



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Estudio de los efectos de modificadores  
del comportamiento reológico y del estado sólido  
en chocolate y sus ingredientes.**

**Tesis de la Facultad de Ciencias Químicas  
de la Universidad Católica de Córdoba  
conforme a los requisitos para obtener el título de  
Doctor en Bioquímica**

**Marcelo Ramón Ceballos**

**Córdoba – Argentina  
2016**

Director: Prof. Dr. Ismael D. Bianco

Co – Directora: Prof. Dra. Silvia L. Cuffini

Comisión de Seguimiento:

Prof. Dra. Valeria Amé

Prof. Dra. Cecilia Carpinella

Prof. Dr. Marcelo Rosmini

Comisión Evaluadora:

Prof. Dra. Valeria Amé

Prof. Dra. Cecilia Carpinella

Prof. Dr. Guillermo Montich



*A Zulma y Arturo, mis viejos*  
*A Dani, Ale, Joji, Fabi y Nati, mis hermanos*  
*A Laura, mi compañera*

## AGRADECIMIENTOS

A Ismael Bianco, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo; por su pasión y desinterés al transmitirme su conocimiento y sus ideas; por su confianza y amistad. Pero por sobre todas las cosas, por estar *siempre*.

A Silvia Cuffini, por haber creído en mí.

A las autoridades de la Universidad Católica de Córdoba, especialmente a la Dra. Sara Palacios, por la aceptación de este trabajo y su buena predisposición permanente. A Celia González, por su atención y paciencia en la resolución de los aspectos administrativos.

A los integrantes de las Comisiones de Seguimiento y de Evaluación, Dres. Valeria Amé, Cecilia Carpinella, Guillermo Montich y Marcelo Rosmini, por las observaciones y correcciones que aportaron a este trabajo.

Al personal de la empresa Arcor; Walter Stark, Marcelo Salcedo, Darío Argüello, Fabián Rencini, Rubén Picón, Gabriel Tognetti y María Eugenia Gioino, quienes facilitaron las muestras de chocolate y otros materiales, pero por sobre todo siempre aportaron ideas y experiencia desinteresadamente.

Al Dr. César Gómez, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC, por facilitarme el uso del reómetro.

A las autoridades del CEPROCOR, Dr. Pablo Rodríguez y Lic. Carlos Debandi; quienes, cada uno en su momento, facilitaron las condiciones para que esta tesis pudiera realizarse.

A Dante Beltramo y Toti, por permitirme desarrollar mis actividades en el Laboratorio de Biotecnología, y por sus inagotables ideas.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología; Adrián, Karina, Vale, Ariel, Vicky, Nelson, Andrea, Juan y Pablo; siempre con buenas ideas y aportando soluciones, desde como sostener un tubo de ensayo para que flote en un baño de agua, hasta la técnica más depurada para inyectar una solución en el equipo de monocapas.

A Sonia Faudone, por sus aportes en el análisis de los perfiles de difracción, y su ayuda para enviar muestras a otros laboratorios cuando fue necesario.

A Tina, por su invaluable ayuda con la preparación de los oleogeles y las mantecas, y por tantas buenas charlas de la vida.

A José y Martín, amigos de la vida y del fútbol, por las charlas de cerveza en los momentos de dudas.

A Sabrina y Laura, por hacer que la música sea un estímulo en todo momento.

A mi “otra familia”; Marina, Juan, Ana, Dani, Per, Ulises, Cristian, Gusti y Benja; por estar siempre presente.

A mis cuñados Daniela, Juan, José y Diego, por interesarse por mi laburo en cada encuentro, ¡asadito de por medio!.

A mis sobrinos Mati, Fede, Agu, Eli, Vale, Zoé, Jere, Fabri, Lucio, Lauti, Cande y Jonás, por siempre llenarme de risas cuando nos vemos.

A mis amadísimos hermanos, por tanta admiración y buenos deseos.

A mi viejo, por su honestidad y su inigualable forma de laburar. Por sus abrazos, que extraño mucho.

A mi vieja, por la palabra justa, por su amistad y sus inagotables demostraciones de amor.

A Laura, por su respeto inabarcable, por su experiencia en estas cosas de la investigación, ¡por su paciencia en estos tramos finales! ... y por su amor siempre demostrado.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Índice de Abreviaturas.....</b>	<b>xii</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de Tablas.....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xviii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>xix</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1. Breve reseña histórica acerca de las formas de consumo del chocolate.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Proceso de fabricación del chocolate y principales transformaciones relacionadas.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Mezclado.....	2
1.2.2. Refinado.....	4
1.2.3. Concado.....	4
1.2.4. Temperado.....	6
<b>1.3. Comportamiento de flujo del chocolate y reología.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Los emulsionantes y su influencia sobre el comportamiento de flujo del chocolate.....</b>	<b>13</b>
1.4.1. Generalidades y mecanismo de acción.....	13
1.4.2. Emulsionantes más comunes: lecitina de soja y PGPR. Comportamiento individual y efecto de sus mezclas.....	14
1.4.3. Nuevas tendencias.....	18
<b>1.5. Teoría general de las emulsiones.....</b>	<b>19</b>

1.5.1. Emulsiones con una de sus fases acuosa: composición, estructura y elección de los emulsionantes adecuados.....	19
1.5.2. Emulsiones no acuosas y emulsionantes poliméricos.....	23
1.5.3. Estructura modificable de los emulsionantes poliméricos y etilceluosa como singular polímero hidrofóbico comestible con actividad de superficie..	26
<b>1.6. Polimorfismo cristalino y transición líquido – sólido del chocolate durante el temperado.....</b>	<b>29</b>
1.6.1. Composición química de la manteca de cacao como base de su comportamiento cristalino.....	29
1.6.2. Transiciones polimórficas y desarrollo del florecimiento graso ( <i>fat bloom</i> ).....	32
<b>1.7. Manteca de cacao y chocolate como vehículos de principios activos..</b>	<b>34</b>
1.7.1. Principios activos añadidos al chocolate: estrategias de formulación para fármacos poco solubles en agua.....	34
1.7.2. Principios activos añadidos al chocolate: fármacos solubles en aceites y grasas, con problemas de fotosensibilidad y dosificación.....	36
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
4.1. Materiales.....	40
4.2. Métodos.....	41
4.2.1. Preparación de las muestras.....	41
4.2.2. Procedimientos analíticos.....	44
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1. CAPÍTULO 1: Influencia de emulsionantes en las propiedades de cristalización de la manteca de cacao .....</b>	<b>48</b>

5.1.1. Etilcelulosa y efecto de surfactantes poliméricos sobre la cristalización de la MC.....	52
<b>5.2. CAPÍTULO 2: ETILCELULOSA (EC) COMO EMULSIONANTE POLIMÉRICO. Impacto en la reología del chocolate fundido.....</b>	<b>54</b>
5.2.1. Solubilidad de la EC en vehículos grasos como base de su acción surfactante.....	54
5.2.2. Efecto dual de la mezcla EC – TCM sobre los parámetros viscosidad y límite de fluencia.....	59
5.2.3. Eficiencia emulsionante de la mezcla TCM-EC.....	67
<b>5.3. CAPÍTULO 3: MECANISMO EMULSIONANTE DE ETILCELULOSA. Efecto de un surfactante polimérico sobre la formación y estabilidad de emulsiones no acuosas (ENA).....</b>	<b>72</b>
5.3.1. Emulsiones no acuosas de estructura <i>fase dispersa polar - en - fase continua grasa</i> como modelos de suspensión chocolate.....	72
5.3.2. Efecto de la EC sobre el comportamiento mecánico de los oleogeles.....	76
5.3.3. Preparación y estabilidad de emulsiones de PG en TCM.....	80
5.3.3.1. Caracterización de la estructura de las emulsiones.....	81
5.3.3.2. Propiedades de flujo de las emulsiones obtenidas usando concentraciones bajas de EC.....	83
5.3.3.3. Efecto del PM y concentración de EC.....	83
5.3.3.4. Dependencia de las propiedades de flujo de las emulsiones respecto de la proporción de PG.....	85
5.3.3.5. Emulsiones obtenidas de soluciones de EC a altas concentraciones y mediciones de extrusión hacia atrás.....	87
<b>5.4. CAPÍTULO 4: CHOCOLATE Y MANTECA DE CACAO COMO VEHÍCULOS DE PRINCIPIOS ACTIVOS FARMACÉUTICOS. Formulaciones novedosas para fármacos poco solubles en agua.....</b>	<b>89</b>

5.4.1. Mebendazol (MBZ). Antiparasitario de uso humano y animal, con problemas de polimorfismo.....	89
5.4.2. Altrenogest. Progestágeno sintético, programador y sincronizador del ciclo estral en ganado porcino y equino, con marcada fotosensibilidad y problemas de dosificación.....	96
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
6.1. Ventajas de la vehiculización de la EC en un TCM previo a su incorporación a la masa de chocolate.....	100
6.2. La EC estabiliza la suspensión chocolate a través de un mecanismo interfacial, efecto favorecido por su muy baja concentración de uso.....	101
6.3. La EC no produce perturbaciones en la formación de la estructura polimórfica más estable de la MC.....	105
6.4. MC y grasas equivalentes como alternativas para el transporte de principios activos farmacéuticos: sencillez en el desarrollo de las formulaciones.....	108
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>110</b>
<b>8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>112</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>129</b>

**ABREVIATURAS:**

AG: ácido graso

AS: aceite de soja

CBE: Cocoa Butter Equivalent (Equivalente de Manteca de Cacao)

EC: etilcelulosa

ENA: emulsiones no acuosas

GC-FID: Gas Chromatography – Flame Ionization Detection (Cromatografía Gaseosa con Detección por Ionización con Llama).

