.17 se grafica el valor médio de Backscattering en función del tiempo. En el caso del agregado de goma garrofín (Figura 4.17: I) no hubo una tendencia aparente entre

la disminución de BS y la concentración de NaCas para ninguna de las dos concentraciones del polisacárido ensayadas. Sin embargo, cuando analizamos las curvas correspondientes a la goma xántica (Figura 4.17: II) se observó un decrecimiento más acelerado del ΔBS para emulsiones con mayores concentraciones de NaCas respecto de las de menor concentración. Esta tendencia se cumple tanto para 0,3% como para 0,5% p/p de polisacárido donde la segunda presenta además una cinética más lenta como se puede observar cualitativamente en la Figura 4.16.

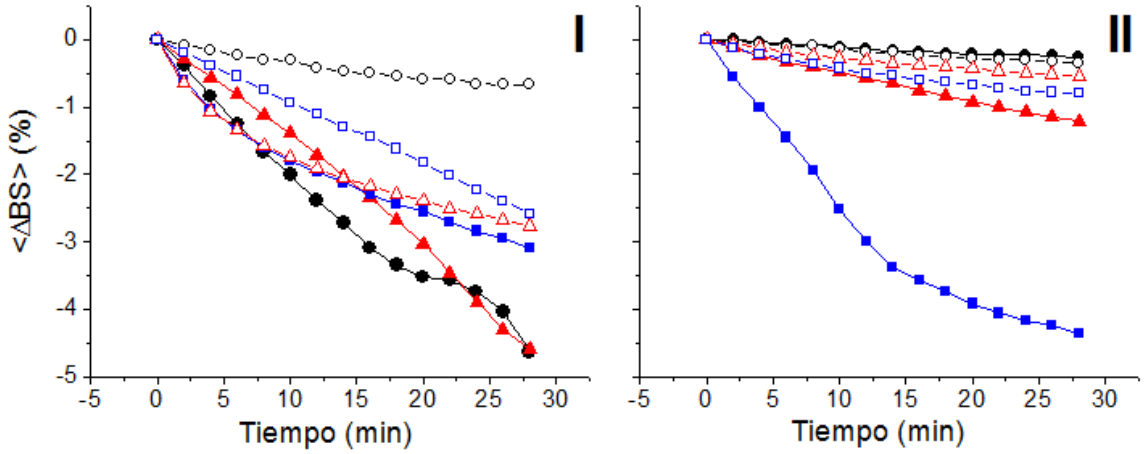

Figura 4.17. Intensidad promedio de luz dispersada (calculada a partir de las curvas obtenidas con el detector colocado a 135º) medida a mitad de tubo (20-50 mm) y graficada en función del tiempo. Los símbolos llenos indican una concentración de polisacáridos de 0,3% p/p y los vacios de 0,5% p/p, con 0,5% p/p (círculos), 2,0 % p/p (triangulos) y 5,0 % p/p (cuadrados) de caseinato de sodio (NaCas) para: I) Goma Garrofin y II) goma xántica.

La falta de una tendencia clara en las cinéticas de floculación de las emulsiones formuladas con goma garrofin (Figura 4.17 I) pudo deberse a que hubo dos mecanismos acoplados. En las emulsiones con goma garrofín tanto la migración como la floculación afectaron la medida de BS. Si bien la migración se

manifiesta con mayor intensidad en la zona 0-20 mm y muy poco por encima de 50 mm pudo haber habido una contribución de este mecanismo en el BS de la parte central del tubo. En las emulsiones formuladas con goma xántica (Figura 4.17 II) no se evidenció migración alguna debido a que la viscosidad del medio continuo fue muy elevada y la floculación resultó el único mecanismo físico de desestabilización apreciable.

A las 24 horas de sintetizadas las emulsiones se obtuvieron micrografías con un microscopio confocal de barrido láser (LSCM). En la Figura 4.18 se observan las imágenes obtenidas luego de teñir la fase oleosa con *Nyle-red*. Las emulsiones que se presentan son las de 0,5% p/p de NaCas y procesadas con ultraturrax. Las gomas xántica y garrofín se agregaron al 0,3% p/p y 0,5% p/p. En todas las fotografías se puede ver que las gotas no forman agregados extensos y que a excepción de la formulada con goma garrofín al 0,3% (Figura 4.18 I), en la que puede notarse una pequeña agregación, el resto son glóbulos homogéneamente dispersos.

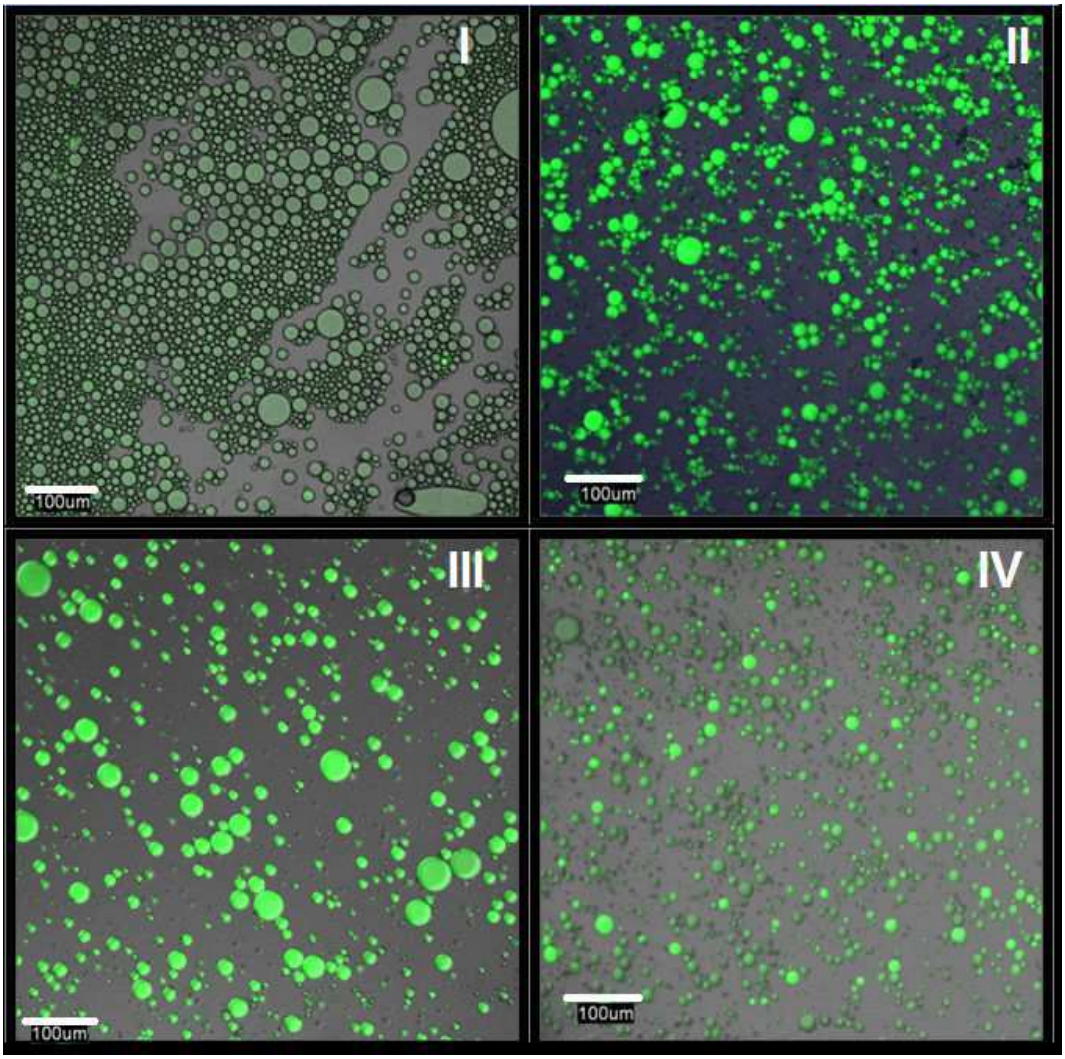

Figura 4.18. Micrografías obtenidas con un microscopio óptico confocal de barrido láser (LSCM) para emulsiones almacenadas 24 h a 22.5°C, la fase lipídica se tiñó con el colorante Nyle-red. Las emulsiones se estabilizaron con 0,5% p/p de NaCas y las fases acuosas contuvieron goma garrofin 0,3 (I) y 0,5% (II) o goma xántica al 0,3 (III) y 0,5% (IV).

El análisis de estabilidad de las emulsiones preparadas con ultraturrax solo fue realizado en la primera media hora luego de sintetizada la muestra. Las emulsiones de 0,5% de NaCas y formuladas con goma xántica resultaron ser las más estables. Extendiendo las mediciones de las muestras sintetizadas con goma xántica (Figura 4.19) durante una semana se pudo observar que la estabilidad de la emulsión que posee la menor concentración de NaCas y polisacárido (Figura

4.19 I) se mantuvo aun después de una semana de preparada. Cuando se incrementó la concentración de polisacárido a 0,5% p/p se registró una pequeña floculación de partículas (Figura 4.19 II); la floculación resultó muy evidente al aumentar la concentración de NaCas a 5,0% p/p (Figura 4.19 III y IV).

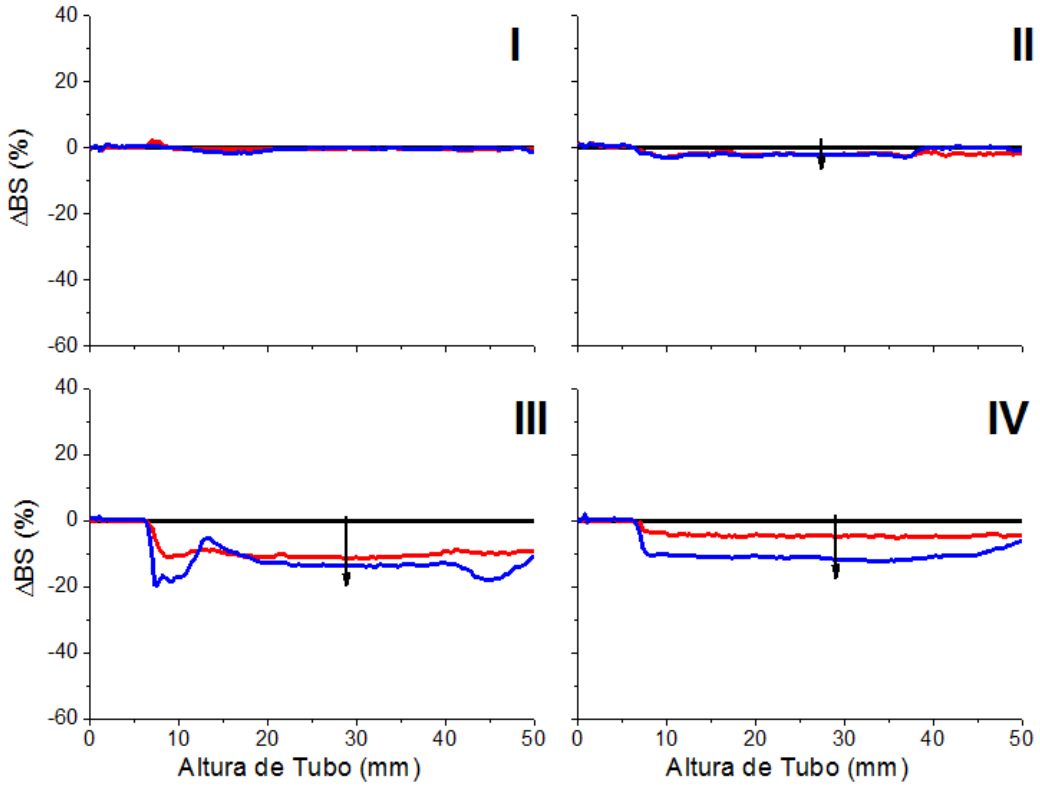

Figura 4.19. Perfiles de dispersión de luz registrados a 135º, expresados en modo referencia (ΔBS) en función de la altura de tubo para emulsiones procesadas con ultraturrax a tiempo inicial (línea negra), 3 días (línea roja) y a los 7 días (línea azul) para: I) 0,3% p/p de goma xántica y 0,5% p/p de NaCas; II) 0,5% p/p de goma xántica y 0,5% p/p de NaCas; III) 0,3%% p/p de goma xántica y 5,0% p/p de NaCas y IV) 0,5% p/p de goma xántica y 5,0% p/p de NaCas.

Al aplicar ultrasonido el tamaño de gota disminuyó y por lo tanto el área superficial expuesta aumentó. Para estas emulsiones se observó una rápida desestabilización de las mismas por formación de agregados y separación de fase (un incremento en la Transmitancia –Ts-) como se detalla en la Figura 4.20 y Figura 4.21.

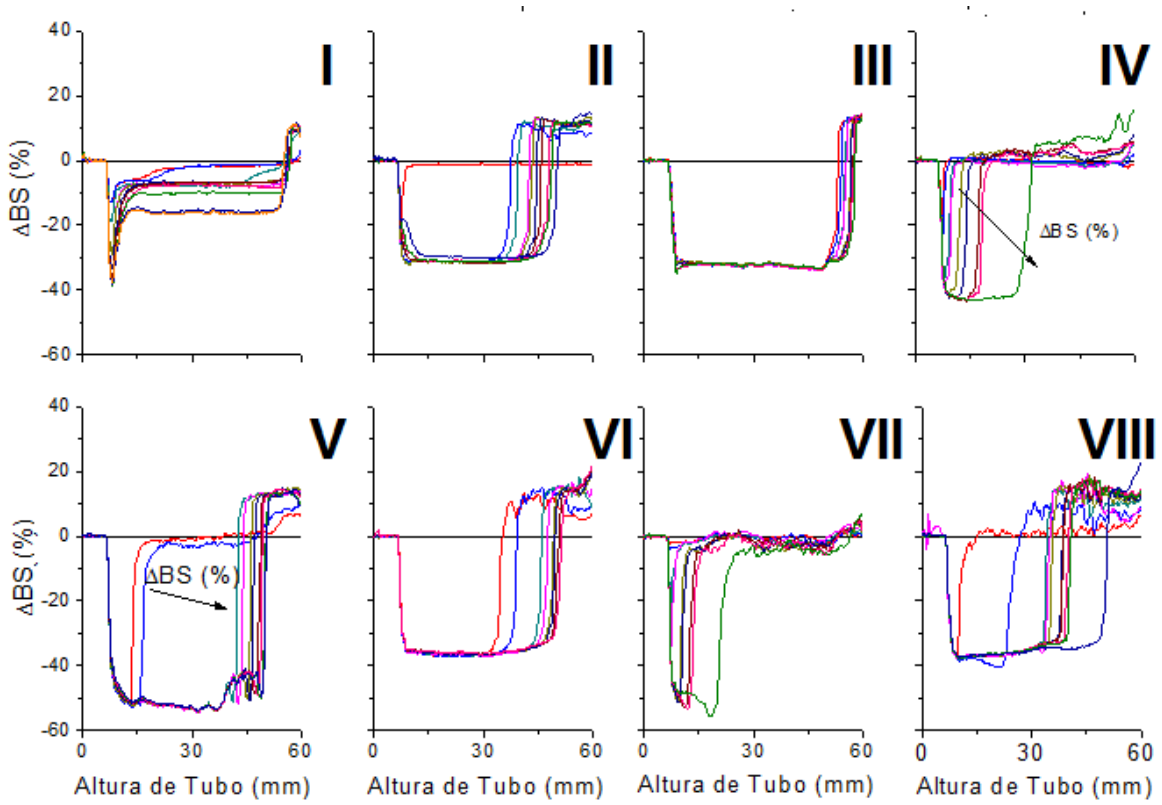

Figura 4.20. Intensidad de luz dispersada registrada a 135º para emulsiones estabilizadas con 0,5 (impares) y 5,0% p/p (pares) de NaCas y procesadas con ultrasonido formuladas con goma garrofín (fila superior) y goma xántica (fila inferior) al 0,3 (I, II, V y VI) y 0,5% p/p (III, IV, VII y VIII) de polisacárido.

En la Figura 4.20 se puede observar que en todos los casos hubo floculación y migración de los flóculos formados. En los casos de goma xántica, el aumento de la transmisión de luz fue consistente con una separación de fases; se formó una fase acuosa límpida en el fondo del tubo indicando una clara desestabilización de la emulsión. En el caso de la goma garrofin este efecto solo es visible a altas concentraciones de caseinato de sodio y de polisacárido.

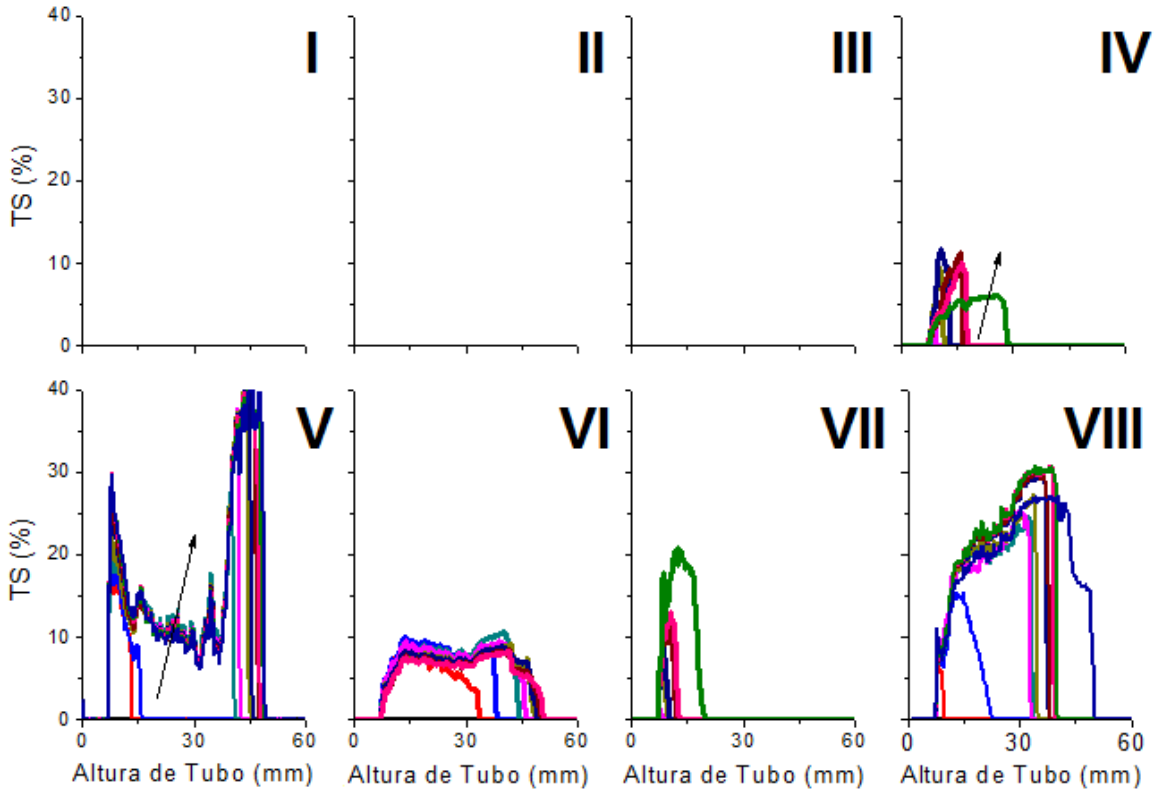

Figura 4.21. Intensidad de luz transmitida para emulsiones estabilizadas con 0,5 (impares) y 5,0% p/p (pares) de NaCas y procesadas con ultrasonido formuladas con goma garrofín (fila superior) y goma xántica (fila inferior) al 0,3 (I, II, V y VI) y 0,5% p/p (III, IV, VII y VIII) de polisacárido.

Es decir, en muestras procesadas con ultraturrax, la goma xántica resultó un estabilizante más efectivo que la goma garrofin, pero su inestabilidad fue mayor cuando disminuyó el tamaño de partícula. En la Figura 4.22 se exhiben micrografías de LSCM en emulsiones formuladas con 0,3 y 0,5% p/p de polisacáridos y estabilizadas con 0,5 y 5,0% p/p de NaCas. En todos los casos se pudo observar floculación de partículas, así como agregados superiores, que fueron acordes con las mediciones realizadas con otras técnicas ópticas antes descriptas.

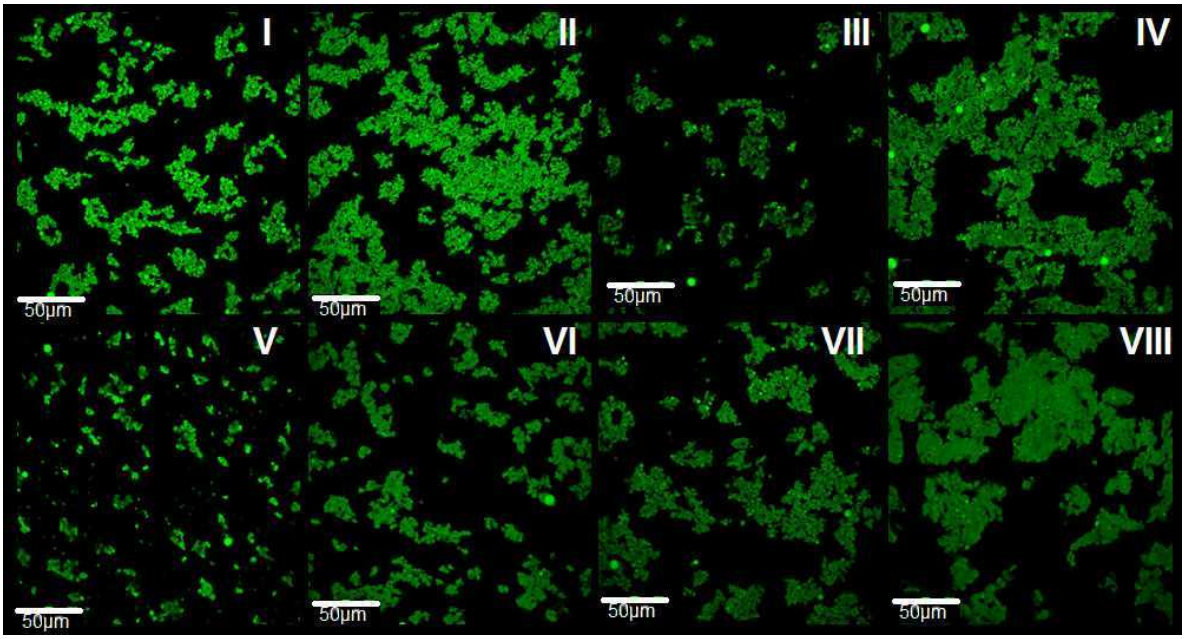

Figura 4.22. Micrografías obtenidas con un microscopio óptico confocal de barrido láser (LSCM). La fase lipídica se tiñó con el colorante *Nyle-red*. Las emulsiones se prepararon con 0,5 (impares) y 5,0% p/p (pares) de NaCas y las fases acuosas contuvieron goma garrofín (fila superior) o goma xántica (fila inferior) al 0,3 (I, II, V y VI) o 0,5% (III, IV, VII y VIII) de polisacárido.

Las emulsiones con mayor estabilidad temporal son las formuladas con la menor concentración de goma xántica y caseinato de sodio ensayadas. Al aplicar ultrasonido todas las emulsiones fueron altamente inestables, probablemente por una mayor interacción proteína-interfase-polisacárido que afectó el entramado de la goma [Rodríguez-Patino & Pilosof 2011; Ye, Gilliland & Singh 2011]. Las EG de goma garrofin fueron inestables en todas las condiciones en las que se observó una mezcla de mecanismos.

4.3.3.4 Empleo de disacáridos: Tamaño de partícula y estabilidad

Sería esperable que hubiera un efecto del agregado de disacáridos a las emulsiones procesadas con ultraturrax sobre el tamaño medio de partícula ($D_{4,3}$)

debido a que estos azúcares simples poseen actividad superficial. De acuerdo a esto, se esperaría también que la estabilidad de la emulsión resultante fuera mayor y que se produjera una disminución en la velocidad de cremado como consecuencia de la disminución del $D_{4,3}$. En la Figura 4.23 se muestra la distribución de tamaño de partículas para emulsiones estabilizadas con 5,0 % p/p de NaCas y formuladas con 20% p/p de sacarosa o trehalosa. Los resultados mostrados confirman la suposición que los azúcares deberían disminuir $D_{4,3}$. Las distribuciones con azúcares presentaron una disminución significativa del tamaño de gota.

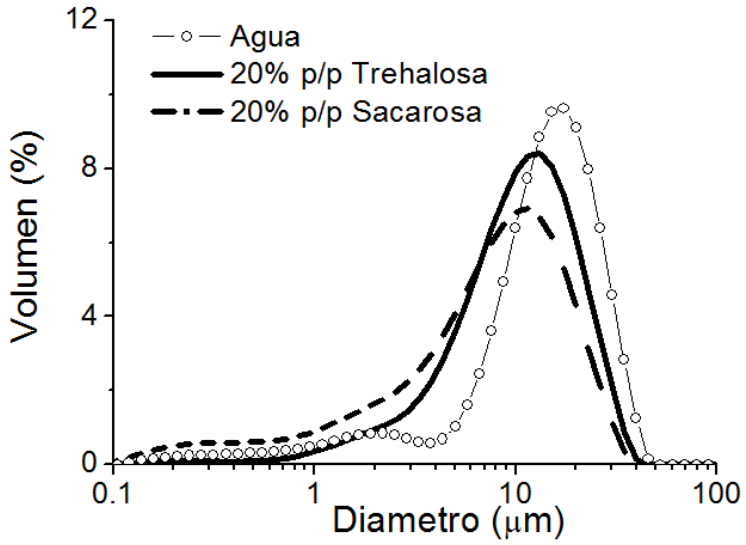

Figura 4.23. Distribución de tamaño de partículas expresado en porcentaje en volumen para las emulsiones homogenizadas con ultraturrax, estabilizadas con 5,0% de NaCas y con una fase acuosa que podía no contener aditivos agregados (símbolo vacío), contener 20% p/p de trehalosa (línea gruesa continua) o 20% p/p de sacarosa (línea entrecortada).

En la Figura 4.24 se muestra la evolución temporal de la intensidad de luz dispersada por las emulsiones preparadas con 5,0 % p/p de NaCas y procesadas con ultraturrax. Se encontró un comportamiento de desestabilización similar tanto

para las emulsiones formuladas con 20% p/p de sacarosa (Figura 4.24 I) como para las que poseen la misma concentración de trehalosa (Figura 4.24 II). El cremado fue el mecanismo de desestabilización esperado debido a que gran parte de los glóbulos tienen tamaños mayores a los 10 µm como se aprecia en la Figura 4.23. A simple vista se puede observar que la velocidad de migración es ligeramente mayor para la emulsión preparada con trehalosa (Figura 4.24 II) que posee una campana invertida más pronunciada. Los cálculos de la velocidad de migración se presentan en la Tabla 4.9. Como puede observarse el agregado de azúcares disminuyó la velocidad de migración siendo el valor para la emulsión con sacarosa ligeramente menor que para la emulsión con trehalosa.

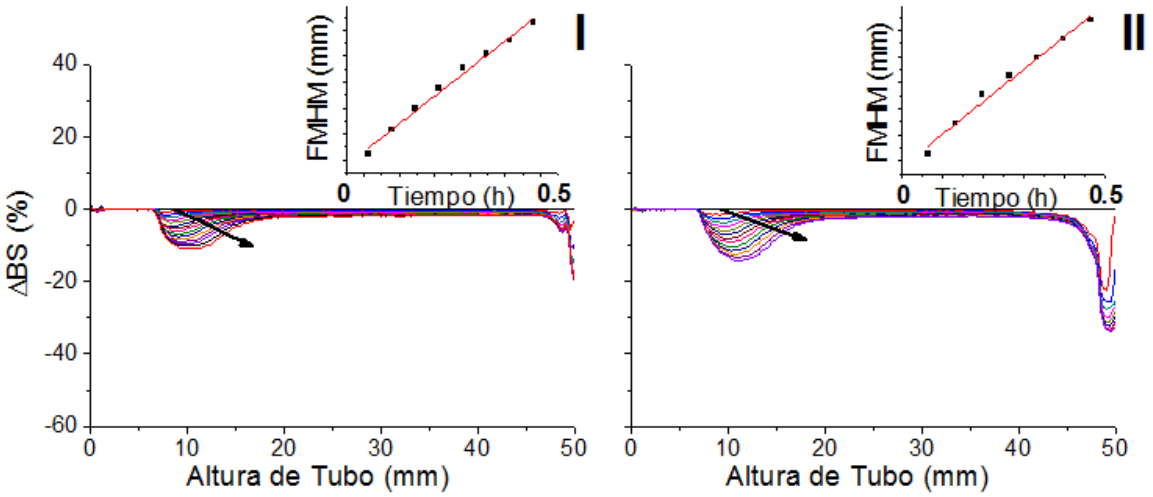

Figura 4.24. Intensidad de luz dispersada registrada a 135º en función de la altura del tubo y del tiempo para emulsiones homogenizadas por ultraturrax, con 5,0% p/p de NaCas y 20% p/p de sacarosa (A) y 20% p/p de trehalosa (B). En los inset se muestra el ancho de pico a media altura del máximo en función del tiempo. La flecha indica la evolución temporal. La emulsión sin agregados en la fase acuosa se muestra en la Figura 4.6 V.

Según la ley de Stokes la relación entre velocidades de migración (K) está determinada por el promedio del cuadrado de los diámetros medidos con y sin

aditivos y las viscosidades de ambas emulsiones. Para dos dispersiones coloidales cuyas fases continuas poseen densidades no muy diferentes y la fracción de volumen de la fase dispersa es la misma, K puede simplificarse a la siguiente expresión:

$$K_i(calculada) \approx \frac{< D_i^2 > \eta_{H_2O}}{< D_{H_2O}^2 > \eta_i} K_{H_2O}$$ Ecuación 4.11

Donde en la Ecuación 4.11 se expresa la velocidad de migración de la emulsión “i” respecto del valor obtenido para la emulsión de igual concentración de proteína y aceite sin aditivos en la fase acuosa (K_{H2O}). En la Tabla 4.9, además de las velocidades de migración calculadas a partir de las medidas realizadas con el analizador Turbiscan, se muestran las calculadas según la relación de la Ecuación 4.11, el diámetro medio de las partículas ($D_{4,3}$) de las curvas de la Figura 4.23 y la viscosidad de la fase continua. Como se informó previamente, las emulsiones formuladas con disacáridos disminuyeron el tamaño de gota debido a la disminución en la tensión superficial de la interfase aceite/agua (página 118). Este hecho sumado a un aumento de la viscosidad del medio continuo devino en un decrecimiento de un factor 2 en la velocidad de cremado. Las velocidades de migración calculadas con la Ecuación 4.11 siguieron la misma tendencia aunque difirieron numéricamente. Las diferencias pueden deberse a que el cálculo a partir de la Ecuación 4.11 se realiza empleando los valores medios de las propiedades y los mismos no reflejan la complejidad de la dispersión coloidal.

Tabla 4.9. Velocidades de migración calculadas a partir de las medidas realizadas con el analizador Turbiscan y con la Ecuación 4.11 para emulsiones estabilizadas con 5% p/p de NaCas y formuladas sin aditivos o con 20% p/p de sacarosa o trehalosa disueltas en la fase acuosa. Se muestra además el diámetro medio de la distribución expresada en volumen ($D_{4,3}$) y la viscosidad del medio continuo.

Muestra	$D_{4,3}$ (μm)	Viscosidad Sn. (cp)	$K_{calculada}$ (mm/h)	$K_{Turbiscan}$ (mm/h)
agua	16,35	1,002	---	58,0±1,0
Sacarosa	9,95	1,90 ± 0,01	12,0 ± 1,0	19,8± 0,7
Trehalosa	12,7	2,03 ± 0,01	16,0 ± 1,0	23,0± 0,5

En la Figura 4.25 se graficaron las distribuciones de tamaño de partícula para emulsiones formuladas con 20% p/p de sacarosa o trehalosa y las emulsiones sin aditivos agregados, homogenizadas con ultrasonido. La inclusión de disacáridos favoreció la dispersión de la fase discontinua dando emulsiones con tamaño de gota más pequeño que el presentado en las emulsiones sin aditivos en la fase acuosa para las tres concentraciones de caseinato de sodio exhibidas. No se encontraron diferencias significativas en los tamaños de gota de las emulsiones cuando se agregó sacarosa o trehalosa a la fase acuosa. Las emulsiones con ambos azúcares presentaron distribuciones de tamaño de gota muy similares entre sí. Para una concentración de NaCas de 0.5% p/p se formaron dos poblaciones diferentes, una de ellas con una moda mucho menor a la de la emulsión sin aditivos. El agregado de azúcares favoreció la formación de gotas pertenecientes a la población de menor moda, a punto tal que fue la población preponderante en la emulsión preparada con 5% p/p de NaCas (Figura 4.25 III).

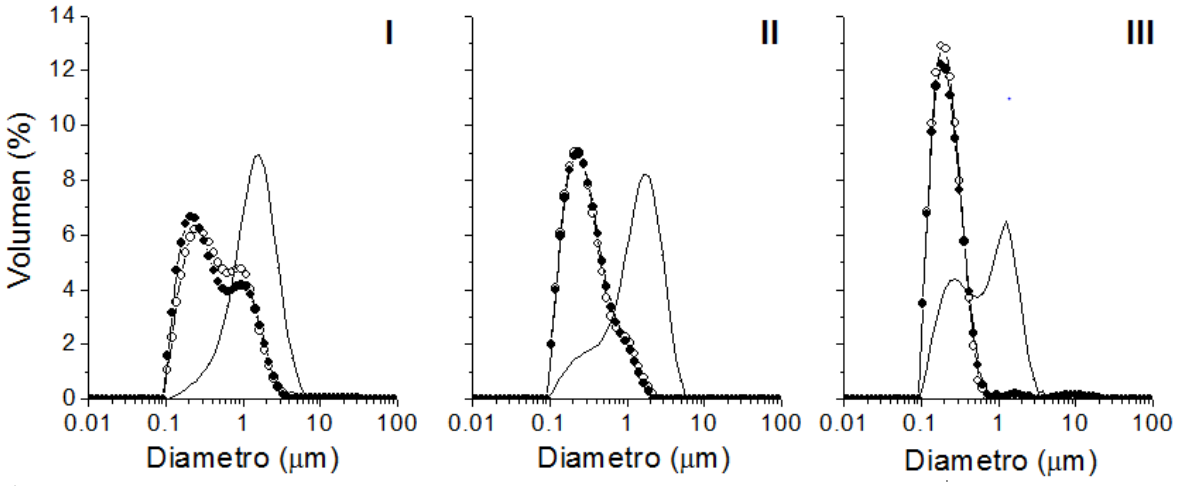

Figura 4.25. Distribución de diámetro de partícula para emulsiones formuladas con 20% p/p de sacarosa (símbolos vacios) o trehalosa (simbolos llenos) comparadas con la emulsión sin aditivos (línea continua) homogenizadas por ultrasonido y estabilizadas con 0,5 (I), 2,0 (II) y 5,0% p/p (III) de NaCas.

En la Figura 4.26 se presentan los cambios en los perfiles de BS expresados en modo referencia para emulsiones con agregado de sacarosa y trehalosa al 20% p/p y estabilizadas con 0,5 (Figura 4.26 I, II), 2,0 (Figura 4.26 III y IV) y 5,0% p/p (Figura 4.26 V y VI) de NaCas y procesadas con ultrasonido. Se observa que mirando el comportamiento en forma global, el efecto de ambos azúcares en la estabilidad de la emulsión es similar. Su inclusión baja la tasa de cremado y suprime la floculación. Si bien las muestras con 5,0 % de caseinato de sodio (Figura 4.26 V y VI) parecen tener una variación en la intensidad media medida a lo largo del tiempo a simple vista, en sendas repeticiones realizadas no exhibieron ninguna tendencia de floculación. Estas últimas emulsiones fueron almacenadas hasta por tres semanas sin que mostraran cambios apreciables de apariencia y de luz dispersada siendo por lo tanto consideradas como emulsiones estables.

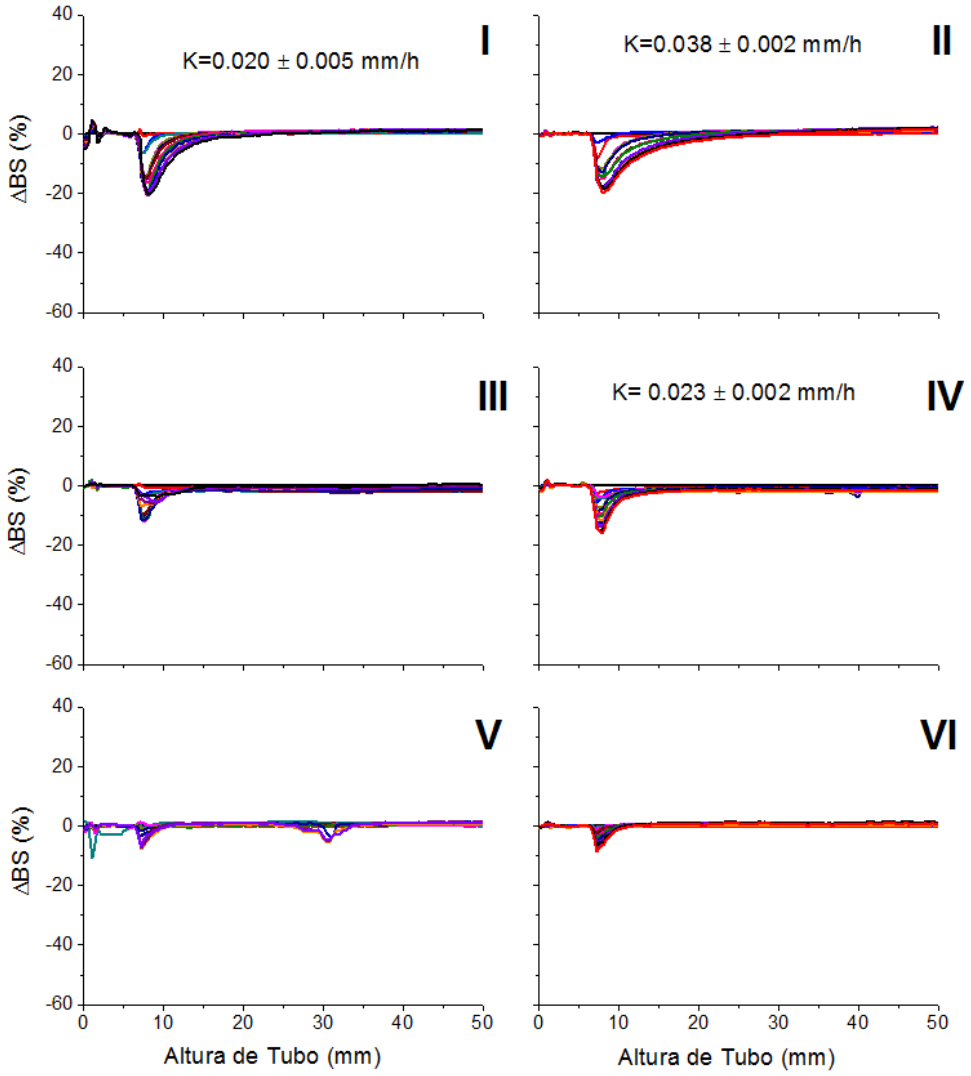

Figura 4.26. Intensidad de luz dispersada registrada a 135º en función de la altura del tubo y del tiempo para emulsiones procesadas con ultrasonido estabilizadas con 0,5 (I y II), 2,0 (III y IV) y 5,0% p/p (V y VI) de NaCas y formuladas con 20% p/p de sacarosa (impares) y 20% p/p de trehalosa (pares). K refiere a la velocidad de migración.

Si se recapitula la evidencia experimental, se observa que tanto sin aditivos como con disacáridos agregados, en el caso de EG el mecanismo principal que se registró fue la migración o cremado debido a que la dispersión coloidal era de partículas grandes y el empuje causado por la diferencia de densidades rigió el fenómeno observado. Por otro lado, cuando se aplicó ultrasonido el tamaño de

gota se redujo en un orden de magnitud lo que trajo como consecuencia una reducción en unos dos órdenes de la velocidad de migración. En ausencia de aditivos, el incremento de caseinato de sodio favoreció la floculación. La formación de agregados se pudo evitar con disacáridos disueltos en la fase acuosa. La Figura 4.27 resume esta tendencia mediante micrografías de LSCM donde es claro que al agregar sacarosa el tamaño de glóbulo disminuye en las EG (Figura 4.27 III) respecto de la emulsión sin aditivos (Figura 4.27 I). Cuando se aplica ultrasonido hay evidencias experimentales de floculación en las emulsiones que no poseen aditivos agregados a la fase acuosa (Figura 4.27 II). Por el contrario cuando se agrega azúcares la dispersión es homogénea (Figura 4.27 IV).

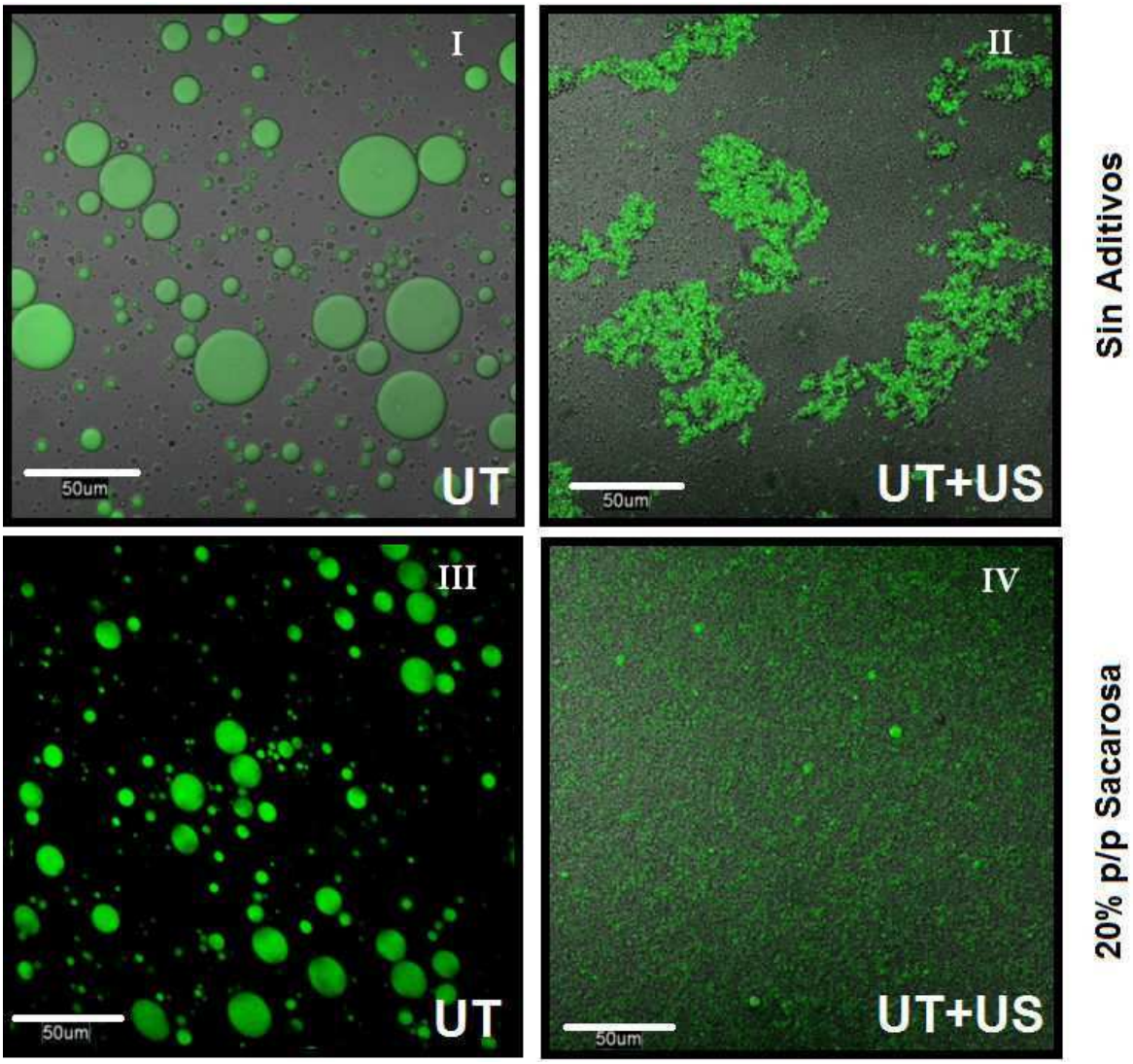

Figura 4.27. Micrografías obtenidas por LSCM que muestran emulsiones estabilizadas con 5% p/p de NaCas sin aditivos agregados (I y II) y emulsiones formuladas con 20% de sacarosa (III y IV).

4.3.4 Una mirada en la nanoescala.

Hasta el momento hemos abordado la descripción de la estabilidad de emulsiones por evidencia macroscópica en diferentes entornos. El hecho de que haya un cambio notable en la estabilidad de una emulsión de caseinato de sodio por el agregado de un disacárido a concentraciones altas de proteína nos motivó a realizar estudios en una escala más pequeña con el objetivo de conocer cómo se

organizan las nanopartículas de caseinato de sodio en los distintos entornos. Como se ha mencionado anteriormente, la técnica de dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS) provee información que se encuentra en el orden de los nanómetros. Las gotas de aceite en todas las muestras ensayadas son muy grandes y no son detectadas en el intervalo de “q” ensayado. Por ende, los patrones de dispersión son debidos a las nanopartículas de proteína, o sea, a las submicelas de caseína que forman el caseinato de sodio. En la Figura 4.28 se muestra una secuencia de dispersogramas donde están contenidas curvas correspondientes a emulsiones preparadas con diferentes métodos de procesamiento, diferentes aceites o que contengan alguno de los dos disacáridos ensayados en la fase acuosa. En la Figura 4.28 I se grafican emulsiones procesadas con ultraturrax para los 3 aceites ensayados en la tesis. Al igual que en lo encontrado al analizar estas muestras con el equipo Turbiscan la estructura del NaCas solo cambió con el agregado de azúcar y no con la naturaleza del aceite en cuestión. Por otro lado hubo también diferencias significativas dependiendo del método de procesamiento empleado como se aprecia en la Figura 4.28 II en la que se ve que una disminución de tamaño de gota, o sea, un aumento de superficie expuesta, se traduce en diferencias evidentes en el dispersograma. Los cambios estructurales se encuentran primordialmente relacionados con la composición de la fase acuosa y con el área superficial expuesta por el aceite. Las emulsiones tratadas con polisacáridos no pueden ser estudiadas con esta técnica porque poseen una estructura que dispersa la radiación X en el mismo intervalo de q que la proteína y la deconvolución de cada contribución no es trivial.

