Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Departamento de Química

**Cristalización de Ceras en Aceite de
Girasol**

Silvana Martini

**Tesis Doctoral
2003**

TESIS
Nº 974

DONACION.....

A.....

Fecha 26.09.03...

Inv Inv..... R

S7011

El presente trabajo de tesis para optar al
título de Doctor de la Facultad de Ciencias
Exactas fue realizado en el Centro de
Investigación y Desarrollo en Criotecnología
de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias
Exactas de la Universidad Nacional de La
Plata, bajo la dirección de la
Dra. María Cristina Añón.

TESIS
No 974.

Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

DONACION.....
▲.....
Fecha 28.04.03
Inv. E..... Inv..... B. 5704

A Mami y Papi

A Nonno

A Lidia

Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme dado la posibilidad de emprender y desarrollar este trabajo de investigación a través de la beca de “Formación de Postgrado” que me fue otorgada.
- A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme incorporado en sus claustros, permitiéndome optar al grado de Doctor en la Facultad de Ciencias Exactas.
- A la Doctora María Cristina Añón por haber aceptado dirigir el presente trabajo de tesis con responsabilidad y dedicación aportando su guía, visión concreta y respaldo durante el desarrollo del mismo.
- A Lidia por sus consejos profesionales y personales.
- A Mabel por “inyectar” sus pensamientos en el momento adecuado.
- A Claudio y Alejandro por entender los días poblados en el box.
- A los chicos del laboratorio, Valeria, Lucas y Marina por su compañerismo y amistad.
- A Arturo y Mario por sus consejos prácticos en el laboratorio.
- A Manuel, Alejandra, Silvina, Marina G., Marina D., Alejandro G., Alejandro C. por compartir el primer turno de almuerzos y leer esos horóscopos interminables.
- A todos los chicos de los laboratorio de Vegetales y Proteínas por tener siempre un mate para convidar.
- A la Dra. Alicia Chaves por sus consejos en Cromatografía Gaseosa.
- A Aldo y Walter por su paciencia con el Cromatógrafo.
- A Cachito, Rodrigo, Martín, Graciela y Andrea que a pesar de no estar en estos momentos me ayudaron y alentaron en mis primeros días de trabajo en la investigación.
- Al equipo de Ingenieros Electrónicos que me ayudaron con el funcionamiento de los equipos.

- A Tortu por estar siempre ahí cuando surge una emergencia.
- A los chicos del taller por su colaboración frente a problemas cotidianos del laboratorio.
- A Diana, Cecilia, Lorenza y Sergio por su colaboración en la búsqueda bibliográfica.
- A Liliana por entender mis pisadas en su piso mojado.
- Al personal del CIDCA en general por su compañerismo y amistad.
- A los chicos de la Cátedra de Química Orgánica II de Farmacia, José, Silvia y Pedro, por su apoyo.
- A Valen por su amistad incondicional.
- A mi Familia por su paciencia y apoyo durante tantos años de estudio.

Gracias!

Los contenidos de este trabajo de tesis han sido publicados los siguientes Congresos Internacionales y Revistas Científicas:

Revistas Internacionales con Referato

- ♦ **“Determination of Wax Concentration in Sunflower-seed Oil”** Martini, S. y Añón, M.C.; *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 77:1087-1092 (2000)
- ♦ **“Effect of Cooling Rate on Nucleation Behavior of Milk Fat-Sunflower Oil Blends”** Martini, S., Herrera, M.L. y Hartel, R.W.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 49, Issue 7, pag. 3223-3229 (2001)
- ♦ **“Practical Considerations in Nucleation Studies”** Martini, S. y Herrera, M. L.; *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 79:411-412 (2002)
- ♦ **“Crystallization of Sunflower Oil Waxes”** Martini, S. y Añón, M.C.; aceptado para ser publicado en *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, (Febrero 2003-J10321)
- ♦ **“Storage of Sunflower-seeds: Effect on the Wax Content of the Oil”** Martini, S. y Añón, M.C.; en redacción para ser enviado al *Journal of Food Science*

Congresos Internacionales

- ♦ **“Determination of Wax Concentration in Sunflower-seed Oil.”** Martini, S. y Añón, M.C.; presentado en “AOCS-OTAI International Conference & Exhibition on Oil Seed & Vegetable Oil Processing.” 19-21 de Febrero de 1999. New Delhi, India. (Poster)
- ♦ **“Comparison of Different Methods to Determine Wax Concentration in Sunflower-seed Oil.”** Martini, S. y Añón, M.C.; presentado en “90th AOCS Annual Meeting & Expo.” 9-12 de Mayo de 1999. Orlando, Florida, USA. (Poster)

- ♦ **“Effect of Cooling Rate on Nucleation Behavior of Milk Fat-Sunflower Oil Blends.”** Martini, S., Herrera, M.L. y Hartel, R.W.; presentado en “91st AOCS Annual Meeting & Expo.” 25-28 de Abril del 2000. San Diego, California, USA. (Poster)

- ♦ **“Cristalización de Ceras en Aceite de Girasol.”** Martini, S. y Añón M.C.; presentado en “Lipidex Sudamerica 2001” 19-21 de Marzo de 2001. Buenos Aires, Argentina. (Poster)

- ♦ **“Effect of Storage Conditions on Crystallization of Sunflower-Seed Oil Waxes.”** Martini, S. y Añón, M.C. ; “92nd AOCS Annual Meeting & Expo” 13-16 de Mayo del 2001. Minneapolis, Minnesota, USA. (Poster)

- ♦ **“Thermal Behavior of Sunflower Oil Waxes”**; Martini, S.; Añón, M.C. y Hartel, R.W.; “World Conference and Exhibition on Oilseed and Edible, Industrial and Specialty Oils: Sources, Processing, By-Products, Utilization and Feed Formulations, Applications and Functionality”. 12-15 de Agosto del 2002, Estambul, Turquía.

Indice**Capítulo 1: Introducción**

1.1. Conceptos generales	1
1.2. Historia del girasol	2
1.3. Estructura de la semilla	4
1.4. Etapas en la producción de aceite de girasol	5
1.4.1. Almacenamiento	5
1.4.2. Descascarado	6
1.4.3. Extracción	7
1.4.4. Refinación	9
<i>a) Refinación convencional</i>	
<i>b) Refinación física</i>	
1.5. Diferentes tecnologías de extracción de ceras	15
1.5.1. Degomado en frío	16
1.5.2. Super Unidegomado	16
1.5.3. Descerado por filtración	17
1.5.4. Neutralización en frío	17
1.5.5. Descerado por vía húmeda	18
1.5.6. Filtración de pulido en frío	19
1.6. Determinación del contenido de ceras en el aceite	20
1.7. Aplicaciones prácticas de grasas y aceites	21
1.7.1. Manteca	21
1.7.2. Margarinas	23
1.7.3. Otros usos alimenticios	23
1.8. Objetivos generales	24

Capítulo 2: Desarrollo de un método turbidimétrico para determinar concentración de ceras en aceite de girasol (turbidimetría de luz polarizada)

2.1. Introducción	26
2.1.1. Remoción de ceras presentes en el aceite de girasol	27
2.1.2. Contenido de cera y estabilidad al frío	28
2.1.3. Determinación del contenido de ceras en aceite de girasol	30
2.2. Objetivo	31
2.3. Materiales y métodos	31
2.3.1. Aceite libre de ceras	31
2.3.2. Ceras libre de aceite	31
2.3.3. Soluciones de ceras	31
2.3.4. Determinación del contenido de ceras	31
2.3.5. Cristalización isotérmica (turbidimetría de luz polarizada)	33
2.3.6. Método turbidimétrico convencional	33
2.3.7. Microscopía óptica	34
2.3.8. Cold Test	35
2.3.9. Estudio Estadístico	35
2.4. Resultados	35
2.4.1. Sistema óptico (turbidimetría de luz polarizada)	35
2.4.2. Temperaturas de cristalización	37
2.4.3. Relación entre los tiempos de inducción y la concentración de ceras	42
2.4.4. Determinación de la concentración de ceras	45
2.4.5. Comparación de distintos métodos	45
2.4.6. Estudio estadístico	48
2.4.7. Aplicación del método desarrollado a muestras de aceites refinados, semi-refinados y crudos	51
2.5. Conclusiones	54

Capítulo 3: Cristalización de ceras en aceite de girasol. Diferencias y similitudes con la cristalización de un fundido (grasa de leche-aceite de girasol)

3.1. Introducción	56
--------------------------	----

3.1.1. Mecanismos involucrados en el proceso de sobre-saturación y sobre-enfriamiento	58
a) <i>Soluciones</i>	
b) <i>Fundido</i>	
3.1.2. Nucleación	60
a) <i>Nucleación homogénea</i>	
b) <i>Nucleación heterogénea</i>	
c) <i>Nucleación secundaria</i>	
d) <i>Parámetros que influyen sobre la nucleación</i>	
3.1.3. Cinética de nucleación	62
a) <i>Tiempos de inducción</i>	
b) <i>Principios de la teoría de nucleación</i>	
c) <i>Energías libres de activación para la nucleación</i>	
d) <i>Nucleación heterogénea</i>	
e) <i>Nucleación secundaria</i>	
3.1.4. Crecimiento cristalino	70
3.1.5. Maduración	75
3.1.6. Morfología cristalina	76
3.1.7. Cambios de fase	77
3.1.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	79
a) <i>DSC de flujo calórico</i>	
b) <i>DSC de compensación de energía</i>	
3.1.9. Microscopía de luz polarizada	81
3.1.10. Difractometría de Rayos X	84
3.2. Objetivos	85

PARTE A: Sistema compuesto por soluciones de ceras en aceite de girasol

3.3. Materiales y Métodos	86
3.3.1. Ceras purificadas y soluciones de ceras	86
3.3.2. Cálculo de energías de activación para la nucleación a partir de soluciones	86
a) <i>Medida de los tiempos de inducción</i>	

<i>b) Cálculo de las energías de activación</i>	
3.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	88
<i>a) Soluciones de ceras</i>	
<i>b) Ceras purificadas</i>	
3.3.4. Microscopía de luz polarizada (MLP)	89
3.3.5. Difractometría de Rayos X (XRD)	89
3.4. Resultados	90
3.4.1. Cálculo de energías de activación para la nucleación	
a partir de soluciones	90
<i>a) Variación de los tiempos de inducción con la sobre-saturación del sistema y la temperatura de cristalización</i>	
<i>b) Variación de las energías de activación con la sobre-saturación y la temperatura de cristalización</i>	
<i>c) Variación de la energía de activación con la temperatura de cristalización</i>	
3.4.2. Comportamiento térmico de las ceras de aceite de girasol	97
<i>a) Ceras purificadas</i>	
<i>b) Ceras en solución</i>	
3.4.3. Difractometría de Rayos-X de los cristales de ceras	108
3.4.4. Morfología de los cristales de ceras	109

PARTE B: Sistema compuesto por mezclas de grasa de leche y aceite de girasol (cristalización a partir de un fundido)

3.3. Materiales y Métodos	113
3.3.1. Mezclas de grasa de leche y aceite de girasol	113
3.3.2. Cálculo de energías de activación para la nucleación	
a partir de un fundido	113
<i>a) Medida de los tiempos de inducción</i>	
<i>b) Cálculo de energías de activación para la nucleación</i>	
3.3.3. Cálculo de los puntos de fusión	114
3.3.4. Cálculo de la composición de las muestras	115
3.3.5. Microscopía de luz polarizada (MLP)	115
3.3.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	116

3.3.7. Difractometría de Rayos X (XRD)	116
3.4. Resultados	116
3.4.1. Cálculo de energías de activación a partir de un fundido	116
<i>a) Cálculo de los tiempos de inducción</i>	
<i>b) Cálculo de las energías de activación</i>	
3.4.2. Comportamiento térmico de las distintas mezclas	
de grasa de leche y aceite de girasol	122
3.4.3. Difracción de rayos X en mezclas	
de grasa de leche y aceite de girasol	125
3.4.4. Composición de los cristales	125
3.4.5. Morfología de los cristales	127
3.5. Conclusiones	130
<i>a) Soluciones de ceras en aceite de girasol</i>	
<i>b) Mezclas de grasa de leche y aceite de girasol</i>	

Capítulo 4: Aplicación Práctica: Efecto de las Condiciones de Almacenamiento de la Semilla de Girasol sobre el Contenido de Ceras del Aceite obtenido.

4.1. Introducción	133
4.1.1. Crecimiento y rendimiento	135
4.1.2. Manipulación de la semilla de girasol	138
<i>a) Cosecha</i>	
<i>b) Condiciones de almacenaje</i>	
<i>c) Equipamiento</i>	
4.1.3. Efecto de factores externos en el cultivo de semillas	
de girasol sobre la calidad del aceite	140
4.1.4. Estabilidad del aceite frente a factores externos	142
4.1.5. Diseños experimentales para el análisis de ceras	143
4.2. Objetivos	144
4.3. Materiales y Métodos	145
4.3.1. Almacenamiento de semillas de girasol	145
4.3.2. Obtención de aceite de girasol	145

4.3.3. Cristalización isotérmica de ceras	145
4.3.4. Separación de ceras. Extracción en fase sólida (SPE)	145
4.3.5. Cromatografía gaseosa-capilar (CGL)	146
4.3.6. Aceite libre de ceras	147
4.3.7. Índice de acidez	147
4.3.8. Determinación de fósforo	147
4.4. Resultados	148
4.4.1. Obtención de aceite de girasol. Rendimiento	148
4.4.2. Determinación del contenido de ceras	150
<i>a) Turbidimetría de luz polarizada</i>	
<i>b) Método microscópico</i>	
4.4.3. Determinación de la composición de ceras. CG	155
4.5. Conclusiones	162

Capítulo 5: Conclusiones Generales

5. Conclusiones generales	163
Bibliografía	170

Capítulo 1

Introducción

Capítulo 1: Introducción

1.1. Conceptos generales.

Los lípidos que forman parte de la dieta humana provienen de productos alimenticios derivados de plantas tropicales, semillas, animales y pescados. Algunos de éstos productos pueden ser consumidos en su estado natural, como es el caso del maní (incorporación de lípidos, proteínas y carbohidratos); sin embargo, otros productos son procesados para extraer la porción grasa. Esta porción es purificada para remover los componentes que afectan adversamente el color, sabor, valor nutricional, estabilidad o facilidad de manipuleo incluyendo la incorporación a otros productos alimenticios. La tecnología empleada varía considerablemente según el tipo de material, su ubicación geográfica, su valor monetario y las características de los subproductos que surgen del procesamiento. Por ejemplo, las semillas de algodón se cultivan por la fibra y no por el aceite, por lo tanto la obtención de aceite no debe influir en el rendimiento y la calidad de la fibra.

Las grasas y aceites se encuentran en semillas oleaginosas (18-70%), pulpa de frutos (30-58%), tejidos animales (60-90%) y pescados (10-20%). El método utilizado para la remoción del aceite depende del origen de la muestra. Por ejemplo, las semillas oleaginosas generalmente poseen una gran porción de material sólido asociado con los lípidos, requiriendo algún tipo de tratamiento térmico antes de ser sometidos al proceso de extracción del aceite por medio del prensado o de solventes (Gunstone y Norris, 1983).

Desde el punto de vista químico, las grasas son ésteres del glicerol y ácidos grasos; sin embargo, las empleadas para el consumo humano son mezclas de diferentes sustancias: pueden contener ácidos grasos libres, mono y di-glicéridos, proteínas, vitaminas, antioxidantes, pigmentos, saborizantes, sales minerales e incluso, tanto en productos naturales como procesados, pueden formar emulsiones acuosas. Las grasas son llamadas aceites cuando son líquidas a

temperatura ambiente, (aproximadamente 25 °C); dentro de ésta categoría se incluyen generalmente a la mayoría de las grasas de origen vegetal y marino. Sin embargo, algunas como las grasas de palma, coco y nuez de palma son sólidas a esta temperatura. En algunas zonas templadas y frías de Europa y Estados Unidos el tipo de producto graso más utilizado por el público es el aceite de ensalada. En éstas regiones los aceites también son extensamente usados en la industria para el fritado, para conservar sardinas, anchoas, pescados y productos cárneos. Con igual fin, el aceite de girasol es muy empleado en algunos países orientales, en el este de Europa así como también en Estados Unidos.

1.2. Historia del Girasol.

El girasol (*Helianthus annuus*) ha sido considerado como una flor de decoración hasta el siglo 19; a partir de entonces fue cultivado como una planta oleaginosa en Rusia. A modo informativo comentaremos que las primeras investigaciones fueron llevadas a cabo en dicho país permitiendo aumentar el porcentaje de aceite en la semilla de un 25 a un 46%. Este incremento en el porcentaje de aceite fue posible no sólo por un aumento del contenido de aceite en la pepa sino también por una disminución de la relación de peso entre la cáscara y la pepa. Hoy en día, el girasol es la planta oleaginosa que posee un mayor rendimiento de aceite. Debido a su alto contenido de vitamina B y de proteína y también por su balance en la composición de aminoácidos, los “pellets” de girasol pueden ser comparados con los mejores pellets por tradición (soja o mani). Sin embargo, el porcentaje relativamente alto de celulosa (7-15%) que se encuentra en éstos pellets puede limitar su utilidad como alimento para animales que no sean rumiantes. La única porción que queda sin usar de la semilla de girasol es la cáscara y su empleo constituye un problema industrial importante. Como sucede con otras semillas oleaginosas la producción de aceite libera una enorme cantidad de este producto secundario. Debido a su baja densidad, el almacenamiento de la cáscara de la semilla necesita gran espacio físico, por lo cual los productores de aceite buscan deshacerse de él. A pesar de que ha sido

difícil encontrar una forma productiva de uso, en general se la puede emplear para la generación de calor, alimentación de ganado, extracción de xilosas y producción de furfural.

En 1820 se llevaron a cabo en Rusia las primeras siembras de girasol, alcanzando en 1867 una producción de aceite de 14 mil toneladas. Dicha producción fue obtenida a partir de semillas que contenían aproximadamente un 30% de lípidos (Sullivan, 1980). En los Estados Unidos, la producción de girasol comenzó a tener importancia recién en la década del 60, antes de esta época era considerado un oleaginoso secundario. En este país en el año 1966, la producción de semilla de girasol fue de 30 mil toneladas aumentando en 1970 a 85 mil toneladas, cantidad insuficiente para la producción en gran escala. En 1979 la producción de semillas alcanzó 3,6 millones de toneladas de las cuales 2,9 millones poseían un alto contenido de aceite (ESCS, 1980). La producción mundial de girasol (Bolsa de Cereales de Buenos Aires, 1985) se ha incrementado en un 50% de 1974 a 1984, siendo la Unión Soviética el principal productor con 4,5 millones de toneladas. Este valor representa el 13,8 % de la producción mundial, colocándose, la Unión Soviética en el segundo lugar entre los países productores. Con respecto a la elaboración de aceite en nuestro país, ésta aumento de 118 mil toneladas en 1964 a 802 mil toneladas en 1984 (Bolsa de Cereales, 1985) siendo, junto con la producción de aceite de soja, la de mayor crecimiento e importancia de los últimos 20 años. El valor de producción de aceite de girasol alcanzado en el año 1993 fue de 2,6 millones de toneladas y en el año 2000 de 4,9 millones de toneladas (INDEC, 2000).

El aumento mundial y nacional en la producción de semillas de girasol y su utilización para la elaboración de aceites comestibles se debe, no sólo al aumento del área sembrada sino también a la aparición de semillas híbridas las cuales tienen un mayor contenido de aceite que las semillas de principios de este siglo (Nolasco y col., 2000). Las primeras experiencias tendientes a obtener este tipo de semillas fueron realizadas en 1927 obteniéndose una variedad con un contenido de aceite del 35% (Sullivan, 1980). Con posterioridad han aparecido semillas híbridas en diferentes países cuyo contenido en aceite varía entre 49-69% (Lopez-Andreu y col., 1982; Fick, 1983). El aumento en el porcentaje de aceite en las

semillas híbridas trae aparejado, tal como se mencionó anteriormente, una disminución en el contenido de cáscara de las mismas (Morrison III y col., 1981). También se observaron cambios en las características estructurales y composición química de éste tipo de semillas. Earle y col. (1968) mostraron la variación del contenido de cáscara, humedad, proteínas y aceite en las semillas y el contenido de los tres últimos parámetros en la cáscara y en la pepita de once variedades. Como regla general, se puede decir que un aumento en el contenido de la cáscara provoca una disminución en el porcentaje de aceite y un ligero incremento de la humedad de la semilla. Los mismos autores mostraron que todas la variedades estudiadas contenían mayoritariamente en sus triglicéridos ácido oleico y linoléico. Datos similares fueron obtenidos por otros autores (Santalla y col., 1993). El contenido de estos ácidos grasos está influenciado por la variación de factores ambientales durante el período de crecimiento del cultivo (Fick, 1983; Purdy, 1986) y por factores genéticos (Putt y col., 1969).

Además de la existencia de semillas híbridas, existen otros factores que incidirían en el contenido de aceite de las semillas tales como: época de siembra (Unger, 1980), zonas con distintos climas (Ghanavati y col., 1981), tiempo de maduración de la semilla (Dedio, 1985), tamaño de la semilla (Afzalpurkar y Lakshminarayana, 1980), cantidad de plantas por hectárea (Holt y Campbell, 1984) y utilización de fertilizantes (nitrógeno, fósforo, potasio).

1.3. Estructura de la semilla.

El girasol es una Angiosperma dicotiledónea perteneciente a la familia de las Asteraceae (Strasburger y col., 1994) que comprende tres subespecies principales: *Helianthus annuus* ssp *lenticularis*, girasol silvestre; *Helianthus annuus* ssp *annuus*, girasol maleza y *Helianthus annuus* ssp *macrocarpus*, girasol cultivado por sus frutos comestibles. Las flores de esta familia están agrupadas en cabezuelas compactas que simulan flores individuales, denominándose a toda la flor, capítulo. Su fruto, seco e indehisciente está compuesto por el pericarpio y la semilla (Saumell, 1980). El pericarpio, de color blanco estriado, negro, pardo,

rojo o violáceo; es seco y fibroso y tiene por función proteger la semilla. Su espesor varía según la variedad, generalmente es mayor en las variedades estriadas donde llega a ser un 40 % del fruto y menor en las negras en las cuales representa el 25 % del mismo. La semilla está compuesta por: el embrión, el endosperma (donde se almacenan las sustancias albuminoideas y oleaginosas), y las membranas y tegumentos. Es importante aclarar que la terminología botánica no coincide con la que se utiliza en la industria aceitera. Lo que en la primera se denomina fruto, pericarpio y semilla, en la segunda se denomina semilla, cáscara y pepita respectivamente.

Respecto a la composición de las semillas, Dremer y col. (1983) trabajando con 74 variedades híbridas hallaron los siguientes valores promedio: 45,3% de aceite; 20,8% de proteínas; 3,5% de cenizas y 26,7% de cáscara. Por su parte Cancalon (1971) determinó que la cáscara proveniente de variedades híbridas está compuesta por 50% de celulosa y lignina, 8,2% de agua, 2,1% de cenizas y 5,2% de lípidos de los cuales 3,0% está constituido por ceras. Las variaciones tanto en la composición de la semilla de girasol como en su contenido de aceites ha traído aparejado continuos cambios en los procesos de extracción y refinación del aceite (Merrien, 1998).

1.4. Etapas en la producción de aceite de girasol.

Las distintas etapas que conducen a la producción de aceite a partir de semillas oleaginosas son: almacenamiento de la semilla, descascarado, extracción del aceite (por prensado, solvente, extracción combinada y supercrítica) y refinación. A continuación se describirá brevemente cada una de estas etapas.

1.4.1. Almacenamiento. Una vez que la semilla es cosechada se almacena en silos los cuales pueden contar con un sistema de secado-refrigerado que asegura una humedad determinada de las mismas. El control de la humedad favorece la disminución de la actividad enzimática y la reducción de la respiración y posterior maduración de los granos. Esta etapa puede mejorarse si previo al

almacenaje se realiza una limpieza del grano seguida de una etapa de secado-refrigerado y eventualmente de un reciclaje con aireación (Ruckenstein, 1981). Durante el secado se debe lograr que la humedad del grano sea menor al 9%, lo que incrementa el tiempo de almacenamiento. Es importante recordar que dicho tiempo no debe ser muy prolongado ya que esto trae aparejado una reducción en el contenido de aceite de la semilla (Carr, 1997).

1.4.2. Descascarado. El descascarado de la semilla antes de procesarla es una técnica común. Este procedimiento permite (Tranchino y col., 1984):

- Mejorar el tenor de proteínas de la harina por reducción del contenido de celulosa de la misma
- Disminuir considerablemente las pérdidas de aceite dado que las cáscaras presentan una gran porosidad que acentúa la adsorción de aceite durante la manipulación y procesamiento de la semilla
- Disminuir el contenido de ceras (la cáscara tiene un porcentaje de cera del orden del 3%)
- Utilizar las cáscaras en la elaboración de fertilizantes, como alimento para ganado vacuno, en la producción de paneles aglomerados y también como combustible de calderas.

El proceso de descascarado consta de dos etapas: en la primera se procede a la rotura de la semilla y en la segunda se separa la cáscara de la pepita. Existen diversas tecnologías para éste proceso, pero en todas ellas hay que tener en cuenta los siguientes factores: tamaño, humedad y tipo de grano a descascarar. En la industria el descascarado se realiza por prensado o aplastamiento de la semilla. Las prensas están compuestas por dos rodillos que pueden ser planos o acanalados, separados por una distancia que es función del tamaño y forma de la semilla.

En la actualidad existen técnicas modernas de descascarado. Una de ellas es la informada por Lange y col. (1984), en la cual la semilla es introducida dentro de un recipiente que contiene N_2 líquido. Posteriormente es transportada a otro recipiente con agua o aceite caliente, este procedimiento produce la rotura de la cáscara y su separación de la pepita. De acuerdo a Ruckenstein (1981) para que

un proceso de descascarado sea considerado satisfactorio, el contenido de cáscara de la pepita a procesar no debe ser superior al 12 % (Fetzer y Hostettler, 1980; Brueske, 1980; Neumunz, 1980) y el contenido de pepita en la cáscara extraída no debe ser mayor al 1,5 %. La aparición de semillas híbridas con altos contenidos de aceite ha ocasionado dificultades en la separación de la cáscara de la pepita, obteniéndose, rendimientos muy bajos.

1.4.3. Extracción. Una vez separada la cáscara de la pepita, se realiza la extracción del aceite. Existen varias tecnologías para ello, las cuales serán descritas brevemente. *Extracción por prensado.* La extracción por presión puede llevarse a cabo utilizando prensas o sistemas pulverizadores-aplastadores. Para el primero de los casos se puede emplear, entre otros, un sistema compuesto por dos cilindros, uno liso y otro acanalado, con velocidades de rotación variable y separados por una distancia que depende del tamaño y la forma de la pepita. Una vez que la pepita pasa por cualquiera de estos dos sistemas se separan dos fases, una compuesta por el aceite y otra denominada industrialmente “torta” la cual todavía contiene aproximadamente 20% de aceite. *Extracción por solventes.* La técnica de extracción por solventes se basa en las características fisicoquímicas y estructurales de los aceites los cuales son solubles en solventes no polares. Industrialmente, el primer solvente utilizado fue tricloroetileno, el cual se reemplazó por hexano, diclorometano y una mezcla azeotrópica hexano-etanol (95-5%). En cuanto a las instalaciones de extracción con solvente utilizadas en las industrias, éstas pueden ser del tipo semi-continuo o continuo. Las condiciones de operación empleadas depende de cual sea el sistema de extracción utilizado. Así, en una planta donde se combinan los procesos de percolación e inmersión (extracción continua), se utilizan tiempos de contacto aceite-solvente (hexano puro) del orden de 40 y 120 min y temperaturas de 40 y 45 °C respectivamente. La cantidad de solvente utilizado (por reposición del solvente que se pierde en la recuperación del mismo) depende de la cantidad de semilla a procesar, y habitualmente se emplean 5,5 Kg de solvente por cada 120 toneladas de semillas. Una vez realizada la extracción del aceite, se procede a su desolventización, operación que se realiza a 105 °C (Rivarola, 1988).

En el caso de oleaginosas con un contenido de aceite menor al 20%, se utiliza la extracción por solvente, en tanto que para contenidos de aceite mayores (por ejemplo el girasol) se realiza una extracción combinada. *Extracción combinada.* En ésta extracción la mayor parte del aceite fácilmente extraíble por solventes proviene de las células rotas durante los procesos preliminares de triturado, presión o laminado mientras que la parte más difícil de extraer se encuentra en la células intactas o parcialmente rotas. La extracción de ésta última fracción requiere de tiempos de contacto mayores ya que se basa en un proceso de ósmosis. En el caso del girasol, la extracción con solvente se realiza sobre la torta que queda de la primera extracción por prensado-triturado-laminado (Clark y col., 1980). El residuo obtenido se somete posteriormente a un proceso de desolventización. El solvente es nuevamente utilizado y el sólido se pelletiza o se lo transforma en harina comercial, cuyo contenido proteico es de gran importancia. Es de hacer notar que dicho contenido disminuye notoriamente cuando aumenta el porcentaje de cáscara en el procesamiento de la semilla pasando de un 46 a un 32,3% para porcentajes de cáscaras del orden del 5-20%, respectivamente (Jacobos, 1985). Durdev y col. (1982), compararon la composición de muestras de aceite de girasol crudo obtenidas mediante prensado o extracción con solventes. En el primer caso, los resultados obtenidos indican un 3,13 a 5,95% de ácidos grasos libres; 0,056% de ceras; 0,68% de insaponificables, 660 mg/Kg de tocoferoles y 0,31% de fosfátidos; en tanto que el aceite obtenido por extracción contenía, 3,31 a 5,95% de ácidos grasos libres, 0,059% de ceras, 0,71% de insaponificables, 674 mg/Kg de tocoferoles y 0,44% de fosfátidos. En ambos casos, el resto (aproximadamente un 95%) está constituido por triglicéridos. *Extracción supercrítica.* Además de los procesos de extracción anteriormente descriptos, se ha desarrollado una nueva técnica que utiliza fluidos supercríticos. Un fluido supercrítico es aquel que se encuentra a una temperatura superior a su punto crítico y tiene propiedades fisicoquímicas intermedias entre el estado líquido y el estado gaseoso. Debido a su alta densidad se comporta como solvente, mientras que debido a su viscosidad y difusividad relativamente bajas presenta un apreciable poder de penetración dentro de la matriz del soluto (Rizvi y col., 1986). Estas propiedades inusuales han

demostrado ser muy útiles en sistemas con un alto grado de dificultad de extracción de solutos de su matriz. Los fluidos empleados en la industria son: metano, etano, propano, n-pentano, acetona, CO₂, piridina, tolueno, benceno. Las ventajas que poseen son: no son tóxicos, ni inflamables, ni corrosivos, son muy baratos y de fácil disponibilidad.

La extracción de aceite de semillas oleaginosas usando CO₂ supercrítico ha sido estudiada por varios autores (De Filippi, 1982; Bott, 1982; Bulley y col., 1984), quienes opinan que es una buena alternativa frente a los demás procesos de extracción, si bien para su utilización se necesitan datos de solubilidad (del aceite en el solvente), distribución de equilibrio del aceite entre la semilla y el solvente y la relación entre los coeficientes de transferencia de masa (Lee y col., 1986). La técnica utilizada es similar a la de extracción con solventes. Una vez que el aceite es extraído de la semilla por su solubilidad en el CO₂ éste es fácilmente separado del aceite cambiando las condiciones de operación (presión y temperatura) y transformando el CO₂ solvente en un gas el cual puede ser mandado a la atmósfera. La eficiencia del proceso depende de la cantidad de CO₂ utilizado, del tiempo de contacto con la semilla, de la presión y temperatura empleada durante la extracción y de la estructura física de la semilla. Stahl y col. (1980), propusieron un sistema muy similar al anterior, salvo que utilizan CO₂ líquido en lugar de CO₂ en estado supercrítico.

1.4.4. Refinación. El aceite de girasol proveniente de la extracción por prensado o extracción con solventes, el cual tal como mencionamos anteriormente está constituido fundamentalmente por triglicéridos (95%), es sometido posteriormente, al igual que otros aceites, a un proceso de refinación para eliminar el resto de sustancias presentes (proteínas, pigmentos, ácidos grasos libres, ceras, etc.). Actualmente existen dos procesos de refinación, el convencional y el físico.

a) Refinación convencional. Este proceso, el más utilizado para aceite de girasol, comprende una serie de etapas:

- **Degomado:** Se designa con la palabra “gomas” a todas aquellas sustancias tales como, fosfolípidos, azúcares, resinas, compuestos proteicos, metales, etc. que son separadas del aceite durante el proceso de degomado. Las “gomas” cuya concentración en el aceite crudo varía de 0,03 a 3,0% (Young, 1980) son moléculas complejas las cuales pueden encontrarse en forma soluble, insoluble o coloidal en el aceite. El contenido de fosfolípidos en el aceite de girasol varía entre 0,5 y 1,0% (Morrison III, 1981). Las especies que se encuentran en mayor proporción son: fosfatidilcolina (lecitina), fosfatidiletanolamina (cefalina), fosfatidilinositol y ácido fosfatídico con contenidos de 52,0, 19,7, 26,0 y 2,2% respectivamente (Chapman, 1980; Pan y col., 2000). Aunque también se han detectado pequeñas cantidades de fosfatidilserina. Dichos fosfolípidos pueden ser clasificados en hidratables y no hidratables dependiendo de la posición del grupo fosfato en la glicerina (posición α y β respectivamente, Wiedermann, 1981).

La presencia de los fosfolípidos no hidratables en los aceites se debe en gran parte a la hidrólisis producida por las enzimas presentes en las semillas durante el almacenamiento. Los fosfolípidos hidratables son extraídos del aceite por el agregado de 1-2% de agua o de una cantidad igual al porcentaje de fosfolípidos presentes en el aceite y, posteriormente se separan por centrifugación. Los fosfolípidos no hidratables son extraídos con ácido fosfórico o cítrico en una concentración que varía entre 0,02-0,5% (Gunstone y Norris, 1983) o 0,1-0,4% de ácido en aceite con un tiempo de contacto de 5-30 min (dependiendo del contenido de gommas del aceite). Generalmente, el ácido más usado es el fosfórico a pesar de tener serias limitaciones tales como: ser muy corrosivo, no poder reducir su contenido a valores inferiores a 2 o 3 ppm, producir la precipitación de calcio y magnesio como sales fosfato, los cuales forman sedimentos pesados que ensucian los discos de las centrifugas e impurifican las gommas separadas, disminuyendo la calidad de las lecitinas comerciales (Leibovitz y Ruckenstein, 1981). Industrialmente existen dos procesos de degomado: el *degomado seco* y el *degomado húmedo*. El primero de ellos se aplica generalmente a aceites crudos que contienen bajos contenidos de fosfátidos tal como el de palma y coco. Este proceso consiste en poner el aceite en contacto con ácidos para formar aglomerados gomosos, los cuales posteriormente se absorben a tierras de

blanqueo y se filtran. El *degomado húmedo* se utiliza en aceites con altos contenidos de fosfolípidos (por ejemplo: girasol y soja). En éste método, el aceite caliente es mezclado con el agente degomante y mantenido a una temperatura de 70-80 °C con agitación durante 30 min como mínimo (Pan y col., 2001). Temperaturas superiores a las citadas, si bien mejoran el degomado, pueden producir la oxidación del aceite. El precipitado gomoso producido es posteriormente centrifugado y el aceite obtenido es secado. La misma experiencia puede ser realizada en frío. La diferencia entre ambos procesos radica en el hecho de que el degomado en frío produce la precipitación de las ceras, las cuales se separan junto con las gomas, mientras que éstas permanecen solubles en el aceite durante el proceso en caliente y deberán ser extraídas en un proceso posterior. Las gomas deben ser removidas del aceite dado que: conducen a la formación de emulsiones en la etapa de neutralización con la posterior pérdida de aceite neutro; disminuyen la actividad decolorante de las tierras activadas por adsorción de los fosfolípidos, obligando a aumentar el consumo de las mismas; se carbonizan durante los procedimientos de calentamiento y desodorizado del aceite, lo cual deriva en una coloración marrón del aceite refinado; forman compuestos de coordinación o sales con calcio, magnesio, hierro y cobre que afectan en forma adversa la estabilidad de los productos oxidativos (Flider y Orthoefer, 1981); además, en algunos casos, se utilizan para la producción de lecitinas comerciales, siendo las lecitinas de girasol junto a las de soja y algodón las más empleadas como emulsificantes en alimentos, en la industria farmacéutica, etc.

- *Neutralización.* En el proceso de neutralización son removidos del aceite los siguientes compuestos: ácidos grasos, pigmentos, fosfolípidos, compuestos sulfurados y ácido fosfórico remanente. Para ello, el aceite una vez degomado es tratado con una solución de hidróxido de sodio en condiciones definidas de temperatura, tiempo y agitación que dependen de cada aceite en particular. Esta etapa puede llevarse a cabo a baja o alta temperatura (12-17 y 75-80 °C respectivamente) (Gunstone y Norris, 1983). La mínima cantidad de álcali requerida para la neutralización puede ser calculada a partir de la siguiente fórmula: $\%NaOH = \%FFA \times 0,142$ donde el %FFA (ácidos grasos libres) es

expresado en términos de ácido oleico (PM=282). Generalmente, para mayor seguridad, se agrega un exceso de NaOH al calculado. Tiempos de contacto cortos requieren un exceso mayor de álcali. Debe ponerse especial cuidado en evitar reacciones de saponificación. La espuma que se forma en el proceso, la cual es insoluble en el aceite, es separada del mismo por centrifugación. Luego, el aceite es lavado con agua caliente (70-90 °C) para remover los jabones residuales y nuevamente es centrifugado. Posteriormente el aceite se seca hasta una humedad y contenido de compuestos volátiles del orden del 0,1%. Este proceso puede realizarse en forma continua, semicontinua y discontinua. Una vez que el aceite ha sido degomado, neutralizado y centrifugado, se procede a la determinación del contenido de fosfolípidos remanentes medido como fósforo y en algunos casos como nitrógeno. Este valor no debe ser superior al 10 ppm.

- *Blanqueo.* En éste proceso son removidos del aceite pigmentos, productos oxidativos, trazas de metales pro-oxidantes, trazas de jabones, compuestos sulfurosos, peróxidos, aldehídos y cetonas que surgen por descomposición de los peróxidos, etc. El blanqueo puede realizarse por calentamiento, oxidación química o adsorción (Gunstone y Norris, 1983). *Calentamiento:* algunos pigmentos pierden su color por calentamiento a temperaturas elevadas. Sin embargo, permanecen en el aceite lo que provoca una disminución en su calidad debido a la formación de productos de degradación en presencia de oxígeno. *Oxidación Química:* en éste proceso, algunos pigmentos tales como los carotenoides se transforman en compuestos incoloros por oxidación. Tal oxidación afecta también a los glicéridos y disminuyen el contenido de antioxidantes naturales, por lo tanto ésta técnica no es usada para aceites comestibles. *Adsorción.* Las tierras de blanqueo adsorben más o menos específicamente a los pigmentos sin afectar la calidad del aceite. Por ello se ha constituido en el método más empleado en la refinación de aceites comestibles. Las tierras de blanqueo utilizadas son silicatos compuestos a los cuales se les ha extraído los iones aluminio. Contienen cantidades variables de magnesio, calcio, hierro y sodio. Las tierras empleadas pueden ser neutras o activadas con ácidos (por lo general ácido sulfúrico). El carbón activado también puede ser usado como blanqueador; si bien es mucho más efectivo que las tierras de blanqueo neutras o

activadas, tiene la desventaja frente a éstas de ser costoso y de retener una gran cantidad de aceite. La cantidad de tierra de blanqueo a usar es del orden del 0,2-0,4% con respecto al peso del aceite, pero se puede llegar hasta un máximo del 2% dependiendo del aceite a blanquear y de la actividad de la tierra usada. La temperatura a la que se realiza el proceso es de aproximadamente 104 °C en presencia de aire y de 82 °C en vacío. El blanqueo en vacío evita la oxidación de distintos componentes presentes en el aceite, la destrucción de antioxidantes naturales y la formación de productos de degradación de difícil extracción. En cuanto a los tiempos de contacto, son generalmente de 10-15 min pudiendo llegar hasta 20 min. La agitación, si bien no es crítica, debe permitir un buen contacto entre el aceite y las tierras blanqueadoras. Una vez concluido el proceso de adsorción, las tierras de blanqueo se eliminan por filtración. Esta etapa, al igual que las anteriores pueden llevarse a cabo en sistemas continuos, semicontinuos o discontinuos.