FMDP: fuerza a la máxima distancia de penetración

HLB: Balance hidrofílico – lipofílico (del inglés: hydrophilic - lipophilic balance)

HPMC: hidroxipropil metilcelulosa

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)

MC: manteca de cacao

MM: materiales minoritarios

o/w: notación para emulsiones de aceite en agua (del inglés: oil-in-water)

OGM: organismos genéticamente modificados

PG: propilenglicol

PGPR: poliglicerol poliricinoleato

PM: peso molecular

TCM: triglicéridos de cadena media

TEM: Transmission Electronic Microscopy (Microscopía Electrónica de Transmisión)

TG: triglicéridos

w/o: notación para emulsiones de agua en aceite (del inglés water-in-oil).

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del proceso de elaboración del chocolate sin leche.....	3
Figura 2. Modelo de empaquetamiento cristalino de una grasa.....	6
Figura 3. Representación esquemática del tipo de fuerzas externas que puede sufrir un material.....	7
Figura 4. Ejemplo de la deformación uniaxial de un cuerpo.....	8
Figura 5. Configuraciones de las geometrías de medición más utilizadas en los instrumentos rotacionales y su rango de aplicación.....	8
Figura 6. Ejemplo de la deformación por cizallamiento de un material.....	9
Figura 7. Diferentes tipos de reogramas.....	10
Figura 8. Diferentes formas de representación gráfica del comportamiento de flujo.....	12
Figura 9. Reograma donde se muestra las regiones de la curva utilizadas por los modelos matemáticos para la obtención por interpolación de los parámetros reológicos del chocolate.....	13
Figura 10. Representación esquemática de una molécula de fosfatidilcolina.....	15
Figura 11. Efecto de la concentración de algunos emulsionantes sobre la viscosidad y el LF del chocolate sin leche.....	16
Figura 12. Estructura química del poliglicerol polirricinoleato (PGPR).....	17
Figura 13. Representación muy esquemática de la estructura de emulsiones o/w y w/o.....	20
Figura 14. Mecanismos de desestabilización de emulsiones.....	22
Figura 15. Estructura de los copolímeros según la disposición de sus monómeros en la molécula.....	26
Figura 16. Estructura química de la celulosa.....	27
Figura 17. Estructura química de la etilcelulosa.....	28
Figura 18. Esquema de la estructura química de un triglicérido saturado.....	29
Figura 19. Polimorfos de la manteca de cacao y su identificación por DRX.....	31
Figura 20. Porción de una tableta de chocolate donde se muestran zonas con desarrollo de fat bloom junto a zonas sin desarrollo.....	32
Figura 21. Estructura química del MBZ.....	35
Figura 22. Difractogramas de los tres polimorfos puros del MBZ, comparado con el obtenido para una materia prima comercial.....	35
Figura 23. Estructura química del altrenogest.....	36

Figura 24. Secuencia de temperado para la cristalización de la MC en el chocolate.....	42
Figura 25. Parámetros del sistema de medición para el ensayo de extrusión hacia atrás.....	45
Figura 26. Patrones de difracción de MC.....	50
Figura 27. Patrones de DRX para mezclas de MC con diferentes proporciones de lecitina de soja.....	51
Figura 28. Patrones de DRX para mezclas de MC con EC de diferentes PM.....	53
Figura 29. Una de las variantes de la mezcla emulsionante desarrollada en esta tesis, comparada con los emulsionantes más utilizados en la industria del chocolate local, la lecitina de soja y el PGPR.....	55
Figura 30. Reograma obtenido para soluciones de EC-10 de diferentes concentraciones en TCM, a 40 °C.....	57
Figura 31. Oleogeles de EC al 8 % p/p en TCM.....	58
Figura 32. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento, para MC y sus mezclas con diferentes proporciones de TCM.....	60
Figura 33. Efecto del agregado de diferentes concentraciones de TCM sobre la viscosidad a velocidades de cizalla = 40/s para MC y mezclas de MC + lecitina 0,5%.....	61
Figura 34. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento, para MC + azúcar, y la posterior mezcla de esta suspensión con TCM y TCM + EC-10.....	62
Figura 35. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento, para suspensiones de MC + azúcar con agregado de la mezcla emulsionante TCM + EC-10, a diferentes concentraciones de EC.....	63
Figura 36. Efecto de la concentración de TCM sobre el comportamiento de flujo del chocolate.....	64
Figura 37. Efecto del TCM sobre el comportamiento de flujo del chocolate en comparación con el efecto de lecitina al 0,5 %.....	65
Figura 38. Efecto de la concentración y PM de la EC sobre la viscosidad y LF del chocolate sin leche.....	66
Figura 39. Representación esquemática de la microestructura de las partículas del chocolate bajo fuerzas de cizalla.....	68
Figura 40. Viscosidad como una función de la velocidad de cizalla para tres muestras de chocolate.....	69

Figura 41. Esquema de una cuba de Langmuir equipada con balanza de Wilhelmy.....	72
Figura 42. Isotherma de compresión (curva <i>presión – área</i> ; $\pi - A$ ) para una monocapa de EC-10 en la interfase agua-aire (25 °C).....	73
Figura 43. Perfil de extrusión hacia atrás (back extrusion) típico, para un oleogel obtenido con 9 % de EC-10 en TCM.....	76
Figura 44. Fuerza a la máxima distancia de penetración (FMDP) para el ensayo de extrusión hacia atrás (back extrusion) en oleogeles preparados con diferentes concentraciones de EC en TCM y aceite de soja.....	77
Figura 45. Evolución en el tiempo de la fuerza a la máxima penetración en el test de back extrusion para geles de EC de cuatro pesos moleculares, al 8 % en el TCM.....	78
Figura 46. Distancia que la sonda penetra en el oleogel antes que la distancia en el punto A sea alcanzada, durante el ensayo de extrusión hacia atrás, para todos los PM de EC a concentraciones de 8 % y 9 %.....	79
Figura 47. Apariencia de emulsiones 50/50 de PG en TCM, estabilizadas con diferentes concentraciones de EC-10 disuelta en la fase grasa.....	80
Figura 48. Ejemplos de fotomicrografías de emulsiones no acuosas y frecuencia de tamaño de gotas de fase dispersa (PG).....	82
Figura 49. Evolución de la viscosidad a 25 °C en función de la fuerza de cizalla (shear stress) para TCM con 1 % p/p de EC-10, y emulsiones preparadas con 50/50 de PG/TCM y estabilizadas con 0,125 %, 0,25 % y 0,50 % de EC-10 disuelta en la fase continua grasa.....	83
Figura 50. Evolución de la viscosidad a 25 °C en función de la fuerza de cizalla (shear stress) para aceite de soja (AS) con 1 % p/p de EC-10, y emulsiones preparadas con 30/70 de PG/AS y estabilizadas con 1 % y 2 % de EC-10 disuelta en la fase continua grasa.....	84
Figura 51. Viscosidad a 25 °C en función de la fuerza de cizalla (shear stress) para emulsiones PG/TCM 1:1 estabilizadas con EC de diferentes PM, disueltas en la fase continua grasa.....	85
Figura 52. Efecto de la concentración de PG sobre la viscosidad y el LF a 25 °C, para emulsiones estabilizadas con 2 % p/p de EC-45.....	86
Figura 53. Viscosidad a la mínima fuerza de cizalla registrada (0,1 Pa; 25 °C) como una función de la concentración de PG, para emulsiones de PG en TCM estabilizadas con 2 % de EC de diferentes PM.....	87

Figura 54. Fuerza a la máxima distancia de penetración (FMDP; 20 mm) en el ensayo de back extrusion como una función de la concentración de PG, para emulsiones de PG en TCM obtenidas a partir de oleogeles de EC al 7 %.....	88
Figura 55. Patrones de DRX de chocolate sin leche, polimorfo C del MBZ y mezcla de ambos.....	92
Figura 56. Patrones de DRX a valores de $2\theta$ entre $4^\circ$ y $10^\circ$ para chocolates sin leche con concentraciones crecientes del polimorfo C de MBZ.....	93
Figura 57. Patrón de DRX para una muestra de MC pura y una mezcla de MC con 0,5 % de MBZ con prevalencia del polimorfo A.....	95
Figura 58. Tabletas obtenidas en el laboratorio para la vehiculización de MBZ y altrenogest.....	98
Figura 59. Modelo de interacción para un polímero de injerto en una emulsión o suspensión.....	102
Figura 60. Modelo de estabilización de la suspensión chocolate por el emulsionante polimérico etilcelulosa.....	103
Figura 61. Modelo de floculación por depleción para la suspensión chocolate....	104
Figura 62. Modelo de floculación por formación de puentes para el chocolate.....	105
Figura 63. Desarrollo de florecimiento graso (fat bloom) en un mismo lote de chocolate sin leche temperado en nuestro laboratorio a través de tres métodos diferentes.....	107
Figura 64. Relación de los conceptos desarrollados en este estudio.....	111
Figura 65. Manteca reducida en contenido acuoso y graso.....	112
Figura 66. Película de EC-100.....	113
Figura 67. Tableta de formulado sólido (CBE) para Altrenogest con cobertura de EC.....	114

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla I. Formas polimórficas de la manteca de cacao.....	30
Tabla II. Composición porcentual del chocolate sin leche y sin emulsionantes usado en esta tesis.....	40
Tabla III. Pesos moleculares de la EC.....	52
Tabla IV. Viscosidad aparente a velocidad de cizallamiento = 40 1/s para oleogeles preparados con diferentes concentraciones de EC de 4 PM, en TCM.....	57

## RESUMEN

La producción del chocolate consta de etapas bien definidas. Durante las primeras, el chocolate es un fluido y se lo prepara para convertirlo controladamente en un sólido. El elemento central de este comportamiento es su fase continua grasa: la manteca de cacao (MC). En ella se dispersan sólidos (azúcar y sólidos de cacao) para formar una suspensión que es y debe mantenerse libre de agua; que debe ser fisicoquímicamente favorecida en su preparación; y que luego debe ser estabilizada. En todos estos aspectos juegan un rol fundamental los emulsionantes.