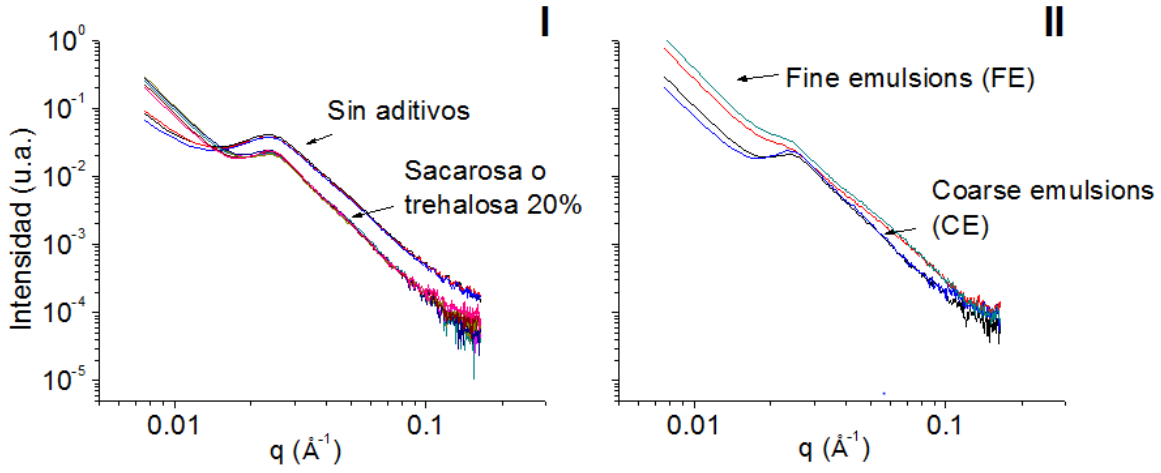

Figura 4.28. Patrones de dispersión de rayos X a bajos ángulos de emulsiones de aceite de pescado, oliva y girasol estabilizadas con 5,0% p/p de NaCas. A) formuladas con disacáridos o sin aditivos y procesadas con UT. B) emulsiones con disacáridos en la fase acuosa procesadas con ultrasonido (EF) o ultraturrax solamente (EG).

La intensidad calculada según la Ecuación 4.10 comprende dos contribuciones: un factor de forma y un factor de estructura que a su vez se lo desacopla en un factor de estructura de corto alcance y otro que toma en cuenta la macro-estructura formada por las mismas. En la Figura 4.29 se ejemplifica la contribución de cada función a la intensidad total. A bajos ángulos (o lo que es lo mismo a bajos valores de q) la curva está caracterizada por los agregados supramoleculares de las submicelas de caseína que se describen con el factor de estructura fractal. A ángulos intermedios las curvas se caracterizan por un pico ancho (ver Figura 4.28) que puede ser atribuido a la correlación entre dos submicelas cercanas (factor de estructura de esferas rígidas). A altos ángulos la contribución principal corresponde al factor de forma de casquetes esféricos polidispersos. Cualquier correlación que pueda existir entre agregados supramoleculares solo podría ser detectada a muy bajo ángulo, siendo ese rango

de q inaccesible en el sincrotrón de campinas actual, por lo tanto dicha interacción no se incluye en el modelo.

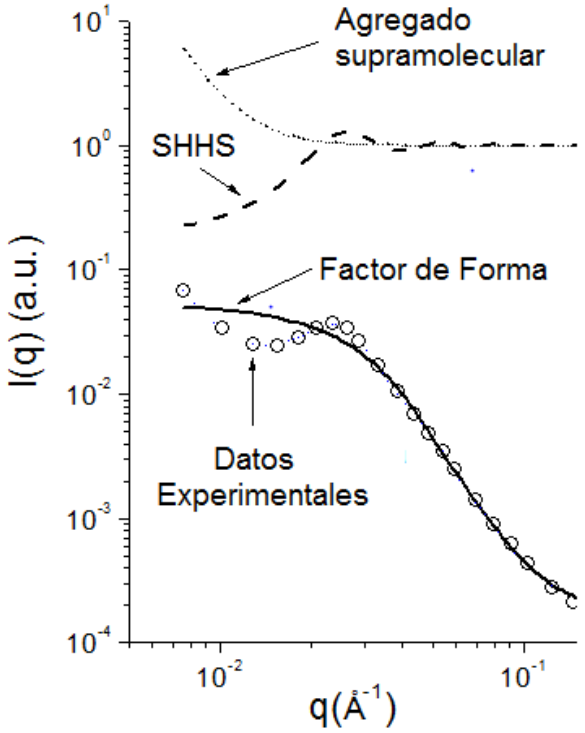

Figura 4.29. Ejemplo de un diagrama de SAXS experimental de NaCas (círculos) en el cual se muestran las contribuciones individuales del modelo propuesto. En línea continua el factor de forma de casquetes esféricos polidispersos. En linea cortada el efecto de correlación de las submicelas (SHHS) descripto por esferas rígidas. En línea punteada el efecto de agregado supramolecular descripto por un factor de estructura fractal.

En la Figura 4.30 se presentan las curvas experimentales y los ajustes del modelo para las mismas utilizando las rutinas de optimización de los Anexos 2, 3 y 4 para las muestras de 2,0; 5,0 y 7,5% p/p de NaCas en diferentes entornos. La concentración de 0,5% p/p fue obviada por su alta inestabilidad y por la baja estadística en la señal.

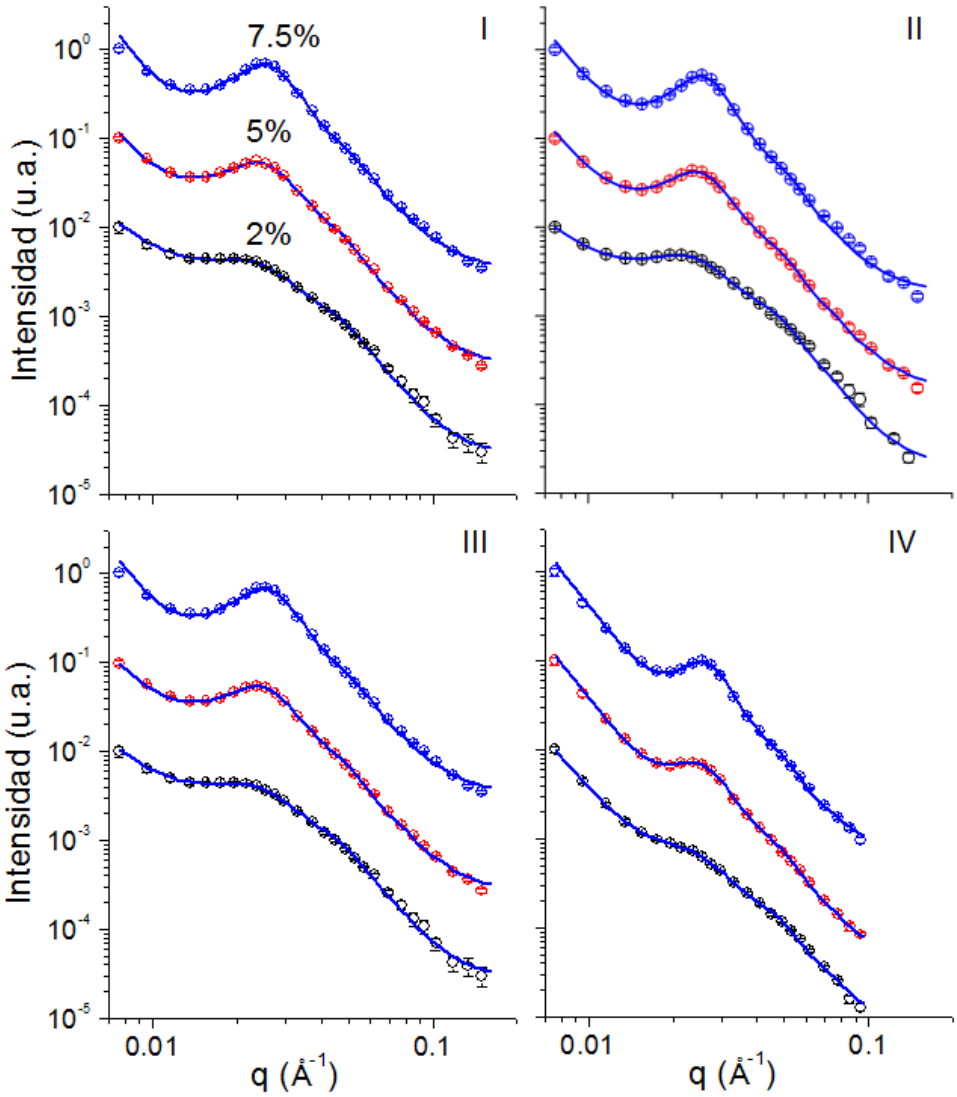

Figura 4.30. Diagramas de dispersión de rayos X para muestras con 2,0; 5,0 y 7,5% p/p de NaCas en el orden que se muestra en I. Los datos experimentales se graficaron en símbolos y el ajuste en línea continua. I) NaCas suspendido en agua. II) NaCas suspendido en solución de 20% p/p de sacarosa. III) Emulsión de aceite de girasol estabilizada con NaCas sin aditivos y procesada con UT. IV) Emulsión de aceite de girasol estabilizada con NaCas y 20% p/p de sacarosa y procesada con UT.

El modelo propuesto proveyó un ajuste completo de las curvas experimentales. Los resultados numéricos obtenidos para los parámetros ajustados en las muestras con aceite de girasol se resumen en la Tabla 4.10. Los mismos permiten una interpretación física concreta de estos sistemas. En la Tabla

4.10 se puede observar que la figura de mérito χ^2 dio valores aceptables en todas las muestras.

Tabla 4.10. Resultado del ajuste numérico de los patrones de dispersión de SAXS.

NaCas % p/p	R_{in} (nm)	$\Delta\rho_{out}/\Delta\rho_{in}$	ϕ_e	Varianza (nm)	D_{FRAC}	ξ (nm)	χ^2
NaCas en Agua (% p/p)							
2,0	4,10±0,03	-1,60±0,01	0,14±0,01	1,76±0,05	2,99±0,01	(3,0±0,5) x 10^3	7,3
5,0	4,18±0,02	-1,2±0,01	0,21±0,01	2,35±0,04	3,02±0,01	(5,6±0,1) x 10^2	5,0
7,5	3,84±0,02	-0,9±0,01	0,24±0,01	1,99±0,03	3,01±0,01	(6,0±0,4) x 10^2	13,3
NaCas en solución de 20 % p/p de sacarosa							
2,0	4,0±0,3	-1,6±0,1	0,17±0,01	1,60±0,2	2,96±0,01	(3,0±0,5) x 10^3	3,38
5,0	3,92±0,03	-1,2±0,03	0,24±0,01	2,13±0,5	3,02±0,01	(2,0±0,2) x 10^2	2,8
7,5	3,38±0,02	-0,2±0,2	0,27±0,01	2,22±0,06	3,04±0,09	(1,7±0,) x 10^2	11,9
Emulsión sin azúcar (EG)							
2,0	4,06±0,04	-2,07±0,01	0,14±0,01	1,61±0,02	2,96± 0,02	(4,8±0,2) x 10^3	12,2
5,0	3,96±0,02	-0,11±0,07	0,22±0,01	2,0,3±0,02	3,00±0,05	(4,8±0,3) x 10^2	1,7
7,5	,3,78±0,01	-0,89±0,01	0,24±0,01	2,4±0,1	3,3±0,1	(2,6 ±0,2) x 10^2	24
Emulsión con 20% Sacarosa (EG)							
2,0	4,10±0,04	-1,72±0,02	0,16±0,01	1,82±0,02	3,07±0,01	(4,9±0,3) x10^2	1,2
5,0	3,96±0,02	-0,1±1	0,24±0,01	2,14±0,06	3,17±0,08	38±2	1,7
7,5	3,89±0,01	0,4±0,2	0,28±0,01	1,81±0,02	3,18±0,02	38±1	3,1

El radio interno (Rin) obtenido por el modelo de casquete esférico (en el modelo se considera la submicela o nanopartícula de caseina) resultó un valor de aproximadamente 4.0 ± 0.1 nm para todas las muestras con un valor promedio de la varianza de la distribución de Schulz-Zimm de 2.0 ± 0.3 nm que corresponde a una gran polidispersidad, un 50%, lo cual era esperable en un producto natural como el que se ha estudiado en esta tesis. El gráfico de la distribución de tamaño de partículas en volumen muestra que hasta un 60% de las nanopartículas se encuetran entre 5 y 10 nm con un radio promedio de 7.0 nm como se muestra en la Figura 4.31. Estos valores fueron similares a los hallados en micelas de caseína de leche por dispersión de neutrones (sección 4.1.3).

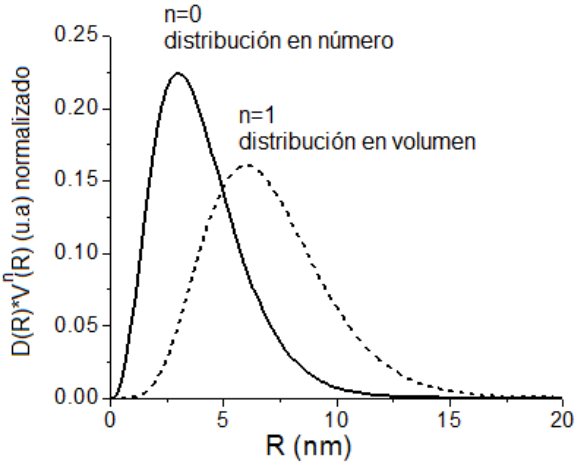

Figura 4.31. Distribución de Schultz-Zimm normalizada para una esfera de 4.0 nm de radio medio con 2 nm de varianza, n=0 refiere a la distribución en número y n=1 distribución en volumen.

Como era esperable, la fracción de volumen efectiva ϕ_e que proviene del factor de estructura de esferas rígidas dió valores crecientes con la concentración de NaCas. Sin embargo, midiendo la densidad de las emulsiones, la fracción de

volumen de proteína en agua fue 0.015, 0.036 y 0.055 para concentraciones de 2,0; 5,0 y 7.5% p/p de NaCas, respectivamente. El hecho que haya habido un orden de diferencia entre los valores de ϕ_e y la fracción de volumen calculada a partir de medidas de densidad se debe a que el modelo basado en la aproximación de Percus-Yevick considera que todas las partículas están homogéneamente distribuidas. En nuestro caso, al formar las esferas estructuras mayores, la concentración de partículas localizadas alrededor de un punto es mucho mayor y eso podría explicar las diferencias entre los dos valores.

Al aplicar ultrasonido la altura del pico ancho bajó en intensidad y se observa que la curva a bajo ángulo posee un desplazamiento hacia mayores valores de q, o sea que el elemento dispersor es más pequeño en su tamaño. En la Figura 4.32 se representa el efecto de aumentar el área superficial sobre la intensidad medida. En las muestras de 2,0% p/p de NaCas se pierde toda correlación entre submicelas de caseína debido a que el pico de la zona central del dispersograma resultó despreciable, lo que se puede interpretar como una asociación total de las caseínas a la interfase, sin caseínas libres en la fase continua.

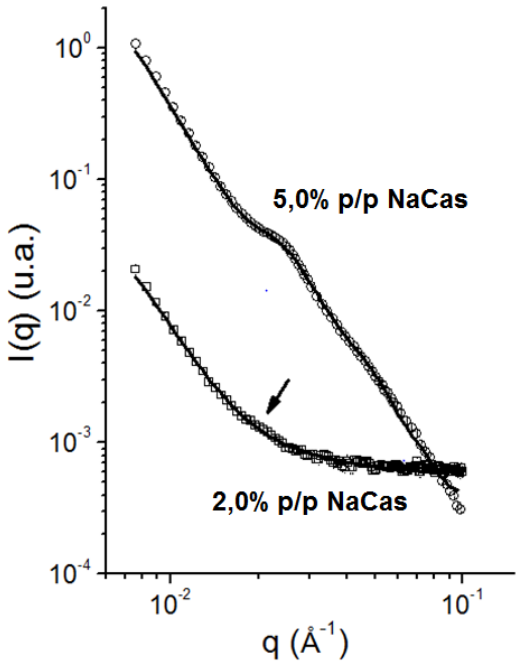

Figura 4.32. Patrones de dispersión de NaCas en emulsiones estabilizadas con 2,0 y 5,0% de proteína y 20% p/p de azúcar. Las mismas han sido tratadas con ultrasonido. La flecha indica la posición del pico ancho interpretado como correlación de corta distancia de nanopartículas de caseína.

La variación en los patrones de dispersión se observó principalmente en los cambios en el factor de estructura total. Debido a que los efectos más interesantes ocurrieron en las emulsiones formuladas con 5,0% p/p de NaCas nos centraremos en el análisis de las mismas. En la Figura 4.33 se muestra el factor de estructura total de tres emulsiones estabilizadas con 5,0% p/p de caseinato de sodio: una emulsión sin agregados homogenizada con UT, una emulsión con 20% p/p de sacarosa en la fase acuosa homogenizada con UT y esta última emulsión luego de aplicar ultrasonido (emulsión fina).

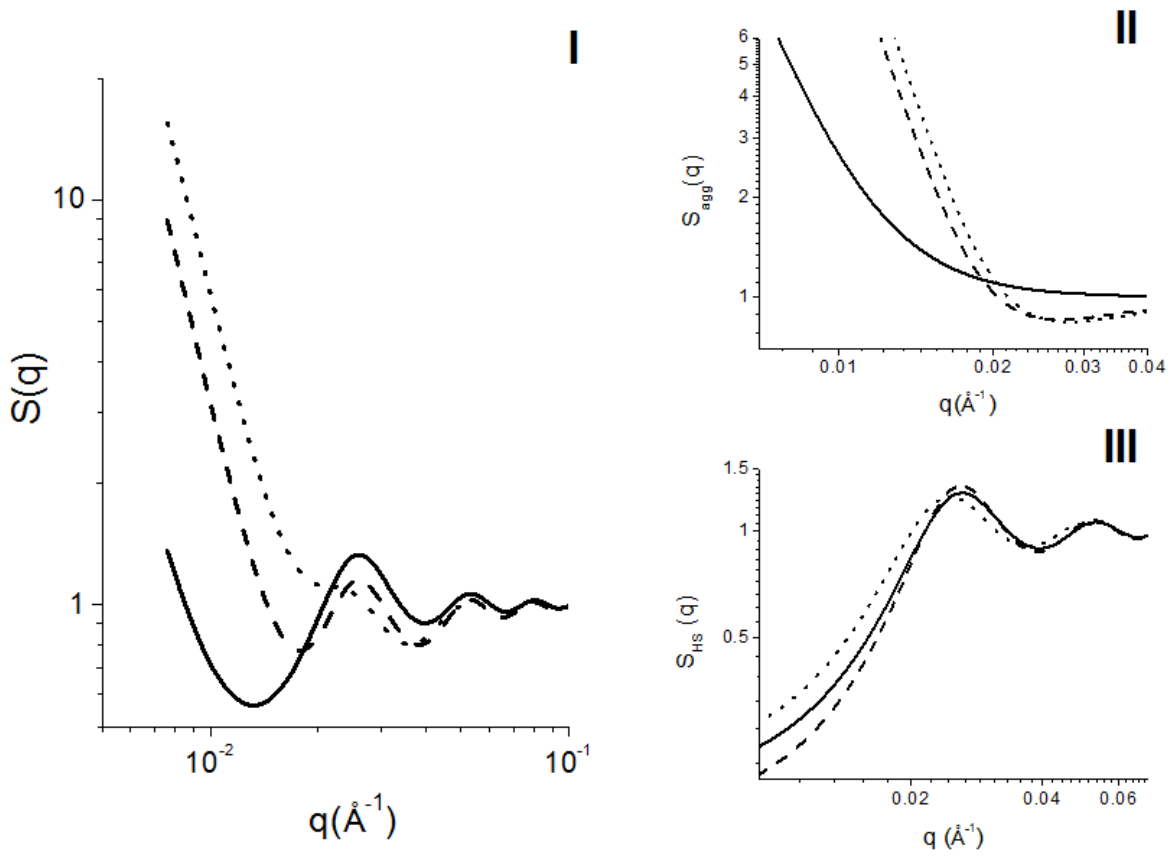

Figura 4.33. Factor de estructura total (I) S(q) y sus contribuciones debido a los grandes agregados (II) correlación a corta distancia por parte de las nanopartículas de caseína (III) emulsiones estabilizadas con 5,0% p/p de NaCas. En línea continua se presenta la emulsión sin agregados y UT, en línea entrecortada la emulsión con 20% p/p de sacarosa y en línea punteada esta última luego de aplicar ultrasonido.

Uno de los objetivos principales del trabajo de tesis fue revelar un posible cambio estructural de los agregados supra-moleculares de nanopartículas de caseína en diferentes fluidos complejos y relacionarlo con la estabilidad macroscópica de las emulsiones. Como se ejemplifica en la Figura 4.33 el factor de estructura cambió significativamente según el ambiente en donde esté disuelta la proteína. A medida que la muestra se fue haciendo más compleja el factor de estructura total se desplazó a mayores valores de q (Figura 4.33 I) debido principalmente a la contribución del agregado supra-molecular (Figura 4.33 II) y

consistente con este hecho, el pico máximo de la función de correlación de cortas distancias (esferas rígidas) se desplazó a ángulos menores (Figura 4.33 III). Es decir, el agregado de submicelas de caseína se hizo más pequeño y por lo tanto la distancia promedio entre caseínas era mayor. La dimensión fractal es un indicativo de cómo se ordenan las subunidades dentro de un arreglo jerárquico mayor. Para todas las muestras calculadas, este parámetro tuvo un valor de alrededor de 3 (Tabla 4.10), indicativo de que se trata de un agregado fractal en volumen (o red tridimensional de nanopartículas).

Los resultados indican que no hay diferencias significativas en la estructura micelar en solución acuosa respecto de una emulsión sin aditivos. Sin embargo, en solución la distancia de correlación fractal decayó en un factor dos cuando se agregó azúcares al 20% (Figura 4.34). Estos resultados fueron acordes con los valores hallados por dispersión dinámica de luz para suspensiones diluidas de NaCas en soluciones de azúcares [Belyakova 2003]. Estos estudios mostraron que las mencionadas soluciones registran una disminución del radio hidrodinámico del agregado supramolecular al agregar azúcar para las mismas concentraciones de sacarosa ensayadas en este trabajo. La disminución del parámetro de correlación fractal se hizo más evidente cuando la muestra se volvió más compleja (Figura 4.34). Efectos sinérgicos resultan de la combinación de disacáridos y la interfase agua/aceite.

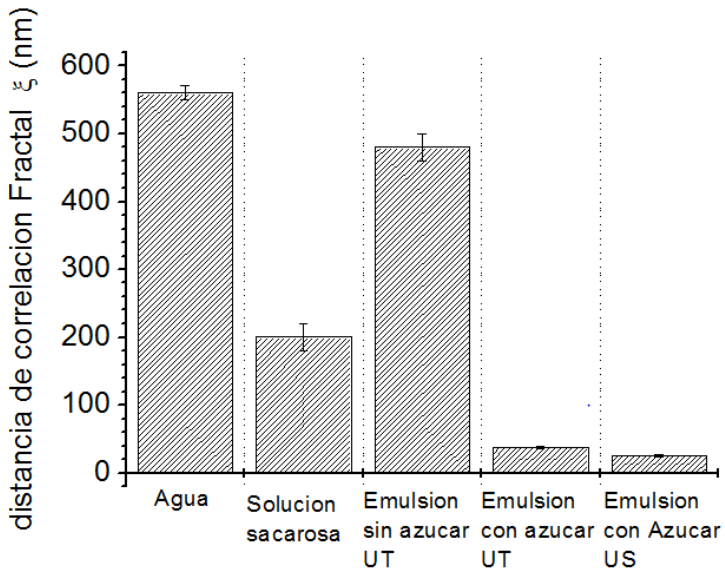

Figura 4.34. Distancia de correlación fractal (*cutoff*) de muestras con 5% p/p de NaCas en diferentes condiciones.

4.4 Discusión y Conclusiones Parciales

A lo largo del capítulo se han presentado diferentes formulaciones para una misma proporción fase continua/fase dispersa. Se ha mencionado que el término "estabilidad" en una dispersión es una característica meramente cinética y refiere a la inercia a presentar cambios macroscópicos dentro de un intervalo de tiempo deseado. Es por ello, que se destacarán primero aquellas emulsiones que han resultado más estables a lo largo de una semana de medición. En el caso de las EG, se logró mediante la adición de la goma xántica a bajas concentraciones de NaCas. El incremento en la viscosidad por el entramado cohesivo que forma el polisacárido en solución fue suficiente como para contener a los glóbulos oleosos de diámetros mayores a los 10 µm bajando considerablemente la velocidad de migración. En las EG la cantidad de NaCas debió minimizarse con el fin de evitar la desestabilización probablemente debida a las interacciones proteína- goma

xántica o goma garrofín. Por otro lado, las estrategias para estabilizar emulsiones de alto contenido proteico fueron: minimizar la moda principal en la distribución de partículas (el cremado es proporcional al cuadrado del díametro) y suprimir la floculación de gotas con el agregado de disacáridos. De esta manera, dependiendo de la aplicación deseada se logró estabilizar tanto emulsiones de gota grande como de gota pequeña. En la Figura 4.35 se presenta un esquema que resume los resultados de manera cualitativa. En el eje de ordenadas se graficó la velocidad de floculación y en el eje de abscisas la migración o cremado. En emulsiones de gota grande la migración es predominante a menos que se formule con algún polisacárido (la goma garrofin presenta un poco de migración también). A medida que el tamaño de gota decrece la migración se suprime y la floculación empieza a predominar. Como caso extremo, en polisacáridos se observa separación de fase. Mientras que adicionando disacáridos se evita la floculación.

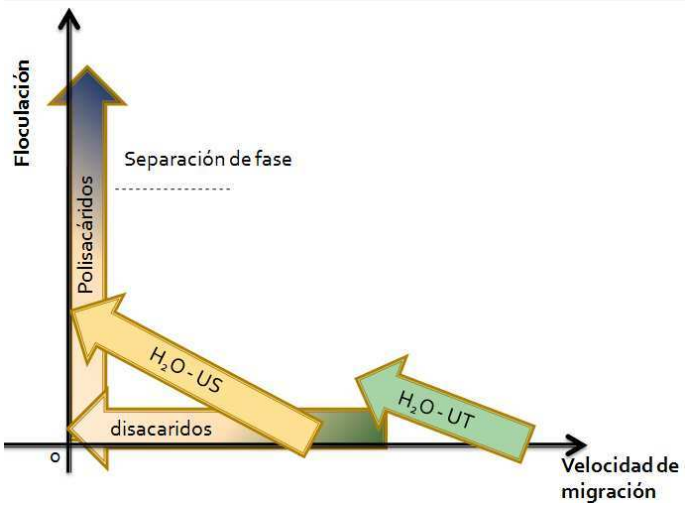

Figura 4.35. Esquema general de mecanismos de desestabilización predominantes en emulsiones formuladas con agua como fase continua o con disacáridos o polisacáridos. La orientación de la flecha indica una disminución de la moda o un incremento en la concentración de NaCas.

El método óptico empleado (turbiscan) permitió analizar con profundidad la estabilidad de las dispersiones sin perturbar la muestra. En muchas situaciones prácticas, las emulsiones resultan opacas y los cambios no son notorios a ojo desnudo. Sin embargo, referentes del área de emulsiones han utilizado la descripción visual para analizar sus sistemas [Dickinson & Ritzoulis 2000; Radford, Dickinson & Golding 2004; Tangsuphoom & Coupland 2009] sin la precisión analítica que este método instrumental tiene. Además, la técnica posee la ventaja de analizar el tubo contenedor en todo el largo de la muestra siendo óptimo frente a otras técnicas ópticas instrumentales que emplean equipos construidos para medir en un punto fijo [Hemar et al. 2003]. Los resultados permitieron la comparación entre muestras y coincidieron con los resultados obtenidos analizando estos sistemas con técnicas de dispersión dinámica de luz. También mostraron estrecha relación con las micrografías obtenidas por microscopia óptica confocal de barrido láser. No obstante, se ha demostrado que la evaluación cuantitativa de los parámetros cinéticos puede estar afectada cuando dos mecanismos conviven dentro del mismo espacio temporal (Figura 4.17). Esto no invalida su riqueza cualitativa, donde por ejemplo, se puede discriminar entre regímenes de floculación como se ejemplificó en la Figura 4.8, lo que sería imposible de observar a ojo desnudo.

Los dos pasos realizados en el procesado de las muestras permiten estudiar dos emulsiones con tamaños de gota que poseen un orden de magnitud de diferencia entre ambas. Al emplear ultrasonido el valor del diámetro medio de las dispersiones resulta inferior al micrón. Si bien esta técnica puede considerarse

“agresiva”, como se coloca una termocupla en la muestra para sensar su temperatura, la misma nunca superó los 35ºC en las cercanías de la punta metálica del sonicador. Por esta razón no se espera desnaturalización de la proteína por aumento de la temperatura. Por otro lado, se realizaron ensayos previos donde se midió el diámetro con dispersión dinámica de luz del NaCas diluido previo y posterior al procesado con ultrasonido y no se encontraron variaciones de tamaño en la población de micelas. La existencia de dos modas en las distribuciones de tamaño de partícula en emulsiones se puede atribuir, principalmente, a la naturaleza hidrodinámica de la muestra más que al procesado dado que existen condiciones en las cuales la distribución resulta esencialmente mono-modal (Figura 4.25: III). Esto presenta una ventaja frente a otra técnica frecuentemente empleada en literatura para generar emulsiones finas, que es la aplicación de presión sobre membranas de porosidad conocida. En la misma la posible coalescencia de gotas entre dos capilares cercanos deviene en la formación de múltiples modas en la distribución de partículas [Mohan & Narsimhan 1997; Christov et al. 2002; Cerdeira et al. 2007]. La separación de fase observada en emulsiones formuladas con polisacáridos, podría deberse a que el procesamiento de las mismas afecte la estructura de las gomas. Sin embargo, esta hipótesis fue descartada evaluando la estabilidad de emulsiones formuladas con proteínas de suero de leche, donde las emulsiones con partículas más pequeñas obtenidas luego de procesar la EG con ultra sonido resultaron ser las más estables [Huck Iriart et al., 2013].

Uno de los resultados novedosos que se han obtenido en este trabajo de tesis es haber mostrado ejemplos claros y concretos de emulsiones cuya estabilidad disminuye al bajar el tamaño medio de gota con una segunda homogenización con ultrasonido, como se ejemplificó en la Figura 4.35. En la síntesis de emulsiones generalmente se intenta obtener emulsiones con distribuciones monomodales, tamaño de gota pequeño y con baja dispersión para evitar agregación, y madurado de Ostwald [McClemmens 2005; Dickinson 2009]. Además se acepta universalmente que "una emulsión estable es aquella que puede mantener sus glóbulos lo suficientemente chicos y bien separados por movimiento Browneano" [Dickinson 2009]. Esta afirmación se basa en principios fisicoquímicos tales como efectos electrostáticos y cinéticos de la teoría clásica de coloides [McClements 2005]. Se han publicado varios artículos donde se discute como formar emulsiones con pequeñas gotas [Abismäil et al. 1999; Vladisavjevíc & Schubert 2003; Leong et al. 2009; Henry et al. 2010; Kaltsa et al. 2013]. Si bien, la distribución de partículas puede jugar un rol fundamental en la estabilidad y el mecanismo físico por el cual la emulsión se desestabilizará [Ivanov & Kralchevski 1997; McClements 2007], los sistemas pueden llegar a ser tan complejos que su estabilidad dependerá en parte del diámetro de partícula, pero será también dependiente de otros factores como la composición. La estabilidad de emulsiones formuladas con polisacáridos puede ser interpretada en base a la interacción electrostática que puede haber entre las gomas, la proteína y aceite-proteína en los casos que la superficie expuesta sea muy grande (emulsiones finas) [Jourdain et al. 2008; Hemar 2001]. La absorción de cualquier proteína en la interfase es el paso más importante en la formación de la emulsión. Durante la absorción las

mismas sufren un cambio conformacional, proceso que tiene asociado una energía de activación dada [Dickinson 2011]. La interacción entre la proteína y el polisacárido, tanto en solución como en la interfase podría tener consecuencias tanto en la síntesis como en la estabilidad cinética de las emulsiones. Se ha reportado que las interacciones proteína-polisacárido inducidas por la superficie pueden ser suficientemente fuertes como para modificar las propiedades viscoelásticas de superficie [Dickinson 2008]. En las mediciones realizadas de tensión y reología superficial no se encontraron diferencias significativas cuando a la emulsión estabilizada con 5,0% p/p de NaCas se le agregó 0,3% p/p de goma xántica. Esto indicaría que las interacciones en superficie serían débiles. No obstante, el efecto podría ser diferente en emulsiones finas debido a que la superficie expuesta es mucho mayor. Las técnicas de luz sincrotrón no se aplican al análisis de este sistema debido a los tamaños de los polisacáridos y la proteína.

En cualquier dispersión cuya superficie posea carga neta, la fuerza iónica del medio puede influir sensiblemente en la estabilidad [Sedev & Exerowa 1999]. Hemos realizado mediciones de estas emulsiones controlando la fuerza iónica de la fase continua, empleando concentraciones de cloruro de sodio de hasta 0.1 molal (las emulsiones son destinadas a alimentos, la concentración de cloruro de sodio no debería ser muy elevada) sin encontrar diferencias en la cinética.

Un hecho interesante es que en una emulsión se puede observar dos mecanismos de desestabilización diferentes simplemente cambiando el tamaño de gota. En las emulsiones estabilizadas con 5,0% p/p de NaCas sin aditivos agregados, la migración es en las EG la manifestación primordial de inestabilidad

mientras que al disminuir el diámetro medio de glóbulo graso la floculación es el mecanismo evidente. La floculación en emulsiones con altos contenidos de NaCas ya había sido informada previamente [Hemar et al. 2003] pero la mayoría de los estudios solo realizaron observaciones en la escala de las micras (microscopias ópticas) o bien describieron los sistemas por inferencias de observaciones macroscópicas mediante medidas reológicas [Dickinson & Golding 1997]. Se ha sostenido en la literatura que la floculación está gobernada por depleción de la fase continua entre las gotas de aceite puenteadas por la proteína [Radford & Dickinson 2004]. Uno de los aportes de la presente tesis al estado del arte en la descripción de la estabilidad de emulsiones formuladas con NaCas es haber logrado proporcionar una interpretación a multiples escalas espaciales y haber podido vincular medidas de microscopía óptica y dispersión de luz visible con la información obtenida por dispersión de rayos X a bajos ángulos que brinda información en la escala del nm. Esta visión en múltiples escalas ha permitido entender la relevancia de la organización de las submicelas de caseína en la estabilidad de la emulsión y la importancia de las interacciones proteína/disacárido o proteína/polisacárido en el proceso de floculación que no solo se relaciona con la concentración de proteína en solución sino también con su estructura en un entorno dado.

Como se detalló en secciones anteriores, la micela de caseína está bien descripta en literatura y los esfuerzos por estudiarla en detalle nacen de su relevancia biológica (médica y veterinaria). El Caseinato de sodio es un producto predilecto en la industria, sin embargo su descripción microscópica es muy vaga

debido a que es un conjunto de proteínas muy flexible. Uno de los autores más renombrados en el campo la define con la frase "*It is flexible enough to go with the flow*" refiriéndose a las propiedades reomórficas de las mismas [Dickinson 2006]. Uno de los hechos más sobresalientes es que la floculación se suprime con el agregado de disacáridos. Con la información obtenida de los dispersogramas y el modelo propuesto pudimos verificar la veracidad de la afirmación anterior, o sea la estructura es sensible al entorno local.

Trabajos previos del grupo liderado por Michel Ollivon en colaboración con investigadores de Nestle [Kalnin, Ouattara & Ollivon 2004; Kalnin et al. 2004b] presentaron estudios de SAXS para emulsiones modelo de NaCas. En los mismos describieron un método para cuantificar la caseína libre y la asociada a superficie. Para ello analizaron el máximo local del pico ancho en la zona central del dispersograma (ver ejemplo en la Figura 4.29) en función de la concentración de NaCas y dado que conocían el contenido de proteína total podían calcular la proteína asociada a la interfase. Sin embargo, no solo su interpretación resulta sencilla, sino que las emulsiones fueron formuladas en agua. No describieron cambios en la estructura producidos por el agregado de aditivos. El modelo que se ha propuesto en este trabajo de tesis, no solo permitió un completo ajuste de las curvas experimentales [Figura 4.30] sino que además se han podido obtener parámetros físicos precisos. Los modelos utilizados en la bibliografía para la micela de caseína de leche han recibido críticas muy duras basadas principalmente en restricciones impuestas por los autores [Horne 2006]. Sin embargo, el modelo empleado en este trabajo de tesis resulta una muy buena

aproximación para obtener información útil y describir el sistema NaCas ya que considera al mismo como un aglomerado de proteínas flexibles y ensambladas de manera desordenada.

Del análisis global de las emulsiones sin aditivos y con disacáridos se puede concluir que la estructura de la caseína en emulsión sin azucares agregados no difiere significativamente de la caseína suspendida en agua. De acuerdo con los resultados publicados en la literatura empleando mediciones de dispersión dinámica de luz [Belyakova et al. 2003], la estructura del sistema proteína-agua se modifica con el agregado de azúcares. También se modifica en emulsiones, en las que se observa un efecto sinérgico sobre la estructura producido por el disacárido que mejora las propiedades del solvente y la presencia de una interfase agua/aceite. La distancia de correlación fractal decrece un orden de magnitud para estas emulsiones complejas que poseen azúcares. Se interpreta, de los resultados, una inhibición del auto-ensamblado de las mismas por interacción con el disacárido. Por otra parte, la concentración de proteína en la interfase podría aumentar por el agregado de disacáridos, lo que se vería reflejado en una menor elasticidad de la superficie como ocurrió en nuestras emulsiones (Figura 4.13). En emulsiones sin aditivos, este auto-ensamblado de las sub-micelas de caseínas compite con la cantidad de proteína en la interfase comprometida con la superficie expuesta por el aceite. La estructura del NaCas en la fase acuosa de las emulsiones es similar a la que presenta en suspensión acuosa [Figura 4.34]. Así mismo, en este trabajo de tesis se encontró una fuerte correlación entre la alta estabilidad de las emulsiones concentradas de NaCas con el auto-ensamblado de

las nanopartículas de caseína en la fase acuosa para dar agregados supra-moleculares.

5 Coalescencia parcial y cristalización

5.1 Introducción

Muchos de los productos basados en emulsiones alimentarias poseen fases dispersas heterogéneas: por ejemplo helados, manteca, margarina, etc. En los mismos las transiciones de fase pueden afectar la estabilidad de la emulsión que lo conforma. La cristalización de la fase grasa en emulsiones de aceite en agua (O/W) resulta de fenómenos complejos y está afectada por parámetros tales como el tamaño de gota, la interacción entre los glóbulos de la fase dispersa, la presencia de emulsificantes en la fase dispersa, el polimorfismo de los cristales de grasa, los efectos de la velocidad de enfriamiento y subsecuentemente la historia térmica del sistema [Awad & Sato 2002].

5.1.1 Nucleación de triglicéridos

En las transiciones de fase tales como la fusión de un sólido que da como resultado un líquido o la evaporación/sublimación en la que se produce el pasaje de una fase condensada a vapor, los potenciales químicos de cada compuesto presentan continuidad durante la transición (en el equilibrio los potenciales químicos se igualan) pero su primera derivada (entalpía y entropía) muestra una discontinuidad. Estas transiciones se denominan procesos de primer orden [Kondepudi & Prigogine 1998]. Los triglicéridos y ácidos grasos no son la excepción y como muchos otros compuestos entran dentro de esta categoría [Rousset 2002]. Estas transiciones de fase de primer orden que ocurren en las grasas se producen a través de un mecanismo de nucleación descripto en la literatura [Foubert, Dewettinck & Vanrolleghem 2003]. Se ha reportado evidencia

experimental y de simulación de mecánica molecular, que muestra que en triglicéridos y previo a la formación del núcleo, las moléculas se ordenan aumentando la microviscosidad local debido a fuerzas de van der Waals. Estas fluctuaciones en la densidad son necesarias para formar el embrión que dará origen a la nueva fase [Dibildox-Alvarado et al. 2010]. El tratamiento clásico que describe el nacimiento de una fase está basado en dos aproximaciones [Debenedetti 1996]: 1-La necesidad de invocar a una distribución de embriones o núcleos en el equilibrio y 2- el tratamiento de los mismos a través de propiedades del sistema en una fase (bulk). La fuerza impulsora en la formación de un nuevo núcleo es proporcional al volumen del mismo (escala con distancia al cubo), pero con un costo energético que es proporcional al área formada por su superficie (distancia al cuadrado) luego de que una fluctuación localizada ocurra [Debenedetti 2006]. Para un embrión sólido formado bajo interpretación clásica el cambio de energía libre está dado por la Ecuación 5.1 [Rousset 2002]:

$$\Delta G = \Delta G_{vol} \,.V + \Delta G_{sup}\, A \cong -\frac{\Delta_{tr} H\, \Delta T}{T_{tr}\, V_m} \,.V + \gamma \,.A \qquad \text{Ecuación 5.1}$$

Donde la variación de energía libre del proceso se disocia en una contribución en volumen “ΔG_{vol}” y una contribución en superficie “ΔG_{sup}” y se puede rescribir para pequeños sobreenfriamientos “ΔT”, teniendo en cuenta la temperatura del equilibrio “T_{tr}”, en función de las propiedades macroscópicas como la entalpía de transición de fase “ΔH_{tr}”, volumen molar “V_m” y la tensión superficial entre las fases “γ” dando una expresión como la que se muestra en la Ecuación

5.1. En la Figura 5.1 se ejemplifica la variación de la energía libre para la formación de núcleos esféricos en función del radio utilizando parámetros arbitrarios.

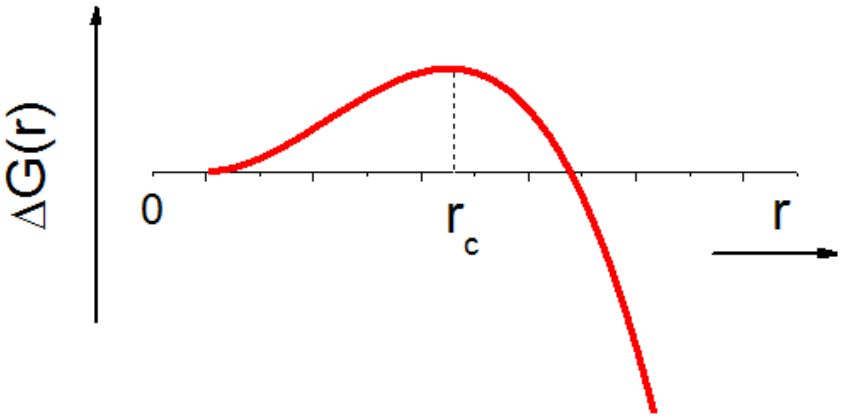

Figura 5.1. Energía libre de formación de núcleos esféricos en función del radio.

El máximo observado en la Figura 5.1 es considerado el trabajo mínimo reversible para formación de un núcleo estable con "r_c" el radio crítico del mismo. Valores de radio mayores a r_c darán como resultado cristales estables. Por el contrario radios menores a r_c corresponden a agregados que vuelven a separarse. Esta interpretación es comúnmente utilizada [Himawan, Starov & Stapley 2006] debido a que se suele trabajar con bajos sobreenfriamientos (o bajas sobresaturaciones). Esta teoría no explica transiciones espinodales que deberían ser abordadas con mayor rigurosidad [Debenedetti 1996; Pan et al. 2006].

5.1.1.1 Nucleación en emulsiones

En párrafos anteriores se ha hecho una breve descripción de la nucleación homogénea en sistemas no dispersos. Existen otros factores que afectan la cinética del proceso de transición de fase. La formación de los embriones que dan lugar a una nueva fase puede verse afectado por impurezas que aceleran la transición [Himawan, Starov & Stapley 2006] y por el entorno donde está localizada la fase grasa. Al emulsionar una fase lipídica en un fluido acuoso la nucleación se puede ver afectada por efectos de confinamiento (tamaño de gota) y por efectos superficiales producidos por la presencia de algunos compuestos en la interfase que actúan como moldes de nucleación [Awad & Sato 2002a]. En estos sistemas confinados, no solo la cinética de nucleación puede verse afectada sino que además las fases polimórficas que presenta la materia grasa pueden ser diferentes en presencia o ausencia de algunos compuestos como por ejemplo emulsificantes [Coupland 2002].

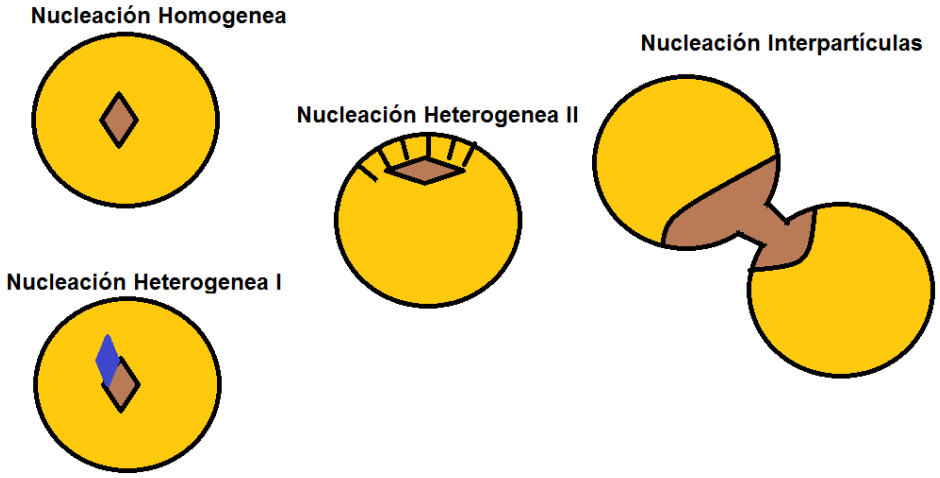

Figura 5.2. Diferentes mecanismos de nucleación en emulsiones.