- *Desodorizado.* En éste proceso se eliminan compuestos que otorgan mal olor y sabor a los aceites, lo cual impide su utilización para el consumo humano. Fundamentalmente se extraen los aldehídos y cetonas, aunque también se pueden eliminar, si aun están presentes, compuestos sulfurados, pigmentos, hidrocarburos, ácidos grasos, mono- y diglicéridos (Gunstone y Norris, 1983). A pesar de que éstos compuestos se encuentran en cantidades del orden de 200-1000 ppm, necesariamente deben ser extraídos pues se detectan cantidades extremadamente pequeñas, inferiores a 1 ppm. La desodorización es esencialmente una destilación al vacío (2-9 mmHg) a temperaturas que varían entre los 160 y 260 °C. Sin embargo, no debería superar los 200 °C pues se favorecen las reacciones de condensación y polimerización de ácidos grasos y triglicéridos que originan productos cancerígenos (Young, 1980). En la actualidad, todas las industrias tienden a usar tiempos de proceso cortos y temperaturas cercanas a los 250 °C. El desodorizado puede realizarse de manera discontinua, semicontinua o continua.

- *Winterizado.* Durante ésta etapa, el aceite de girasol es enfriado para eliminar sustancias que cristalizan a bajas temperaturas y que ocasionan turbidez en el mismo. Fundamentalmente, esta fracción está constituida por

Además, a la turbidez contribuyen triglicéridos que contienen ácidos grasos saturados (Leibovitz y Ruckenstein, 1981) tales como la ester-dioleína y la palmito-dioleína, los cuales forman cristales de estructura β cuyo tamaño oscila entre 25-50 μm . Varios investigadores han estudiado la composición química de las ceras. Los mismos han mostrado que los ácidos grasos y los alcoholes presentes en éstos compuestos poseen de 14 a 32 y de 12 a 32 átomos de carbono, respectivamente (Gracian y Arevalo, 1981). Las ceras presentes en el aceite provienen principalmente de la cáscara de la semilla, la cual posee cantidades que varían del 1,5- 3,0%. Estas cáscaras pasan al aceite durante el proceso de descascarado. El contenido de ceras en la cáscara ha ido aumentando con el correr de los años hasta alcanzar los valores arriba mencionados, fundamentalmente por la aparición de semillas híbridas (Kehse, 1980). Los valores de literatura muestran que el contenido de ceras en el aceite crudo varía entre 0,02-0,35% (Morrison III, 1982a). Algunos autores han informado valores superiores que pueden alcanzar al 1% (Ruckenstein, 1981; Leibovitz y Ruckenstein, 1981). Para la remoción de las ceras del aceite hay que tener en cuenta, además de sus características químicas, ciertas propiedades físicas, tal como su punto de fusión, el cual está comprendido en el rango de 70-80 °C (Rivarola y col., 1985; Turkulov y col., 1986).

b) *Refinación física*. Esta nueva técnica consiste en degomar el aceite crudo en caliente y posteriormente realizar una destilación al vacío logrando la eliminación de los ácidos grasos libres, aldehídos, cetonas, compuestos sulfonados, pigmentos, etc. Una vez realizada ésta destilación se procede a la eliminación de las ceras enfriando el aceite, tal como fuera explicado anteriormente. Las ventajas de este proceso refinación respecto al convencional reside en el hecho de que permite eliminar ácidos grasos libres del orden del 8 % o más y simplifica el tratamiento de efluentes. Sin embargo, la planta requiere un costo inicial alto y no todos los tipos y calidades de aceites pueden ser refinados hasta alcanzar los estándares de calidad exigidos (Young, 1980).

1.5. Diferentes tecnologías de extracción de ceras.

Las ceras junto con las demás sustancias que generan turbidez en el aceite son extraídas del mismo por filtración o centrifugación. La filtración, proceso de por sí lento, se ve dificultada por:

- la alta viscosidad del aceite a bajas temperaturas
- la falta de un tamaño uniforme de los cristales de ceras formados y
- la presencia de materiales mucilaginosos los cuales recubren a los cristales de las ceras.

El lugar en el proceso de refinación en el cual se debe llevar a cabo la separación de las ceras es algo aún muy discutido. Una de las variantes consiste en enfriar el aceite entre 5-10 °C y luego separar los jabones, fosfolípidos y ceras por centrifugación. Las ceras en este caso se ubican en la interfase aceite-solución acuosa y son arrastradas por la fase más pesada. Por su parte, la compañía Alfa-Laval (Alfa-Laval, 30670E) lleva a cabo la separación de las ceras una vez que el aceite ha sido degomado y neutralizado. El aceite es entonces enfriado a 5-10 °C y mezclado con 1-5% de agua. La mezcla aceite-agua se pasa luego a tanques apropiados donde permanece 5 h. Durante éste período, las ceras cristalizan, los cristales son humedecidos por el agua presente y son transferidos a la fase acuosa ayudados por la presencia de jabones remanentes. Finalmente las ceras se separan por centrifugación. Ramos Ayerbe y Rodríguez Berbel (1985) estudiaron el efecto de la presencia de distintos tensioactivos encontrando resultados semejantes para todos los casos ensayados. Otra técnica descrita por distintos autores (Morrison III y Robertson, 1975) para la separación de ceras se basa en la mayor solubilidad de éstos compuestos en distintos solventes respecto del aceite, el agregado de éstos solventes ocasiona también la disminución de la viscosidad del aceite, logrando una mayor facilidad en la separación de las ceras. Específicamente, éstos autores agregan al aceite una mezcla compuesta por 85 % de acetona y 15 % de hexano en una proporción solvente:aceite que varía del 20-70 %. Posteriormente, la misma se enfría a una temperatura que puede ir de 0 a – 15 °C para provocar la cristalización de las ceras en el solvente. Los cristales se

separan por centrifugación y el residuo de solvente que pudo haber quedado se elimina por calentamiento. También se pueden utilizar distintos tipos de solventes en distintas proporciones aceite:solvente. Morrison III y Thomas (1976) demostraron la conveniencia de realizar el proceso de descerado por solventes en aceite refinado. Los resultados obtenidos indican que el porcentaje de fosfolípidos y ceras remanentes en el aceite es menor para un aceite refinado y luego enfriado. Otros investigadores también han informado que los fosfolípidos retardan e inhiben la cristalización de ceras en aceites vegetales (Rivarola y col.; 1988). En la actualidad existen diversos métodos para remover las ceras. Los más difundidos están asociados a la refinación. Podemos, sin embargo mencionar otros dos, sólo a título informativo, pocos utilizados y vinculados al tratamiento de aceites crudos (Bloch, 1998).

1.5.1. Degomado en frío. Consiste simplemente en enfriar el aceite crudo a 15-20 °C y mantenerlo a esta temperatura por unas 24 h. Luego se mezcla con un pequeño porcentaje de agua y después de una breve retención con agitación suave, se centrifuga para separar simultáneamente gomas y ceras. Algunas experiencias con este proceso demostraron que se puede remover entre 70-80% de las ceras presentes en el aceite crudo. Sin embargo, las mermas son importantes y la capacidad de la centrifuga separadora disminuye considerablemente (más de un 50%). Por lo tanto, no resulta muy conveniente, salvo que se utilice para disminuir la formación de fondos de tanques y como una forma de obtener aceites crudos con bajos contenidos de ceras para enviar a la refinería.

1.5.2. Super Unidegomado. Este método permite obtener aceites crudo con 8 ppm de fósforo y a la vez reducir el contenido de ceras garantizando un máximo de 150 ppm, el cual es un muy buen valor para un aceite crudo, pero insuficiente para un refinado, por lo que debe completarse el refinado en la refinería. El método consiste en calentar el aceite hasta unos 70 °C y mezclarlo con ácido cítrico, luego de lo cual se retiene por unos 10 min. Después de enfriar parcialmente a unos 40 °C, se mezcla con agua y se retiene bajo agitación por 1 h aproximadamente. Posteriormente se calienta y se envía a la centrifuga

separadora de gomas, obteniéndose un aceite con 30 ppm de fósforo. Para reducir aun más el contenido de gomas, el aceite es enfriado y mezclado con una pequeña cantidad de soda cáustica. Se consigue así aglomerar las gomas remanentes, las que se separan con una centrífuga clarificadora. Si se realiza la separación a unos 25 °C, se puede realizar en forma simultánea un descerado parcial. El proceso, es complejo y caro.

Con respecto a los métodos asociados a la refinación podemos mencionar los siguientes:

1.5.3. Descerado por filtración. Consiste en realizar el proceso de refinación convencional en caliente para posteriormente enfriar, cristalizar las ceras y separarlas por filtración. El aceite se calienta a 80-90 °C, se mezcla con 0,1% de ácido fosfórico en un mezclador dinámico, se retiene por unos 5 min sin agitación, luego se mezcla con soda cáustica diluida en otro mezclador dinámico, se retiene en un tanque con agitador por unos 6-8 min y finalmente se centrifuga para separar las borras de neutralización. A continuación se procede al lavado con un 5-10% de agua caliente en una o dos etapas y se seca al vacío.

La filtración se realiza luego del blanqueo o la desodorización, enfriando el aceite con fluido refrigerante hasta 6-8 °C. A esta temperatura permanece 4-6 h en los cristalizadores. Luego pasa a un segundo cristizador donde se agrega ayuda filtrante, cuyas partículas actúan como núcleos de cristalización y facilitan la filtración. Luego de madurar unas 6 h, se filtra a unos 15 °C.

Esta alternativa permite obtener aceites de muy buena estabilidad al frío, pero tiene el inconveniente que el filtrado en frío de aceites conteniendo el total de ceras resulta muy lento y engorroso, requiriendo mucha mano de obra, por lo que para las plantas de alta capacidad puede ser una desventaja seria, salvo que se utilicen filtros automáticos de muy alta capacidad filtrante.

1.5.4. Neutralización en frío. Este método fue desarrollado para reemplazar el anterior, sobre todo en plantas de alta capacidad y para procesar aceites con contenidos de ceras mayores a 500 ppm.

El aceite crudo se somete en primer lugar a un acondicionamiento ácido a temperatura ambiente mezclándolo con ácido fosfórico en un mezclador dinámico y sometiéndolo luego a una retención de unos 5 min. Posteriormente, el aceite se enfría en un equipo de placas a unos 5 °C y se mezcla en línea con la cantidad estequiométrica de soda cáustica. Luego se envía a los tanques de cristalización donde permanece unas 10 h como mínimo. A continuación, se calienta suavemente a 15-20 °C. Con ello se reduce considerablemente la viscosidad del aceite, facilitando la separación de la centrifuga de neutralización, donde se separan las borras junto con las ceras en forma de una pasta muy viscosa. Finalmente, el aceite neutro se lava en caliente en una sola etapa y se seca al vacío. Este método tiene tres ventajas:

- posee sólo dos etapas de centrifugación, requiriendo una menor inversión,
- produce aceites con muy buena estabilidad al frío,
- los requerimientos de energía son moderados, pues hay una sola etapa de enfriamiento, partiendo del aceite a temperatura ambiente.

La desventaja que presenta es que al separar las borras junto con las ceras a muy baja temperatura, se provoca un arrastre adicional de aceite neutro por emulsificación. Esto es más notable cuanto mayor es el volumen de borra a separar, es decir mayores grados de acidez en el aceite crudo.

1.5.5. Descerado por vía húmeda. Consiste en realizar una neutralización convencional en caliente. Una vez separadas las borras, el aceite se enfría a 6-8 °C y se envía a dos o tres tanques de maduración en serie, donde el tiempo total de residencia es de unas 8-10 h. Luego de madurar en el primer tanque, al pasar al segundo madurador se agrega un pequeño porcentaje de agua entre 3-5%, junto a una solución de soda cáustica diluida para elevar el contenido de jabones totales hasta un valor de 2500 a 3000 ppm. Esto tiene por finalidad aprovechar la naturaleza hidrofílica de las ceras para poder separarlas luego en la centrifuga separadora junto al agua jabonosa. El agregado de un electrolito también favorece

el paso de las ceras de la fase aceite a la fase acuosa. Una vez finalizado el tiempo de maduración, se procede a un calentamiento suave hasta 20-25 °C y se separa en una centrífuga de platos. Luego de esta etapa se realiza un lavado convencional en caliente y se seca al vacío. Este proceso, a diferencia del neutralizado en frío, va indefectiblemente acompañado de una filtración final de pulido en frío para remover el remanente de ceras que la winterización por vía húmeda no puede separar.

La ventaja de este proceso es que produce mermas menores que el neutralizado en frío. La diferencia de rendimiento puede llegar hasta 0,5% o aún más si se procesan aceites de alta acidez. Sin embargo, tiene la desventaja de su mayor requerimiento de energía y la mayor inversión necesaria, ya que consta de dos etapas de centrifugación.

1.5.6. Filtración de pulido en frío. El aceite proveniente del blanqueador o el desodorizador, se enfría a 40 °C y luego aún mas a 12-15 °C con agua helada, en un intercambiador a placas. Posteriormente es enviado a un tanque aislado sin agitación. Luego de un tiempo de permanencia de 12 h, se filtra en filtro a placas horizontal, dosificándose en línea una suspensión de tierra ayuda filtrante, en proporción de 0,1 a 0,2% en peso respecto al aceite. Para realizar la precapa del filtro, se utiliza aproximadamente entre 0,7 y 1,0 Kg de tierra por m². El hecho de realizar la filtración de pulido luego de la desodorización y no antes, no implica un deterioro de la calidad del aceite por oxidación, ya que sólo en algunos casos se percibe un leve aumento del Índice de Peróxidos pero muy poco significativo. Además brinda la ventaja, al realizarla en ésta etapa, de eliminar algunos compuestos formados durante la desodorización que pueden producir turbidez. Podemos mencionar aquí brevemente la filtración de pulido realizada inmediatamente luego de la separación de ceras en el proceso vía húmeda. El aceite frío que sale de la centrífuga separadora, conteniendo trazas de ceras es filtrado sin enfriar nuevamente ni cristalizar. Sin embargo, como este aceite contiene 0,5% de humedad, esta filtración no es sencilla. Requiere una precapa especial, ayuda filtrante de calidad seleccionada y una cuidadosa selección de la malla filtrante.

1.6. Determinación del contenido de ceras en el aceite.

A continuación describiremos brevemente algunos de los métodos utilizados para determinar la concentración de ceras en aceite de girasol. Dichos métodos se basan, en su mayoría, en el proceso de cristalización de las mismas y en la medición de la turbidez que éstas forman en la solución oleosa. Los métodos existentes se describirán con más detalle en la introducción del Capítulo 2.

Debido a que las ceras cristalizan en el aceite a bajas temperaturas, éstas deben ser extraídas del mismo, si dicha extracción no se realiza, el aceite no puede ser comercializado ya que no pasaría el test del frío (AOCS, Cc 11-53). Este test consiste en dejar el aceite refinado a 0 °C durante 24 h o a 0 °C durante 5.5 h. Pasado éste tiempo, si el aceite contiene ceras presentará turbidez y en algunos casos precipitados que ocasionarían el rechazo de la partida de aceite. Este método ha sido muy criticado, no sólo por el tiempo que se necesita para su realización, sino también porque un aceite que pasa el test del frío puede desarrollar turbidez si se somete a 0 °C por períodos de tiempo más prolongados. Turkulov y col. (1986) demostraron en uno de sus trabajos que los aceites que contienen de 8 a 70 mg de cera por Kg de aceite pasan el test del frío pero desarrollan turbidez si permanecen 48 h a esa temperatura. Este hecho ocasiona dificultades en la comercialización de aceites especialmente en aquellos países que utilizan recipientes de plástico para su embotellamiento. Para evitar esta dificultad es más importante la determinación de la concentración de ceras en el aceite que la realización del test del frío. Varios autores han desarrollado métodos para determinar la concentración de ceras en el aceite. Tanto Brimberg y Wretensjo (1979) como Morrison III y Robertson (1975) desarrollaron sendos métodos turbidimétricos de realización rápida, superiores al test del frío en la predicción de la tendencia a la precipitación o cristalización de las ceras en el aceite después de largos tiempos de almacenamiento a 0 °C. El primero de ellos sólo puede utilizarse para determinar ceras en aceites refinados en tanto que el segundo es útil tanto para aceites refinados como crudos. El método que quizá es más efectivo es el presentado por Caupiel (1977) el cual hace uso de un equipo de

rayo láser para la determinación de cristales de ceras en el aceite. Si bien este método es muy rápido y efectivo, es costoso, lo cual hace difícil su aplicación en la industria.

1.7. Aplicaciones prácticas de grasas y aceites

Como se indicó anteriormente, el 80% de la producción anual de grasas y aceites se utiliza en su mayor parte como alimento humano. La grasa alimenticia se consume en la leche o puede ser convertida en distintos subproductos como la manteca, margarina, queso y otros productos. Los aceites vegetales y las grasas animales son utilizados luego de una modificación adecuada como productos untables, aceites de fritura, grasas de cocción, aceites para ensaladas, mayonesa, helados, etc. Aproximadamente un 5% de la producción anual de grasas y aceites es usado como alimento para animales y el resto (aproximadamente un 15%) se convierte en un conjunto de oleoquímicos de los cuales un 90% son usados como distintos tipos de surfactantes. A continuación se describirán los usos de los compuestos anteriormente nombrados (Gunstone, 1996).

1.7.1. Manteca. La manteca es una emulsión de agua en aceite que contiene 80-82% de grasa y 18-20% de agua que generalmente contiene un agregado de sal. La manteca es elaborada con leche de vaca (3-4% de grasa) que en primera instancia se convierte en crema (30-45% de grasa) por medio de una centrifugación y luego se transforma en manteca (80-82% de grasa) para lo cual es necesario invertir la emulsión. La composición de la grasa de leche cambia durante la primavera y el otoño debido a la variación de la dieta. La grasa está compuesta básicamente por triglicéridos (97-98%) junto con ácidos grasos libres y mono y diglicéridos. También posee colesterol (0,2-0,4%), fosfolípidos (0,2-1,0%) y trazas de carotenoides, escualeno y vitaminas A y D. La grasa de leche se caracteriza por la presencia de triglicéridos con ácidos grasos de cadena corta o mediana y ácidos monoinsaturados trans.

El consumo de mantecas ha disminuido en los últimos años como consecuencia de su alto precio comparado con productos untables de otra naturaleza, su deficiente untabilidad, especialmente a la temperatura de la heladera, su alto contenido de grasa y su contenido relativamente alto de ácidos grasos saturados y ácidos trans los cuales no son deseados basados en factores nutricionales. Por otro lado tiene un sabor característico y una textura deseable al paladar. Algunas de estas características fueron superadas a través de cambios legales y avances tecnológicos. Se desarrollaron mantecas con contenidos de grasas menores designándolas como, mantecas (80-90% de grasa), mantecas con tres cuartos de grasa (60-62% de grasa), mantecas con la mitad de grasa (39-41% de grasa) y productos untables (otros niveles de grasa). Estos productos modificados poseen menor valor calorífico. También se produce grasa de leche con modificaciones en su composición química debido a una variación en la dieta de las vacas. De este modo se puede obtener grasa de leche enriquecida en ácidos mono y poliinsaturados. En la actualidad está permitido realizar mezclas de manteca con aceites vegetales en la producción de productos de repostería. Este hecho disminuye el contenido de ácidos grasos saturados, modificando el comportamiento térmico y la untabilidad del producto final. Finalmente, el fraccionamiento de la grasa de leche anhidra produce una fracción dura (rica en ácido esteárico) y una fracción rica en ácido oleico. Estas fracciones pueden ser usadas en forma separada o mezclarse para lograr las características deseadas de un producto en particular. Por ejemplo, la grasa de leche anhidra se puede utilizar para la producción de tortas; una mezcla de grasa de leche anhidra y la fracción oleica se utiliza para la elaboración de galletitas, bizcochos y crema de manteca; una mezcla de grasa de leche anhidra y la fracción de estearina puede usarse para la confección de masas de hojaldre y masas fermentadas y por último, la fracción de oleína puede utilizarse para la elaboración de conos de helado, waffles y barras de chocolate o helados.

1.7.2. Margarinas. Este producto fue originariamente un sustituto económico para la manteca, pero actualmente es un producto tan importante como la manteca con alguna ventajas sobre la misma. La mayor ventaja de la margarina

1.7.2. Margarinas. Este producto fue originariamente un sustituto económico para la manteca, pero actualmente es un producto tan importante como la manteca con algunas ventajas sobre la misma. La mayor ventaja de la margarina es que puede ser untada a temperaturas bajas como la del refrigerador. También puede ser fabricada con bajos contenidos de ácidos grasos saturados y mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados. Las margarinas contienen sin embargo valores significativos de ácidos grasos trans debido a la hidrogenación parcial del aceite empleado en su elaboración.

Las margarinas se producen a partir de grasas y aceites apropiados (soja, colza, girasol, algodón, palma, coco, etc.) que deben haber sido fraccionados, fundidos, hidrogenados y/o esterificados. Se incluyen otros ingredientes como puede ser agentes tensioactivos, proteínas, sal y agua junto con algunos preservadores, sabores y vitaminas. Dependiendo de la composición de ácidos grasos y de su consecuente comportamiento térmico, se pueden obtener distintos productos: margarinas blandas y duras. Una margarina típica tiene un contenido de sólidos de 30-40% a 5 °C para lograr una buena untabilidad a la temperatura de la heladera, 10-20% a 10 °C para que tengan una buena textura a temperatura ambiente y menos de 3% a 35 °C para que se fundan rápidamente en la boca.

Los triglicéridos pueden cristalizar en distintas formas polimórficas (β o β'). Los triglicéridos que cristalizan en una margarina deben hacerlo en la forma β' y permanecer en ésta forma polimórfica ya que este tipo de cristales son pequeños y tienen la capacidad de atrapar gran cantidad de aceite líquido obteniendo productos firmes con buena textura y sensación táctil bucal. Esto se puede lograr incorporando aceites que tienen tendencia de cristalizar en la forma β' como es el caso del aceite de algodón, palma, girasol y aceites de pescados hidrogenados. Los cristales β son más grandes y tiene una consistencia granulosa que hace al producto desagradable al gusto.

1.7.3. Otros usos alimentarios. En el caso de la fritura, los aceites sirven no sólo como medio de cocción (altas temperaturas) sino que también incorporan sabor, nutrientes y textura a las comidas debido a que una cantidad de la grasa es absorbida por el alimento que está siendo freído. Es importante que el aceite a

Los estudios de cristalización tanto de ceras como de triglicéridos son importantes desde el punto de vista académico y tecnológico. El entendimiento de los efectos de la formulación y los factores de procesamiento sobre la cinética de cristalización es importante para controlar la calidad del producto. A partir de lo expuesto anteriormente, detallaremos los objetivos del presente trabajo de tesis.

1.8. Objetivos Generales

El objetivo general de este trabajo fue estudiar el proceso de cristalización de las ceras presentes en el aceite de girasol. A partir del mismo nos planteamos como objetivos específicos:

- desarrollar un método para determinar la concentración de ceras en aceites de girasol refinados, semi-refinados y crudos,
- calcular parámetros energéticos involucrados en el proceso de cristalización de sistemas lipídicos partiendo de un sistema en solución (ceras en aceite de girasol) y de un fundido (mezclas de aceite de girasol y grasa de leche),
- comprender el comportamiento térmico de los sistemas lipídicos en cuestión estudiando los factores que afectan su cristalización,
- estudiar los factores que influyen en el contenido de ceras en aceites obtenidos bajo distintas condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo de almacenamiento de las semillas).

Capítulo 2

Desarrollo de un Método Turbidimétrico para Determinar Concentración de Ceras en Aceite de Girasol (Turbidimetría de Luz Polarizada)

**Capítulo 2: Desarrollo de un Método Turbidimétrico para Determinar
Concentración de Ceras en Aceite de Girasol
(Turbidimetría de Luz Polarizada)**

2.1. Introducción.

Algunos aceites vegetales (girasol, maíz, canola, arroz, etc.) forman un sedimento o turbidez durante el almacenamiento a temperatura ambiente. El aceite de girasol genera sedimentos causantes de turbidez cuando es almacenado a bajas temperaturas (20 °C) y requiere ser sometido a una winterización para removerlos. Entre los componentes que generan esta turbidez se encuentran triglicéridos saturados, ceras, ácidos grasos libres y en menor proporción hidrocarburos, esteroides y sus ésteres y alcoholes (Xiaojun y col., 1993.). Estos componentes están presentes en aceites refinados, blanqueados y desodorizados en concentraciones del orden de ppm o ppb haciendo muy difícil su remoción. Los compuestos que causan turbidez, también pueden complejarse con fosfolípidos no hidratables lo cual explica porqué los fosfolípidos interfieren con el proceso de winterización del aceite de girasol (Rivarola y col., 1988). La formación de sedimento es generalmente atribuida a componentes cerosos y/o triglicéridos poco comunes particularmente aquellos con ácidos grasos saturados. Tal como se mencionó anteriormente, las ceras en el aceite de girasol son ésteres de ácidos grasos saturados de cadena larga (C_{20} a C_{22}) con alcoholes de C_{24} a C_{28} , siendo su punto de fusión de aproximadamente 74 °C. Debido entonces a su alto punto de fusión y a su baja solubilidad, la presencia de pequeñas cantidades de éstos compuestos en los aceites refinados provoca la aparición de un precipitado cristalino que afecta el brillo y la transparencia, lo que debe necesariamente evitarse, especialmente si el aceite se envasa, como es normal, en envases transparentes (Przyblski y col., 1993).

La aceptación global del aceite de girasol como un aceite de calidad para la cocción y como un alimento saludable ha incrementado los controles de calidad. A medida que nuevas semillas híbridas han reemplazado las semillas naturalmente polinizadas, se observó un mayor contenido de ceras en el aceite obtenido a partir de las primeras. Estos híbridos fueron desarrollados con el objetivo de aumentar el rendimiento de aceite disminuyendo el porcentaje de cáscara en la semilla. Morrison III (1983), demostró una correlación positiva entre el porcentaje de cáscara en la semilla y el contenido de ceras en el aceite. A pesar de que un mejor descascarado produce un menor contenido de ceras, un contenido bajo de cáscara produce una disminución en el rendimiento de extracción de aceite. Los productores han superado este inconveniente descascarando junto con el degomado o aplicando una refinación alcalina en frío. Debido a que las ceras están localizadas casi exclusivamente en la superficie de la cáscara, se ha informado un método de lavado de las semillas con hexano en caliente para obtener una mejor eficiencia en el descerado (Morrison III, 1982*b* y 1983).

2.1.1. Remoción de ceras presentes en el aceite de girasol. Existen distintas alternativas técnicas para separar las ceras del aceite de girasol durante el proceso de refinación. Todas ellas involucran distintos procesos de cristalización (temperatura, tiempo de residencia, presencia de jabones, fosfolípidos, etc.). Una de las especificaciones de calidad requieren que el aceite permanezca límpido durante su almacenamiento por 24 h a 0 °C (Test del Frío o Cold test). Como consecuencia, la separación de las ceras debe estar asegurada por medio de la formación de cristales que pueden ser filtrados o centrifugados de manera sencilla con un mínimo de retención de aceite de modo de mantener los altos rendimientos de proceso. Las condiciones de cristalización están afectadas en gran proporción por las condiciones de degomado y neutralización que debido a consideraciones económicas o de ahorro de energía producen que la separación de las ceras se produzcan en distintas etapas dentro del proceso de obtención y refinación del aceite (Rivarola y col., 1985).

Para remover las ceras existen diversos métodos. Los más difundidos están asociados a la refinación del aceite (descerado por filtración, neutralizado y descerado simultáneos y descerado por vía húmeda), pero sin embargo existen métodos asociados al tratamiento de aceites crudos (degomado en frío y Super Unidegomado). Los procesos antes mencionados fueron descritos en el Capítulo 1 y pueden resumirse en el esquema que se detalla en la Figura 2.1.1 (Bloch, 1998).

2.1.2. Contenido de cera y estabilidad al frío. La medición cuantitativa de ceras en aceite se puede realizar mediante técnicas cromatográficas, pero toma mucho tiempo, razón por la cual muchas compañías han elegido utilizar el turbidímetro (correctamente calibrado) como un método rápido y adecuado para mediciones del contenido de ceras. En caso de no disponer de este equipo, se utiliza como referencia la prueba del frío (Cold Test): un aceite de maíz o girasol descerado que se mantiene claro durante al menos 24 h a 0 °C corresponde aproximadamente a un contenido de ceras por debajo de 50 ppm. No obstante, se ha notado que a pesar de pasar el test del frío, un aceite puede desarrollar turbidez después de unos pocos días de almacenamiento a temperatura ambiente en una botella clara. Turkulov y col. (1986) demostraron que algunos aceites que contenían 8-70 ppm de ceras pasaban el test del frío si permanecían a esta temperatura durante 48 h. Esto probablemente se debe a un problema de viscosidad a 0 °C que demora la cristalización de las ceras. Por ésta razón, algunos usuarios prefieren realizar el test del frío del aceite de girasol descerado a 12 °C. La estabilidad del test del frío también depende de las condiciones locales; por ejemplo, en países fríos, generalmente es necesario un test del frío de 48 h a 0 °C para un contenido de ceras de aproximadamente 15 ppm (Givon y Tirtiaux, 2000). Debido a lo detallado anteriormente, es importante determinar el contenido de ceras en los aceites refinados antes de realizar el test del frío.

Figura 2.1.1. Esquema de las distintas variantes para la eliminación de ceras del aceite de girasol

2.1.3. Determinación del contenido de ceras en aceite de girasol. Las ceras presentes en el aceite de girasol son difíciles de medir debido a que se encuentran en muy baja concentración (0,02-0,35%) en el aceite. Si bien la estabilidad al frío de las ceras presentes en aceites refinados es una medida del contenido de ceras ésta determinación es cualitativa y por lo tanto no es posible determinar la cantidad exacta de las mismas. Para ello, se han desarrollado diversos métodos para cuantificar ceras los cuales arrojan resultados suficientemente precisos. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas.

- *Método gravimétrico:* requiere el uso de un procedimiento de extracción, equipos especiales y tiempos de extracción muy prolongados.
- *Método cromatográfico:* se basa en el análisis de alcoholes y ácidos grasos que forman parte de las ceras por medio de una cromatografía gaseosa. A pesar de que con éste método se obtienen resultados precisos, tiene la desventaja de no ser un método rápido de cuantificación pues requiere de una laboriosa preparación de la muestra a analizar. Por otro lado, al trabajar con las ceras purificadas a partir de un aceite crudo o refinado, solo se puede determinar el contenido de ceras cristalizables dependiendo de las condiciones de proceso a las cuales se somete la muestra.
- *Método turbidimétrico:* es un método rápido desarrollado por Brimberg y Wretensjo (1979), utiliza la turbidez del aceite frío para determinar el contenido de ceras, sin embargo, no puede ser aplicado a aceites crudos. Existen modificaciones de éste método como la incorporación de solventes al aceite para aumentar su sensibilidad (Morrison III, 1982b y Moulton, 1988).
- *Test del frío:* Tal como se discutió con anterioridad, el test del frío se basa en la determinación visual de la turbidez del aceite enfriado bajo determinadas condiciones de tiempo y temperatura (24 h a 0 °C o 5.5 h a 0 °C). Este método posee la desventaja de que se necesita un observador altamente entrenado para obtener resultados confiables. Por otro lado, tal como se mencionó anteriormente, Turkulov y col. (1986) demostraron que algunos aceites que contenían 8-70 ppm de ceras pasaban el test del frío y sin embargo desarrollaban turbidez si permanecían a 0 °C durante 48 h.

- **Microscopía:** Rivarola y col. (1985) desarrollaron un método microscópico basado en la solubilidad de las ceras en el aceite. Realizaron una curva de equilibrio entre el aceite y las ceras (curva de solubilidad). Dicha curva permite evaluar el contenido de ceras de un determinado aceite conociendo la temperatura de solubilización de los cristales de ceras en el aceite.

2.2. Objetivo

El objetivo del presente capítulo fue desarrollar un método para determinar la concentración de ceras en aceites de girasol refinados, semi-refinados y crudos. Dicho método debía ser preciso (determinación de contenidos de ceras menores a 50 ppm), reproducible y fácil de operar.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Aceite libre de ceras. Se obtuvo aceite libre de ceras a partir de un aceite comercial (Molinos Río de La Plata, S.A., Buenos Aires). El mismo se almacenó a 0 °C durante 48 h como mínimo para permitir la cristalización de las ceras remanentes y luego se centrifugó a 3000 x g durante 60 min a 0 °C. De este modo se pueden separar las ceras precipitadas del aceite de girasol refinado (en caso de que las haya).

2.3.2. Ceras libre de aceite. Se filtró aceite crudo obtenido de fondo de tanque (Molinos Río de La Plata). El residuo sólido se lavó con éter de petróleo a 0 °C. Las ceras obtenidas fueron purificadas por medio de sucesivas extracciones con hexano en caliente seguidas de centrifugación (30 min, 3000 x g, 0 °C).

2.3.3. Soluciones de ceras. Se prepararon soluciones de ceras entre 0-1000 ppm en aceite de girasol mezclando ceras purificadas con aceite libre de ceras. Luego de preparar las mezclas, el objetivo inmediato fue calentar las soluciones para lograr la

completa disolución o fusión de las ceras en la fase oleosa obteniendo una solución homogénea y al mismo tiempo eliminar la historia térmica de la muestra. Este objetivo se logró colocando las soluciones a 110 °C durante 90 min. Como conclusión de lo expuesto anteriormente, la metodología utilizada para preparar las soluciones de ceras en aceite fueron:

- pesar la cantidad de ceras necesaria (ceras libres de aceite),
- pesar la cantidad de aceite necesario (aceite libre de ceras),
- dispersar las ceras en el aceite y
- colocar inmediatamente la solución en una estufa a 110 °C durante 90 min.

2.3.4. Determinación del contenido de ceras. Se determinó el contenido de ceras de soluciones de ceras en aceite de girasol de concentración conocida por medio del método turbidimétrico desarrollado y por los métodos pre-existentes con el objetivo de comparar los resultados obtenidos. También se determinaron concentraciones de ceras en aceites de girasol refinados, semi-refinados y crudos para demostrar las aplicaciones del presente método desarrollado.

- *Cristalización isotérmica (turbidimetría de luz polarizada):* las muestras fundidas se introdujeron en una celda termostatzada a las distintas temperaturas de cristalización ensayadas (12, 22, 30 y 35 °C) para luego poder inducir la cristalización de las ceras y determinar su tiempo de inducción (intervalo entre el momento en que la muestra llega a la temperatura de cristalización y el comienzo de la cristalización que se ve reflejado por un aumento en la señal del equipo utilizado).
- *Método turbidimétrico convencional:* Las muestras fundidas se colocaron en los viales del turbidímetro (La Motte 2008; Chestertown, MD) y se enfriaron en un baño de agua-hielo hasta 21 °C. Luego se procedió a realizar la medida turbidimétrica.

- **Método microscópico:** Las muestras fundidas fueron enfriadas a 0 °C y almacenadas a ésta temperatura durante 48 h de modo de asegurar una cristalización completa de las ceras. Luego, 70 µL de la muestra fueron colocados entre un portaobjetos y un cubreobjeto (previamente se agitó la muestra para asegurar la homogeneización de la misma) junto con una termocupla muy fina de cobre-constantan para observar la fusión de las ceras en función del aumento de temperatura y de éste modo determinar su concentración (Rivarola y col., 1985).
- **Test del frío:** Las muestras fundidas se almacenaron a 0 °C durante 24 h y luego se observó la presencia o ausencia de turbidez de las mismas.

2.3.5. Cristalización isotérmica (Turbidimetría de luz polarizada). El fundamento de la técnica es inducir la cristalización isotérmica de las ceras presentes en el aceite de girasol. El proceso de cristalización fue seguido por medio de un sistema óptico de alta resolución. El equipo utilizado es una modificación del utilizado por Chong y Sato (Herrera, 1994). Se utilizó un láser de Helio-Neón como fuente de luz. La muestra se colocó en una celda con una camisa de agua que permite termostatar la muestra a la temperatura de cristalización deseada por medio de la circulación de agua a partir de un baño termostático adecuado. Entre la fuente de luz (láser) y la celda se encuentra un polarizador (polarización de la luz del láser) y la luz transmitida por los cristales atraviesan el segundo analizador colocado en la posición de Cross-Nicols con respecto al primero. Este diseño permite la detección de cristales ópticamente activos por medio de un fotodiodo de Cd-S que actúa como detector (Herrera, 1994). A continuación se muestra un esquema del equipo.

2.3.6. Método turbidimétrico convencional. La turbidez determinada por este método es medida en unidades nefeloturbidimétricas (NTU) usando un Turbidímetro modelo La Motte 2008 (Chestertown, MD). El instrumento fue calibrado con una suspensión de formazina utilizada como solución estándar. Los valores de NTU fueron convertidos en unidades de concentración por medio de una curva de calibración realizada con soluciones de ceras de concentración

conocida. Para ello se utilizaron soluciones de 0 – 1500 ppm de ceras en aceite de girasol.

Figura 2.3.1. Esquema del equipo utilizado para determinar tiempos de inducción

2.3.7. Microscopía óptica. Se utilizó un microscopio de luz polarizada (Microscopio marca Leitz, modelo Ortholux II, Ernest Leitz Co., Wetzlar, Alemania) que posee una platina con control de temperatura. La temperatura de la platina se controló por medio de un baño termostático (Lauda UK 30, Werklauda, Königshofen, Alemania) que permite la circulación de una mezcla de etilenglicol:agua en una proporción 3:1. Cuando la platina llega a 5 °C, se coloca la muestra, que ha sido previamente sometida al tratamiento térmico descrito anteriormente, entre porta y cubreobjeto junto con la termocupla muy fina de cobre-constantan. En este momento, se detiene la circulación del fluido refrigerante y se comienza el calentamiento de la platina a una velocidad constante por medio de un reóstato. De este modo se puede seguir el proceso de

fusión de las ceras presentes en el aceite a medida que se aumenta la temperatura de la platina y determinar la temperatura a la cual se alcanza el equilibrio cera/aceite cuando se observa la fusión del último cristal de cera. Con éste valor de temperatura, se puede determinar la concentración de ceras en la muestra por medio de una curva de equilibrio cera/aceite que fue desarrollada con anterioridad en nuestro laboratorio (Rivarola y col., 1985).

2.3.8. Cold Test. Las muestras fundidas se almacenaron a 0 °C durante 24 h y luego se procedió a observar la presencia o ausencia visual de turbidez.

2.3.9. Estudio estadístico. Se prepararon soluciones de 0, 25, 50, 100, 250 y 750 ppm de ceras en aceite de girasol tal como se describió anteriormente. Cada solución fue preparada por duplicado y el contenido de ceras fue determinado por medio de los tres métodos descritos anteriormente. Los resultados fueron analizados por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA).