En este estudio, se evaluaron moléculas poliméricas con potencial capacidad emulsionante como mejoradoras del comportamiento de flujo de la masa de chocolate fluido, pero que a la vez no entorpezcan la etapa de cristalización polimórfica en su transición líquido-sólido. Ambos aspectos son insolubles para la obtención de un chocolate con buenos atributos organolépticos y buena resistencia al "fat bloom" como principal e inevitable parámetro de deterioro. Entre los productos evaluados, el copolímero de injerto etilcelulosa (EC) fue el más eficiente, vehiculizado por disolución en una mezcla de triglicéridos de cadena media (TCM).

Considerando la complejidad de la matriz chocolate, donde la ausencia de agua constituye quizás la dificultad más grande para su estudio, se recurrió al diseño de emulsiones no acuosas de propilenglicol en aceite para describir los mecanismos fisicoquímicos involucrados en la acción emulsionante de la mezcla EC-TCM. La estabilización exitosa de estas emulsiones permitió postular un modelo de acción posible para la suspensión chocolate, basado en la muy buena actividad de superficie de la EC.

Esta condición de anhidro del chocolate fue aprovechada para vehicular principios activos poco solubles en agua. En esta tesis se demostró que la manteca de cacao no sólo es un buen solvente para estas drogas, sino también que su transición líquido-sólido sirvió para el diseño de dos formulaciones terapéuticas: un antiparasitario de uso humano y animal (mebendazol), y un regulador estral porcino (altrenogest). Además de la obtención de formulados homogéneos, estudios de estabilidad demostraron que la matriz chocolate no afecta el polimorfismo del mebendazol, y protege al altrenogest de su fotosensibilidad.

**Palabras clave:** emulsionantes poliméricos, chocolate, reología, polimorfismo, cristalografía, etilcelulosa.

## SUMMARY

Chocolate production consists of well-defined stages. Firstly, chocolate is a fluid and thus is prepared to turn it into a solid, through a controlled process. Cocoa butter is the continuous phase in chocolate, and represents the central component that explains its behavior. Diverse particles (sugar and cocoa solids) are dispersed into this continuous phase to form a water-free suspension, which should remain anhydrous throughout the manufacturing process; should be favored in their preparation from a physicochemical point of view; and finally should be stabilized. Emulsifiers play a key role in all these aspects.

In this study, polymeric molecules with potential emulsifying activity were evaluated. They should be able to improve the chocolate flow behavior, but without hindering the polymorphic crystallization stage when the liquid-solid transition occurs. A final product with good mouthfeel as well as high spoilage resistance is totally dependent of these characteristics. The graft copolymer ethylcellulose (EC) dissolved into medium chain triglycerides (MCT), was the most efficient one among different tested molecules. Given the complexity of chocolate matrix where waterless is perhaps the greatest difficulty for its study, non-aqueous oil-based propylene glycol emulsions were used to describe the physicochemical mechanisms involved in the emulsifying activity of EC-MCT mixture. Based on both these non-aqueous emulsions stabilization as well as the good surface properties of EC, modeling of chocolate stabilization was possible.

Anhydrous status of chocolate was exploited to use it as a vehicle for poorly water soluble drugs. In this thesis it was shown that cocoa butter is not only a good solvent for these drugs, but also that its liquid-solid transition was used to design two therapeutic formulations: an antiparasitic for human and animal treatment (mebendazole), and a porcine estrous regulator (altrenogest). In addition to homogeneous formulations, stability tests were carried out, which showed that both mebendazole polymorphism as well as altrenogest photosensitivity were not affected.

**Key words:** polymeric emulsifiers, chocolate, rheology, polymorphism, crystallography, ethylcellulose.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Breve reseña histórica acerca de las formas de consumo del chocolate

Evidencias arqueológicas en las zonas norte y centro de Sudamérica, muestran que el cacao ya se cultivaba aproximadamente unos 2000 años antes de la llegada de los españoles a nuestro continente. Civilizaciones pre-hispánicas como los Olmecas, Aztecas y Mayas utilizaban los granos de cacao para producir una bebida especiada y amarga: el *xocolatl*; a la cual atribuían propiedades energizantes y afrodisíacas. Esta bebida se obtenía a partir de la maceración de los cotiledones del grano de cacao, previamente molidos y tostados. Al líquido resultante, eventualmente podían agregarse vainilla, especias y miel. Hacia 1520, las expediciones de Colón y las de Cortés llevan la costumbre de preparación de la bebida a Europa, y en el siglo XVII la corona española introduce el cultivo del cacao en la entonces Guinea Española, en la costa oeste de África. Este es el antecedente de los actuales cultivos africanos del cacao, donde actualmente se cosecha más del 70 % del cacao mundial. Mucho más adelante en el tiempo, los primeros registros del consumo de chocolate en forma sólida datan del año 1730, en Europa (1,2).

Esta muy breve reseña histórica sobre las formas de preparación y consumo de este alimento tan popular, permite comprender rápidamente que su fabricación se ha realizado desde sus inicios a través de un proceso netamente empírico. Como ha ocurrido en innumerables procesos industriales, el avance concomitante de la ciencia y la tecnología junto a la necesidad de volúmenes de producción cada vez mayores, han generado paulatinamente la división del proceso de fabricación del chocolate en varias etapas. Esta división no ha sido caprichosa, sino que obedece a las posibilidades que cada una de esas etapas otorga para la introducción de mejoras, las cuales tienen como fin último lograr un proceso más eficiente y competitivo sin resignar e incluso mejorando la calidad del producto final. De esta manera, existe y se genera constantemente abundante bibliografía destinada a la comprensión en detalle de los diferentes estadios del proceso, así como también numerosas patentes con potenciales mejoras en maquinarias e ingredientes (1,3-5). No obstante, numerosos aspectos siguen desarrollándose en forma empírica, con alguna proporción de desconocimiento en algunas transformaciones. El estudio abordado en esta tesis aprovecha la escisión en etapas del proceso, para intentar aportar conocimiento aprovechable en las tareas industriales, pero con el foco

puesto en la comprensión de eventos moleculares que puedan servir de base para futuros desarrollos.

## **1.2. Proceso de fabricación del chocolate y principales transformaciones relacionadas**

Independientemente de diferencias puntuales que tienen origen en las zonas geográficas donde se fabrique y en las costumbres de consumo de las poblaciones que habitan esas regiones (6), el esquema básico del proceso moderno de producción del chocolate puede resumirse como se muestra en la Figura 1. Este esquema incluye además las etapas básicas involucradas en la recolección del grano de cacao y su transformación hasta la obtención de los ingredientes básicos del chocolate: la MC y el licor de cacao.

Aproximadamente el 80 % de la producción mundial de cacao se genera en muy pocos países, y el procesamiento de esos granos para obtener los diferentes ingredientes suma algunos pocos actores más (ver Anexo A) (7).

De esto se deduce que en la mayoría de los países fabricantes de chocolate y/o productos derivados (el nuestro entre ellos) esos ingredientes son importados desde aquellas regiones, por lo que el proceso de fabricación del chocolate es considerado a partir de la etapa de mezclado de los ingredientes básicos, que en el caso del chocolate sin leche son azúcar, licor de cacao, MC y emulsionantes. Desde un punto de vista fisicoquímico, a partir de este mezclado y considerando estos ingredientes, el chocolate fundido constituye una suspensión de partículas sólidas hidrofílicas (el azúcar y los sólidos de cacao aportados por el licor de cacao), en una fase continua hidrofóbica de naturaleza grasa, la manteca de cacao (8, 9).

### **1.2.1. Mezclado**

El objetivo de esta etapa es lograr una masa homogénea compuesta por MC, azúcar y licor de cacao; en relativamente corto tiempo y con la ayuda de temperatura, ya que la MC es una grasa sólida a temperatura ambiente y debe fundirse. La mezcla se realiza en amasadoras automáticas, y las condiciones necesarias dependerán de si el proceso es por lote o continuo, pero si se considera el primer caso, por ejemplo, la combinación suele ser una mezcla exhaustiva durante 12 – 15 minutos a 40 – 50 °C.