En la Figura 63 se ejemplifican los mecanismos de nucleación que podrían ocurrir en la fase grasa de una emulsión. Además del esquema que representa la nucleación homogénea se muestran otros que describen otros mecanismos posibles como la nucleación heterogénea y la nucleación interpartículas. Generalmente cuando las transiciones de fase ocurren en sistemas heterogéneos se ven afectadas por el entorno. El primer caso de nucleación heterogenea está dado por la presencia de alguna impureza disuelta en la grasa que pueda hacer de semilla de la nueva fase (Figura 5.2: Nucleación Heterogenea I). El segundo caso posible es que alguna molécula de la interfase juegue el rol de molde y la nucleación ocurra en la superficie aceite/agua (Figura 5.2: Nucleación Heterogenea II) y el tercer mecanismo, muy relacionado con la estabilidad de emulsiones (coalescencia parcial) es la nucleación entre gotas. Es decir que el cristal formado esté compartido entre dos glóbulos.

5.1.2 Polimorfismo y Difracción de Rayos X

Una vez formados los núcleos, los cristales del sólido comienzan a crecer alrededor del embrión. El tamaño final de los mismos dependerá del compromiso entre dos factores: la velocidad de nucleación y la velocidad de crecimiento o maduración. Las mismas están gobernadas por el sobreenfriamiento (diferencia entre la temperatura de fusión y la temperatura de trabajo) [Rousset 2002]. Este proceso se denomina comúnmente cristalización, debido a que la nueva fase se ordena de manera de formar un cristal. Desde el punto de vista matemático, un cristal es un arreglo de puntos con simetría traslacional y desde el punto de vista

cristalográfico se puede definir cristal como la repetición de un motivo en tres dimensiones, o la repetición de un conjunto de átomos o moléculas que se disponen periódicamente cuyo mínimo elemento de simetría se denomina celda unidad [Giacovazzo1992]. La incidencia de radiación X monocromática en este arreglo periódico resulta en el fenómeno de difracción, donde los ángulos e intensidad de la radiación difractada dependen del grupo de simetría, el número atómico de los átomos que conforman al compuesto, distancias interatómicas y la orientación del cristal respecto al haz incidente [Giacovazzo 1992]. Se denomina polimorfismo a la capacidad de un conjunto de moléculas de empaquetarse con diferentes simetrías. Los triglicéridos presentan tres formas polimórficas principales: alfa (α), beta prima (β') y beta (β). Esta nomenclatura tiene su correspondencia con la simetría de la celda unidad la cual está determinada por la disposición de las cadenas alifáticas. La celda α es hexagonal, en la misma cada cadena está rodeada por otras seis a distancias iguales. Las cadenas tienen cierto grado de libertad rotacional. La celda β' es ortorrómbica y posee un empaquetamiento más compacto que la forma α. La celda β es triclínica y posee el empaquetamiento más compacto de las tres celdas. Estos compuestos poseen alta histéresis en la transformación de fase [Nozaki & Hikosaka 2001] por lo que las transiciones de una forma polimórfica a otra son irreversibles y en el sentido de estabilidad creciente, es decir, $\alpha \rightarrow \beta' \rightarrow \beta$ [Sato & Ueno 2001, Huck-Iriart et al. 2011c]. Es interesante destacar que estas transformaciones polimórficas decrecen la simetría del empaquetamiento a fin de disminuir la entropía conformacional de las cadenas alifáticas [Sato & Ueno 2001]. Es decir, el movimiento rotacional es

más restringido en la transición de una fase inestable a otra fase termodinámicamente más estable aumentando en esta última la interacción entre cadenas carbonadas. La obtención de cada fase polimórfica depende de las variables de proceso (temperatura final, velocidad de enfriamiento, ciclado térmico), el grado de esterificación del glicerol, el largo de cadena de los ácidos grasos (y sus posibles combinaciones, es decir tipo y posición de los ácidos grasos esterificados al glicerol) y la composición química de la muestra.

5.1.3 Grasa de Leche

La grasa de leche se fracciona para lograr la variabilidad funcional deseada para la formulación de una variedad de productos lo que permite obtener cortes grasos con diferentes propiedades fisicoquímicas [Kaylegian & Lindsay 1995]. Está compuesta por un 97-98% de triglicéridos (TAGs) [Wright 2000]. Las grasas de pastelería y panadería, los extendedores de manteca de cacao, las grasas de confitería y la grasa láctea, entre otros, son ejemplos de materias grasas que se emplean como fracciones en lugar de cómo grasa sin modificar, dado que las mismas poseen mejores propiedades que la grasa de origen [Pedersen 1988; Deffense 1989; Bumbalough 1989; Kaylegian 1991; Yi 1993; Kaylegian & Lindsay 1995].

De acuerdo con la temperatura de cristalización seleccionada se obtienen distintas fracciones de grasa de leche que presentan propiedades características. Si la fracción obtenida por cristalización en seco tiene un punto de fusión superior a los 45ºC, se denomina fracción de grasa de leche de muy alto punto de fusión

(VHMF). Si funde entre los 35 y 45 ºC, es una fracción de grasa de leche de alto punto de fusión (HMF), si lo hace entre los 25 y 35 ºC es de punto de fusión medio (MMF), si funde entre 10 y 25 ºC se denomina de bajo punto de fusión (LMF) y si lo hace a menos de 10ºC se trata de una fracción de muy bajo punto de fusión (VLMF).

5.1.4 Componentes minoritarios

En literatura se ha estudiado extensamente el efecto de los componentes minoritarios (<2%) sobre la nucleación y crecimiento de cristales en sistemas grasos. Estas sustancias pueden ser propias de la matriz natural o bien aditivos específicos los cuales tienen gran relevancia para la industria alimenticia. Estos componentes se definen como lipídicos (ej: fosfolípidos, colesterol, etc) y no lipídicos (ej: proteínas, cationes metálicos, polisacáridos, etc) [Smith et al. 2011]. Los resultados obtenidos en bibliografía son muchas veces muy interesantes desde el punto de vista académico pero los aditivos empleados no son de grado alimenticio y en otras ocasiones son extraídos durante el proceso de purificación del producto. En la literatura especializada se han descripto fenómenos muy interesantes sobre el efecto de emulsificantes durante la cristalización isotérmica de sistemas grasos. Los efectos descriptos han sido muy ambiguos. En algunos casos la presencia de un emulsificante acelera la nucleación/crecimiento de cristales mientras que en otros casos se describe un marcado retardo [Yuki, Matsuda & Nishimura 1990; Herrera & Marquez Rocha 1996; Hodate et al. 1997; Awad & Sato 2001; Awad & Sato 2002b; Sakamoto et al. 2004; Cerdeira et al. 2005; Cerdeira et al. 2006; Arima et al. 2007]. En este trabajo de tesis se abordó el

problema del efecto del agregado de un emulsificante lipofílico sobre la cristalización de los cristales en la fase grasa de una emulsión y en fase homogénea con el fin de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción del emulsificante durante la nucleación.

5.1.5 Coalescencia Parcial

El fenómeno de coalescencia parcial se produce en las emulsiones cuya fase dispersa sufre una transición de fase líquido-sólido. La formación de los cristales puede afectar la estabilidad de las mismas. Dependiendo de la rigidez de los cristales formados, los mismos pueden atravesar la interfase aceite/líquido y así una gota puede unirse a otra con la nueva fase como puente [Coupland 2002]. Estos cristales pueden nuclear en la superficie de la gota como se mencionó anteriormente o bien una vez formados pueden adsorberse en la interfase [Rousseau 2000]. Estos sistemas dispersos semicristalinos pueden ocasionar cambios en las emulsiones, entre ellos disminuir dramáticamente la estabilidad de la emulsión [Vanapalli & Coupland 2001], modificar las propiedades sensoriales del alimento [Benjamins et al. 2009] o inclusive en emulsiones muy concentradas, los globulos pueden percolar y formar geles bicontinuos [Thivilliers et al. 2006].

5.2 Materiales y métodos particulares

5.2.1 Materiales

5.2.1.1 Fase lipídica

A fin de estudiar los efectos del agregado de un emulsificante lipofílico sobre el comportamiento polimórfico de la materia grasa, tanto en fase homogénea como en emulsión, se seleccionó como fase grasa modelo a la fracción de alto punto de fusión de la grasa de leche (HMF), la cual se diluyó hasta un 40% p/p con aceite de girasol (100, 90, 80, 70 y 60% p/p de HMF).

Las emulsiones se formularon con 20% p/p de fase lipídica, calentando la fase dispersa a 60ºC durante 30 minutos a fin de asegurar que toda la muestra estuviera en el estado líquido. Esta concentración se seleccionó para tener una buena relación señal/ruido en los estudios de cristalización y polimorfismo. La estabilidad de las emulsiones cuya fase lipídica contenía sólidos se comparó con la de la formulada con 100% de aceite de girasol. Las mediciones descriptas en este capítulo se realizaron en condiciones isotérmicas. Se fundió la grasa a 60ºC y se mantuvo a esa temperatura durante al menos 30 minutos con el fin de asegurarse que no quedaran agregados cristalinos que pudieran actuar como semillas sólidas y afectar la cinética de cristalización de la fase lipídica. Con este tratamiento térmico se borró toda la historia térmica previa de la materia grasa.

5.2.1.2 Emulsificante

El emulsificante lipofílico utilizado fue un palmitoil-ester de sacarosa (P-170). Este producto fue donado por la compañía Mitsubishi-Kasei Food Corp. (Tokio, Japón). P-170 tiene un punto de fusión de 58.0°C y un contenido de monoesters de 1% p/p y de di, tri y poliesters de 99% p/p. En promedio el grado de esterificación es entre 5 y 6 ácidos palmíticos por sacarosa. El balance hidrofílico/lipofílico (HLB) del mismo es 1, es decir es soluble en sustancias de naturaleza hidrofóbica. Se utilizó en una concentración de 0,5% p/p. Este valor se encuentra dentro del rango de concentraciones en el que se emplea habitualmente en alimentos.

5.2.1.3 Fase acuosa

En el estudio de emulsiones (EG y EF), las mismas se estabilizaron con 20% p/p de sacarosa y 4,0% p/p de caseinato de sodio; composición que resultó óptima para evitar la floculación por efectos de la concentración de NaCas y mantener la entidad del glóbulo inalterado durante las mediciones.

5.2.2 Contenido de Grasa Sólida (SFC)

El contenido de grasa sólida (SFC) de equilibrio se midió empleando un equipo Minispec mq20 NMR analyzer (Bruker, Karlsruhe, Germany). Como fuente de excitación se empleó una onda de radiofrecuencia de 20 MHz. La misma se aplicó durante 2 μs. El ángulo entre el pulso incidente y el vector del campo

magnético fue de 90°. Este pulso excitó los hidrógenos de todas las fases. Cuando se retiró el pulso, los núcleos retornaron a su posición original emitiendo una señal de radiofrecuencias. La amplitud inicial de la señal es proporcional al número de hidrógenos totales de la muestra. Las señales debidas a los hidrógenos de las distintas fases decaen a velocidades diferentes. La fase sólida presenta un decaimiento muy rápido mientras que la fase líquida decae más lentamente. Se midió el número de núcleos magnéticos totales (11 μs) y el número de núcleos del líquido (70 μs). El número de núcleos del sólido se calcula por diferencia. Habitualmente se emplea la siguiente ecuación para obtener el contenido de sólidos expresado en porcentaje:

$$SFC(\%) = 100\frac{(SA_1 - SA_2)F}{(SA_1 - SA_2)F + SA_2} \qquad \text{Ecuación 5.2}$$

donde SA_1 es la amplitud de la señal proporcional al número de núcleos hidrógeno totales, SA_2 es la amplitud de la señal proporcional al número de núcleos en la fase líquida y *F* es un factor que se emplea para corregir el tiempo muerto del detector dado que no es posible medir las muestras al tiempo cero. *F* se determinó empleando estándares certificados de plásticos en aceite en los que se conoce con exactitud el contenido de sólidos. La relajación de los núcleos de los estándares y otros sistemas como grasas, polímeros o emulsiones son proporcionales. Las muestras se sometieron a los tratamientos térmicos indicados

en el método oficial de la American Oil Chemists' Society [AOCS 1989] con los cuales se obtiene el máximo contenido de sólidos que se puede formar a la temperatura seleccionada y la forma polimórfica más estable de la materia grasa, es decir la forma β.

La cantidad de sólidos totales en función del tiempo suele interpretarse mediante modelos probabilisticos, deterministicos, numéricos y estocásticos [Rousset 2002]. Un modelo deterministico usualmente empleado fue propuesto por Avrami [Avrami 1939, 1940, 1941]; el mismo está basado en la Ecuación 5.3:

$$\frac{SFO\ (t)}{SFO(t \to \infty)} = 1 - \exp\left(-k\ t^{n}\right) \qquad \text{Ecuación 5.3}$$

Este modelo posee tres parámetros ajustables, la cantidad de sólidos a tiempo infinito (o en equilibrio térmico) "SFO(t→∞)" o "SFO_{∞}" ; el factor exponencial "k" que está relacionado con la velocidad de crecimiento y nucleación mientras que "n" es un índice de cristalización referido al mecanismo [de Bruijn, de Jong & van den Berg 1981]. La relación entre n y el tipo de cristal formado se detalla en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Indices de Avrami y su interpretación.

n	Tipo de cristal y nucleación esperada
3+1=4	Esferulitas con nucleación constante
3+0=3	Esferulitas con cantidad de núcleos constantes
2+1=3	Discoides con nucleación constante
2+0=2	Discoides con cantidad de núcleos constantes
1+1=2	Cilíndricos con nucleación constante
1+0=1	Cilíndricos con cantidad de núcleos constantes

5.2.2.1 Microscopía óptica de Luz Polarizada

Los cristales formados se observaron con un microscopio óptico de luz polarizada (PLM; Carl Zeiss, Jena, Alemania) equipado con una plataforma de control de temperatura INSTEC mK1000 (Boulder, Colorado, EEUU) y acoplado a una cámara digital AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss, Jena, Alemania) conectado a una computadora. Para tomar las imágenes se empleó un programa denominado AxioVision 6.1. Las muestras se fundieron por más de 15 minutos a temperaturas superiores a los 60ºC y luego se enfriaron rápidamente hasta la temperatura de cristalización. Se tomaron periódicamente imágenes con un objetivo de 20X para seguir la cristalización en los sistemas homogéneos y objetivos de 20X y 50X para observar las emulsiones.

5.2.2.2 Dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS)

El análisis de las transformaciones polimórficas se realizaron en la línea SAXS1 del sincrotrón de Campinas, Sp, Brasil. Para las mismas se utilizó una distancia entre el portamuestras y el detector de 189,615 mm y una longitud de onda de 1,488 Å.

Las muestras grasas en sistemas con más de una fase que contienen varios componentes poseen generalmente baja cristalinidad. Para analizar el polimorfismo y cuantificar la cinética de transición de fase se registró la difracción correspondiente a la organización lamelar de los triglicéridos en el tiempo. Estos patrones son caracteristicos de cada forma polimórfica [Sato 2000]. La difracción de estos planos ocurre a bajos ángulos y los difractogramas obtenidos poseen una muy buena relación intensidad/ruido. Durante la nucleación, la orientación de los planos cristalinos es al azar y resulta en patrones de difracción isotrópicos. Esto permite la integración bidimensional de la intensidad registrada en el detector como se detalló anteriormente (Sección 3.2.3.2). Una vez identificados los picos de difracción en los diagramas unidimensionales y correlacionados con cada una de las forma polimórficas que presenta la materia grasa empleada en este estudio, se siguió la evolución temporal de cada una a través de la relación de áreas de cada pico.

Los experimentos de difracción suelen tener perfiles Lorentzianos, sin embargo, hay otros efectos que generan un ensanchamiento de pico (por ejemplo el efecto Doppler) que siguen un perfil Gaussiano. Cuando ocurren dos fenómenos simultaneos, los mismos deben ser tenidos en cuenta en el análisis. La función de Voigt es el resultado del producto de convolución entre las dos funciones.

$$Gauss(x, x_c, \sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} Exp\left(-\frac{(x - x_c)^2}{2\sigma^2}\right)$$

$$Lorentz(x, x_c, \rho) = \frac{\rho}{\pi\,[(x - x_c)^2 + \rho^2]}$$

Ecuación 5.4

$$Voigt(x, x_c, \sigma, \rho) = \int_{-\infty}^{\infty} Gauss(x', x_c, \sigma).Lorentz(x' - x, x_c, \rho)dx$$

Donde "x_c" refiere al centro del perfil, con σ y ρ las varianzas de las curvas Gaussiana y Lorentziana, respectivamente. En la Figura 5.3 se muestra, a modo de ejemplo, la forma de una curva Lorentziana (línea entrecortada) y una función Gaussiana (línea continua), ambas con la misma varianza y el resultado de la convolución (círculos).

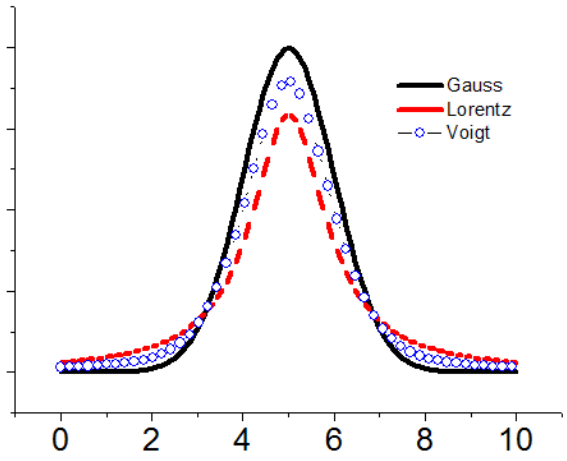

Figura 5.3. Ejemplo de las tres funciones arbitrariamente centradas en el mismo valor. La función de Voigt tiene una funcionalidad intermedia entre los dos perfiles que la componen.

En la práctica, el problema numérico principal es que al analizar múltiples picos de difracción el cálculo puede llegar a ser computacionalmente costoso, especialmente si hay que evaluar un centenar de difractogramas. En la literatura se ha propuesto una función pseudo-Voigt normalizada (PVoigt) que se expresa en la Ecuación 5.5

$$PVoigt(x, x_c, \Gamma) = (1-\eta)Gauss(x, x_c, \Gamma) + \eta . Lorentz(x, x_c, \Gamma)$$

$$\Gamma = (\Gamma_G^5 + 2{,}69296\Gamma_G^4\Gamma_L + 2{,}42843\Gamma_G^3\Gamma_L^2 + 4{,}47163\Gamma_G^2\Gamma_L^3 + 0{,}07842\Gamma_G\Gamma_L^4 + \Gamma_L^5)^{1/5}$$

Ecuación 5.5

$$\eta = 1{,}36603\frac{\Gamma_L}{\Gamma} - 0{,}47719\left(\frac{\Gamma_L}{\Gamma}\right)^2 + 0{,}11116\left(\frac{\Gamma_L}{\Gamma}\right)^3$$

Donde la función es una contribución lineal de los dos perfiles normalizados con η el factor de mezcla (0 ≤ η ≤ 1) y Γ es el ancho a media altura el cual está determinado por las varianzas de cada perfil (G: Gaussiano y L: Lorentziano). Esta función ha dado resultados excelentes en el análisis de difractogramas en polvos y refinamiento de Rietveld [Thompson, Cox & Hastings 1987]. Para el ajuste de las curvas experimentales se utilizó el algoritmo de Monte Carlo propuesto en el Anexo 4 obteniéndose excelentes resultados.

5.3 Resultados

5.3.1 Fase grasa homogénea

Antes de analizar los fenómenos de cristalización en emulsiones, se caracterizó el sistema graso obtenido al mezclar la fracción de alto punto de fusión de grasa de leche (HMF) con diferentes proporciones de aceite de girasol como se detalló en la sección de materiales y se estudió el efecto del agregado del emulsionante hidrofóbico P-170 en la cristalización de la materia grasa.

5.3.1.1 Contenido de grasa sólida (SFC)

En la Figura 5.4 se muestran las curvas de contenido de grasa sólida (SFC) obtenidas en función del tiempo para la cristalización isotérmica de HMFX donde X representa el porcentaje de grasa de leche mezclado con aceite de girasol (por ejemplo para HMF sin girasol es HMF100), a dos temperaturas diferentes: 30°C (parte I) y 10ºC (parte II).

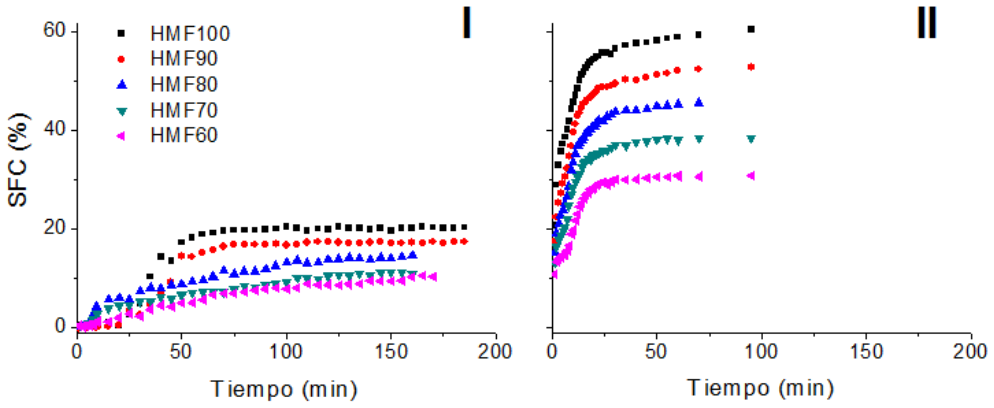

Figura 5.4. Porcentaje de grasa sólida (SFC) medido durante la cristalización isotérmica de diferentes mezclas de grasa de leche de alto punto de fusión con aceite de girasol. I) cristalizado a 30ºC y II) a 10ºC.

En todos los casos un aumento de la concentración de aceite de girasol devino en una disminución en la cantidad de sólidos finales (a tiempos largos) y además, en una disminución de la velocidad de cristalización (partes I y II). Al incrementar el sobreenfriamiento la cantidad de sólidos aumentó respecto a los valores medidos a sobreenfriamientos moderados y los tiempos de inducción decrecieron como puede observarse en la Figura 5.4II. En la parte I de la Figura 5.4 se puede observar que el SFC a tiempo cero fue cero para todas las mezclas HMF/girasol ensayadas mientras que en la parte II es claro que la cristalización comenzó antes de alcanzar la temperatura seleccionada.

Cómo se detalló en la introducción del presente capítulo (página 171), se ha reportado que los emulsionantes poseen efectos interesantes en la cinética de nucleación y crecimiento de los cristales, pero los resultados han sido ambiguos. Distintos autores han informado efectos de aceleración o de retardo para el mismo emulsificante en sistemas grasos similares. Sin embargo, ningún autor ha informado ambos efectos en el mismo sistema. En este trabajo encontramos que

P-170 tuvo ambos efectos y que produjo aceleración o demora dependiendo del sobreenfriamiento y no de la concentración del emulsificante como han propuesto otros autores.

Para cada muestra ensayada se pudo evidenciar que la temperatura juega un rol fundamental en el efecto del emulsificante sobre la cristalización y que para cada mezcla HMF/girasol existe una temperatura por encima de la cual el efecto es de demora y por debajo de la cual el efecto es de aceleración. En la Figura 5.5 se presentan los resultados hallados para tres mezclas de HMF/girasol. Se han graficado como ejemplo dos temperaturas: una más baja en la que el efecto es de aceleración de la nucleación y una más alta en la que el efecto es de demora de la cristalización.

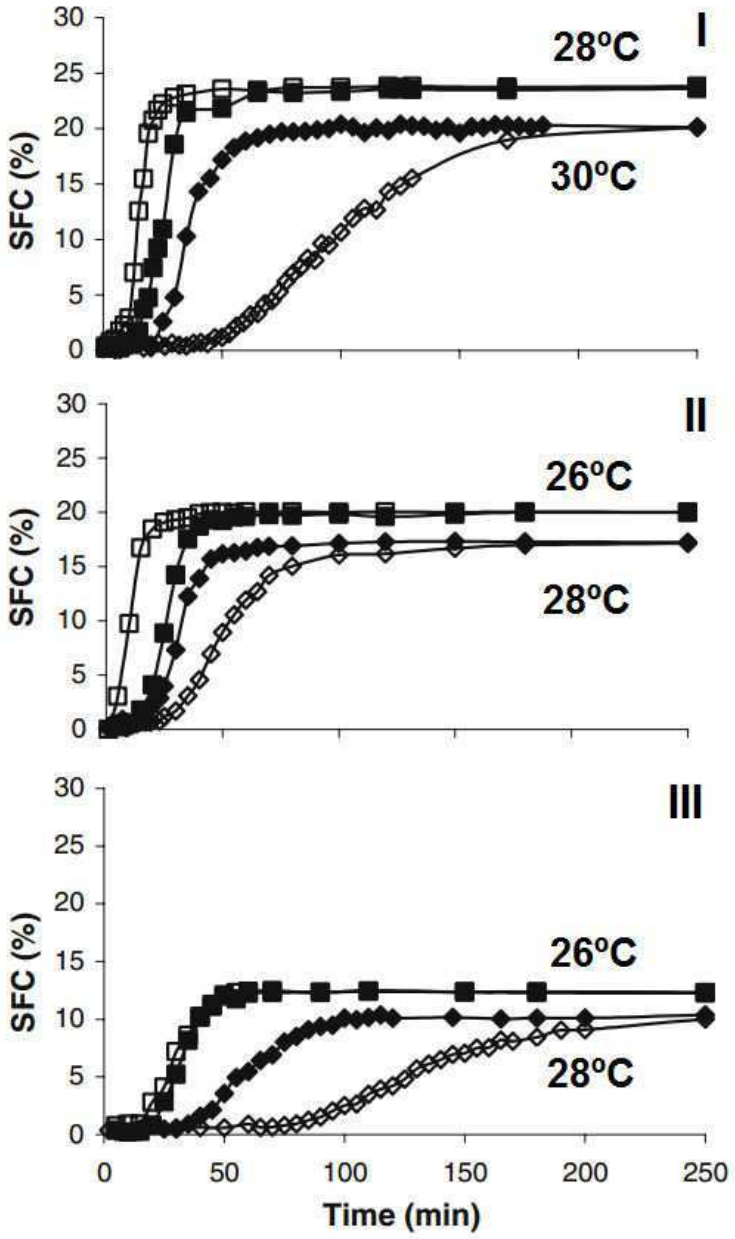

Figura 5.5. Cinética de cristalización isotérmica para tres composiciones de HMF/SFO diferentes. En todos los casos los símbolos llenos representan al sistema graso sin emulsionante y los símbolos vacios la fase grasa con el agregado de 0.5% p/p de P-170. I) HMF100. II) HMF80 III) HMF60

En la Figura 5.5 se puede observar que la cantidad de sólidos totales no estuvo afectada por el pequeño agregado de emulsificante al sistema (0.5% p/p).

Siempre convergió a un valor similar una vez seleccionada la temperatura de trabajo. El cambio principal radica en la velocidad con la cual llega a esta asíntota.

Cuando se calculan los coeficientes de Avrami (Ecuación 5.3) se espera que el índice “n” decrezca con el aumento del sobreenfriamiento debido a que ocurra una nucleación más espontanea y que la cinética tenga una constante de velocidad mayor, mientras que a bajas sobresaturaciones la nucleación resulte esporádica y n posea valores mayores [Campos, Narine & Marangoni 2002]. Con el modelo de Avrami se podría obtener tiempos de inducción medios y se podría comparar los parámetros n y k entre muestras [Wright & Marangoni 2002]. En nuestros sistemas, el ajuste de las curvas experimentales, no dio buenos resultados. La razón principal podría ser que el modelo de Avrami considera que la velocidad de crecimiento es constante. En sistemas con una composición tan compleja como los nuestros esta suposición resulta una hipótesis muy osada y no siempre válida [Narine, Humphrey & Bouzidi 2006]. La Ecuación 5.3 se puede reescribir para obtener la forma lineal que se muestra a continuación:

$$\log\left(-\log\left(1-\frac{SFC(t)}{SFC_{\infty}}\right)\right)=\log(K)+n\log(t) \qquad \text{Ecuación 5.6}$$

En la Figura 5.6 se grafican las curvas del contenido de sólidos totales a un determinado tiempo *t* expresada según la Ecuación 5.6 para las muestras de HMF100 sin aditivos (parte I y II) y con 0,5% p/p de P-170 agregado (parte III y IV), tanto para la cristalización isotérmica a 30ºC (parte I y III) como para la cristalización a 28ºC (parte II y IV). La cantidad de sólidos totales a tiempo infinito

“SFC∞” se obtuvo por extrapolación de la parte final de la curva empleando una función exponencial.

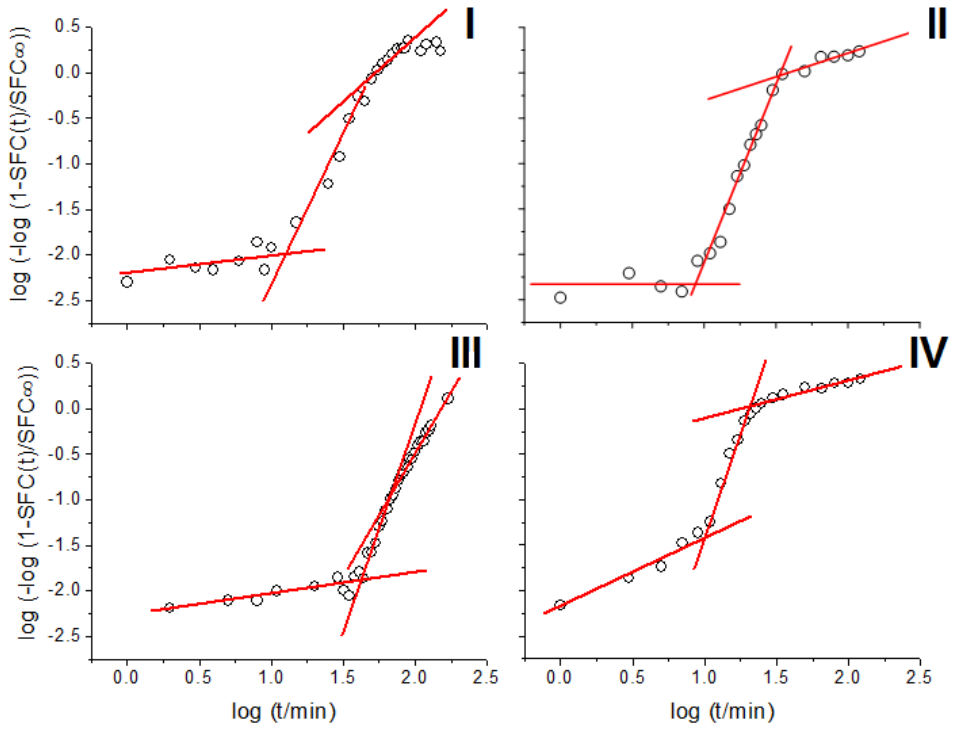

Figura 5.6. Linealización de las curvas de sólidos totales a un tiempo *t* según la ecuación de Avrami para HMF100 (I y II) y HMF100 con P-170 agregado (III y IV) cristalizado isotérmicamente a 30ºC (I y III) y 28ºC (II y IV).

En la Figura 5.6 se puede ver que la aproximación de velocidad de crecimiento constante no es válida y que se pueden apreciar en todos los casos al menos tres regímenes diferentes. Cuando se intenta aproximar los datos a un simple crecimiento exponencial se obtendrá un valor medio entre todas las pendientes y ordenadas lo que genera resultados no muy confiables a la hora de realizar un análisis sistemático. Narine y colaboradores han observado resultados similares en otros sistemas complejos y han propuesto, de manera semiempírica, el analisis por partes de la curva, es decir, un ajuste en cada zona lineal. Sin

embargo de esta manera se pierde el sentido físico del modelo [Narine, Humphrey & Bouzidi 2006]. Una perspectiva a futuro, es el análisis diferencial de las curvas proponiendo algún mecanismo de cristalización [Foubert et al. 2002].

5.3.1.2 Microscopía Óptica de Luz Polarizada

En Figura 5.7 se exponen micrografías obtenidas por PLM para muestras de grasa de leche de alto punto de fusión (HMF). Las mismas se tomaron luego de transcurrida una hora a la temperatura de cristalización dado que a partir de ese lapso de tiempo no se observaron cambios en la microestructura. Al cristalizar la muestra a 28ºC (Figura 5.7 I) se observó la formación de pequeños cristales homogéneamente distribuidos lo que está de acuerdo con una cinética de nucleación rápida. Al aumentar la temperatura de cristalización a 30ºC (Figura 5.7 II), la distribución de cristales dejó de ser homogénea. Es interesante destacar que al agregar 0,5% p/p del emulsionante P-170 hubo un cambio morfológico respecto de la cristalización sin emulsificantes tanto a 28ºC (Figura 5.7 III) como a 30ºC (Figura 5.7 IV). A bajos sofreenfriamientos, los cristales presentaron forma de rosetas, correspondientes a cristales grandes de la forma β' [Rincón-Cardona 2013a]

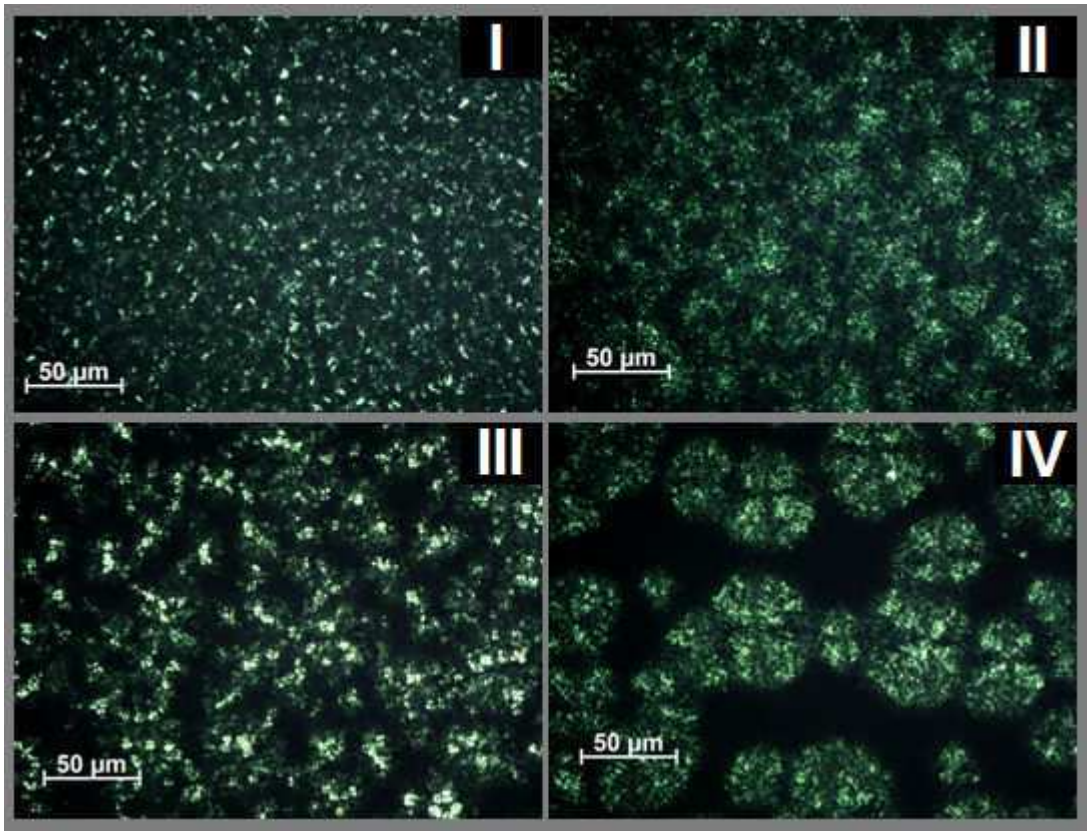

Figura 5.7. Imágenes de PLM tomadas usando un objetivo de 20X, luego de 60 minutos de cristalización isotérmica. I y III cristalizadas a 28ºC y II y IV cristalizadas a 30ºC, para muestras grasas de HMF100 sin agregados (I y II) y con 0.5% p/p de p-170 (III y IV)

Un efecto similar se pudo observar al diluir la grasa de leche con un 20% p/p de aceite de girasol como se destaca en la Figura 5.8, donde en la fila superior se muestran las micrografías de la grasa sin emulsionante y en la inferior los cristales obtenidos cuando a HMF80 se le agregó 0,5% p/p de P-170. Las temperaturas de trabajo seleccionadas fueron 26ºC (Figura 5.8 I y III) y 28ºC (Figura 5.8 II y IV).

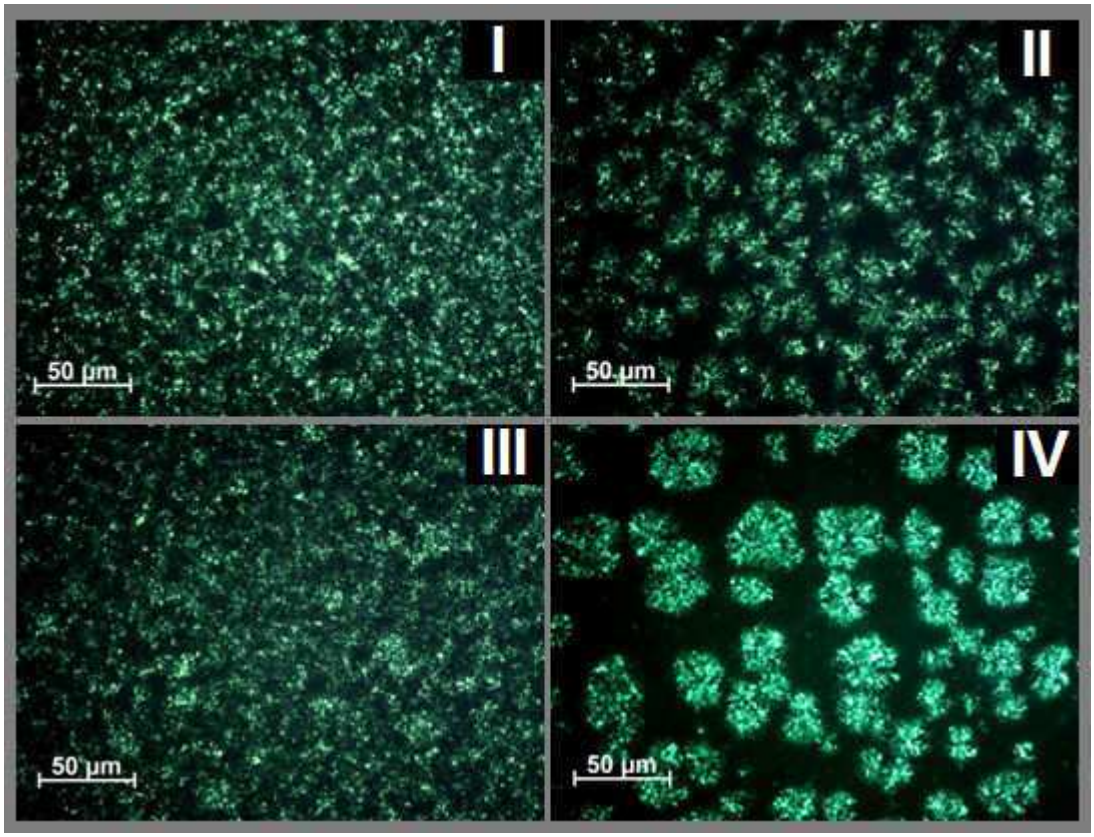

Figura 5.8. Imágenes de PLM tomadas usando un objetivo de 20X luego de 60 minutos de cristalización isotérmica. I y III cristalizadas a 26ºC y II y IV cristalizadas a 28ºC, para muestras grasas de HMF80 sin agregados (I y II) y con 0.5% p/p de p-170 (III y IV)

Sin embargo, al aumentar la concentración de aceite de girasol hasta un 40% p/p la tendencia mostrada en la morfología cambió (Figura 5.9). El aumento del contenido de girasol tuvo el mismo efecto. Las muestras sin agregados de emulsionante mostraron cristales más grandes que HMF100 y HMF80 cuando cristalizaron a altos y bajos sofreenfriamientos (26°C, Figura 69 I; 28ºC, Figura 5.9 II). Sin embargo, al agregar 0,5% p/p de P-170 los cristales resultaron más pequeños que para HMF60 sin agregado de P-170 cuando la cristalización ocurrió a 28°C (Figura 5.9 II). Una posible explicación para esta diferencia es que el

emulsificante produzca una reducción en el tamaño del cristal y sea este y no el agregado de girasol el efecto predominante.

.

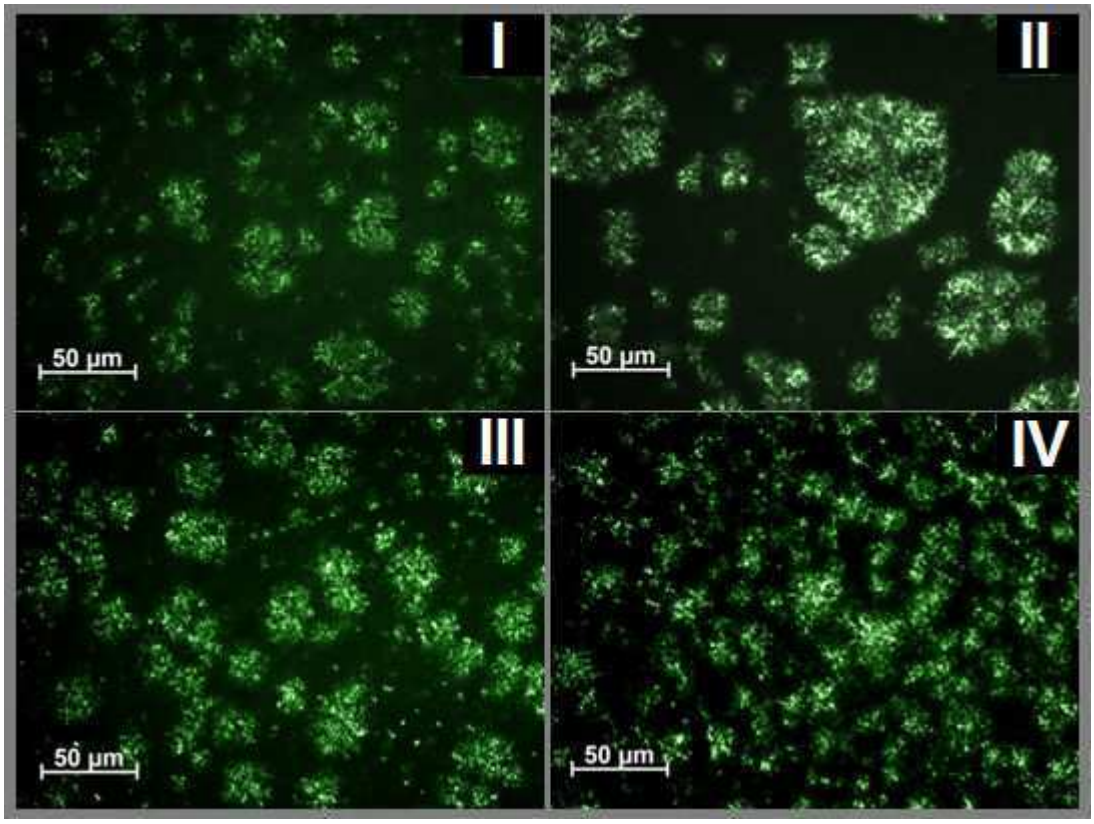

Figura 5.9. Imágenes de PLM tomadas usando un objetivo de 20X luego de 60 minutos de cristalización isotérmica. I y III cristalizadas a 26ºC y II y IV cristalizadas a 28ºC, para muestras grasas de HMF60 sin agregados (I y II) y con 0.5% p/p de p-170 (III y IV)

A pesar que el agregado de P-170 tiene una influencia diferente durante la cristalización isotérmica en la morfología de la mezcla HMF60 que en las muestras HMF100 y HMF80, la cinética del proceso evaluada por NMR es similar a la de las de las muestras HMF100 y HMF80 (ver Figura 5.5 III). Es decir, por encima de una cierta temperatura el efecto es de demora de la cristalización y por debajo de la misma, de aceleración. Algunos autores han evaluado el efecto de los

emulsificantes empleando como única técnica la microscopía de luz polarizada. Esto ha contribuido a la controversia existente en la literatura acerca del efecto que producen los emulsificantes sobre la cristalización de las materias grasas. Una revisión exaustiva de la literatura fue realizada por Smith et al. 2011.

5.3.1.3 Dispersión de Rayos X a bajos ángulos (SAXS)

Ya se han descripto los efectos en la velocidad de cristalización y los cambios en la morfología de los cristales que ocurren por el agregado de un emulsionante lipofílico. Con los experimentos de difracción de rayos X en función del tiempo se analizaron las transformaciones polimórficas de las grasas desde los primeros estadíos en los cuales nace la nueva fase y evoluciona hasta que no se producen cambios.

En la Figura 5.10 se muestran los resultados de los experimentos de difracción de rayos X en función del tiempo obtenidos al cristalizar HMF100 a dos temperaturas, con y sin el agregado de P-170. En todos los casos el pico menos intenso centrado en 1,80º correspondió a la difracción de la forma polimórfica α mientras que el pico intenso centrado en 2,03º correspondió a la forma polimórfica β' [Sato 2001].

En todos los casos se pudo observar que la nucleación ocurrió bajo la forma polimórfica α la que luego sufrió una transformación de fase sólida a β', evidenciada por la desaparición del pico de difracción correspondiente a la forma polimórfica α y la aparición del pico de difracción correspondiente a la forma β'.