2.4. Resultados

2.4.1. Sistema óptico (turbidimetría de luz polarizada). Se desarrolló un método sensible, sencillo, preciso y fácil de utilizar para determinar la concentración de ceras en aceites crudos, semi-refinados y refinados. El fundamento del método es inducir la cristalización isotérmica de las ceras presentes en el aceite a una determinada temperatura (temperatura de cristalización) basados en la super-saturación del sistema bajo estas condiciones. El equipo utilizado consiste en un sistema óptico que detecta la presencia de sustancias ópticamente activas (cristales de ceras). Para ello, se prepararon soluciones de concentración de ceras conocida (refinado, semi-refinado y crudo) y se eligió una temperatura de cristalización adecuada según la curva de solubilidad descrita por Rivarola y col. (1985). La temperatura de cristalización fue controlada por medio de un baño que permite la circulación de agua en la camisa de la celda donde se coloca la muestra. Al introducir la muestra fundida

en la celda termostatzada a la temperatura de cristalización elegida, se da comienzo a la lectura del fotosensor y de la termocupla. Se observa que la temperatura disminuye aproximadamente a 5 °C/min hasta que alcanza un valor constante (temperatura de cristalización). La señal del láser (fotosensor) permanece constante en forma de línea de base uniforme hasta que se produce la cristalización de las ceras. La señal del fotosensor (o detector) y la temperatura de la celda (termocupla de cobre-constantan) -mV y °C respectivamente- fueron registradas en el mismo gráfico. El equipo utilizado fue descrito en la Figura 2.3.1. en la sección de Materiales y Métodos. El proceso de cristalización puede producirse antes o después de alcanzada la temperatura de cristalización de acuerdo tanto a la concentración de ceras en la solución como a la temperatura de cristalización elegida tal como se explicará en detalle más adelante. Cuando comienza la cristalización o, mas específicamente la nucleación del sistema, se observa un salto importante en la señal del láser indicando la aparición de cristales ópticamente activos. El tiempo que transcurre entre el momento en el que se alcanza la temperatura de cristalización y el aumento de la señal se define como tiempo de inducción y se calcula extrapolando las pendientes de ambos eventos. Es importante destacar que el tiempo de inducción debe ser un valor lo suficientemente grande como para ser medido pero no tan grande como para que el método deje de ser eficiente y rápido. Para lograr obtener un rango de tiempos de inducción adecuados se varió la temperatura de cristalización ya que las concentraciones deben ser fijadas pues el objetivo es estudiar concentraciones de ceras entre 0-1000 ppm. Como se mencionó anteriormente, el tiempo de inducción depende fuertemente no sólo de la concentración de la muestra sino también de las condiciones de proceso (temperatura de cristalización y agitación aplicada en la celda de cristalización). En los estudios realizados la agitación se mantuvo constante para estudiar solo el efecto de la concentración y de la temperatura sobre el proceso de cristalización de las ceras en el aceite de girasol. La Figura 2.4.1. muestra un gráfico típico de los registros mencionados anteriormente. Por medio de éste tipo de gráfico se puede calcular el tiempo de inducción de cada una de las muestras.

Figura 2.4.1. Respuesta típica del sistema óptico y seguimiento de la temperatura en la celda de cristalización

2.4.2. Temperaturas de cristalización. Una vez estandarizadas las condiciones de preparación y tratamientos térmicos de las muestras, se comenzó a medir los tiempos de inducción de soluciones de ceras en aceite de concentración conocida. Las primeras soluciones preparadas fueron de 0-100 ppm (concentraciones de ceras encontradas en aceites de girasol refinados); las temperaturas de cristalización obtenidas se detallan en la Tabla 2.4.1. La primer temperatura de cristalización elegida fue de 16 °C (según el rango de concentración seleccionado y la curva de solubilidad desarrollada por Rivarola y col., 1985) y las soluciones ensayadas fueron de 98, 47 y 11 ppm. Como puede observarse en la Tabla 2.4.1., a medida que aumenta la concentración de ceras (C), el tiempo de inducción (τ) disminuye para una temperatura de cristalización constante (T_c). Para la solución de 11 ppm no se obtuvo tiempo de inducción en un periodo de 2 h de corrida (límite de tiempo arbitrario elegido para considerar el sistema dentro de una metodología rápida). Debido a que unos de los principales objetivos de este trabajo fue desarrollar un método de determinación de ceras en aceites de girasol refinados (contenidos de ceras entre 0 y 50 ppm), se disminuyó la temperatura de

cristalización a 12 °C, obteniéndose un tiempo de inducción de 59 min para la solución de 11 ppm.

Tabla 2.4.1. Temperaturas de cristalización y tiempos de inducción obtenidos para algunas soluciones de concentración conocidas.

C (ppm)	T_c (°C)	τ (min)
98	16	6,4
47	16	25,5
11	16	--*
11	12	59,0

* No se obtuvo τ en un período de 2 horas (no se produjo cristalización en éste periodo de tiempo)

Las soluciones de mayor concentración ($C > 50$ ppm) poseen un tiempo de inducción muy corto cuando son sometidas a ésta temperatura de cristalización ($T_c = 12$ °C). A continuación, se estudiaron concentraciones del orden de las 100 ppm a distintas T_c y los resultados obtenidos se detallan en la siguiente tabla. De estos datos se concluyó que la temperatura óptima para soluciones del orden de 100 ppm es la de 22 °C.

Sabiendo que el tiempo de inducción de una solución de 11 ppm es de 59 min (Tabla 2.4.1) y siendo ésta concentración cercana al límite inferior de detección que deseamos obtener, se prepararon soluciones de concentración de 11, 13, 16, 21, 31, 40 ppm y se cristalizaron a 12 °C sabiendo que los tiempos de inducción disminuirán a medida que aumenta la concentración de ceras en el aceite. De éste modo se obtuvieron los respectivos tiempos de inducción (promedios de 3 medidas realizadas bajo las mismas condiciones experimentales) calculados a

partir de un gráfico de señal del láser (mV) vs. tiempo de corrida según fue detallado con anterioridad.

Tabla 2.4.2. Temperaturas de cristalización y tiempos de inducción para soluciones de aproximadamente 100 ppm.

C (ppm)	T_c (°C)	τ (min)
73	25	--*
73	20	< 0
73	22	14,7
100	22	6,8
100	24	30,0

* No se obtuvo τ en un período de 2 horas (no se produjo cristalización en éste período de tiempo)

Cuando se intentó correr una solución de 50 ppm a 12 °C el tiempo de inducción encontrado fue menor que cero; esto implica que la cristalización se produjo antes de que el sistema alcance la T_c haciendo imposible el cálculo del tiempo de inducción (tiempos de inducción menores a cero, lo cual no tiene ningún sentido físico). Teniendo en cuenta éstos resultados, se corrió la misma solución a una temperatura mayor. De acuerdo a los datos analizados anteriormente se realizó una cristalización isotérmica de la solución a una T_c de 22 °C, obteniendo un tiempo de inducción aceptable. A partir de ésta determinación se probaron soluciones de mayor concentración (52, 62, 85, 102, 120, 151 ppm) cristalizadas a la misma T_c (T_c=22 °C) hasta alcanzar una concentración en la cual el tiempo de inducción vuelva a dar un valor negativo. El rango de concentración de soluciones que cristalizan a una temperatura de 22 °C es de 50-150 ppm. A continuación se buscó una temperatura para concentraciones mayores a 150

ppm y nuevamente utilizando la curva de solubilidad de ceras se aumentó la temperatura a 30 °C obteniendo valores de tiempos de inducción razonables en el rango de 150-500 ppm (concentraciones correspondientes a aceites de girasol crudos). Las soluciones que se corrieron fueron de 201, 252, 302, 400, 500 ppm. Con el objetivo de ampliar aún mas el rango de aplicación del método se buscó una temperatura que pueda representar la situación de aceites de concentraciones mayores (representación de aceites crudos). Se encontró que para 500, 598, 757, 1000 ppm el tiempo de inducción caía dentro de los valores esperados cuando la cristalización se producía a 35 °C. A continuación se detallan las condiciones de cristalización, los tiempos de inducción y las concentraciones de las soluciones ensayadas (Tablas 2.4.3., 2.4.4., 2.4.5. y 2.4.6. para las cristalizaciones realizadas a 12, 22, 30 y 35 °C respectivamente).

**Tabla 2.4.3. Tiempos de inducción hallados para soluciones de 10-100 ppm.
Cristalización isotérmica a 12 °C.**

C	T_c	τ
(ppm)	(°C)	(min)
11	12	48,3 ± 1,8
13	12	10,2 ± 1,1
16	12	7,1 ± 0,3
21	12	3,6 ± 0,3
31	12	2,8 ± 0,1
40	12	1,8 ± 0,2

**Tabla 2.4.4. Tiempos de inducción hallados para soluciones de 50–150 ppm.
cristalización isotérmica a 22 °C.**

C (ppm)	T_c (°C)	τ (min)
52	22	54,5 ± 0,9
62	22	25,8 ± 1,0
85	22	10,7 ± 1,5
102	22	6,1 ± 0,5
120	22	3,2 ± 0,2
151	22	2,0 ± 0,6

**Tabla 2.4.5. Tiempos de inducción hallados para soluciones de 200–500 ppm.
cristalización isotérmica a 30 °C.**

C (ppm)	T_c (°C)	τ (min)
201	30	50,9 ± 0,3
252	30	11,7 ± 0,8
302	30	7,3 ± 0,1
400	30	2,4 ± 0,8
500	30	1,5 ± 0,3

**Tabla 2.4.6. Tiempos de inducción hallados para soluciones de 500–1000 ppm.
Cristalización isotérmica a 35 °C.**

C (ppm)	T_c (°C)	τ (min)
500	35	39,4 ± 0,2
598	35	19,1 ± 0,2
757	35	5,1 ± 0,5
1000	35	2,7 ± 0,2

2.4.3. Relación entre los tiempos de inducción y la concentración de ceras de la muestra. Una vez que se determinaron los tiempos de inducción de las soluciones detalladas anteriormente, se graficaron los valores hallados en función de la concentración de ceras de la muestra para cada una de las temperaturas de cristalización ensayadas (12, 22, 30, 35 °C)(Figura 2.4.2.).

Los valores graficados en la figura anterior fueron regresionados con el programa estadístico Systat. La mejor correlación obtenida para cada uno de los gráficos respondió a un comportamiento exponencial decreciente. Los resultados se expresan por medio de la siguiente ecuación:

$$y = A_1 e^{-(x-x_0)/t_1} + A_2 e^{-(x-x_0)/t_2} \quad [1]$$

donde x : contenido de ceras expresado en ppm e y : tiempos de inducción expresados en minutos. Los valores de las constantes (A_1 , t_1 , x_0 , A_2 , t_2) varían para cada una de las temperaturas ensayadas (Tabla 2.4.7). Mediante estos valores se puede calcular la concentración de una muestra desconocida determinando

simplemente el tiempo de inducción a la temperatura de cristalización correspondiente.

Figura 2.4.2. Tiempos de inducción en función de la concentración de ceras para las diferentes temperaturas de cristalización

Tabla 2.4.7. Valores de las constantes obtenidas para las curvas exponenciales decrecientes

Temperatura (°C)	A ₁	x ₀	t ₁	A ₂	t ₂
12	27,79	11,18	0,66	9,54	12,82
22	32,94	51,59	0,47	41,69	22,55
30	17,67	200,97	106,03	33,51	4,44
35	5,40	505,95	692,73	31,14	67,73

En los gráficos de tiempo de inducción vs. concentración de ceras, se puede observar que los valores obtenidos para temperaturas menores son los que poseen mayor error debido a que la temperatura de cristalización varía fuertemente con la concentración de ceras; mientras que para temperaturas mayores, esta variación es marcadamente menor lo cual implica menor error en las determinaciones realizadas. Esta observación se correlaciona con la curva de solubilidad de ceras, la cual aumenta rápidamente para concentraciones menores a 100 ppm mientras que para concentraciones mayores la pendiente de la curva es menor. El error en cada uno de los gráficos se puede analizar a partir de una representación de $\ln \tau$ vs. concentración de ceras que debería tener un comportamiento lineal. El coeficiente de correlación obtenido al realizar una regresión lineal es la medida del error en las determinaciones (Figura 2.4.3.). En la Tabla 2.4.8. se detallan los parámetros de las rectas obtenidas de las regresiones correspondientes al gráfico de la Figura 2.4.3.

Figura 2.4.3. Representación gráfica de $\ln \tau$ en función de la concentración de ceras

**Tabla 2.4.8. Parámetros de la regresión lineal correspondiente a las rectas de la
Figura 2.4.3**

Temperatura (°C)	Parametros ($y = A + B x$)		
	A	B	R
12	3,70	-0,085	-0,82276
22	5,42	-0,036	-0,97098
30	5,47	-0,011	-0,91173
35	6,04	-0,005	-0,93445

2.4.4. Determinación de la concentración de ceras. Se prepararon distintas soluciones de contenido de ceras conocido, se determinaron los tiempos de inducción de éstas soluciones y se calculó la concentración de las mismas por medio de las curvas de correlación detalladas anteriormente. Las concentraciones ensayadas fueron: 117, 322 y 400 ppm (dil. 1/10). A continuación se determinaron los tiempos de inducción de soluciones de 125 y 1500 ppm y de las siguientes diluciones (1/5, 1/10 y 1/2, 1/5, 1/10, 1/100 respectivamente). Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 2.4.9.

2.4.5. Comparación de distintos métodos. Se compararon las metodologías preexistentes (microscopía y turbidimetría) con el método desarrollado en este trabajo. Se ensayaron soluciones de 125 y 1500 ppm y de sus respectivas diluciones (detalladas anteriormente) por los métodos arriba mencionados. El método microscópico se basa en la curva de solubilidad de ceras en el aceite tal como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Para realizar las medidas turbidimétricas se realizó una curva de calibración con soluciones de concentración de ceras conocidas. Se prepararon soluciones que abarcaran todo

el rango de concentración estudiado y se leyeron las NTU correspondientes. Con éstos valores se realizó un gráfico de concentración de ceras en función de NTU. La curva obtenida puede observarse en la Figura 2.4.4.

Tabla 2.4.9. Tiempos de inducción y concentraciones de algunas soluciones preparadas en el laboratorio

Soluciones (ppm)	T_c (°C)	τ_{medio} (min)	σ_{n-1}	C_{medio} (ppm)	σ_{n-1}	C_f (ppm)
117	22	4,1	0,6	104	3	104
322	30	6,3	0,5	311	9	311
400 dil 1/10	12	0,8	0,1	43,4	0,6	434
1500	35	--	--	--	--	>1000
1500 dil ½	35	4,6	0,2	749	9	1498
1500 dil 1/5	30	8,5	0,1	300,1	32,2	1500
1500 dil 1/10	22	1,0	0,7	139	18	1390
1500 dil 1/100	12	15,3	2,7	12,2	0,3	1220
125	22	1,3	0,4	130	7	130
125 dil 1/10	12	10,3	0,9	12,9	0,2	129
125 dil 1/5	12	3,5	0,1	24,1	0,1	120

T_c : Temperatura de cristalización expresada en °C; τ_{medio} : Tiempo de inducción promedio de tres medidas expresado en minutos; σ_{n-1} : Desviación estándar de la medida; C_{medio} : Concentración calculada a partir de las curvas de correlación (valores medios expresados en ppm); C_f : Concentración final de la solución obtenida multiplicando el valor de C_{medio} por el factor de dilución correspondiente.

Una vez realizada la curva de calibración, las muestras se procesaron como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Se obtuvo el valor de NTU correspondiente y luego, por medio de la curva de calibración se determinó su concentración. Es importante estandarizar bien las condiciones de medida y esperar que las lecturas se estabilicen ya que para soluciones concentradas, estas oscilan debido a la gran cantidad de ceras presentes. Los valores obtenidos por los tres métodos (sistema óptico, microscopía y turbidimetría) fueron comparados con el test del frío (Tabla 2.4.10).

Figura 2.4.4. Curva de calibración del método turbidimétrico

Tabla 2.4.10: Concentración de ceras determinada por distintos métodos

Soluciones (ppm)	Microscopía (ppm)		Sistema óptico (ppm)		Turbidimetría (ppm)		Test del frío
	C	C _f	C	C _f	C	C _f	
1500	1120 ± 134	1120	>1000	>1000	1093 ± 5	1093	+++
1500 _(dil. 1/2)	674 ± 32	1384	749 ± 9	1498	793 ± 39	1586	++
1500 _(dil. 1/5)	319 ± 24	1595	300 ± 32	1500	201 ± 14	1005	+
1500 _(dil. 1/10)	159 ± 24	1590	139 ± 18	1390	120 ± 3	1200	--*
1500 _(dil. 1/100)	S/C (n=3)		12,2 ± 0,3	1220	94,0 ± 7,0	9400	--
125	124 ± 18	124	130 ± 7	130	138 ± 4	138	+
125 _(dil. 1/5)	S/C (n=3)		24,1 ± 0,1	120.5	78,0 ± 3,8	390	--
125 _(dil. 1/10)	S/C (n=3)		12,9 ± 0,2	129	81,0 ± 2,0	810	--

--, límpido; --*, ligeramente turbio; + turbio; ++ turbidez fácilmente visible; +++ turbidez importante. C_f : Concentración final de la solución obtenida multiplicando el valor de C_{medio} por el factor de dilución correspondiente. S/C : no se observan cristales en ninguno de los campos observados en tres determinaciones realizadas.

2.4.6. Estudio Estadístico. Como se puede observar a partir de los datos detallados en la Tabla 2.4.11., los valores de concentración obtenidos por los tres métodos son comparables. El siguiente objetivo fue determinar la validez de los datos obtenidos; para lo cual se realizó un test ANOVA. Se prepararon soluciones de 0, 25, 50, 100, 250 y 750 ppm de ceras en aceite de girasol tal como se detalló anteriormente. Estas soluciones fueron realizadas por duplicado. Una vez obtenidas las doce soluciones, se determinaron las concentraciones de las mismas utilizando los tres métodos en cuestión. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla 2.4.11.

Tabla 2.4.11. Concentraciones (ppm) de las soluciones preparadas para realizar el test de ANOVA

C (ppm)	Microscopía	Sistema óptico	Turbidimetría
0	S/C	< 10	68,1
0	S/C	<10	78,0
28.2	S/C	20,5	68,1
27.0	S/C	24,4	63,9
53.0	68,3	51,2	76,6
55.2	60,3	54,1	72,4
100	93,8	102	93,6
101	90,3	108	90,7
252	291	235	249
251	238	237	236
752	706	813	689
750	812	764	736

S/C : no se observan cristales en ninguno de los campos observados en tres determinaciones realizadas.

Los resultados para concentraciones mayores a 100 ppm se encuentran en el mismo orden para los tres métodos estudiados. El objetivo de la realización del test de ANOVA fue comprobar que la diferencia en los valores de concentración hallados por cada uno de los métodos no son estadísticamente significativas. Por lo tanto este test fue aplicado al error relativo porcentual (ERP) obtenido para las soluciones de concentraciones mayores a 100 ppm (100, 250, y 750 ppm). Este error se define como la diferencia entre los valores obtenidos con cada uno de los métodos estudiados y la concentración real de la solución (Tabla 2.4.12.). El test de ANOVA fue realizado a estos valores de ERP usando el programa Systat. Por medio de éste test se analizó si el método usado y la concentración de la muestra influían en la determinación de la concentración de la misma y si existía algún tipo de relación entre estos dos factores que pudieran interferir en dicha determinación. Los resultados demuestran que los factores analizados no afectan significativamente los valores de ERP hallados ($P < 0.05$). Esto significa que para concentraciones mayores a 100 ppm los tres métodos son estadísticamente similares y por lo tanto los valores arrojados por ellos son comparables. Cabe destacar que este test no se pudo aplicar para soluciones de baja concentración (contenidos de ceras menores a 100 ppm) ya que los valores hallados por los tres métodos son diferentes debido a las limitaciones conocidas del método microscópico y turbidimétrico. Este hecho muestra la ventaja del método óptico (láser) frente a los métodos pre-existentes para determinar contenido de ceras en aceite de girasol refinado.

Tabla 2.4.12. Comparación de los distintos métodos por el test de ANOVA

Método	Concentración Real (ppm)	Medidas (ppm)	ERP (%)
A	100	93,8	-6,2
B	100	102	2,0
C	100	93,6	-6,4
A	101	90,3	-10,6
B	101	108	6,9
C	101	90,7	-10,2
A	252	291	15,5
B	252	235	-6,7
C	252	249	-1,2
A	251	238	-5,2
B	251	237	-5,6
C	251	236	-6,0
A	752	706	-6,1
B	752	813	8,1
C	752	689	-8,4
A	750	812	8,2
B	750	764	1,9
C	750	736	-1,9

A : Método Microscópico; B : Sistema óptico; C : Método turbidimétrico

2.4.7. Aplicación del método desarrollado a muestras de aceites refinados, semi-refinados y crudos. Una vez comprobada la veracidad de los resultados obtenidos por el sistema óptico, se procedió a determinar la concentración de ceras en algunas muestras (refinados, semi-refinados y crudos) provistas por Molinos Río de La Plata y Guipeba-Ceval. Estas concentraciones fueron determinadas utilizando los tres métodos mencionados con anterioridad, los resultados obtenidos se detallan en las Tablas 2.4.13 y 2.4.14. Debido a que algunos aceites crudos poseían gran cantidad de impurezas, que no son eliminadas por filtración en caliente ya que poseen la misma solubilidad que las ceras, cuando se producía la cristalización de las ceras en el aceite a la temperatura de cristalización correspondiente, la señal del láser decrecía en lugar de aumentar como debería ser su comportamiento habitual. Esto se debe a que el sistema óptico desarrollado se basa en una turbidimetría de alta definición y cualquier impureza que cristalice a una temperatura dada influirá en la lectura del fotodiodo del láser. Para solucionar este inconveniente, se realizaron diluciones de aquellas soluciones que presentaban este tipo de comportamiento. Las diluciones se llevaron a cabo con aceite libre de ceras y por pesada; de este modo se pudo calcular el tiempo de inducción y por medio del factor de dilución se obtuvo la concentración de ceras de la solución original. Se puede concluir que las impurezas presentes en el aceite son las responsables del comportamiento fuera de lo común de los aceites crudos con respecto a las soluciones preparadas en el laboratorio debido a que co-cristalizan con las ceras aumentando notablemente la turbidez del medio e impidiendo la detección de la señal del láser por medio del fotodiodo. Este comportamiento no se observó para aceites refinados o semi-refinados de girasol.

Tabla 2.4.13. Valores de concentración de las muestras obtenidas con el sistema óptico

Muestras	T_c (°C)	τ_{medio} (min)	σ_{n-1}	C_{medio} (ppm)	σ_{n-1}	C_f
1 ^a	22	12,5	2,6	79,1	4,8	791
2 ^a	22	14,9	2,7	75,0	4,1	750
3 ^a	22	6,1	0,7	95,0	2,7	950
4 ^a	12	12,0	0,2	12,5	0,1	125
5 ^a	22	11,5	0,6	80,7	1,2	807
6 ^a	22	23,8	1,9	65,9	0,5	659
7 ^a	22	16,1	2,3	73,2	3,4	732
8 ^a	12	1,3	0,1	37,1	0,1	371
9 ^a	22	17,5	1,1	71,2	1,5	712
10	12	8,4	0,5	13,7	0,3	137
11	12	12,9	1,4	12,4	0,2	12,4
12	12	9,2	0,6	13,3	0,2	13,3
13	12	∞^b	--	--	--	<10
14	12	13,1	--	13,5	--	13,5
15	12	∞^b	--	--	--	<10
16 ^a	22	7,0	0,7	91,9	2,2	919
17 ^a	12	9,4	0,7	13,3	0,3	133
18 ^a	22	23,3	7,7	65,5	7,4	655
19	22	8,5	1,9	86,8	4,9	86,8

^a Valores medidos con una dilución 1/10 del aceite crudo; ^b No se produjo cristalización luego de un periodo de 2 horas de medida C_f: Concentración final de la solución obtenida multiplicando el valor de C_{medio} por el factor de dilución correspondiente.

Tabla 2.4.14: Comparación de los valores de concentración de las muestras obtenidas por los tres métodos

Muestras	Concentración (ppm)			Test del frío
	Microscopía	Sistema óptico	Turbidimetría	
1	714 ± 62 ^a	791 ± 48	757 ± 45	+++
2	740 ± 63 ^a	750 ± 41	623 ± 56	+++
3	1128 ± 29 ^a	950 ± 27	1272 ± 110	+++
4	880 ± 130	764 ± 9	704 ± 73	++
5	826 ± 17 ^a	807 ± 12	780	++
6	653 ± 31 ^a	659 ± 5	676 ± 43	++
7	777 ± 14 ^a	732 ± 34	988 ± 70	+++
8	S/C ^a	371 ± 1	411 ± 28	+
9	656	712 ± 15	610 ± 93	--
10	168 ± 35	137 ± 3	137 ± 22	+
11	70,2 ± 6,0	12,4 ± 0,4	64,8 ± 1,6	--
12	64,3 ± 7,0	13,3 ± 0,2	62,0 ± 1,7	--
13	52,0 ± 1,4	< 10	68,6 ± 3,6	--
14	S/C ^a	13,5	93,1 ± 45,0	--
15	S/C ^a	< 10	--	--
16	997 ± 89 ^a	919 ± 22	946 ± 12	+++
17	186 ± 19	133 ± 3	197 ± 2	+
18	637 ± 22 ^a	668 ± 41	769 ± 8	+++
19	162 ± 9	86,8 ± 4,9	208 ± 17	+

^a Valores medidos con una dilución 1/10 del aceite crudo; S/C : no se observan cristales en ninguno de los campos observados en tres determinaciones realizadas.

2.5. Conclusiones.

Resumiendo los resultados obtenidos en este capítulo podemos decir que se ha desarrollado un método turbidimétrico de alta resolución para determinar el contenido de ceras en aceites refinados, semi-refinados y crudos. Dicho método es sencillo de utilizar y no requiere largos tiempos de procesamiento de la muestra. Los resultados obtenidos a partir de las determinaciones realizadas con éste turbidímetro fueron comparadas con los métodos pre-existentes para la determinación de ceras. Para concentraciones de ceras menores a 100 ppm el método microscópico y turbidimétrico arrojan valores notablemente mayores a los determinados por el sistema óptico. Este hecho puede explicarse debido a que los dos primeros no son lo suficientemente sensibles para detectar bajos contenidos de ceras y por lo tanto no son recomendables para ser aplicados a muestras de aceites refinados. Esto responde a que los cristales detectados por estos métodos deben tener un tamaño mínimo de 2 μm . En cambio, el sistema óptico (turbidímetro de alta resolución) es capaz de detectar cristales de tamaño menores a 2 μm representando la etapa inicial del proceso de cristalización de la muestra (nucleación), aumentando la sensibilidad del método. Una pequeña limitación del método desarrollado es que no es lo suficientemente sensible cuando los tiempos de inducción son muy pequeños (<1 min). Esta situación se produce cuando las soluciones ensayadas se encuentran en el límite de concentración (muy alta supersaturación) para cada intervalo de temperatura de cristalización (40-50 ppm, 150 ppm, 500 ppm y 1000 ppm aproximadamente para temperaturas de cristalización de 12, 22, 30 y 35 °C respectivamente).

Capítulo 3

Cristalización de Ceras en Aceite de Girasol. Diferencias y Similitudes con la Cristalización de un fundido (grasa de leche- aceite de girasol)

Capítulo 3: Cristalización de ceras en aceite de girasol. Diferencias y similitudes con la cristalización de un fundido (grasa de leche-aceite de girasol)

Debido a que la separación de ceras del aceite involucra la cristalización de las mismas, introduciremos brevemente algunos conceptos acerca de dicho proceso. Tal como se mencionó anteriormente, las ceras tienen características lipofílicas clasificándose dentro de los sistemas lipídicos. Es importante, por lo tanto conocer los parámetros que influyen en el proceso de cristalización analizando las similitudes y diferencias que pueden encontrarse cuando dicho proceso se origina a partir de distintos tipos de sistemas lipídicos (solución de ceras en aceite de girasol y un fundido de mezclas de grasa de leche y aceite de girasol).

3.1. Introducción

El término *cristalización* describe diferentes fenómenos relacionados con la formación de una red cristalina. Las cuatro etapas involucradas típicamente en la cristalización son:

1. Generación de un estado de *sobre-saturación* o *sobre-enfriamiento*,
2. *Nucleación*: formación de una estructura de red cristalina a partir de una solución o de un fundido,
3. *Crecimiento*: crecimiento gradual del núcleo hasta que se alcanza el equilibrio y
4. *Maduración*: reorganización de la estructura cristalina para alcanzar un estado de menor energía, generalmente sin cambio de volumen de la fase cristalina.

En primer lugar, con el objetivo de formar un cristal, la fase líquida debe superar la condición de equilibrio y transformarse en un estado de *sobre-saturación* (en el caso de una solución) o de *sobre-enfriamiento* (en el caso de una muestra enfriada desde el fundido). Este estado puede alcanzarse enfriando un compuesto por debajo de su punto de fusión (por ej. agua) o generando de alguna manera una concentración en solución mayor que la concentración de solubilidad del sistema específico (ej. azúcares, sales, etc.). Estas condiciones de sobre-saturación o sobre-enfriamiento en alimentos están regidas por factores de formulación o condiciones de procesamiento. Una vez que la solución o el fundido han sido sobre-saturados, existe una fuerza termodinámica que produce la cristalización. Esto significa que las moléculas tienden a formar un estado cristalino para disminuir el nivel de energía del sistema. Durante el proceso de *nucleación*, las moléculas en la fase líquida se reordenan y eventualmente forman una estructura estable que se organiza en una red cristalina. La redistribución ordenada de las moléculas en la red involucra una liberación de calor latente a medida que se produce el cambio de fase. La nucleación también depende de la formulación (tipo y concentración de agentes promotores o inhibidores de la nucleación) y de las condiciones de proceso (velocidades de transferencia térmica y de masa). Sin embargo, en muchos sistemas puede haber condiciones en donde la nucleación está inhibida, especialmente cuando la sobre-saturación es muy alta, y el sistema se convierte en estado vítreo. Este fluido sobre-saturado y viscoso puede tener características similares a un sólido, condición requerida para ciertos productos alimenticios.

Los núcleos que se forman pueden crecer a un mayor tamaño dependiendo de la sobre-saturación del sistema. El grado de este *crecimiento* depende de la magnitud de sobre-saturación remanente en la solución luego de que la nucleación ha ocurrido. El crecimiento continúa hasta que toda la sobre-saturación disponible ha sido eliminada y el sistema llega al equilibrio, esto depende de la temperatura y la composición del sistema. Por ejemplo, si se deja cristalizar un jarabe de azúcar altamente concentrado, la concentración de la solución remanente disminuye hasta que alcanza la concentración de equilibrio (solubilidad) característica para esa temperatura y ese sistema. Una vez que la

concentración de solubilidad se alcanza, el proceso de cristalización se detiene ya que el sistema ha adquirido una fase estable de material cristalino. Cuando se alcanza el equilibrio y si se somete al sistema a un período de almacenamiento largo, se pueden producir cambios en la estructura cristalina. Esto es particularmente cierto en el almacenamiento de alimentos, donde la temperatura y humedad relativa pueden variar con el tiempo a medida que el alimento es transportado. Sin embargo, aun bajo condiciones de temperatura y humedad constante, se pueden producir cambios en la estructura cristalina para minimizar la energía del sistema. Este fenómeno tendiente a lograr un equilibrio más global se denomina *maduración* (o ripening) el cual involucra un cambio tanto en la energía libre superficial como en la energía interna. Dos ejemplos que describen la maduración en alimentos son el aglomeramiento (o coarsening) de cristales de hielo en alimentos congelados durante el almacenamiento y la formación de “bloom” en chocolate. Para controlar la cristalización en alimentos, cada uno de los pasos descritos anteriormente deben ser controlados de modo de obtener una estructura cristalina dada y las características deseadas en un producto específico (textura y estabilidad en el almacenamiento). El control del proceso de cristalización involucra la elección cuidadosa de ingredientes que promuevan la estructura deseada, condiciones de procesamiento adecuadas que induzcan o prevengan la cristalización y las condiciones de almacenamiento propicias para mantener la estructura cristalina deseada o prevenir la formación de cristales no deseados. En muchos productos alimenticios, el control de la cristalización no es un objetivo fácil de cumplir ya que nuestros conocimientos de cómo influyen los parámetros de cristalización en la formación y crecimiento cristalino es limitada. Para lograr un control mas adecuado de la calidad del producto es importante poseer una mejor comprensión de los fundamentos de la cristalización (Hartel, 2001). Habiendo descrito los pasos fundamentales en el proceso de cristalización y los factores que lo rigen, pasaremos a describir con mas detalle cada una de éstas etapas.

3.1.1. Mecanismos involucrados en el proceso de sobre-saturación y sobre-enfriamiento. a) Soluciones. Para que se produzca la nucleación a partir de una

solución, es necesario crear un estado de sobre-saturación del sistema alcanzando una concentración C mayor a la concentración de saturación del mismo (C_s) o solubilidad del soluto en un solvente dado. Esta diferencia en concentración genera una diferencia entre los potenciales químicos de la solución sobre-saturada y de la saturada:

$$\Delta\mu = k_B T \ln C/C_s = 2\gamma v/r^* \quad [1]$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, γ la energía libre superficial entre el núcleo y la solución, r^* el radio del núcleo considerado esférico, y v el volumen de una molécula dentro del núcleo. La ecuación [1] (Ec. de Gibbs-Thomson), relaciona el tamaño cristalino y la sobre-saturación. Esta ecuación muestra que para cada valor de sobre-saturación corresponde un radio crítico para el cual el núcleo o el cristal está en equilibrio con la solución. Cualquier núcleo o cristal es estable sólo cuando la concentración de la solución es mayor que la concentración de equilibrio (solubilidad) de un cristal de tamaño infinito. La relación $\beta=C/C_s$ es generalmente el coeficiente de saturación y $(\beta-1)$, la sobre-saturación. En realidad, el término *sobre-saturación* se utiliza para denominar a las siguientes expresiones: β , $\ln\beta$, $(\beta-1)$, y también la diferencia $C-C_s$. Debido a que el proceso de nucleación y el crecimiento cristalino en solución generalmente se producen a bajas sobre-saturaciones, $\ln \beta$ puede aproximarse a $(\beta-1)$. Sin embargo, el uso de la definición de sobresaturación como $\beta=C/C_s$ permite la utilización de los valores absolutos de las concentraciones. Esto significa que se puede obtener el mismo valor de sobre-saturación en el mismo solvente debido a que la curva de solubilidad varía suficientemente rápido con la temperatura. Cuando se trabaja con soluciones, la situación es más complicada que cuando se trabaja desde el vapor o desde un fundido debido a que el valor de sobre-saturación depende de las unidades utilizadas para C y C_s : molaridades, molalidades, fracciones molares, actividades, etc. En soluciones no electrolíticas, donde las moléculas de soluto no están dissociadas, las mejores unidades son molaridades y fracciones molares. Por otro lado, en soluciones electrolíticas,

donde las moléculas de soluto están parcial o totalmente disociadas, las mejores unidades son las actividades.

b) Fundido. La aceptación de que un sólido de forma esférica y radio r^* está en equilibrio con sus aguas madres (fundido) a una temperatura T implica que el punto de fusión de un cristal pequeño está por debajo del de un cristal de tamaño infinito. En éste caso, el equilibrio se alcanza cuando

$$\Delta\mu = 2\gamma v / r^* = \Delta H_{\text{fus}} (T_{\text{fus}} - T) / T_{\text{fus}} \quad [2]$$

donde T_{fus} y ΔH_{fus} , son las temperatura y entalpía de fusión por molécula respectivamente. γ , la energía libre interfacial entre el sólido y el fundido, y v , el volumen de una molécula en el sólido, la diferencia $\Delta T = (T_{\text{fus}} - T)$ se denomina sobre-enfriamiento.

3.1.2. Nucleación. La nucleación o la formación de una fase cristalina, es probablemente el paso más importante para controlar la cristalización en alimentos. Para producir una estructura cristalina adecuada (número, tamaño, distribución, forma y polimorfismo) es necesario lograr en el proceso un adecuado avance de la nucleación en un tiempo apropiado. Por este motivo es importante entender los mecanismos de nucleación, la cinética o la velocidad a la cual ocurre, y como los parámetros operacionales y la formulación del producto influyen en estas velocidades.

La nucleación generalmente se clasifica en primaria y secundaria involucrando mecanismos homogéneos y heterogéneos para el primer caso. La *nucleación homogénea*, involucra la formación de una red cristalina basada en la agregación de moléculas de un tamaño estable, mientras que la *nucleación heterogénea*, involucra una impureza que promueve la formación del núcleo. La *nucleación secundaria* puede producirse de diferentes maneras donde la más común es la nucleación de contacto. En este caso, el contacto entre un cristal y otro elemento como puede ser otro cristal, un agitador o una pared sólida, causa la formación de un núcleo bajo condiciones en las cuales la nucleación no se debería haber producido (zona metaestable) (Hartel, 2001).

a) *Nucleación homogénea.* La nucleación primaria homogénea es el mecanismo clásico de formación de un núcleo. A pesar de que la nucleación homogénea raramente ocurre en situaciones prácticas, es importante entender este mecanismo de formación de cristales. En la teoría clásica de nucleación, las moléculas en solución se juntan, tanto solas como unidas, con una cierta probabilidad de permanecer unidas como agrupamientos moleculares (clusters). Estos agrupamientos se forman y disocian continuamente en una solución sobresaturada. Este proceso de agregación molecular se produce basado en fluctuaciones energéticas localizadas y eventualmente se forma un núcleo estable dependiendo de la temperatura y de la sobre-saturación. La naturaleza exacta de los agrupamientos moleculares, o embriones pre-núcleo, es desconocida. Este agrupamiento involucra eventos al azar donde las moléculas se juntan, interaccionan y luego se disocian nuevamente en alguna escala de tiempo. Si las condiciones son correctas (suficiente sobre-enfriamiento o sobre-saturación), la velocidad de asociación es mayor que la de disociación y se forma un agrupamiento de tamaño crítico. En algún punto, el agrupamiento pasa de ser un agrupamiento de moléculas al azar a una red cristalina. Esto significa que la organización molecular de estos agrupamientos debe romperse y re-ordenarse antes de la formación de la red cristalina.

b) *Nucleación heterogénea.* Como se mencionó con anterioridad, la nucleación homogénea ocurre raramente en situaciones reales. Generalmente, la presencia de sitios extraños de nucleación inducen la formación del núcleo a valores de sobre-saturación y sobre-enfriamiento mucho más bajos que los requeridos para una nucleación homogénea. Estos sitios de nucleación pueden ser partículas de

polvo, impurezas, o rayaduras e imperfecciones en el recipiente que contiene la muestra. Se piensa que estos sitios orientan las moléculas de soluto de tal manera de promover la formación de la red cristalina reduciendo la energía requerida para formar una superficie estable y disminuyendo el número de interacciones moleculares requeridas para formar un núcleo estable.

c) Nucleación secundaria. En muchos sistemas, incluyendo sacarosa, hielo, ácido cítrico, lípidos y muchas sales, existe una zona metaestable de sobre-saturación donde no se produce nucleación heterogénea espontánea por un largo período de tiempo. Si se agregan semillas de nucleación a esta solución sobre-saturada, estas crecerán basadas en la cinética de nucleación del sistema pero no se formarán espontáneamente nuevos núcleos. Sin embargo, bajo determinados rangos de concentración y temperatura, se pueden formar nuevos núcleos a partir de las superficies de los cristales pre-existentes. Este proceso de formación de núcleos debido a la presencia de superficies cristalinas pre-existentes se denomina nucleación secundaria. Es importante destacar que la nucleación secundaria ocurre en condiciones bajo las cuales no se produce una nucleación heterogénea espontánea.

d) Parámetros que influyen en la nucleación. Con el objetivo de controlar y predecir el proceso de nucleación en alimentos y otros productos, es necesario cuantificar las velocidades de nucleación bajo diferentes condiciones. Los tiempos de inducción (tiempo que necesita la muestra para cristalizar desde que se alcanza la temperatura de cristalización) y las curvas de velocidad de nucleación son influenciadas por la sobre-saturación del sistema y por la temperatura de cristalización. Sin embargo, también existe una importante influencia de condiciones de procesamiento (por ejemplo, velocidad de agitación) y la presencia de impurezas o aditivos sobre los tiempos de inducción y las velocidades de nucleación.