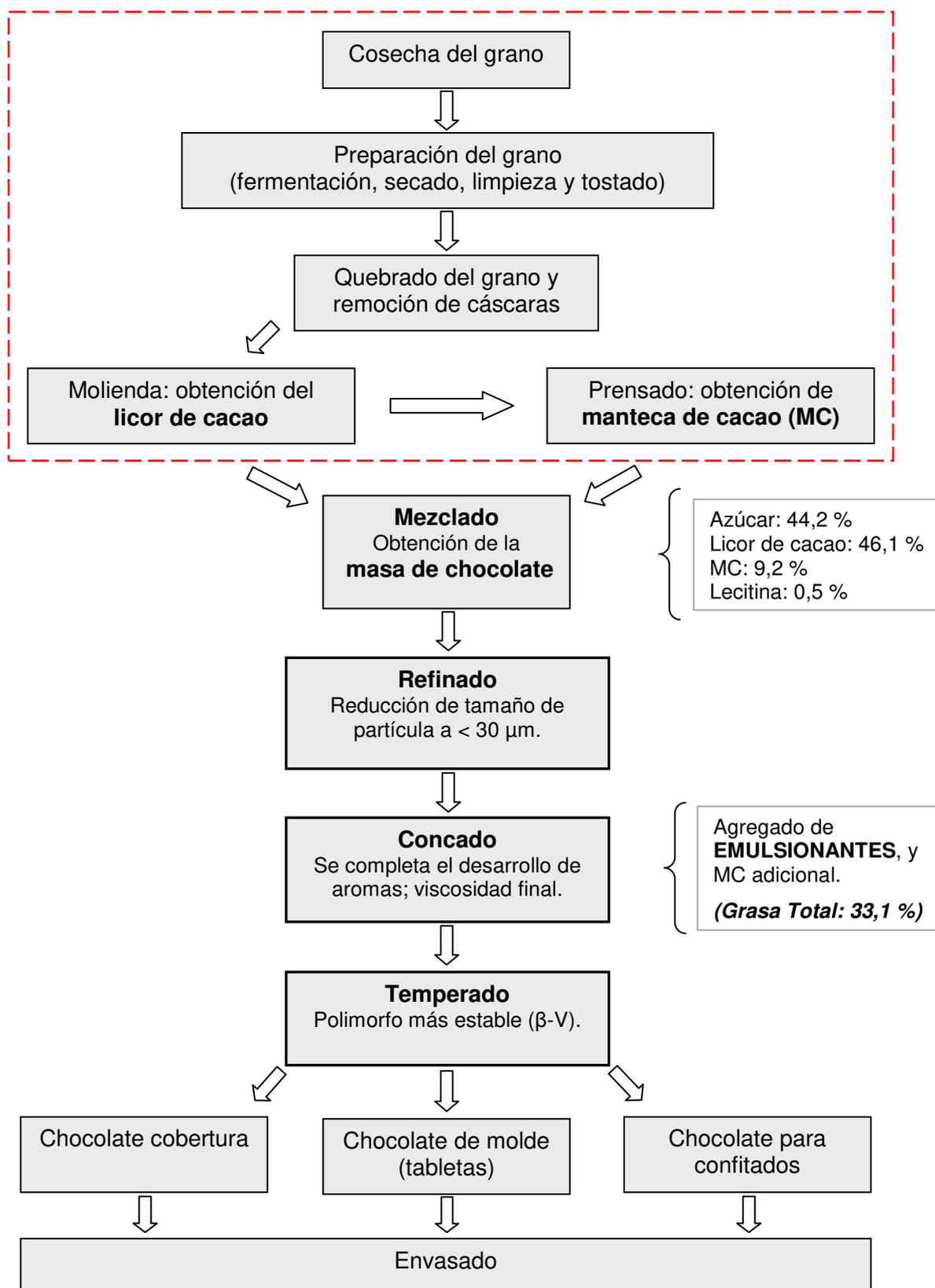


Figura 1: Esquema del proceso de elaboración del chocolate sin leche. El rectángulo rojo representa el procesado de los granos de cacao, y sus productos serán las materias primas más importantes del resto del esquema, el proceso de elaboración propiamente dicho del chocolate (modificado de las referencias 1, 10, 11).

En el caso de grandes productores de chocolate, se opta por el proceso continuo, con variantes específicas de tiempo y temperatura. En cualquier caso, se obtiene una mezcla de textura relativamente dura, y de una consistencia más bien plástica (12). Esto se debe no sólo al tamaño de partícula, que puede alcanzar los 2 mm, sino también a que en esta etapa falta una porción del total de la MC según la formulación, que será añadida durante la etapa de concado.

### 1.2.2. Refinado

El tamaño de partícula de la mezcla original, se debe principalmente a que el azúcar es añadida tal como se la obtiene para su consumo doméstico, aunque también hacen su aporte los sólidos del cacao. Así, a través de fuerzas de cizallamiento controladas, en esta etapa se produce la reducción de tamaño quebrando partículas de azúcar y disgregando grumos provenientes de la etapa anterior. El proceso se controla para lograr un tamaño menor a 30  $\mu\text{m}$ , de manera tal que las partículas no puedan ser detectadas por la lengua, lo cual daría una sensación de chocolate "arenoso". Por la misma acción mecánica del refinado, las partículas cada vez más pequeñas comienzan a recubrirse de grasa, aislándose unas de otras. Se trata entonces del primer paso para alcanzar una textura suave, la que será definitivamente alcanzada durante el concado.

Desde un punto de vista fisicoquímico, el aspecto más importante de esta etapa es el hecho que el azúcar, que ha sido agregada en estado cristalino en la etapa de mezclado, no sufra una transición irreversible hacia un estado amorfo, altamente higroscópico. Esto es: el azúcar deberá estar en ese estado estructural cristalino en el producto sólido terminado (13).

### 1.2.3. Concado

Este es básicamente un paso de mezclado exhaustivo de los ingredientes del chocolate con producción de cambios no sólo físicos sino también químicos, que incluyen el desarrollo de sabores y aromas ya definitivos, así como la transformación de la masa grosera de chocolate refinado en una suspensión fluida totalmente homogénea. En esta suspensión donde la MC es la fase continua, cada una de las partículas sólidas se dispersará para terminar por recubrirse con una capa de grasa.

Si bien esto da una idea de la importancia de esta etapa, el concado es un mezclado muy ineficiente: para lograr un chocolate sin leche de buena calidad, puede ser necesario un mezclado mínimo durante 24 h (el chocolate con leche puede insumir entre 5 y 12 h), con un gasto de energía y tiempo que es simple de ponderar (4). Para mejorar la eficiencia de esta etapa (esto es: con el menor gasto energético y de insumos posible) se añaden la MC que faltaba para completar la formulación y *modificadores reológicos con actividad de superficie*: los *emulsionantes*.

Considerando la maquinaria necesaria, existe una amplia variedad de equipos industriales (los más comunes pueden verse en el Anexo B) cuyo funcionamiento puede diferir en mayor o menor medida, con combinaciones de tiempo y temperatura específicas para cada equipo, y que además van a depender del tipo de chocolate que desee fabricarse. No obstante, y en forma resumida, el proceso de concado se diseña para lograr los siguientes cambios (14):

a) Reducción del contenido de agua de aproximadamente 2 % a menos de 0,8 %. Si bien puede parecer una disminución cuantitativamente no significativa, es indispensable para el desarrollo final de los aromas y sabores (la evaporación del agua arrastra químicos indeseables como ácido acético y algunos aldehídos volátiles), así como también de la textura: la presencia de agua puede disolver el azúcar haciéndole perder su estado cristalino, afectando las propiedades de flujo de la mezcla.

b) Culminación de las transformaciones químicas que han comenzado durante el procesado de los granos de cacao, y en menor medida continuaron durante el refinado. Estas reacciones químicas definirán tanto los aromas y sabores del producto final, dadas principalmente por reacciones de Maillard (pardeamiento o caramelización), así como también el contenido de sustancias bioactivas provenientes del grano de cacao, como son los polifenoles.

c) Modificación de la reología de la masa de chocolate: desde el punto de vista de este estudio, el aspecto más importante está relacionado a la adición de MC y emulsionantes, que contribuirán al mejor manejo de la masa principalmente a través de la reducción de la viscosidad del chocolate. Esto también se ve favorecido por el diseño de la maquinaria utilizada, favoreciendo la disgregación de grumos provenientes del refinado. En la Sección 1.4. se desarrollará en mayor detalle el efecto de los emulsionantes sobre los principales parámetros reológicos del chocolate fundido. Además, el uso de cantidades adecuadas de

emulsionantes combinado a un proceso de concado correctamente diseñado, contribuirán al desarrollo de una buena transición líquido-sólido, que se lleva a cabo en la etapa siguiente.

#### 1.2.4. Temperado

Durante esta etapa se produce la transformación del chocolate fundido en chocolate sólido: se trata de la solidificación de la MC como matriz o fase continua en el chocolate. La solidificación de los lípidos en general, se produce a través de la cristalización ordenada de sus triglicéridos (TG) constituyentes (Figura 2).