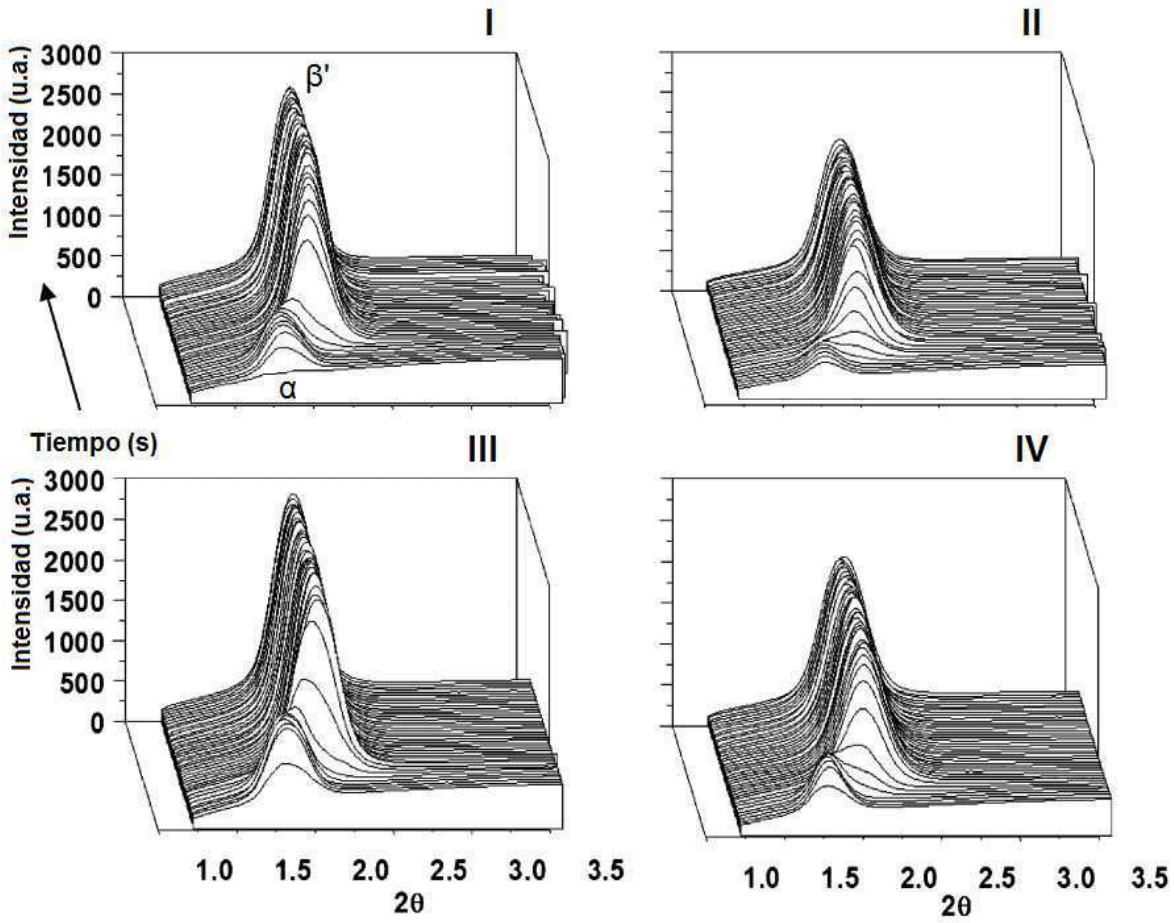

Figura 5.10. Diagramas de difracción de rayos X obtenidos para HMF100 (I y II) y con 0,5% p/p de P-170 agregado (III y IV). La cristalización isotérmica se realizó a dos temperaturas: 28ºC (I y III) y 30ºC (II y IV).

Estos diagramas resultaron similares en todas las muestras. En la Figura 5.11 se muestra otro ejemplo de diagramas de difracción en función del tiempo. HMF60 se cristalizó a 26°C y 28°C sin aditivos y con el agregado de P-170.

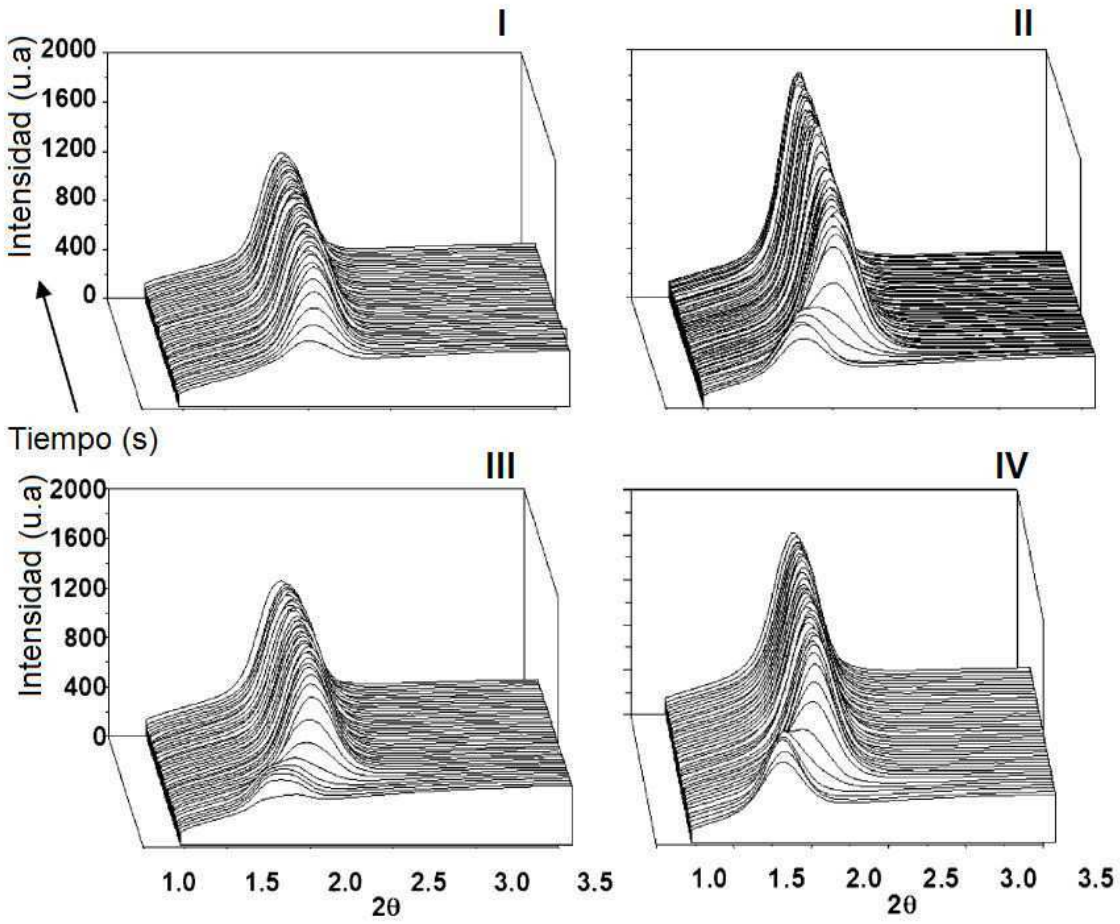

Figura 5.11. Diagramas de difracción de rayos X obtenidos para HMF60 sin agregados (I y II) y con 0,5% p/p de P-170 agregado (III y IV). La cristalización isotérmica se realizó a dos temperaturas: 26ºC (I y III) y 28ºC (II y IV).

Un análisis más detallado resultó de deconvolucionar los dos picos correspondientes a la difracción de cada forma polimórfica descripta utilizando la Ecuación 5.4. Al graficar el área obtenida para cada forma polimórfica a partir de las curvas intensidad normalizadas en función del tiempo, como se detalla para las emulsiones de HMF100 en la Figura 5.12 y HMF80 en la Figura 5.13, se observó que en todos los casos al cristalizar a bajos sobreenfriamientos (Figura 5.12 I) la coexistencia de fases ocurre en un periodo corto pero esta coexistencia se alargó notablemente cuando se adicionó 0,5% p/p de surfactante lipofílico (Figura 5.12

III). Al aumentar el sobreenfriamiento la coexistencia de fases en HMF100 sin aditivos resultó mayor (Figura 5.10II y Figura 5.12 II). Esto se debió a que la forma α que es la más inestable cristaliza siempre primero y tiene un tiempo de vida mayor a temperaturas más bajas.

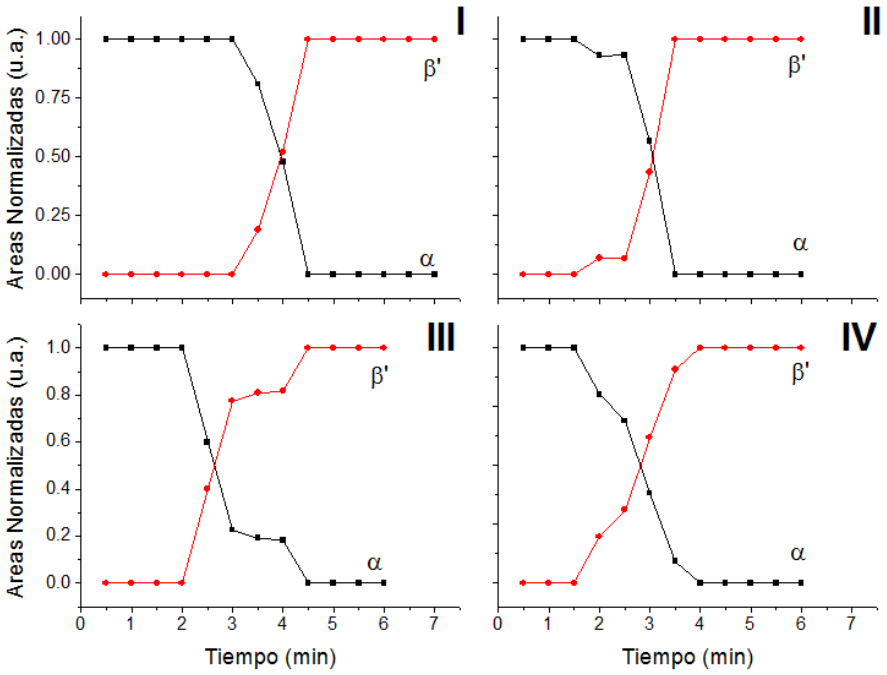

Figura 5.12. Áreas normalizadas en función del tiempo. La fila superior corresponde a HMF100 sin agregados y la fila inferior a HMF100 con 0,5% p/p de P-170. Cada una a dos temperaturas diferentes (30ºC: I y III y 28ºC: II y IV).

Si la temperatura de cristalización elegida es superior al punto de fusión de la forma α, la materia grasa cristaliza directamente en la forma β'. El agregado de emulsificante alargó el tiempo de coexistencia de ambas formas polimórficas (Figura 5.10IV). P-170 cristaliza en una celda similar a la de la forma α. La misma presenta un solo pico de difracción a 1,80°. Como su punto de fusión es superior al de HMF100 cristaliza primero y actúa como semilla de cristalización para la materia grasa favoreciendo la forma polimórfica más similar a la del emulsificante.

A bajas temperaturas entonces acelera la cristalización. A temperaturas más cercanas al punto de fusión de la grasa la forma α tiene un tiempo de vida corto o no cristaliza (como se destaca en la Figura 5.11 I) y el efecto es de demora dado que a estas temperaturas no actúa eficientemente como semilla. Como se trata de una molécula con estructura diferente probablemente dificulte la nucleación al incorporarse como impureza al cristal. En la Figura 5.13 se muestra la deconvolución de áreas normalizadas para HMF80. En la misma se puede ver que se evidencia un comportamiento similar al detallado para la grasa sin aceite de girasol agregado.

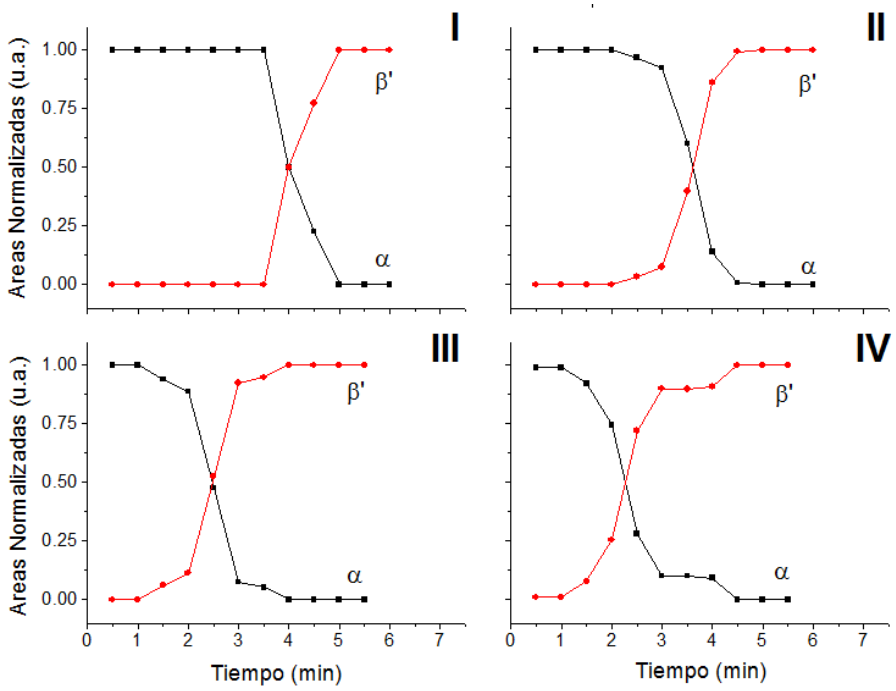

Figura 5.13. Áreas normalizadas en función del tiempo. La fila superior corresponde a HMF80 sin agregados y la fila inferior a HMF80 con 0,5% p/p de P-170. Cada una a dos temperaturas diferentes (28ºC: I y III y 26ºC: II y IV).

Ningún autor en la literatura ha descripto ambos efectos en el mismo sistema graso. Este resultado novedoso implica que el emulsionante lipofílico está

involucrado en la formación de los cristales de grasa alterando la cinética de cristalización y el comportamiento polimórfico del sistema.

5.3.2 Emulsiones y Grasas

5.3.2.1 Tamaño de gota y estabilidad de emulsiones de gota grande

En la Figura 5.14 se muestran las curvas de dispersión dinámica de luz para emulsiones de gota grande, EG (es decir, aquellas procesadas con agitación mecánica únicamente), formuladas con 100% de HMF Figura 5.14I, 60% de HMF Figura 5.14II y aceite de girasol Figura 5.14III. En todos los casos el 99% de las gotas de la distribución tuvieron diametros mayores a 1 µm y si bien las distribuciones presentaron pequeñas diferencias las curvas tuvieron una forma similar. Los valores de los diámetros medios ($D_{4,3}$) tampoco presentaron diferencias significativas en todas las muestras. Para HMF y HMF60 $D_{4,3}$ fue 11±1 µm y para SFO (HMF0) 13±1 µm, con un ancho de distribución *W* (diferencia de percentilos 0,9 y 0,1) de 18 ±1 µm en todos los casos. Al igual que se mostró en el capítulo anterior, los resultados no difieren entre aceites una vez fijada la concentración de NaCas y aditivos de la fase acuosa. A pesar de las sutiles diferencias que se encontraron todas las curvas se asemejan.

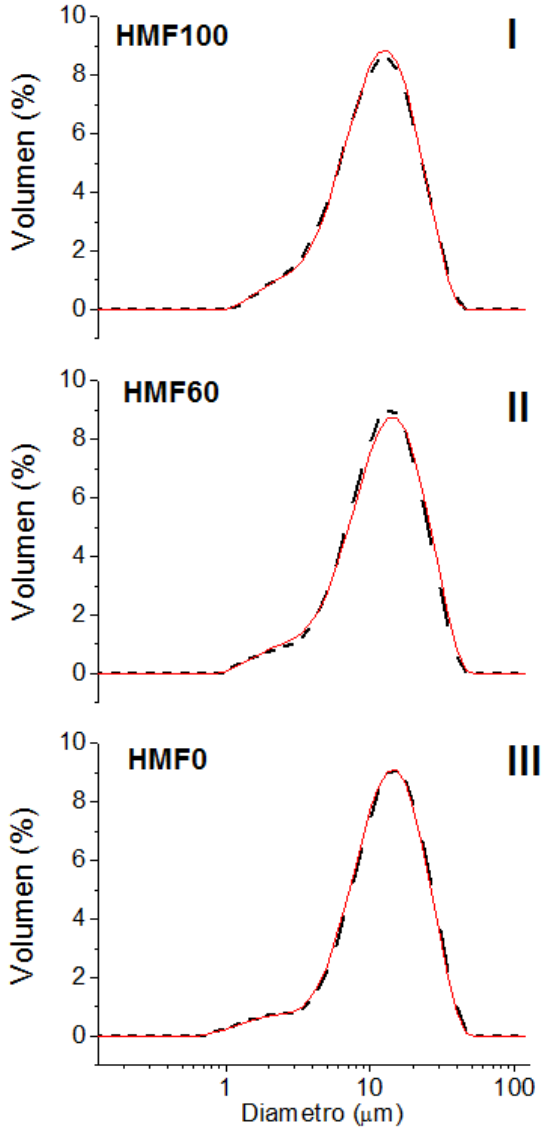

Figura 5.14. Dispersión Dinámica de Luz para emulsiones de gota grande, EG, formuladas con 20% p/p de fase grasa, 4,0% p/p de NaCas y 20% p/p de sacarosa. Con línea entrecortada se expresan las fases oleosas sin agregado de emulsificante y en línea continua las mismas emulsiones con un agregado de 0,5% p/p de P-170.

Si hubo coalescencia parcial, la misma no fue detectable por dispersión de luz estática utilizando el Turbiscan debido a que las partículas fueron muy grandes y por ello la migración fue el único fenómeno observado durante los primeros minutos. Sin embargo, la migración de las gotas de la emulsión no afectó las mediciones realizadas con el equipo de NMR ni las realizadas con las facilidades

de SAXS del LNLS. En el primer caso porque el equipo integra la señal obtenida en 3 cm del tubo aproximadamente (colocándose en el tubo la cantidad necesaria para medir) y en el segundo porque el porta muestras fue muy pequeño. En la Figura 5.15 se muestran dos imágenes obtenidas al estudiar HMF100 y HMF0 con el analizador vertical Turbiscan graficado en ΔBS (%) en función del tiempo. En la parte I se presentan los resultados para HMF100 y en la parte II para aceite de girasol (HMF0), con la fase lipídica en una proporción de 20% p/p, como ejemplo de dos casos extremos en composición de fase dispersa. En los primeros minutos se produjo el cremado de glóbulos grandes lo que se observa como una gran disminución de la intensidad en la zona inferior del tubo (0-20 mm).

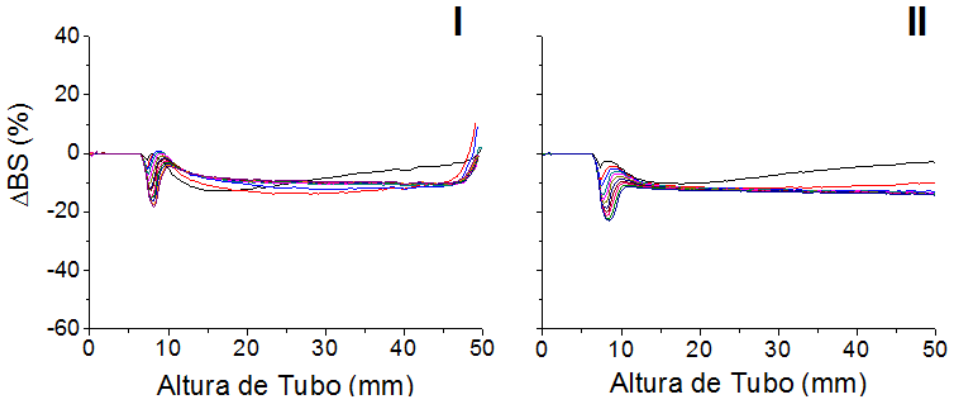

Figura 5.15. Cinética de destabilización de emulsiones de gota grande, EG. HMF100 (A) y aceite de girasol, HMF0 (B), formuladas con 4,0% p/p de NaCas y 20% p/p de sacarosa, seguida a través de medidas de intensidad de luz dispersada en función de la altura del tubo.

No se hallaron diferencias significativas entre las emulsiones preparadas con el agregado del aditivo P-170 a la fase dispersa y sin el mismo. Esto indica que el emulsificante no tuvo un efecto sobre la estabilidad de estas emulsiones.

5.3.2.2 Contenido de grasa sólida en sistemas compartimentalizados

Al cristalizar la fase grasa dispersada en un medio acuoso, la nucleación y crecimiento de cristales ocurren en un espacio confinado por la interfase agua/lípido. Al agregar el surfactante P-170 a las emulsiones dos hechos muy interesantes ocurrieron (Figura 5.16). El primero es que siempre el surfactante aceleró la cristalización. La cristalización en emulsiones se produce siempre a una temperatura más baja que en fase homogénea. Por esta razón, las experiencias se realizaron a temperaturas más bajas que las experiencias en fase homogénea. Todas las temperaturas ensayadas resultaron menores que la temperatura a la cual se observó por NMR que el efecto del emulsificante cambió de aceleración a demora. Es decir, todas pertenecen al rango en el cual el efecto es de aceleración de la nucleación en la fase grasa. En estas emulsiones no se produce cristalización a las temperaturas correspondientes al rango donde el emulsificante demora la cristalización. El segundo hecho es que el contenido de grasa sólida siempre es mayor cuando se adiciona un 0,5% p/p de P-170 (símbolos vacios). Como se mostró en la Figura 5.14, la distribución de tamaño de gota en la dispersión líquido-lìquido no cambia con el agregado de este aditivo, la explicación de este resultado no yace en el confinamiento sino que por el contrario apoya la hipótesis de que actúa como semilla de cristalización.

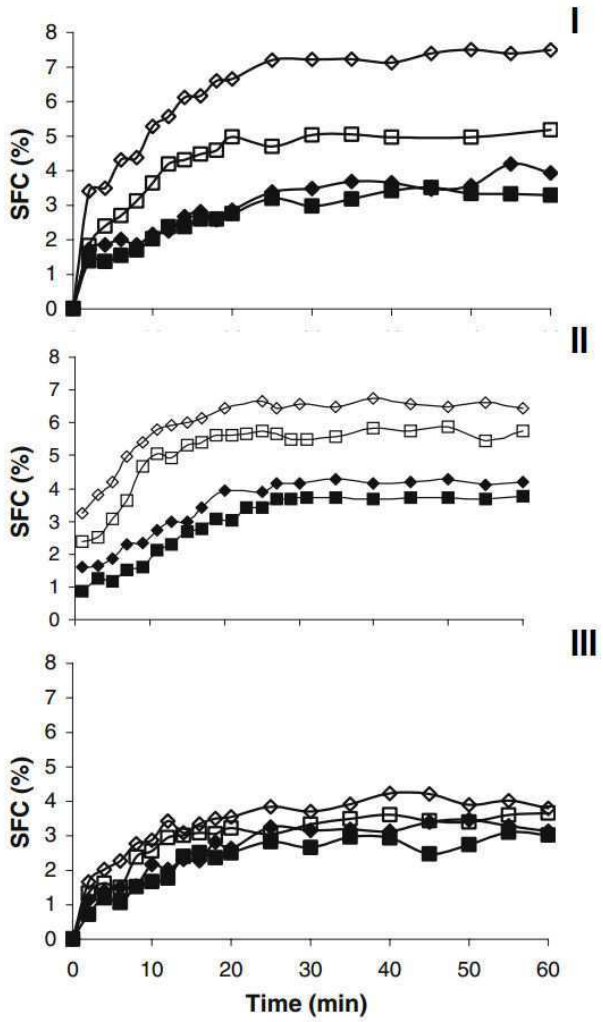

Figura 5.16. Contenido de grasa sólida en emulsiones formuladas con 20% p/p de fase grasa. Los símbolos llenos representan emulsiones sin aditivos y los vacios emulsiones con el agregado de P-170. Los cuadrados indican experimentos realizados a 24ºC y los rombos experimentos realizados a 22ºC. I. HMF100. II. HMF80. III. HMF60.

5.3.2.3 Microscopia óptica de Luz Polarizada

Cuando se cristalizaron a 24°C las emulsiones formuladas con HMF100 durante 2 horas y a 22°C las formuladas con HMF80 y HMF60 por el mismo intervalo de tiempo y se observaron los cristales con PLM, utilizando un objetivo de 50X como se muestra en la Figura 5.17, no pudieron encontrarse diferencias

visuales entre las muestras preparadas con y sin el agregado del emulsionante, ni entre las que poseían diferencias en la composición de la fase grasa.

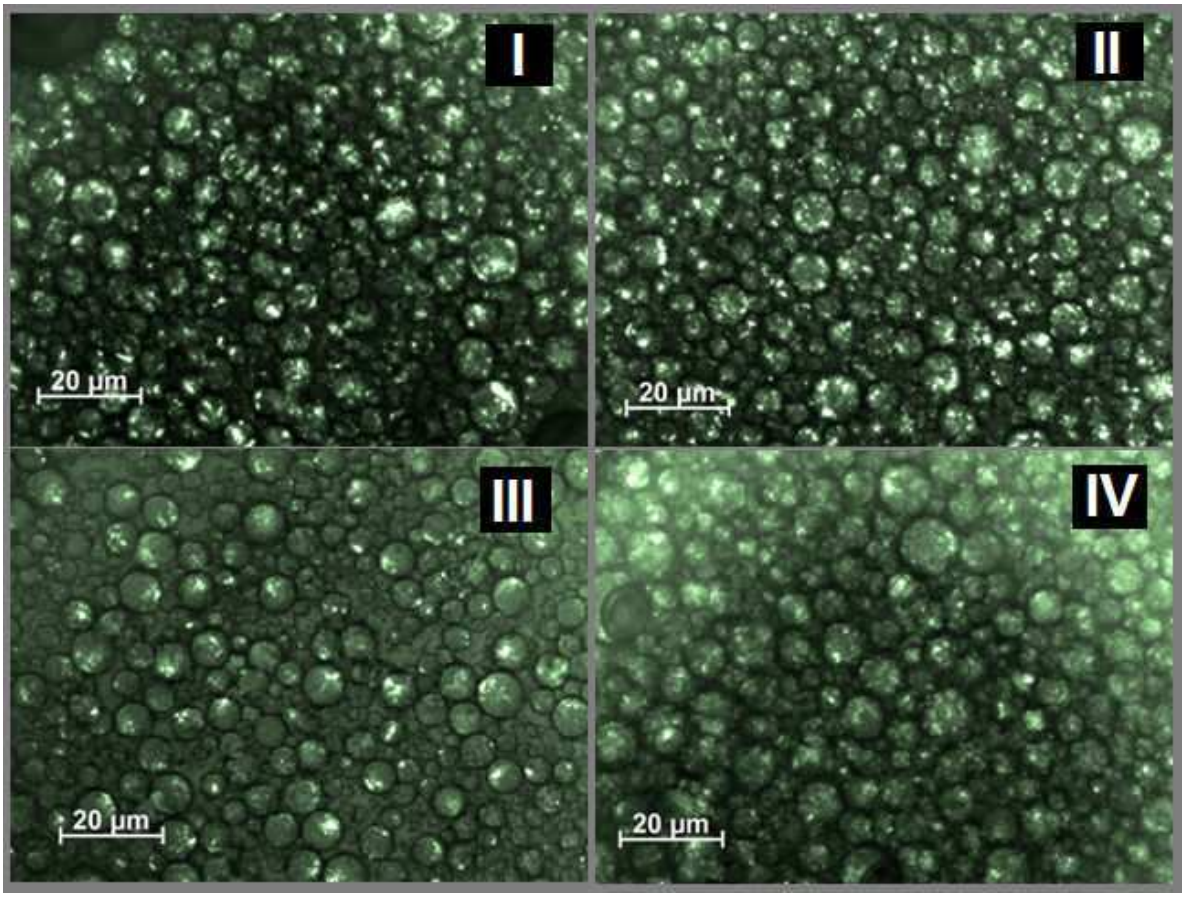

Figura 5.17. Micrografía de emulsiones obtenidas por PLM con platina termostatizada utilizando un objetivo de 50X. I. HMF100 a 24ºC, II.HMF100+P-170 a 24ºC; III.HMF60 a 22ºC y IV. HMF60+P-170 a 22ºC.

Un hecho a destacar es que en todas las emulsiones de la Figura 5.17 los cristales se encontraron en su mayoría cerca de la interfase de las gotas. En la Figura 5.18 se realizó un zoom digital de la emulsión preparada con HMF60 (Figura 5.17III) y se le aplicó un algoritmo que detecta bordes utilizando el programa de uso libre ImageJ [Abramoff, Magalhaes & Ram 2004; Schneider, Rasband & Eliceiri 2012]. En la misma se destacan los cristales en las cercanías de la interfase. En la literatura se ha propuesto que en el proceso de nucleación la

superficie de la gota juega el rol de molde en estos sistemas dispersos [Awad & Sato 2002a]. En ese contexto la presencia de NaCas generaría un entorno no apto para el crecimiento de los cristales. Cuando se adiciona un surfactante, este facilita la nucleación en la superficie obteniendo mayores concentraciones de grasa sólida como se demostró en las experiencias de NMR (Figura 5.16).

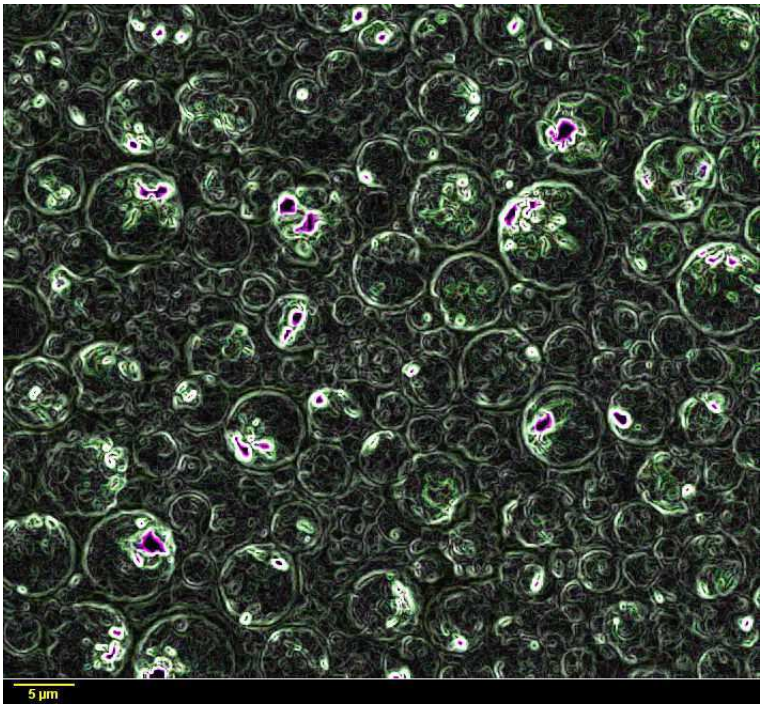

Figura 5.18. Imagen de una emulsión preparada con HMF60, cristalizada por dos horas a 22ºC y tratada con un algoritmo de búsqueda de bordes utilizando el programa de uso libre ImageJ.

Si bien no se han encontrado diferencias en la estabilidad de las emulsiones por el agregado del surfactante lipofílico, ni se pudo verificar por imágenes diferencias en la microestuctura de las diferentes muestras, se puede esperar que el proceso de coalescencia tenga relevancia en la estabilidad de estos sistemas. Con el fin de ejemplificar la importancia de la coalescencia parcial en emulsiones,

se preparó una emulsión con menor contenido de fase lipídica (10% p/p de HMF100). En la Figura 5.19 se puede ver que una vez sintetizada la muestra las partículas resultaron del orden de los 10 µm y se presentaron homogéneamente distribuidas. Cuando se almacenaron dos horas a 22ºC se registró la formación de cristales y agregación de partículas. Al fundir los sólidos a 50ºC se observaron glóbulos de diámetros superiores a los iniciales indicando coalescencia de las gotas. La formación de una fase cristalina en la gota condujo a desestabilización por coalescencia parcial. Cuando las emulsiones descriptas en el capítulo 4 se desestabilizaron, lo hicieron por floculación registrándose una disminución del BS en la región central del tubo de Turbiscan. Esto quiere decir que la formación de cristales en la fase discontinua cambió el mecanismo de desestabilización de las emulsiones formuladas con NaCas.

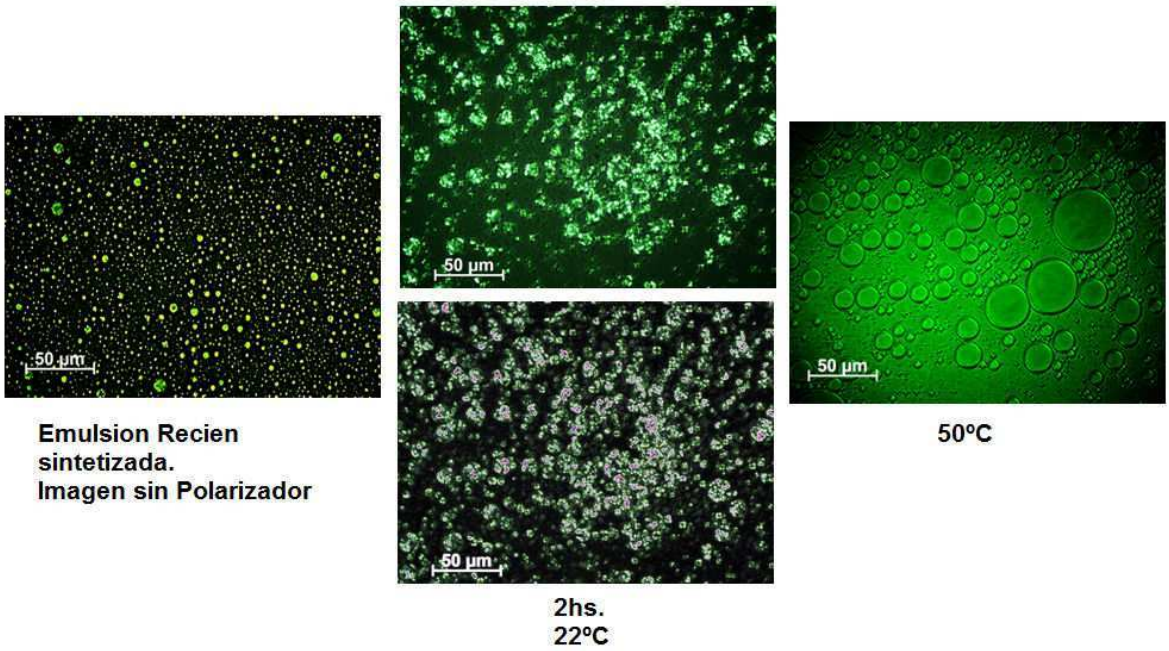

Figura 5.19. Emulsión preparada con 10% p/p de HMF, almacenada a 22ºC durante dos horas y luego fundida a 50ºC. Las imágenes ejemplifican la relevancia de la coalescencia parcial en la estabilidad de una emulsión.

5.3.2.4 Dispersión de Rayos X a bajos ángulos (SAXS)

En la Figura 5.20 se exhiben los resultados de difracción resuelto en el tiempo para dos EG: HMF60 (I y III) y HMF100 (II y IV). En la misma, en la fila inferior se encuentran los difractogramas para las muestras con P-170 agregado. Al ser un sistema más diluido, en cuanto a cantidad de cristales, la intensidad registrada fue mucho menor y facilitó el análisis dado que la superposición de curvas fue mínima.

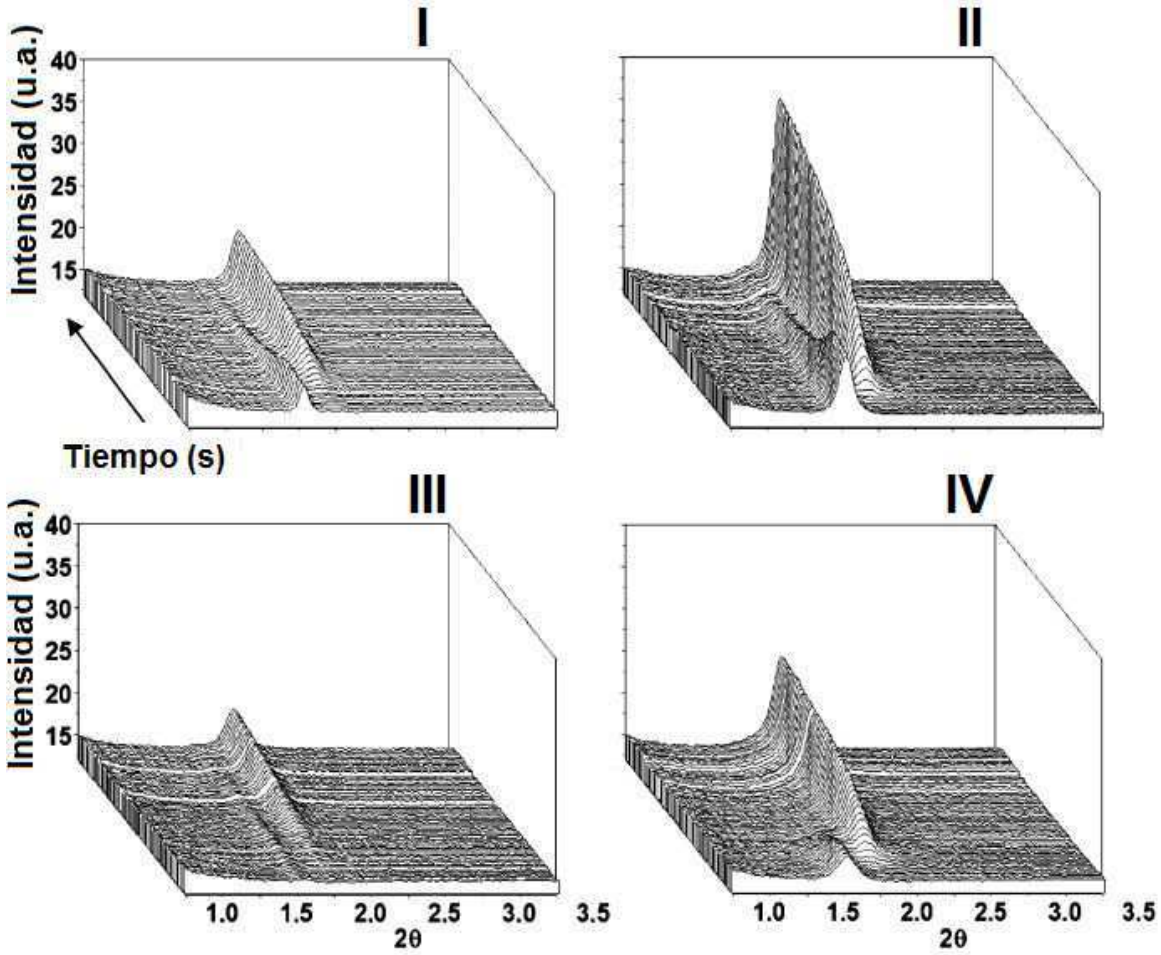

Figura 5.20. Difracción de rayos X en función del tiempo para emulsiones de HMF60 (A y C) a 22ºC y HMF100 a 24ºC (B y D) sin agregados (I y II) y con P-170 (III y IV).

En todos los casos, al proyectar todas las curvas a un mismo plano se pudo observar un punto isosbéstico como se detalla en la Figura 5.21. Cada fase cristalina tiene su distancia interplanar determinada. La transformación polimórfica entre dos fases grasas mantiene el centro de cada pico (relacionado con la distancia entre lamelas) fijo [Sato & Ueno 2001]. Este ejemplo, resultó importante para mostrar en un sistema diluido el fenómeno de transformación de fases. Tanto en la Figura 5.10 como en la Figura 5.11 se mostraron difractogramas en fase grasa homogénea (entendiéndose homogeneidad como que la fase lipídica no se encuentra dispersada en una emulsión). Cuando dos curvas se solapan debido a que sus centros son muy próximos (respecto a su varianza), y como cada curva es el resultado de una integración temporal, lo que se observa en apariencia es que el máximo se mueve. Este artefacto se evita cuando los picos de difracción son menos intensos.

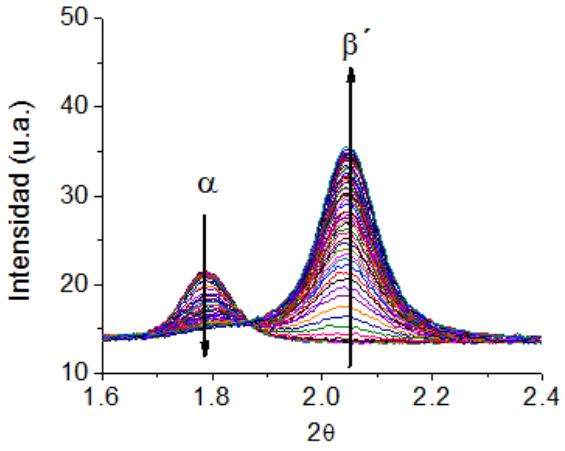

Figura 5.21. Transformación polimórfica isotérmica en función del tiempo. El decrecimiento de la intensidad de la fase α se encuentra acompañada por un aumento en la intensidad de la fase β' y se observa un punto isosbéstico.

En la Figura 5.22 se analiza la coexistencia de fases sólidas en emulsiones. En la misma se han graficado las áreas bajo las curvas de SAXS en función del tiempo para la forma β'. En todo el intervalo exhibido se detectó la presencia de la fase polimórfica α. Esto se indica con una barra en la parte superior del gráfico ya que esta área se mantiene constante. El resultado es congruente con el análisis en fase homogénea. La coexistencia de fases fue mayor con el agregado de P-170 que en las emulsiones sin el aditivo.

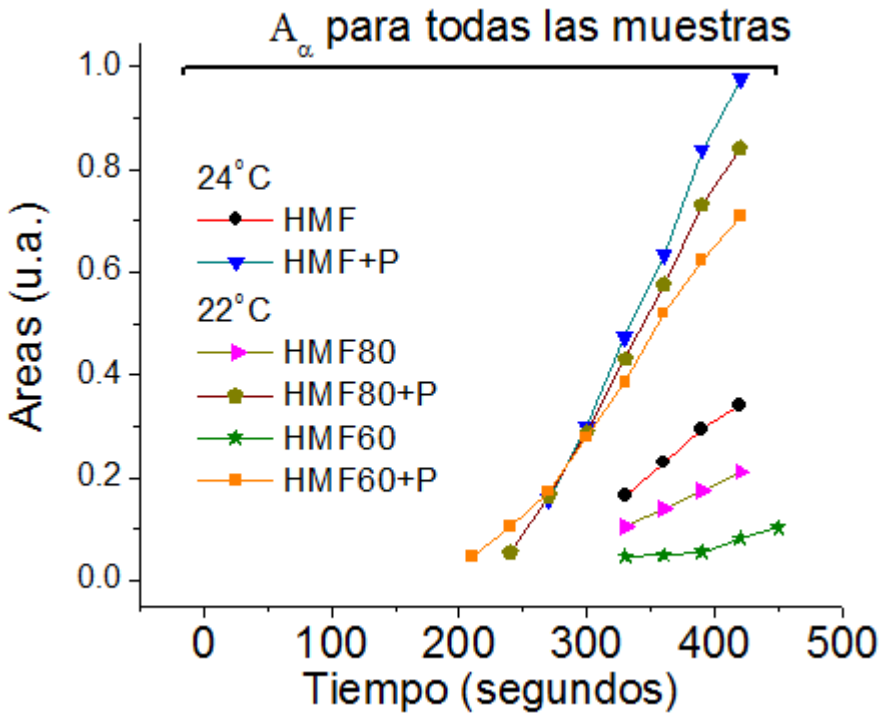

Figura 5.22. Áreas normalizadas de emulsiones formuladas con 20% de HMF100, HMF80 y HMF60. En la misma solo se exhiben los puntos correspondientes a la fase β'. En todo el intervalo se detecto la presencia de la fase α. En la leyenda interior se especifica la muestra y la temperatura de trabajo.

5.3.3 Emulsiones Finas (EF)

El efecto de la cristalización en la estabilidad de emulsiones finas no pudo ser estudiado. La materia grasa, contenida en gotas tan pequeñas, (en su mayoría menores al micrón como se muestra en la Tabla 5.2), no cristalizó en el intervalo de temperaturas de trabajo seleccionadas. Por otra parte estas emulsiones no mostraron desestabilización por coalescencia parcial en el período estudiado.

Tabla 5.2. Parámetros de distribución de tamaño de gota medidos por dispersión dinámica de luz para tres emulsiones finas. Los resultados son coincidentes tanto para las emulsiones con P-170 agregado como para las mismas sin el aditivo.

Muestra	$D_{4,3}$ (µm)	W (µm)	$V_{\%>1}$
HMF100	3,69 ± 0,01	0.492 ± 0,005	2.25 ± 0,01
HMF60	3,47 ± 0,01	0.445 ± 0,005	1.84 ± 0,01
HMF0	3,22 ± 0,01	0.390 ± 0,005	1.37 ± 0,01

La estabilidad de estas emulsiones fue muy alta en todos los casos. Las mismas se mantuvieron estables durante una semana entera. En la Figura 5.23 se muestran la cinética de desestabilización de emulsiones cuya fase grasa fue HMF100 o HMF0. Como se puede apreciar en la Figura 5.23I ocurrió un ligero cremado luego de 1 semana y en el caso de la Figura 5.23II no se observó desestabilización en ese periodo.

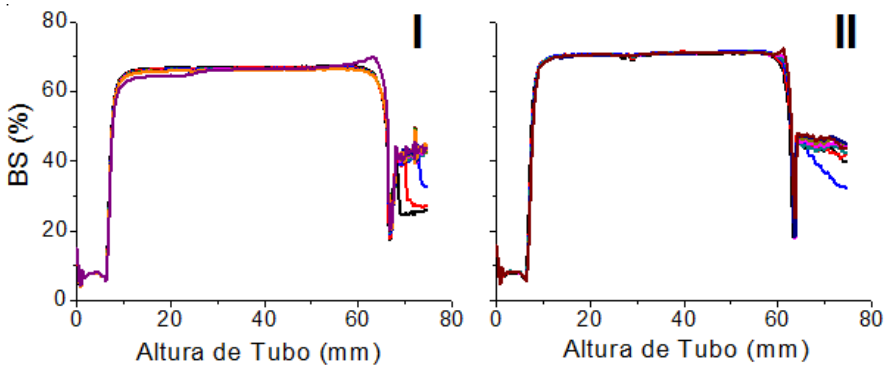

Figura 5.23. Cinética de destabilización de emulsiones de gota fina formuladas con HMF100 (A) y aceite de girasol, HMF0 (B) como fase grasa y con 4,0% p/p de NaCas y 20% p/p de sacarosa, evaluada a través de medidas de intensidad de luz dispersada en función de la altura del tubo.

5.4 Conclusiones

Se ha logrado estudiar la cristalización de la materia grasa tanto en fase homogénea como dispersa en emulsión a través de diversas técnicas que involucran la radiación visible, radiación X y radiofrecuencias (en el caso de NMR). La combinación de estas técnicas permitió analizar estos sistemas en múltiples escalas y en diferentes estadios del proceso de transición de fase.

La selección de las concentraciones de aditivos y composición para la formulación de emulsiones se hizo en base a priorizar las mediciones cristalográficas y a tener en cuenta la cantidad de sólidos grasos. Para el estudio detallado de la estabilidad y/o microestructura la proporción de materia grasa resultó un poco elevada como se demuestra en las diferencias visuales obtenidas en microscopía entre 20 y 10% p/p de HMF100, HMF80 y HMF60 (ver Figura 5.17 I y Figura 5.19).