3.1.3. Cinética de nucleación. Existen dos aspectos a considerar acerca de la cinética de nucleación. El primero de ellos es la velocidad de formación del núcleo (número de núcleos formados por unidad de volumen y tiempo) evidenciado por la producción espontánea de cristales estables y descritos por las teorías de

nulceación clásicas. El segundo se refiere al tiempo requerido para que se produzca la nucleación, el cual puede ser considerado como la velocidad de formación de embriones o agrupamientos. Los datos de nucleación están dados generalmente como velocidades de producción de núcleos en condiciones específicas o en tiempos de inducción requeridos para que comience la producción de un núcleo. A pesar de que estos parámetros están relacionados, probablemente no sean exactamente una medida del mismo proceso. Sin embargo, muchos consideran al tiempo de inducción como la inversa de la velocidad de nucleación. Ambos parámetros son importantes para controlar el proceso de cristalización.

a) *Tiempos de inducción.* Los tiempos de inducción miden el tiempo requerido para detectar la primer evidencia de formación de un núcleo. El tiempo de inducción indica una combinación del tiempo real requerido por el núcleo para formarse más un tiempo de medida que depende de la sensibilidad del equipo usado para su determinación. Por lo tanto el tiempo de inducción medido puede expresarse de la siguiente manera:

$$\tau = \tau_n + \tau_g \quad [3]$$

donde τ_n es el tiempo de inducción verdadero necesario para la formación de un núcleo y τ_g es el tiempo requerido para que el núcleo crezca lo suficiente como para ser detectado. Las técnicas de detección incluyen observación visual, índice de refracción, medidas turbidimétricas, difracción de luz (light scattering) y calorimetría. La validez de la medida del tiempo de inducción depende de la técnica utilizada. Si se requiere una observación visual de los cristales para determinar el tiempo de inducción, se debe tener en cuenta el crecimiento del cristal hasta alcanzar un tamaño detectable. Los primeros datos de medida de tiempos de inducción sufren esta desventaja, la cual ha sido parcialmente superada por el uso de microscopios. Sin embargo, la muestra observada en el microscopio debe ser grande para asegurarse la observación del primer núcleo. También se puede observar la nucleación del sistema por medio de cambios en la concentración de una solución sobre-saturada. Este cambio de concentración

puede seguirse por medio de la medida del índice de refracción de la solución. La calorimetría ha sido usada para detectar cambios térmicos generados durante la cristalización. Este es un método excelente para determinar tiempos de inducción en el caso de que exista una gran liberación de calor latente y si se produce una gran cantidad de núcleos en forma simultánea. Otra técnica muy común para medir tiempos de inducción es la turbidimetría. En este caso, la muestra debe mantenerse a una temperatura deseada y bajo condiciones de agitación controlada. Se usa una medida de absorbancia a una longitud de onda elevada para detectar la aparición de los primeros cristales debido a la difracción de la luz que ellos producen. En todos estos casos se observa el comienzo de la nucleación masiva.

b) Principios de la Teoría de Nucleación. Como hemos dicho anteriormente, un núcleo es estable solo si posee un radio crítico, r^* , el cual depende de la sobresaturación del sistema (β). Este núcleo contiene un número crítico de moléculas, i^* . Debido a que es poco probable que i^* moléculas se encuentren simultáneamente, la nucleación es considerada como el resultado de la adición de monómeros a agregados cuyos tamaños son menores que el tamaño crítico. Estos agregados se denominan *embriones* para poder distinguirlos del núcleo que ya han excedido el tamaño crítico. Cuando se alcanza el tamaño crítico, el núcleo crítico posee una gran probabilidad de transformarse en cristal. Si además imaginamos que un núcleo grande se disocia en monómeros, entonces estamos en presencia de un sistema en estado estacionario.

Antes de que el embrión se transforme en núcleo, el sistema está representado por elementos de distintos tamaños. Si el sistema está en estado estacionario, la velocidad de formación de un i -mero debe ser igual a su velocidad de desaparición. Si k^a es la constante de velocidad (frecuencia) para adicionar un monómero a un i -mero y k^s es la constante de velocidad para sustraer un monómero de un $(i+1)$ -mero. Entonces, tenemos que:

$$k_{i-1}^a N_{i-1} N_1 + k_{i+1}^s N_{i+1} = k_i^a N_i N_1 + k_i^s N_i \quad [4]$$

Cualquier embrión de la clase (i-1) se transforma en un i-mero por medio de la adición de un monómero. Pero, un i-mero también se puede formar si un monómero se escapa de un (i+1)-mero. Si reordenamos la ecuación 3 de modo de obtener el flujo de embriones que pasan de una clase inferior a una superior, obtenemos la velocidad de nucleación en estado estacionario:

$$J = k_{a_{i-1}} N_{i-1} N_1 - k_{s_i} N_i = k_{a_i} N_i N_1 - k_{s_{i+1}} N_{i+1} \quad [5]$$

Esta diferencia es constante para todo tipo de embriones. Para resolver este grupo de ecuaciones, se asume que en el equilibrio la velocidad a la cual un monómero se escapa de un embrión o es atrapado por él es la misma:

$$k_{a_{i-1}} n_{i-1} n_1 = k_{s_i} n_i \quad [6]$$

Donde las concentraciones n se suponen iguales a las concentraciones N en el estado estacionario, de modo que $N_1 = n_1$, es el número de monómeros en el sistema por unidad de volumen.

J depende principalmente del orden de los tamaños de i^* , de modo que se puede considerar como el producto de la concentración en el núcleo de tamaño crítico y la frecuencia a la cual los cristales crecen debido a la adición de un monómero, entonces,

$$J = k_{a_{i^*}} n_1 Z \exp (-\Delta G^*/k_B T) \quad [7]$$

Donde ΔG^* es la energía libre de activación para formar un núcleo de tamaño crítico y Z es denominado el Factor Zeldovich:

$$Z = (\Delta G^*/3\pi k_B T_{i^*}^2)^{1/2} \quad [8]$$

Debido a consideraciones prácticas, el producto $k_{a_{i^*}} Z$ se reemplaza por un término de frecuencia, ν , y cuando no hay ninguna razón en especial para considerar la concentración en unidades de monómeros, el producto νn_1 se

reemplaza por un coeficiente cinético K. Cuando la nucleación se produce en una fase condensada (fundido o solución), es necesario considerar la dificultad encontrada por una molécula para cruzar la interfase entre el sólido y el líquido. Esto vale especialmente para fundidos o soluciones de alta viscosidad. En este caso, es necesario agregar una energía libre adicional debido a la difusión. Por lo tanto, la ecuación 7 se puede re-escribir de la siguiente forma:

$$J = v n_1 \exp (-\Delta G^*/k_B T) \exp (-\Delta G_{vd}^*/k_B T) \quad [9]$$

Cuando la temperatura disminuye, el término de difusión puede transformarse en el paso determinante en la velocidad de nucleación y en el crecimiento cristalino.

c) *Energías libres de activación para la nucleación.* Para que se produzca la nucleación, las moléculas de las aguas madres deben formar embriones que luego se transforman en núcleos y cristales. Esto sucede en las aguas madres donde la energía media impuesta por la sobre-saturación es constante. Por lo tanto, los núcleos se producen en algunos lugares de las aguas madres donde hay fluctuaciones de energía cercanos al valor de energía medio. Para generar un núcleo, es necesario sobrepasar una barrera energética que necesita una energía libre de activación, ΔG :

$$\Delta G = -i \Delta \mu + A_1 \gamma_1 + A_2 \gamma_2 + \dots \quad [10]$$

donde las áreas superficiales $A_1, A_2, \dots$ representan diferentes caras cristalinas con distintas energías libres interfaciales $\gamma_1, \gamma_2, \dots$ con respecto a las aguas madres. Si el cristal posee un solo tipo de cara, o si el núcleo es una gota de líquido, la ecuación 10 se reduce a :

$$\Delta G = -i \Delta \mu + A \gamma \quad [11]$$

En esta expresión, el primer término representa la energía para crear el volumen del núcleo, mientras que el segundo término representa el exceso de energía para crear su superficie. Si la forma del núcleo es esférica, tenemos entonces:

$$i = 4\pi r^3/3v \quad \text{y} \quad A = 4\pi r^2 \quad [12]$$

Cuando se alcanza el equilibrio, el núcleo posee un tamaño crítico:

$$r^* = 2\gamma v / \Delta\mu \quad [13]$$

la cual es la ecuación de Gibbs-Thomson. Insertando la expresión de r^* en las ecuaciones 11 y 12, se obtiene la expresión para la energía de activación crítica para la nucleación:

$$\Delta G^* = 16\pi v^2 \gamma^3 / 3(\Delta\mu)^2 \quad [14]$$

o

$$\Delta G^* = (1/3)(4\pi r^{*2} \gamma) \quad [15]$$

El factor $16\pi/3$ resulta de la forma atribuida al núcleo. Puede ser reemplazado en una forma más general por un factor adimensional, f .

d) Nucleación heterogénea. En muchos sistemas reales, especialmente cuando la sobre-saturación no es suficientemente alta, se produce una nucleación heterogénea antes de la nucleación homogénea. Para obtener la expresión de la energía libre de activación en este tipo de proceso, es conveniente tener en cuenta el ángulo de contacto entre la partícula y el sustrato (α). El valor de α depende de la manera en que el sustrato es humedecido por el núcleo.

Las energías interfaciales involucradas en este proceso son γ_0 entre el sustrato y las aguas madres, γ_1 entre el núcleo y las aguas madres, y γ_2 entre el núcleo y el sustrato. Cuando el núcleo avanza sobre el sustrato, deben superarse dos barreras energéticas con el objetivo de crear nuevas superficies, mientras que existe una liberación de energía por la pérdida de una fracción de área del sustrato al adicionarse el núcleo sobre el mismo. La energía de activación para la nucleación heterogénea es entonces la siguiente sumatoria:

$$G = -i \Delta\mu + A_1 \gamma_1 + A_2 \gamma_2 - A_2 \gamma_0 \quad [16]$$

Donde las diferentes energías superficiales se relacionan por medio de la ecuación de Young:

$$\gamma_0 = \gamma_2 + \gamma_1 \cos \alpha \quad [17]$$

para un embrión en forma capsular se obtiene:

$$\Delta G_{\text{het}} = -(4\pi r^3/3v)(2-3 \cos \alpha + \cos^3 \alpha)/4\Delta\mu + 4\pi r^2(1 - \cos \alpha)/2\gamma_1 - 4\pi r^2(1 - \cos^2 \alpha)/4\gamma_1 \cos \alpha \quad [18]$$

y en el equilibrio, el radio crítico será:

$$r_{\text{het}}^* = 2\gamma_1 v/\Delta\mu \quad [19]$$

El tamaño del núcleo es el mismo que el formado a través de una nucleación homogénea. Sin embargo, debido a que la forma capsular contiene menor cantidad de moléculas que una esfera completa, podemos esperar que la barrera energética sea menor en el presente caso que para una nucleación homogénea. Insertando la ecuación 19 en la 18 se obtiene la expresión para la energía de activación crítica para el caso de una nucleación heterogénea:

$$\Delta G_{\text{het}}^* = \Delta G^* (1/2 - 3/4 \cos \alpha + 1/4 \cos^3 \alpha) \quad [20]$$

esta expresión es el producto de ΔG^* para una nucleación homogénea multiplicando un término que contiene el valor del ángulo de contacto, α . Para un valor de $\alpha = 180^\circ$, tenemos que $\Delta G^*_{\text{het}} = \Delta G^*$, lo cual significa que la nucleación no se produce mas fácilmente en el sustrato que en el seno de la solución. Para $\alpha = 90^\circ$, $\Delta G^*_{\text{het}} = \Delta G^*/2$, y para α tendiendo a cero (perfecta humidificación del sustrato), ΔG^*_{het} también tiende a cero, lo cual significa que en este caso límite, no se necesita energía de activación para producir la nucleación. Cuanto menor es α , es mayor el efecto catalítico del sustrato para la formación de una nueva fase.

e) *Nucleación secundaria.* A diferencia de la nucleación primaria, la nucleación secundaria se origina debido a la presencia de cristales pre-existentes en el material que se cristalizará a partir de las aguas madres. Generalmente se observa cuando la cristalización se produce en sistemas en solución. En general no es muy importante en sistemas pequeños, pero tiene más importancia en cristalizadores industriales. La cristalización secundaria es difícil de explicar en detalle debido a la especificidad de los distintos sistemas soluto-solvente: material a cristalizar, tamaño y forma del cristal, densidad de la suspensión cristalina, naturaleza y tamaño del cristizador, etc. De acuerdo a distintos estudios, la mayor fuente de nucleación secundaria es la superficie del cristal. Cualquier superficie cristalina aunque aparente ser suave y pareja, presenta rugosidades que crecen rápidamente a medida que aumenta la sobre-saturación. La nucleación secundaria se produce cuando embriones pequeños son removidos de la superficie y exceden el tamaño crítico, el cual depende de la sobre-saturación tal como se describió anteriormente. Este es el caso por ejemplo de cristales que crecen en forma dendrítica. Debido a que la forma externa de la dendrita es muy irregular, existen muchos lugares en donde el radio es menor que el radio crítico impuesto por la ecuación de Gibbs-Thomson. Por lo tanto, se produce una disolución parcial de la dendrita y ésta origina un nuevo núcleo (por ejemplo, crecimiento de cloruro de amonio en solución acuosa cristalizado en un porta). En el caso de compuestos de largas cadenas moleculares, las dendritas se forman solo cuando la sobre-saturación es muy alta y por lo tanto la nucleación

secundaria se genera en lugares donde la superficie del cristal ha sido dañada o impurificada. Existen dos causas para explicar la remoción de embriones o núcleos de la superficie. Exceptuando la disolución parcial, lo cual origina una remoción espontánea, la remoción se debe a fuerzas de roce del fluido o debido a colisiones entre el cristal y sus vecinos o con las paredes del cristizador, agitador, etc. En ambos casos, la agitación juega un rol importante: se espera una nucleación secundaria en el caso de materiales quebradizos y/o en soluciones de cristales densos donde el número de colisiones es alto.

3.1.4. Crecimiento cristalino. Una vez que el núcleo ha sido formado en una solución sobre-saturada, éstos crecen a una velocidad dependiente de las condiciones del medio que los rodea. Los cristales continúan creciendo mientras exista una condición de sobre-saturación del sistema y en la medida en que las moléculas tengan suficiente movilidad para desplazarse hacia la superficie del cristal y orientarse en la red cristalina, alcanzando un estado de equilibrio donde toda la sobre-saturación disponible ha sido consumida.

El primer paso en el proceso de crecimiento cristalino es la migración (o transferencia de masa) de las moléculas hacia la superficie del cristal que está creciendo. Este movimiento puede ocurrir por difusión o por transporte convectivo o por alguna combinación de ambos procesos. Independientemente del grado de transferencia de masa convectiva en el seno de la solución, existe todavía fluido estancado cerca de la superficie del cristal a través del cual debe producirse la difusión de moléculas. En algunos sistemas, como en los azúcares reductores (lactosa, etc.), se puede producir una reacción química para mantener el equilibrio en la solución. Por ejemplo, a medida que cristaliza la α -lactosa a partir de una solución, se produce la formación de β -lactosa por mutarrotación. Bajo ciertas circunstancias, la velocidad de esta mutarrotación puede limitar la velocidad de crecimiento cristalino. Si las especies que cristalizan poseen una forma en solución distinta a la forma necesaria para ser incorporada en la red cristalina, entonces se debe producir una transformación antes de que se pueda producir el crecimiento cristalino. Por ejemplo, las aguas de hidratación alrededor de la molécula de azúcar debe desolvatarse antes de ser incorporada a la matriz

del cristal. Por otro lado, si los “clusters” de las moléculas que cristalizan se forman en la solución sobre-saturada, estos necesitan reordenarse de modo que las moléculas puedan acomodarse en la matriz. A medida que las moléculas de la especie que está cristalizando difunden hacia la superficie del cristal que está creciendo, todas las otras moléculas deben alejarse de modo de mantener la fuerza impulsora para la cristalización. Una vez que las especies que están cristalizando alcanzan la superficie del cristal, las moléculas deben orientarse, tanto solas o como unidades multimoleculares ya crecidas, de modo de poder ser incorporadas en la matriz. Esta orientación se produce en una capa de moléculas cercana a la estructura de la matriz existente, que posee un espesor del orden de nanómetros. Esta capa llamada capa de adsorción es la región donde las moléculas de líquido se orientan de la misma forma que las moléculas en la estructura de la matriz. Una vez que se produjo la orientación de las unidades moleculares en esta capa de adsorción, estas unidades deben migrar a lo largo de la superficie hasta que encuentran un sitio apropiado para su incorporación en la matriz. Este proceso de difusión superficial continúa hasta que la incorporación real de las unidades en la matriz ocurre en un sitio favorable de la misma. La elección del sitio de incorporación en la matriz depende de la fuerza impulsora y de la velocidad de crecimiento. Si un cristal crece despacio, las unidades de crecimiento se incorporan en el sitio energéticamente más favorable, mientras que crecimientos rápidos resultan en un arreglo más desorganizado de las unidades de crecimiento y la matriz del cristal es menos perfecta. Una vez que las moléculas fueron incorporadas en la matriz, el calor latente de fusión asociado con el cambio de fase debe ser removido de los alrededores de la superficie cristalina. En sistemas en solución esto se produce principalmente a través de la fase líquida a una velocidad que depende de los mecanismos combinados de conducción y convección. Cuando la cristalización se produce en una superficie fría, la transferencia de calor se produce en su mayor parte a través del cristal que está creciendo.

Cualquiera de estos mecanismos pueden influenciar o limitar el crecimiento cristalino. De hecho, más de uno de estos mecanismos pueden ser importantes y contribuir a la variación de aspectos controlados por la velocidad a medida que

varían las condiciones. Por ejemplo, el crecimiento de cristales de sacarosa está controlado por dos pasos: la difusión en el seno de la solución y la incorporación a la superficie (difusión superficial). A altas temperaturas, la difusión en el seno de la solución es el principal mecanismo que controla el crecimiento cristalino, mientras que la incorporación a la superficie es el paso que limita el crecimiento a bajas temperaturas. Debe destacarse, sin embargo, que cada uno de estos pasos pueden ocurrir simultáneamente.

Existen otros mecanismos por medio de los cuales los cristales pueden continuar creciendo, aunque estos procesos no siempre llevan a la pérdida de sobre-saturación y pueden ocurrir cuando el sistema se encuentra en equilibrio. Cuando existen muchos cristales pequeños, ellos pueden aglomerarse o agregarse para producir cristales de mayor tamaño. Este proceso es especialmente importante en sistemas donde la agitación produce el contacto entre cristales bajo condiciones en las cuales ellos se pegarían formando aglomerados. Este mecanismo puede ser extremadamente importante en la cristalización de grasas donde pueden ocurrir al mismo tiempo tanto procesos moleculares como aglomeración. Otro medio por el cual se puede producir el crecimiento cristalino es el proceso termodinámico de maduración (*Maduración de Ostwald*). Este proceso se genera gracias a la diferencia de solubilidad o puntos de fusión de cristales muy pequeños. Bajo ciertas circunstancias, existen cristales muy pequeños (generalmente $< 5 \mu\text{m}$) que pueden estar realmente sub-saturados en una solución y disolverse al mismo tiempo que cristales grandes en los alrededores están sobre-saturados y crecen hacia mayores tamaños a expensas de los pequeños. Este tipo de aumento de tamaño se produce sin cambio alguno en el volumen total del material cristalino, siendo solo una redistribución del mismo desde cristales pequeños (que desaparecen) hacia mayores (que crecen). Este es el mecanismo principal de recristalización en alimentos y se discutirá con mayor detalle más adelante.

En sistemas en solución, el grado de crecimiento cristalino está basado en la sobre-saturación. Asumiendo que no se forman nuevos núcleos, el crecimiento del cristal continúa hasta que el sistema alcanza el punto de equilibrio definido por el diagrama de fase (el punto de solubilidad a la temperatura en la que se

produce el crecimiento). Esto significa que la solución comienza en un valor de sobre-saturación elevada (concentración inicial por encima de la saturación) y a medida que el crecimiento cristalino avanza, la sobre-saturación disminuye hasta que se alcanza el equilibrio de volumen de fase. Sin embargo, en sistemas fundidos, el crecimiento cristalino continua hasta que el sistema alcanza el equilibrio térmico o hasta que todo el material haya cristalizado (Hartel, 2001). Hasta el momento podemos resumir los pasos involucrados en el crecimiento cristalino de la siguiente manera:

- Mutarrotación de las especies a cristalizar para obtener la correcta forma anomérica,
- Difusión de las moléculas desde el seno de la solución a la interfase del cristal.
- Remoción de todas o algunas de las moléculas de agua de hidratación asociadas a las moléculas de la sustancia a cristalizar,
- Difusión de moléculas que no pertenecen a la especie a cristalizar fuera de la superficie del cristal,
- Orientación de las moléculas que cristalizan en unidades de crecimiento en la interfase cristal-líquido
- Difusión superficial de las unidades de crecimiento hacia un sitio apropiado para ser incorporado a la matriz y
- Remoción del calor generado debido al cambio de fase.

De acuerdo al sistema que se esté estudiando la cristalización puede producirse a partir de un soluto presente en una solución o a partir de un fundido. A continuación pasaremos a describir brevemente los mecanismos que generan la cristalización en cada uno de éstos sistemas por separado y luego, en la sección de Materiales y Métodos se describirá con más detalle las ecuaciones involucradas en la interpretación de éstos mecanismos (Boistelle, 1988).

Una vez que los núcleos se forman y estos exceden el tamaño crítico, se transforman en cristales que crecen dependiendo no sólo de factores externos (sobre-saturación, solvente, temperatura, impurezas) sino también de factores internos (estructura, enlaces, defectos). Comentaremos brevemente los puntos más importantes de las teorías de cinética de crecimiento cristalino, teniendo en

más importantes de las teorías de cinética de crecimiento cristalino, teniendo en cuenta que las caras rugosas de los cristales crecen continuamente y las caras lisas lo hacen por capas. En el caso de un crecimiento continuo, la velocidad de crecimiento es directamente proporcional a la sobre-saturación del sistema. Sin embargo, cuando el crecimiento se produce a partir de un fundido, la energía libre de difusión de las moléculas en el fundido juega un papel importante en la cinética de crecimiento. La velocidad de crecimiento es directamente proporcional a la sobre-saturación e inversamente proporcional a la viscosidad. Si la viscosidad aumenta drásticamente con la disminución de temperatura, puede suceder que a una determinada temperatura la velocidad de crecimiento alcance un máximo y luego disminuya con un aumento del sobre-enfriamiento.

Como dijimos anteriormente, la caras planas de los cristales crecen por extensión lateral de sus capas. Cuando las superficies de los cristales no tienen ningún defecto, el crecimiento se produce a través de nucleaciones en dos dimensiones. Las unidades de crecimiento (moléculas o átomos) que se adsorben en la superficie deben difundir, encontrarse y coalescer en un núcleo bidimensional. Cuando este núcleo excede un tamaño crítico, se esparce a lo largo de la superficie y se debe formar un nuevo núcleo de crecimiento. Se emplean dos modelos para este mecanismo de crecimiento. En el modelo *mononuclear* existe solo un núcleo en la superficie del cristal en cualquier momento. En el modelo *polinuclear*, existen varios núcleos simultáneamente en la superficie del mismo. En ambos modelos, la velocidad de crecimiento de las caras cristalinas es proporcional a la velocidad de nucleación bidimensional, la cual depende de la energía libre de activación. La velocidad de crecimiento es una función exponencial de la sobre-saturación.

El mecanismo de crecimiento de la segunda capa se denomina *mecanismo de crecimiento espiral*. Cuando existe una dislocación que emerge de la superficie del cristal, ésta provee un escalón. Cuando las moléculas de las aguas madres se adsorben en la cara cristalina, primero difunden a lo largo y hacia el escalón. Cuando encuentran la imperfección superficial, quedan atrapadas en la superficie. El escalón avanza rodeando el punto emergente de dislocación. Luego de una rotación completa, una o varias capas de moléculas han sido

incorporadas al cristal. Este crecimiento en espiral puede ser circular o poligonal. El último se observa generalmente en compuestos de cadena larga.

3.1.5. Maduración. Una vez que se produjo la nucleación, los cristales se desarrollan y en solución co-existen muchas partículas de diferente tamaño y forma. Aún en el caso de que no se formen fases metaestables, el sistema es todavía inestable debido a que las condiciones de equilibrio termodinámico no han sido aún satisfechas. Para un valor de sobre-saturación dado, β , solo los cristales que obedecen la ecuación de Gibbs-Thomson son estables. Mas aún, debido a que la nucleación y el crecimiento cristalino generan cristales crecidos, la condición de minimizar la energía libre para cada cristal no es satisfecha; por lo tanto tampoco es satisfecha para todo el sistema. En un sistema donde se produce una cristalización, la sobre-saturación está en evolución continua. Cuando la nucleación y el crecimiento avanzan, la sobre-saturación decrece. De acuerdo a esto, el radio crítico del cristal aumenta de modo que en un momento dado la sobre-saturación posee un valor para el cual solo hay un tipo de tamaño cristalino que obedece la ecuación de Gibbs-Thomson. Los cristales de tamaño $r < r^*$ se disuelven inmediatamente. Cristales de tamaño $r > r^*$ comienzan a recolectar moléculas de soluto que provienen de la solución de cristales anteriores. Pero aún para esos cristales existe una competencia entre la evolución de sus propios radios y el radio crítico. Debido a que el radio crítico aumenta muy rápidamente con la disminución de la sobre-saturación, todos los cristales menos uno se transforman en subcríticos y desaparecen del sistema. El único cristal en el cual se deposita todo el material sólido es el que posee mayor tamaño inicial. Cuando todos los otros cristales desaparecen, este cristal está en equilibrio con una solución débilmente sobre-saturada, de modo que la ecuación de Gibbs-Thomson se cumple.

En la escala de tiempo que se maneja en los laboratorios, este fenómeno de maduración raramente se completa, especialmente en el caso de un proceso isotérmico real. Sin embargo, es posible favorecer la evolución cinética del tamaño cristalino generando una fluctuación de temperatura. La amplitud y frecuencia de las fluctuaciones dependen del sistema que se está investigando. El

segundo punto que limita el proceso de maduración es el tamaño cristalino en sí. El proceso de maduración se produce principalmente en cristales menores a 1 μm , sin embargo, se utiliza este principio para aumentar el tamaño cristalino de materiales que poseen dificultades para crecer, especialmente en cristalizadores en batch. Debido a éste proceso, la distribución de tamaño aumenta hacia tamaños mayores pero simultáneamente, el histograma de distribución de tamaño se ensancha y se achata. Debido a que la maduración involucra procesos de disolución y crecimiento, la velocidad de crecimiento depende de la presencia de impurezas en el sistema. En algunos casos especiales, (por ejemplo, productos farmacéuticos o cristales usados en spray) el proceso de maduración debe ser absolutamente evitado. Solo muy buenas disoluciones e inhibidores del crecimiento pueden prevenir la evolución de tamaño (Boistelle, 1988).

Cuando se desarrolla un producto o se desea conocer las propiedades del mismo, no sólo hay que tener en cuenta el proceso de cristalización (nucleación y crecimiento cristalino); sino que también es necesario considerar las consecuencias que un determinado proceso de cristalización produce sobre el producto cuando éste es sometido a diferentes condiciones de proceso. Dentro de éste grupo de características que no se deben dejar de tener en cuenta se encuentra la morfología de los cristales obtenidos, el comportamiento térmico y su polimorfismo. A continuación introduciremos brevemente algunos conceptos sobre éstas características para luego poder realizar una mejor discusión de los resultados obtenidos.

3.1.6. Morfología cristalina. El hábito o morfología de un cristal juega un rol muy importante en el proceso de cristalización. A menudo, los cristales crecen con caras o lados planos y bien definidos, pero en muchos casos, algunas de las caras aparecen con rugosidades que hacen que éstas sean mas redondeadas. En estos casos, la velocidad de crecimiento es mucho mayor que en las caras planas. En casos extremos, se producen crecimientos dendríticos o celulares. Un caso intermedio sería el del crecimiento esferulítico. Los cristales forman esferulitas que están formadas por gran cantidad de cristales pequeños bien definidos que

crecen a partir de un núcleo poco definido. La morfología de los cristales con caras planas está determinada por la tendencia que ellos tienen a transformarse en cristales con caras rugosas. Esta transformación está relacionada con una temperatura determinada a partir de la cual una cara plana se transforma en rugosa para un determinado sistema. Este efecto se denomina “thermal roughening”. La velocidad de crecimiento de estas caras aumenta por debajo de esta temperatura crítica. Por otro lado, como resultado de la temperatura crítica una cara plana puede transformarse en rugosa debido a una sobre-saturación crítica. Este fenómeno se denomina “kinetical roughening”, resultando también en altas velocidades de crecimiento. Estos efectos pueden explicar la morfología tan particular de los cristales de grasas en general.

Los fenómenos antes descritos son determinados por el concepto de energía libre de los bordes que ocurren en las superficies: cuanto menor es la energía libre de los bordes, menor es la temperatura crítica y el valor de sobre-saturación a partir del cual se produce la transformación. Las implicancias del concepto de esta transición para explicar el fenómeno de crecimiento cristalino junto con la morfología son muy profundos. Las caras rugosas poseen en general mayores velocidades de crecimiento que las planas y en muchos de los casos, estas caras no aparecen en la morfología del cristal (Bennema y col., 2001).

3.1.7. Cambios de fase. Las propiedades físicas de los alimentos pueden ser alteradas por transiciones de fase de sus componentes principales, como pueden ser carbohidratos, lípidos, proteínas y agua. El comportamiento de transición de fase de sólidos alimentarios tiene similitudes con los de los polímeros sintéticos. Sin embargo, en alimentos, el agua es probablemente el compuesto más significativo afectando el estado físico y las propiedades de otros componentes de estructura más complicada. En éstos sistemas pueden ocurrir varias transiciones de fase de primer y segundo orden durante el procesamiento, almacenamiento y distribución. Los constituyentes mayoritarios de los alimentos pueden existir en el estado líquido, sólido cristalino o amorfo no cristalino. Los lípidos, junto con los carbohidratos y las proteínas son los sólidos principales de los alimentos. Sin embargo, los lípidos difieren de los carbohidratos y de las proteínas en que son

poco solubles en agua y presentan transiciones de fase que no son afectadas significativamente por su presencia. Las transiciones de fase más importantes de los lípidos en alimentos que afectan su comportamiento en el procesamiento, almacenamiento y consumo son las transiciones entre el estado sólido y líquido de las grasas y aceites. Dichas transiciones incluyen cristalización en distintas formas polimórficas y efecto de la composición de la grasa en las propiedades de los alimentos. La relación entre las propiedades de un alimento y su estado físico son complicadas. El estado físico en alimentos puede ser difícil de detectar y generalmente es extremadamente sensible a la temperatura, tiempo y contenido de agua (Roos, 1995).

Microscópicamente, las cadenas moleculares sufren en forma sucesiva transiciones de fase complicadas tanto en la cristalización o fusión entre el fundido y la fase cristalina, en la “cristalización líquida” desde el fundido hacia una mesofase líquida-sólida y en varias transiciones sólido-sólido. Las grasas y los sistemas lipídicos están compuestos por componentes hidrofóbicos y polares y debido a que los primeros están formados generalmente por hidrocarburos lineales, poseen una gran capacidad para re-organizarse gracias a las fuerzas atractivas de van der Waals entre cadenas lineales. Esto juega un importante rol en cristalizaciones y cambios de fase de grasas y sistemas lipídicos, los cuales son procesos complejos. El efecto del tamaño o de la presencia de defectos en el cambio de fase es significativamente fuerte e importante. El tamaño finito afecta la temperatura de transición (T_c) debido al efecto superficial que resulta en una pérdida de energía libre del cristal. La T_c del tamaño finito está dado por la ecuación de Gibbs-Thomson asumiendo una forma cúbica del cristal:

$$T_c = T_c^0 (1 - 6V\sigma/r\Delta H) \quad [21]$$

donde T_c^0 es la temperatura de transición en el equilibrio para pasar de la fase B a la A definido por el tamaño infinito de la fase A, σ es la energía libre superficial, V es el volumen específico, $\Delta H (\equiv H_B - H_A)$ indica la entalpía del cambio de fase, H_B y H_A son las entalpías de la fase B y A respectivamente y r es el tamaño de un

cristal de la fase A. Por lo tanto, la disminución de la temperatura de transición es proporcional a r^{-1} .

El efecto de una estructura desordenada en el cambio de fase es el mismo que el del tamaño finito. La energía libre del cristal aumenta debido al incremento de energía interna, W . La temperatura de transición está dada por una ecuación de Gibbs-Thomson similar:

$$T_c = T_c^0 (1 - W/\Delta H) \quad [22]$$

Cuando un cristal de cadenas moleculares se calienta, los defectos se introducen debido a una expansión térmica anisotrópica significativa (Nozaki y Hikosaka, 2001).

3.1.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC). Hacia el final del siglo 1800 se estableció en Europa el uso de medidas de temperatura de alta precisión como puede ser el uso de termocuplas, termómetros de resistencia y pirómetros ópticos. Como resultado, éstas técnicas fueron rápidamente utilizadas para la medida de temperaturas elevadas en sistemas químicos. El mayor desarrollo se produjo en técnicas térmicas aplicadas a la química de los polímeros. Dichas técnicas son comunmente conocidas hoy en día como *Análisis Térmico Diferencial (DTA)* y *Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)*. Basaremos nuestra descripción en la técnica de DSC ya que ésta se utilizó en el presente capítulo de tesis para estudiar el comportamiento térmico de los sistemas de estudio. La DSC es una herramienta ideal para caracterizar polímeros y para estudiar transiciones de primer y segundo orden. Dentro de las transiciones de primer orden se estudian los procesos de fusión, cristalización, disociación y agregación de macromoléculas, desnaturalización de proteínas y también se puede aplicar a estudios cinéticos. A partir de éste tipo de determinaciones es posible calcular el punto de fusión, el grado de polimerización, la degradación térmica y reacciones de oxidación de distintos sistemas. En éste tipo de técnica se registra generalmente el calor generado o absorbido cuando la muestra es calentada a una velocidad de calentamiento constante. De acuerdo al tipo de transformación

que se lleva a cabo durante la experiencia, se obtienen distintos perfiles de curvas. En el caso de tratarse de una transformación endotérmica (por ejemplo la fusión de lípidos) en los equipos de DSC utilizados en este trabajo de tesis, se obtienen endotermas las cuales se representan como desviaciones positivas de la línea de base indicando la absorción de calor por parte del sistema. Análogamente, en el caso de tratarse de procesos exotérmicos (cristalización de lípidos, transformaciones polimórficas) la curva obtenida son desviaciones negativas de la línea de base. Las curvas generadas por los procesos mencionados anteriormente poseen un perfil en forma de pico en el cual se pueden identificar distintos parámetros como: temperatura inicial de la transición (T_i), temperatura de pico (T_p), índice de cooperatividad del proceso ($\Delta T_{1/2}$) medido como el ancho del pico a la mitad de su altura, y el área del mismo. Dividiendo el valor del área calculado por la masa de la muestra se calcula el valor de entalpía del proceso estudiado (ΔH). Las transiciones de segundo orden que pueden estudiarse por medio de ésta técnica involucran los procesos de transición vítrea los cuales se evidencian por un cambio en el valor de la capacidad calorífica del sistema (C_p). A partir de los diagramas de DSC obtenidos en estos casos se puede calcular la temperatura de transición vítrea (T_g) como el punto en el cual se produce un cambio en la pendiente de la curva. Las transiciones de segundo orden generan sólo un cambio de capacidad calorífica (y por lo tanto un cambio en la pendiente de la línea de base) sin generar un pico como los descriptos en las transiciones de primer orden. Existen dos tipos de equipos de DSC distintos. El primero de ellos se denomina *DSC de compensación de energía*, en el cual, se registra la potencia o el calor. El otro tipo de equipo es el *DSC de flujo calórico* en el cual se registra la diferencia $T_s - T_r$ en función de la temperatura. En general, la utilización de sólo una de las técnicas térmicas descritas con anterioridad junto con otros métodos fisicoquímicos es suficiente para proveer una descripción completa del sistema. A continuación describiremos brevemente el fundamento de los dos tipos de DSC que existen.

a) *DSC de flujo calórico*. La celda de éste tipo de equipo utiliza un disco de constantan como su principal fuente de transferencia de calor a la muestra y a la referencia y actúa como uno de los elementos de medida de temperatura

formando parte de la conexión termoelectrica. La muestra de interés y la referencia se colocan en cápsulas que se colocan a su vez en plataformas elevadas del disco de constantan. El calor es transferido desde el disco hacia la muestra y la referencia por medio de las cápsulas. La diferencia de flujo de calor entre la muestra y la referencia se registra por medio de una termocupla de cromo-constantan formada por el disco de constantan y la placa de cromo que cubre la parte inferior de cada plataforma. Se conectan alambres de aluminio y cromo a la parte inferior de la plataforma y la termocupla resultante se utiliza para registrar directamente la temperatura de la muestra.

b) DSC de compensación de energía. En este caso, tanto el recipiente que contiene la muestra como el que contiene la referencia consiste en un recipiente y un soporte de acero inoxidable, un sensor alámbrico de platino un calentador de níquel-cromo y otras partes térmicas. Estos componentes están ensamblados juntos mecánicamente uno sobre otro en íntimo contacto entre sí. El instrumento, mantiene la temperatura de la muestra igual a la temperatura de una referencia administrando calor al material de la muestra o de la referencia. La cantidad de calor requerido para mantener estas condiciones isotérmicas es registrado como función del tiempo (o de la temperatura) (Wendlandt y Gallagher, 1981).

Específicamente, la técnica de DSC ha sido utilizada para estudiar distintos sistemas. No sólo ha servido para caracterizar aceites tropicales como puede ser el aceite de palma y coco, sino también para identificar otros aceites vegetales y para su detección en productos elaborados. Las curvas de fusión de DSC han sido útiles para detectar cambios polimórficos en mezclas de grasas comestibles, para evaluar el efecto de grasas en estado líquido sobre los puntos de fusión y comportamiento polimórfico de manteca de cacao, para detectar adulterantes como pueden ser grasas animales en mantecas y también para analizar las interacciones físicas de mezclas ternarias de grasas (Sessa y col., 1996).

3.1.9. Microscopía de luz polarizada (MLP). Hoy en día es imposible discutir los resultados de una medida macroscópica como es el análisis térmico sin comprender la estructura molecular del sistema, esto implica, su estructura

microscópica. Por lo tanto, introduciremos aquí algunos conceptos relativos al comportamiento microscópico de diversos sistemas. En primer término, debemos destacar que existen distintos tipos de moléculas y cada una de ellas se comporta de manera diferente en forma microscópica. Las *moléculas rígidas* poseen la capacidad de establecer fuertes enlaces en una, dos o tres direcciones en el espacio. Cuando éstas moléculas se funden pierden su integridad molecular. Una vez fundidas, si bien los enlaces fuertes no son permanentes, se intercambian constantemente aunque en cualquier momento sólo una pequeña fracción de ellos está realmente roto (aproximadamente un 5-10% a la temperatura de fusión). Debido a que los enlaces que establecen las estructuras moleculares son fuertes, las temperaturas de fusión son relativamente altas. El número de moléculas diferentes en éste tipo de materia está determinado por variaciones en los átomos y en los tipos de uniones. La estructura molecular exacta es, sin embargo, de menor importancia que la estructura cristalina, la cual está basada en una unidad estructural mucho menor que la propia molécula. Si se requiere un conocimiento más detallado se debe estudiar el tipo de unión, la forma molecular y la configuración y los defectos estructurales y concentración. Como sabemos, se conocen tres tipos de uniones fuertes (iónicas, covalentes y metálica) las cuales pueden generar las diferentes estructuras tridimensionales en las macromoléculas. Por otro lado, las *moléculas pequeñas*, se comportan de modo un poco diferente a las moléculas rígidas. Su estructura molecular se establece por medio de fuerzas débiles y por lo tanto, cuando se funden, su integridad molecular generalmente se mantiene. Esto se refleja en una temperatura de fusión baja. Por último, describiremos la *macromoléculas flexibles* las cuales se consideran intermedias entre los tipos de moléculas descritos anteriormente. Su estructura generalmente es lineal de modo de obtener la flexibilidad deseada. Generalmente, pueden ser fundidas o disueltas sin la pérdida de integridad molecular y por éste motivo poseen una temperatura de fusión intermedia. El número de macromoléculas lineales posibles que pueden mantener su integridad molecular durante la fusión, es ilimitada. Cualquier número de unidades repetitivas pueden estar unidas de diversas maneras. Esta multiplicidad es la

base de la importancia de la ciencia de macromoléculas. Este tipo de moléculas son las que estudiaremos en éste trabajo de tesis.