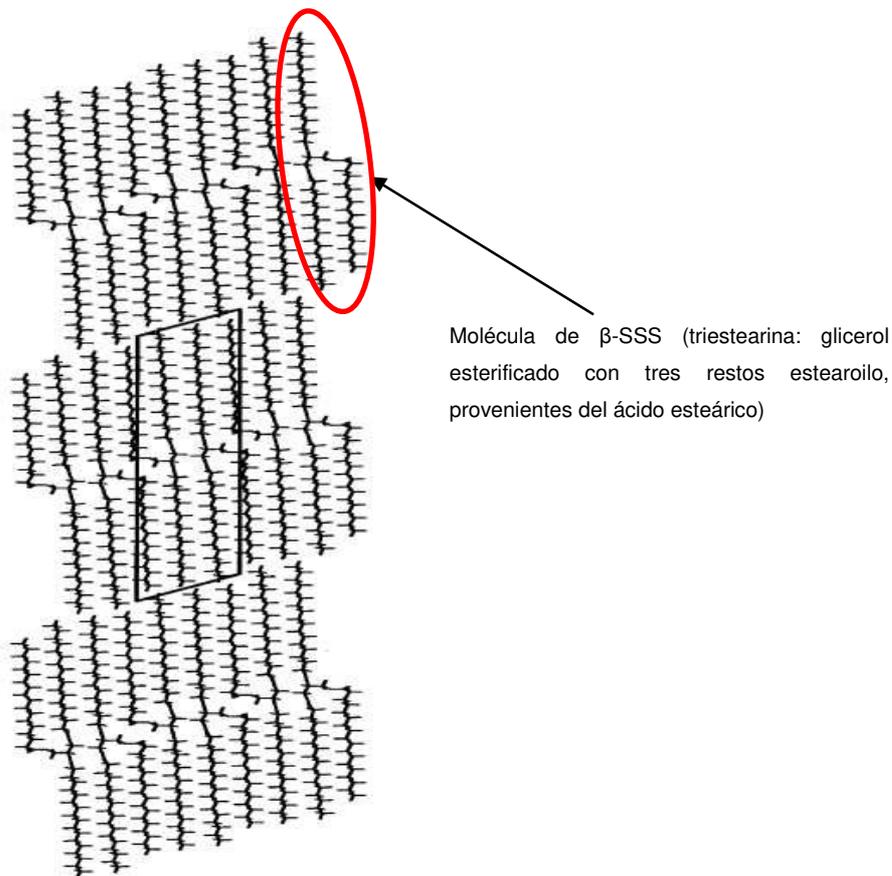


Figura 2. Modelo de empaquetamiento cristalino de una grasa. Se muestra sólo en dos dimensiones, pero este arreglo debe entenderse extendido hacia las 3 dimensiones espaciales.  $\beta$ -SSS (S = ácido esteárico). (modificado de la referencia 15).

Para una determinada grasa (esto es, de una determinada composición química) esa cristalización puede ocurrir en diferentes arreglos microestructurales tridimensionales, por lo que se dice que las grasas presentan *polimorfismo*. Como se

verá en secciones posteriores, las características especiales de la MC, hacen que la misma pueda solidificar hasta en seis polimorfos distintos, aunque sólo uno de ellos es el adecuado para lograr un chocolate de buena calidad. La etapa de temperado se diseña para la obtención de ese polimorfo específico, por lo que se trata entonces de una transición de fase que se realiza en forma estrechamente controlada en temperatura, tiempo y agitación.

Como sucede en el caso del concado, existen diferentes equipos y combinaciones de estos tres parámetros, para lograr una cristalización direccionada de acuerdo a los estándares de calidad de cada fabricante.

### 1.3. Comportamiento de flujo del chocolate y reología

La fabricación de chocolate de buena calidad depende en gran medida del concado y temperado. Durante el concado, el chocolate se encuentra fundido y la reología otorga los elementos para su seguimiento y comprensión; mientras que durante el temperado el chocolate solidifica y la cristalografía será la disciplina que permitirá su estudio.

En el análisis reológico los instrumentos usados involucran la aplicación de determinadas fuerzas sobre los materiales estudiados. Esto también ocurre en el análisis textural, y si bien se usará para otros aspectos de este estudio, es conveniente describir aquí brevemente aspectos básicos de las fuerzas usadas en ambos estudios.

Una fuerza puede ser normal, si se aplica en forma perpendicular al plano que contiene el material; o tangencial, si se aplica en forma paralela a dicho plano (Figura 3). En cada caso, el material experimentará una deformación. Para evaluar grandes deformaciones y propiedades de fractura, se utiliza generalmente un *anализador de textura* o *texturómetro*, y en esta tesis se usó para la caracterización

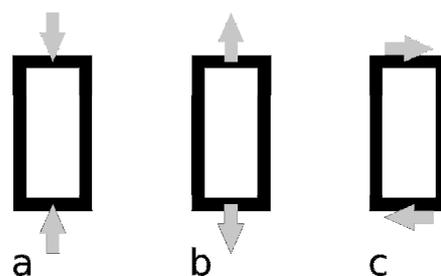


Figura 3. Representación esquemática del tipo de fuerzas externas que puede sufrir un material. (a) y (b): fuerzas normales; (c) fuerza tangencial.

de propiedades texturales en oleogel y emulsiones no acuosas obtenidas a partir de ellos (16).

La deformación experimentada por el material (Figura 4) en un texturómetro, dependerá de la geometría de medición que se use en el equipo, así como también de características del material (estructura, composición, forma y tamaño de la porción de estudio).

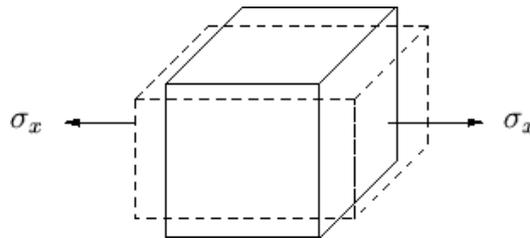


Figura 4. Ejemplo de la deformación uniaxial de un cuerpo por acción de fuerzas normales de extensión.

Para la medición de pequeñas deformaciones, se utilizan generalmente *viscosímetros* o *reómetros*, y este último se usó en este estudio para medir las propiedades de flujo del chocolate fundido. Se trata de un equipo diseñado para la aplicación de fuerzas tangenciales, conocidas como fuerzas de cizalla (*shear stress*)<sup>a</sup>. La muestra es “cizallada” (sheared) entre las dos partes de la geometría de medición (Figura 5).

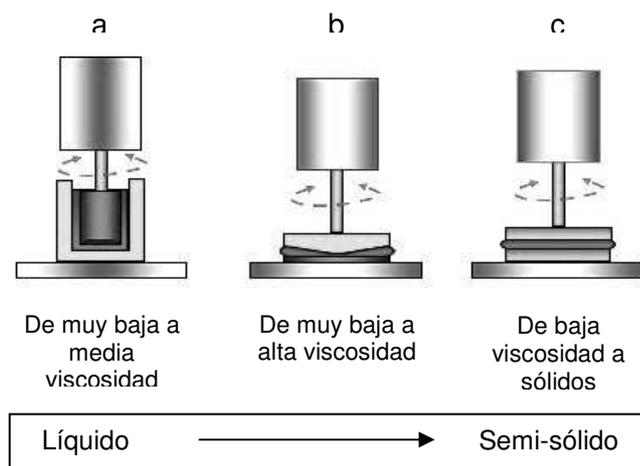


Figura 5. Configuraciones de las geometrías de medición más utilizadas en los instrumentos rotacionales y su rango de aplicación. (a) Cilindros concéntricos. (b) Cono y plato. (c) Platos paralelos.

<sup>a</sup> Muchas definiciones involucran términos específicos de origen inglés, que lamentablemente no siempre cuentan con traducciones precisas o muchas veces su traducción es ambigua respecto de otros términos (por ejemplo: muchas veces *strain* y *stress* pueden traducirse indistintamente como *tensión*, *esfuerzo* o simplemente *fuerza*. Por otro lado, en castellano, *tensión* ó *esfuerzo* pueden ser usados como sinónimos de *fuerza*, lo cual claramente impide sus definiciones desde el punto de vista reológico). Para evitar ambigüedades, en este texto muchas veces se incluirán los términos correspondientes en inglés, sobre todo en las definiciones.

Independientemente de la geometría que se utilice (17,18), la deformación  $\gamma$  (strain) experimentada por un material sobre el que actúa un esfuerzo de cizalla  $\tau$  (shear stress), puede verse en la Figura 6.

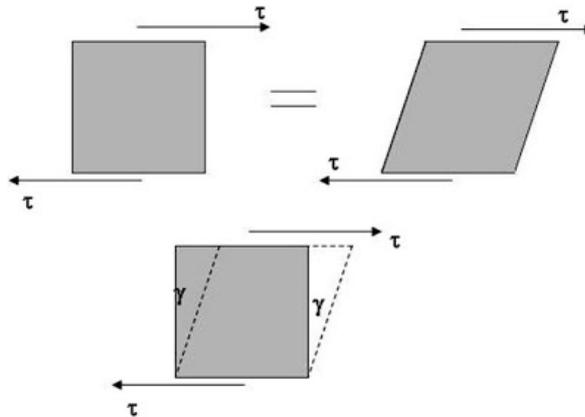


Figura 6. Ejemplo de la deformación por cizallamiento de un material por acción de fuerzas tangenciales.

De esta manera, se define a la Reología como *la ciencia que estudia la deformación y el flujo de los materiales* (19-23). Esta definición puede resultar a veces algo ambigua, y para comprenderla acabadamente es necesario entender el campo de estudio de esta disciplina.

En este sentido, un material es considerado un líquido cuando el grado de deformación que experimenta es proporcional a la fuerza por unidad de área (stress) ejercida sobre él, siendo la constante de proporcionalidad un coeficiente llamado viscosidad (Ley de Newton-Stokes). En el extremo opuesto, un material es un sólido cuando también existe proporcionalidad entre el stress aplicado y la deformación sufrida. En este caso, la constante de proporcionalidad se conoce como módulo de elasticidad o módulo de Young, y constituye una propiedad inherente del material (Ley de Hookes) (24,25).