Uno de los logros más significativos de este trabajo de tesis fue aportar elementos que permitan explicar los resultados contradictorios informados en la

literatura sobre el efecto de los emulsificantes hidrofóbicos sobre la cinética de cristalización de la materia grasa en fase homogénea y emulsiones (ver página 171). Hasta el presente, ningún autor había informado efectos de aceleración y demora para el mismo sistema en fase homogénea. Estudiando la cinética de cristalización por NMR, nosotros encontramos que siempre existe una temperatura por debajo de la cual el efecto es de aceleración y por encima de la cual el efecto es de demora. En fase homogénea, entonces, la temperatura en la cual el proceso tiene lugar es el parámetro determinante. Empleando SAXS y PLM se determinó que el agregado de surfactante tiene una íntima relación con el proceso de nucleación y crecimiento de cristales. A temperaturas alejadas del punto de fusión un pequeño agregado del aditivo aumenta la coexistencia de fases de las formas polimórficas α y β' mientras que a temperaturas cercanas la relación se invierte. Como se ha dicho, este resultado fue un aporte a la discusión siendo los primeros en mostrar la importancia de la temperatura y acompañando las hipótesis propuestas con medidas realizadas en un sincrotrón que permitieron una interpretación más profunda de estos sistemas [Huck Iriart, Candal & Herera 2009; Huck Iriart 2011c]. Cuando el sistema estudiado fue una emulsión siempre se observó una aceleración en el proceso. Este fenómeno puede estar fundamentado en dos observaciones. La primera es que al ser una transición de fase en un sistema confinado se tuvo que trabajar a temperaturas menores. La segunda observación es uno de los resultados más interesantes que hay que destacar, y es que con el pequeño agregado de surfactante, la cantidad de sólidos totales en la emulsión aumenta (Figura 5.16) mientras que en fase homogénea se llegaba al mismo valor asintótico (Figura 5.4). Como se ha mostrado, los cristales se forman

preferentemente en la superficie de los glóbulos (Figura 5.18) y el surfactante puede brindarle un molde que facilita su crecimiento.

El agregado de P-170 no modificó en ningún caso las características de las emulsiones sintetizadas. Tanto el tamaño de gota como la estabilidad permanecieron sin alteraciones. Al ser un emulsionante de carácter lipofílico posee propiedades tensioactivas inferiores a las proporcionadas por el NaCas. Por lo tanto, los efectos registrados fueron solo en la cinética de cristalización y en la cantidad de sólidos totales.

En este capítulo, el estudio de emulsiones finas no ha aportado datos valiosos desde el punto de vista de la transición de fase. Las gotas fueron tan pequeñas que la temperatura de trabajo no fue suficientemente baja como para que se observe el fenómeno de cristalización. Sin embargo, como resultado relevante se puede mencionar que estas emulsiones son estables aun a diferente proporción aceite/agua respecto a las empleadas en el capítulo anterior. Para una concentración de NaCas y sacarosa fija, los resultados fueron similares en todos los sistemas grasos estudiados. Eso revela la importancia de la fase continua y de los efectos del caseinato sobre la estabilidad de la emulsión.

6 Estructuración de emulsiones por gelificación ácida del NaCas

6.1 Introducción

6.1.1 Geles y Gelificación

La palabra “gel” es de uso común y habitual tanto en la literatura específica como en la vida cotidiana. Sin embargo, resulta difícil encontrar una definición unívoca y que describa este concepto. La Real Academia Española define a un gel como el “*Estado que adopta una materia en dispersión coloidal cuando flocula o se coagula*.” Claramente esta definición resulta muy vaga al punto que parece desembarazarse del problema de describir el fenómeno. La literatura científica lo ha enmarcado en diferentes contextos según definiciones fenomenológicas o estructurales. Con el fin de abarcar una gran cantidad de sistemas diversos se empezaron a emplear prefijos para especificar de que tipo de sistema se trata (aerogeles, xerogeles, microgeles, nanogeles, hidrogeles, oleogeles, etc) [Hench & West 1990; Almdal et al 1993; Marangoni & Garti 2011]. No obstante las definiciones que se han propuesto no dejan de ser ambiguas. Nos basaremos en la definición fenomenológica (visión más moderna) de Almdal y colaboradores. En la misma estos autores argumentan que un gel debe poseer las siguientes características [Almdal et al. 1993]:

1- Un gel es un sólido o semisólido blando con dos o más componentes en el cual uno es un líquido y está presente en cantidades sustanciales.
2- En cuanto a sus propiedades mecánicas, es un sólido viscolástico donde dependiendo de las circunstancias puede fluir como un líquido viscoso o comportarse como un sólido elástico.

Los geles poseen gran importancia en diferentes aplicaciones: en la fabricación de materiales nanoestructurados [Soler-Illia et al. 2002], en medios soporte para catalizadores [Méhn et al. 2004], en *delivery* de drogas [Hoffman 2012], como soporte de material biológico [Perulini et al. 2007] y en particular en el área de tecnología de alimentos para generar materiales comestibles como soporte de sabores o aromas (gomas y caramelos) o para estructurar alimentos y reemplazar materia grasa sólida por aceites con mejores propiedades nutricionales [Laredo, Barbut & Marangoni 2011].

6.1.2 Gelificación del Caseinato de Sodio

Las caseínas son uno de los principales subproductos de leche. La gelación de las mismas mediante reacciones enzimáticas es deseable para productos como quesos y yogures [Nonaka et al. 1992]. El autoensamblado de este grupo de proteínas varía con el pH y la concentración de calcio como se describió en la introducción (Página 8). A pH cercanos al punto isoeléctrico la masa molar del coloide incrementa rápidamente hasta formar geles [Dickinson 2006]. Para el estudio de la gelificación de proteínas de leche, se reemplazó la acidificación de la fermentación de bacterias lácticas por la acidificación controlada [Braga, Menosi & Cunha 2006]. La gelificación del NaCas y los tiempos en los cuales el proceso transcurre son sensibles a diversos factores como fuerza iónica, temperatura o aditivos como sacarosa [Belyakova et al. 2003; HadSadok et al. 2008]. En la literatura este fenómeno se ha interpretado como una floculación marcada de las proteínas a pH menores a 6 (o en las cercanías del punto isolectrico pH≈5.6)

[Belyakova et al. 2003]. Sin embargo, no se han descripto los cambios estructurales que pueda sufrir el NaCas entre pH 6 y 7. En micelas de caseína de leche se ha demostrado que hay una reestructuración de las mismas previo a la gelificación [Moitzi et al. 2011]. Este sistema difiere de los que estudiamos en que posee calcio y como resultado de esto la estructura de la caseína es diferente a la que tiene en soluciones o emulsiones de NaCas.

6.1.3 Acidificación homogénea

El mayor problema de acidificar con soluciones de ácidos concentrados reside en que la velocidad de difusión del ácido en la solución o emulsión de NaCas es más lenta que la velocidad de agregación de las caseínas. Esta inhomogeneidad podría tener como consecuencia la formación de flóculos dispersos (similar a cuando se corta la leche con jugo de limón) siendo en consecuencia el ácido inefectivo para generar la formación de un gel homogéneo. Este problema se solucionó hace un par de décadas utilizando una molécula neutra cuyo producto de hidrólisis es un ácido orgánico [Shapero, El Toro & Cane 1974]. En la Figura 6.1 se muestra un esquema de la reacción de hidrólisis del ácido glucono- δ-lactona (GDL) que fue el compuesto utilizado en la tesis. Posee una presentación en polvo, cuya velocidad de disolución es mayor a la velocidad de hidrólisis permitiendo una acidificación uniforme en todo el sistema [Braga, Menosi & Cunha 2006; Adams et al. 2009].

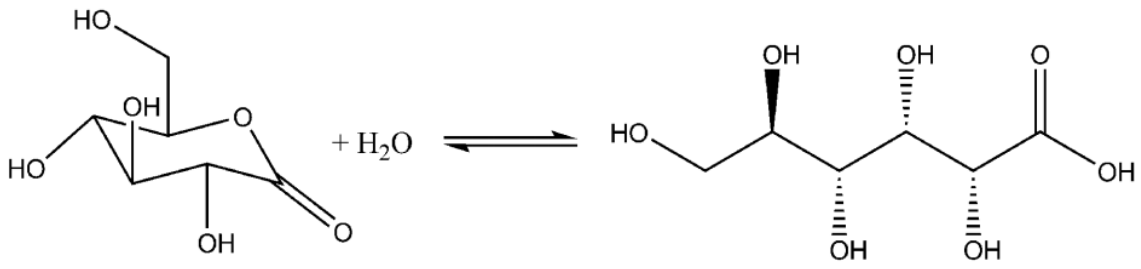

Figura 6.1. Esquema de la reacción de hidrólisis del ácido glucono-δ-lactona.

La velocidad de hidrólisis depende de la concentración de GDL y está catalizada por protones u oxhidrilos. La mínima velocidad de hidrólisis se registra en condiciones de pH neutro [Adams et al. 2009]. Los sistemas preparados con NaCas tuvieron en todos los casos un pH inicial de alrededor de 6,9 a 7,0. Esto permite manipular la muestra para colocarla en los equipos sin mayor dificultad una vez iniciada la reacción ya que no se registran cambios en por lo menos los primeros 10 minutos. En el momento de agregar el ácido se enciende el cronómetro y la medición que se realiza en los primeros minutos arroja un resultado similar a los obtenidos en varias mediciones subsiguientes.

6.2 Materiales y Métodos particulares

6.2.1 Materiales

Todas las emulsiones se formularon con 10% p/p de aceite de girasol. Se analizaron dos conjuntos de muestras: en el primer grupo se dejó fija la concentración de NaCas en 5,0% p/p y se varió la concentración de sacarosa. Los valores empleados fueron 0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 y 30,0%. En el segundo grupo

se estudiaron emulsiones formuladas con 20% p/p de sacarosa y 2,0; 5,0 y 7,5% p/p de NaCas. En el primer grupo se evaluó el efecto del azúcar y en el segundo conjunto de muestras el efecto de la concentración de NaCas.

Los geles ácidos se sintetizaron a partir de emulsiones tratadas con ultrasonido (como se describió en el capítulo 4). Para la acidificación se utilizó el ácido δ-gluconolactona (Sigma Aldrich) en una proporción en peso de proteína:ácido 5:1 (denominaremos a esta relación simple cantidad de ácido: SA) y 5:2 (llamaremos a esta proporción doble cantidad de ácido: DA). La elección de una relación en peso dada está fundamentada en que las proteínas poseen actividad ácido-base y con las relaciones seleccionadas se mantienen constantes los equivalentes de ácido respecto a los de la proteína. Al finalizar la reacción de hidrólisis, el pH resultó aproximadamente 4 en todos los casos. Este valor está por debajo del punto isoeléctrico del NaCas. La diferencia en las concentraciones de ácido se ve reflejada en la velocidad de reacción y por lo tanto en la velocidad de gelificación.

6.2.2 Tiempo de relajación longitudinal T_2 (NMR)

La movilidad molecular durante el proceso de emulsión-gel se estimó mediante la determinación de los tiempos de relajación T_2 obtenidos por la técnica de resonancia magnética nuclear (^{1}H-NMR). Se empleó un equipo Bruker Minispec mq20 de resonancia magnética nuclear de pulsos (p-NMR) con un campo magnético de 0,47 T que opera a una frecuencia de resonancia de 20 MHz. El porta-muestra tiene un sistema de control de temperatura que permite operar

entre -100 y 80 ºC empleando Nitrógeno líquido como fluido refrigerante. La temperatura durante las mediciones cinéticas se mantuvo constante a 22,5°C. El experimento de NMR consiste en inducir la transición entre los dos niveles de energía que tienen los núcleos atómicos de número de spin impar al hallarse en presencia de un campo magnético. Los núcleos pueden alinearse con el campo (nivel de menor energía) o en sentido contrario (nivel de mayor energía). Estos dos niveles son muy cercanos por lo que se trabaja con pulsos de radiación discontinuos para impedir la saturación de la señal. La muestra se colocó en un tubo cilíndrico de 0.9 mm de diámetro y con una altura de aproximadamente 4 cm. Para medir el tiempo T_2 se empleó la secuencia cpmb (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) que emplea los siguientes pulsos: un primer pulso de radiofrecuencia a 90° por 2.74 μs, 0,1 mS entre pulsos y un segundo pulso a 180° aplicado por 5.06 μs seguido por 2s de espera para relajación de la muestra.

6.2.2.1 Análisis de curvas de relajación

En muestras complejas los entornos en los cuales se encuentran contenidos los hidrógenos pueden ser muy diversos y la señal de relajación resultante corresponderá a la sumatoria de las contribuciones de todos los tipos de hidrógeno presentes en la muestra. En el caso de que las distribuciones de tiempos de relajación sean monomodales, simétricas y con un ancho medio pequeño se puede ajustar por una ecuación exponencial simple de la forma:

$$y(x) = A \exp\left(-\frac{x}{T_2}\right) + B$$ Ecuación 6.1

Donde A y B son el factor exponencial y una constante de base respectivamente y T_2 corresponde al tiempo de relajación medio. En muestras que poseen hidrógenos con diversos entornos y movilidades moleculares muy diferentes entre sí se puede discriminar entre diversas poblaciones medias utilizando ajustes biexponenciales o triexponenciales [Ruan & Chen 1998]. El análisis por cuadrados mínimos convencional se vuelve impreciso cuando la cantidad de exponenciales aumenta [Mao, Tang & Swanson 2000]. Es por ello que para el análisis de múltiples poblaciones se requieren otros métodos. Para el caso de tiempos de relajación discretos existen métodos basados en el uso de transformada de Laplace y el aproximante de Padé [Tellier 1991]. Hace tres décadas se propuso un algoritmo para estimar las poblaciones que contribuyen a una curva experimental [Provencher 1982]; el mismo ha adquirido mucha popularidad. Se empleó el programa UPENwin creado por investigadores de la universidad de Udinese, Italia basados en el algoritmo de Provencher. Para testear el programa se simularon curvas de decaimiento exponencial que se pudieran describir con la Ecuación 6.1. En la Figura 6.2 se detallan en la fila superior tres curvas simuladas (a las cuales se les incluyó un ruido aleatorio máximo del 5% del valor) y en la fila inferior el valor de los tiempos de relajación simulados (línea gruesa) y la distribución calculada (línea delgada). Para el experimento de una ecuación monomodal discreta (Figura 6.2 I) se obtuvo una distribución estrecha

(Figura 6.2 IV). Al agregar un 10% de dispersión mediante una función Gaussiana (Figura 6.2 II) se obtiene una población más ancha que la primera (Figura 6.2 V). Cuando se le agregó una segunda población (pero cercana a la primera; Figura 6.2 III), la distribución resultante siguió siendo única pero ancha y asimétrica. Volveremos a mencionar estas simulaciones cuando se muestren curvas experimentales en la sección de resultados.

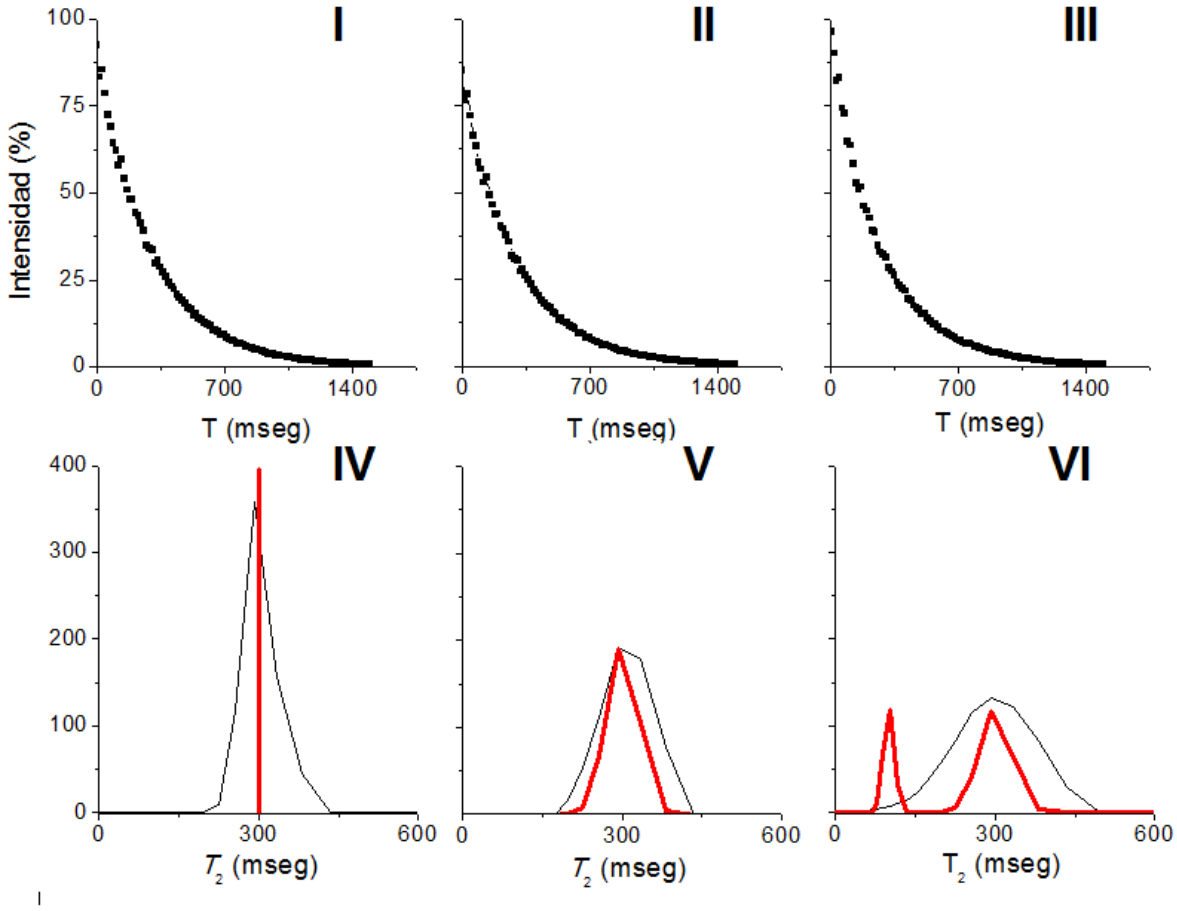

Figura 6.2. Curvas simuladas de tiempos de relajación T_2 (I, II y II). En la parte inferior de la figura se muestran las distribuciones arbitrarias utilizadas indicadas con línea gruesa (IV, V y VI) y el resultado del cálculo indicado con línea delgada.

6.2.3 Reología

Para determinar el tiempo de gelificación medido durante la transición emulsión-gel se empleó un reómetro oscilatorio dinámico Phaar Physica MCR 300 con esfuerzo de corte controlado (ver Figura 6.3). Se utilizó un sistema de platos parelelos (PP30/S) separados por un espacio de 1 mm, entre los cuales se colocó aproximadamente 0,85 ml de muestra, lo que permitió llenar completamente el espacio entre platos. La temperatura del plato inferior fue controlada mediante un sistema Peltier y un baño termostatizado (Viscotherm VT2, Phaar Physica). Las experiencias se realizaron en condiciones isotérmicas a 22,5ºC.

Figura 6.3. Fotografía del reómetro empleado.

Luego de disolver el ácido GDL en la emulsión, la misma se colocó entre los platos paralelos y se aplicó silicona líquida en los bordes con el objetivo de prevenir la evaporación de agua de la muestra y evitar la adherencia de la muestra

al sistema de platos. Las condiciones de medición se seleccionaron de manera tal de evaluar las muestras en el rango de comportamiento viscoelástico lineal. Se empleó una frecuencia de 1 Hz con una deformación del 0,01%. Durante las mediciones se registró la evolución en el tiempo del módulo de almacenamiento o elástico (G'), el módulo de pérdida o viscoso (G'') y la tangente del ángulo de pérdida (tan δ=G''/G') que indica el carácter viscoelástico del material. La transición de una estructura viscosa (sol) a una viscoelástica (gel) durante la evolución del pH por hidrólisis del GDL es determinada por el punto de cruce entre las curvas que describen el comportamiento del módulo viscoso (G'') y del módulo elástico (G'), momento en el cual el ángulo de desfasaje es de 45º. Luego de este punto de cruce o "punto gel", G' asciende notoriamente y se observa el consecuente descenso de la tan δ. Se tomará G'=G'' como punto de gelificación (t_{gel}) [Tanaka 2012]. Los valores informados son el promedio de dos determinaciones con un error menor al 5 %.

6.2.4 Dispersión de Rayos X a Bajos Ángulos (SAXS)

Las experiencias empleando SAXS se realizaron en el Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, San Pablo, Brasil. Se empleó la línea SAXS2 especialmente preparada para emulsiones y geles. Las muestras se inyectaron inmediatamente después de disolver el ácido GDL en un porta-muestras apto para líquidos. La distancia entre la muestra y el detector fue de 1974,156 mm y se empleó una longitud de onda de 1,55 Å dando un intervalo de trabajo en el módulo del vector q de 0,08 a 1,7 nm^{-1}.

6.2.4.1 Modelo empleado

Para la interpretación de los geles se mantuvo el mismo modelo utilizado para interpretar el agregado macromolecular de submicelas de caseínas. Sin embargo, no se tuvo en cuenta el factor de estructura fractal debido a que en la geometría utilizada se obtuvieron menos puntos a ángulos menores que los que se registraron en dicha zona en las emulsiones y constituyeron la contribución por la correlación de nanopartículas de caseína.

6.3 Resultados

6.3.1 Gelificación de suspensiones de caseinato de sodio

6.3.1.1 Dispersión estática de luz y gelificación

Como se describió en las páginas anteriores, la técnica de dispersión de luz estática empleando un analizador vertical resultó una herramienta muy útil para analizar la estabilidad de emulsiones. En la Figura 6.4 se muestra la transmisión (TS; Figura 6.4 I) y Backscattering (BS; Figura 6.4 II) de una suspensión coloidal de 5,0% p/p de NaCas a medida que la hidrólisis de GDL tiene lugar.

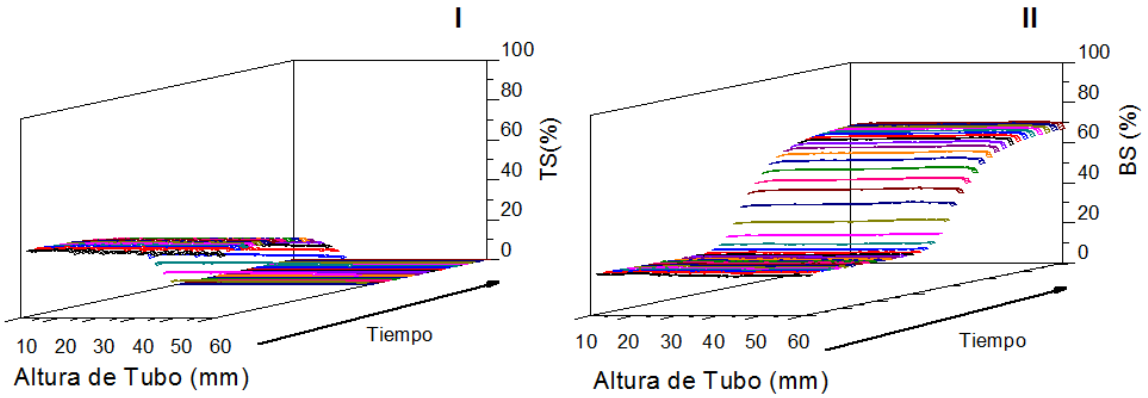

Figura 6.4. Intensidad de luz transmitida (I) y dispersada a 135º o Backscattering (II) de una muestra de NaCas al 5,0% p/p acidificada con simple cantidad de ácido (relación en peso proteína/ácido 5:1). La flecha indica la progresión temporal.

En la misma se pudo ver que los cambios en el tiempo son homogéneos en la región 10-60 mm del tubo. En la evolución de la señal medida se detecta una disminución de la luz transmitida y posteriormente un incremento de la intensidad de luz dispersada. Es por ello que para facilitar la lectura se analizará la intensidad promedio en función del tiempo. En la Figura 6.5 se grafica la intensidad promedio para suspensiones de caseinato al 5,0% p/p en agua (Figura 6.5 I) y en solución acuosa de 20% p/p de sacarosa (Figura 6.5 II). En la misma se refleja la tendencia que se mostró en el gráfico tridimensional de la Figura 6.4. En los primeros momentos, luego de agregar el ácido, la suspensión presentó una apariencia opalescente con una considerable intensidad de luz transmitida. A medida que la reacción de hidrólisis avanzó, la transmitancia (cuadrados) decreció y a partir de cierto punto la luz dispersada a 135º (en círculos) comenzó a aumentar hasta que llegó a algún máximo en el cual la curva se acercó asintóticamente a un valor o disminuyó ligeramente según los cambios estructurales macroscópicos de la muestra una vez gelificada.

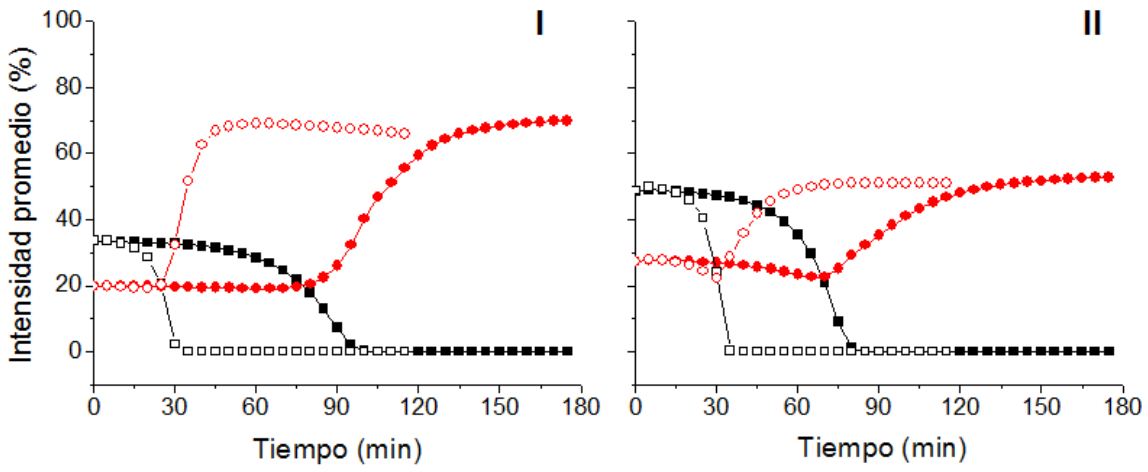

Figura 6.5. Intensidad de luz promedio transmitida (cuadrados) y dispersada, BS (círculos) con dos relaciones en peso de proteína y ácido orgánico (5:1 y 5:2), donde en símbolo lleno se encuentra graficada la concentración símple de ácido y con símbolos vacios la concentración doble de ácido. I- Suspensión de 5,0% p/p de NaCas en agua y II- suspensión de 5,0% p/p de NaCas en solución acuosa de 20% p/p de sacarosa.

En los primeros estadios previos a la gelificación, la disminución de la transmitancia se puede deber a cambios estructurales del NaCas que son afectados por la disminución del pH. Cuando se describió los principios físicos de la técnica, se expresó que la transmitancia sigue una ecuación del tipo Lambert-Beer (Ecuación 1.6) y tomando las siguientes hipótesis:

1- La absorbancia se la define como el log (T_0/T)

2- Los parámetros ópticos no varían apreciablemente con los cambios de pH y tamaño de partícula (hipótesis muy osada)

3- Los elementos dispersantes son esféricos de radio R.

Entonces la relación de radio medio "<R>" y la fracción de volumen efectiva "Φ_{eff}" en función del tiempo queda establecida por la simple aproximación:

$$\frac{< R(t) > \emptyset_{\mathrm{eff}}(\mathrm{t} = 0)}{< R(t = 0) > \emptyset_{\mathrm{eff}}(\mathrm{t})} = \frac{A(t = 0)}{A(t)} \qquad \text{Ecuación 6.2}$$

En la Figura 6.6 se grafica la A(t=0)/A(t) en función del tiempo para NaCas suspendido en agua y acidificado con SA y DA. Si bien las hipótesis enunciadas pueden resultar muy osadas, se puede obtener cierta información valiosa.

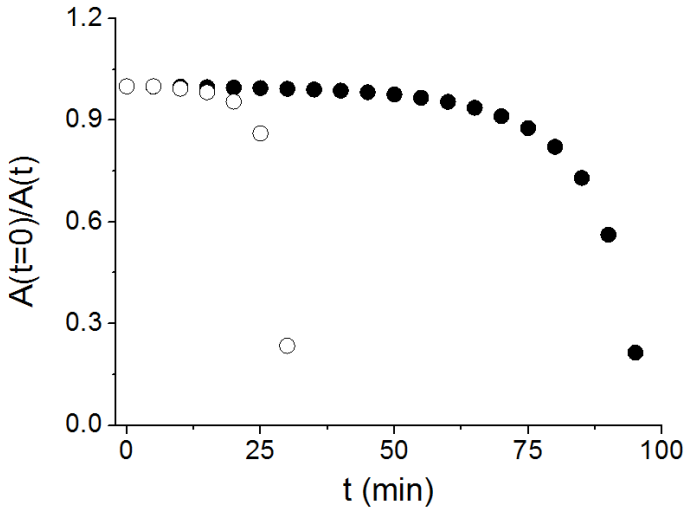

Figura 6.6. Inversa de la absorbancia en función del tiempo para una suspensión de caseinato de sodio en agua acidificado con SA (círculos llenos) y DA (círculos vacios).

Si la fracción de volumen efectiva se conservara constante (hipótesis adicional) a lo largo del experimento, el aumento en la absorbancia se debería a una pérdida en la agregación de las micelas de NaCas. Sin embargo, antes de gelificar el NaCas forma agregados que le confieren a la suspensión un aspecto blancuzco (aumento del radio) y al mismo tiempo se produce una disminución de

la intensidad de luz transmitida. La interpretación que se podría hacer es que la fracción de volumen efectiva no se puede considerar constante y la variación de este factor lleva a un aumento de la Absorbancia. El incremento en el BS puede no estar asociado a cambios en las partículas de caseina sino a cambios estructurales macroscópicos que ocurren al formarse el gel (el aumento significativo en el valor de BS coincidió con el momento previo en el que se observó un cambio de viscosidad en la muestra y ocurrió la gelificación). Como hay diversos factores que inciden en los valores de BS que se registran y dado que esta técnica aún no se ha empleado para describir el proceso de gelificación los resultados obtenidos a partir de análisis de dispersión de luz se compararon con una técnica habitualmente empleada para medir el tiempo de gelificación que es la reología.

6.3.1.2 Medidas realizadas empleando reología

Si bien las medidas realizadas empleando reología dinámica son mecánicamente perturbativas y podrían dar resultados no comparables con los que arrojan las técnicas descriptas en este trabajo de tesis, realizamos estas mediciones porque las mismas son ampliamente empleadas para analizar geles. En nuestros sistemas las hemos usado exclusivamente para determinar los tiempos de gelificación y trabajando siempre en el rango viscoelástico lineal. En la Figura 6.7 se muestran las curvas obtenidas para los módulos elástico y viscoso en función del tiempo.

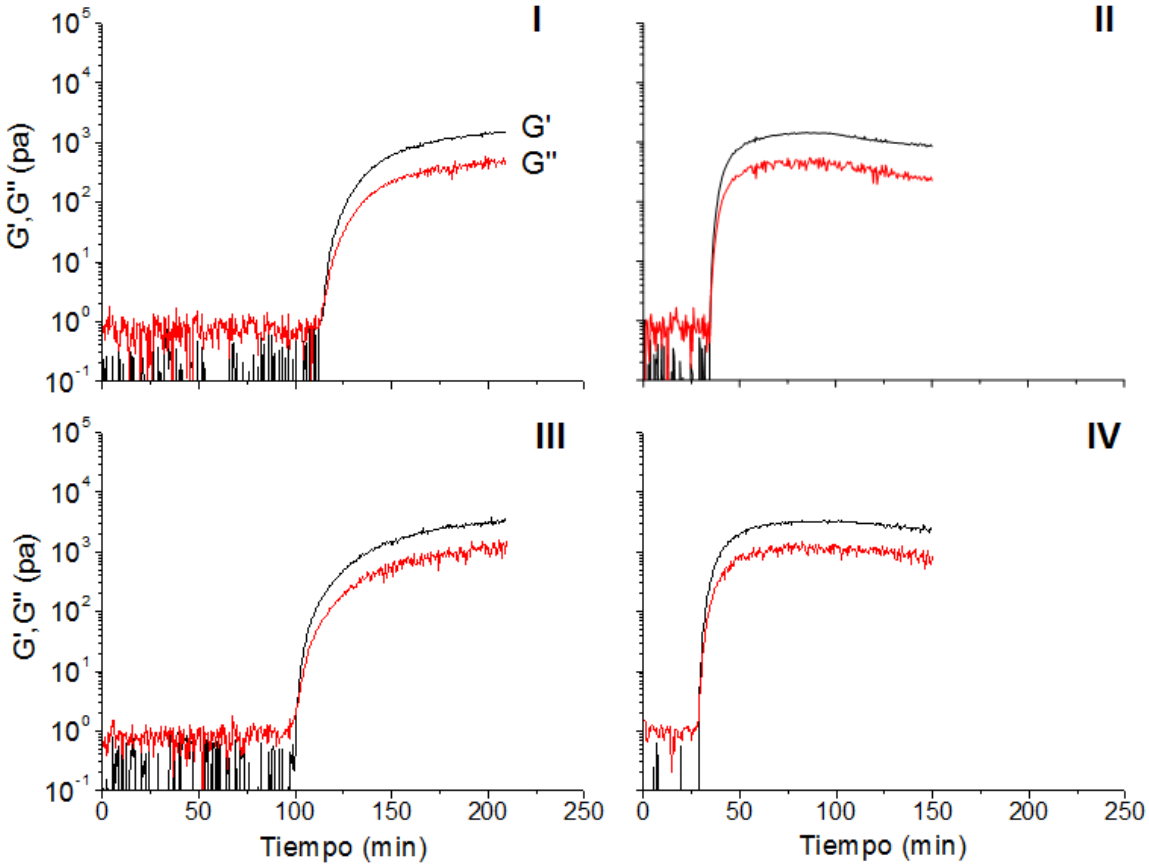

Figura 6.7. Módulo elástico (G') y módulo viscoso (G'') en función del tiempo para suspensiones de NaCas en agua (I y III) y en solución acuosa de sacarosa al 20% p/p (II y IV), gelificada con simple (I y II) y doble (III y IV) cantidad de ácido. En todos los casos G' es la curva inferior previamente al punto de gelificación y la superior con posterioridad al mismo.

En la Tabla 6.1 se exhiben los tiempos de gelificación obtenidos a partir del cruce en las curvas registradas durante las medidas reológicas (G'=G''). Es interesante destacar que con el agregado de sacarosa el tiempo de gelificación fue menor tanto en las muestras en las que se adicionó SA como en las que contenían DA.

Tabla 6.1. Tiempos de gelificación de suspensiones de 5,0% p/p de NaCas en dos medios acuosos diferentes. Los tiempos de gelificación se determinaron midiendo el tiempo en el que se cruzan las curvas obtenidas por reología (G'=G'').

suspensión 5,0% p/p NaCas	Tiempo de Gelificación (SA)	Tiempo de Gelificación (DA)
Agua	113 ± 3 min	35 ± 1 min
20% p/p sacarosa	100 ± 1 min	29,0 ± 0,5 min

6.3.1.3 Dispersión de rayos X a bajos ángulos

La geometría empleada para medir la dispersión de rayos X a bajos ángulos permitió seguir la progresión de la interacción entre las nanopartículas de caseína a lo largo del tiempo. En la Figura 6.8 se puede ver los cambios estructurales obtenidos para muestras de 5,0% p/p de NaCas. Para la proteína suspendida en agua y acidificada con SA (Figura 6.8 I) se puede ver que la primera curva posee un patrón similar al obtenido en el capítulo 4 (pH inicial). A medida que la hidrólisis tuvo lugar y que el sistema se fue acidificando homogéneamente, el pico de correlación que había sido interpretado como la correlación entre dos esferas rígidas (o sea un pico debido a la interacción entre proteínas) se corre hacia angulos menores, es decir las distancias promedio entre los centros de dos esferas son mayores. A partir de cierto punto el máximo local deja de observarse. Los elementos dispersores son tan grandes que la señal debería verse a q menores, es decir la misma está fuera del rango de medida que se logra con este arreglo experimental. Al emplear DA en la misma muestra (Figura 6.8 III) el efecto es similar solo que la velocidad a la que ocurre el corrimiento es mayor. Los mismos efectos se registraron en la solución de sacarosa 20% p/p para SA (Figura 6.8 II) y DA (Figura 6.8 IV). Un resultado importante a destacar es que la intensidad, a altos ángulos, decrece bajo una ley exponencial $I(q) \propto q^{-4}$ para

todas las curvas incluso después de gelificar. Este resultado indicó que el sistema coloidal se mantuvo compacto en el tiempo, es decir, que la diferencia de densidades electrónicas resultó estar definida. Si en cambio la proteína se entrelazara para formar un sistema del tipo polimérico, la intensidad a ángulos grandes tendría que decaer según $I(q) \propto q^{-2}$ o similar [Kirste & Oberthür 1982].

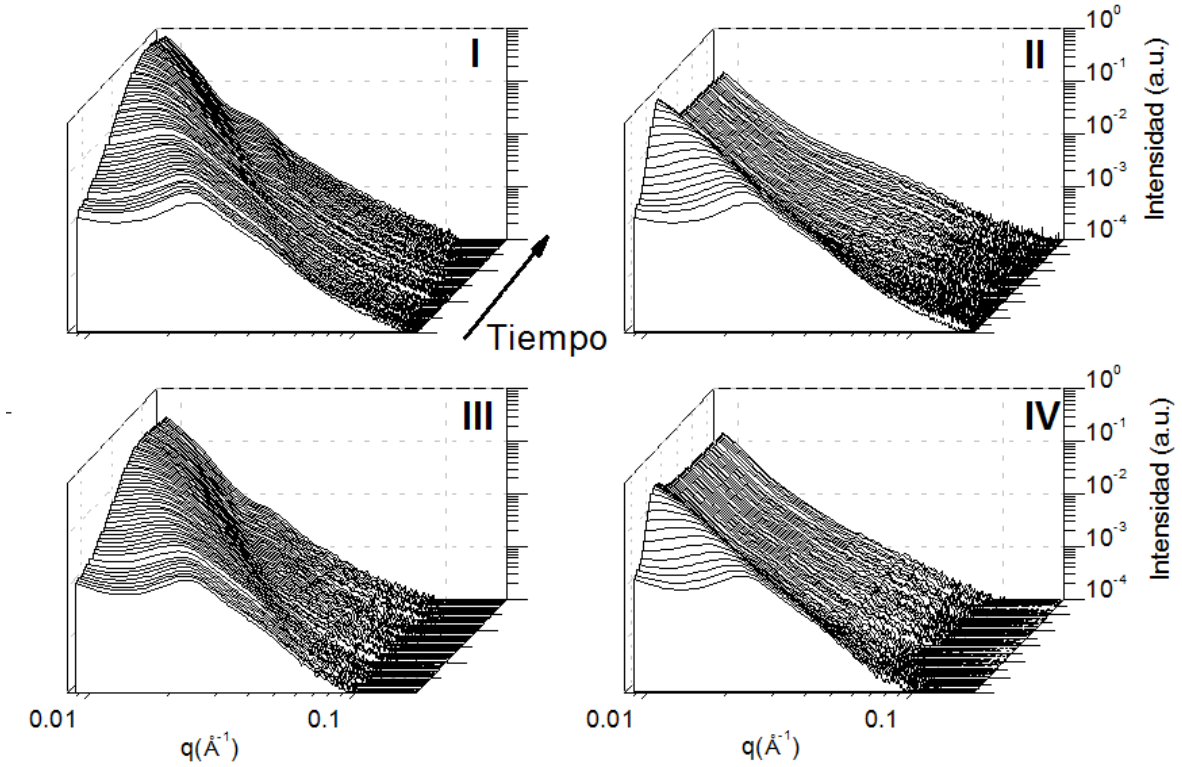

Figura 6.8. Diagramas de dispersión de rayos X en función del tiempo para muestras de NaCas 5,0% p/p en agua (I y III) y suspendido en una solución 20% p/p de sacarosa (II y IV) luego de agregar simple cantidad de ácido (I y II) y doble cantidad de ácido (III y IV). Se muestra en todos los casos los primeros sesenta minutos de reacción.

Para evaluar los cambios estructurales en los primeros minutos luego de la gelificación se ajustaron las curvas al modelo propuesto en el capítulo 4 (sección 4.2.6.2) donde se tomó S_{agg}=1. La función de estructura fractal se había propuesto

para interpretar las curvas a bajos ángulos, cuando se varió el pH la curva de correlación entre esferas se corrió para ángulos menores y dejó de ser evidente la contribución del agregado supramolecular a la curva de SAXS (en la geometría de trabajo). En la Figura 6.9 I se muestran tres curvas experimentales (los datos se indican con símbolos) que corresponden a la acidificación controlada de una suspensión de 5,0% p/p de NaCas. En la misma se incluyeron dispersogramas tomados a tres tiempos diferentes una vez comenzada la reacción de hidrólisis del ácido GDL. Como ya se explicó se despreció la contribución a bajos ángulos y por ello la función fue ajustada a partir del primer mínimo, lo que permitió muy buenos ajustes. En la Figura 6.9 II se grafica el factor de estructura de esferas rígidas para las mismas muestras. El máximo absoluto se desplaza a ángulos menores a medida que pasa el tiempo, indicando que la distancia de correlación entre partículas de caseína es mayor. Es decir, existe una agregación en los primeros tiempos.

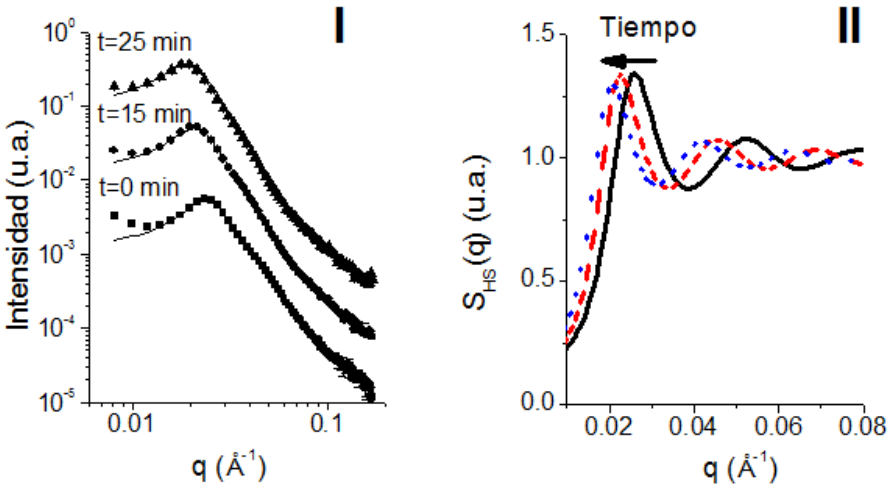

Figura 6.9. I. Diagrama de dispersión de rayos X a bajos ángulos para una suspensión 5,0% p/p de NaCas a tres tiempos distintos tomados con posterioridad a la inclusión del ácido. En línea continua se encuentra el modelo e indicados con símbolos, los datos experimentales. El ajuste se realizó a partir del primer mínimo local. II. Factor de estructura de esferas rígidas para los tres tiempos mostrados. En continuo el tiempo inicial, en línea entrecortada t=15 min y en punteado t=25 min.

Debido a que el radio de esferas rígidas que determina la distancia de correlación "R_{HS}" y el radio interno "R_{in}" que describe a la submicela de caseína poseen una alta correlación (es decir que varias relaciones R_{HS}/R_{in} pueden dar la misma bondad de ajuste por mínimos cuadrados), se estableció de manera arbitraria que "$R_{HS}=3R_{in}$". Es por ello que se registraron los cambios en el R_{in} en función del tiempo (antes de que se pierda el pico de correlación). En la Figura 6.10 se grafica la dependencia temporal del parámetro de ajuste R_{in}. En la misma se puede apreciar que la velocidad en la que aumenta su valor es considerablemente mayor para muestras acidificadas con doble cantidad de ácido (símbolos vacios) que de simple cantidad de ácido (símbolos llenos). No se vieron diferencias significativas por el agregado de azúcar.

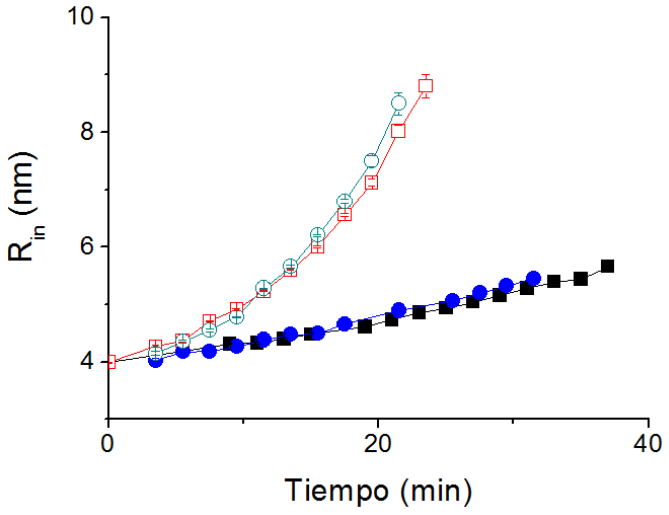

Figura 6.10. Variación del R_{in} en función del tiempo para suspensiones de NaCas en agua (cuadrados) y en solución de sacarosa 20% p/p (círculos) luego de acidificar con simple cantidad de ácido (símbolos llenos) y con doble cantidad de ácido (símbolos vacios).

También se ajustó la fracción de volumen efectiva del factor de estructura y la polidispersidad reflejada en la varianza de la distribución en número de Schulz-Zimm “σ”. En la Figura 6.11 se muestra la varianza normalizada por el valor medio del radio interno “$\sigma/\langle R_{in}\rangle$” y la fracción de volumen efectiva del factor de estructura en función del tiempo para la acidificación homogénea con GDL de emulsiones de NaCas, tanto con simple como doble cantidad de ácido.