El proceso de cristalización es complicado debido al tamaño y a la flexibilidad de las moléculas. El macroconformación del equilibrio en el cristal debe poseer la menor energía libre. Cada unión del esqueleto molecular debe encontrarse en la posición rotacional más favorable. Estas cadenas extendidas luego se empacan de modo de producir una máxima interacción constituyendo la celda unidad de la molécula. Un cristal en equilibrio se obtiene a partir de la extensión tridimensional de la celda unidad hasta alcanzar dimensiones macroscópicas. El proceso de cristalización desde una solución o desde el fundido está restringido por el plegamiento de las cadenas. Una molécula lineal suficientemente móvil y flexible inicialmente crece hasta generar un cristal plegado de 5-50 nm de espesor. La razón de éste plegamiento de las cadenas se encuentra en el proceso de cristalización. El ordenamiento de las cadenas y el empaquetamiento ocurre rápida y sucesivamente debido a razones termodinámicas. Esto no es posible para moléculas largas en un tiempo finito y por lo tanto existe un compromiso en el plegado de las cadenas. Debido a la longitud de las moléculas, éstas participan en diferentes áreas cristalinas y amorfas. Una descripción detallada de dichas estructuras requiere el conocimiento del porcentaje de cristalinidad, la estructura cristalina, la morfología y tamaño del cristal, los defectos cristalinos y las desviaciones en las áreas amorfas de la estructura típica del fundido o de la estructura vítrea debido a que las moléculas están unidas a un área cristalina.

Un entendimiento completo de las características macroscópicas de un sistema sólo puede ser alcanzado cuando se complementa con observaciones microscópicas. Por ejemplo, ni bien se alcanza una estructura ordenada en un sólido, los estudios de difracción de rayos X pueden dar información acerca de la estructura cristalina, tamaño y defectos. Por otro lado, la microscopía electrónica es una técnica directa para observar estructuras en los cristales mas pequeños o estructuras en diferentes fases. Sin embargo, puede ser necesario aumentar el contraste mediante coloraciones específicas para éste tipo de microscopía. Los análisis de Infrarrojos y Raman han sido útiles no sólo para identificar grupos químicos de frecuencias vibracionales características sino también brindan

químicos de frecuencias vibracionales características sino también para brindar información sobre las frecuencias normales de vibración, constantes de fuerzas, empacamiento y plegado en los cristales y para la determinación del grosor laminar. Similarmente, la resonancia magnética nuclear ha brindado información acerca de la movilidad y la estructura de fase en materiales macromoleculares. La microscopía de luz polarizada (MLP) puede utilizarse para observar estructuras dendríticas y esferulíticas. Cualquier orientación en la muestra puede ser estudiada por birrefringencia y está cuantitativamente acoplada al comportamiento microscópico. Con el objetivo de lograr un análisis térmico correcto, se pueden utilizar cualquiera de la técnicas mencionadas anteriormente obteniendo información valiosa sobre la estructura microscópica y de éste modo poder interpretar el comportamiento macroscópico de las muestras (Wunderlich, 1981).

A pesar de que la MLP ha alcanzado una amplia aceptación en la industria alimentaria, la técnica ha comenzado a ganar atención recientemente en estudios de polimorfismo y cristalización de grasas y aceites. La MLP demostró ser un muy buen método para el estudio de eventos tempranos en el proceso de cristalización de grasas y aceites (Wright y col, 2000). También es una técnica que está siendo utilizada cada vez con más frecuencia para estudiar la microestructura y composición de sistemas alimentarios en relación con sus propiedades físicas y comportamiento frente a distintas condiciones de procesamiento (Marangoni y Roussau, 1996). En muchas aplicaciones de grasas comestibles la morfología y el número de cristales determina la utilidad de la grasa para un cierto producto o propósito. Por ejemplo, la morfología de los cristales de triglicéridos está relacionada con la posibilidad de formar una red para así formar una grasa plástica. Esta técnica se ha utilizado también para estudiar la cristalización isotérmica de distintos sistemas lipídicos como puede ser aceite de girasol hidrogenado (Herrera, 1994) y ceras en aceite de girasol (Rivarola y col., 1985; Petruccelli y Añón, 1991) y en otros aceites vegetales como canola (Liu y col., 1994).

lípidos pueden aparecer en una amplia variedad de estructuras dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura, presión, solvente etc.) y de la historia térmica a la cual han sido sometidos. Esta complejidad en su estructura está relacionada con sus actividades funcionales y propiedades físicas. Para conocer las estructuras a nivel molecular y los mecanismos que controlan la estabilidad de una estructura determinada y cambios de fase, es de importancia fundamental el entendimiento del comportamiento fisicoquímico de estos sistemas tan complicados.

3.2. Objetivos

El objetivo del presente capítulo fue estudiar los factores tanto energéticos como de procesamiento que controlan la cristalización de sistemas lipídicos. Específicamente, estudiar la nucleación y crecimiento cristalino de éstos sistemas utilizando dos sistemas modelos: uno que describa la cristalización a partir de una solución (solución de ceras en aceite de girasol) y otro que describa la cristalización a partir de un fundido (mezclas de grasa de leche y aceite de girasol en distintas proporciones). El objetivo de estudiar éstos dos sistemas lipídicos fue analizar las diferencias y similitudes que existen entre ellos ya que a pesar de poseer la misma naturaleza lipídica, el proceso de cristalización está regido por diferentes parámetros.

Con el objetivo de clarificar la exposición de los Materiales y Métodos utilizados y los Resultados obtenidos en cada sistema, dividiremos el resto del capítulo en dos partes: una describiendo el sistema de ceras en solución (PARTE A) y la segunda el sistema fundido (PARTE B).

PARTE A: Sistema compuesto por soluciones de ceras en aceite de girasol.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Ceras purificadas y soluciones de ceras. a) *Ceras en solución:* Se prepararon soluciones de ceras entre 0-1000 ppm para determinar los tiempos de inducción de cristalización y así calcular las energías de activación del sistema. Separadamente se prepararon soluciones de 500, 1000, 2500 y 5000 ppm para estudiar el comportamiento térmico de éste sistema. En todos los casos, las soluciones fueron preparadas tal como se describió en el Cap. 2, 2.3.3.

b) *ceras purificadas.* Las ceras purificadas se utilizaron para realizar estudios de calorimetría. Las ceras fueron purificadas tal como se describió con anterioridad (Cap. 2; 2.3.2).

3.3.2. Cálculo de energías de activación para la nucleación a partir de soluciones. Con el objetivo de demostrar la influencia de distintos parámetros en la velocidad de nucleación estudiaremos en ésta sección la nucleación a partir de un sistema en solución (ceras en aceite de girasol). Luego de insertar la ecuación 1 para $\Delta\mu$ en la ecuación 14 y despreciando la energía libre de activación debido a la difusión de las moléculas de soluto hacia el cristal (ec. 9), obtenemos la siguiente ecuación para la velocidad de nucleación:

$$J = v n_1 \exp \left[- \frac{f v^2 \gamma^3}{(k_B T)^3} \ln^2 \beta \right] \quad [23]$$

Donde $k_B = 1,38 \times 10^{-23}$ J/K. La velocidad de nucleación depende fuertemente de la sobre-saturación. Existe un tiempo lag de nucleación o un período de inducción (τ_i) que se define como el tiempo entre el momento en que la sobre-saturación se produjo y el momento en que ocurre la cristalización. Suponiendo que el estado

estacionario se alcanza junto con la sobre-saturación, se obtiene un tiempo de inducción determinado para un β dado tal como:

$$J\tau_i = \{v n_1 \exp [- f v^2 \gamma^3 / (k_B T)^3 \ln^2 \beta]\} \tau_i \quad [24]$$

Si ahora imaginamos que sólo un núcleo se forma a $\tau_i = 1$ seg, entonces, obtenemos:

$$\ln v n_1 = f v^2 \gamma^3 / (k_B T)^3 \ln^2 \beta \quad [25]$$

Si graficamos los datos de $\ln \tau_i$ correspondientes a los distintos valores de sobre-saturación impuestos al sistema, en función de $1/\ln^2 \beta$, deberíamos obtener una línea recta. El rango de sobre-saturación a través del cual se pueden realizar los experimentos es limitado, especialmente cuando se trabaja en soluciones. Por ejemplo, cuando β es muy grande los τ_i son difíciles de medir debido a que son muy cortos.

A partir de la ecuación 23 se puede observar que la velocidad de nucleación (número de núcleos formados por unidad de volumen y tiempo) en soluciones depende de la sobre-saturación y de la temperatura. Es necesario aclarar que la sobre-saturación también depende de la temperatura ya que generalmente la solubilidad es función de éste parámetro. Por lo tanto es difícil separar los efectos de la temperatura de aquellos correspondientes a la sobre-saturación del sistema en solución.

a) Medida de los tiempos de inducción. Se determinaron los tiempos de inducción de soluciones de ceras de concentraciones conocidas a distintas temperaturas utilizando el sistema óptico desarrollado en el Capítulo 2. Con los datos de tiempos de inducción, temperatura de cristalización y sobre-saturación del sistema se calcularon las energías de activación a distintas temperaturas de cristalización utilizando las ecuaciones descriptas anteriormente.

b) Cálculo de las energías de activación. J puede ser tomada como proporcional a la inversa del tiempo de inducción de nucleación (τ). Por lo tanto, si graficamos

$\ln \tau$, que corresponden a las distintas sobre-saturaciones del sistema, versus $1/\ln^2 \beta$, deberíamos obtener una línea recta. ΔG_n puede ser calculada de la pendiente de esta curva (s) a partir de:

$$\Delta G_n = s k_B T / \ln^2 \beta \quad [26]$$

A pesar de que la pendiente obtenida en éste análisis es una constante, la energía libre de activación para la nucleación es función de la sobre-saturación del sistema y de la temperatura de cristalización (Boistelle, 1988; Hartel, 2001).

3.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las medidas fueron realizadas con un calorímetro Pyris 1 Perkin Elmer (Perkin Elmer, Chicago, IL) y un software Pyris™ para Windows. Previamente a las corridas se realizaron calibraciones a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min utilizando Indio y Mercurio como estándares. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. Todas las medidas fueron realizadas por duplicado.

a) Soluciones de ceras. Se fundieron las soluciones (500, 1000, 2500 y 5000 ppm) colocándolas a 110 °C durante 90 min. Se pesaron entre 5-15 mg de estas soluciones y se colocaron en cápsulas de aluminio para ser utilizadas en el calorímetro. Cada una de las muestras fue sometida al siguiente tratamiento térmico: Se calentaron a 10 °C/min hasta alcanzar los 110 °C y se mantuvieron a ésta temperatura para fundir las ceras y eliminar la historia térmica de las mismas. Luego se enfriaron a dos velocidades de enfriamiento distintas (1 y 20 °C/min) hasta llegar a la temperatura de cristalización deseada (0, 12, 22, 30 y 35 °C). Se mantuvieron a ésta temperatura durante 30 min y luego se calentaron a una velocidad de 10 °C/min hasta alcanzar nuevamente los 110 °C. En este caso, se estudió tanto el proceso de cristalización como el de fusión de cada una de las muestras ensayadas.

b) Ceras purificadas. Se pesaron entre 5-15 mg de ceras puras y secas en cápsulas de aluminio para ser utilizadas en DSC. Se colocaron las cápsulas dentro del horno del calorímetro y se las sometió al siguiente programa de temperatura: Se calentaron a una velocidad de 10 °C/min hasta 110 °C para

fundir completamente la muestra y borrar la historia térmica de las mismas y se mantuvo a esta temperatura por 10 min. Luego, se enfriaron a dos velocidades de enfriamiento distintas (1 y 20 °C/min) hasta la temperatura de cristalización correspondiente (0, 12, 22, 30, 35, 65, 70, 71 y 72 °C). Se mantuvieron a ésta temperatura durante 30 minutos y luego se calentaron a una velocidad de 10 °C/min hasta llegar nuevamente a 110 °C y así poder estudiar su comportamiento térmico

3.3.4. Microscopía de luz polarizada (MLP). Las características del microscopio de luz polarizada fueron descriptas en el Capítulo 2 (Cap. 2, 2.3.7.). Esta técnica se utilizó para estudiar la morfología de los cristales obtenidos. Las soluciones de ceras en aceite de girasol fueron cristalizadas a la temperatura de cristalización deseada (0, 12, 22, 30 y 35 °C) por medio de un baño termostático programable (LAUDA RK 8 KP, Werklauda, Königshofen, Alemania) a las dos velocidades de enfriamiento ensayadas anteriormente (1 y 20 °C/min) y fueron mantenidas a la temperatura de cristalización durante 30 min. Luego se centrifugaron (60 min, 3000 x g, a la temperatura de cristalización correspondiente) para separar los cristales de la fase oleosa. Los cristales así separados fueron lavados dos veces con hexano en frío y centrifugados (60 min, 3000 x g, 0 °C) para separar los cristales del hexano (hexano + aceite). Los cristales fueron secados y utilizados para el estudio de su morfología y de su patrón de Rayos-X.

3.3.5. Difractometría de Rayos X (XRD). Los estudios de Rayos-X fueron realizados en un espectrofotómetro de rayos-X Philips 1730 acoplado con un sistema para controlar la temperatura (Philips Argentina S.A., Capital Federal, Argentina). La temperatura de la celda donde se coloca la muestra fue controlada por medio de un criostato programable Lauda UK 30 (Werklauda). Se utilizó como fluido refrigerante etilenglicol en agua (3:1, vol/vol). Se utilizó una radiación de cobre tipo $K_{\alpha 1\alpha 2}$ a 40 kV, 20 mA y una velocidad de escaneo de 1 °/min desde 5 a 50 °.

3.4. Resultados

3.4.1. Cálculo de energías de activación para la nucleación a partir de soluciones. A partir de lo descrito anteriormente, se puede estudiar la influencia de distintos parámetros (velocidad de enfriamiento, temperatura de cristalización y concentración de ceras) sobre la velocidad de nucleación de las ceras en el aceite de girasol, interpretando los resultados por medio del cálculo de la energía libre de activación.

a) *Variación de los tiempos de inducción con la sobre-saturación (β) y la temperatura de cristalización.* En la Tabla 3.4.1. se detallan los tiempos de inducción, concentraciones, valores de sobre-saturación y temperaturas de cristalización ensayadas para el cálculo de las energías de activación de nucleación de éste sistema. La Figura 3.4.1. (a-d) muestra un gráfico de $\ln \tau$ vs. $1/\ln^2 \beta$ para las soluciones ensayadas anteriormente cristalizadas a 12, 22, 30 and 35 °C. Como se mencionó anteriormente, β fue definido como C/C_s . Los valores de C_s fueron 8, 45, 195 y 450 ppm para 12, 22, 30 y 35 °C respectivamente. Cuando se grafica $\ln \tau$ vs $1/\ln^2 \beta$ de las soluciones cristalizadas a 12 °C (Figura 3.4.1.a), se puede observar un comportamiento lineal. Sin embargo, cuando se realiza el correspondiente gráfico para las soluciones cristalizadas a 22, 30 y 35 °C, (Figuras 3.4.1.b-d) el comportamiento observado es hiperbólico. Este hecho demuestra la presencia de una zona metaestable: es decir, existe un valor de sobre-saturación crítico (β^*) por debajo del cual la velocidad de nucleación es muy cercana a cero y por encima del cual la misma se transforma en catastrófica (nucleación espontánea). Para bajos valores de sobresaturación ($\beta < \beta^*$) la cinética de cambio de fase es cero a pesar del hecho de que el sistema está fuera del equilibrio. En esta zona de metaestabilidad, el proceso de nucleación es atrasado por algún tiempo; pero, la metaestabilidad no depende solamente de la sobresaturación sino también de la temperatura y de factores externos como agitación.

Con el objetivo de calcular los valores de ΔG_n , los valores de β que representan la zona metaestable fueron despreciados. Los primeros 5 valores de la Figura 3.4.1.b fueron regresionados linealmente. El mismo procedimiento se realizó con los tres

primeros datos de las Figuras 3.4.1.c y d. En la Tabla 3.4.2. se muestran los valores de los parámetros de las regresiones lineales de la Figura 3.4.1.

Tabla 3.4.1. Temperaturas de cristalización, concentración tiempos de inducción y sobre-saturaciones de las soluciones de ceras ensayadas.

T_c (°C)	C (ppm)	τ (min)	β
12	11	46,3	1,375
	13	10,1	1,625
	16	7,2	2,000
	21	3,1	2,625
	31	2,8	3,875
	40	1,6	5,000
22	52	54,5	1,155
	62	26,1	1,378
	76	15,0	1,689
	85	8,4	1,889
	102	3,8	2,267
	120	2,7	2,667
	151	1,4	3,355
30	201	50,9	1,031
	252	10,8	1,292
	302	7,1	1,549
	400	2,3	2,051
	500	1,5	2,564
35	500	39,4	1,111
	598	12,7	1,329
	757	4,5	1,682
	1000	2,7	2,222

Figura 3.4.1. Gráfico de $\ln \tau$ vs. $1/\ln^2 \beta$ para soluciones de a) 0-50, b) 50-150, c) 200-500 y d) 500-1000 ppm cristalizadas a 12, 22, 30 y 35 °C respectivamente para cada intervalo de concentración

Tabla 3.4.2. Parámetros de la regresión lineal obtenidos para los gráficos de la Figura 3.4.1.

T_c (°C)	Parámetros ($y = a + s x$)		
	a	s	R
12	0,823	0,319	0,965
22	0,074	0,764	0,979
30	0,040	0,370	0,997
35	0,876	0,137	0,990

A partir de la pendiente de estas rectas, se puede calcular (ΔG_n) para cada valor de sobre-saturación y para cada temperatura de cristalización utilizando la ecuación 25.

b) *Variación de ΔG_n con la sobre-saturación y la temperatura de cristalización.* En la Figura 3.4.2. se puede observar la variación de ΔG_n con la sobre-saturación del sistema para cada una de las temperaturas ensayadas (12, 22, 30 y 35 °C). Como puede observarse, el valor de ΔG_n decrece exponencialmente a medida que la sobre-saturación del sistema aumenta para cada una de las temperaturas ensayadas.

Figura 3.4.2. Dependencia de ΔG_n calculado con la sobre-saturación del sistema para cada una de las temperaturas ensayadas.

Este comportamiento puede deberse a la necesidad de la existencia de una fuerza impulsora para que se produzca la cristalización. Dicha fuerza impulsora no solo está determinada por la temperatura del sistema sino también por la concentración del soluto. Dicho de otra manera, debe existir una concentración tal en el sistema que exceda la concentración de saturación en equilibrio ($C > C_s$). Termodinámicamente, debe haber una diferencia en el potencial químico entre la solución concentrada y la condición de equilibrio. Cuanto mayor es esta diferencia, mayor es la fuerza impulsora para generar el proceso de cristalización. Debido a que la cristalización ocurre en un sistema cerrado, la fuerza impulsora disminuye hasta que se alcanza la condición de equilibrio y la cristalización se detiene (Hartel, 2001). Cuando C se iguala con C_s , no existe sobre-saturación en el sistema, la velocidad de nucleación es cercana a cero y por lo tanto no se observa tiempo de inducción debido a que no ocurre cristalización (Boistelle, 1988). Hasta el momento hemos estudiado la nucleación del sistema con respecto a la sobre-saturación del mismo (β) ya que trabajamos a T_c constante para cada rango de concentración ensayada.

c) *Variación de ΔG_n con la temperatura.* El objetivo parcial de esta etapa fue estudiar la variación de la energía de activación con la temperatura aislando el sistema del factor sobre-saturación. Debido a que la concentración de saturación (C_s) varía con la temperatura para una concentración dada, la sobre-saturación del sistema también depende de la temperatura. La Figura 3.4.3. muestra el efecto de la temperatura en la C_s para ceras en aceite de girasol. Se puede ver una fuerte dependencia exponencial.

Figura 3.4.3. Variación de C_s con la temperatura

Para una concentración de ceras determinada, C , la sobresaturación (β) disminuye cuando aumenta la temperatura debido a que C_s aumenta; por lo tanto, para C constante, la velocidad de nucleación aumenta a medida que la temperatura disminuye. La fuerza impulsora (T_c) aumenta y la solubilidad de las ceras en el aceite disminuye resultando en una mayor velocidad de nucleación obteniendo un menor tiempo de inducción. Por consiguiente, para poder estudiar la nucleación de este sistema solo por efecto de la temperatura de cristalización, se calculó la energía de activación para un valor de sobre-saturación constante ($\beta=2$). Los datos obtenidos se detallan en la Figura 3.4.4.

Figura 3.4.4. Dependencia de ΔG_n con la temperatura ($\beta=2$)

El valor de sobre-saturación empleado ($\beta=2$) fue elegido en forma arbitraria a partir de la Figura 3.4.2, sin embargo, puede observarse que ésta tendencia se repite para todo el rango de valores de sobre-saturaciones estudiadas. En la Figura 3.4.4. se muestra el efecto de la temperatura sobre la cristalización de las ceras ya que la sobre-saturación se mantiene constante. En este caso, la única fuerza impulsora que afecta el proceso de cristalización es la temperatura. En ésta Figura se puede observar que ΔG_n aumenta entre 12 y 22 °C generando un menor tiempo de inducción para las muestras cristalizadas a menor temperatura dado que un aumento en la fuerza impulsora (T_c) resulta en una mayor velocidad de nucleación y por ende tiempos de inducción menores. Sin embargo, para temperaturas mayores a 22 °C, ΔG_n disminuye. Esto implica que la velocidad de nucleación aumenta para temperaturas mayores a 22 °C a pesar de que la fuerza impulsora es menor. Este hecho puede ser atribuido a la disminución de la viscosidad del aceite cuando se trabaja a altas temperaturas. Cuando la viscosidad disminuye, las moléculas de ceras pueden migrar más rápidamente en la solución obteniendo un tiempo de inducción menor debido a que encuentran menos dificultad para atravesar la interfase entre las fases sólidas y líquidas.

3.4.2. Comportamiento térmico de ceras de aceite de girasol. Una vez que se desarrolló un método para calcular la concentración de ceras en aceite de girasol y se estudió la nucleación de éste sistema por medio de la determinación de tiempos de inducción, se procedió a analizar el comportamiento térmico de las ceras, tanto purificadas (libres de aceite) como en solución por medio de la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se estudió la influencia de la temperatura de cristalización y de la velocidad de enfriamiento sobre los parámetros de fusión y cristalización de las muestras detalladas anteriormente.

a) *Ceras purificadas.* Se comenzó por estudiar el comportamiento térmico de las ceras purificadas, para lo cual se cristalizaron las muestras a distintas temperaturas de cristalización (0, 12, 22, 30, 35 °C) a dos velocidades de enfriamiento distintas: una lenta (1 °C/min) y una rápida (20 °C/min). Las temperaturas de cristalización fueron elegidas de acuerdo a las condiciones halladas para la determinación de concentración de ceras por medio del turbidímetro de luz polarizada. Se analizó el comportamiento térmico calentando la muestra y observando la fusión de la misma. Los diagramas de DSC obtenidos para éste rango de temperaturas no mostraron diferencias significativas, pero se observó una leve diferencia entre las muestras cristalizadas a distintas velocidades. La Figura 3.4.5. muestra, a modo de ejemplo, los diagramas de DSC obtenidos para ceras purificadas cristalizadas a 35 °C a 1 y 20 °C/min. Como puede observarse en ésta Figura, el diagrama de DSC para ceras cristalizadas a una velocidad de enfriamiento lenta presenta una endoterma más ancha que la correspondiente a ceras cristalizadas a una velocidad de enfriamiento rápida. En la Tabla 3.4.3. se muestran los parámetros obtenidos en las corridas DSC para la temperatura de cristalización de 35 °C. Un parámetro que describe la cooperatividad del proceso es el ancho del pico a la mitad de su altura ($\Delta T_{1/2}$). Esta medida puede tomarse como un índice de cooperatividad indicando un mayor grado de cooperatividad cuando el valor de $\Delta T_{1/2}$ disminuye. Para el caso de las ceras purificadas cristalizadas a 35 °C a velocidad de enfriamiento lenta y rápida los valores de $\Delta T_{1/2}$ fueron 3,0 y 2,8 °C respectivamente indicando un leve aumento en el ancho de pico para la muestra cristalizada lentamente (proceso menos cooperativo).

Figura 3.4.5. Diagramas DSC obtenidos para ceras purificadas cristalizadas a 35 °C a 1 y 20 °C/min.

Tabla 3.4.3. Parámetros obtenidos en las corridas de DSC

Parámetros de las curvas de fusión						
T _c (°C)	Velocidad de enfriamiento rápida (20 °C/min)			Velocidad de enfriamiento lenta (1 °C/min)		
	T _i (°C)	ΔH (J/g)	T _{pico} (°C)	T _i (°C)	ΔH (J/g)	T _{pico} (°C)
35	70,4 ± 0,1	198,54 ± 1,67	74,4 ± 0,5	70,1 ± 0,5	199,82 ± 0,83	74,3 ± 0,5
70	70,7 ± 0,2	175,95 ± 1,41	74,9 ± 0,4	70,7 ± 0,4	174,16 ± 0,71	74,7 ± 0,3
71	71,8 ± 0,5	141,15 ± 1,13	75,0 ± 0,2	71,9 ± 0,5	140,89 ± 0,58	74,9 ± 0,1
72	72,8 ± 0,5	87,39 ± 0,70	74,9 ± 0,4	72,8 ± 0,3	87,11 ± 0,36	74,8 ± 0,5

La Tabla 3.4.3. muestra los parámetros de las curvas de DSC: temperatura inicial, T_i ; Temperatura de pico, T_{pico} y entalpías, ΔH , para las muestras estudiadas. Debido a que no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando se cristalizaron las muestras de 0 a 35 °C, se aumentó la T_c hasta 65 °C. Este aumento en T_c no fue suficiente para provocar diferencias en el comportamiento térmico de las ceras purificadas; por lo tanto, en la Tabla 3.4.3. solo se detallan los valores de los mismos a 35 °C. A continuación se realizaron cristalizaciones de las mismas muestras pero a temperaturas de cristalización mayores (70, 71 y 72 °C). En estas condiciones de cristalización se observaron algunos cambios en los parámetros de cristalización (Tabla 3.4.3). En la Figura 3.4.6. se presentan los diagramas de DSC obtenidos para una muestra de ceras purificadas cristalizadas a 72 °C a ambas velocidades de enfriamiento. La endoterma de la muestra enfriada lentamente presenta un pequeño hombro a bajas temperaturas con respecto a las endotermas obtenidas a partir de la misma muestra enfriada rápidamente a la misma temperatura. Este comportamiento se observó para todas las temperaturas de cristalización ensayadas. A medida que se aumentó la temperatura de cristalización, se observó un aumento de T_i obteniendo un pico mas angosto para las T_c altas tal como muestran las endotermas de la Figura 3.4.7. Los valores de $\Delta T_{1/2}$ calculados fueron 3,1; 3,0 y 2,3 °C para la muestra cristalizada a velocidad de enfriamiento lenta a 70, 71 y 72 °C respectivamente y 2,8; 3,0 y 2,2 °C para las mismas muestras cristalizadas a velocidad de enfriamiento rápida corroborando, de este modo la presencia de picos mas anchos en las muestras cristalizadas lentamente.

Figura 3.4.6. Diagramas DSC obtenidos a partir de ceras purificadas cristalizadas a 72 °C a $1\text{ y }20\text{ °C/min}$.

Figura 3.4.7. Diagramas de DSC de ceras purificadas cristalizadas a distintas temperaturas a velocidad de enfriamiento rápida.

En ninguna de las condiciones de corrida se encontraron diferencias significativas en los valores de T_{pico} ($p < 0,05$). La Tabla 3.4.3. muestra una disminución de ΔH a medida que T_c aumenta. Este es un resultado esperado ya que una disminución de la fuerza impulsora ($>T_c$) resulta en una velocidad de nucleación menor y por lo tanto, a un mismo tiempo de cristalización, se forma menor cantidad de sólido reflejado en una disminución en el valor de ΔH . No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de ΔH para las muestras sometidas a diferentes velocidades de enfriamiento para una misma T_c .

El comportamiento térmico observado para las ceras cristalizadas entre 0 y 65 °C puede explicarse debido a que éstas temperaturas son muy bajas (muy alto sobre-enfriamiento) para generar alguna variación en el comportamiento térmico de las ceras. En cambio, para mayores temperaturas, menor sobre-enfriamiento y por lo tanto, menor fuerza impulsora (70, 71 y 72 °C) el sólido formado se enriquece en compuestos de alto punto de fusión a medida que la cristalización se produce a T_c mayores. Debido a que el sólido obtenido a mayores temperaturas de cristalización es más rico en compuestos de alto punto de fusión, el perfil de fusión obtenido es más angosto que el que se obtiene con una fase sólida compuesta de moléculas de distinta composición química (ceras de alto y bajo punto de fusión) lo cual ocurre cuando las T_c son menores. Cuando las muestras son rápidamente enfriadas hasta llegar a la T_c , los cristales no tienen suficiente tiempo para reorganizarse y forman soluciones sólidas lo que se traduce en la obtención de un pico más angosto en los diagramas de DSC. Sin embargo, cuando las muestras son cristalizadas a velocidades de enfriamiento lentas, el sistema se encuentra en condiciones de equilibrio permitiendo la organización molecular de las ceras de similar composición química, obteniendo distintos picos en los diagramas de DSC, o como es en este caso un hombro a valores bajos de temperatura.

b) *Ceras en Solución.* La Tabla 3.4.4. muestra los parámetros obtenidos para las curvas de fusión de DSC cuando se cristalizaron muestras de ceras en aceite de girasol de concentración conocida (5000, 2500, 1000 y 500 ppm). Dichas muestras fueron sometidas a distintas condiciones de cristalización (distintas T_c y velocidad

Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

INV.
570-11

de enfriamiento constante). Los valores de ΔH calculados fueron expresados en J/g total de muestra (aceite + ceras).

Tabla 3.4.4. Parámetros obtenidos a partir de los termogramas DSC para soluciones de ceras cristalizadas a distintas T_c enfriadas a 20 °C/min (velocidad rápida de enfriamiento).

Parámetros de fusión						
T_c (°C)	5000 ppm			2500 ppm		
	T_i (°C)	ΔH (J/g)	T_{pico} (°C)	T_i (°C)	ΔH (J/g)	T_{pico} (°C)
0	40,9	0,91	49,2	41,4	0,51	46,4
12	40,1	0,91	48,9	31,9	0,44	46,2
22	39,3	0,83	48,7	35,1	0,29	44,5
30	41,9	0,35	48,7	41,0	0,17	45,3
35	45,9	0,13	49,3	43,2	0,05	46,2

Los valores detallados son el valor medio de duplicados cuyos errores son del 10 % en los valores de temperaturas y del 5% en los de entalpías.

Parámetros de fusión						
T_c (°C)	1000 ppm			500 ppm		
	T_i (°C)	ΔH (J/g)	T_{pico} (°C)	T_i (°C)	ΔH (J/g)	T_{pico} (°C)
0	46,7	0,39	50,2	43,8	0,21	50,5
12	45,5	0,32	50,2	44,0	0,20	50,6
22	47,2	0,12	52,5	45,0	0,04	52,0
30	--	--	--	--	--	--
35	--	--	--	--	--	--

Los valores detallados son el valor medio de duplicados cuyos errores son del 10 % en los valores de temperaturas y del 5% en los de entalpías.

A diferencia de las ceras purificadas donde la fuerza impulsora dependía solamente de la T_c , cuando trabajamos con ceras en solución la fuerza impulsora que genera la cristalización de las mismas es tanto la T_c como la concentración de la muestra (sobre-saturación del sistema). Al igual que en el caso de las ceras purificadas, se puede observar (Tabla 3.4.4.) que los valores de ΔH disminuyen a medida que disminuye la concentración de ceras (C) y a medida que aumenta la T_c debido a que ambos fenómenos generan una disminución de la fuerza impulsora del sistema obteniendo menor cantidad de masa cristalizada, lo cual se traduce en un valor de ΔH menor. Las T_{pico} se mantienen aproximadamente constantes para todas las concentraciones y la T_i tienden a aumentar a medida que aumenta T_c .

La Figura 3.4.8. muestra los diagramas de DSC obtenidos para una solución de 5000 ppm cristalizada a distintas T_c (0, 12, 22, 30 and 35 °C). En ésta figura se puede ver el efecto de la temperatura de cristalización sobre la cristalización de las ceras; cuando T_c aumenta, el área del pico disminuye. Esto se debe a que la fuerza impulsora del sistema disminuye debido no sólo al aumento de la temperatura de cristalización, sino también a la disminución de la sobre-saturación del sistema (β). En esta figura se repite el efecto del “*tailing*” observado en las ceras purificadas cuando se produce la cristalización a bajas T_c . Tal como se describió anteriormente éste comportamiento puede deberse a la fusión de componentes de bajo punto de fusión que cristalizan a la temperatura ensayada, pero sin embargo no pueden hacerlo a temperaturas mayores debido a una disminución en la fuerza impulsora. En la muestra cristalizada a 35 °C se puede distinguir la presencia de un pequeño hombro a bajas temperaturas.

Figura 3.4.8. Curvas DSC de una solución de 5000 ppm de ceras en aceite de girasol cristalizada a distintas temperatura de cristalización.

La Figura 3.4.9.a muestra el comportamiento térmico de soluciones de ceras de distinta concentración cuando fueron cristalizadas a 0 °C. A partir de esta Figura se puede analizar el efecto de la concentración de ceras en la cristalización de las mismas a una temperatura constante. En este caso, el único factor que afecta la fuerza impulsora es la sobre-saturación del sistema. Debido a que T_c es una constante, C_s también es constante y por lo tanto, la sobre-saturación del sistema dependerá solamente de la concentración de ceras.

Figura 3.4.9. Termogramas DSC de fusión (a) y cristalización (b) obtenidas para soluciones de distintas concentración de ceras cuando fueron cristalizadas a 0 °C.

El proceso de cristalización de éstas soluciones fue seguido por DSC (Figura 3.4.9.b) y los parámetros obtenidos se detallan en la Tabla 3.4.5.

Tabla 3.4.5. Parámetros de los termogramas DSC que describen el proceso de cristalización de distintas soluciones de ceras en aceite de girasol cristalizadas a distintas T_c .

Parámetros de cristalización						
T_c (°C)	5000 ppm			2500 ppm		
	T_i (°C)	ΔH (J/g)	T_{pico} (°C)	T_i (°C)	ΔH (J/g)	T_{pico} (°C)
0	40,8	0,92	37,84	38,0	0,59	33,7
12	40,8	0,85	37,75	37,8	0,47	34,5
22	40,8	0,67	37,75	37,6	0,38	34,4
30	40,8	0,55	38,09	37,1	0,15	34,5
35	40,5	0,11	38,42	--	--	--

Los valores detallados son el valor medio de duplicados cuyos errores son del 10 % en los valores de temperaturas y del 5% en los de entalpías.

Parámetros de cristalización						
T_c (°C)	1000 ppm			500 ppm		
	T_i (°C)	ΔH (J/g)	T_{pico} (°C)	T_i (°C)	ΔH (J/g)	T_{pico} (°C)
0	40,4	0,47	34,9	40,5	0,12	38,2
12	40,4	0,31	34,8	40,3	0,12	38,1
22	40,3	0,20	37,8	40,4	0,12	38,1
30	40,2	0,14	38,1	40,3	0,11	38,1
35	39,9	0,03	38,1	--	--	--

Los valores detallados son el valor medio de duplicados cuyos errores son del 10 % en los valores de temperaturas y del 5% en los de entalpías.

Tanto en la Figura 3.4.9.a como en la Figura 3.4.9.b se puede observar que a medida que disminuye la concentración de ceras, los picos de DSC obtenidos son más pequeños y anchos así como la presencia de un hombro en la muestra de 2500 ppm que se transforma en dos picos distintos para las soluciones de 1000 y 500 ppm. Las soluciones de ceras fueron cristalizadas también a 0 °C a una velocidad de enfriamiento lenta (1 °C/min). Los parámetros de las curvas de DSC de fusión y cristalización obtenidos en éstas condiciones se presentan en la Tabla 3.4.6.

Tabla 3.4.6. Parámetros de los termogramas DSC que describen el proceso de cristalización y fusión de distintas soluciones de ceras en aceite de girasol cristalizadas a $T_c=0$ °C a una velocidad de enfriamiento lenta (1 °C/min).

C (ppm)	Curvas de cristalización			Curvas de fusión		
	T_i (°C)	ΔH (J/g)	T_{pico} (°C)	T_i (°C)	ΔH (J/g)	T_{pico} (°C)
5000	45,7	0,202	44,9	39,2	0,80	48,6
2500	42,2	0,105	40,9	31,7	0,35	45,2
1000	--	--	--	--	--	--
500	--	--	--	--	--	--

Los valores detallados son el valor medio de duplicados cuyos errores son del 10 % en los valores de temperaturas y del 5% en los de entalpías.

Los picos obtenidos fueron muy pequeños obteniendo valores de entalpías muy bajos. En la Figura 3.4.10. se puede ver que las endotermas de las muestras cristalizadas a velocidades de enfriamiento lentas se produce un hombro tal como se describió para las soluciones de ceras de distintas concentración cristalizadas a 0 °C. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran claramente la presencia de un hombro en los procesos de fusión y cristalización de soluciones de ceras en aceite de girasol, especialmente cuando las cristalizaciones se realizaron a T_c altas y para velocidades de enfriamiento lentas. Es común atribuir éste perfil de

termogramas a transformaciones de tipo polimórficas, para lo cual se realizaron estudios de rayos X de los sólidos obtenidos y verificar ésta hipótesis. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los diagramas de rayos X observándose dos picos a 4,14 y 3,72 Å para todas las muestras ensayadas. Esto indicaría que la presencia de los hombros en los termogramas correspondientes se debe posiblemente al fraccionamiento durante el proceso de cristalización.

Figura 3.4.10. Diagramas DSC de una solución de ceras en aceite de girasol de 2500 ppm cristalizada a 0 °C a 1 y 20 °C/min.

3.4.3. Difractometría de Rayos-X de los cristales de ceras. Tal como se mencionó anteriormente, se realizaron difractometrías de rayos X de todas las muestras estudiadas con el objetivo de analizar la existencia de polimorfismo. No se observaron diferencias en ninguno de los diagramas observándose dos picos característicos; uno a 4,14 y otro a 3,72 Å (Liu y col., 1996).

3.4.4. Morfología de los cristales de ceras. Con el objetivo de estudiar la morfología de los cristales de ceras obtenidos bajo distintas condiciones de cristalización, se tomaron fotografías de los cristales obtenidos a partir de una solución de 5000 ppm cristalizada a diferentes temperaturas de cristalización (12, 22, 30 y 35 °C). Dichas fotografías se muestran en la Figura 3.4.11.

En la Figura 3.4.12. se muestran fotografías de los cristales obtenidos a partir de soluciones de 5000, 2500, 1000 y 500 ppm cristalizadas a 0 °C. Mientras que en la Figura 3.4.13. se observan las diferencias morfológicas entre los cristales obtenidos a partir de una solución de 2500 ppm cristalizada a diferentes velocidades de enfriamiento (1 y 20 °C/min).

No existen grandes diferencias en la morfología de los cristales obtenidos a partir de soluciones de 5000 ppm cristalizadas a distintas T_c (Figura 3.4.11.). Sin embargo, cuando las soluciones de distintas concentraciones fueron cristalizadas a 0 °C se observan morfologías completamente distintas. Los cristales de la solución de 5000 ppm son fuertemente brillantes y forman aglomerados de gran tamaño. A medida que disminuye la concentración de ceras los cristales poseen morfología más definida observándose estructuras en forma de pequeños bastones para las concentraciones de 1000 y 500 ppm (Figura 3.4.12.). Análogamente, los cristales obtenidos para las muestras cristalizadas a velocidades de enfriamiento lenta poseen morfología menos definida formando aglomerados con gran cantidad de material depositado.