De esta manera, el líquido ideal (fluido viscoso Newtoniano) comienza a fluir a una cierta velocidad cuando se le aplica una fuerza, y mantiene la forma que adquirió al momento de aplicar esa fuerza. En el otro extremo, el sólido ideal (sólido elástico Hookeano) se deforma instantáneamente bajo la acción de una fuerza, pero retoma su forma original después que el esfuerzo se ha retirado (16).

Sin embargo, la gran mayoría de los materiales presenta un comportamiento intermedio entre estos extremos, evidenciando características tanto viscosas como

elásticas, por lo que reciben el nombre de *viscoelásticos*. Estos materiales no-Newtonianos y no-Hookeanos, constituyen el campo de estudio de la Reología (26).

Con estas consideraciones, podemos plantear la siguiente relación (18):

$$\eta = \tau / D \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

$\eta$  = viscosidad. Unidades:  $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$  (ó  $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ). Cualitativamente, expresa la resistencia a fluir que presenta un material, ante una fuerza aplicada.

$\tau$  = fuerza de cizalla ó esfuerzo de cizalla (shear stress). Unidades:  $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$  (ó  $\text{Pa}$ ). Es la fuerza ejercida tangencialmente sobre el plano de un material, para desplazarlo respecto de otro inmediatamente vecino (Figura 6).

$D$  = velocidad de cizallamiento (shear rate)<sup>b</sup>. Unidades:  $\text{s}^{-1}$ .

Graficando  $D$  versus  $\tau$ , obtenemos un *reograma* o *curva de flujo* (Figura 7), una forma visual rápida y sencilla de comprender la reacción de un material (deformación, dada por  $D$ ), frente a la acción de una fuerza  $\tau$ .

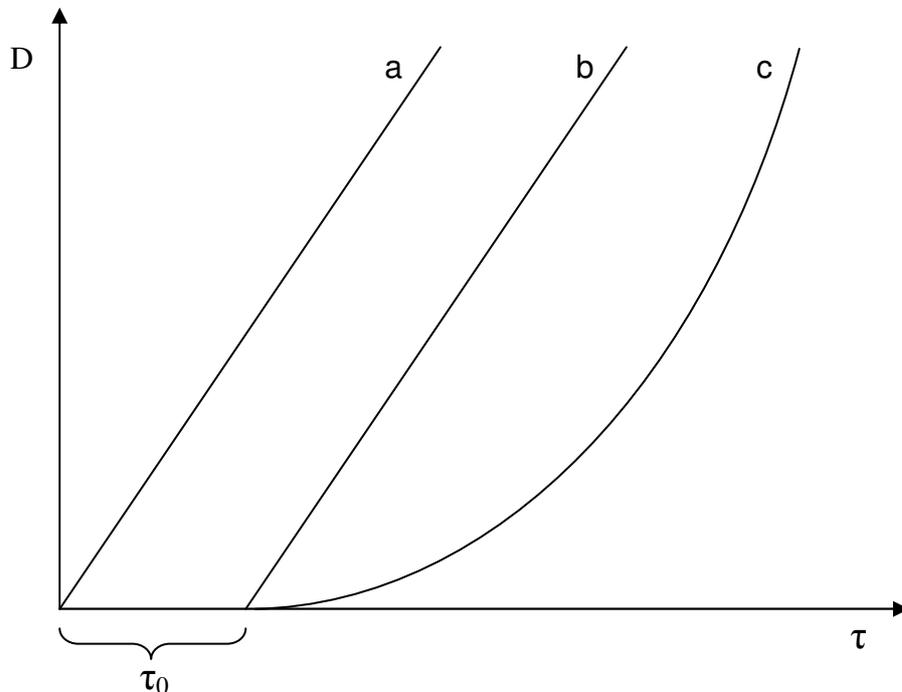


Figura 7. Diferentes tipos de reogramas: (a) Newtoniano; (b) Bingham; (c) pseudoplástico (chocolate) (18).

<sup>b</sup> El término shear rate en muchos textos aparece con el símbolo "gamma punto". En este texto se adopta la simbología usada por Chevalley (1994), en uno de los textos más citados sobre chocolate. Por otro lado, la ICA en su método para la determinación de la viscosidad en chocolate (17), utiliza indistintamente ambos símbolos.

Para los fluidos Newtonianos obtendremos una línea recta que pasa por el origen, de cuya pendiente  $1/\eta$  se extrae la viscosidad  $\eta$  (Ecuación 1; Figura 7-a). Esto implica que un líquido ideal comenzará a fluir en el mismo momento en que se aplica la fuerza (ejemplos de estos líquidos son el agua, el etanol, soluciones de sacarosa).

Los *fluidos de Bingham* (Figura 7-b), son aquellos que a pesar de aplicárseles una fuerza, no comenzarán a fluir hasta que esa fuerza alcance un valor umbral mínimo  $\tau_0$ . Esta mínima fuerza recibe el nombre de *límite de fluencia* (*yield value*). Un ejemplo de este tipo de fluidos es la pasta dental. Luego de ese punto, la recíproca de la pendiente de la recta es la *viscosidad plástica* ( $\eta_{pl}$ ) del fluido, que responde a:

$$\eta_{pl} = (\tau - \tau_0) / D \quad (\text{Ecuación 2})$$

La ecuación 2 puede escribirse de la siguiente manera, tomando la forma de una ecuación de recta (18):

$$\tau = \tau_0 + \eta_{pl} D \quad (\text{Ecuación 3})$$

Debido a la presencia de partículas sólidas en suspensión, el chocolate fundido no se comporta como un fluido ideal, sino que presenta un comportamiento No-Newtoniano (Figura 7-c).

La desviación del comportamiento Newtoniano del chocolate se debe a que cuando la masa fluye, las partículas sufren la atracción entre ellas debido a su superficie hidrofílica. Así, la fricción interna resultante hace que la viscosidad dependa de cuán alta sea la velocidad de cizalla (shear rate). Puede observarse que también presenta un límite de fluencia, pero en este caso el reograma es curvo y no lineal, demostrando la dependencia de la viscosidad respecto de la deformación. La derivada en cada punto de la curva 7-c, permite obtener un valor de viscosidad dependiente de la velocidad de deformación (shear rate), y se conoce como *viscosidad aparente*:

$$\eta_{ap} = f(D) \quad (\text{Ecuación 4})$$

En el caso de la Figura 7-c, esto significa que cada incremento de  $D$ , va acompañado de una disminución de la viscosidad. Este fenómeno se conoce como *fluidificación por cizalla (shear thinning)*. Los fluidos que muestran este comportamiento de flujo, se conocen como *pseudoplásticos*. Además del chocolate, varios alimentos muestran este tipo de flujo, entre los que se encuentran algunos tipos de leche concentrada, soluciones concentradas de polímeros lineales (como por ejemplo la goma guar y los xantanos), y varios jugos de fruta (16).

En la Figura 8 se muestran otras formas de visualizar los datos de los reogramas para fluidos.

Se han planteado varios modelos matemáticos para obtener una ecuación que permita explicar la curvatura del reograma del chocolate, entre los que podemos citar los de Steiner, Casson, Bingham, Carreau, Tscheuschner, Herschel-Bulkley o Windhab, modelos que constantemente se someten a evaluación y comparación entre sí (18,27-30).

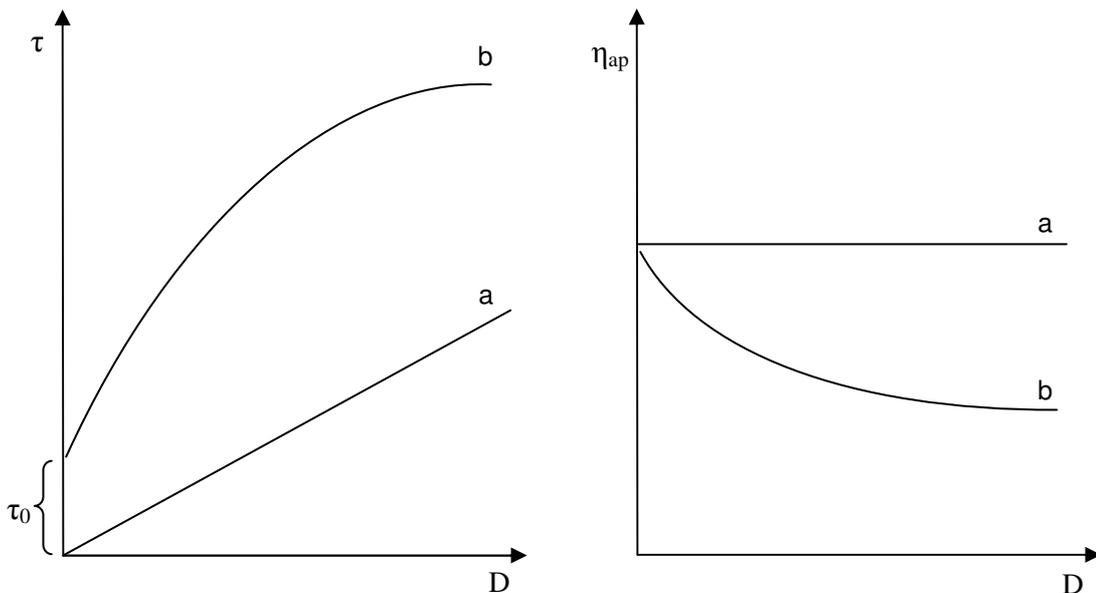


Figura 8. Diferentes formas de representación gráfica del comportamiento de flujo. (a) Newtoniano; (b) pseudoplástico (chocolate).