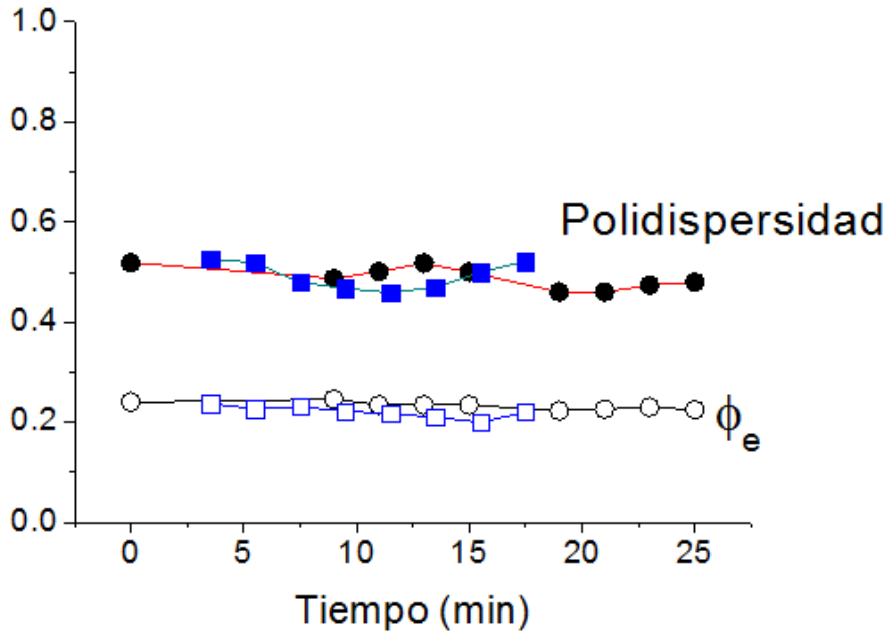

Figura 6.11. Acidificación homogénea de caseinato de sodio en agua con simple (círculos) y doble (cuadrados) cantidad de ácido. La fracción de volumen efectiva se muestra en símbolos vacios y la polidispersidad en símbolos llenos.

Como se observa en la Figura 6.11 en todos los casos la polidispersidad relativa se conserva alrededor del 50% tanto para SA como para DA. Mientras que la fracción de volumen efectiva, correspondiente al factor de forma, oscila alrededor de 0.23. Este efecto se ha registrado también en las soluciones de

sacarosa, donde la fracción de volumen se mantuvo alrededor de 0.20, debido a que se encuentra con un menor número de agregación como se discutió en el capítulo 4. Mientras que la polidispersidad osciló alrededor del 50% para todas las experiencias (incluido emulsiones), el tamaño del agregado varió según el entorno. El parámetro que tuvo mayor variación fue el que determina el pico de correlación y por eso es el único que se ha discutido.

6.3.2 Gelificación de emulsiones de caseinato de sodio

Luego de estudiar la gelificación del NaCas en disoluciones se procedió a describir sistemas más complejos de interés de esta tesis como son las emulsiones.

6.3.2.1 Medidas realizadas empleando reología

El análisis de los tiempos de gelificación (t_{gel}) se realizó determinando el punto donde se cruzan las curvas de los módulos elástico y viscoso (G'=G''). La emulsión con 5,0% p/p de NaCas, sin otros aditivos y gelificada con simple cantidad de ácido dio un t_{gel} de 90 ± 5 minutos. Estos tiempos bajaron paulatinamente a medida que se aumentó la concentración de sacarosa (símbolos vacios en Figura 6.12). Para estos estudios se decidió dejar la relación proteína/ácido fija. Como la relación proteína/ácido es en peso, la molalidad del ácido aumenta al aumentar la concentración de caseinato y esto podría resultar en pequeñas variaciones de la velocidad de gelificación. Por eso se eligió una

concentración de proteína constante (5% p/p). El mismo efecto de la sacarosa sobre los tiempos de gelificación se observó cuando se agregó doble cantidad de ácido (símbolos llenos en Figura 6.12) con una diferencia aproximada de 60 minutos entre las t_{gel} de ambos experimentos (tres veces más rápido para doble cantidad de ácido).

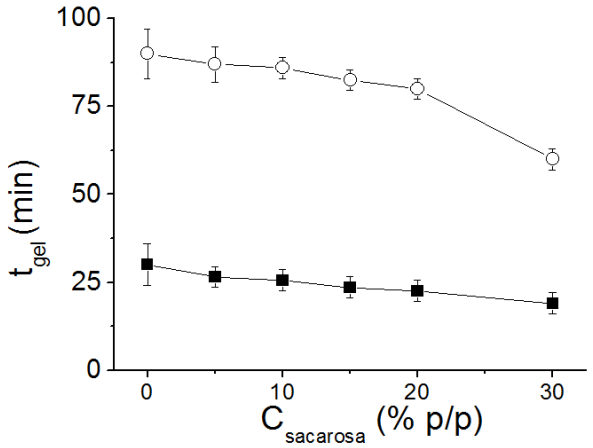

Figura 6.12. Tiempos de gelificacion (t_{gel}) para emulsiones estabilizadas con 5,0% p/p de NaCas y concentraciones crecientes de sacararosa, acidificadas con simple (símbolos vacios) y doble (símbolos llenos) cantidad de ácido.

La disminución en los tiempos de gelificación pudo haber estado determinada por la suma de dos factores: por un lado por el incremento de la concentración de azúcar; por otro lado, por la agregación que sufre la proteína en presencia del azúcar. Ya hemos analizado en la sección 1 que el NaCas se encuentra parcialmente agregado a pH cercano a 7 cuando se adiciona sacarosa. Para analizar la gelificación en ausencia del efecto de agregación se modificó la concentración de NaCas a una concentración fija de sacarosa de 20% p/p. Los tiempos de gelificación disminuyeron al aumentar la concentración de proteína

(Figura 6.13). Como era esperable, el entramado cohesivo o gel se formó más fácilmente con el aumento de la concentración de proteína.

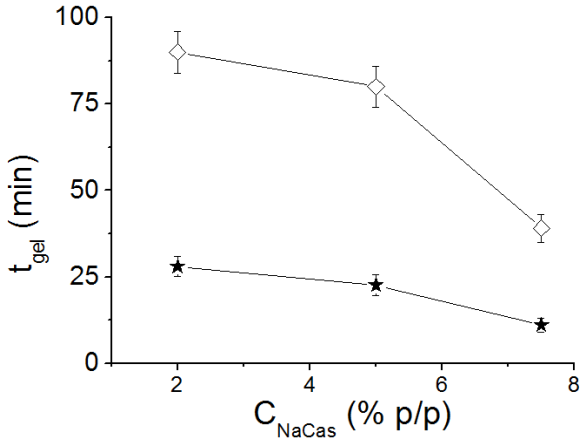

Figura 6.13 Tiempos de gelificacion (t_{gel}) para emulsiones formuladas con 20% p/p de sacarosa y concentraciones crecientes de NaCas cuando la acidificación se realizó con simple (símbolos vacios) y doble (símbolos llenos) cantidad de ácido.

Por otro lado el valor del módulo elástico del gel a tiempos largos, valor al cual converge asintóticamente durante su evolución da una noción de la dureza del mismo una vez que no sufre cambios estructurales grandes. En la Figura 6.14 se graficó el valor de G' a tiempos largos en función de la composición del gel y de la cantidad de ácido. Tanto para la relación proteína/ácido 5:1 como para la 5:2 las tendencias de G' a tiempos largos resultaron similares lo cual indica que las características mecánicas del gel formado no dependen de la velocidad de gelificación (al menos en el orden de tiempo ensayado). En geles formulados con 5,0% p/p de NaCas el módulo elástico crece monótonamente con la concentración de sacarosa (Figura 6.14 I). La dependencia es más marcada cuando el parámetro

que se varía es la concentración de proteína (Figura 6.14 II), lo cual es lógico debido a que la estructura final está generada por las submicelas de caseína.

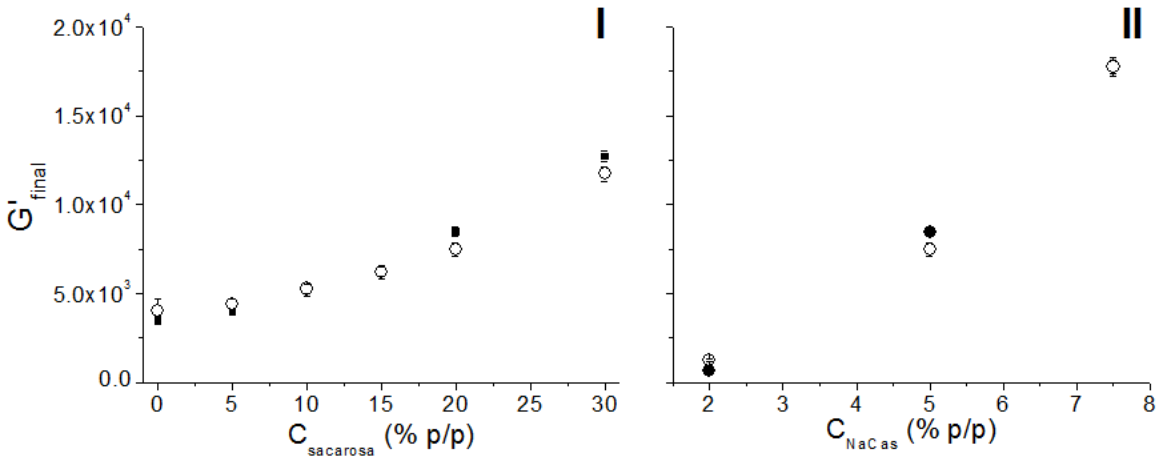

Figura 6.14. Módulo elástico G' a tiempo infinito para procesos de gelificación con simple cantidad de ácido, relación proteína/ácido 5:1 (círculos vacios) y doble cantidad de ácido, relación proteína/ácido 5:2 (círculos llenos) para emulsiones formuladas con 5,0% p/p de NaCas y concentraciones crecientes de sacarosa (I) y para emulsiones con 20% p/p de sacarosa y cantidades variables de NaCas (II).

6.3.2.2 Microestructura de los geles sintetizados

Una vez sintetizados los geles se analizó la microestructura de las emulsiones por tinción de la fase oleosa y empleando la técnica de microscopia confocal de barrido laser. En la Figura 6.15 se muestra como cambia la microestructura con la concentración de sacarosa expresada en peso para emulsiones formuladas con 5,0% p/p de NaCas y 10% de aceite de girasol. En la misma se puede observar que al incrementar la concentración del disacárido se favorece la coalescencia de glóbulos grasos.

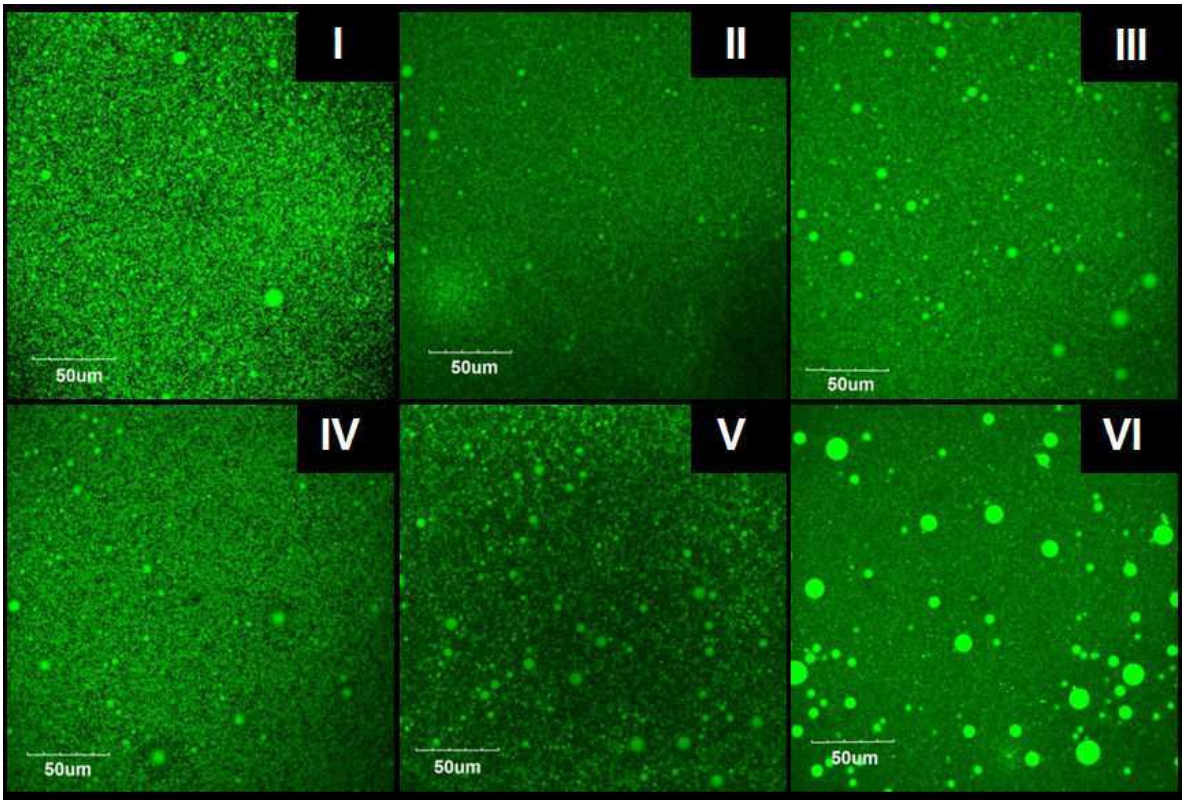

Figura 6.15. Imágenes de miscroscopía confocal de barrido laser para emulsiones formuladas con 5,0% p/p de NaCas y 10% de aceite de girasol tomadas luego de completarse la gelificación del NaCas empleando simple cantidad de ácido en diferentes concentraciones de sacarosa. I: 0%, II: 5%, III: 10%, IV: 15%, V: 20% y VI: 30%.

El efecto fue más marcado al aumentar la cantidad de ácido al doble (relación en peso de proteína/ácido 5:2, Figura 6.16), donde incluso a concentraciones relativamente bajas de azúcar se observó un incremento en la formación de gotas grandes que rondan los 5 a 30 μm. Hay que remarcar que las mediciones se realizaron 4 horas después de finalizada la síntesis y acidificación. En este tiempo las emulsiones finas han demostrado ser muy estables (en especial frente a coalescencia) (discusión en la sección 4.4). Esto significa que en los sistemas estudiados la coalescencia ocurrió durante el proceso de acidificación y formación del gel.

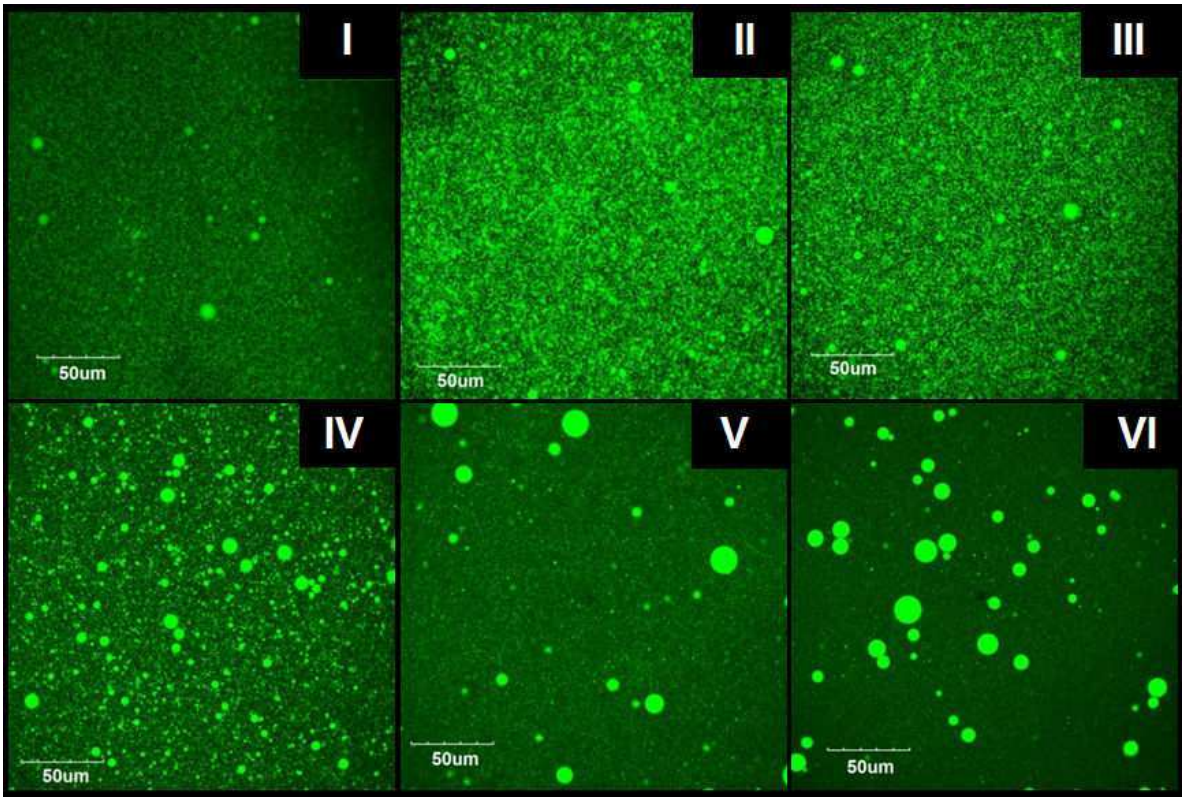

Figura 6.16. Imágenes de miscroscopía confocal de barrido láser para emulsiones de 5,0% p/p de NaCas y 10% de aceite de girasol tomadas con posterioridad a la gelificación del NaCas empleando una relación de proteína/ácido 5:2 en diferentes concentraciones de sacarosa. I: 0%, II: 5%, III: 10%, IV: 15%, V: 20% y VI:30%.

Las emulsiones formuladas con 20% p/p de sacarosa y estabilizadas con concentraciones variables de NaCas manifestaron un comportamiento similar al observado cuando se incrementó el azúcar. En la Figura 6.17 se muestran tres imágenes de LSCM para emulsiones de 2,0, 5,0 y 7,5% p/p de NaCas formuladas con 20% de sacarosa y gelificadas con relación proteína/ácido 5:1. En la misma se observa que la coalescencia es más evidente a altas concentraciones de NaCas.

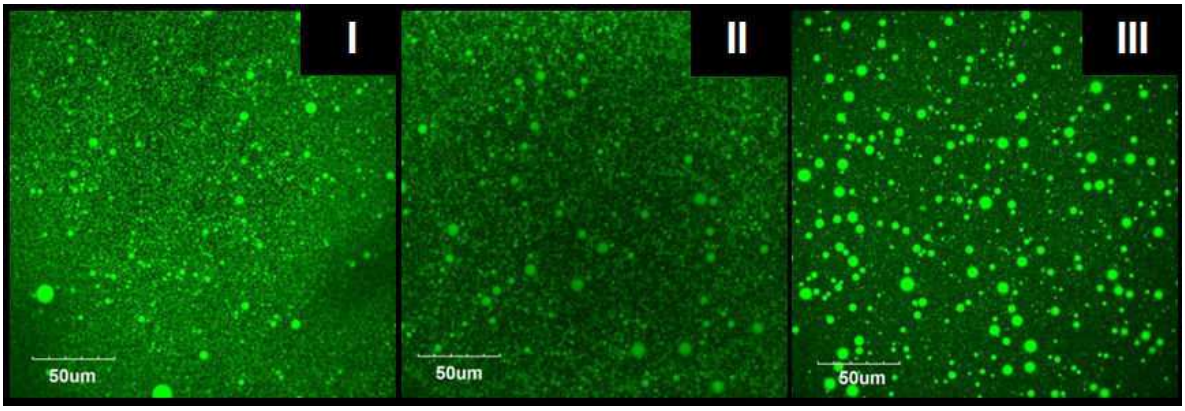

Figura 6.17. Imágenes de miscroscopía confocal de barrido láser para emulsiones formuladas con 20% p/p de sacarosa y 10% de aceite de girasol tomadas con posterioridad a la gelificación del NaCas empleando una relación proteína/ácido 5:1 en concentración variable de NaCas. I: 2%, II: 5% y III: 7,5%.

Al disminuir la relación en peso proteína/ácido (5:2, Figura 6.18) se observaron gotas de diámetros mayores aunque en menor cantidad. Si bien no se ha realizado un estudio estadístico exhaustivo, los cambios cualitativos son evidentes.

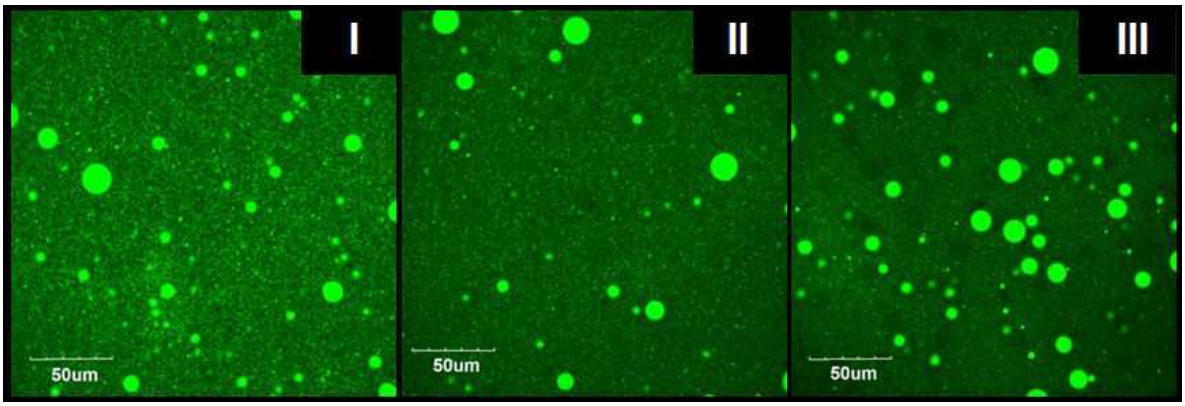

Figura 6.18. Imágenes de miscroscopía confocal de barrido láser para emulsiones formuladas con 20% p/p de sacarosa y 10% de aceite de girasol tomadas con posterioridad a la gelificación del NaCas empleando una relación proteína/ácido 5:2 en concentraciones variables de NaCas. I: 2%, II: 5% y III: 7,5%.

6.3.2.3 Sinéresis

Al estudiar la microestructura de la fase oleosa se evidenció que existió mayor tendencia a la coalescencia durante el proceso emulsión-gel cuando se formularon las emulsiones con altas concentraciones de disacárido que cuando se emplearon bajas concentraciones. Si se pesa el agua (o solución acuosa) que exuda el gel una hora después de formado en una caja de Petri de similar tamaño se puede estudiar la sinéresis de los geles. En la Figura 6.19 está expresada la proporción de solución acuosa que el gel exuda una vez formado. En geles sin azúcar la pérdida de agua es alta y visualmente se pudieron observar grietas rodeadas de gotas de agua. Al aumentar la concentración de azúcar la sinéresis es menor. Hay que remarcar que la cantidad de fase continua perdida depende de la superficie expuesta. Es por ello que se midieron todos los geles en cajas de Petri similares; las mismas poseían un diámetro de unos 5 cm con una superficie grande en relación a la masa colocada (5,0 gramos aproximadamente).

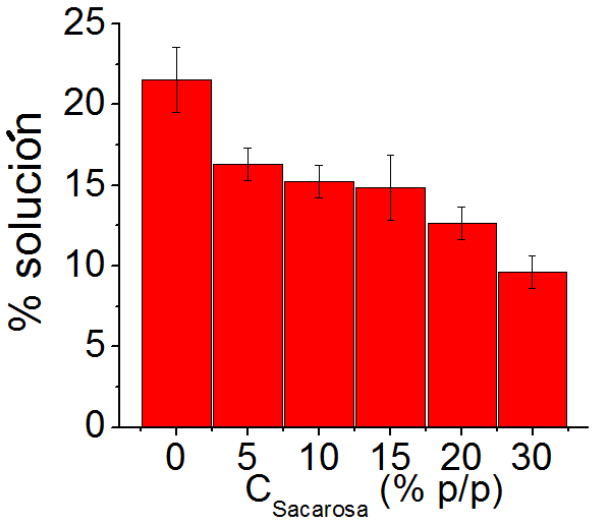

Figura 6.19. Porcentaje de solución acuosa perdida una hora después de ocurrir la gelificación en función de la cantidad de sacarosa agregada para emulsiones formuladas con 5% p/p de NaCas y simple relación ácido.

Cuando se analizó el porcentaje de solución perdida en geles preparados con diferente proporción de NaCas y 20% p/p de sacarosa se obtuvo un valor similar y comparable en las tres muestras (Figura 6.20), indicando que la sinéresis está determinada mayormente por la concentración de sacarosa que es una molécula higroscópica. Estos sistemas se prepararon con una misma proporción de aceite. Como se explicó en la sección 1.2.1 Materiales, en todos los casos la proporción fue 10%.

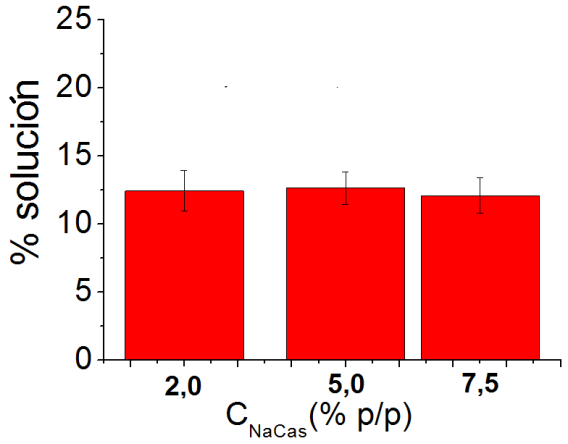

Figura 6.20. Porcentaje de solución acuosa perdida una hora después de que ocurrió la gelificación en función de la cantidad de NaCas para emulsiones con 20% p/p de sacarosa en la fase acuosa y simple relación de ácido.

6.3.2.4 Tiempo de relajación T_2 (NMR)

En la Figura 6.21 se muestra a modo de ejemplo tres curvas de relajación experimentales (Figura 6.21 I) obtenidas durante la acidificación para una emulsión sin azúcar y con 5,0% de NaCas cuando la relación proteína/ácido fue 5:2. En la Figura 6.21 II se muestra el resultado del análisis realizado con un software del equipo. Con la resolución del algoritmo todas las curvas continuas parecen tener un solo máximo. A tiempo inicial (curva continua gruesa) la

distribución es estrecha y simétrica. Cuando se va acidificando el sistema, la curva se desplaza a valores menores de T_2 pudiéndose interpretar este cambio como una disminución en la movilidad molecular del agua. Al gelificar la distribución resulta ancha y asimétrica (línea entrecortada). Es probable que haya más de una distribución cercana pero que no se resuelve con el algoritmo. Una hora después de ocurrir la gelificación (línea continua delgada) la distribución resultó más estrecha.

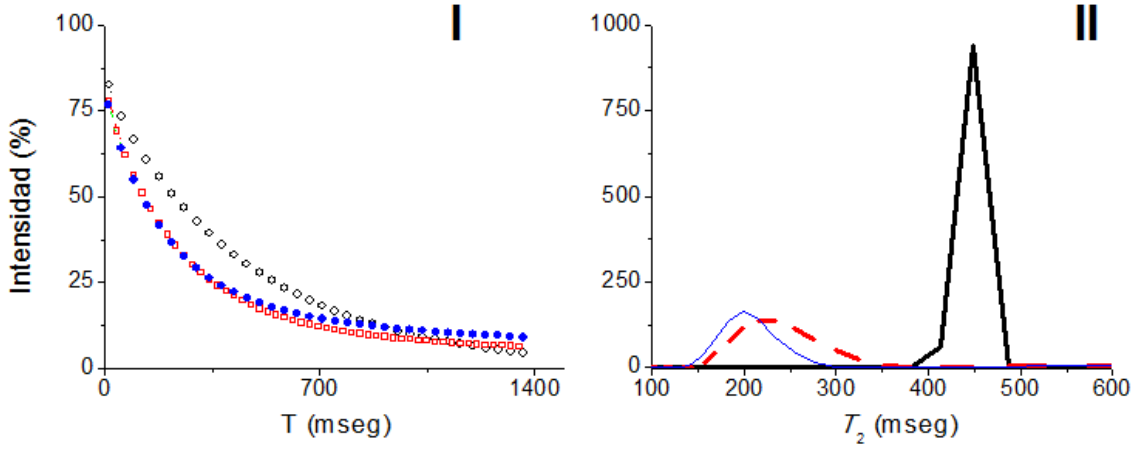

Figura 6.21. I. Relajación experimental de una emulsión sin azúcar y con 5,0% p/p de NaCas a tiempo inicial (rombos vacios), al gelificar (cuadrados vacios) y una hora después de ocurrir la gelificación (rombos llenos). II. Distribución de tiempos de relajación calculados para el tiempo inicial (línea continua gruesa), al gelificar (línea entrecortada) y una hora después de ocurrir la gelificación (línea continua delgada).

Bajo la resolución del algoritmo empleado y debido a que todas las curvas presentaron una sola distribución se optó por ajustar las curvas experimentales por una exponencial simple (Ecuación 6.1) y observar la variación de la posición del pico graficado en las curvas de distribución en función del tiempo. En la Figura 6.22 se graficó el resultado del ajuste monoexponencial. El ajuste resultó muy bueno (los errores del ajuste fueron tan pequeños que resultaron menores que el

tamaño del símbolo). En todos los casos al aumentar la concentración de sacarosa la movilidad molecular disminuye, indicando un descenso del tiempo de relajación promedio. Por otro lado cabe señalar que las curvas no se cortaron en ningún punto (Figura 6.22 I y Figura 6.22 III). El mismo resultado se obtuvo al aumentar la concentración de NaCas a una concentración de sacarosa fija de 20% p/p (Figura 6.22 II y IV). Tanto la variación de T_2 con la concentración de sacarosa como la variación de este tiempo con la concentración de NaCas se comportan de manera similar al módulo elástico (Figura 6.14) evaluado por medidas reológicas. Las muestras con mayores concentraciones de sacarosa y/o de NaCas presentan mayor rigidez lo que coincide con una menor movilidad molecular.

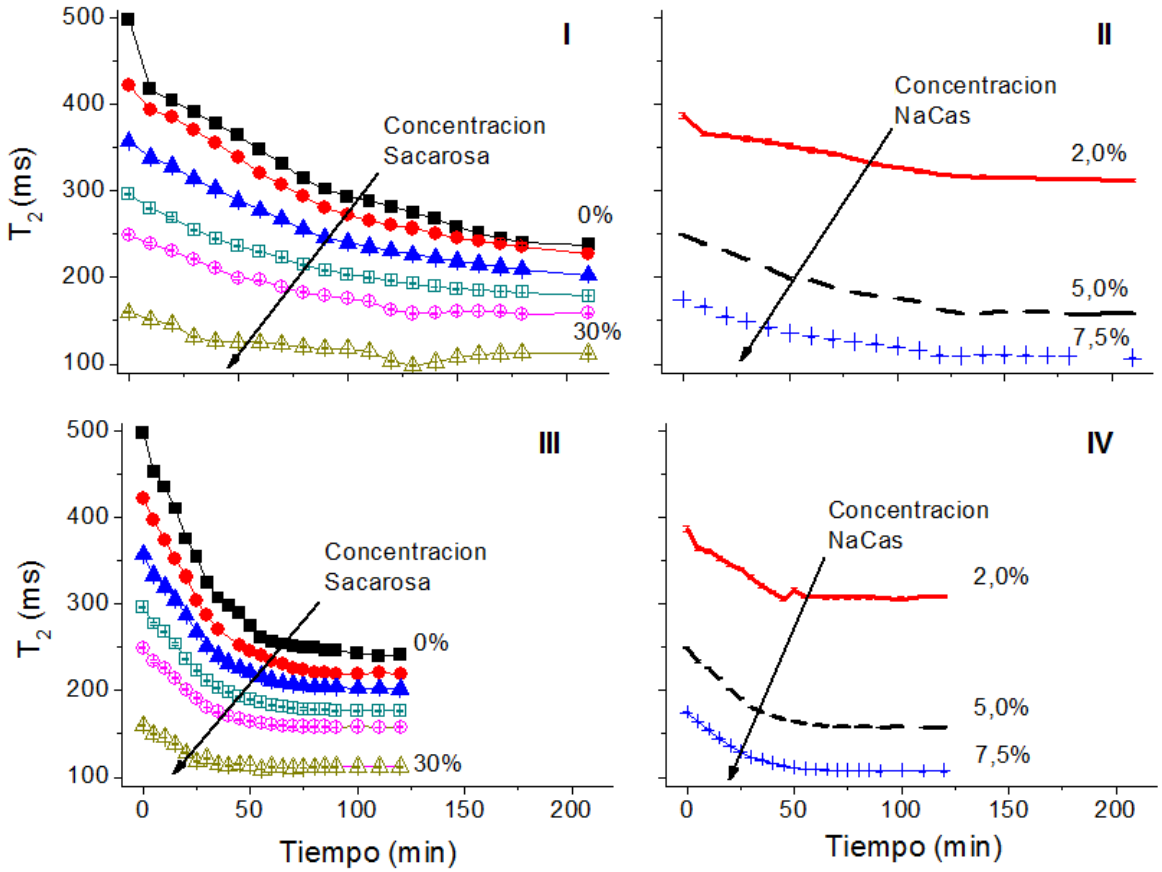

Figura 6.22. Tiempos de relajación T_2 (calculados empleando un ajuste monoexponencial) en función del tiempo. La barra de error por el ajuste se encuentra oculta por el símbolo y/o línea debido a que el mismo resultó muy bueno para todas las curvas. I y III. Emulsiones con 5,0% p/p de NaCas a concentraciones crecientes (en dirección de la flecha) de sacarosa (0, 5, 10, 15, 20 y 30% p/p) acidificadas con simple (I) y doble (III) cantidad de ácido. II y IV. Emulsiones formuladas con 20% p/p de sacarosa y concentraciones crecientes (en sentido de la flecha) de NaCas (2,0, 5,0 y 7,5% p/p) para simple (II) y doble (IV) cantidad de ácido. Simple: relación proteína/ácido 5:1 y doble: relación proteína/ácido 5:2.

Los tiempos de relajación decrecen asintóticamente a un valor final. Los cambios más abruptos se encontraron por debajo del tiempo de gelificación. A cantidad simple de ácido (Figura 6.22 I y II) los cambios son más suaves que cuando se trata de doble concentración de ácido (Figura 6.22 III y IV). Como se observa en la Figura 6.22 III y en la Figura 6.22 IV el cambio de régimen condice

con las variaciones mostradas en los tiempos de relajación calculados por medidas de reología.

6.3.2.5 Dispersión estática de luz y gelificación de emulsiones

Cuando se estudió la dispersión de luz con una fuente monocromática de longitud de onda 850 nm empleando el analizador vertical Turbiscan en suspensiones de NaCas en agua y/o solución azucarada se verificó un decaimiento exponencial de la transmitancia con un posterior incremento de la luz dispersada a 135º que coincidió, además, con el tiempo de gelificación (en orden de magnitud al menos). Cuando se analizaron las emulsiones, la transmitancia no fue un parámetro útil porque el sistema resultó opaco al paso óptico empleado. Sin embargo, a partir de cierto momento la intensidad de luz dispersada o *backscattering* comenzó a aumentar significativamente en todos los procesos de gelificación. En la Figura 6.23 se muestra la evolución temporal del BS para dos emulsiones. La Figura 6.23 I corresponde al perfil que se suele obtener en emulsiones de NaCas y azúcar al acidificar con GDL. En particular este perfil fue el resultado de acidificar una emulsión de 5,0% p/p de NaCas con 20% p/p de sacarosa. Un hecho interesante, es que en algunos geles se puede ver un perfil discontinuo una vez que se forma el gel, como es el caso de la Figura 6.23 II (emulsión sin azúcar agregado). Estas disrupciones aparecieron cuando los geles fueron muy frágiles. Cuando se sintetizaron geles sin azucares, la sinéresis fue tan alta que el material resultante presentó grietas cuya formación pudo ser registrada con el Tubiscan.

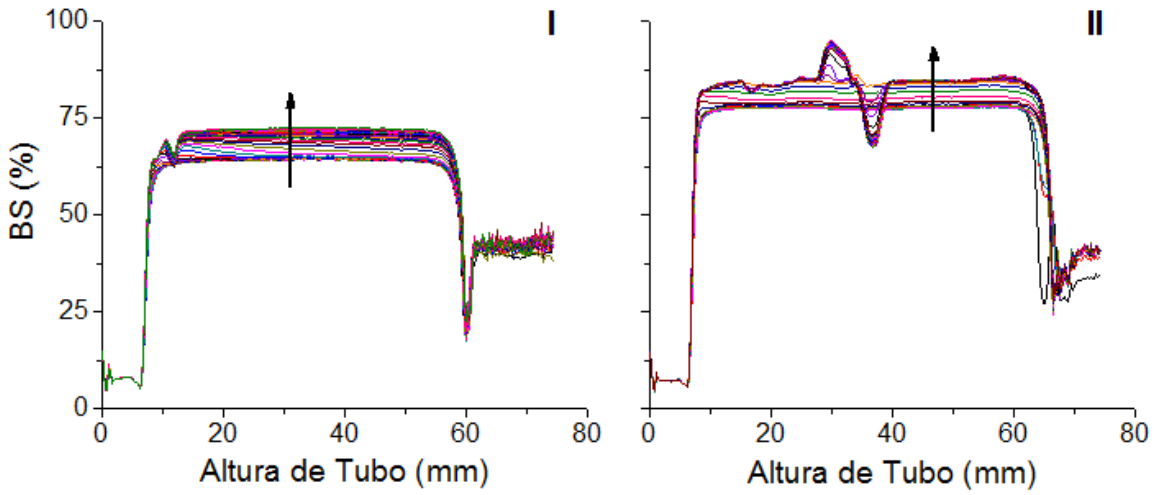

Figura 6.23. Intensidad de luz dispersada en función de la altura del tubo para una emulsión fina de 5,0% p/p de NaCas luego de agregar simple concentración de ácido. La flecha indica el transcurso del tiempo. I. con 20% p/p de sacarosa. II. Sin azucares agregados.

Tomando valores medios en las zonas homogéneas (generalmente en alturas de tubo entre 30-50 mm) se puede comparar la evolución temporal del *backscattering* entre las diferentes muestras. En la Figura 6.24 se graficó la dependencia del valor medio de la radiación dispersada “<BS>” en función del tiempo para emulsiones de 5,0% de NaCas y concentraciones variables de sacarosa. Cuando se acidificó con simple concentración de ácido (Figura 6.24) se pudo observar que a tiempos menores a los 50 minutos los cambios ópticos fueron más apreciables en aquellas emulsiones que contenían mayores concentraciones de disacárido (esto puede atribuirse a las propiedades ópticas de cada solución). A partir de tiempos cercanos a los 60 minutos todas las curvas comienzan a crecer asintóticamente hasta un valor medio final. El mismo perfil se observó, a diferencia de los tiempos en los cuales ocurre el proceso, para muestras acidificadas con doble concentración de ácido (proteína/ácido 5:2), (Figura 6.24 II).

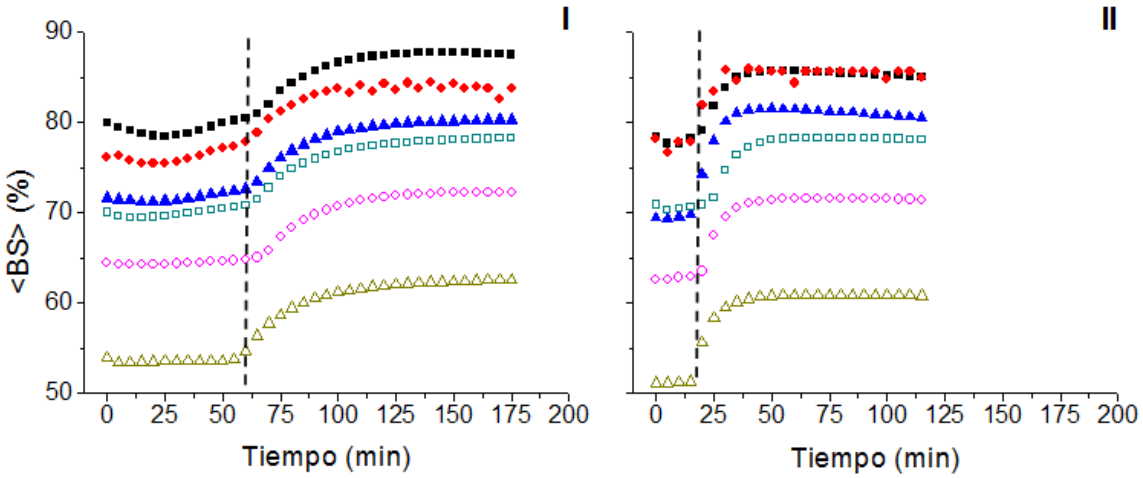

Figura 6.24. Intensidad de luz monocromática (λ= 850 nm) dispersada promedio a 135º en función del tiempo para emulsiones de 5,0% de NaCas y proporciones en peso crecientes de sacarosa: 0% (cuadrados llenos), 5% (rombos llenos), 10% (triangulos llenos), 15% (cuadrados vacios), 20%(rombos vacios) y 30% (triangulos vacios). La línea punteada muestra el tiempo aproximado donde la funcionalidad de la curva se asemeja en todas las curvas. I. Acidificada con simple concentración de ácido. II. Acidificada con doble concentración de ácido.

Cuando se analizaron las curvas pertenecientes al subgrupo de muestras a las que se le varió la concentración de NaCas (Figura 6.25) se encontró que las curvas correspondientes a las emulsiones que contenían 2,0 y 5,0% de NaCas comenzaron a crecer a tiempos similares tanto a concentración simple (Figura 6.25 I) como doble (Figura 6.25 II) de ácido. Los valores medios para la emulsión con 7,5% p/p de NaCas comenzaron a crecer antes que para las otras dos concentraciones. El crecimiento de las curvas comienza en estadíos previos a la gelificación y llega a la asíntota final una vez que ha gelificado. Estas variaciones están asociadas a los cambios estructurales de la proteína. Generalmente los diversos mecanismos de desestabilización de las emulsiones muestran una depleción en la intensidad de luz dispersada como se indicó en materiales y métodos generales (página 52). Este proceso mostró un crecimiento marcado del BS homogéneamente en todo el tubo lo que se puede desacoplar fácilmente de

los cambios ocurridos por desestabilización por cremado o floculación. Asi se suma un indicador de cambio estructural más que hasta ahora no había sido descripto en bibliografía.

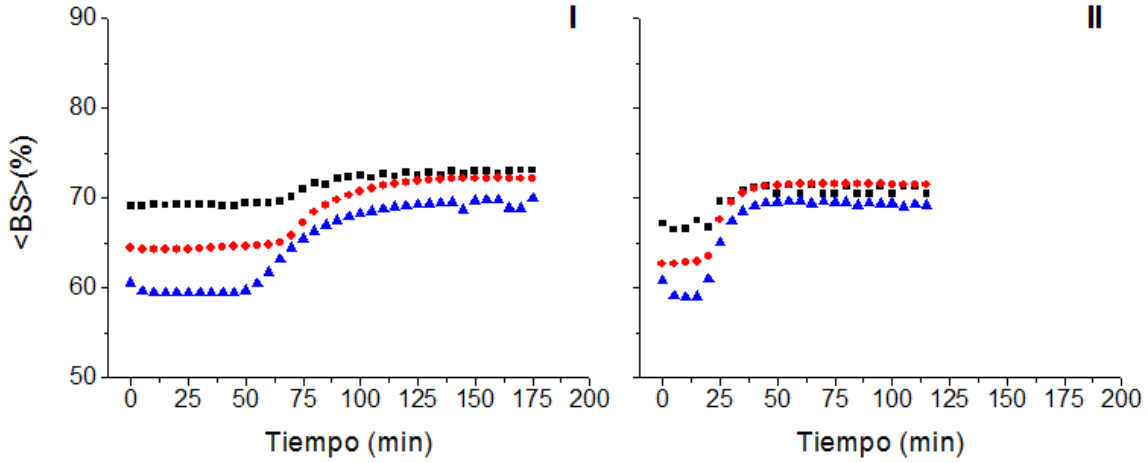

Figura 6.25. Intensidad de luz monocromática (λ = 850 nm) dispersada promedio a 135º en función del tiempo para emulsiones con 20% p/p de sacarosa y proporciones en peso crecientes de NaCas: 2,0% (cuadrados llenos), 5,0% (rombos llenos), 7,5% (triángulos llenos) I. Acidificada con simple concentración de ácido. II. Acidificada con doble concentración de ácido.

6.3.2.6 Dispersión de rayos X a bajos ángulos

Cuando se analizaron los dispersogramas obtenidos mediante la técnica de SAXS para emulsiones acidificadas con GDL en función del tiempo se han encontrado resultados similares a los obtenidos para caseína suspendida en solución acuosa (sin aceite dispersado). Como se ha discutido en el capítulo 4, el intervalo de trabajo permite vislumbrar la estructura en la nanoescala, es decir las nanopartículas de caseína. En la Figura 6.26 muestra la evolución temporal para emulsiones de 5,0% p/p de NaCas en proporciones crecientes de sacarosa y acidificado con simple cantidad de ácido. Es preciso observar que, sin azúcar

agregada, existe un pico de correlación (Figura 6.26 I), que está atenuado respecto a las muestras sin aceite, pero que empieza a ser menos intenso a medida que se aumenta la concentración de disacárido. Cuando se llega a concentraciones de 20 (Figura 6.26 V) y 30% p/p (Figura 6.26 VI) de sacarosa la correlación desaparece. Este resultado es acorde con lo que se concluyó en el capítulo 4, donde el azúcar en presencia de aceite propensa a bajar el número de agregación del arreglo supramolecular de submicelas de caseína a pH neutro (inicial en este caso). Es preciso recordar que estas emulsiones son EF, por lo cual el área expuesta por los glóbulos grasos es muy grande.