Figura 3.4.11. Micrografías de una solución de 5000 ppm cristalizada a 12, 22, 30 y 35 °C (*a*, *b*, *c* y *d*, respectivamente)

Figura 3.4.12. Micrografías de soluciones de 5000, 2500, 1000 y 500 ppm (*a*, *b*, *c* y *d*, respectivamente) cristalizadas a 0 °C

Figura 3.4.13. Micrografías de una solución de 2500 ppm cristalizada a velocidades de enfriamiento lenta, *a*, 1 °C/min y rápida, *b*, 20 °C/min.

PARTE B: Sistema compuesto por mezclas de grasa de leche y aceite de girasol (cristalización a partir de un fundido)

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Mezclas de grasa de leche con aceite de girasol. Las muestras utilizadas fueron: grasa de leche pura (GL) y con la adición de 10, 20 y 40% (p/p) de aceite de girasol (AG). Dichas muestras fueron calentadas a 80 °C para fundirlas y eliminar su historia térmica. Se determinaron los tiempos de inducción, punto de fusión y la composición de cada una de éstas muestras.

3.3.2. Cálculo de energías de activación para la nucleación a partir de un fundido.

a) *Medida de los tiempos de inducción.* Las muestras se fundieron y se indujo la cristalización de las mismas con el equipo de láser utilizado en el Capítulo 2. Las muestras fundidas se colocaron en una celda termostaticada a la temperatura de cristalización deseada por medio de un baño termostático de modo de obtener los tiempos de inducción correspondientes. Dicho proceso se realizó a dos velocidades de enfriamiento diferentes, una rápida (5,5 °C/min) y una lenta (0,1 °C/min).

b) *Cálculo de energías activación para la nucleación.* Debido a que en este sistema la cristalización se produce a partir de la muestra fundida y no a partir de la solución es necesario deducir la ecuación de Fisher-Turnbull para este sistema. Tal como se mencionó anteriormente, la energía libre de activación (ΔG_n) puede calcularse a partir de la ecuación 9 (Strickland-Constable, 1968), donde J puede ser tomada como proporcional a la inversa del tiempo de inducción de nucleación (τ). Para un núcleo esférico, la energía libre de activación está relacionada con la energía superficial de la interfase sólido/líquido, σ , y el sobre-enfriamiento (temperatura de fusión, T_m – temperatura de cristalización, T_c) $\Delta T = (T_m - T_c)$ por la siguiente ecuación:

$$\Delta G_n = (16/3) \pi \sigma^3 T_m^2 / (\Delta H)^2 (\Delta T)^2 \quad [27]$$

Siendo ΔH la entalpia de nucleación.

Para un sistema formado por triglicéridos, la mayor barrera para la difusión es la conformación molecular y por lo tanto, el segundo término exponencial de la ec. [9] es igual a:

$$-\alpha \Delta S / R \quad [28]$$

Donde α es la fracción de moléculas que deben estar en la conformación correcta para ser incorporadas al núcleo, ΔS , es la disminución de entropía de cristalización de un mol de triglicéridos y R es la constante de los gases. Combinando las ecuaciones [9], [27] y [28], y reordenando, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\tau T = h / N k_B \exp (\alpha \Delta S / k_B) \exp [(16/3) \pi \sigma^3 T_m^2 / k_B T (\Delta H)^2 (\Delta T)^2] \quad [29]$$

Donde h es la constante de Planck, N es el número de moléculas por mol de triglicéridos y k_B es la constante de Boltzman (Strickland-Constable, 1968). Si se grafica $\ln \tau T$ vs. $1/T(\Delta T)^2$, se puede obtener una pendiente, s , la cual permite calcular la energía libre de nucleación a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta G_n = s k_B / (T_m - T_c)^2 \quad [30]$$

A pesar de que la pendiente obtenida a partir de éste análisis es una constante, la energía libre de activación es una función del sobre-enfriamiento. Esta ecuación fue desarrollada para sistemas de triglicéridos con un solo componente, sin embargo, se probó que es totalmente aplicable a sistemas multicomponente (Ng, 1990; Herrera y col., 1998) como puede ser aceite de girasol y palma.

3.3.3. Cálculo de los puntos de fusión. Los puntos de fusión fueron determinados como *Mettler Dropping Points* (MDP). Las determinaciones fueron

utilizó el método de la AOCS (Cc 18-80) para realizar estas medidas. El recipiente utilizado para realizar la medición se colocó en un freezer 10 min antes de llenarlo con la muestra grasa. El recipiente se llenó hasta el tope con la muestra fundida y se colocó nuevamente en el freezer durante 15 min. Luego, el recipiente se retiró del freezer y se colocó en el horno del equipo Mettler (Mettler FP83, Mettler Corp., Hightstown, NJ). La temperatura del horno fue controlada por medio de un procesador central Mettler FP90. El horno fue sometido a un precalentamiento hasta alcanzar los 29 °C. La velocidad de calentamiento del equipo fue de 1 °C/min. La fuente de calor fue activada luego de colocar la muestra en el horno y la temperatura de *dropping point* fue registrada en un visor.

3.3.4. Cálculo de la composición de las muestras. El perfil de triglicéridos fue determinado por medio de un cromatógrafo gaseoso Hewlett- Packard 5890 Series II (Hewlett- Packard, San Fernando, CA) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un inyector on- column. Se utilizó una columna Heliflex Phase AT-1 de longitud de 30 m y un diámetro interno de 0,25 mm (Alltech and Associates, Deerfield, IL). Se utilizó Helio como gas carrier a un flujo de 2 mL/min y los gases hidrógeno y aire fueron utilizados para alimentar el FID junto con el Helio. Se prepararon las muestras utilizando el método de Lund (Lund, 1988). Se pesaron 10 mg de la muestra en viales de CG y se disolvió en 1,8 mL de iso-octano. Se adicionaron al vial 100 µL de estándar interno (triglicéridos con 27 carbonos, (C₂₇ trioctanoína), en iso-octano: 2,02 mg/mL). Se almacenaron las muestras en el refrigerador previo al análisis. Para poder separar los diferentes triglicéridos de acuerdo a su número de carbono, se realizó el siguiente perfil de temperatura: Inicialmente se mantuvo la temperatura a 280 °C por 1 min, luego se aumentó la temperatura a una velocidad de 3,0 °C/min hasta alcanzar 355 °C. El detector se mantuvo a 370 °C. La composición fue determinada basada en el área integrada por el software ChemStation Chromatography software proporcionado por Hewlett Packard. Las muestras fueron corridas por duplicado.

3.3.5. Microscopía de Luz Polarizada (MLP). Se indujo la cristalización a 36 °C a dos velocidades de enfriamiento distintas (0,1 y 5,5 °C/min). Se dejó cristalizar

3.3.5. Microscopía de Luz Polarizada (MLP). Se indujo la cristalización a 36 °C a dos velocidades de enfriamiento distintas (0,1 y 5,5 °C/min). Se dejó cristalizar la muestra y se siguió dicho proceso por medio del turbidímetro de luz polarizada. En el momento en que la señal del láser alcanza su máximo, se toma una gota de la muestra y se coloca entre un porta- y un cubre-objeto para ser observado al microscopio y poder estudiar la morfología de los cristales iniciales. Las características del microscopio de luz polarizada fueron descriptas en el Capítulo 2 (Cap. 2, 2.3.7.).

3.3.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC). Cuando el proceso de cristalización llega a su fin los cristales se filtran y se utilizan para estudiar su comportamiento térmico, su composición y su patrón de Rayos-X. Las medidas fueron realizadas con un calorímetro Polymer Laboratories Calorimeter (Rheometric Scientific Ltd.). Previamente a las corridas se realizaron calibraciones a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min utilizando Indio y Mercurio como estándares. Se pesó entre 8-12 mg de muestra y se las sometió a un programa de temperatura de 5 °C/min desde 0 a 80 °C. Se utilizó una cápsula vacía como referencia. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

3.3.7. Difractometría de Rayos X (XRD). Los estudios de Rayos-X fueron realizados en un espectrofotómetro de rayos-X Philips 1730 acoplado con un sistema para controlar la temperatura (Philips Argentina S.A., Capital Federal, Argentina). La temperatura de la celda donde se coloca la muestra fue controlada por medio de un criostato programable Lauda UK 30 (Werklauda). Se utilizó como fluido refrigerante etilenglicol en agua (3:1, vol/vol). Se utilizó una radiación de cobre tipo $K_{\alpha 1\alpha 2}$ a 40 kV, 20 mA y una velocidad de escaneo de 1 °/min desde 5 a 50 °.

3.4. Resultados

3.4.1. Cálculo de energías de activación a partir de un fundido. Debido a que la única fuerza impulsora de este tipo de sistemas es el sobre-enfriamiento, ($\Delta T = T_m - T_c$) donde T_m es la temperatura de fusión y T_c es la temperatura de cristalización, se estudió el efecto del mismo frente a una variación en la composición de la muestra (en lugar de concentración tal como se realizó en un sistema en solución). Debido a la importancia de los factores de procesamiento en este tipo de muestra a nivel industrial, se analizaron distintas velocidades de enfriamiento, una lenta (0,1 °C/min) y otra rápida (5,5 °C/min).

a) *Cálculo de los tiempos de inducción.* La Figura 3.4.1. muestra los tiempos de inducción obtenidos cuando las muestras fueron cristalizadas a una velocidad de enfriamiento rápida (5,5 °C/min) y la Figura 3.4.2. muestra los mismos datos pero cuando las muestras fueron enfriadas a 0,1 °C/min (velocidad de enfriamiento lenta). A pesar de las pequeñas diferencias en los puntos de fusión (Tabla 3.4.1.) para las mezclas de distinta proporción de aceite de girasol en grasa de leche, los tiempos de inducción obtenidos entre muestras para una velocidad de enfriamiento constante, fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$). Dicha diferencia en los tiempos de inducción puede estar dada por el aumento del contenido de triglicéridos de C_{52} y C_{54} a medida que aumenta el contenido de aceite de girasol en la muestra generando una fuerza impulsora menor. A velocidades de enfriamiento lentas, se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tiempos de inducción de las muestras de GL y 10% AG y entre las muestras de 10 y 20% AG para todas las temperaturas estudiadas; y una diferencia altamente significativa ($p < 0,01$) entre las muestras de 20 y 40% AG. Los tiempos de inducción obtenidos cuando las muestras fueron cristalizadas a velocidad de enfriamiento lenta fueron mas cortos que los obtenidos a velocidad de enfriamiento rápida para el mismo sobre-enfriamiento. En general, cuando una grasa es cristalizada a una velocidad de enfriamiento rápida (80 °C/min), se espera obtener la forma polimórfica tipo α mientras que a las velocidades de enfriamiento estudiadas en este trabajo (por ej. 0,1 °C/min), se esperan las formas polimórficas tipo β' o β (Sato, 1988). Cuando se enfría aceite de palma a 0,1 °C/min hasta una temperatura de cristalización cercana al punto de fusión de la muestra, la forma polimórfica tipo β' posee menor tiempo de inducción que la forma β . Para las tres formas polimórficas de las grasas,

los tiempos de inducción aumentan en el orden α , β' y β (Chong y Sato, 1993). Se esperaría que una velocidad de enfriamiento lenta promueva la formación de formas polimórficas más estables (polimorfismo β) que tienen tiempos de inducción más largos. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio fueron invertidos, obteniendo tiempos de inducción mas largos para las muestras enfriadas rápidamente. La fuerza termodinámica es la misma en ambos casos, pero las muestras enfriadas rápidamente (5,5 °C/min) tardaron más en cristalizar para cada temperatura estudiada. Se obtuvieron resultados similares para aceite de girasol hidrogenado con características químicas muy distintas a estas muestras (rico en triglicéridos con ác. eláidico; Herrera, 1994). Este comportamiento puede explicarse debido al tiempo requerido por las moléculas para organizarse y alinearse con sus vecinas de modo de formar un núcleo estable. En las muestras cristalizadas rápidamente, esta organización se produce principalmente a la temperatura de cristalización, mientras que el proceso de enfriamiento lento permite que esta reorganización se produzca a temperaturas mayores a medida que la muestra se enfría hasta llegar a la temperatura de cristalización. El resultado final es que la muestra que ha sido enfriada lentamente necesita permanecer menos tiempo a la temperatura de cristalización establecida debido a que gran parte de la organización molecular ha ocurrido en el período de tiempo en que la muestra llega a la temperatura de cristalización.

Para todas las muestras estudiadas y para ambas velocidades de enfriamiento, se puede dibujar una curva continua para los tiempos de inducción en función de la temperatura de cristalización. Esto indica que cuando las muestras son cristalizadas bajo éstas condiciones, se obtiene un solo tipo de polimorfismo.

Figura 3.4.1. Tiempos de inducción de mezclas de grasa de leche y aceite de girasol cristalizadas a 5,5 °C/min

Figura 3.4.2. Tiempos de inducción de mezclas de grasa de leche y aceite de girasol cristalizadas a 0,1 °C/min

Tabla 3.4.1. Composición química y puntos de fusión de las muestras estudiadas.

Nº de Carbono	Composición química (P/P) de las muestras originales				
	AG	GL	10% AG	20% AG	40% AG
C26	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4
C28	0,0	0,5	0,5	0,4	0,4
C30	0,0	1,0	0,9	0,8	0,7
C32	0,0	2,1	2,0	1,8	1,4
C34	0,0	4,8	4,4	3,9	3,2
C36	0,3	8,6	7,9	7,2	6,3
C38	3,9	13,2	12,4	11,4	7,8
C40	0,0	8,0	7,3	6,6	7,2
C42	0,0	7,0	6,1	5,5	4,2
C44	0,0	7,5	6,5	5,8	4,8
C46	0,0	9,0	6,6	6,9	5,8
C48	0,1	11,0	10,0	8,3	6,8
C50	2,2	13,2	12,5	10,3	8,8
C52	20,1	9,2	10,0	9,9	13,1
C54	73,1	4,3	12,5	20,6	29,3
C54 (18:0)-d	0,8	0,3	1,4	0,3	0,5
C54 (18:1)-a,b,c	72,3	3,9	11,1	20,3	28,8
C54-b (un-known)	4,5	1,5	1,0	2,6	4,3
C54-c (un-known)	0,0	1,0	1,9	0,9	0,2
C54 (18:1cis)-a	67,8	1,5	8,1	16,9	24,3
MDP (°C)		40,2	40,4	38,8	37,4

Desviación estandar para todas las determinaciones $\leq \pm 1\%$

b) *Cálculo de energías de activación.* En la Tabla 3.4.2. se muestran los valores de energías libres de activación obtenidas a partir de la ecuación de Fisher Turnbull (ec. 28) con los tiempos de inducción medidos a velocidad lenta de enfriamiento junto con las temperaturas de cristalización y los valores de sobre-enfriamiento basados en los datos de punto de fusión detallados en la Tabla 3.4.1. Las pendientes obtenidas de los gráficos de $\ln(\tau T)$ vs. $1/T(\Delta T)^2$ para las muestras de GL, 10, 20 y 40% AG fueron de $1,302 \times 10^3$, $1,667 \times 10^3$, $1,956 \times 10^3$ y $2,439 \times 10^3$, respectivamente. Los coeficientes de regresión obtenidos de los gráficos se muestran en la Figura 3.4.3. El valor de ΔG_n de las mezclas aumenta a medida que el contenido de GL disminuye para el mismo valor de sobre-enfriamiento (por ej. para un ΔT de 2,4, ΔG_n fueron 1,9; 2,4; 2,9 y 3,5 para GL, 10, 20 y 40% AG respectivamente).

Tabla 3.4.2. Energías de activación (ΔG_c) de todas las muestras

GL			10% AG			20% AG			40% AG		
T_c	ΔT	ΔG_c	T_c	ΔT	ΔG_c	T_c	ΔT	ΔG_c	T_c	ΔT	ΔG_c
37,2	3,0	1,2	36,9	3,5	1,1	35,6	3,2	1,6	33,5	3,9	1,3
37,8	2,4	1,9	37,2	3,2	1,3	35,8	3,0	1,8	33,9	3,5	1,6
38,1	2,1	2,4	37,6	2,8	1,8	36,2	2,6	2,4	34,2	3,2	2,0
38,3	1,9	3,0	38,0	2,4	2,4	36,5	2,3	3,1	34,7	2,7	2,8
38,7	1,5	4,8	38,2	2,2	2,8	36,8	2,0	4,0	34,9	2,5	3,2
			38,3	2,1	3,1				35,1	2,3	3,8
			38,6	1,8	4,2						

T_c y ΔT en $^{\circ}\text{C}$ y ΔG_n en kJ/mol

Para los triglicéridos, la principal barrera difusional para la nucleación es la estructura molecular. Esto implica que los triglicéridos deben encontrarse en la conformación correcta antes de ser incorporados al núcleo (Sato, 1988). Basados

en la composición de las mezclas, la adición de aceite de girasol aumentó substancialmente el contenido de C18:1 en las mezclas. Sin embargo, las energías de activación fueron más cercanas de lo esperado de acuerdo a las diferencias en C18:1 para las distintas mezclas a igual sobre-enfriamiento. Estos valores son del orden de magnitud de los publicados para aceite de girasol hidrogenado y 10 veces menores que los calculados para aceite de palma (Ng, 1990) (grasa semisólida natural).

Figura 3.4.3. Gráfico de $\ln(\tau T)$ vs. $1/T(\Delta T)^2$

3.4.2. Comportamiento térmico de las distintas mezclas de GL y AG. Con el objetivo de estudiar el comportamiento térmico y composición de los cristales de las respectivas mezclas, éstas fueron cristalizadas a 36 °C y los cristales así obtenidos fueron filtrados tal como se describió en la sección de Materiales y Métodos. La Figura 3.4.4. muestra termogramas de cristales iniciales de GL y las mezclas de 10, 20 y 40% AG obtenidos bajo las diferentes velocidades de enfriamiento. Para el caso de la muestra de GL a ambas velocidades de enfriamiento, se observan dos endotermas con temperaturas de pico próximas a 20 y 44 °C. El pico de 20 °C

disminuye en tamaño con el aumento de AG (10 y 20% AG) y no aparece en la muestra de 40% AG. Este hecho concuerda con la disminución del contenido de triglicéridos de cadena corta y media (Tabla 3.4.1.). En todos los casos, se encontró variación en el comportamiento térmico con la velocidad de enfriamiento. La endoterma de alta temperatura es más ancha para los cristales obtenidos a velocidad de enfriamiento lenta. Las temperaturas de pico de las segundas endotermas son $43,7 \pm 0,6$; $42,6 \pm 0,5$; $42,9 \pm 0,8$ y $47,1 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ para las muestras de GL, 10%, 20% y 40% AG respectivamente cristalizadas a una velocidad de enfriamiento rápida y $44,0 \pm 0,7$, $43,0 \pm 0,8$, $45,4 \pm 0,8$ y $46,4 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ para las mismas muestras pero cristalizadas a velocidad de enfriamiento lenta. Las entalpías de la endoterma de alta temperatura fueron $52,2 \pm 9,2$; $52,2 \pm 8,6$; $53,9 \pm 9,1$; y $63,1 \pm 9,5$ J/g para las muestras GL, 10%, 20% y 40% AG, respectivamente cristalizadas a $5,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y $43,9 \pm 8,2$; $45,6 \pm 8,4$; $53,9 \pm 8,9$; $52,2 \pm 9,0$ J/g para $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las temperaturas de pico ni entre los valores de entalpías obtenidos para las diferentes velocidades de enfriamiento. Tampoco se observaron endotermas a alta temperatura para las muestras cristalizadas lentamente que es lo que hubiera ocurrido si se produjera algún tipo de transformación polimórfica. Tanto para velocidades de enfriamiento rápidas como lentas, la forma polimórfica β' fue muy estable y los cristales mantuvieron este tipo de polimorfismo luego de 1 semana de almacenamiento a 10°C . En el caso de una cinética de enfriamiento lenta, el rango de fusión de los cristales es mayor, observándose un pico de alta temperatura más ancho (Figura 3.4.4.). El modo en que se modificó el perfil de las curvas sugiere que las diferencias encontradas en los termogramas de fusión no se originaron en una transformación polimórfica sino en cambios en la composición de los triglicéridos mixtos.

Figura 3.4.4. Termogramas de las muestras cristalizadas a velocidades de enfriamiento rápida y lenta (5,5 y 0,1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ respectivamente). a) GL, b) 10% AG, c) 20% AG y d) 40% AG.

3.4.3. Difracción de Rayos-X en mezclas de grasa de leche y aceite de girasol.

La relación entre los tiempos de inducción y la temperatura de cristalización en las mezclas de grasa de leche y aceite de girasol fue de tipo exponencial creciente continua, lo cual indica la presencia de una sola forma polimórfica en el sistema. Estos resultados fueron confirmados realizando análisis de difracción de Rayos X a los cristales iniciales obtenidos en esta cristalización. Para todas las muestras y para todas las temperaturas de cristalización enfriadas rápida y lentamente solo se detectó la forma β' obteniéndose dos fuertes señales a 3,9 y 4,3 Å en los diagramas de Rayos X. No se observó ninguna señal a 4,6 Å, característica del polimorfismo β . Los diagramas de Rayos X obtenidos fueron muy similares entre las distintas muestras lo cual indica que no se producen cambios polimórficos en las condiciones de cristalización estudiadas y por lo tanto, el polimorfismo no es responsable de las diferencias en tiempos de inducción ni en el comportamiento térmico de los cristales obtenidos en estos experimentos.

3.4.4. Composición de los cristales. La Tabla 3.4.3. muestra la composición química de los primeros cristales formados a velocidad de enfriamiento rápida y lenta. El sólido obtenido contiene triglicéridos tanto de la fase sólida como de la líquida atrapada entre los cristales. Sin embargo, no se observó diferencia en la composición del líquido atrapado entre ambas velocidades de enfriamiento (Patience y col., 1999). Las muestras que fueron enfriadas lentamente poseen una débil disminución en el contenido de triglicéridos de C_{40} y un débil aumento del contenido de C_{50} y C_{54} . El componente cis-insaturado de C_{54} fue mayor en la muestra de 40% AG cristalizada lentamente con respecto a la cristalizada en forma rápida.

Tabla 3.4.3. Composición Química de los cristales iniciales obtenidos a ambas velocidades de enfriamiento.

N° de Carbono	Composición química de los cristales							
	(36 °C, 5,5 °C/min)				(36 °C, 0,1 °C/min)			
	GL	10% AG	20% AG	40% AG	GL	10% AG	20% AG	40% AG
C26	0,6	0,4	0,5	0,3	0,8	0,6	0,6	0,6
C28	0,5	0,5	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,3
C30	1,0	0,9	0,9	0,6	0,9	0,8	0,8	0,5
C32	2,0	1,8	1,7	1,2	1,9	1,8	1,6	1,1
C34	4,5	4,2	3,9	2,9	4,3	4,1	3,6	2,4
C36	8,8	8,2	7,7	5,8	7,8	7,4	6,6	4,4
C38	10,2	9,6	9,2	7,1	11,7	11,3	10,3	7,3
C40	10,4	9,8	8,9	6,9	7,2	6,8	6,1	4,0
C42	6,2	5,9	5,5	4,2	6,2	5,8	5,2	3,8
C44	7,6	7,1	6,6	5,4	7,5	6,7	6,1	5,1
C46	9,6	9,0	8,2	7,0	9,7	8,4	7,8	7,3
C48	11,3	10,4	9,3	8,2	12,3	10,5	9,9	9,4
C50	13,5	12,5	11,4	10,4	15,3	13,4	12,7	12,5
C52	10,5	10,8	11,6	13,6	9,9	10,1	10,5	12,2
C54	3,2	8,8	14,1	26,0	4,2	11,9	17,8	29,0
C54 (18:0)-d	0,6	0,6	0,4	0,3	0,5	0,6	0,4	0,9
C54 (18:1)-a,b,c	2,6	8,2	13,7	25,7	3,6	11,3	17,5	28,2
C54-b (un-known)	1,2	1,5	1,8	2,9	1,5	2,0	2,3	2,4
C54-c (un-known)	0,8	0,8	0,7	1,0	1,3	1,0	0,9	1,0
C54 (18:1cis)-a	0,6	5,9	11,2	21,8	0,8	8,3	14,3	24,9

Estas diferencias son demasiado pequeñas para justificar el acortamiento de los tiempos de inducción detectados cuando la muestra se enfría lentamente. Por lo tanto, la interacción entre los triglicéridos puede cumplir un rol importante en este comportamiento. Bajo las condiciones de estudio, las muestras enfriadas lentamente cristalizaron más rápidamente y fueron menos propensas que las muestras enfriadas rápidamente a formar cristales compuestos. A velocidades de enfriamiento rápidas, un triglicérido de alto punto de fusión puede desarrollar

cristales compuestos (soluciones sólidas) con otro triglicérido que puede tener un punto de fusión menor. Breischuh y Windhab (1998) informaron que se pueden formar cristales compuestos en grasa de leche cristalizada rápidamente bajo un sobre-enfriamiento dado, aún cuando el sobre-enfriamiento se produce solo por un período corto de tiempo.

3.4.5. Morfología de los cristales. Los cristales presentes en el inicio de la cristalización fueron fotografiados. Las fotos obtenidas para las muestras enfriadas lenta y rápidamente a 36 °C se muestran en la Figura 3.4.5. y 3.4.6. respectivamente. Cuando las muestras se enfriaron lentamente (Figura 3.4.5.), se puede observar que todas ellas presentaron formas esferulíticas pero las mismas fueron mayores y menos empacadas a medida que aumenta el contenido de aceite en la mezcla. Las fotografías de las muestras enfriadas a velocidad de enfriamiento rápida (Figura 3.4.6.) también muestran una morfología en forma de esferulitas con una estructura de agujas organizadas radialmente desde el centro del cristal. Estas estructuras también se vieron menos empacadas a medida que aumenta el contenido de AG y la muestra con 40% AG mostró una morfología diferente con esferulitas incompletas y agujas de mayor tamaño.

Las muestras con 0 y 10% AG mostraron morfologías similares y tamaños cristalinos del mismo orden para ambas velocidades de enfriamiento. Las muestras con 20 y 40% AG mostraron diferencias mayores presentando esferulitas de mayor tamaño indicando un favorecimiento en la cristalización cuando las muestras se enfrian lentamente. Para sobre-enfriamientos altos, ($\Delta T_{GL} = 4,2$; $\Delta T_{10\% AG} = 4,4$), solo se observó una pequeña diferencia entre las velocidades de enfriamiento. Sin embargo, para sobre-enfriamientos intermedios ($\Delta T_{20\% AG} = 2,8$) y bajos ($\Delta T_{40\% AG} = 1,4$), la velocidad de enfriamiento lenta favorece la cristalización (para el mismo tiempo de cristalización, se obtienen más esferulitas mejor formadas) e influye en la morfología. En este caso, el proceso de cristalización fue determinado por la fuerza impulsora termodinámica (sobre-enfriamiento), pero sin embargo, el proceso de cristalización fue también influenciado por factores cinéticos como puede ser la velocidad de enfriamiento.

Figura 3.4.5. Cristales de GL, 10, 20 y 40% AG (a, b, c y d) cristalizados a 36 °C a velocidad de enfriamiento lenta (0,1 °C/min)

Figura 3.4.6. Cristales de GL, 10, 20 y 40% AG (*a*, *b*, *c* y *d*) cristalizados a 36 °C a velocidad de enfriamiento rápida (5,5 °C/min)

3.5. Conclusiones

Tal como se explicó en la introducción del presente capítulo, el proceso de cristalización se puede dividir de acuerdo al sistema que se estudie. Por un lado, se puede analizar la cristalización (más específicamente la nucleación) a partir de un sistema en solución y por el otro, se puede estudiar un sistema que cristalice a partir de un fundido.

a) Solución de ceras en aceite de girasol. Para estudiar un sistema en solución se utilizaron ceras en aceite de girasol y se variaron tanto la concentración de las ceras en el aceite como la temperatura de cristalización (fuerzas impulsoras de la nucleación para este sistema). A partir de éste estudio se pudo calcular el valor de ΔG_n . El conocimiento de los valores de ΔG_n es una herramienta importante para entender el proceso de nucleación. Cabe destacar que la metodología utilizada en este trabajo para calcular los valores de ΔG_n no solo es original sino que la medición de los tiempos de inducción es sencilla, rápida y muy fácil de realizar. Los valores de ΔG_n obtenidos varían con la sobresaturación del sistema para una temperatura de cristalización constante. Cuando la sobre-saturación aumenta, ΔG_n disminuye resultando en un tiempo de inducción menor debido a una mayor velocidad de nucleación. Cuando la sobre-saturación es constante, los valores de ΔG_n no aumentan con la temperatura, que sería el resultado esperado, sino que tiene un máximo debido a la disminución de la viscosidad del medio.

b) Mezclas de grasa de leche y aceite de girasol. Cuando la cristalización se produce a partir de un sistema fundido, el único factor que influye sobre la fuerza impulsora de cristalización es el sobre-enfriamiento, el cual depende tanto de la temperatura de fusión de la muestra como de la temperatura de cristalización del sistema. Se observó que un aumento del contenido de aceite de girasol en las muestras (menor punto de fusión) produjo un aumento en los tiempos de inducción para una temperatura de cristalización constante debido a la disminución de la fuerza impulsora (menor sobre-enfriamiento). Estos resultados se correlacionan con un aumento en ΔG_n de estas muestras. También se pudo observar una disminución del tiempo de inducción cuando la cristalización se produce a velocidades de

enfriamiento lentas para un mismo valor de sobre-enfriamiento y para una misma muestra. En este caso, las condiciones termodinámicas de cristalización son las mismas pero existe una variación en la cinética de nucleación.

Las condiciones de procesamiento (temperatura de cristalización, concentración, composición y velocidades de enfriamiento), influyen sobre la cinética de nucleación de ambos sistemas lipídicos estudiados. Estas variaciones pueden correlacionarse no sólo con cambios microscópicos de los cristales sino que también se pueden ver reflejados en el comportamiento térmico del sistema. En ambos sistemas se observó que cuando la fuerza impulsora es alta, se favorece la formación de soluciones sólidas de comportamiento térmico característico. A medida que la fuerza impulsora disminuye, debido a una disminución de la concentración (como es el caso de las ceras) o debido a un cambio en la composición del sistema (como es el caso de las distintas mezclas de grasa de leche y aceite de girasol) y por lo tanto a un cambio en la temperatura de fusión de las muestras, se evidencia la presencia de los distintos componentes que forman parte del sistema lipídico complejo debido a un fraccionamiento parcial o total de los cristales obtenidos. El mismo efecto se observa cuando las muestras son cristalizadas a velocidades de enfriamiento lentas. En ninguno de los casos estudiados, las diferencias observadas fueron debidas a un cambio polimórfico del sólido obtenido (transición sólido-sólido). En todos los casos se observaron diferencias en la morfologías obtenidas cuando las muestras fueron cristalizadas bajo distintas condiciones de proceso.

Capítulo 4

Aplicación Práctica: Efecto de las Condiciones de Almacenamiento de la Semilla de Girasol sobre el Contenido de Ceras del Aceite obtenido

Capítulo 4: Aplicación Práctica: Efecto de las Condiciones de Almacenamiento de la Semilla de Girasol sobre el Contenido de Ceras del Aceite Obtenido.

4.1. Introducción

Tal como se mencionó con anterioridad, el aceite de girasol crudo se obtiene a partir de semillas parcialmente descascaradas por medio de un proceso de presión en frío seguido de una extracción con hexano y un degomado con agua. La calidad y estabilidad del aceite son los factores más importantes en la producción, aceptación y venta de los productos oleosos de origen vegetal. Estas propiedades dependen principalmente de la calidad de la semilla, el tratamiento de la misma previo a la extracción y de las condiciones de proceso. El procesamiento de los aceites causa alteraciones en su composición química afectando su calidad y su estabilidad oxidativa. Las condiciones de proceso están influenciadas por la presencia de componentes menores como pueden ser ácidos grasos libres, tocoferoles, fosfolípidos, metales y ceras, los cuales poseen propiedades pro o anti-oxidantes. La mayoría de éstos compuestos son insolubles y poseen alto punto de fusión, por lo tanto, deben ser removidos del aceite durante pasos específicos en el proceso de refinación (pre-descerado por centrifugación, winterización) tal como se explicó en detalle en los capítulos anteriores. Durante muchos años, el contenido de ceras fue determinado por medio de procedimientos de cristalización seguidos por una filtración y pesando el residuo sólido. Estos métodos eran mas precisos cuando se aplicaban a aceites crudos, los cuales son ricos en ceras cristalizables a altas temperaturas. En 1989, con el objetivo de evitar el paso de cristalización y para obtener una medida precisa del contenido total de ceras, se propuso un método cromatográfico. Mariani y Fedeli (1989) propusieron un método basado en el uso de una columna silicagel hidratada al 2% en agua que fue aplicado a aceites de maní, soja y colza. La fracción obtenida por elución con una mezcla de hexano/dietileter 99:1

contenía una gran cantidad de esteroides esterificados los cuales co-eluían en la cromatografía gaseosa junto con las ceras de alto peso molecular (C_{46} o más). A pesar de ello, éste método es suficientemente sensible como para detectar ceras de cadena corta (C_{40} - C_{46}) y por consiguiente fue adoptado por la Comunidad Europea (EES; 1993) como una herramienta para controlar la pureza del aceite de oliva (Hénon y col.; 2001).

En los últimos años, varios autores han investigado la influencia de los procesos industriales, especialmente el proceso de refinación, sobre la estabilidad y calidad de distintos aceites vegetales como arroz, soja, oliva sésamo, etc. (Hopia, 1993; Pérez-Camino y col., 1993; Kamal-Eldin y Appelqvist, 1995; Rade y col., 1995; Smouse, 1995; Ferrari y col., 1996, 1997; Ruiz-Méndez y col., 1997; Abou-Gharbia y col., 1997; Gomes y Caponio, 1998). Sin embargo, existen relativamente pocos estudios en la literatura que involucren el estudio de la evolución de los constituyentes del aceite de girasol durante su procesamiento. En particular, se sabe muy poco acerca de los cambios en la calidad del aceite debido a la extracción y al degomado. Brevedan y col. (2000) observaron que no existe ningún cambio en la composición de ácidos grasos y tocoferoles durante el proceso de refinación. Sin embargo, los contenidos de algunos compuestos minoritarios como metales, ceras y fosfolípidos resultaron apreciablemente afectados con los procesos de extracción y degomado con agua. Los aceites de girasol obtenidos por extracción con hexano presentaron un grado de deterioro inicial superior y una mayor estabilidad oxidativa con respecto a los aceites obtenidos por prensado. Carelli y col. (2002) estudiaron la influencia de las distintas etapas de refinación del aceite sobre el contenido de ceras en los mismos. Estos autores observaron que los aceites obtenidos por extracción poseían mayor contenido de ceras que los obtenidos por prensado. Sin embargo, dicho valor no se vio afectado significativamente por la etapa de degomado. Mariani y col. (1989) estudiaron los componentes menores presentes en distintos tipos de aceites (girasol, soja, maní y arroz) frente a diferentes condiciones de refinación y a la variación de su concentración a lo largo del proceso. Estos investigadores, en concordancia con otros estudios, detectaron una variación en el contenido de ceras entre 720 y 1630 ppm de acuerdo a la tecnología utilizada en la extracción del aceite. También observaron la variación del contenido de

ceras a lo largo de las distintas etapas de refinación y como dicho valor disminuye a lo largo del proceso. Tubaileh y col. (2002) estudiaron los cambios en el contenido de ceras y alcoholes durante el proceso de desodorización y la refinación física en aceites de oliva. Los resultados obtenidos mostraron que el máximo contenido de ceras se obtiene cuando el aceite alcanza la temperatura de desodorización. Asimismo, el contenido de alcoholes disminuye a lo largo del tiempo operacional y los cambios observados no dependen de las variables estudiadas.

4.1.1. Crecimiento y rendimiento. Para poder efectuar un óptimo manejo de los cultivos es necesario conocer el funcionamiento de los mismos. Por ello, es importante conocer como crecen y cómo y cuándo se determinan los componentes del rendimiento: el número de granos por unidad de superficie y el peso de los mismos. En determinadas etapas del ciclo de los cultivos, la variación del crecimiento produce importantes efectos en el rendimiento. Resulta clara la necesidad de conocer estas etapas críticas, ya que ello nos ayuda a *i)* interpretar o predecir el efecto de variaciones en el ambiente o en el manejo del cultivo sobre el rendimiento y *ii)* optimizar el manejo de los cultivos y la respuesta a la aplicación de insumos. Algunos autores (Andrade y col., 2000) han analizado el comportamiento del maíz, girasol y soja en lo referente al crecimiento y determinación del rendimiento, contrastando características eco-fisiológicas relacionadas con la productividad. Ellos observaron que las etapas más críticas para la determinación del rendimiento de los cultivos bien implantados son la floración en maíz, el llenado de semillas en soja y la floración y el llenado de semillas en girasol. Para lograr una mayor y/o eficiente producción, los cultivos deben ser manejados de manera tal de optimizar su estado fisiológico general al comienzo de estas etapas. Si se obtienen excelentes girasoles alrededor de la floración, no necesariamente se van a obtener altos rendimientos, pues todavía falta una fase crítica que es el llenado del grano. Los productores conocen esto ya que alguna vez obtuvieron rendimientos menores de lo esperado según el aspecto de sus cultivos en floración. Es necesario entonces llegar a la floración con un cultivo en óptimo estado, para ello, el cultivo debe estar sano, libre de malezas, bien provisto de agua y nutrientes y con densidad de plantas adecuada. Se debe

tratar de evitar la ocurrencia de deficiencias hídricas en esta etapa, ya sea a través del riego cuando sea posible, o de la elección de la fecha de siembra y del ciclo cultivar. La disponibilidad de nutrientes no debe ser limitante desde los momentos en que estos son requeridos en altas cantidades. En esquemas de alta producción es necesario hacer coincidir la floración con los momentos de mayor radiación incidente y, con el objetivo de obtener altos rendimientos, el cultivo debe mantenerse en buen estado durante el llenado de granos. Sin embargo, el cultivo de girasol es más estable que el de maíz frente a variaciones en la densidad y uniformidad de plantas. Aún así, la densidad óptima varía con la situación de producción, aumentando cuando mayor sea la oferta de recursos y menor la incidencia de enfermedades y vuelco (Andrade y col., 2000). Otros autores (López Pereira y col., 2000) demostraron un mayor rendimiento relacionado con un aumento del índice de cosecha asociado con un incremento en la duración relativa del período de llenado de la semilla. La mayoría de las semillas que resultaron levemente más livianas pero con una relación pepa/cáscara mayor, junto con una mayor concentración de aceite en la pepa fueron mayormente responsables de la variación del rendimiento de aceite en la semilla.