A través de estos modelos, pueden obtenerse la viscosidad aparente (en adelante, simplemente la *viscosidad*) y el *límite de fluencia (LF)* por interpolación en los reogramas experimentales obtenidos para el chocolate (ver Figura 9): ambas propiedades reológicas son utilizadas en la industria para definir el tipo de producto y su aplicación, así como su seguimiento en el control de calidad diario. El LF es una propiedad que denota la transición entre los comportamientos semi-sólido a semi-líquido, o lo que es lo mismo, como una transición de una deformación más elástica

hacia una más viscosa: cómo ya se mencionó, es la fuerza de cizalla (shear stress) a partir de la cual hay evidencia de flujo en el chocolate fundido. Por otro lado, industrialmente la viscosidad determina características para el bombeo a través de cañerías, llenado de bombones, cobertura de superficies y características sensoriales (29). Representa la energía que debe entregarse a la masa de chocolate para que continúe en movimiento, una vez que este ha comenzado.

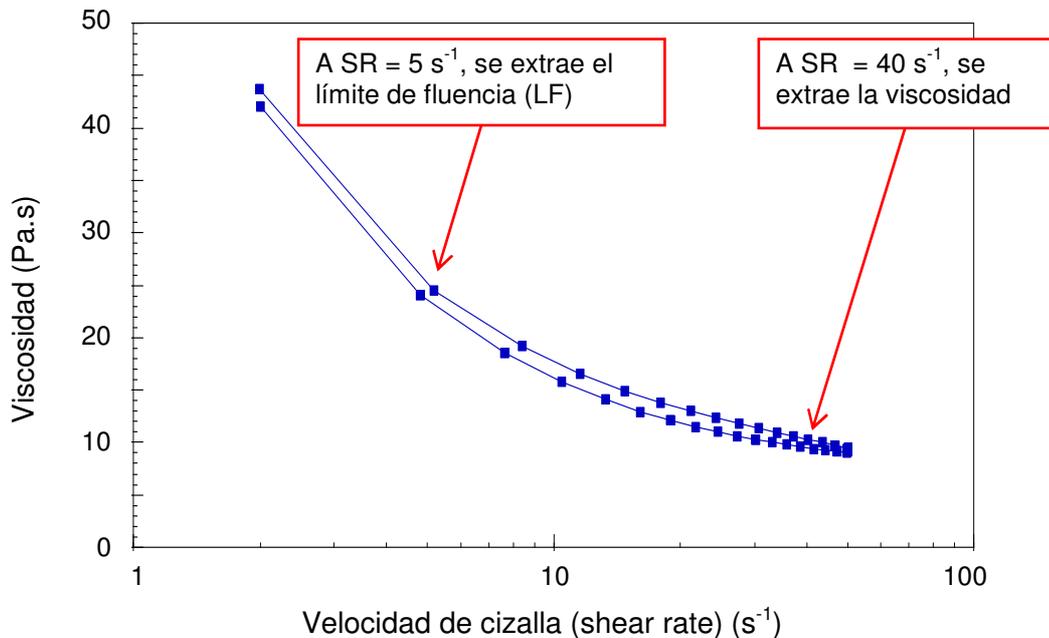


Figura 9. Reograma donde se muestra las regiones de la curva utilizadas por los modelos matemáticos para la obtención por interpolación de los parámetros reológicos del chocolate.

## 1.4. Los emulsionantes y su influencia sobre el comportamiento de flujo del chocolate

### 1.4.1. Generalidades y mecanismo de acción

Varios factores afectan los parámetros reológicos viscosidad y LF en el chocolate, entre los que podemos citar el contenido de grasa (MC), los emulsionantes y la humedad; la distribución del tamaño de partícula, la temperatura y el tiempo de concado (11,18).

El azúcar en el chocolate es una fase hidrofílica que no puede disolverse, por lo que se dispersa en forma sólida en la fase continua hidrofóbica que es la MC. Esta dispersión ocurrirá entonces cuando la superficie de las partículas de azúcar, sean

recubiertas de grasa. Esto no es simple de realizar (más considerando la proporción de ambos ingredientes), por lo que el concado se plantea como un proceso muy ineficiente. Así, el uso de agentes químicos con actividad de superficie, los *emulsionantes*, son usados para facilitar este proceso (11). No obstante, además de haberse mencionado en reiteradas ocasiones el rol de los emulsionantes en el concado, no es trivial su aporte durante las fases de almacenado, ya que influyen sobre la cristalización de la MC (temperado), regulando las transiciones polimórficas durante el almacenado del producto sólido. Por esto, se dice que los emulsionantes también actúan como inhibidores del florecimiento graso (*fat bloom*; ver sección 1.6.2.) (31).

En la fabricación del chocolate o de golosinas donde el chocolate es un ingrediente principal, existe un amplio número de moléculas que tienen en común la posibilidad de ser usados como emulsionantes, ya que son *anfifílicos*: poseen propiedades lipofílicas e hidrofílicas. Esto significa que su molécula presenta un grupo funcional hidrofílico que será atraído hacia la fase acuosa **o no acuosa pero polar**, y otro grupo hidofóbico o lipofílico (generalmente una cadena hidrocarbonada larga) que interactuará con la fase oleosa (32). De esta manera, reducen la energía libre interfacial y fluidifican la masa. Entre esas moléculas podemos citar la lecitina y lecitinas modificadas (también llamadas *lecitinas sintéticas*, son sales de amonio de ácidos fosfatídicos, comercialmente conocidas como YN), ésteres de poliglicerol, entre los que podemos citar al poliglicerol poliricinoleato (PGPR), monoestearato de glicerilo, ésteres de sorbitano, polisorbatos, monoglicéridos esterificados con ácido láctico o tartárico, monoglicéridos acetilados, ésteres de sacarosa y monoésteres de propilenglicol (31,33). La elección de emulsionantes naturales o sintéticos dependerá del producto final (11).

#### 1.4.2. Emulsionantes más comunes: lecitina de soja y PGPR. Comportamiento individual y efecto de sus mezclas.

El emulsionante más utilizado por eficiencia y costo desde hace mucho tiempo, es la *lecitina de soja*. Se trata de una mezcla natural de fosfolípidos ó fosfoglicéridos, siendo la fosfatidilcolina (Figura 10) el componente que más eficientemente actúa como emulsionante en el chocolate.

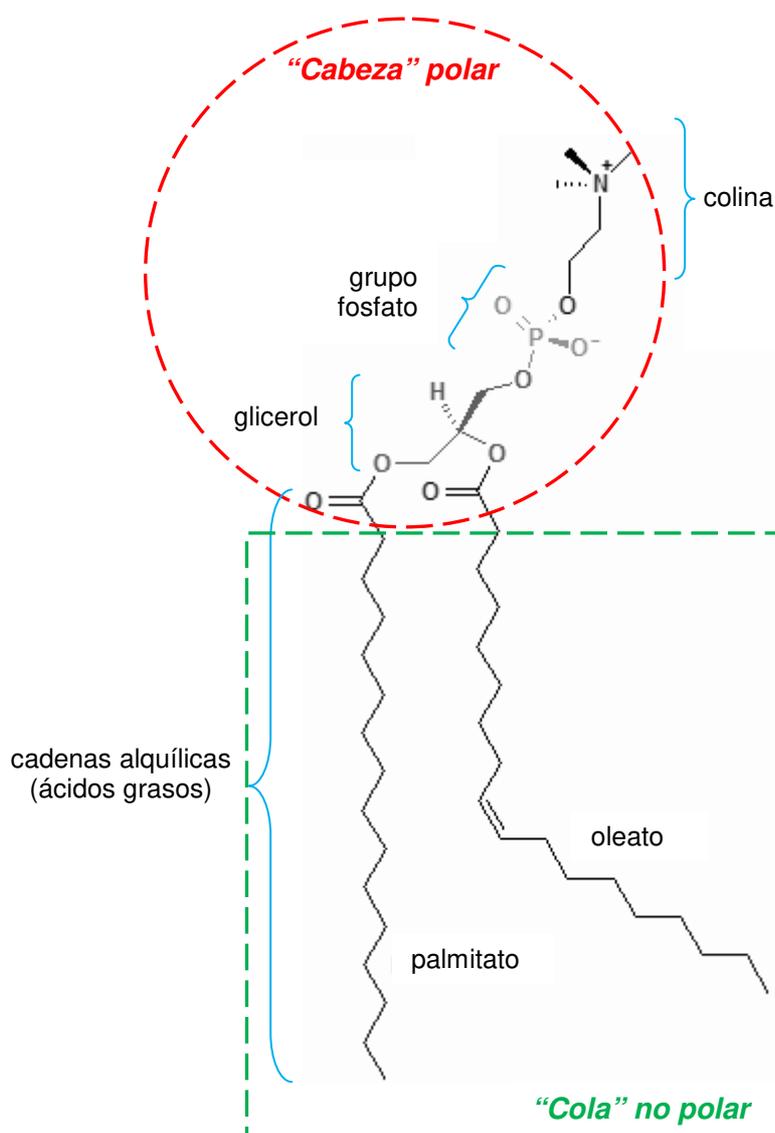


Figura 10: Representación esquemática de una molécula de fosfatidilcolina, donde las cadenas alquílicas provienen de los ácidos grasos oleico y palmítico.