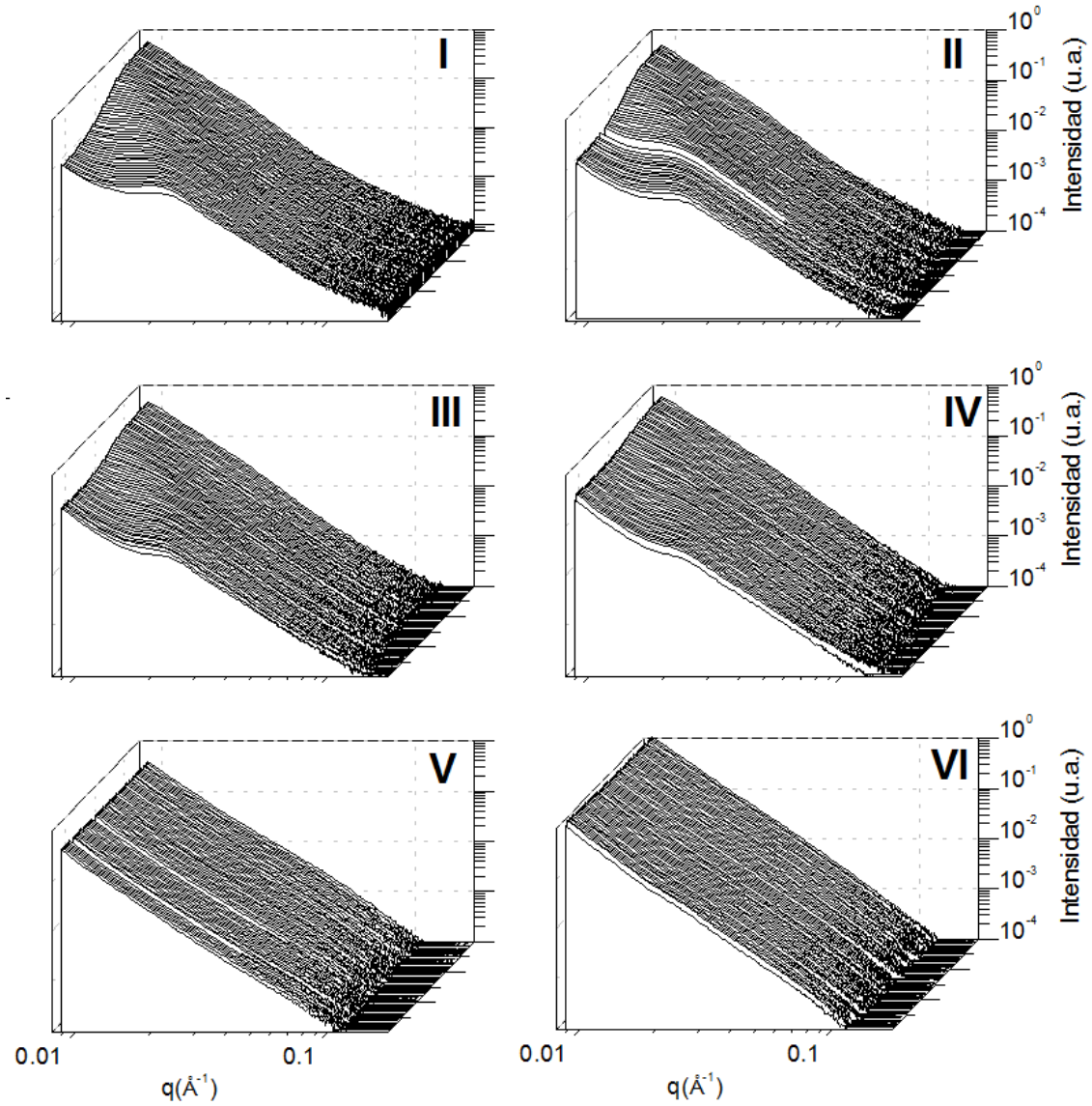

Figura 6.26. Dispersogramas en función del tiempo para emulsiones estabilizadas con 5,0% p/p de NaCas para diferentes concentraciones en peso de sacarosa, donde la primera curva es a tiempo inicial: I. 0%; II. 5%; III. 10%; IV. 15%: V. 20%; VI. 30%. Se grafico los primeros 60 minutos de reacción.

Los dispersogramas con doble cantidad de ácido son funcionalmente similares, pero como se mostró en la Figura 6.8, el pico de dispersión desaparece a tiempos menores y estos resultados se evaluarán en función del radio de la nanopartícula de caseína (o submicela de caseínas). Además, en ángulos superiores al del pico de correlación, se realizaron ajustes lineales en los gráficos

log-log y como resultado se obtuvieron pendientes que se encuentran entre -3,5 y -4. Este resultado indicó que la pendiente de la zona de Porod corresponde a un objeto dispersor compacto. En la Figura 6.27 se exhibe la evolución temporal de una emulsión de 7,5% p/p de NaCas y 20% p/p de sacarosa y acidificada con simple ácido. En la misma se pudo notar la presencia de un pequeño pico de correlación a tiempos iniciales. Para la EF, a altas concentraciones de sacarosa, la correlación a concentraciones menores de NaCas es imperceptible.

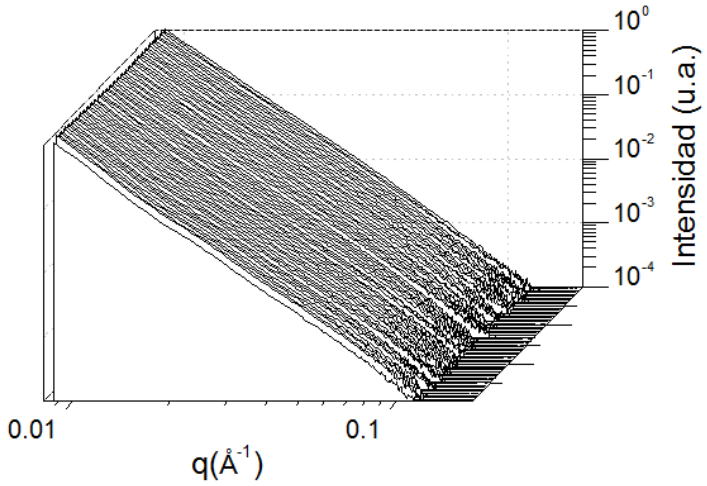

Figura 6.27. Dispersograma en función del tiempo para una emulsión estabilizada con 7,5% p/p de NaCas y 20% p/p de sacarosa acidificada con simple ácido.

En un intervalo acotado cercano al tiempo inicial y anterior a la transición emulsión-gel puede seguirse la distancia de correlación media a través del parámetro ajustable R_{in}. En la Figura 6.28 I se grafica la variación de R_{in} para emulsiones formuladas con hasta 15% p/p de sacarosa y con 5,0% p/p de NaCas. A concentraciones mayores de sacarosa el ajuste de las curvas no fue posible. En la gráfica puede apreciarse que a pesar de que todas las curvas parecen casi paralelas, durante todo el tiempo de medición, R_{in} es mayor a medida que se

aumenta la concentración de disacárido. Lo mismo ocurre cuando se agrega doble cantidad de ácido (Figura 6.28 II) y a tiempos menores a los 30 minutos. A tiempos mayores el pico de correlación se encontró en las cercanías del mínimo valor de "q" que puede accederse experimentalmente y el error de ajuste resulta muy grande.

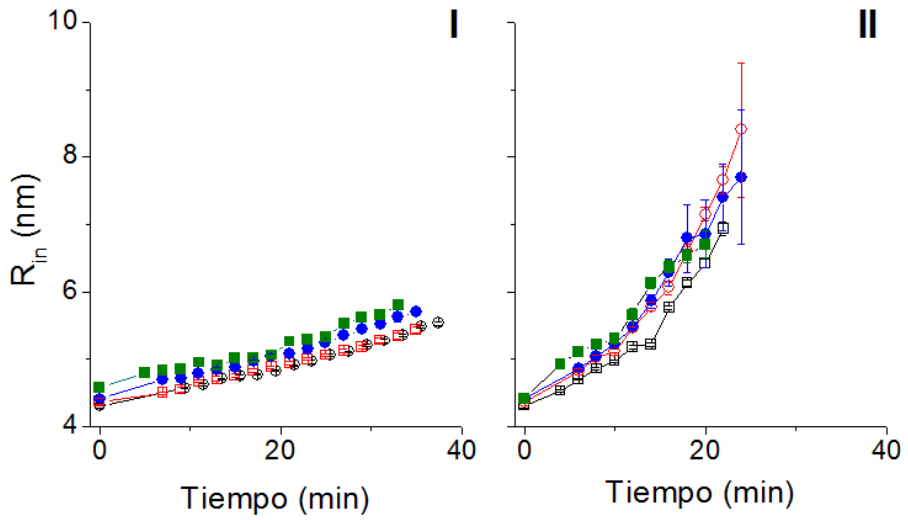

Figura 6.28. Parámetro ajustable R_{in} (radio interno) en función del tiempo para emulsiones estabilizadas con 5,0% p/p de NaCas y que contenían proporciones en peso variables de sacarosa: 0% (cuadrados vacios); 5% (círculos vacios); 10% (círculos llenos); 15% (cuadrados llenos). Para simple (I) y doble (II) cantidad de ácido.

Como se observó en la Figura 6.28 I, las curvas de R_{in} en función del tiempo son casi paralelas para todas las concentraciones de sacarosa ensayadas. Es decir, como la velocidad de acidificación dependió de la concentración de ácido era de esperar que la celeridad fuera similar. Estos resultados están de acuerdo con los hallados en el capítulo 4; la diferencia reside en que el valor inicial es diferente. En la Figura 6.29 se graficaron los R_{in} de las subunidades de caseína

previo a la acidificación. A medida que se aumenta la concentración de sacarosa el valor del radio interno es mayor.

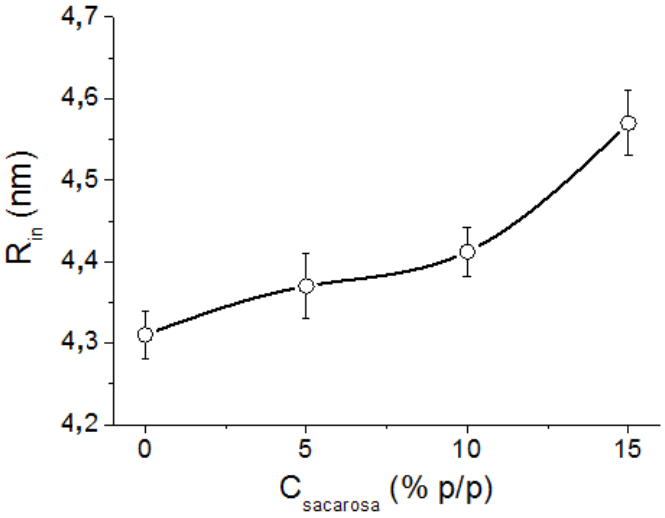

Figura 6.29. Radio interno antes de acidificar, para emulsiones estabilizadas con 5,0% p/p de NaCas en función de la concentración de sacarosa.

Se ha dicho que el radio interno es el único parámetro que varió apreciablemente a lo largo de los ajustes. En todos estos ejemplos la fracción de volumen efectiva se mantuvo en 0.18 ± 0.01. Este valor que se debe al agregado supramolecular de nanopartículas de caseina es menor al calculado para el NaCas en solución. El incremento en la concentración de sacarosa llevó a un aumento en el radio interno calculado. Es preciso recordar que el radio interno calculado no corresponde al tamaño de una proteína, sino a un conjunto de proteínas que las hemos denominado submicela de caseína. La presencia de sacarosa favorece el crecimiento de las submicelas de caseína y esto conduce a tiempos de gelificacion menores.

6.4 Conclusiones

Las técnicas empleadas fueron muy útiles para caracterizar la evolución temporal durante la transición emulsión-gel en diferentes estadios del proceso. Dividiremos los eventos en anteriores al t_{gel} y posteriores al mismo. La luz monocromática transmitida en suspensiones de NaCas (sin aceite disperso) y la dispersión de rayos X a bajos ángulos permitió comparar el comportamiento de la caseína en solución y en emulsión en los primeros estadios luego de la disolución del ácido GDL. Se pudo analizar que durante la acidificación inicial, hubo cambios estructurales que afectaron el tamaño de las submicelas de caseína que conforman al caseinato de sodio y que a su vez se modificó la estructura supramolecular que conforman lo que fue observado mediante las propiedades ópticas de la dispersión (observado por Turbiscan). Durante este periodo hubo un incremento en la viscosidad determinado por una disminución de la movilidad molecular medido por NMR (Figura 6.22). Al alcanzar las cercanías de la transición emulsión-gel, la radiación de 850 nm dispersada a 135º (*backscattering*) aumentó asintóticamente a un valor final una vez gelificada la muestra. Por medidas de reología se pudo determinar con precisión el tiempo de gelificación (ver Tabla 6.1, Figura 6.12 y Figura 6.13) y la evolución del módulo elástico para cada gel. Una vez sintetizado el gel la microscopía óptica confocal de barrido laser permitió analizar la microestructura de la fase oleosa y por medición del peso de la solución acuosa perdida se siguió la sinéresis de los geles.

En sistemas de caseínas de leche se ha descripto una reorganización micelar a medida que se modifica el pH de la solución en la cual están disueltas

[Moitzi 2011]. La dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS) permitió cuantificar los cambios en la estructura interna del NaCas observada en función del pH. Si bien para poder caracterizar estructuras de mayor jerarquía en el gel sería conveniente alcanzar ángulos menores a los empleados, éstos no pueden ser alcanzados por el sincrotrón brasilero actual. En un futuro cercano podremos emplear el nuevo sincrotrón Sirius.

Una ventaja muy importante de esta proteína es que se mantiene ovillada en las condiciones experimentales ensayadas y por ello siempre se registró una diferencia muy significativa entre la densidad electrónica de la proteína y del medio. En la Figura 6.30 se muestran dos curvas simuladas de SAXS para un cuerpo compacto como es el caso de una proteína ovillada (inferior) y un polímero expandido (superior). La diferencia principal reside en la zona de altos ángulos (o región de Porod). Como en todas las muestras ensayadas en este trabajo de tesis la curva fue proporcional a q^{-4} comprobamos que la gelificación no ocurrió por una desnaturalización con apertura de la estructura globular.

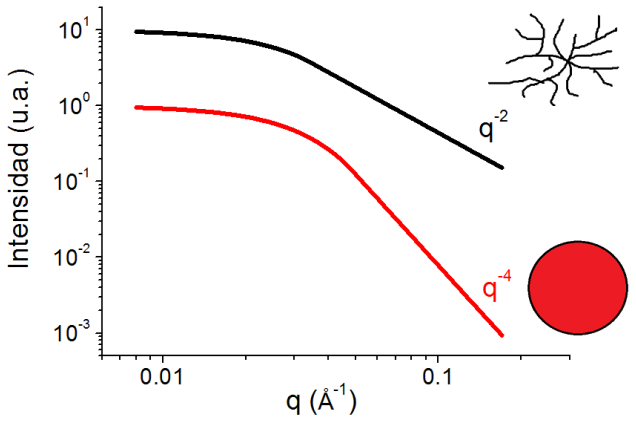

Figura 6.30. Curvas simuladas de SAXS para una muestra compacta (inferior) y una estructura del tipo polimérico en la que puede verse un cambio continuo en la diferencia de densidad electrónica (curva superior).

La microestructura de la fase oleosa en el gel final indicó que hubo mayor tendencia a la coalescencia de glóbulos grasos cuando se aumentó la concentración de sacarosa. Este fenómeno pudo entenderse bajo los conceptos de adsorción en superficie. La proteína juega el papel de tensioactivo agua/aceite al igual que la sacarosa. Cuando se aumentó el contenido de azúcar, la tensión superficial disminuyó y esto pudo favorecer la desorción superficial de nanopartículas de caseína que después se encontraron comprometidas con la formación del gel. Como la proteína es la principal responsable de suprimir la coalescencia por impedimento estérico, si esta se libera de la superficie la probabilidad de coalescencia aumenta. El proceso de acidificación homogénea con la inclusión de la transición emulsión-gel resultó en un conjunto de procesos fisicoquímicos complejos. Las interacciones caseína-caseína están gobernadas por el potencial electrostático y fuerzas dispersivas. Estas proteínas, además, como se explicó anteriormente pueden estar involucradas en equilibrios de adsorción-desorción de las nanopartículas de caseína sobre la superficie,

propiedades que les brinda acción de tensioactivo y protectoras de coalescencia por impedimento estérico. Por último, el agregado de azúcar afectó a todas las interacciones y por eso estudiamos estos efectos complejos de manera sistemática. Una vez estructurada la emulsión por gelificación de NaCas, la misma evolucionó o envejeció. El interior del gel resultó hidrofóbico y el agua fue rechazada hacia el exterior del mismo. En este caso la adición del disacárido previno la pérdida de líquido. Como conclusión general, para obtener un gel estructurado y estable es necesario formularlo con un valor de concentración de disacárido de compromiso, a fin de evitar la sinéresis, pero en concentraciones tales que la coalescencia de las gotas grasas sea baja. De acuerdo con nuestros resultados, un valor de 15% sería una concentración óptima.

Antes de concluir con el capítulo, es deseo del autor destacar el resultado obtenido con el analizador vertical *Turbiscan*. En la literatura no hay descripción alguna que siga el proceso de gelificación empleando este equipo. Recientemente se ha evaluado la desnaturalización térmica de proteínas de suero de leche siguiendo los cambios en el *backscattering* [Lamb et al. 2013]. Esto muestra el potencial de este método para seguir cambios estructurales. De esta manera, en sistemas similares, no solo se podrían evaluar los procesos de cremado/sedimentación, floculación/coalescencia en forma simultánea sino que también se podría seguir la restructuración supramolecular de las nanopartículas de caseína durante el proceso de gelificación por un aumento apreciable de la intensidad del BS.

7 Conclusiones generales y perspectivas

A lo largo del presente trabajo de tesis se ha descripto al caseinato de sodio como un ingrediente complejo y versátil en la manufactura de sistemas heterogéneos aceite/agua o grasa/agua. La composición de la fase acuosa y/o lipídica fueron las variables de elección que se discutieron con más detalle en el análisis del comportamiento macroscópico de las emulsiones. La temperatura, variable fisicoquímica estrella, solo se modificó en el análisis de transición sólido/líquido en la fase dispersa. El resto de las experiencias se realizaron a temperatura ambiente, siempre a un valor constante. Diversos mecanismos de desestabilización, aislados o acoplados, se han descripto, desde migración pura en EG, floculación en EF y coalescencia durante la transición emulsión-gel en EF.

Realizando una recapitulación general, las emulsiones no han sido afectadas, mayormente, por la composición de la fase dispersa en las condiciones ensayadas siempre y cuando la materia grasa no solidifique parcial o totalmente a temperatura ambiente. La estabilización de emulsiones de gota grande, en un lapso de una semana, puede ser lograda mediante el empleo de polisacáridos de alto peso molecular, como es el caso de la goma xántica. Cuando la población de partículas es inferior al micrón la estabilización de dichos glóbulos se alcanza con el agregado de disacáridos (capítulo 4). Al reemplazar el aceite de la fase dispersa por un sistema semisólido (grasa de leche), la estabilidad puede verse afectada por coalescencia parcial. A temperatura ambiente, las EF no mostraron la presencia de sólidos lo cual, en principio permite suponer que se podría obtener emulsiones estables a temperatura ambiente. El empleo de surfactantes de carácter lipofílico en la formulación de una emulsión puede aumentar, no solo la

velocidad de cristalización, sino la cantidad de sólidos totales yendo en desmedro de la estabilidad de dichas emulsiones (capítulo 5). Finalmente, la dispersión de aceite en agua puede estabilizarse por gelificación de la proteína. En estos casos, el agregado entre un 5 y 10% p/p de sacarosa (agente higroscópico) disminuye la pérdida de agua del gel, mientras que a concentraciones mayores del disacárido lleva a la coalescencia de glóbulos grasos (capítulo 6).

La descripción y caracterización de los sistemas complejos ha sido posible mediante técnicas no invasivas (químicas o mecánicas). El ojo crítico del lector podrá detenerse en este punto y objetar el empleo de técnicas como reología, ya sea en material masivo como superficial. Estas medidas basan sus principios en una pequeña perturbación mecánica controlada que no produce cambios estructurales permanentes. Las mismas se han empleado como caracterizaciones complementarias para describir el sistema o discutir un concepto. No obstante, las principales técnicas empleadas en el presente trabajo de tesis se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Cada técnica empleada posee un intervalo espacial diferente, pero en su conjunto, fueron los ladrillos que construyeron un entendimiento coherente y amplio de los fenómenos fisicoquímicos que controlan la estabilidad de las emulsiones estabilizadas con NaCas.

Es deseo del autor hacer una especial mención a la técnica de dispersión de rayos X a bajos ángulos o SAXS por sus siglas en inglés. La misma ha sido una herramienta muy útil para describir los sistemas en distancias características de los nanómetros. Esta técnica no ha sido muy empleada en la literatura

especializada en ciencia de los alimentos. Su interpretación no es trivial y requiere de conocimientos específicos y preparación adecuada. A lo largo de la tesis se ha estudiado exhaustivamente los principios físicos de la técnica, como así el tratamiento de datos e interpretación. Como resultado se ha logrado escribir rutinas y algoritmos propios que han servido, además, para el análisis realizado con otras técnicas experimentales (ver anexos 2, 3 y 4). Como se ha mencionado, esta técnica ha permitido interpretar observaciones macroscópicas (luz visible e IR cercano) en forma más profunda y ha sido la base de una interpretación más acabada de la organización de las partículas de caseinato de sodio en la nanoescala en diferentes sistemas.

Los sistemas de NaCas poseen características muy interesantes desde el punto de vista fisicoquímico, pero además tienen muy buenas cualidades para el desarrollo de nuevos productos basados en su estabilidad cinética. Los geles son sistemas que están muy en boga cuando se desea preparar nuevos materiales. Las perspectivas a futuro fluyen en esa dirección. El uso de grasas *trans* o saturadas está siendo reemplazado paulatinamente y el empleo de geles es una alternativa para formular productos con grasas líquidas que sin embargo se comporten como sólidos. La estructuración por transición sol-gel o emulsión-gel de sistemas dispersos puede ser una alternativa viable para producir alimentos más saludables. Por otro lado, si se consideran las propiedades hidrófobas de estos sistemas, que como resultado dan una sinéresis muy alta, se puede destacar que se podría aprovechar este potencial para manufacturar plásticos o films

comestibles, donde se ha observado que se obtienen materiales rígidos una vez que han perdido el agua.

Por último, la capacidad de emulsionar y gelificar por parte del NaCas podría emplearse en la creación de geles híbridos y materiales porosos. En la Figura 7.1 se aprecia dos imágenes de microscopía de barrido electrónico para materiales de oxido de silicio obtenidas por gelificación homogénea de emulsiones de tetra-etoxi-silano (TEOS) en una solución agua/etanol y estabilizadas con NaCas y posterior calcinación de la materia orgánica en un horno tubular.

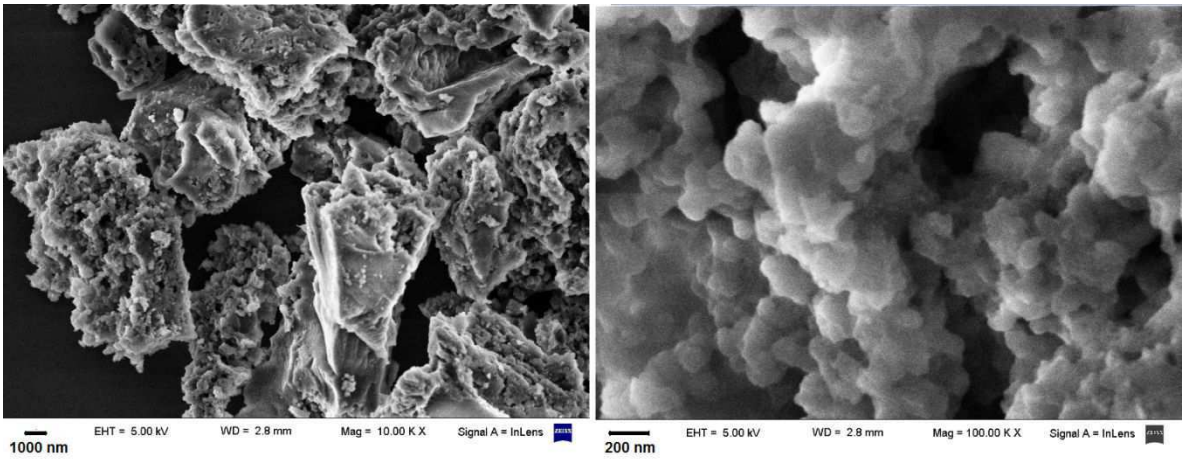

Figura 7.1. Imágenes de microscopía de barrido electrónico (SEM) de una matriz de óxido de silicio calcinado obtenida de una gelificación mixta de TEOS emulsionado con NaCas. Se muestran dos magnificaciones diferentes.

En la Figura 7.1 se puede observar que el material obtenido es poroso y con cierta rugosidad. Siendo una buena opción a la hora de hacer materiales soporte para catalizadores.

Este trabajo de tesis muestra el aporte que la ciencia de materiales puede hacer a sistemas alimenticios a través de la descripción de los mismos con técnicas más usuales en el área de materiales que permiten un estudio más profundo de los alimentos y en escalas de nanómetros.

8 Anexos

Los cálculos realizados en los anexos fueron llevados a cabo mediante programas escritos en Fortran y Scilab 5.4.0[1].

El tratamiento de archivos y datos se hizo mediante scripting en Python 3.3 a través de la plataforma PyZo.

[1] Scilab Enterprises (2012). Scilab: Free and Open Source software for numerical computation (OS, Version 5.40) [Software]. Available from: http://www.scilab.org

8.1 Anexo 1. Cálculo de velocidades de cremado

Para el cálculo de la velocidad de cremado, se parte de perfiles de ΔBS en función del tiempo con curvas similares a la Figura A.1.1 donde hay una depleción de la intensidad de luz registrada debida al movimiento de las partículas causadas por la diferencia de densidad entre la fase dispersa y continua.

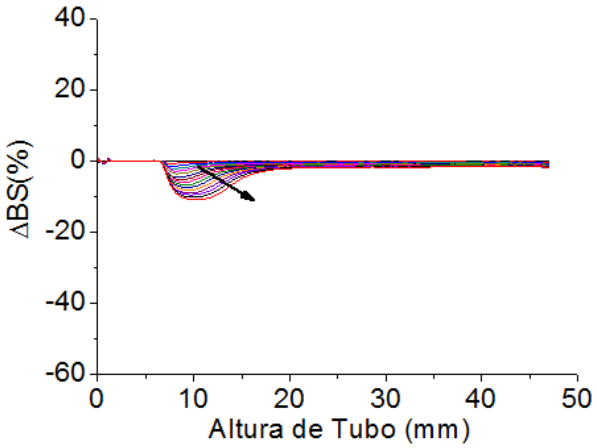

Figura A.1.1. Perfil de una cinética de cremado para una emulsión registrado por turbiscan. La flecha indica el paso del tiempo.

Para facilitar la comprensión de los cambios en función del tiempo se graficaron las mismas curvas de la Figura A.1.1 en una gráfica tridimensional donde se muestra magnificada la zona de interés (Figura A.1.2). Como se enunció en el capítulo 1 (ver sección 1.5.3), si no hay cambios en el tamaño de las partículas coloidales, la disminución en el BS es debida a la disminución de la fracción de volumen por causa de la migración. Para calcular la velocidad de migración se realiza un corte a media altura respecto del punto mínimo absoluto de la campana invertida (ver línea gruesa paralela al plano determinado por el tiempo y la altura de tubo). Fijar un valor de intensidad relativa constante, es

similar a evaluar el movimiento de partículas a una fracción de volumen en particular a lo largo del eje vertical.

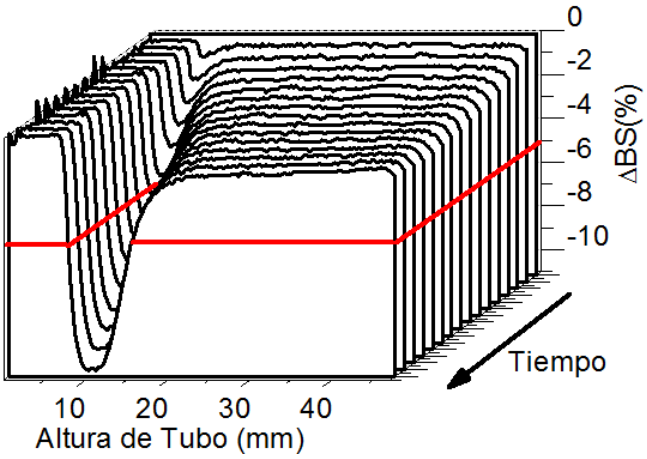

Figura A.1.2. Perfil tridimensional de la cinética de cremado para una emulsión registrado por turbiscan. La línea gruesa paralela al plano perpendicular a ΔBS representa la intensidad a media altura respecto del mínimo absoluto de las campanas invertidas.

Al realizar el corte a media altura como se muestra en la Figura A.1.2 se pueden graficar los puntos de intersección entre las curvas de BS y el plano señalado en rojo en la Figura A.1.2 (Figura A.1.3 I). En esta selección de intensidad relativa arbitraria, parte de las curvas no llegan a cortar el plano señalado y no se consideran para el cálculo. En la Figura A.1.3 I se puede ver para cada campana los dos puntos que cortan el plano: en negro el punto correspondiente a la parte superior mientras que en símbolos vacios la intersección del punto inferior de la campana con el plano rojo. En la Figura A.1.3 II se grafica el ancho de la campana a media altura a un tiempo t (distancia entre el punto negro y el vacío) y se toma el régimen lineal para realizar un ajuste por mínimos cuadrados empleando una recta. La velocidad de migración "$K_{mig}=\partial z/\partial t$" es la velocidad límite (constante) y es relativa a la posición de BS fijada. Para

realizar comparaciones entre las muestras se seleccionó siempre la misma posición relativa.

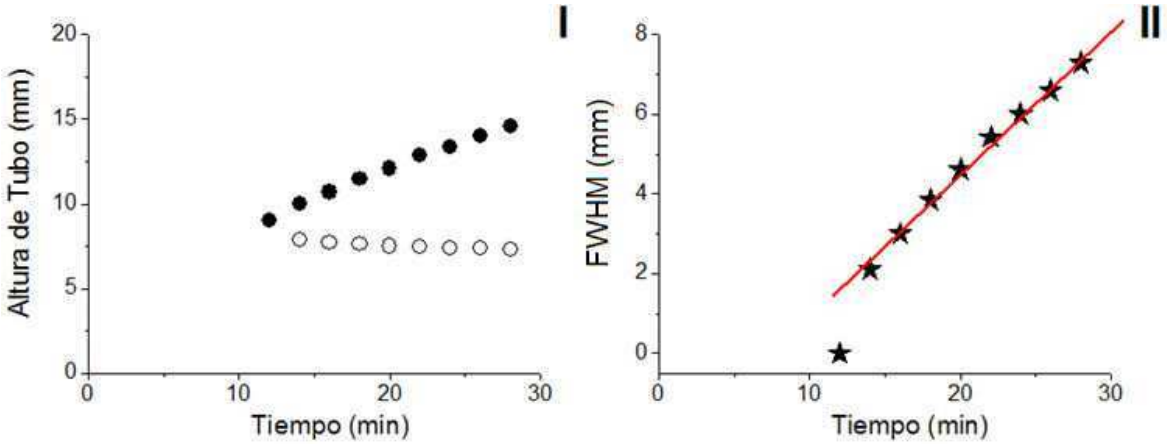

Figura A.1.3. I. Puntos de intersección de la curva de BS en función del tiempo con el plano perpendicular a la intensidad de luz dispersada a 135º seleccionada a media altura respecto del mínimo absoluto. II. Ancho de pico en función del tiempo. La línea roja indica el régimen lineal.

8.2 Anexo 2. Cuadrados mínimos lineales y no lineales

La interpretación de resultados experimentales a través de modelos matemáticos analíticos (o no) es muy común en física, química y biología. Un método muy empleado para calcular el valor de las magnitudes físicas a través de funciones paramétricas por ajuste sobre medidas experimentales, es el de cuadrados mínimos [Björck 1990]. En este método se minimiza la diferencia entre la curva teórica y los "N" puntos experimentales.

$$Z = \sum_{j=1}^{N} w_j \, (y_j^{mod} - y_j^{exp})^2 \qquad \text{Ecuación A.2.1}$$

Donde la función "Z" es la sumatoria del cuadrado de la diferencia (o residuos) entre los puntos experimentales "y_j^{exp}" y los propuestos por el modelo "y_j^{mod}" y w_j una función de peso que se le asignan a cada punto experimental. Minimizar la función "Z" para cada parámetro "λ_i" del modelo implica exigir, para todos los parámetros, la condición:

$$\frac{\partial Z}{\partial \lambda_i} = 0 \qquad \text{Ecuación A.2.2}$$

Es decir que al igualar la derivada de la función Z en el i-esimo parámetro empleando la definición de la Ecuación A.2.1 la expresión queda:

$$\sum_{j=1}^{N} w_j \; y_j^{mod} \; \frac{\partial y_j^{mod}}{\partial \lambda_i} = \sum_{j=1}^{N} w_j \; y_j^{exp} \; \frac{\partial y_j^{mod}}{\partial \lambda_i}$$ Ecuación A.2.3

El caso lineal es el más sencillo de resolver. En el mismo la función propuesta se escribe como una suma de funciones o bases "f_i" ponderadas por un escalar.

$$y^{mod} = \sum_{i=1}^{M} \lambda_i f_i$$ Ecuación A.2.4

En este caso los parámetros λ_i son escalares. Reemplazando la Ecuación A.2.4 en la Ecuación A.2.3 queda finalmente:

$$\sum_{j=1}^{N} w_j \; y_j^{mod} \mathrm{f}_{\mathrm{i,j}} = \sum_{j=1}^{N} w_j \; y_j^{exp} \; \mathrm{f}_{\mathrm{i,j}}$$ Ecuación A.2.5

Si tomamos la notación de pseudo-producto interno para facilitar la lectura:

$$< h|w|g >= \sum_k w_k h_k g_k$$ Ecuación A.2.6

Donde h y g son dos funciones y w el factor de peso. El producto se define como la sumatoria de las funciones evaluado en los k-ésimos términos. El sistema lineal a resolver queda determinado por la matriz de la

Ecuación A.2.7:

$$\begin{pmatrix} < f_1|w|f_1 > & \dots & < f_1|w|f_n > \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ < f_n|w|f_1 > & \dots & < f_n|w|f_n > \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \lambda_1 \\ \vdots \\ \lambda_n \end{pmatrix}$$

Ecuación A.2.7

$$= \begin{pmatrix} < y^{exp}|w|f_1 > \\ \vdots \\ < y^{exp}|w|f_n > \end{pmatrix}$$

Cuando se trata de funciones no lineales, numéricamente es más complicado de resolver. En el caso de que se pueda escribir y/o calcular la derivada parcial del modelo propuesto en función de los parámetros no lineales se podría resolver iterativamente la Ecuación A.2.3. Sin embargo, en las cercanías de máximos o mínimos, la inversión de la matriz podría no ser factible. Esto es lo que se conoce como problemas mal planteados [Hansen 1994].

Existen varios métodos empleados en literatura. En la tesis se ha empleado el método de Levenberg–Marquardt [Levengberg 1944; Marquardt 1963]. El mismo consiste en agregar un término que estabiliza la inversión de la matriz de la siguiente forma:

$$(J^T J + \mu Id)\Delta\lambda = -J^T[y^{exp} - \mathrm{y}^{\mathrm{mod}}]$$

Ecuación A.2.8

Donde *J* es el Jacobbiano de la función propuesta (notar que en la

Ecuación A.2.7 J^TJ resulta la matriz de la izquierda) e Id es la matriz identidad. Para estabilizar la inversión de la matriz se le suma un parámetro positivo “μ” variable que regulariza numéricamente la operación [Madsen, Nielsen & Tingleff 2004; Oliveira et al. 2012].

8.3 Anexo 3. Suavizado de curvas y errores

Para aquellos casos en los que el error de medición sea aleatorio e independiente, la probabilidad que describe al error puede aproximarse por una distribución Gaussiana. La función de máxima verosimilitud se escribe como la productoria de las probabilidades dadas por [Sijbers & den Dekker 2004]:

$$L = \prod_{j=1}^{N} \frac{1}{\sigma_j \sqrt{2\pi}} exp\left[-\frac{\left(y_j^{mod} - y_j^{exp}\right)^2}{2\sigma_j^2}\right]$$ Ecuación A.3.1

Donde "σ_j" es la varianza o incerteza en cada punto experimental. Como maximizar "L" es igual a minimizar "– ln(L)"

$$-\ln(L) = \chi^2 = \sum_{j=1}^{N} \frac{\left(y_j^{mod} - y_j^{exp}\right)^2}{\sigma_j^2} + cte$$ Ecuación A.3.2

La función Z definida en el anexo 2 es en el presente caso χ^2, donde la función de peso en el j-esimo punto experimental está definida como "$w_j = \sigma_j^{-2}$". El empleo de esta figura de mérito es muy usual en optimización de curvas de dispersión a bajos ángulos debido a que las curvas pueden tener muchos órdenes de magnitud entre las zonas de bajos y altos ángulos [Pedersen 1992].

El pretratamiento de las curvas experimentales se basó en asignar la incertidumbre a cada punto a través de interpolación con una función suave y reducir la cantidad de puntos para que el modelado sea computacionalmente menos costoso. Debido al problema mencionado anteriormente, en el cual se

presenta la necesidad del ajuste de funciones en curvas cuyos extremos difieren en órdenes de magnitud, se ha dividido el diagrama de intensidad “I” en función de “q” en P partes. $[q_1,I_1],[q_2,I_2],\ldots,[q_P,I_P]$ a fin de obtener un buen ajuste en cada parte. Se realizaron dos rutinas diferentes dependiendo del caso. La primera fue basada en interpolación polinomial. Para aquellas curvas cuyo ajuste por polinomios generaró una sobreestimación de las incertezas en los puntos a bajos ángulos se utilizó la base determinada en la Ecuación A.3.3.

$$I'_l(q) = \sum_k C_k \frac{\sin(q_l R_k)}{q_l R_k} + Cte \qquad \text{Ecuación A.3.3}$$

Donde C_k son los pesos de la combinación lineal para cada R_k. La interpolación provee un suavizado de las curvas que permite calcular el desvió estándar de cada punto experimental.

8.4 Anexo 4. Método de Montecarlo para ajuste de funciones

Sea un número real y aleatorio con distribución uniforme R(0,1) Є [0,1] y sea E($\mathbf{O}$) la energía asociada a un sistema que depende de los observables $\mathbf{O}$. Entonces el criterio de aceptación de una perturbación en una variable $\mathbf{O}_i$ Є $\mathbf{O}$ viene dado por las siguientes condiciones: si esta variación deviene en una disminución en la energía del sistema entonces se acepta el nuevo valor. Por el contrario, si la energía del sistema aumenta el criterio de aceptación es tal que: R(0,1) < exp[-E/kT] (distribución de Boltzmann). Este es el conocido algoritmo de Metropolis y es un método estadístico basado en el muestreo de estados basados en distribuciones de probabilidad en procesos aleatorios (conocido como cadena de Markov) [Metropolis et al. 1953; Hastings 1970].

Posteriormente aparecieron métodos basados en el algoritmo de Nicolas Metropolis denominados Simulated Annealing [van Laarhoven & Aarts 1987], donde al igual que en la industria metalúrgica se enfría el sistema lentamente desde temperaturas altas a temperaturas menores. En los métodos implica tender el valor de una temperatura “T” dada hasta 0 K. O sea, la condición de mínima entropía. Estos algoritmos se han utilizado en optimización y hay propuestas varias funciones que controlen la temperatura [Ingber 1993].

8.4.1 Algoritmo usual para interpretar datos de SAXS

En literatura se encuentra el siguiente algoritmo [Pikunic et al. 2003]: para la iteración “n+1” y ante un nuevo valor del parámetro λi, Si $\chi^2_{n+1} < \chi^2_n$ se acepta,

pero si $\chi^2_{n+1} > \chi^2_n$ entonces, solo es aceptado si y solo si $R(0,1) < \exp[(\chi^2_n - \chi^2_{n+1})/T]$, con T una constante.

8.4.2 El algoritmo propuesto

La función temperatura se determinó por el valor mínimo de la figura de mérito χ^2 en la iteración k+1 dividido por el logaritmo del mismo para los casos que sea mayor a 10.

$$T(k+1) = \begin{cases} \dfrac{min\{\chi^2_{k+1}\}}{\log(min\{\chi^2_{k+1}\})} & si\ min\{\chi^2_{k+1}\} \geq 10 \\ min\{\chi^2_{k+1}\} & si\ min\{\chi^2_{k+1}\} < 10 \end{cases}$$

Ecuación A.4.1

La modificación del presente algoritmo frente a los encontrados en literatura, reside en establecer el mínimo χ^2 encontrado como la temperatura y además que, en lugar de comparar al χ^2 de la iteración k frente a la nueva perturbación k+1, se calcula el desplazamiento del mismo ante el valor mínimo encontrado χ^2_{min}=min{ $\chi^2_1, \chi^2_2, \ldots, \chi^2_{k-1} \chi^2_k$}.

$$\ln(L') = \frac{\chi^2_{min}}{T} - \frac{\chi^2_{k+1}}{T} = \log(\chi^2_{min})\left[1 - \frac{\chi^2_{k+1}}{\chi^2_{min}}\right]$$

Ecuación A.4.2

donde la nueva función "*L'*" toma valores entre 0 y 1 con una distribución Gaussiana. Por otra parte, el algoritmo se ha optimizado separando los términos lineales (λ^{lin}) de los parámetros no lineales (λ^{nl}), donde la perturbación sobre la variable i-esima del parámetro no lineal en la iteración k+1 se hizo mediante:

$$\lambda_{k+1}^{nl} = \lambda_k^{nl} + G(0, sig)$$ Ecuación A.4.3

donde G(0,sig) es un numero aleatorio de distribución Gaussiana centrado en el origen con varianza “sig”.

Algoritmo de Montecarlo con baño térmico (escrito en pseudo-código):

En iteración: k+1

1. $\chi^2_{min}=\min\{\chi^2_1, \cdots, \chi^2_k\}$

Para i entre 1 y M (en M parámetros no lineales)

2. $\lambda_{i,k} \rightarrow \lambda_{i,k+1}$ (Ecuación A.4.3)
3. calcular términos lineales por mínimos cuadrados (Anexo 2)
4. $\lambda_{j,k+1} \rightarrow \chi^2_{k+1}$
5. Si $\chi^2_{k+1} < \chi^2_k$
   Entonces se acepta nuevo valor.
6. Si $\chi^2_{n+1} > \chi^2_n$
   si R(0,1)<L’
   Entonces se acepta valor
   caso contrario
   $\lambda_{j,k+1} = \lambda_{j,k}$
7. Si $\chi^2_{k+1}=\min\{\chi^2_1, \cdots, \chi^2_k\}$
   Entonces $\chi^2_{min}=\chi^2_{k+1}$

El método es similar a método de *Simulated Annealing* donde el algoritmo se autoregula (o “enfría”) a medida que encuentra nuevos valores mínimos. Y La distribución es en principio Gaussiana en vez de Bolztmann.

Ventajas del Método:

- No hay que escribir derivadas ni apelar a derivadas numéricas.

- Es un método sencillo que se puede escribir en cualquier programa de cálculo, rápidamente, y tener la flexibilidad de cambiar de modelo simplemente declarando una nueva función. En programas rígidos de análisis de curvas de SAXS esto es más complicado.
- Puede complementarse bien con una rutina de mínimos cuadrados no lineales comunes, obteniéndose valores iniciales muy buenos.

Desventajas:

- Los valores que se obtienen de hacer varias veces la misma rutina sobre un mismo experimento y mismo intervalo de acción son similares pero no idénticos.
- Tiene un costo computacional mayor que otros métodos. Pero es el costo por hacer un programa mucho más sencillo de programar y de uso más general.