El máximo porcentaje de aceite que puede expresar un cultivar está determinado genéticamente (Hernández, 1996). En los híbridos que se encuentran actualmente en el mercado argentino, el porcentaje máximo de aceite oscila entre el 42 y el 57%. La expresión del porcentaje de aceite potencial de cada cultivar puede estar altamente influenciado por el ambiente. Por ello, si se desean obtener elevados porcentajes de aceite, la elección del genotipo a sembrar debe tener en cuenta no sólo el porcentaje de aceite potencial del cultivar, sino también la capacidad del material genético para expresar dicha característica en el ambiente en que será cultivado. Las principales fuentes de asimilados para la síntesis del aceite son: la fotosíntesis, que se realiza en forma contemporánea al llenado de los frutos, y los hidratos de carbono de reserva, almacenados principalmente en el tallo, en la base de la raíz primaria y en el receptáculo. La fijación de carbono en las hojas durante el período de llenado juega un rol importante en el aporte de los asimilados que sirven como sustrato para la síntesis de aceite. Por ello, existen dos factores muy ligados a la fotosíntesis del cultivo durante la etapa de

síntesis de aceite y, en consecuencia, a la nutrición carbonada de los frutos: la duración de la superficie foliar durante dicha etapa, y el nivel de radiación interceptada durante la misma. La síntesis de aceite se realiza en una etapa relativamente corta del ciclo del cultivo, durante el período de floración-madurez fisiológica, que dura entre 29 y 50 días, valores obtenidos en una amplia gama de condiciones ambientales y genotipos. Dentro de dicha etapa, el período de mayor síntesis de aceite comienza en general entre 7 y 10 días después de la fecundación de los frutos y culmina unos 3 a 5 días antes de la madurez fisiológica. Mantener un área foliar suficiente para asegurar un adecuado aporte de asimilados a los frutos durante este corto período en el que se determina el porcentaje de aceite, es fundamental si se desea maximizar el mismo. El porcentaje de aceite en los frutos correlaciona positivamente con la duración de la superficie foliar después de la floración. Una buena duración de la superficie foliar en el período de floración-madurez fisiológica es, por lo tanto, esencial para alcanzar porcentajes de aceite cercanos al potencial del cultivar. La disponibilidad hídrica puede afectar fuertemente la duración de superficie foliar. Esta puede ser también afectada por otras variables como el aporte de nitrógeno, el nivel de radiación incidente y la presencia de enfermedades foliares. Como se mencionó anteriormente, la temperatura afecta la duración del período de llenado de frutos, la que disminuye a mayor temperatura, pudiendo acortar la etapa de síntesis de aceite disminuyendo el porcentaje del mismo. Sin embargo, este parámetro correlaciona positivamente con las temperaturas durante la floración, estadio anterior al comienzo de la síntesis de aceite (Aguirrezabal y Pereyra, 1998). Luego de estudiar los factores que afectan el rendimiento de la planta de girasol, se ha demostrado que numerosos caracteres morfológicos y fisiológicos pueden definir el potencial del rendimiento del cultivo. Los mismos determinarán que las plantas sean capaces de aprovechar con la máxima eficiencia la disponibilidad de recursos provistos con las actuales prácticas agronómicas. Hernández y Orioli (1994) propusieron un ideotipo de la planta de girasol, en el cual, dentro de las características morfológicas, propusieron que las plantas posean un sistema radical extenso y profundo, tallos de porte mediano con alta capacidad de reserva a fotoasimilados, los cuales pueden ser retribuidos al grano durante el período de su llenado y hojas con un ritmo de senescencia lento. Dentro de las

características asociadas con la formación de rendimiento, propusieron que la superficie meristemática del receptáculo sea máxima previo al inicio de la diferenciación de los primordios florales, y que el capítulo maduro posea un bajo ritmo respiratorio. Se deben lograr capítulos con frutos más grandes y más pesados y con mayor contenido porcentual de aceite.

4.1.2. Manipulación de la semilla de Girasol. Dentro de la industria de semillas oleaginosas, existen zonas geográficas donde se producen materias primas que contienen aceite mas allá de sus necesidades y otros sectores que están inhabilitados para producir lo necesario para satisfacer sus requerimientos básicos. Como consecuencia, la cosecha para maximizar la calidad y producción, junto con las prácticas de transporte y almacenaje para minimizar el daño de la semilla, son casi tan importantes como la tecnología utilizada en el procesamiento para lograr productos finales de alta calidad y costo final mínimo. Algunas de las cosechas de oleaginosas más grandes del mundo se utilizan para ilustrar factores importantes durante la cosecha, almacenaje y transporte. Dichos factores son comunes para todas las oleaginosas, mientras que otros son específicos a cosechas individuales.

a) *Cosecha.* Generalmente, la plantación de girasol se encuentra lista para cosechar aproximadamente unos 120 días después de ser plantada. Este período de tiempo puede reducirse cuando se registran altas temperaturas estivales. El girasol está maduro cuando la parte de atrás del cabezal ha pasado de verde a amarillo y las brácteas se están volviendo marrones. Esto ocurre de 30 a 45 días después de la floración, dependiendo de la temperatura durante la maduración. En forma similar a otras plantaciones, se pueden obtener cosechas prematuras por medio de la aplicación de desecantes. Cuando se usan dichos productos, se aplican aproximadamente a 25-30% de humedad de la semilla o cuando éstas están fisiológicamente maduras. A pesar de que las heladas fuertes ayudan a reducir el período de secado, si éstas son muy tempranas se producen pérdidas de producción y contenido de aceite. Muchos productores prefieren cosechar girasol a niveles de humedad altos y luego secar las semillas para reducir las pérdidas por roturas y exposición a los pájaros. En general, la producción es mayor para los cultivos sembrados tempranamente, en relación a los cultivos de

maduración más tardíos. Una semana después de que la semilla alcanza el máximo valor de humedad éste disminuye hasta alcanzar un valor de 45% y en éstos momentos se obtiene el máximo contenido de aceite.

b) Condiciones de almacenaje. Después de la cosecha, las condiciones de almacenaje también tienen efecto sobre la calidad final del grano. Los principales factores que pueden afectar adversamente el almacenaje de la semilla son la humedad, la temperatura, los mohos y las bacterias. Los granos y las semillas oleaginosas almacenados a alta humedad y temperaturas elevadas pueden estar sujetos a calentamiento debido al crecimiento natural de microorganismos y al aumento de temperatura resultante dentro de la pila de la semilla. El calentamiento intenso incrementa el contenido de ácidos grasos libres, daña el color y la calidad del aceite. La prolongación del tiempo de almacenaje antes del procesamiento de las semillas es también un factor a tener en cuenta. Por otro lado, también se acepta que las condiciones deficientes de almacenaje causan problemas en la calidad del producto, reducen la eficiencia del proceso y disminuyen la producción del mismo.

Las semillas desarrollan dióxido de carbono y agua a expensas de azúcar y almidón. Estas reacciones metabólicas se ven favorecidas por la humedad y temperatura de la semilla y humedad relativa ambiente. Por lo tanto es importante almacenar las semillas a baja temperatura y humedad para prevenir el desarrollo de agua y dióxido de carbono y de este modo minimizar la fermentación. Por ejemplo, las semillas oleaginosas almacenadas bajo condiciones favorables a un contenido de humedad de 8% y a una temperatura de 25 °C desarrollan solo 10 gramos de dióxido de carbono por tonelada por día. Esta cantidad sería 100 veces mayor si el contenido de humedad fuera del 20%. Por lo tanto, las semillas oleaginosas pueden ser protegidas del proceso fermentativo destructor almacenándolas a un contenido relativamente bajo de humedad y a una temperatura debajo de 30 °C. Los problemas potenciales de almacenaje pueden ser ilustrados por la dinámica de la temperatura y humedad de un silo. Por ejemplo, si se almacenan semillas oleaginosas dentro de un silo de almacenaje a temperatura moderadamente templada, ellas permanecerán templadas. Cuando llegue el invierno, la pared exterior del silo estará fría. La baja temperatura penetra en el silo gradualmente generando un enfriamiento de la

pared del mismo y la parte exterior de las semillas. Originalmente, la humedad estaba distribuida en forma pareja a través de las semillas, pero ahora migrará a través de las mismas hacia áreas de condensación más frías. Lo inverso sucederá durante la primavera y el verano. A medida que la parte exterior del silo se calienta, la humedad será entonces llevada desde la parte externa de las semillas hacia el área fría del centro. Como resultado de ello, los niveles de humedad pueden exceder los niveles de seguridad y promover el crecimiento de mohos.

c) *Equipamiento*. Durante la cosecha, el equipo utilizado para la recolección y transporte de las semillas oleaginosas puede causar algunas roturas de las mismas y llevar al incremento en el contenido de ácidos grasos libres y oxidación. Las roturas de semillas pueden evitarse utilizando una bandeja larga para juntar semillas que se extiende delante de la barra cortadora de la máquina cosechadora. Paralelamente se ha observado que el color y los valores de acidez aumentan con el tiempo, la temperatura y la humedad relativa. La calidad de la proteína puede también disminuir por su interacción con carbohidratos durante el almacenaje y procesamiento. Por lo tanto, el control del almacenaje tanto en el campo como en la planta de procesamiento es trascendental para la calidad del producto final. Existen diversas medidas importantes a ser tomadas en cuenta para el almacenaje seguro de semillas oleaginosas. Los silos de almacenaje adecuados deben poseer siempre una prelimpieza de la semilla y control de humedad y temperatura. La prelimpieza se realiza con el objetivo de retirar materiales extraños provenientes del campo como paja, tallos, etc. que crearían problemas para la operación del secador, como también durante el almacenaje. El silo de almacenaje debe tener dispositivos de registro de temperatura y alarma, tales como termómetros de control remoto para realizar un seguimiento de la temperatura de las semillas en puntos selectos del silo. Cuando el contenido de humedad de las semillas oleaginosas excede los valores apropiados, el mismo debe reducirse secando las semillas a un nivel satisfactorio (Carr; 1997).

4.1.3. Efecto de factores externos en el cultivo de semillas de girasol sobre la calidad del aceite obtenido. En muchos cultivos se ha demostrado una relación entre la latitud geográfica y la composición de ácidos grasos. Por ejemplo, en España fue estudiada la relación entre la ubicación geográfica y la

composición de ácidos grasos en aceite de girasol para los cultivos del año 1988. Se encontró que no sólo la latitud sino que también las condiciones climáticas y la temperatura al momento de realizar la plantación, la floración y la maduración de la planta juegan un rol importante en la composición relativa de los ácidos grasos como pueden ser el linoleico, oleico y esteárico mientras que el ácido palmítico permanecía constante. La composición final de ácidos grasos obtenida a partir de semillas maduras es más una función de la ubicación geográfica y las condiciones climáticas que de la variedad que ha sido plantada salvo que las semillas plantadas sean híbridos donde la manipulación genética controla la composición de ácidos grasos en mayor proporción que el contenido total de aceite. En general, existe una correlación entre la latitud y la composición de ácidos grasos, ya que la primera influye sobre las condiciones climáticas. Cuando existen otros factores que afectan las condiciones climáticas, o cuando el ciclo biológico de la planta se produce en una época diferente del año, la relación general entre la ubicación geográfica y la composición de ácidos grasos se altera. Esto significa que las condiciones climáticas son las que influyen en dicho parámetro y por lo tanto, todos los factores que pueden afectarlas también contribuyen en la variación de la composición de ácidos grasos. Paralelamente, Putt y col. (1969) demostraron estadísticamente que la variación en la composición de ácidos grasos se debía tanto a la variedad como a la ubicación. La temperatura en el momento de la síntesis del aceite también debe ser considerada ya que bajas temperaturas parecen producir aceites con altos contenidos de ácido linoleico. En un artículo posterior, Kinman (1972) introdujo el factor genético indicando que puede ser posible plantar semillas híbridas que producirían aceites con altos contenidos de ácido linoleico aún en ubicaciones geográficas con bajas temperaturas. La presión por disminuir el colesterol en las dietas humanas ha favorecido a los aceites comestibles que contienen ácidos grasos altamente insaturados como el ácido linoleico. Los aceites de girasol con altos contenidos de ácido linoleico no pueden ser obtenidos a partir de semillas sembradas por debajo de cierta latitud y por lo tanto se reduciría su venta. Lajara y col. (1990) demostraron que aunque existe una correlación inversa entre el contenido de ácido linoleico y ácido oleico, el contenido total de dichos ácidos no es constante ni independiente de la temperatura. Dicho valor aumenta con la temperatura y

con la disminución del contenido de ácido oleico. Sin embargo, el contenido de ácido esteárico aumenta cuando el contenido de ácido oleico y linoleico disminuye sugiriendo un valor constante para la combinación de éstos tres ácidos grasos. Agüero y col. (1999) evaluaron el rendimiento del grano de girasol, el porcentaje de aceite y el porcentaje de ácido oleico de una colección de híbridos “alto oleico” experimentales y comerciales e híbridos tradicionales, que representan el nivel alcanzado por el mejoramiento genético de girasol en Argentina. La media del porcentaje de ácido oleico encontrada en los híbridos experimentales “alto oleico” fue de 82,3%, mientras que el de los híbridos tradicionales fue de 28,6%. El rendimiento y el porcentaje de aceite de algunos híbridos “alto oleico” fue significativamente mayor al de los híbridos tradicionales. De la Vega y Chapman (2002) demostraron que el aumento en el rendimiento debido a la interacción entre la variedad genética y los factores ambientales se podía atribuir también al tipo de suelo (de acuerdo a si es más rico en carbono o nitrógeno). Como conclusión, podemos decir que la temperatura promedio del área sembrada durante el desarrollo de la semilla y las condiciones climáticas locales junto con la variedad genética del grano, son los factores que tienen mayor influencia sobre la composición de ácidos grasos.

4.1.4. Estabilidad del aceite frente a factores externos. Uno de los objetivos principales de la Ciencia y Tecnología de Alimentos es evitar el deterioro de productos nutricionales cuando son almacenados luego de su producción. Muchos tipos de alimentos, por ejemplo, untables basados en aceites vegetales, deben conservar su sabor y aroma durante varios meses. Keszler y col. (2000) han estudiado la producción de compuestos volátiles formados en el curso de la descomposición térmica de hidroperóxidos durante el almacenamiento de aceite de girasol. Dichos autores establecieron que los aldehídos alifáticos formados se originan a partir de radicales alcoxilos derivados de triglicéridos de ácido linoleico. El efecto de la oxidación en el aceite causada por la luz es bien conocido (Nawar; 1996). Wann (1995) ha descripto un método para estudiar el efecto de la exposición a la luz de los aceites en una botella de vidrio transparente en contacto con el aire, y Kiritsakis (1998) estudió el efecto relativo de botellas de vidrio y de plástico sobre la oxidación de aceite de oliva expuesto a la luz y en

botellas envueltas en papel de aluminio. En ambos casos, la exposición a la luz tuvo un efecto significativo sobre el deterioro del sabor. Existe muy poca información acerca de la vida útil de aceites de girasol embotellados en su envase original. Un panel de consumidores sería el más apropiado para determinar cuando un producto alimenticio llega al final de su vida útil. Por ejemplo, Ramírez y col. (2001) encontraron que inesperadamente el 15% de los consumidores prefirió las muestras de aceite más oxidadas a las frescas. También demostraron que tanto la temperatura de almacenamiento como la exposición a la luz ejercen un efecto importante sobre la vida útil del aceite. La misma fue estimada a una temperatura ambiente de 20 °C y el resultado obtenido fue de 281 días para el aceite expuesto a la luz y mayor de 2 años para los aceites almacenados en la oscuridad.

4.1.5. Diseños experimentales para el análisis de ceras. Las ceras pueden ser definidas estrictamente como ésteres de ácidos y alcoholes de cadena larga. Sin embargo, para los químicos que se dedican al estudio de cualquier tipo de ceras, éstas constituyen un amplio espectro de compuestos de diferente composición química (por ej.: hidrocarburos, ésteres cerosos y de esteroides, cetonas, aldehídos, alcoholes y esteroides). La configuración y estructura cristalina de las ceras vegetales ha llamado la atención de varios investigadores durante muchos años y se han realizado muchos estudios referentes a la síntesis de las mismas. En general, se acepta el hecho de que la morfología de estas estructuras está determinada en su mayor parte por la composición de las ceras, sin embargo, como es de esperar, el medio ambiente y las condiciones de cristalización (tipo y velocidad) pueden influenciar la estructura cerosa. Las ceras vegetales pueden provenir de la superficie de las hojas, vainas, tallos y frutos. No obstante, también se puede encontrar material ceroso en otros órganos de las plantas: semillas, recubrimientos de las semillas, frutos, flores, cortezas y cáscaras. Otra particularidad de éstos compuestos cerosos es que el largo de la cadena puede ir desde C_2 hasta C_{62} . Las ceras presentes en forma de monoésteres forman parte del 80% de los lípidos superficiales de las plantas. Los componentes mayoritarios de estos compuestos son ácidos grasos de cadena larga (C_{12} - C_{30}) y alcoholes (C_{20} - C_{32}). El largo de cadena total cubre un intervalo de C_{34} a C_{62} en

donde los homólogos de cadena par son más abundantes que los de cadena impar. Estos últimos pueden originarse a partir de alcoholes ramificados o restos ácidos (Bianchi; 1995). Una consecuencia de éstas características es que la naturaleza no polar de las ceras hacen que sea dificultosa su extracción de los tejidos. En tiempos pasados, el tejido animal o vegetal era secado y luego el contenido lipídico total del material podía ser extraído con hexano o cloroformo por medio de una extracción semi-continua. Debido a que las ceras forman parte de las capas externas de las plantas y animales, se hizo más común extraerlas colocando el material en remojo en frío y ocasionalmente a la temperatura de ebullición del éter de petróleo. También se ha usado el cloroformo, pero debido a su toxicidad se ha sustituido por diclorometano. Luego de la remoción del solvente bajo vacío el residuo puede ser pesado. Por otro lado, una cantidad conocida del componente ceroso en forma de estándar (que no se encuentra generalmente en la muestra) puede ser adicionado a la muestra permitiendo la cuantificación de estos componentes por medio de una cromatografía. Con el objetivo de separar las ceras en sus componentes químicos, es necesario disolverlas en el solvente menos polar, generalmente hexano o éter de petróleo. En ocasiones se ha encontrado que el extracto de ceras no se disuelve completamente en estos solventes, en este caso se pueden disolver en solvente en caliente antes de hacer el análisis cromatográfico, pero este procedimiento generalmente causa, en algunos casos, la precipitación de las ceras en el extremo de la columna. Por lo tanto es recomendable disolver las ceras en un solvente un poco más polar como puede ser cloroformo o diclorometano. Existen diferentes técnicas para separar los componentes que forman parte de las ceras. Tales técnicas son: cromatografía en columna, cromatografía en capa, HPLC y espectrometría de masa (Hamilton, 1995). Mas adelante se describirá en detalle la cromatografía en columna que es la técnica que se desarrolló en este capítulo.

4.2. Objetivos

Debido a la importancia de los factores externos sobre la calidad del aceite, el objetivo de éste capítulo fue estudiar las características de un aceite (especialmente

contenido y composición de ceras) obtenido a partir de semillas almacenadas bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Almacenamiento de semillas de girasol. Las semillas de girasol fueron proporcionadas por Molinos Río de La Plata S.A. (Avellaneda, Buenos Aires, Argentina). Estas semillas fueron almacenadas en el laboratorio en recipientes de acrílico transparente sellados y colocados a tres temperaturas de almacenamiento (10, 21 y 37 °C) durante un período de 306 días (aproximadamente un año).

4.3.2. Obtención de aceite de girasol. Se tomaron 30 g de semillas de girasol, se molieron y se colocaron en cartuchos de papel de filtro con el objetivo de ser sometidas a una extracción semi-continua con hexano en caliente. Dicho procedimiento se repitió a distintos intervalos de tiempo (0, 10, 48, 124, 236, 264 y 306 días). Previa a la toma de muestra, las semillas fueron homogeneizadas cuidadosamente de modo de tomar semillas que se encontraban tanto en el borde del silo como en el centro del mismo. La extracción se realizó durante 2 h; tiempo a partir del cual la cantidad de aceite que se extrae por éste método no es significativa. Una vez transcurrido dicho tiempo, se eliminó el solvente por evaporación sobre una platina calefactora a baja temperatura. Este procedimiento se realizó por triplicado y se determinó por pesada la cantidad de aceite obtenido. Los aceites fueron almacenados a 0 °C para evitar su deterioro durante el período de tiempo en el que se realizaron las determinaciones experimentales.

4.3.3. Cristalización isotérmica de ceras. Los aceites así obtenidos fueron diluidos (1/10, 1/20, 1/25 y 1/100 según corresponda) por pesada con aceite libre de ceras y se indujo la cristalización isotérmica a 22 y 12 °C de los mismos por medio del equipo desarrollado y descrito en el Capítulo 2 para poder obtener así el contenido de ceras en las muestras oleosas.

4.3.4. Separación de ceras. Extracción en fase sólida (SPE). La técnica de extracción en fase sólida se utiliza como metodología para pre-tratar a las muestras

que van a ser sometidas a un determinado análisis. Generalmente se utiliza para el aislamiento y el fraccionamiento de lípidos (Ebeler y Ebeler, 1996). En éste caso particular, se puede separar la fracción cerosa de los triglicéridos del aceite. Para ello se utilizó una columna de sílica (10 g; Alltech, Deerfield, IL). El procedimiento fue el siguiente: el aceite fue calentado (90 min a 110 °C) para fundir las ceras y borrar la historia térmica de la muestra; luego se pesaron 0,4 g del mismo y se agregó el colorante Sudan II (1 gota, 1% en CHCl₃). El colorante posee el mismo tiempo de retención que los triglicéridos permitiendo identificar la fracción de los mismos. Sabiendo que las ceras eluyen a menor tiempo que estos compuestos, pueden ser separadas de la fase oleosa recolectando la primer porción de eluato. Luego de mezclar el colorante con el aceite, se calienta la muestra nuevamente durante 30 min aproximadamente para eliminar el contenido de cloroformo del colorante. En este momento, se siembra la muestra en la columna de sílica (previamente lavada y suspendida en cloroformo para que el frente de solvente sea parejo y no interfieran las burbujas de aire). El recipiente que contenía la muestra fue lavado tres veces con 50 µL de CHCl₃ y éstas porciones fueron sembradas junto con la muestra. Se realizó la elución con cloroformo a temperatura ambiente y se recogió el eluato hasta la fracción del colorante (presencia de ceras) tardando aproximadamente 20 min. Luego, se continuó con la elución del colorante y triglicéridos de modo de limpiar la columna y ésta fracción se descartó. El primer eluato se llevó a sequedad en una platina calefactora a baja temperatura. El residuo sólido se resuspendió en 500 µL de cloroformo. Luego de la adición del estándar interno se inyectó 2 µL de esta solución a la columna cromatográfica.

4.3.5. Cromatografía gaseosa capilar (CG). Se realizó una cromatografía gaseosa capilar de las muestras de ceras aisladas del aceite de girasol por medio de SPE tal como se describió en el párrafo anterior. El instrumento utilizado para realizar la CG fue un Varian 3400 equipado con un detector de ionización de llama (FID). Las condiciones de proceso fueron: gas portador, helio (3 ml/min); programa de temperatura del horno, 2 min a T_i = 240 °C con una rampa de 2 °C/min hasta T_f = 340 °C y 25 min a 340 °C. La temperatura del inyector fue de 340 °C; la relación de split, 1:95, temperatura del FID, 350 °C; la columna capilar utilizada fue una AT-5, de 15 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno; espesor de la película,

0,25 μm (Alltech, Deerfield, IL). Se realizó una curva de calibración para estudiar la respuesta de las distintas moléculas que forman parte de las ceras presentes en el aceite de girasol frente a las condiciones de corrida a las cuales se las exponen. Para ello se utilizaron estándares de ceras: C₃₄, éster palmitil esteárico; C₃₈, éster araquidil esteárico; C₄₀, éster araquidil araquídico; C₄₂, éster behenil araquídico, C₄₄, éster behenil behénico (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). El contenido de ceras fue calculado usando el método de estándar interno utilizándose como tal la molécula de C₃₄ (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, C₃₄, éster palmitil esteárico; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO).

4.3.6. Aceite libre de ceras. El aceite libre de ceras fue obtenido tal como se describió en capítulos anteriores y se utilizó para realizar las diluciones de los aceites obtenidos.

4.3.7. Índice de acidez. El índice de acidez de un aceite se encuentra incorporado al estándar de comercialización argentino. Su medición es efectuada titulando el aceite extraído de las semillas con una solución de hidróxido de sodio 0,1 N. Este índice permite estimar el contenido de ácidos grasos libres en la materia grasa. Este contenido se incrementa con el enranciamiento, por lo que el índice de acidez es utilizado como un indicador de la calidad del aceite para la alimentación humana. La definición estricta del índice de acidez es: cantidad de hidróxido de potasio (expresada en mg) necesaria para neutralizar los ácidos grasos que se encuentran en 1 g de muestra oleosa. Por lo tanto:

$$IA = V_{\text{álcali}} \times N \times 56,1 / m_{\text{muestra}}$$

donde: IA es el índice de acidez, $V_{\text{álcali}}$ es el volumen de álcali utilizado en la titulación expresado en mL, N es la normalidad del álcali, 56,1 es el peso molecular del hidróxido de potasio y m_{muestra} es la masa de la muestra utilizada para realizar la titulación expresada en g (AOCS, Te 2a-64).

4.3.8. Determinación de fósforo. Se determinó el contenido de fósforo de las muestras por medio de la técnica descrita en las normas IRAM (5597-1970). La misma consiste en calcinar la muestra y complejar el fósforo presente en la misma con molibdeno. Dicho complejo posee coloración azulado permitiendo la medida de

absorbancia a 650 nm. Por medio de este ensayo, junto con la realización de una curva de calibración se puede determinar la concentración de fósforo en las muestras.

4.4. Resultados

4.4.1. Obtención de aceite. Rendimiento. Se determinó el rendimiento del proceso de extracción pesando la cantidad de aceite obtenida. Dicho resultado se expresó cada 100 g de semillas (% p/p). Los datos se detallan en la Figura 4.4.1. Esta Figura muestra que no existen variaciones significativas ($p < 0.05$) en el contenido de aceite extraído de las semillas almacenadas bajo distintas condiciones de tiempo y temperatura obteniendo un valor promedio entre 25-40%. Las distintas condiciones de almacenamiento de las semillas luego de su cosecha no influyeron en el contenido de aceite de las mismas. De acuerdo a la introducción realizada sobre los factores que influyen en la síntesis de aceite (Aguirrezabal y Pereyra, 1998), es lógico esperar que no se produzca ninguna variación en el rendimiento de aceite de las semillas ya que dicho valor depende de las condiciones tanto genéticas como ambientales a las cuales fueron sometidas las plantas de girasol durante la síntesis de los triglicéridos.

Es interesante comentar el aspecto que presentaron los aceites obtenidos en el laboratorio ya que éstos poseían características similares a aceites semi-refinados. Si bien se intentó reproducir el proceso de extracción industrial hay que tener en cuenta las diferencias entre dicho proceso y el realizado en el laboratorio. Por ejemplo, en la industria la obtención de aceite comienza con una primera etapa de prensado de la semilla, tratamiento a altas temperaturas con el objetivo de facilitar la ruptura de las células y por lo tanto la extracción del aceite y por último, la etapa de extracción continua con hexano. Si bien, las semillas fueron molidas en el laboratorio previamente a su extracción, dicho proceso no es completamente comparable al proceso de prensado. Otra diferencia reside en el hecho de que las semillas molidas fueron colocadas en un papel de filtro para poder proceder a su extracción, mientras que la industria la extracción es de tipo continua y con un contacto directo entre la semilla y el solvente de extracción. Estas diferencias

pueden parecer insignificantes, ellas pueden afectar la calidad, eficiencia y características del aceite obtenido. Por último, es necesario considerar que la cantidad de muestra procesada en el laboratorio es insignificante con respecto a las magnitudes que se manejan a nivel industrial. Estos factores podrían generar diferencias cuantitativas en el rendimiento en la extracción del aceite y el contenido de ceras, sin embargo las tendencias y el comportamiento cualitativo podrían ser comparables a la producción a gran escala. Tal como se mencionó en la introducción de éste capítulo, Mariani y Fedeli (1989) demostraron que el contenido de ceras varía de acuerdo a la tecnología utilizada en la extracción de aceite, obteniendo valores desde 720-1630 ppm de ceras. Con el objetivo de caracterizar el aceite obtenido y determinar su calidad, se determinó el índice de acidez y el contenido de fósforo de los mismos. El índice de acidez (concentración de ácidos grasos libres) en la materia grasa aumenta naturalmente con el transcurso del tiempo desde la cosecha de los frutos, por acción de lipasas. Esto se encuentra contemplado en las bases de comercialización de la Argentina que fijan un índice de acidez máximo de 1,5% para granos que son comercializados desde el momento de cosecha hasta el 31 de agosto del año siguiente y tolera hasta un 3% para frutos comercializados luego de esa fecha (Aguirrezabal y Pereyra, 1998). En las muestras analizadas en este estudio, no se observaron variaciones en los índices de acidez con el tiempo de almacenamiento, obteniéndose un valor promedio de $2,2 \pm 0,2$. Paralelamente, se determinó el contenido de fósforo de las mismas muestras obteniéndose valores menores a 80 ppm. Cabe destacar que los valores de contenido de fósforo encontrados en aceites crudos provenientes de la industria se encuentran en el orden de 200 ppm para aceites obtenidos por prensado y de 400 ppm para aceites obtenidos por extracción; mientras que los aceites que han sido sometidos a un degomado (semi-refinados) poseen un contenido de fósforo de 60 ppm aproximadamente. Los datos detallados en ésta sección demuestran que los aceites obtenidos en el laboratorio poseen características similares a aceites semi-refinados.

Figura 4.4.1. Contenido de aceite obtenido de semillas almacenadas bajo distintas condiciones de tiempo y temperatura.

4.4.2. Determinación del contenido de ceras. a) *Tubidimetría de luz polarizada.*

El contenido de ceras de estas muestras fue analizado por medio del método óptico descrito en el Capítulo 2. Los tiempos de inducción obtenidos, las diluciones realizadas a las muestras y la temperatura de cristalización utilizadas se detallan en la Tabla 4.4.1. La Figura 4.4.2. muestra la concentración de ceras obtenida a partir de los tiempos de inducción calculados. Para todas las muestras estudiadas, se observa un incremento en la concentración de ceras en los primeros 50 días de almacenamiento, pero, luego de éste tiempo dicha concentración disminuyó hasta alcanzar nuevamente el valor inicial. A partir de éste momento, la concentración aumenta gradualmente y a partir del día 201 permanece en un valor aproximado de 1500-2000 ppm (dependiendo de la temperatura de almacenamiento de las semillas). El aumento en el contenido de ceras en las muestras obtenidas a partir de semillas almacenadas a 37 °C fue mayor que el proveniente de semillas almacenadas a 21 °C que a su vez fue mayor que el valor obtenido para las muestras de 10 °C ($p < 0,05$). La concentración inicial fue de 1000 ppm aproximadamente para todas las muestras y la máxima concentración obtenida fue de 2000, 1600 y 1400 ppm aproximadamente para las muestras provenientes de

semillas almacenadas a 37, 21 y 10 °C, respectivamente. Este hecho sugiere que la temperatura de almacenamiento aumenta el contenido de ceras de los aceites obtenidos en las condiciones experimentales detalladas con anterioridad. Esto puede deberse tanto a un aumento en la producción de ceras en las semillas de girasol debido a un aumento de la actividad enzimática con la temperatura durante el almacenamiento y/o a una mayor extracción de éstos compuestos causada por algún cambio estructural en la cáscara de las semillas a causa del aumento de la temperatura y el almacenamiento prolongado.

b) Método microscópico. La concentración de ceras de las mismas muestras fue determinada también por medio del método microscópico. Los valores obtenidos se detallan en la Figura 4.4.3. Si bien los valores absolutos hallados son superiores a los obtenidos por medio del método turbidimétrico, la tendencia en el aumento de concentración de ceras con la temperatura y el tiempo de almacenamiento se mantiene. Se puede observar un valor inicial de aproximadamente 1000 ppm para todas las muestras, luego un aumento del contenido de ceras en los primeros días de almacenamiento y por último un aumento importante en dicho contenido. El máximo valor obtenido fue de 3000, 2000 y 1900 ppm aproximadamente para las muestras de 37, 21 y 10 °C respectivamente.

Debido a las diferencias en los valores absolutos encontrados entre éstos dos métodos (turbidimetría de luz polarizada y microscopía) y estimando que una de las causas que pueden originar dicha diferencia es la presencia de impurezas, se procedió a filtrar el aceite en caliente para eliminar cualquier sustancia que permaneciera en estado sólido a esa temperatura. Una vez filtradas las muestras se determinó la concentración de ceras de las mismas por los dos métodos mencionados anteriormente. Se obtuvieron valores de concentración entre un 10-20% menores para las muestras filtradas cuando la concentración fue determinada por medio de la turbidimetría de luz polarizada. Cuando se utilizó el método microscópico, los valores obtenidos para los aceites filtrados fueron entre un 80-90% menores luego de la filtración. A modo de ejemplo, podemos informar los valores obtenidos para el lote de semillas tomado a los 264 días de almacenamiento. El contenido de ceras determinado por microscopía fue de 2032, 1713 y 3174 ppm para los aceites obtenidos a partir de semillas almacenadas a 10, 21 y 37 °C, respectivamente. Mientras que la concentración de ceras en las mismas muestras

luego de ser sometidas a la filtración en caliente fue de 358, 127 y 191 ppm, respectivamente. Como conclusión podemos decir que las impurezas sólidas que se encuentran en los aceites crudos influyen sobre la solubilidad de las ceras en el aceite (fundamento del método microscópico). El efecto probable que ejercerían las impurezas sobre la muestra de aceite sería que éstas co-cristalizarían con las ceras y disminuirían la solubilidad de las mismas en la fase oleosa resultando en la necesidad de someter a la muestra a una temperatura mayor para poder solubilizarlas completamente y de este modo determinar su concentración. Este hecho produciría un error por exceso en la determinación microscópica. Por otro lado, éstas impurezas parecen no intervenir en la determinación de ceras por medio del método de turbidimetría de luz polarizada ya que las diferencias encontradas entre las determinaciones de los aceites filtrados y sin filtrar no fueron tan importantes. Por lo tanto, la co-cristalización de las impurezas tendrían un efecto más importante sobre la solubilidad de las ceras en el aceite que sobre la cinética de nucleación de las mismas interviniendo posiblemente en la etapa de crecimiento de sus cristales. Nuevamente a modo de ejemplo, podemos citar aquí los valores de concentración de ceras encontrados para aceites obtenidos a partir de semillas almacenadas a 10, 21 y 37 °C durante 264 días. Dichos valores fueron: 1539, 1830 y 2000 ppm, respectivamente para los aceites crudos y 1300, 1358 y 1800 ppm para las mismas muestras pero luego de ser sometidas a la filtración en caliente.

Tabla 4.4.1. Tiempos de inducción (τ) de las ceras presentes en los aceites estudiados al ser cristalizadas bajo condiciones isotérmicas (T_c).

Condiciones de Almacenamiento		dilución (p/p)	T_c (°C)	τ (min)
Tiempo (días)	Temperatura (°C)			
0	10	1/100	12	42,9
10		1/100	12	24,6
48		1/10	22	0,2
124		1/10	22	1,5
201		1/20	22	9,6
236		1/20	12	0,5
306		1/20	22	9,6
0	21	1/100	12	42,9
10		1/100	12	12,3
48		1/10	22	0,9
124		1/10	22	3,1
201		1/20	22	8,2
236		1/20	22	6,8
306		1/20	22	7,4
0	37	1/100	12	42,9
10		1/50	12	8,1
48		1/10	22	1,1
124		1/25	12	2,6
201		1/20	22	5,3
236		1/20	22	4,6
306		1/20	22	4,8

Figura 4.4.2. Concentración de ceras en aceite de girasol determinadas por medio de la turbidimetría de luz polarizada.

Figura 4.4.3. Determinación de la concentración de ceras por le método de microscopía.

4.4.3. Determinación de la composición de ceras. CGL. Con el objetivo de estudiar no sólo la concentración de ceras sino también su composición, las muestras de los días 0, 10, 48, 124 y 236 fueron analizadas utilizando la técnica de cromatografía capilar (Nota y col., 1999; Carelli y col., 1998). Se realizaron curvas de calibración con los estándares mencionados en la sección de Materiales y Métodos sembrando distintos volúmenes de los mismos de modo de obtener diferentes cantidades de muestra dentro de la columna. Las curvas de calibración obtenidas se detallan en la Figura 4.4.4. Como puede observarse se obtuvo un comportamiento lineal entre la cantidad de estándar sembrado y la respuesta del detector.

Las ceras presentes en el aceite fueron aisladas de los triglicéridos que forman parte de la fase oleosa por medio de una columna SPE tal como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos. La primera porción de elución es la que contiene las ceras. Luego de separar las mismas de los triglicéridos, se resuspendieron en CHCl_3 y se inyectaron en el cromatógrafo gaseoso para analizar su composición junto con la adición de un estándar interno. Los resultados de estos análisis demostraron la presencia de componentes de C_{36} y C_{38} en baja proporción (menor del 10%) y una muy pequeña cantidad de C_{37} y C_{39} (1-3%) para todas las condiciones de almacenamiento ensayadas (tiempo y temperatura). Se encontró una mayor proporción de componentes de número de carbonos par, entre C_{40} - C_{48} para todas las muestras analizadas junto con cantidades significativas del componente de 41 átomos de carbono. También se observó la presencia de ésteres de alto peso molecular cuyos tiempos de retención son mayores a los de las ceras con 48 átomos de carbono (Kiosseglou y Boskou, 1990; Grob y col., 1990). La Figura 4.4.5. muestra la composición de las ceras (% C_{40} - C_{48}) de las muestras almacenadas a 10, 21 y 37 °C, respectivamente. Para las muestras de aceite obtenidas a partir de semillas almacenadas a 10 °C se observó una disminución en el porcentaje de C_{40} desde 20% a 7% a los 124 días de almacenamiento con un aumento posterior a los 236 días de almacenamiento (14%). El porcentaje de C_{41} , en cambio, mostró un máximo a los 124 días de almacenamiento con un valor de 26%, aproximadamente. Los porcentajes de C_{42} y C_{44} disminuyeron a lo largo del almacenamiento. El último disminuyó levemente

desde un 20% hasta un 8%. Por otro lado, el porcentaje de C₄₆ permaneció aproximadamente constante durante el período analizado variando entre un 15 y 20%. El porcentaje de C₄₈ sufrió un importante aumento a los 10 días de almacenamiento (de 11% para el día 0 a 30% para el día 10) y luego disminuyó en forma continua hasta alcanzar un valor de 8%, aproximadamente.

Cuando las semillas fueron almacenadas a 21 °C, el porcentaje de C₄₀ disminuyó en forma continua a lo largo del tiempo de almacenamiento. En forma equivalente a lo encontrado para las muestras almacenadas a 10 °C, el porcentaje de C₄₁ aumentó en forma importante alcanzando un valor máximo a los 124 días de almacenamiento (17%, aproximadamente). El contenido de C₄₂ presentó un importante aumento al día 10 (33%) para luego disminuir (7%). El porcentaje de C₄₄ se mantuvo aproximadamente constante a lo largo del período ensayado. En cambio, los porcentajes de C₄₆ y C₄₈ aumentaron levemente hasta alcanzar un máximo en el día 48 (26%).

A 37 °C, los porcentajes de C₄₀ y C₄₂ alcanzaron un mínimo a los 48 días de almacenamiento y luego sufrieron un importante incremento (19 y 22% para C₄₀ y C₄₂, respectivamente) permaneciendo aproximadamente constante a partir de éste tiempo de almacenamiento. El porcentaje de C₄₁ no sufrió importantes variaciones y el valor encontrado fue de aproximadamente 5%. El porcentaje de C₄₄ permanece constante durante los primeros días de almacenamiento, alcanzó un mínimo a los 124 días (11%) y luego sufrió un importante aumento a los 236 días (28%). Con respecto al porcentaje de C₄₆ y C₄₈, se produjo un aumento en el día 10 (23 y 22% para C₄₆ y C₄₈, respectivamente) y luego una disminución en el día 124 (13 y 10% para C₄₆ y C₄₈, respectivamente) manteniéndose aproximadamente en este valor para ambos casos.

Los resultados alcanzados muestran que el porcentaje de C₄₀ de las ceras de aceites de semillas almacenadas fué siempre menor o igual que el porcentaje obtenido en aceites obtenidos a partir de semillas que no fueron almacenadas. Lo mismo sucede para la mayoría de los tiempos ensayados y para las ceras de C₄₂ y C₄₄, mientras que se observó un comportamiento opuesto para las ceras de C₄₁, C₄₆ y C₄₈. También puede observarse un leve aumento en el contenido de C₄₀, C₄₂ y C₄₄ con la temperatura de almacenamiento de las semillas en especial a largos tiempos de almacenamiento; mientras que el componente de 41 átomos de

carbono sufrió una marcada disminución con la temperatura de almacenamiento de las semillas. Por otro lado, los componentes de C₄₆ y C₄₈ sufren una leve disminución con un máximo en la temperatura de almacenamiento de 21 °C.