9 Referencias

9.1 Artículos científicos, capítulos de libros y libros.

- Abismäil, B.; Canseiler, J.P.; Wilhelm, A.M.; Delmas, H.;Gourdon, C. “Emulsification by Ultrasound: Droplet Size Distribution and Stability” Ultrasonics Sonochemistry.6(1):75-83 **1999**
- Abramoff, M.D.; Magalhaes, P.J.; Ramm, S.J. “Image Processing with ImageJ” Biophotonics International 11(7): 36-42 **2004**
- Acharya, D.P.; Hartley, P.G. “Progress in Microemulsion Characterization” Current Opinion in Colloid & Interface Science 17: 274-280 **2012**
- Adam-Barret, M.; Riaublanc, A.; Rondeau-Mouro, C.; Mariette, F. “Effects of Crystal Growth and Polymorphism of Triacylglycerols on NMR Relaxation Parameters. Evidence of a Relationship between Crystal Size and Spin-Latice Relaxation Time” Crystal Growth & Design 9: 4273-4280 **2009**
- Adams, D.J.; Butler, M.F.; Frith, W.J.; Kirkland, M.; Mullen, L.; Sanderson, P. “A New Method for Maintaining Homogeneity During Liquid-Hydrogel Transition Using Low Molecular Weight Hydrogelator” Soft Matter 5:1856-1862 **2009**
- Adamson, A.W.; Gast, A.P. Libro titulado “Physical Chemistry of Surfaces” 6ta edición, Wiley **1997**
- Almdal, K.; Dyre, J.; Hvidt, S. Kramer, O. “Towars a Phenomenological Definition of the Term ‘Gel’” Polymer Gels and Networks 1: 5-17 **1993**
- Alvarez-Cerimedo, M.S.; Huck-Iriart, C.; Candal, R.J.; Herrera, M.L. “Stability of Emulsions Formulated with High Concentrations of Sodium

Caseinate and Trehalose" Food Research International 43: 1482-1493 **2010**

- Antonov, Y.A.; van Puyvelde, P.; Moldenaers, P. "Solvent Quality as a Key Factor for Shear-induced Mixing in Biopolymer Emulsions" Food Hydrocolloids 23: 262-270 **2009**
- AOCS, "Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society", 4th edn., American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, , Method Cd 16-81 **1989**
- Arima, S.; Ueji, T.; Ueno, S.; Ogawa, A.; Sato, K. "Retardation of Crystallization-induced Destestabilization of PMF-in-water Emulsion with Emulsifier Additives" Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 55(1): 98-106 **2007**
- Avrami, M. "Kinetics of Phase Change I: General Theory" Journal of Chemical Physics 7:1103-1112 **1939**
- Avrami, M. "Kinetics of Phase Change II: Transformation-time Relations for Random Distribution Nuclei" Journal of Chemical Physics 8:212-224 **1940**
- Avrami, M. "Kinetics of Phase Change III: Granulation, Phase Change, and Microestructure" Journal of Chemical Physics 9:177-184 **1941**
- Awad, T.; Sato, K. "Effects of Hydrophobic Emulsifier Additives on Crystallization Behavior of Palm Mid Fraction in Oil-in-water Emulsion" Journal of American Chemist's Society 78(8): 837-842 **2001**

- Awad, T.S.; Sato, K. capítulo de libro “Fat Crystallization in O/W Emulsions Controlled by Hydrophobic Emulsifier Additives” de “Physical Properties of Lipids” Marcel Dekker Inc. 2: 37-62 **2002a**
- Awad, T.S; Sato, K. “Acceleration of Crystallization of Palm Kernel Oil in Oil-in-water Emulsion by Hydrophobic Emulsifier Additives” Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 25(1): 45-53 **2002b**
- Baümler, E.R. “Cinética de Extracción de Aceites Vegetales y sus Compuestos Minoritarios” Tesis doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahia Blanca, Argentina **2009**
- Bearden, J.A. “X-Ray Wavelengths” Reviews of Modern Physics 39: **1967**
- Beaucage, G. “Small Angle Scattering from Polymeric Mass Fractal of Arbitrary Mass Fractal Dimensión” Journal of Applied Crystallography 39: 134-146 **1996**
- Belyakova, L.E.; Antipova, A.S.; Semenova, M.G.; Dickinson, E.; Merino, L.M.; Tsapkina, E.N. “Effect of Sucrose on Molecular and Interaction Parameters of Sodium Caseinate in Aqueous Solution: Relationship to Protein Gelation” Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 31: 31-46 **2003**
- Benjamins, J.; Vingerhoeds, M.H.; Zoet, F.D.; de Hoog, E.H.A.; van Aken, G.A. “Partial Coalescence as a Tool to Control Sensory Perception of Emulsions” Food Hydrocolloids 23:102-115 **2009**
- Binks, B.P. “Particles as surfactants- Similarities and differences” Current Opinion in Colloid & Interface Science 7: 21-41 **2002**

- Björck, Å. “Least Square Methods” Handbook of Numerical Analysis 1:469-647. **1990**
- Bockisch, M. libro titulado ”Fats and Oils” Handbook of AOCS Press **1998**
- Bonk, F.A.; Caldarelli, S.; Phan, T.; Bertin, D.; Deazevedo, E.R.; Mantovani, G.L.; Bonagamba, T.J.; Plivelic, T.S.; Torriani, I.L. “Investigation by Combined Solid-State NMR and SAX Methods of the Morphology and Domain Size in Polystyrene-b-polyethylene Oxide-b-polyestyrene Triblock Copolymers” Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics 48(1): 55-64 **2010**
- Bordes, C.; García, F.; Frances, C.; Biscans, B.; Snabre, P. “On Line Optical Investigation of Concentrated Dispersions in Precipitation and Grinding Processes” Kona, 19: 94-108 **2001**
- Born, M.; Wolf, E. Libro titulado “Principles of Optics” 6ta edición, Pergamon Press **1980**
- Bracewell, R.N. Libro titulado “The Fourier Transform and Its Applications” Mc Graw Hill 3ra edición **2000**
- Braga, A.L.M.; Menossi, M.; Cunha, R.L. “The effect of the Glucono-δ-lactone/caseinate Ratio on Sodium Caseinate Gelation” International Dairy Journal 16:389-398 **2006**
- Bumbalough, J.E. “Spreadable Product Having an Anhydrous Milk Fat Component” U.S. Patent 4.839.190 **1989**

- Campos, R.; Narine, S.S; Marangoni, A.G. “Effect of Cooling Rate on the Structure and Mechanical Properties of Milk Fat and Lard” Food Research International 35:971-981 **2002**
- Cardinaux, F.; Zaccarelli, E.; Stradned, E.; Bucciarelli, S; Farago, B.; Egelhaaf, S.U.; Sciortino, F.; Schurtenberger, P. “Cluster-Driven Dynamical Arrest in Concentrated Lysozyme Solutions” The Journal of Physical Chemistry B 115: 7227-7237 **2011**
- Carlton, R.A. Capítulo de libro “Polarized Light Microscopy” de “Pharmaceutical Microscopy” Springer Science 2:7-64 **2011**
- Cavalcanti, L.P.; Torriani, I.L.; Plivelic, T.S.; Oliveira, C.L.P.; Kellermann, G.; Neuenschwander, R. “Two New Sealed Sample Cells for Small-angle X-ray Scattering from Macromolecules in Solution and Complex Fluids using Synchrotron Radiation” Review of Scientific Instruments, USA. 75(11): 4541-4546 **2004**
- Cavalcanti, L.P.; Konovalov, O.; Torriani, I.L.; Haas, H. “Drog Loading to Lipid-based Cationic Nanoparticles” Nuclear Instrument and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 238(1): 290-293 **2005**
- Cerdeira, M.; Pastore, V.; Vera, L.V.; Martini, S.; Candal, R.J.; Herrera, M.L. “Nucleation behavior of Blended High-melting Fractions of Milk Fat as Affected by Emulsifiers” European Journal of Lipid Science and Technology 107(12): 877-885 **2005**

- Cerdeira, M.; Martini, S.; Candal, R.J.; Herrera, M.L. “Polymorphism and Growth Behavior of Low-trans Fat Blends Formulated With and Without Emulsifiers” Journal of the American Chemist’s Society 83(6): 489-496 **2006**
- Cerdeira, M.; Palazolo, G.G; Candal, R.J.; Herrera, M.L. “Factors Affecting Initial Retention of a Microencapsulated Sunflower Seed Oil/Milk Fat Fraction Blend” Journal of the American oil Chemists’ Society 64(6): 523-531 **2007**
- Cisneros, A.; Mazzanti, G.; Campos, R.; Marangoni, A.G. “Polymorphic Transformation in Mixtures of High and Low Melting Fractions of Milk Fat” Journal of Agricultural and food chemistry 54: 6030-6033 **2006**
- Christov, N.C.; Ganchev, D.N.; Vassileva, N.D.; Denkov, N.D.; Danov, K.D; Kralchevsky, P.A. “Capillary Mechanisms in Membrane Emulsification: Oil-in-water Emulsions Stabilized by Tween 20 and Milk Proteins” Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects 209: 83-104 **2002**
- Chu, M.; Kollias, N.; Luedtke, M. Capítulo de libro “Confocal Scanning Laser Microscopy: Applications for Imaging Dynamic Processes in Skin in Vivo” de “Laser Scanning: Theory and Application” 2:31-48 **2011**
- Christov, N.C.; Ganchev, D.N.; Vassileva, N.D.; Denkov, N.D.; Danov, K.D; Kralchevsky, P.A. “Capillary Mechanisms in Membrane Emulsification: Oil-in-water Emulsions Stabilized by Tween 20 and Milk Proteins” Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects 209: 83-104 **2002**

- Colquhoun, I.; Goodfellow, B. Capitulo de libro “Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy” en “Spectroscopic Techniques for Food Analysis” VCH Publishers Inc. 87-145 **1994**
- Coupland, J.N. “Crystallization in Emulsions” Current Opinion in Colloid and Interface Science 7:445-450 **2002**
- Craievich, A. Capítulo de libro “Small Angle Scattering by Nanostructured Materials” de “Handbook of Sol-Gel Science and Technology”. Volume II: Materials characterization; Kluwer Academic Publishers 8 : 161-189. **2005**
- Dalgleish, D.G. “On the Structural Models of Bovine Casein Micelles-Review and Possible Improvements” Soft Matter 7: 2265-2272 **2011**
- de Bruijn, T.J.W.; de Jong, W.A.; van den Berg, P.J. “Kinetic Parameters in Avrami-Erofeev Type Reactions From Isothermal and Non-isothermal Experiments” Thermochimica Acta 45: 315-325 **1981**
- de Oliveira Neto, M.; Alonso, R.L. Leite, F.L.; Oliveira Jr. N.; Poliarpov, I.; Mascarenhas, Y.P. Capítulo de libro “Simulated Annealing of Two Electron Density Solution Systems” de “Simulated Annealing” InTech 17: 340-362 **2008**
- Debenedetti, P.G. Libro titulado “Metastable Liquids: Concepts and Principles” Princeton University Press **1996**
- Debenedetti, P.G. “When a Phase is Born” Nature 441:168-169 **2006**
- Deffense, E. Capítulo de libro “Fractionated Milk Fat Products in Bakary Products” de “Proc. New Uses for Milk” The Dairy Science Research Center, Laval University, Quebec, Canada, pag 79 **1989**

- Dibildox-Alvarado, E.; Laredo, T.; Toro-Vazquez, J.F.; Marangoni, A.G. "Pre-nucleation Structuring of TAG Melts Revealed by Fluorescence Polarization Spectroscopy and Molecular Mechanics Simulations" Journal of the American Oil Chemists` Society 87: 1115-1125 **2010**
- Dickinson, E.; Golding, M. "Rheology of Sodium Caseinate Stabilized Oil-in-Water Emulsions" Journal of Colloid and Interface Science 197(1):166-176 **1997**
- Dickinson, E.; Pawlowsky, K. "Effect of I-carragenan on Flocculation Creaming and Rheology of a Protein-stabized Emulsion" Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 3799-3806 **1997**
- Dickinson, E.; Ritzoulis, C. "Creaming and Rheology of Oil-in-water Emulsions Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Sodium Caseinate" Journal of Colloid and Interface Science 224:148-154 **2000**
- Dickinson, E. "Structure Formation in Casein-based Gels, Foams, and Emulsions" Colloids and Surfaces A 288: 3-11 **2006**
- Dickinson, E. "Interfacial Structure and Stability of Food Emulsions as Affected by Protein-Polysaccharide Interactions" Soft Matter 4(5): 932-942 **2008**
- Dickinson, E. "Hydrocolloids and Emulsion Stability" Handbook of Hydrocolloids 2nd edición. 2:23-49 **2009**
- Dickinson, E. "Mixed Biopolymers at Interfaces: Competitive Adsorption and Multilayer Structures" Food Hydrocolloids 25(8): 1966-1983 **2011**

- Farrell Jr, H.M.; Malin, E.L.; Brown, E.M.; Qi, P.X. “Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?” Current Opinion in Colloid & interface Science 11:135-147 **2006**
- Feigin, L.A.; Svergun, D.I. Libro titulado “Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering” Plenum Press **1987**
- Ferragut, R.; Somoza, A.; Tolley, A.; Torriani, I. “Precipitation Kinetics in Al–Zn–Mg Commercial Alloys” Journal of Materials Processing Technology 141:35-40 **2003**
- Ford, Jr. N.C. capitulo de libro “Light Scattering Aparatus” de “Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectoscopy” Plenum Press 2:7-58 **1985**
- Foubert, I; Vanrolleghem, P.A.; Vanhoutte, B.; Dewettinck, K. “Dynamic Mathematical Model of the Crystallization Kinetics of Fats” Food Research International 35(10): 945-956 **2002**
- Foubert, I.; Dewettinck, K.; Vanrolleghem, P.A. “Modelling of the Crystallization Kinetics of Fats” Trends in Food Science & Technology 14:79-92 **2003**
- Fritz, G.; Glatter, O. “Structure and Interaction in Dense Colloidal Systems: Evaluation of Scattering Data by the Generalized Indirect Fourier Transformation Method” Journal of Physics: Condensed Matter 18: S2403-S2419 **2006**

- Giacovazzo, C. Capítulo de libro “The Diffraction of X-ray by Crystals” de “Fundamentals of Crystallography” Oxford Science Publications 3:141-228 **1992**
- Gibaud, T.; Mahmoundi, N.; Oberdisse, J.; Lindner, P.; Pedersen, J.S; Oliveira, C.L.P.; Stradner, A.; Schurtenberger, P. “New Routes to Food Gels and Glasses” Faraday Discussions 158: 267-284 **2012**
- Glatter, O.; Kratky, O. Libro titulado “Small Angle X-Ray Scattering” Academic Press **1982**
- Gralle, M.; Botelho, M.M.; Oliveira, C.L.P.; Torriani, I.L.; Ferreira, S.T. “Solution Studies and Structural Model of the Extracellular Domain of the Human Amyloid Precursor Protein” Biophysical Journal 63(6): 3513-3524 **2002**
- Grigoriev, D.O.; Derkatch, S.; Krägel, J.; Miller, R.; “Relationship Between Structure and Rheological Properties of BSA/Tween 80 Adsorption Layers at the Air/Water interface” Food Hydrocolloids 21: 823-830 **2007**
- Guzey, D.; McClements, D.J. “Formation Stability and Properties of Multilayer Emulsions for Application in the Food Industry” Advances in Colloid and Interface Science 128: 227-248 **2006**
- HadjSadok, A.; Pitkowski, A.; Nicolai, T.; Benyahia, L.; Moulai-Mostefa, N. “Characterisation of Sodium Caseinate as a Function of Ionic Strength, pH and Temperature Using Static and Dynamic Light Scattering” Food Hydrocolloids 22:1460-1466 **2008**

- Hansen, C. “Regularization Tools: A Matlab Package for Analysis and Solution of Discrete Ill-posed Problems” Numerical Algorithm 6(1):1-35 **1994**
- Hansen, S.; Bauer, R.; Lomholt, S.B.; Bruun Qvist, K.; Pedersen, J.S. Mortensen, K. “Structure of Casein Micelles Studied by Small-angle Neutro Scattering” European Biophysics Journal 24: 143-147 **1996**
- Hammersley A.P.; Svernsson O.S.; Hanfland M.;Fitch A.N Häusermann D. “Two-dimensional Detector Software: From Real Detector to Idealised Image or two Theta Scan” High Presure Research 14:235-248 **1996**
- Hammouda B. “A new Guinier-porod Model” Journal of Applied Crystallography 43: 716-719 **2010**
- Harding, G.; David, T.B. “Liquid metal Anode X-Ray Tubes and their Potential for High Continuous Power Operation” Radiation Physics and Chemistry 67:7-14 **2003**
- Hasenhuettl R.W. Libro titulado “Crystallization in Food” Aspen publications **2011**
- Hastings, W.K. “Monte Carlo Sampling Methods Using Markov Chains and Their Applications” Biometrika 57(1): 97-109 **1970**
- Hench, L.L.; West, J.K. “The Sol-Gel Process” Chemical Reviews 90:33-72 **1990**
- Henry, J.V.L.; Fryer, P.J.; Frith, W.J.; Norton, I.T. “The Influence of Phospolipids and Food Proteins on the Size and Stability of Model Sub-Micron Emulsions” Food Hydrocolloids, 24(1): 66-71 **2010**

- Hemar, Y.; Tamehana, M.; Munro, P.A.; Singh, H. “Influence of Xanthan Gum on the Formation and Stability of Sodium Caseinate Oil-in-water Emulsions” Food Hydrocolloids 15: 513-519 **2001**
- Hemar, Y. ; Pinder, D.N.; Hunter, R.J.; Singh, H.; Hébraud, P.; Horne, D.S. “Monitoring of Flocculation and Creaming of Sodium-caseinate-stabilized Emulsions using Diffusing-wave Spectroscopy” Journal of Colloid and Interface Science 264: 502-508 **2003**
- Herrera, M.L.; Marquez Rocha, F.J “Effects of Sucrose Ester on the Kinetics of Polymorphic Transition in Hydrogenated Sunflower Oil” Journal of the American Oil Chemist’ s Society 73(3):321-326 **1996**
- Herrero, A.M.; Carmona, P.; Pintado, T.; Jiménez-Colmenero, F.; Ruíz-Capillas, C. “Olive oil-in-water Emulsions Stabilized with Caseinate: Elucidation of Protein-Lipid Interaction by Infrared Spectroscopy” Food Hydrocolloids 25: 12-18 **2011**
- Himawan, C.; Starov, V.M.; Stapley, A.G.F. “Thermodynamic and Kinetic Aspects of Fat Crystallization” Advances in Colloid and Interface Science 122:3-33 **2006**
- Hodate, Y.; Ueno, S.; Yano, T.; Katsuragi, T.; Tezuka, Y.; Tagawa, T.; Yoshimoto, N.; Sato, K. “Ultrasonic Velocity Measurement of Crystallization Rates of Palm Oil in Oil-water Emulsions” Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 128: 217-224 **1997**
- Hoffman, A.S “Hydrogels for Biomedical Applications” Advance Drug Delivery Reviews 64:18-23 **2012**

- Hogan, S.A.; McNamee, B.F.; O'Riordan, E.D.: O'Sullivan, M. "Microencapsulating Properties of Sodium Caseinate" Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:1934-1938 **2001**
- Holt, C.; Kruift, C.G.; Tuinier, R.; Timmins, P.A. "Substructure of Bovine Casein Micelles by Small-angle X-ray and Neutron Scattering" Colloids and surfaces A 213: 275-284 **2003**
- Hong, M.; Zhang, Y.; Hu, F.; "Membrane Protein Structure and Dynamics from NMR Spectroscopy" Annual Reviews Phys. Chem. 63: 1-24 **2012**
- Horne, D.S. "Casein Micelle Structure: Models and Muddles" Current Opinion in Colloid and Interface Science 11: 148-153 **2006**
- Huck-Iriart, C.; Candal, R.J.; Herrera, M.L. "Effects of Addition of a Palmitic Sucrose Ester on Low-Trans-Fat Blends Crystallization in Bulk and in Oil-in-Water Emulsions" Food Biophysics 4:158-166 **2009**
- Huck-Iriart, C.; Alvarez-Cerimedo, M.S.; Candal, R.J.; Herrera, M.L. "Structures and Stability of Lipid Emulsions Formulated with Sodium Caseinate" Current Opinion in Colloid & Interface Science 16:412-420 **2011a**
- Huck-Iriart, C; Herrera M.L. Capítulo de libro "Application of Sunflower Oil in Food Manufacture" de "Sunflowers: Cultivation, Nutrition and Biodiesel Uses" Nova Science Publisher 135-152 **2011b**
- Huck-Iriart, C.; Morales-Mendoza N.J.; Candal, R.J.; Herrera M.L. Capítulo de libro "Applications of X-Ray Scattering in Edible Lipid Systems" de "X-Ray Scattering" Nova Science Publishers 87-106 **2011c**

- Huck-Iriart, C.; Pinzones Ruiz-Henestrosa, V.M.; Candal, R.J.; Herrera, M.L. “Effect of Aqueous Phase Composition on Stability of Sodium Caseinate/Sunflower Oil Emulsions” Food and Bioprocess Technology 6-9: 2406-2418 **2013**
- Hukins D.W.L Libro titulado “X-Ray Diffraction by Disordered and Ordered Systems” Pergamon Press **1981**
- Ianeselli, L.; Zhang, F.; Skoda, M.W.A.; Jacobs, R.M.J.; Martin, R.A.; Callow, S.; Prévost, S.; Schreiber, F. “Protein-Protein Interactions in Ovalbumin Solutions Studied by Small-angle Scattering: Effect of the Ionic Strength and the Chemical Nature of Cations” The Journal of Physical Chemistry B 144: 3776-3783 **2010**
- Ikeda E.; Ueno S.; Miyamoto, R. Sato, K. “Phase Behavior of a Binary Mixture of 1,3-Dipalmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol and 1,3-Dioleoyl-2-palmitoyl-sn-glycerol in n-Dodecane Solution” Journal of Physical Chemistry B 114: 10961-10969 **2010**
- Ingber, L. “Simulated Annealing: Practice versus Theory” Mathematical and Computer Modelling 18(11): 29-57 **1993**
- Ivanov, I.B; Kralchevsky, P.A. “Stability of Emulsions Under Equilibrium and Dynamic Conditions” Colloids and Surfaces A 128: 155-175 **1997**
- Jourdain, L.; Leser, M.E.; Schimitt, C.; Michel, M.; Dickinson, E. “Stability of Emulsions Containing Sodium Caseinate and Dextran Sulfate: Relationship to Complexation in Solution” Food Hydrocolloids 22(4): 647-659 **2008**

- Kahr, B.; Freudenthal, J.; Gunn, E. “Crystals in Light” Accounts of chemical research 43: 684-692 **2010**
- Kalnin, D.; Ouattara, M.; Ollivon, M. “A New Method for the Determination of the Concentration of Free and Associated Sodium Caseinate in Model Emulsions” Progress in Colloid and Polymer Science 128:207-211 **2004**
- Kalnin, D.; Quennesson, P.; Artzner, F.; Schafer, O.; Narayanan, T.; Ollivon, M. “Monitoring both Fat Crystallization and Self-Assembly of Sodium Caseinate in Model Emulsions using Synchrotron X-ray diffraction” 126: 139-145 **2004b**
- Kaltsa, O.; Michon, C.; Yanniotis, S.; Mandala, I. “Ultrasonic Energy Input Influence on the Production of Sub-micron O/W Emulsions Containing Whey Protein and Common Stabilizers” Ultrasonics Sonochemistry 20(3): 881-891 **2013**
- Katzbauer, B. “Properties and Applications of Xanthan gum” Polymer Degradation an Stability 59: 81-84 **1998**
- Kaylegian, K.E. “Physical and Chemical Properties of Milkfat Fractions” M.S. Thesis, University of Wisconsin-Madison **1991**
- Kaylegian, K.E.; Lindsay, R.C. Capitulo de libro “Raw Materials for Milk Fat Fractionation” de “Handbook of Milk Fractionation Technology and Application” AOCS Press 22-23 **1995**
- Kazakov, V.N.; Fainerman, V.B.; Kondratenko, P.G.; Elin, A.F.; Sinyachenko, O.V.; Miller, R. “Dilational Rheology of Serum Albumin and

Blood Serum Solution as Studied by Oscillating Drop Tensiometry" Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 62: 77-82 **2008**

- Kim K. Capitulo de libro "Synchrotron Radiation" de "X-Ray Data Booklet" 3ra edición Lawrence Berkeley National Laboratory 2: 1-16 **2009**
- Kirste, R.G.; Oberthür, R.C. Capítulo de libro "Synthetic Polymers in Solution" de "Small-angle X-ray Scattering" Academic Press 12: 387-431 **1982**
- Kodali, D.R. Capítulo de libro "Trans fats: Chemistry, Occurrence, Functional Need in Food and Potential Solutions" de "Trans fats alternatives" AOCS Press **2005**
- Kondepudi, D.; Prigogine, I. Libro titulado "Modern Thermodynamics: From Heat Engines to Dissipative Structures" John Wiley & Sons **1998**
- Kruif, C.G de; Huppertz, T.; Urban, V.S.; Petukhov, A.V. "Casein micelles and their internal structure" Advance in Colloid and interface Science 171(172): 36-52 **2012**
- Laneuville, S.I.; Turgeon, S.L.; Sanchez, C.; Paquin, P. "Gelation of Native β-lactoglobulin Induced by Electrostatic Attractive Interaction with Xanthan Gum" Langmuir 22: 7351-7357 **2006**
- Lamb, A.; Payne, F.; Xiong, Y.L.; Castillo, M. "Optical Backscatter Method for Determining Thermal Denaturation of β-Lactoglobulin and other Whey Proteins in Milk" Journal of Dairy Science 96(3): 1356-1365 **2013**.
- Laredo, T.; Barbut, S.; Marangoni, A.G. "Molecular Interactions of Polymer Oleogelation" Soft Matter 7: 2734-2743 **2011**

- Leong, T.S.H.; Woodster, T.J.; Kentish, S.E.; Ashokkumar, M. “Minimising oil Droplet Size Using Ultrasonic Emulsification” Ultrasonics Sonochemistry 16(6): 721-727 **2009.**
- Levenberg, K. “A Method for the Solution of Certain Non-Linear Problems in Least Squares” Quarterly of Applied Mathematics 2:164-168 **1944**
- Lide, D.R Editor de “CRC Handbook of Chemistry and Physics” version para Internet <http://www.hbcpnetbase.com> **2005**
- Lindner, H.; Fritz, G.; Glatter, O. “Measurement on Concentrated Oil in Water Emulsions Using Static Light Scattering” Journal of Colloid and Interface Science 242: 239-246 **2001**
- Liu, L.; Zhao, Q. Liu, T.; Zhao, M. “Dynamic Surface Pressure of Dilatational Viscoelasticity of Sodium Caseinate/Xanthan gum mixtures at the Oil-Water Interface” Food Hydrocolloids 25(5): 1593-1597 **2011**
- Liu, J.; Zhu, K.; Ye, T.; Wan, S.; Wang, Y.; Li, B.; Wang, C. “Influence of Konjac Glucomannan on Gelling Properties and Water State in Egg White Protein Gel” Food Research International 51(2): 437-443 **2013**
- Livney, Y.D. “Milk proteins as vehicles for bioactives” Current Opinion in Colloid & Interface Science 15 : 73-83 **2010**
- Loglio, J.R.; Pandolfi, P.; Miller, R.; Makievski, A.V. Ravena, F.; Ferrari, M. Capítulo de libro “Drop and Bubble Shape Analysis as a Tool for Dilational Rheological Studies of Interfacial Layers” de “Novel Methods to Study Interfacial Layers” Elsevier 439-483 **2001**

- Macomber, R.S. Libro titulado “A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy” Wiley **1998**
- Madsen, K.; Nielsen, H.B.; Tingleff, O. Libro: “Methods for on-Linear Least Squares Problems” 2da edición University of Denmark **2004**
- Manciu, M.; Ruckenstein, E. “Role of the Hydration Force in the Stability of Colloids at High Ionic Strengths” Langmuir 17: 7061-7070 **2001**
- Marangoni, A.G.; Garti, N. Capítulo de libro “An Overview of the Past, Present, and Future of Organogels” de “Edible Oleogels: Structure and Health Implications” AOCS Press 1:1-18 **2011**
- March, T.L; Johnston, M.R.; Duggan, P.J.; Gardiner, J. “Synthesis, Structure, and Biological Applications of α-Fluorinated β-Amino Acids and Derivatives” Chemistry & Biodiversity 9: 2410-2441 **2012**
- Marquardt, D. “An Algorithm for Least-Squares Estimation of Non-Linear Parameters” SIAM Journal on Applied Mathematics 11(2): 431-441 **1963**
- Martinez, M.J., Ruiz-Henestrosa, V.M.P.; Sánchez, C.C.; Rodriguez Patino, J.M., Pilosof, A.M.R. “Foaming and Surface Properties of Casein Glycomacropeptide-gelatin Mixture as Affected by their Interactions in the Aqueous Phase” Food Hydrocolloids 33:48-57 **2013**
- Mao, R; Tang, J.; Swanson, B.G. “Relaxation Time Spectrum of Hydrogels by CONTIN Analysis” Journal of Food Science 65(3): 374-380 **2000**
- McClements, D.J. “Protein-Stabilized Emulsions” Current Opinion in Colloid & Interface Science 9-5: 305-313 **2004**

- McClements D.J. Capítulo de libro “Emulsion stability”. De “Food emulsions: principles, practices, and techniques”, 2nd ed. New York, USA: CRC Press; 269-339 **2005**.
- McClements, D.J. “Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability” Critical Reviews in Food Science and Nutrition 47: 611-649 **2007**
- McClements, D.J.”Advances in Fabrication of Emulsions with Enhanced Functionality Using Structural Design Principles” Current Opinion in Colloid & Interface Science 17: 235-245 **2012**
- McClements, D.J. “Utilizing Food Effects to Overcome Challenges in Delivery of Lipophilic Bioactives: Structural Design of Medical and Functional Foods” Expert Opinion in Drug Delivery Publicado online, DOI: 10.1517/17425247.2013.837448 **2013**
- Méhn, D.; Fonseca, A.; Bister, G.; Nagy, J.B. “A Comparison of Different Preparation Methods of Fe/Mo/Al2O3 Sol-gel Catalyst for Synthesis of Single Wall Carbon Nanotubes” Chemical Physics Letters 393-4: 378-384 **2004**
- Mengual, O.; Meunier, G.; Cayré, I.; Puech, K.; Snabre, P. “Characterisation of Instability of Concentrated Dispersions by a New Optical Analyser: the Turbiscan MA 1000” Colloids and Surfaces A 152:111-123 **1999a**

- Mengual, O.; Meunier, G.; Cayré, I.; Puech, K.; Snabre, P. “TURBISCAN MA 200: Multiple Light Scattering Mesurement for Concentrated Emulsion and Suspension Instability Analysis” Talanta 50: 445-456 **1999b**
- Mertens, H.D.T; Svergun, D. “Structural Characterization of Proteins and Complexes using Small-angle X-ray Solution Scattering” Journal of Structural biology 172: 128-141 **2010**
- Metropolis, N.; Rosenbluth, A.W.; Rosenbluth, M.N.; Teller, A.H. Teller, E. “Equation of State Calculations by Fast Computing Machines” Journal of Chemical Physics 21(6): 1087-1092 **1953**
- Mills, P.; Snabre, P. “Settling of a Suspensión of Hard Spheres” Europhysics Letters 25:651-656 **1994**
- Mirhosseini, H.; Tan, C.P.; Hamid, N.S.A.; Yusof, S. “Effect of Arabic Gum, Xantan Gum and Orange oil on Flavor Release from Diluted Orange Beverage Emulsion” Food Chemistry 107: 1161-1172 **2008**
- Mohan, S.; Narsimhan, G. “Coalescence of Protein-stabilized Emulsions in a High-pressure Homogenizer” Journal of Colloid and Interface Science 192: 1-15 **1997**
- Moitzi, C.; Menzel, A.; Schurtenberger, P.; Stradner, A. “The pH Induced Sol-Gel Transition in Skim Milk Revisited. A Detailed Study Using Time-Resolved Light and X-ray Scattering Experiment” Langmuir 27: 2195-2203 **2011**
- Morales, V.L.; Parlange, J.; Wu, M.; Pérez-Reche, F.J.; Zhang, W.; Sang, W.; Steenhuis, T.S. “Surfactant-Mediated Control of Colloid Pattern

Assembly and Attachment Strength in Evaporating Droplets" Langmuir 29: 1831-1840 **2013**

- Narchi, I.; Vial, Ch.; Djelveh, G. "Effect of Protein-Polysaccharide Mixtures on the Continuous Manufacturing of Foamed Food Products" Food Hydrocolloids 23: 188-201 **2009**
- Narine, S.S.; Humphrey, K.L.; Bouzidi, L. "Modification of the Avrami Model for Application to the Kinetics of the Melt Crystallization of Lipids" Journal of the American Oil Chemist' Society 83(11): 913-921 **2006**
- Nonaka, M.; Sakamoto, H.; Toiguchi, S.; Kawajiri, H.; Soeda, T.; Motoki, M. "Sodium Caseinate and Skim Milk Gels Formed by Incubation with Microbial Transglutaminase" Journal of Food Science 57(5): 1214-1241 **1992**
- Nozaki, K.; Hikosaka, M. Capítulo de libro "Nucleation and Growth in the Solid-Solid Phase Transition of n-alkanes" de "Crystallization and Processes in Fat and Lipid Systems" Marcel Dekker, Ink. 4: 151- 176 **2001**
- Oldenbourg, R. "Polarized Light Field Microscopy: An Analytical Method Using a Microlens Array to Simultaneously Capture both Conoscopic and Orthoscopic Views of Birrefringent Objects" Journal of Mcroscopy 231: 419-432 **2008**
- Oliveira C.L.P Capítulo de libro "Investigating Macromolecular Complexes in Solution by Small Angle X-Ray Scattering" de "Current Trends in X-Ray Crystallography" InTech 16:367-392 **2011**
- Oliveira C.L.P.; Gerbelli, B.B.; Silva, E.R.T.; Nallet, F.; Navailles, L.; Oliveira E.A.; Pedersen, J.S. "Gaussian deconvolution: a useful method for a form-

free modeling of scattering data from mono- and multilayered planar systems" Journal of Applied Crystallography 45:1278-1286 **2012**

- Orthaber, D.; Bergmann, A.; Glatter, O.; "SAXS experiments on Absolute Scale with Kratky Systems Using Water as a Secondary Standard" Journal of Applied Crystallography 33:218-225 **2000**
- Ossowski, S.; Jackson, A.; Obiols-Rabasa, M.; Holt, C.; Lenton, S.; Porcar, L.; Paulsson, M.; Nylander. "Aggregation Behavior of Bovine κ-and β-Casein Studied with Small Angle Neutron Scattering, Light Scattering, and Cryogenic Transmission Electron Microscopy" Langmuir 28(38): 13577-13588 **2012**
- Pan, A.C.; Rappl, T.J.; Chander, D.; Balsara, N.P. "Neutron Scattering and Monte Carlo Determination of the Critical Nucleus Size with Quench Depth" The Journal of Physical Chemistry B. 110(8): 3692-3696 **2006**
- Pecora, R. capítulo de libro "Introduction" del libro "Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy" Plenum Press, 1:1-6 **1985**
- Pedersen, A. "Puff Pastry Butter- A new Product in the Dairy Industry" Special Issue of: Danish Dairy and Food Ind. **1988**
- Pedersen, J.S.; Posselt D.; Mortensen, K. "Analytical Treatment of the Resolution Function for Small-angle Scattering" Journal of Applied Crystallography 23: 321-333 **1990**

- Pedersen, J.S. “Model-Independent Determination of the Surface Scattering-Length-Density Profile from Specular Reflectivity Data” Journal of Applied Crystallographic 25: 129-145 **1992**
- Pedersen, J.S. “Analysis of Small-Angle Scattering Data from Colloids and Polymer Solutions: Modeling and Least-squares Fitting” Advances in Colloid and Interface Science 70:171-210 **1997**
- Pedersen, J.S. Capítulo de libro “Modelling of Small-angle Scattering Data from colloids and Polymer systems” de “Neutrons, X-ray and Light” Elsevier 16: 391-420 **2001**
- Percus, J.K.; Yevick, G.J. “Analysis of Classical Statistical Mechanics by Means of Collective Coordinates” Physical Reviews 110:1-13 **1958**
- Perullini, M.; Rivero, M.M.; Jobbágy, M.; Mentaberry, A.; Bilmes, S.A. “Plant Cell Proliferation Inside an Inorganic Host” Journal of Biotechnology 127(3): 542-548 **2007**
- Pikunic, J.; Clinard, C.; Cohaut, N.; Gubbins, K.E.; Guet, J.M.G.; Pellenq, J.M.; Rannou, I.; Rouzaud, J.N. “Structural Modeling of Porous Carbons: Constrained Reverse Monte Carlo Method” Langmuir 19:8565-8582 **2003**
- Provencher, S. “CONTIN: A General Purpose Constrain Regularization Program for Inverting Noisy Linear Algebraic and Integral Equations” Computer Physics Communications 27-3:229-242 **1982**
- Radford, S.J.; Dickinson, E. “Depletion Flocculation of Caseinate-stabilized Emulsions: What is the Optimun Size of the Non-adsorbed Protein Nano-Particles?” Colloids and Surfaces A 238: 71-81 **2004**

- Radford, S.J.; Dickinson, E.; Golding, M. “Stability and Rheology of Emulsions Containing Sodium Caseinate: Combined Effects of Ionic Calcium and Alcohol” Journal of Colloid and Interface Science 274: 673-686 **2004**
- Rai, V.; Dey, N Capítulo de libro “The Basics of Confocal Microscopy” de “Laser Scanning: Theory and Practice” 5:75-96 **2011**
- Ramos, C.H.I. Oliveira, C.L.P. Fan, C.Y.; Torriani, I.L.; Cyr, D.M. “Conserved Central Domains Control the Quaternary Structure of Type I and Type II Hsp40 Molecular Chaperones” Journal of Molecular Biology 383(1): 155-166 **2008**
- Riello, P.; Mattiazzi, M.; Pedersen, J.S.; Benedetti, A. “Time-Resolved in Situ Small-Angle X-ray Scattering Study of Silica Particle Formation in Nonionic Water-in-Oil Microemulsions” Langmuir 24(10):5225-5228 **2008**
- Rincón-Cardona, J.A.; Martini, S.; Candal, R.J.; Herrera, M.L. “Polymorphic Behavior During Isothermal Crystallization of High Stearic High Oleic Sunflower Oil Stearin” Food Research International 51: 86-97 **2013a**
- Rincón-Cardona, J.A.; Huck-Iriart, C.; Herrera, M.L. Capítulo de libro “Application of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) in Foods” de “Confocal Laser Microscopy – Principles and Applications in Medicine, Biology and the Food Sciences. InTech Open 11: 203-234 **2013b**
- Robinson, A.L. Capitulo de libro “History of Synchrotron Radiation” de “ X-Ray Data Booklet” 3ra edición Lawrence Berkeley National Laboratory 2:21-32 **2009**

- Rodríguez-Patino, J.M; Pilosof, A.M.R. “Protein-Polysaccharide Interactions at Fluid Interfaces” Food Hydrocolloids 25: 1925-1937 **2011**
- Rousseau, D.; “Fat Crystals and Emulsion Stability-a Review” Food Research International 33: 3-14 **2000**
- Rousset, P. Capítulo de libro “Theory: Kinetics of Crystallization” de “Physical Properties of Lipids” Marcel Dekker, Inc. 1:1-36 **2002**
- Ruan, R.R.; Chen, P.L. Libro titulado “Water in Foods and Biological Materials: A nuclear magnetic resonance approach” Technomic Publishing Company, Inc. **1998**
- Sakamoto, M.; Ohba, A.; Kuriyama, J.; Maruo, K.; Ueno, S.; Sato, K. “Influences of Fatty Acid moiety and esterification of Polyglycerol Fatty Acid Esters on the Crystallization of Palm Mid Fraction in Oil-in-water Emulsion” Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 37: 27-33 **2004**
- Sakurai, J.J.; Napolitano, J.J. Libro titulado “Modern Quantum Mechanics” 2da edición, Addison-Wesley **2011**
- Sato, K. “Crystallization Behaviour of Fats and Lipids –a Review” Chemical Engineering Science 56: 2255-2265 **2001**
- Sato, K.; Ueno, S. Capítulo de libro “Molecular Interactions and Phase behavior of Polymorphic Fats” de “Crystallization Processes in Fat and Lipid Systems” Marcel Dekker, Inc. 5: 177-210 **2001**
- Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. “NIH Imagen to ImageJ: 25 Years of Image Analysis” Nature Methods 9: 671-675 **2012**

- Schmitt, C.; Sanchez, C.; Thomas, F.; Hardy, J. “Complex Coacervation Between β-lactoglobulin and Acacia Gum in Aqueous Medium” Food Hydrocolloids 13(6): 483-496 **1999**
- Schramm, L.L. Libro titulado “Emulsions, Foams and Suspensions” Wiley-VCH **2005**
- Sedev, R.; Exerowa, D. “DLVO and non-DLVO Surface Forces in Foam Films from Amphiphilic Block Copolymers” Advances in Colloids and Interface Science 83: 111-136 **1999**
- Sefcik, J.; Verduyn, M.; Storti, G.; Morbidelli, M. “Charging of Latex Particles Stabilized by Sulfate Surfactant” Langmuir 19: 4778-4783 **2003**
- Shallengberger, R.S. “Hydrogen Bonding and the Varying Sweetness of the Sugars” Journal of Food Science 28(5):584-589 **1963**
- Shapero, WH; El Toro; Cane, A. “Molding Composition and Method of Molding” US-Patents 3.809.661 **1974**
- Sijbers, J.; den Dekker, A.J. “Maximun Likehood Estimation of Signal Amplitud and Noise Variance from MR Data” Magnetic Resonance in Medicine 51(3): 586-594 **2004**
- Silva, J.C.; Plivelic, T.S. Herrera, M.L.; Ruscheinsky, N.; Kieckbusch, T.G.; Luccas, V.; Torriani, I.L. “Polymorphic Phases of Natural Fat from Cupuassu (Teobroma Grandiflorum) Beans: A WAXS/SAXS/DSC Study” Crystal Growth and Desing 9: 5155-5163 **2009**

- Silva, J.C.; Borges, J.C. Cyr, D.M. Ramos C.H.I.; Torriani, I.L. “Central Domain Deletions Affect the SAXS Solution Structure and Function of Yeast Hsp40 Protein Sis1 and Ydj1” BMC Structural Biology 11: 1472-680 **2011**
- Smith, K.W.; Bhaggan, K.; Talbot, G.; van Malssen, L.F. “Crystallization of Fats: Influence of Minor Components and Additives” Journal the American Oil Chemist’ Society 88: 1085-1101 **2011**
- Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Colma, M.J. “Nano-emulsions” Current Opinion in Colloid and Interface Science 10: 102-110 **2005**
- Soler-Illia, G.J.A.A.; Sanchez, C.; Lebeau, B.; Patalin, J. “Chemical Strategies to Desing Textured Materials: from Microporous and Mesoporous Oxides to Nanonetworks and Hierarchical Structures” Chemical Reviews 102: 4093-4138 **2002**
- Sosa, N. “Efecto de la Trehalosa sobre la Encapsulación de Aromas Cítricos por Secado Spray” tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina **2012**
- Spyropoulos, F.; Portsch, A. Norton, I.T. “Effect of Sucrose on the Phase and Flow Behaviour of Polysaccharide/Protein Aqueous Two-phase Systems” Food Hydrocolloids 24:217-226 **2010**
- Tabor, R.F.; Chan, D.Y.C.; Grieser, F.; Degastine, R.R. “Structural Forces in Soft Matter Systems” The Journal of Physical Chemistry Letters 2: 434-437 **2011**

- Tanaka. Y. Capítulo de libro “Viscoelastic Properties of Sol-Gel Transition” de “Reology” InTech Open 2:29-58 **2012**
- Tangsuphoom, N.; Coupland, J.N. “Effect of surface-active Stabilizers on the Surface Properties of Coconut Milk Emulsions” Food Hydrocolloids 23: 1801-1809 **2009**
- Tcholakova, S.; Denkov, N.D.; Ivanov, I.B.; Cambell, B. “Coalescence Stability of Emulsions Containing Globular milk proteins” Advances in Colloid and Interface Science 123(126): 259-293 **2006**
- Tellier, C.; Guillou-Charpin, M.; Le Botlan, D.; Pelissolo, F. “Analysis of Low-Resolution, Low-Field NMR Relaxation Data with the Padé-Laplace Method” Magnetic Resonance in Chemistry 29(2):164-167 **1991**
- Texeira, J. “Small-angle Scattering by Fractal Systems” Journal of Applied Crystallography 21:781-785 **1988**
- Thivilliers, F.; Drelon, N.; Schimitt, V.; Leal-Calderon, F. “Bicontinuous Emulsion Gels Induced by Partial Coalescence: Kinetics and Mechanism” Europhysics Letters 76(2):332-338 **2006**
- Thompson, P.; Cox, D.E.; Hastings, J.B. “Rietveld Refinement of Debye-Scherrer Synchrotron X-ray Data from Al_2O_3” Journal of Applied Crystallographic 20: 79-83 **1987**
- Toro-Mendoza, J.; Petsev, D. “Brownian Dynamics of Emulsions Film Formation and Droplet Coalescence” Physical Review E 81: 051404 1-10 **2010**

- Treweek T. Capítulo de libro “Alpha-Casein as Molecular Chaperone” de “Milk Proteins” INTECH open, 3: 85-118 **2012**
- Tsang, L.; Kong, J.A.; Ding K. Libro titulado “Scattering of Electromagnetic waves – Theory and Applications” Wiley **2000.**
- van Laarhoven, P.J.M.; Aarts, E.H.L. capítulo “Simulated Annealing” del libro “Simulated Annealing: Theory and Applications” 2:7-15 **1987**
- Vanapalli, S.A.; Coupland, J.N. “Emulsions Under Shear- The Formation and Properties of Partially Coalesced Lipid Structures” Food Hydrocolloids 15:507-512 **2001**
- Vladisavijevic, G.T.; Schubert, H.”Influence of Process Parameters on Droplet Size Distribution in SPG Membrane Emulsification Stability of Prepared Emulsion Droplets” Journal of Membrane Science 225(1): 15-23 **2003**
- Vrijmoeth, J.; Stok, R.W.; Veldman, R.; Schoonveld, W.A.; Klapwijk, T.M. “Single Crystallites in Planar Polycrystalineoliogothiophe Films: Determination of Orientation and Thickness by Polarization Microscopy” Journal of Applied Physics 83: 3816-3824 **1998**
- Weik, M.; Ravelli, R.B.G.; Kryger, G.; McSweeney, S.; Raves, M.L.; Harel, M.; Gros, P.; Silman, I.; Kroon, J.; Sussman, J.L. “Specific Chemical and Structural Damage to Proteins Produced by Synchrotron Radiaton” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(2): 623-628 **2000**

- Wittry, D.V. “Rotating Anode X-Ray Source and Cooling Technique Therefor” US. Patents 4165472 **1979**
- Wright, A.J.; Hartel, R.W.; Narine, S.S.; Marangoni, A.G. “The Effect of Minor Components on Milk Fat Crystallization” Journal of the American Oil Chemists´ Society 77(5): 463-475 **2000**
- Wright, A.J.; Marangoni, A.G. Capítulo de libro “Effect of Minor Components of Milkfat Properties” de “Physical Properties of Lipids” Marcel Dekker, Inc. 5:125-159 **2002**
- Xu, X. Capítulo de libro “High Precision and Fast Functional Mapping of Brain Circuitry through Laser Scanning Photostimulation and Fast Dye Imaging” de “Laser Scanning: Theory and Applications” InTech 7:113-132 **2011**
- Yanagihara, M.; Yamashita, K. Capitulo de libro “X-ray Optics: Multilayers for Soft and Hard X-Rays” de “X-Ray Spectrometry: Recent Technological Advances” John Wiley & Sons 3: 63-78 **2004**
- Ye, A.; Gilliland, J.; Singh, H. “Thermal Treatment to Form a Complex Surface Layer of Sodium Caseinate and Gum Arabic on Oil-water Interfaces” Food Hydrocolloids 25:1677-1686 **2011**
- Yi, M. “Effects of Milk Fat in Chocolate Bloom” M.S. Thesis, University of Wisconsin-Madison **1993**
- Yuki, A.; Matsuda, K.; Nishimura, A. “Effect of Sucrose Polyesters on Crystallization Behavior of Vegetable Shortening and Margarine Fat” Journal of the Japanese Oil Chemistry’ Society 39(4):236-244 **1990**

- Zhai, J.; Miles, A.J.; Pattenden, L.K.; Lee, T.; Augustin, M.A.; Wallace, B.A.; Aguilar, M.; Wooster, T.J. “Changes in β-lactoglobulin Conformation at the Oil/Water Interface of Emulsions Studied by Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy” Biomacromolecules 11: 2136-2142 **2010**
- Zhai, J.; Wooster, T.J.; Hoffmann, S.V.; Lee, T.; Augustin, M.A.; Aguilar, M. “Structural Rearrangement of β-Lactoglobulin at Different Oil-Water Interfaces and Its Effect on Emulsion Stability” Langmuir 27: 9227-9236 **2011**
- Zimm, B.H. “The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions" The Journal of Chemical Physics 16:1093-1116 **1948**

9.2 Páginas Web

- Diamond: http://www.diamond.ac.uk/Home/About/Synchrotrons/World.html
- Fourier: http://www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/magic.html
- Lightsources: www.lightsources.org
- MiePlot: www.philiplaven.com
- SASfit: https://kur.web.psi.ch/sans1/SANSSoft/sasfit.html