Analizando brevemente la biosíntesis de las ceras, podemos ver que las mismas se sintetizan a partir de un *pool de cadenas carbonadas aciladas* (R-CH₂-CH₂-CO-S-CoA) las cuales se originan por adición de unidades de dos carbonos catalizada por una enlongasa específica. Dicho *pool* de cadenas carbonadas aciladas posee esqueletos de número de carbono par, y a partir de estos compuestos se originan los alcoholes y ácidos (por medio de la acción de reductasas e hidrolasas) que formarán parte de los compuestos cerosos. La formación del enlace éster está catalizada por una enzima llamada genéricamente Acil-CoA alcohol transacilasa. Durante los distintos pasos de síntesis del alcohol ceroso, existe un aldehído como producto intermediario el cual puede descarboxilarse (por la acción de una enzima descarboxilasa) y luego ser sometido a una hidroxilación por medio de una hidroxilasa específica obteniendo un alcohol secundario con un átomo de carbono menos; originando en forma transitiva un compuesto ceroso con número de carbono impar (von Wettstein-Knowles; 1994). De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar que, en general, la variación del porcentaje de ceras de 40, 42 y 44 átomos de carbono es inversamente proporcional a la variación del porcentaje de ceras de 41, 46 y 48 átomos de carbono. Por ejemplo, se puede ver un aumento del porcentaje de C₄₀, C₄₂ y C₄₄ a 37 °C, especialmente a largos tiempos de almacenamiento, junto con una disminución del porcentaje de C₄₁ a la misma temperatura acompañado por una disminución de C₄₆ y C₄₈ pero en menor proporción. La relación inversa detectada entre los diferentes compuestos cerosos podría deberse a una mayor acción de hidrolasas durante el almacenamiento, especialmente a altas temperaturas, que actuarían sobre la unión éster de las ceras produciendo los alcoholes y ácidos respectivos. Debido a que en la célula, el sistema enzimático se encuentra activo, éstos compuestos están disponibles para ser utilizados como sustratos por las respectivas enzimas encargadas de la síntesis de ceras (elongasas, reductasas, hidroxilasas, etc.) obteniendo nuevos compuestos cerosos. Teniendo en cuenta que en las semillas almacenadas no existe incorporación de materia orgánica desde el exterior de la

semilla, la síntesis de los compuestos cerosos debe realizarse sólo a expensas del *pool* generado a partir de la hidrólisis de las ceras pre-existentes.

También se observa que existe una mayor acción, especialmente a 10 y 21 °C, de las decarboxilasas e hidrolasas que conducen a la síntesis de ceras de 41 restos de carbono. La producción de ceras con largas cadenas carbonadas (C₄₄, C₄₆ y C₄₈) aparentemente requiere de menos tiempo que la correspondiente a la de moléculas con 40 y 42 átomos de carbono. Las enzimas responsables de este comportamiento son las *elongasas* y éstas se encontrarían más activas a 21 °C y luego a 37 °C.

Figura 4.4.4. Curvas de calibración de estándares de ceras de a) C_{34} , b) C_{38} , c) C_{40} , d) C_{42} y e) C_{44} .

Figura 4.4.5. Variación en la composición de C₄₀-C₄₈ de las muestras almacenadas a 10, 21, y 37 °C, respectivamente.

4.5. Conclusiones.

Como conclusión general del presente capítulo podemos decir que el tiempo y la temperatura de almacenamiento de las semillas de girasol influyen sobre la calidad del aceite obtenido. Si bien dichos parámetros no afectan la eficiencia de extracción del aceite, provocan un aumento del contenido de ceras con el incremento tanto del tiempo como de la temperatura de almacenamiento.

Ambos parámetros afectan también la composición de ceras a lo largo del tiempo de almacenamiento. Se ha detectado una variación en el porcentaje de los distintos compuestos cerosos a lo largo del periodo de almacenamiento estudiado el cual podría ser atribuido a una hidrólisis de los compuestos pre-existentes en la semilla y a una reconversión en compuestos cerosos de distinto número de átomos de carbono.

Es importante destacar que no existe incorporación de materia orgánica a la semilla durante el periodo de almacenamiento, por lo tanto, el incremento detectado en el contenido de ceras tiene que ser debido a una síntesis a partir de sustratos existentes en la célula provenientes de la degradación de las ceras pre-existentes ó de otros componentes. No debe descartarse la posibilidad de cambios a nivel de la estructura de la semilla inducidos por cambios ambientales y el tiempo de almacenamiento que modifiquen la facilidad de arrastre de las ceras al aceite. También podría existir un efecto combinado de ambos mecanismos. Sin embargo, queda claro la permanencia en la semilla de sistemas enzimáticos activos que, dependiendo de las condiciones de almacenamiento, pueden afectar en mayor o menor medida la composición de los componentes cerosos. Sin duda, estas modificaciones pueden afectar la calidad del aceite que se extrae; un mayor contenido de componentes de mayor número de carbono se traduciría en una mayor turbidez lo que requeriría cambios en las condiciones de cristalización durante el proceso de refinación. Como conclusión podemos decir que temperaturas de almacenamiento inferiores a temperatura ambiente serían las más apropiadas.

Capítulo 5

Conclusiones Generales

Capítulo 5: Conclusiones Generales

El presente trabajo de tesis surgió como respuesta a la necesidad de la industria aceitera de resolver la problemática existente sobre la determinación de ceras en aceites refinados. La falta de metodología para determinar la concentración de ceras, especialmente en este tipo de aceites, se intensifica por el desconocimiento de aspectos básicos relacionados con los procesos involucrados en la refinación de aceites, en particular el proceso de cristalización. Teniendo en cuenta estos aspectos se desarrolló el presente trabajo de tesis en el que se obtuvieron los siguientes resultados:

❄ Se desarrolló un método capaz de detectar y cuantificar trazas de ceras presentes en aceites de girasol, las cuales son responsables (entre otros compuestos) de la turbidez que presentan los aceites crudos, semi-refinados y refinados. Dicho método consiste en una turbidimetría de alta resolución que posee un láser como fuente de luz. La luz emergente se polariza, pasa a través de la muestra y luego atraviesa dos analizadores colocados en posición de Cross-Nicols permitiendo de este modo la detección de sustancias birrefringentes (sustancias capaces de refractar un solo haz incidente en dos haces de direcciones diferentes). Las ceras en estado cristalino poseen esta característica y por lo tanto pueden ser determinadas utilizando esta técnica. El método desarrollado se basó en la inducción de la cristalización en forma isotérmica de las ceras presentes en el aceite y se optimizó para determinar la concentración de ceras en aceites refinados (contenidos de ceras menores a 100 ppm) y en aceites semi-refinados y crudos (100-1000 ppm).

❄ Una vez desarrollado el método turbidimétrico, se demostró que el mismo es comparable con los previamente utilizados para determinar el contenido de ceras en aceites (test del frío, turbidimetría convencional y microscopía de luz polarizada). Se compararon las diferencias y similitudes entre los distintos métodos existentes. Si bien los métodos utilizados en la industria aceitera no son

totalmente comparables, ellos se complementan entre sí. Por ejemplo, el *test del frío* es un muy buen método para determinar turbidez en aceites refinados pero posee la desventaja de ser un método cualitativo. Por otro lado, se necesita de un operador altamente entrenado para realizar las determinaciones ya que la detección visual de la turbidez es muy subjetiva y depende significativamente del umbral visual de cada operador. El *método turbidimétrico tradicional* puede ser de gran utilidad para la determinación de concentración de ceras en aceites semi-refinados (100-300 ppm). Su utilización en aceites crudos resulta engorrosa debido a que las mediciones no son suficientemente repetitivas. La dispersión encontrada en éstos casos se debe a la presencia de grandes cantidades de sedimento. Este forma una nube que decanta en la celda turbidimétrica a lo largo de la medición generando variaciones en la medida. Este problema se puede solucionar estandarizando cuidadosamente el tiempo de medida. También es necesario estandarizar las condiciones de enfriamiento de la muestra ya que tanto una variación en la velocidad de enfriamiento como en la temperatura de cristalización causará errores por exceso o por defecto. En cuanto al *método microscópico* desarrollado con anterioridad en nuestro laboratorio, podemos decir que los datos obtenidos son repetitivos cuando la concentración de ceras oscila entre 100-1500 ppm (aceites semi-refinados y crudos). A pesar de que esta técnica también requiere de un operador entrenado, la ventaja frente al *test del frío* es que permite cuantificar las ceras presentes en el aceite responsables de su turbidez. Como puede verse, ninguno de los métodos descritos es capaz de detectar cantidades de ceras menores a 100 ppm. Las ventajas más importantes del método desarrollado en este trabajo:

- es capaz de detectar valores de ceras tan bajos como 10 ppm cubriendo la necesidad de la industria de poseer un método para cuantificar concentraciones de ceras en aceites refinados lo que permite asegurar un producto final de alta calidad para ser liberado al mercado tanto nacional como internacional.
- no necesita un operador altamente entrenado para su funcionamiento y la correcta interpretación de los resultados
- es totalmente objetivo, ya que la detección es realizada por un fotodiodo y no existe subjetividad del operador

- no necesita otras materias primas más que el aceite cuya determinación se desea realizar, convirtiéndolo en un método altamente económico para ser aplicado en el ensayo de rutina de un laboratorio de control de calidad.

✿ Se estudiaron los factores que afectan el proceso de cristalización isotérmica en sistemas en solución y sistemas fundidos. En el primer caso, se emplearon soluciones de ceras en aceite de girasol, y en el segundo mezclas de grasa de leche y aceite de girasol.

- Soluciones de ceras en aceite de girasol:

- Se estudió el proceso de nucleación de las ceras y se determinaron los parámetros que lo caracterizan (energías de activación y sobre-saturación) y su variación con la temperatura de cristalización elegida. Para ello se utilizó el turbidímetro de alta resolución para determinar los tiempos de inducción de soluciones con distintas concentraciones de ceras. Se determinó que la energía de activación de este sistema, y por lo tanto su velocidad de nucleación, está influenciada tanto por la temperatura de cristalización a la cual se somete la muestra como por la sobre-saturación del sistema (relación entre la concentración de ceras en el aceite y en el equilibrio).
- Se analizó además el comportamiento térmico de éstas soluciones cristalizadas bajo diferentes condiciones de proceso (concentración, velocidad de enfriamiento y temperatura de cristalización). Estos factores generaron distintos comportamientos térmicos de las soluciones de ceras reflejados tanto en los valores de entalpías como en los perfiles de las endotermas encontradas. Para altas fuerzas impulsoras, se favoreció la formación de soluciones sólidas de comportamiento térmico característico (observación de un solo pico en la endoterma de fusión). A medida que la fuerza impulsora disminuye, debido a una disminución en la concentración de ceras y a un aumento de la temperatura de cristalización, se evidencia la presencia de los distintos componentes que forman parte del sistema lipídico complejo debido a un fraccionamiento parcial o total de los cristales obtenidos.
- Se estudió también la morfología de los cristales de ceras obtenidos. Se observó que no existen diferencias significativas en la morfología cuando el

proceso de cristalización se realiza a diferentes temperaturas para una misma concentración de ceras. En todos los casos se observaron cristales en forma de agujas poco definidas formando agregados. Se detectaron diferentes morfologías cuando se utilizaron soluciones de ceras de distinta concentración y se cristalizaron a una misma temperatura. A medida que disminuye la concentración de ceras, los cristales poseían morfología más definida observándose estructuras en forma de bastones sin la formación de aglomerados. Los cristales obtenidos a partir de muestras cristalizadas a velocidades de enfriamiento lentas poseían una morfología menos definida y mayor cantidad de material aglomerado que los correspondientes a una velocidad de enfriamiento rápida.

-Mezcla de grasa de leche/aceite de girasol:

- En el caso de las muestras cristalizadas a partir de un fundido, se estudiaron la velocidad de enfriamiento y el sobre-enfriamiento del sistema, el cual está dado por la diferencia entre la temperatura de cristalización y el punto de fusión de cada una de las muestras. Análogamente a lo realizado con las ceras en solución, se determinaron los tiempos de inducción de estos sistemas lipídicos y las energías de activación correspondientes. Se detectó que los tiempos de inducción obtenidos dependen no sólo de la composición de la muestra sino también de la velocidad de enfriamiento del sistema y de la temperatura de cristalización. Se observó una importante dependencia de las energías de activación con la temperatura de cristalización (sobre-enfriamiento).
- Se estudió además el comportamiento térmico de las muestras de grasa de leche en aceite de girasol cristalizadas bajo diferentes condiciones de proceso (velocidad de enfriamiento y temperatura de cristalización). Análogamente a lo observado para el sistema de soluciones de ceras, cuando la fuerza impulsora fue alta, se favoreció la formación de soluciones sólidas de comportamiento térmico característico (una sola endoterma de fusión en los diagramas de DSC). A medida que la fuerza impulsora disminuye, debido a una disminución en la temperatura de cristalización o a un cambio en la composición del sistema (cambio en la temperatura de fusión de las muestras), se evidenció la

presencia de los distintos componentes que forman parte del sistema debido a un fraccionamiento parcial o total de los cristales.

- Se observaron diferencias significativas en las morfologías de los cristales obtenidos a partir de estas mezclas. En todos los casos la morfología obtenida fue de forma de esferulitas. Para velocidades de enfriamiento lenta y rápida, a medida que aumentó el contenido de aceite de girasol en la mezcla se observaron cristales de mayor tamaño pero con menor cantidad de material sólido depositado (esferulitas incompletas). Para el mismo sobre-enfriamiento, las muestras cristalizadas a velocidad de enfriamiento lenta contenían cristales mayores y mas densos. El estudio de las transiciones térmicas de los cristales y de su morfología es importante desde el punto de vista tecnológico ya que estos influyen en las propiedades macroscópicas del producto final y complementan la comprensión de los fenómenos moleculares que ocurren a nivel microscópico.

✿ Se estudió la influencia del tiempo y la temperatura de almacenamiento de las semillas de girasol sobre las características de los aceites extraídos a partir de ellas (contenido y tipo de ceras, contenido de aceite, etc.). La cantidad de aceite obtenido fue constante para todas las condiciones ensayadas, mientras que la concentración de sedimento, aumentó a lo largo del tiempo de almacenamiento. Se observó una variación significativa en la composición de las ceras que forman parte del sedimento en el aceite crudo debido a la interconversión de los ácidos grasos y alcoholes que forman parte de ellas.

Como conclusión general podemos decir que existen distintos métodos para determinar la concentración de ceras en aceites vegetales y que cada uno de ellos posee ventajas y desventajas. Para poder aplicar cada uno de estos métodos es necesario conocer las leyes básicas que los rigen y como se comporta el sistema en estudio frente a las distintas variables de proceso. Teniendo en cuenta estas consideraciones se pueden obtener resultados confiables, que brindan una importante y valiosa información combinando los distintos métodos que se encuentran disponibles. Hemos visto además, que el proceso de cristalización de

los sistemas lipídicos estudiados en este trabajo es afectado por diferentes parámetros como la temperatura de cristalización, sobre-saturación del sistema, sobre-enfriamiento y velocidad de enfriamiento. La variación de cada uno de éstos parámetros genera diferencias significativas en el comportamiento térmico y morfología de los cristales obtenidos. Por este motivo es de gran importancia conocer y controlar estas variables para poder lograr la calidad del producto final deseada.

Silvana Martini

2003

Bibliografia

Bibliografía

- Abou-Gharbia, H.A., Shahidi, F., Shehata, A.A.Y. y Youssef, M.M., "Effect of Processing on Oxidative Stability of Sesame Oil Extracted from Intact and Dehulled Seeds", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74:215-221 (1997).
- Afzalpukar, A.B. y Lakshminarayana, G., "Variations in Oil Content and Fatty Acid Composition with Sunflower Head Size and Shape", *Ibid.*, 57:105-106 (1980).
- Agüero, M.E., Pereyra, V.R., Aguirrezábal, L.A.N. y Lúquez, J., "Rendimiento de grano y porcentaje de aceite de híbridos de girasol "alto oleico" cultivados en Argentina", *Agriscientia*, XVI:49-53 (1999).
- Agüero, M.E., Lúquez, J., Pereyra, V.R. y Aguirrezábal, L.A.N., "Stability of High Oleic Sunflower Hybrids for Grain Yield and Oil and Oleic Acid Contents in the Sunflower Sowing Region in Argentina", *15th International Sunflower Conference*, Toulouse, Francia, A85-88 (2000).
- Aguirrezabal, L.A.N. y Pereyra, V.R., "Porcentaje de Aceite" en *Calidad de productos agrícolas. Bases ecofisiológicas, genéticas y de manejo agronómico*, Editores: Aguirrezábal, L.A.N. y Andrade, F. H., Balcarce, Editorial Unidad Integrada, pp. 140-185 (1998).
- Alfa-Laval, Tumba, *Bullitin Sales Information*, 30670E
- Andrade, F.H., Aguirrezábal, L.A.N. y Rizzalli, R.H., "Crecimiento y rendimiento comparados", en *Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja*, Editores: Andrade, F.H. y Sadras, V.O., EEA Balcarce-Fac. de Cs. Arg., UNMP, pp. 61-88 (2000).
- AOCS. Métodos Oficiales. Cold Test. Cc 11-53.
- AOCS. Métodos Oficiales. Acid Value. Te 2a-64.
- AOCS. Métodos Oficiales. Mettler Dropping Point. Cc 18-80.
- Bianchi, G., "Plant Waxes" en *Waxes: Chemistry Molecular Biology and Functions*, Editor: Hamilton, R.J., The Oily Press pp. 175-222 (1994).
- Bennema, P., Hollander, F.F.A., Boerrigter, S.X.M., Grimbergen, R.F.P., van de Streek, J. y Meekes, H., "Morphological Connected Net-Roughening Transition

- Theory” en *Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems* por Gardi, N. y Sato, K. Marcel Dekker, New York (2001).
- Bloch, S., “Distintas alternativas para refinación y descerado del aceite de girasol”, *Aceites y Grasas*, Marzo, pag. 53-66 (1998).
 - Boistelle, R., “Fundamentals of Nucleation and Crystal Growth” en *Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids* por Gardi, N. y Sato, K., Marcel Dekker, Inc., New York (1988).
 - Bolsa de Cereales de Buenos Aires (1985).
 - Botha, I. y Mailer, R.J., “Evaluation of Cold-Test Methods for Screening Cloudy Canola Oils”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78:395-399 (2001).
 - Bott, T.R., “Fundamentals of Carbon Dioxide in Solvent Extraction” *Chem. Ind.*, 6:394-396 (1982).
 - Breitschuh, B. y Windhab, E.J., “Parameter Influencing Co-crystallization and Polymorphism in Milk Fat”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75:897-904 (1998).
 - Brevedan, M.I.V., Carelli, A.A. y Crapiste, G.H., “Changes in Composition and Quality of Sunflower Oils During Extraction and Degumming”, *Grasas y Aceites*, 51:417-423 (2000).
 - Brimberg, U.I. y Wretensjo, I.C., “Rapid Method for Determination of Wax in Sunflowerseed Oils”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56:857-860 (1979).
 - Brueske, G.D., “Sunflower Seed Processing”. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 57:123A (1980).
 - Bulley, N.R., Fattori, M., Neisen, A. y Moys, L., “Supercritical Fluid Extraction of Vegetable Oil Seeds”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61:1362-1365 (1984).
 - Cancalon, P., “Chemical Composition of Sunflower Seed Hulls”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 48:629-632 (1971).
 - Carelli, A.A., Forbito P.R., Bodnariuk P. y Crapiste G.H., “Análisis Cuantitativo de Ceras en Aceite de Girasol”, *Aceites & Grasas*, 30:103-111 (1998).
 - Carelli, A.A., Frizzera, L.M., Forbito, P.R. y Crapiste, G.H., “Wax Composition of Sunflower Seed Oils”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79:763-768 (2002).
 - Carr, R.A., “Cosecha, Almacenaje y Transporte de Semillas Oleaginosas”, *Ibid.*, 373-388 (1997).

- Caupiel, J.E., "Emploi du Laser pour Mesurer la Limpidité des Huiles", *Rev. Franc. Corps Gras.*, 22:427-431 (1977).
- Chapman, G.W., "A Conversion Factor to Determine Phospholipid Content in Soybean and Sunflower Crude Oils", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 57:299-302 (1980).
- Chong, C.L. y Sato, K., "Kinetic Study of Palm Oil Crystallization", *Inform.*, (1993).
- Clark, S.P., Wan, P.J. y Matlock, S.W., "Pilot Plant Production of Sunflower Seed Flour", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 57:275^a-279A (1980).
- Dedio, W., "Effects of Seeding and Harvesting Dates on Yield and Oil Quality of Sunflower Cultivars", *Canadian J. Plant Sci.*, 65(2):299-305 (1985).
- De Filippi, R.P., "CO₂ as a Solvent: Application to Fats , Oils and other Materials", *Chem. Ind.*, 6:390-394 (1982).
- De la Vega, A.J. y Chapman, S.C., "Spatial and Seasonal Effects Confounding Interpretation of Sunflower Yields in Argentina", *Field Crops Research* 73:107-120 (2002).
- Dremer, M.L., Roath, W.W., Holm, E.T. y D'Appolonia, B., "Yield, Characteristics and Composition of Oil-Type Hybrid Sunflower Seed Grown in North Dakota", *J. Am Oil Chem. Soc.*, 60:1876-1877 (1983).
- Durdev, S., Perdihi, A. y Turkulov, J., *Hranai ishrana*, 23:245 (1982)
- Earle, F.R., Vanetten, C.M., Clark, T.F. y Wolff, J.A., "Compositional Data on Sunflower Seed" *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45:876-879 (1968).
- Ebeler, S.E. y J.D. Ebeler, "SPE Methodologies for the Separation of Lipids", *Inform.*, 7:1094-1103 (1996).
- EES, "Isolamento delle Cere negli Oli de Oliva mediante Cromatografia su Colonna: Nota all'allegato IV del Regolamento CEE 2568/91 (1993).
- ESCS, "Fats and Oil Situation", Fos 208, USDA Washington DC (1980).
- Fahn, A., *Anatomía Vegetal*, H Blume Ediciones, Cap. 21, pag. 15 (1965).
- Ferrari, R. A., Esteves, W., Mukherjee, K.D. y Schulte, E., "Alterations of Sterols and Steryl Esters in Vegetable Oils During Industrial Refining", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73:587-592 (1996).

- Ferrari, R. A., Schulte, E., Esteves, W., Brühl, L. y Mukherjee, K.D., "Minor Constituents of Vegetable Oils During Industrial Processing", *J. Agric. Food Chem.*, 45:4753-4757 (1997).
- Fetzer, W. y Hostettler, J.A., "Sunflower Dehulling Today", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 57:123A (1980).
- Fick, G.N., "Genetics and Breeding of Sunflower", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60:1252-1255 (1983).
- Flider, F.J. y Orthoefer, F.T., "Metals in Soybean Oil", *Ibid.*, 58:270-272 (1981).
- Ghanavati, N.A., Nahavandi, E. y Ghaderi, A., "Breeding Sunflower for Semi-Arid Regions", *J. Agric. Sci.*, 2:447-450 (1981).
- Givon, V. y Tirtiaux, A., "Revisión de los Distintos Métodos para la Eliminación de Gomas y Ceras", *Aceites y Grasas*, Septiembre, pag. 381-390 (2000).
- Gomes, T. y Caponio, F., "Evaluation of the State of Oxidation of Olive-Pomace Oils. Influence of the Refining Process", *J. Agric. Food Chem.*, 46:1137-1142 (1998).
- Gracian, J. y Arevalo, G., "Composition of Waxes in Sunflower Oil" *Grasas y Aceites*, 32:1-5 (1981).
- Grob, K. y Lanfranchi, M., "Reproducibility of Results from LC-GC of Sterols and Wax Esters in Olive Oils", *J. of High Resolution Chromatography*, 12:624-626 (1989).
- Grob, K., Lanfranchi, M. y Mariani, C., "Determination of Free and Esterified Sterols and of Wax Esters in Oils and Fats by Coupled Liquid Chromatography-Gas Chromatography", *J. of Chromatography*, 471:397-405 (1989).
- Grob, K., Lanfranchi, M. y Mariani, C., "Evaluation of Olive Oils Through the Fatty Alcohols, the Sterols and their Esters by Coupled LC-GC", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67:626-634 (1990).
- Gunstone, F.D. y Norris, F.A., "Recovery of Fats and Oils from their Sources" en *Lipids in Foods. Chemistry, Biochemistry and Technology*. Pergamon Press, Oxford, England (1983).

- Hartel, R.W., "Nucleation" in *Crystallization in Foods*, by Hartel, R.W., Aspen Publication, Maryland (2001).
- Hénon, G., Recseg, K. y Kovari, K., "Wax Analysis of Vegetable Oils Using Liquid Chromatography on a Double-Adsorbent Layer of Silica Gel and Silver Nitrate-Impregnated Silica Gel", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78:401-410 (2001).
- Hernández, L.F. y Orioli, G.A., "El ideotipo del girasol (*Helianthus annuus* L.)", *Agriscientia*, XI:87-98 (1994).
- Hernández, L.F., "Morphogénesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.) as affected by exogenous application of plant growth regulators", *Ibid.*, XIII:3-11 (1996).
- Herrera, M.L., "Crystallization Behavior of Hydrogenated Sunflower Oil: Kinetics and Polymorphism", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71:1255-1260 (1994).
- Herrera, M.L., Falabella, C., Melgarejo, M y Añón, M.C., "Isothermal Crystallization of Hydrogenated Sunflower Oil: I-Nucleation", *Ibid.*, 75:1273-1280 (1998).
- Holt, N.W. y Campbell, S.J., "Effect of Plant Density on the Agronomic Performance of Sunflower on Dryland", *Canadian J. Plant Sci.*, 64(3):599-605 (1984).
- Hopia, A., "Analysis of High Molecular Weight Auto-oxidation Products using High Performance Size Exclusion Chromatography: II. Changes during Processing", *Lebensm. Wiss u Technol.*, 26:568-571 (1993).
- INDEC, Encuesta Nacional Agropecuaria (2000).
- IRAM 5597-1970
- Jacobos, W.F., *Actas XI Conferencia Internacional de Girasol*, Mar del Plata, Argentina, Vol II, pag. 835 (1985).
- Kamal-Eldin, A. y Appelqvist, L., "The Effects of Extraction Methods on Sesame Oil Stability", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72:967-969 (1995).
- Kehse, W., "Wintérisation de l'huile de tournesol", *Rev. Franc. Corps Grass*, 27:567-570 (1980).

- Kehse, W., "Wintérization de l'huile de tournesol", *Rev. Franc. Corps Grass*, 27:567-570 (1980).
- Keszler, A. Kriska, T. y Németh, A., "Mechanism of Volatile Compound Production during Storage of Sunflower Oil", *J. Agric. Food Chem.*, 48:5981-5985 (2000).
- Kinman, M.L. y Earle, F.R., "Agronomic performance and chemical composition of the seed of sunflower hybrids and introduced varieties", *Crop. Sci.*; 4:417 (1964).
- Kinman, M.L., "Breeding for Lipid and Amino Acid Composition in Sunflower", *J. Am Oil Chem. Soc.*, 49:36-37 (1972).
- Kiosseoglow, V. y Boskou, D., "Separation and Fatty Acid Composition of Steryl and Wax Esters in Hexane Extracts of Sunflower Seed, Soybeans and Tomato Seeds", *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 23:340-342 (1990).
- Kiritsakis, A.K., "Packaging and Bottling of Olive Oil" en *Olive Oil*, Food & Nutrition Press, Turnbull, Connecticut, pp. 217-220 (1998).
- Kleiman, R., Earle, F.R., Wolff, I.A., "Wax Esters from Sunflower oil Tank Settlings", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46:505-506 (1969).
- Lajara, J.R., Diaz, U. y Diaz Quindiello, R., "Definite Influence of Location and Climatic Conditions on the Fatty Acid Composition of Sunflower Seed Oil", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67:618-623 (1990).
- Lange, D.A., Hanson, M.C. y Kriva, K.L., United States Patent, US 4436757 (1984).
- Lee, A.K.K., Bulley, N.R., Fattori, M. y Neisen, A., "Modelling of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Canola Oilseed in Fixed Beds", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63:921-925 (1986).
- Leibovitz, Z. Y Ruckenstein, C., "New processes in degumming, bleaching, deacidification-deodorization and winterizing of edible oils", *Revue Francaise des Corps Gras*, 28:303-308 (1981).
- Liu, H., Billiaderis, C.G., Przybylski, R. y Eskin, N.A.M., "Effects of Crystallization Conditions on Sedimentation in Canola Oil", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71: 409-415 (1994).

- Liu, H., Przybylski, R., Dawson, K., Eskin, N.A.M. y Billiaderis, C.G., "Comparison of the Composition and Properties of Canola and Sunflower oil Sediments with Canola Seed Hull Lipids", *Ibid.* 73:493-498 (1996).
- Lopez-Andreu, F.J., Molina, J.M. y Carpena, O., "Comparative Study on the Seed Oil Quality of three Spanish Sunflower Varieties", *Grasas y Aceites*, 33:150-153 (1982).
- López Pereira, M., Sadrás, V.O. y Trápani, N., "Physiological Traits Associated with Sunflower Yield Potential: Future Oportunities", *15th International Sunflower Conference*, Toulouse, Francia, E82-87 (2000).
- Lund, P., "Butterfat triglycerides", *Milchwissenschaft*, 43:159-161 (1988).
- Marangoni, A.G. y Roussau, D., "Is Plastic Fat Rheology Goverend by the Fractal Nature of the Fat Crystal Network?", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73:31-36 (1996).
- Mariani, C. y Fedeli, E., "Minor Components of Vegetable Oils: Non-glyceric esters", *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 66:397-401 (1989).
- Merrien, A., "Conociendo al Girasol", *Aceites y Grasas*, Marzo, pag. 75-80 (1998).
- Morrison III, W.H. y Robertson, J.A., "Solvent Winterization of Sunflower Seed Oil", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52:148-150 (1975).
- Morrison III, W.H. y Thomas, J.K., "Removal of Waxes from Sunflower Seed Oil by Miscella Refining and Winterization", *Ibid.*, 53:485-486 (1976).
- Morrison III, W.H., "Sunflower Lecithin", *Ibid.*, 58:902-903 (1981).
- Morrison III, W.H., Akin, D.E. y Robertson, J.A., "Open Pollinated and Hybrid Sunflower Seed Structures that May Affect Processing of Oil", *Ibid.*, 58:969-972 (1981).
- Morrison III, W.H., "Rapid Determination of Wax in Sunflower Seed Oil", *Ibid.*, 59:284-285 (1982a).
- Morrison III, W.H., "A Rapid, Effective Method for the Reduction of Waxes in Sunflower Seed Oil", *Ibid.*, 59:519-520 (1982b).
- Morrison III, W.H., "Variation in the Wax Content of Sunflower Seed with Location and Hybrid", *Ibid.*, 60:1013-1014 (1983).

- Moulton Sr., K.J., "Turbidimetric Measurement of Wax in Sunflower Oil", *Ibid.*, 65:367-368 (1988).
- Muñoz, R., "Girasol 1997/1998", *Panorama Agrario Mundial. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria* (Buenos Aires, Argentina) 21 (199) 3-10 (1997).
- Nawar, W.W., "Lipids" en *Food Chemistry* (O.R. Fennema, ed.) pp. 299, Marcel Dekker, New York (1996).
- Neumunz, G.M., "Sunflower Seed Dehulling Systems", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 57:124A (1980).
- Ng, W.L., "A Study of the Kinetics of Nucleation in Palm Oil Melt", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67:879-882 (1990).
- Nolasco, S.M., Dosio, G.A.A., Riccobene, I.C., Santalla, E.M. y Aguirrezábal, L.A.N., "Relationship Between Seed Oil Percentage and Kernel Oil Percentage & Kernel Percentage (w/w) as Affected by Plant Density & Solar Radiation Intercepted During Grain Filling in Sunflower", *15th International Sunflower Conference*, Toulouse, Francia; D19-14 (2000).
- Nota, G. D. Naviglio, R. Romano, V. Sabia, S. Spagna Musso y C. Improta, "Determination of the Wax Ester Content in Olive Oils. Improvement in the Method Proposed by EEC Regulation 183/93", *J. Agric. Food Chem.*, 47:202-205 (1999).
- Nozaki, K. y Hikosaka, M., "Nucleation and Growth in the Solid-Solid Phase Transitions of n-Alkanes", en *Crystallization Processes in Fats and Lipid Systems* por Gardi, N. y Sato, K. Marcel Dekker, New York (2001).
- Pan, L.G., Campana, A., Tomás, M.C. y Añón, M.C., "A Kinetic Study of Phospholipid Extraction by Degumming Process in Sunflower Seed Oil", *Ibid.*, 77:1273-1276 (2000).
- Pan, L.G., Noli, A., Campana, A., Barrera, M., Tomás, M.C. y Añón, M.C., "Influence of the Operating Conditions on Acid Degumming Process in Sunflower Seed Oil", *Ibid.*, 78:553-554 (2001).
- Patience, D.B., Hartel, R.W. y Illingworth, D., "Crystallization and Pressure Filtration of Anhydrous Milk Fat: Mixing Effects", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76:585-594 (1999).

- Perez-Camino, M.C., Ruiz-Mendez, M.V., Márquez-Ruiz, G. y Dobarganes, M.C., "Aceites de Oliva Virgenes y Refinados: Diferencias en Componentes Menores Glicerídicos", *Grasas y Aceites*; 44:91-96 (1993).
- Petruccelli, S. y Añón, M.C., "Crystallization of Waxes in Sunflowerseed Oil: Effect of an Inhibitor", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68:684-686 (1991).
- Przyblski, R., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M., "Formation and Partial Characterization of Canola Oil Sediment", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70:1009-1015 (1993).
- Purdy, R.W., "High Oleic Sunflower: Physical and Chemical Characteristics", *Ibid.*, 63:1062-1066 (1986).
- Putt, E.D., Craig, B.N. y Carson, R.M., "Variation in Composition of Sunflower Oil From Composite Samples and Single Seeds of Varieties and Inbred Lines", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46:126-129 (1969).
- Rade, D., Strucelj, D. y Mokrovac, Z., "Effect of Soybean Pretreatment on the Phospholipid Content in Crude and Degummed Oils", *Fat Sci. Technol.*, 97:501-507 (1995).
- Ramírez, G., Hough, G. y Contarini, A., "Influence of Temperature and Light Exposure on Sensory Shelf-Life of a Commercial Sunflower Oil", *J. of Food Quality*, 24:195-204 (2001).
- Ramos Ayerbe, F. y Rodríguez Berbel, F., "Estudio sobre la recuperación de los subproductos procedentes del descerado de los aceites de girasol de producción nacional", *Grasas y Aceites*, 36:1-4 (1985).
- Reiter, B. y Lorbeer, E., "Analysis of the Wax Ester Fraction of Olive Oil and Sunflower Oil by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78:881-888 (2001).
- Rivarola, G., Añón, M.C. y Calvelo, A., "Crystallization of Waxes During Sunflowerseed Oil Refining", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62:1508-1513 (1985).
- Rivarola, G., Añón, M.C. y Calvelo, A., "Influence of Phospholipids on the Crystallization of Waxes in Sunflowerseed Oil", *Ibid.*, 65:1771-1773 (1988).
- Rizvi, S.S.H., Benado, A.L., Zollweg, J.A. y Daniels, J.A., "Supercritical Fluid Extraction: Fundamental Principles and Modeling Methods", *Food Technology*, 40:55-65 (1986).

- Robertson, J.A., "Use of Sunflower Seed in Food Products", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 6:201-240 (1975).
- Roos, Y.H., "Food Components and Polymers" en *Phase Transitions in Foods* por Roos, Y.H., Academic Press Limited, London, UK (1995).
- Ruiz-Mendez, M.V., Márquez-Ruiz, G. y Dobarganes, M.C., "Relationships Between Quality of Crude and Refined Edible Oils Based on Quantitation of Minor Glyceridic Compuonds", *Food Chemistry*; 60:549-554 (1997).
- Ruckenstein, C., "Modern processing of crude sunflower oil", *Revue Francaise des Corps Gras*, 28:161-164 (1981).
- Santalla, E., Riccobene, I. y Nolasco, S., "Composición de Semillas de Girasol Cultivadas en Argentina" *Grasas y Aceites*; 44:175-178 (1993).
- Sato, K., "Crystallization of Fats and Fatty Acids" en *Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids*, Gardi, N. y Sato, K., Marcell Deckker: NY pp: 254-259 (1988).
- Saumell, M., *Girasol: Técnicas Actualizadas para su Mejoramiento y Cultivo*, Editorial Hemisferio Sur S.A., Cap. II, pag. 41 (1980).
- Schwitzer, M.K., *Margarine and other Food Fats*, Leonard Hill Limited, London (1951).
- Sessa, D.J., Nelsen, T. C., Kleimen, R. y Arquette, J.D., "Diferencial Scanning Calorimetry Index for Estimating Level of Saturation in Transesterified Wax Esters", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73:271-273 (1996).
- Smouse, T.H., "Factors Affecting Oil Quality and Stability" en *Methods to Asses Quality and Stability of Oils and Fat-containing Foods*; p. 17-36; K. Warner y N.A.M. Eskin (Eds.). AOCS Press, Champaign (1995).
- Stahl, E., Schutz, E. y Mangold, H.K., "Extraction of Seed Oils with Liquid and Supercritical Carbon Dioxide", *J. Agric. Food Chem.*, 28:1153-1157 (1980).
- Strasburger, E.; Noll, F.; Schenck, H. y Schimper, A.F.W., "Tratado de Botánica" 8ª Edición castellana, Ediciones Omega, S.A., Barcelona, (1994).
- Strickland-Constable, R.F., "Nucleation of Solids", en *Kinetics and Mechanism of Crystallization*, Academic Press: London, U.K., pag. 74-129 (1968).

- Sullivan, F.B., “Sunflower Oil Processing from Crude to Salad Oil”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 57:845A-847A (1980).
- Tranchino, L., Melle, F. y Sodini, G., “Almost Complete Dehulling of High Oil Sunflower Seed”, *Ibid.*, 61:1261-1265 (1984).
- Tubaileh, R.M., Garrido-Fernández, A., Ruiz.Méndez, M.V., León-Camacho, M. y Graciani-Constante E., *Ibid.*, 79:101-104 (2002).
- Turkulov, J., Dimic, E., Karlovic, Dj. y Vuksa, V., “The Effect of Temperature and Wax Content on the Appearance of Turbidity in Sunflowerseed Oil”, *Ibid.*, 63:1360-1363 (1986).
- Unger, P.W., “Planting Date Effects on Growth, Yield and Oil of Irrigated Sunflower”, *Agronomy Journal*, 72:914-916 (1980).
- von Wettstein-Knowles, P., “Biosynthesis and Genetics of Waxes” en *Waxes: Chemistry Molecular Biology and Functions*, Editor: Hamilton, R.J., The Oily Press pp. 91-129 (1994).
- Wan, P.J., “Accelerated Stability Methods”, en *Methods to Assess Quality and Stability of Oils and Fat-Containing Foods* (K.Warner y M.Eskin, eds.) pp. 184, AOCS Press, Champaign, Illinois (1995).
- Wendlant, W.W. y Gallagher, P.K., “Instrumentation” en *Thermal Characterization of Polymeric Materials* por Turi, E. Academic Press, Inc. Florida (1981).
- Wiedermann, L.M., “Degumming, Refining and Bleaching Soybean Oil”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58:159-166 (1981).
- Wright A.J., Narine, S.S. y Marangoni, A.G., “Comparison of Experimental Techniques used in Lipid Crystallization Studies”, *Ibid.*, 77:1239-1242 (2000).
- Wundelich, B., “The basis of Thermal Analysis”, en *Thermal Characterization of Polymeric Materials*, por Turi, E., Academic Press, Inc. Florida (1981).
- Xiaojun, HU, Daun, J.K., Scarth, R., “Characterization of Wax Sediments in Refined Canola Oils”, *Ibid.*, 70:535-537 (1993).
- Young, V., *Fats and Oils*, editado por R.J. Hamilton y A. Bhati, Applied Science Publishers L.T.D., Cap.7 pag. 136 y 149 (1980).