En la Figura 11 (34) se muestra la acción de la lecitina comparada con la de otras moléculas sobre los parámetros reológicos del chocolate fundido. Puede verse que la adición de entre 0,1 % y 0,3 % de lecitina disminuye drásticamente tanto la viscosidad como el LF. Este efecto está dado principalmente por su elevada actividad de superficie, ya que interacciona con la superficie del azúcar a través de la porción hidrofílica de su molécula (el grupo fosfatídico), disponiendo sus restos hidrofóbicos hacia la fase continua oleosa (18,31). En la lecitina cruda, los ácidos oleico (C 18:1) y palmítico (C 16:0) son los restos hidrofóbicos que presentan mayor actividad de superficie al usarse en la preparación del chocolate (12). Esta modificación superficial en el azúcar incrementaría su lipofilicidad a través de una

fuerte disminución de su carácter ácido, reduciendo la interacción entre las partículas de azúcar y favoreciendo el flujo de la masa (35).

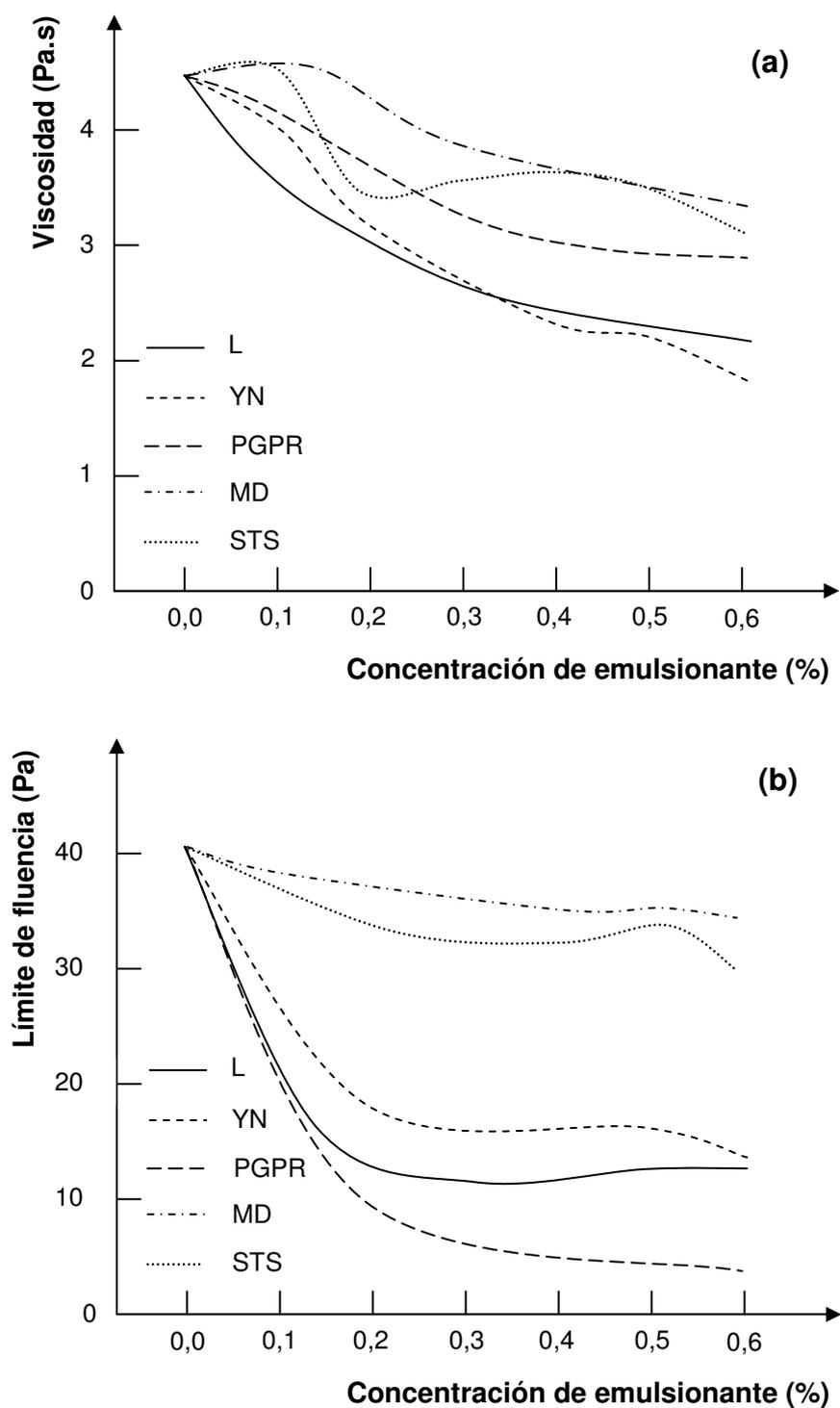


Figura 11. Efecto de la concentración de algunos emulsionantes sobre (a) la viscosidad y (b) el LF del chocolate sin leche. L: Lecitina, YN: lecitina sintética, PGPR: poliglicerol poliricinoleato, MD: mono y diglicéridos, STS: triestearato de sorbitano (modificado de la referencia 34).

Sin embargo, si el nivel de lecitina supera el 0,3 % – 0,5 %, comienza a ocurrir el espesamiento de la masa del chocolate, aunque esto se da por un incremento en el LF (Figura 11-b) mientras que la viscosidad sigue bajando (Figura 11-a) (12,18,33,34). No se conocen muy bien las causas de este fenómeno, pero el incremento en el LF ha sido vinculado a la formación de micelas en la fase continua grasa, posiblemente como multicapas alrededor de los granos de azúcar, lo cual dificultaría el flujo (11).

Teniendo esto en cuenta, es muy común la utilización de más de una molécula para lograr un control más o menos individual de la viscosidad y el LF. Entre las moléculas adicionales, en los últimos años ha ganado mucha aceptación el uso del PGPR (Figura 12) en distintos alimentos y particularmente en chocolate, y sus efectos han sido ampliamente estudiados (33,36-39). Obtenido sintéticamente a través de la reacción de policondensación del glicerol con aceite de ricino (en inglés, *castor oil*; el 90 % del aceite de ricino corresponde a TG del ácido ricinoleico), el PGPR ha sido usado en Europa y el resto del mundo, y recientemente se ha aprobado su uso en los Estados Unidos (31).

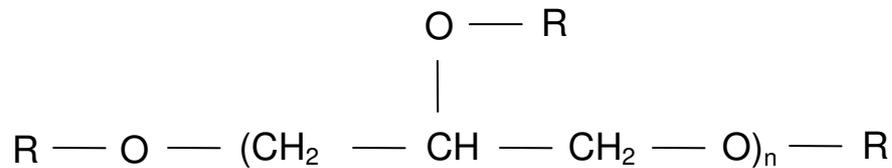


Figura 12. Estructura química del poliglicerol poliricinoleato (PGPR). R = H ó un grupo ácido graso derivado del ácido ricinoleico policondensado. n = grado de polimerización del glicerol (31).

Se trata de una mezcla químicamente compleja, donde predominan los di- tri- y tetraglicérols. Como puede verse en la Figura 11-a, el PGPR no tiene grandes efectos sobre la viscosidad del chocolate, pero puede reducir el LF más del 50 % cuando se lo utiliza al 0,2 %, y llevarlo a muy bajos valores cuando se lo usa al 0,5 % en chocolates sin leche. En chocolates con leche puede incluso eliminar el LF cuando se lo usa por encima de 0,8 % (33). Estos autores además, sugieren que las mezclas de lecitina + PGPR más eficientes para reducir el LF tanto en chocolates con y sin leche, fue la proporción de 30:70 de lecitina:PGPR. En cuanto a la máxima disminución de la viscosidad en chocolates sin leche, se obtuvo con la mezcla 50:50 de ambos componentes.

De esta manera, puede manipularse la composición de la mezcla para establecer los valores de viscosidad y LF que más convengan, según el producto que quiera fabricarse y su posible aplicación. La presencia de PGPR permite al chocolate fluir con mucha facilidad dentro de los moldes sin atrapar burbujas de aire, sobre todo de aquellos con formas complejas. También facilita el flujo de chocolate cuando debe usarse para cubrir formas complejas (31).

En cuanto al mecanismo de acción, el PGPR cubre las partículas sólidas, y dado su mayor peso molecular, se extiende más ampliamente que la lecitina dentro de la fase continua, produciendo una mayor estabilización estérica. En otras palabras, a diferencia de la lecitina, el PGPR no se estructura formando parte de la suspensión, sino que incrementa la fracción de volumen de la fase continua grasa y una agua residual, impidiendo que ésta hidrate y disuelva las partículas sólidas, lo cual haría incrementar la viscosidad de la masa (12).

Operativamente, manipular la composición de una mezcla emulsionante permitiría poder influir de manera más o menos independiente sobre la viscosidad y el LF. Por otro lado, la importancia de la adición de los emulsionantes no es sólo tecnológica, sino también económica: de no usarse emulsionantes, el efecto “lubricante” de los mismos debería ser suplido agregando más MC. Este es el insumo más costoso en la fabricación del chocolate, y es aceptado que una parte de lecitina de soja añadida puede sustituir entre 9 y 10 partes de MC (14), así como una mezcla de 0,5 % de lecitina y 0,2 % de PGPR, permite una reducción de aproximadamente un 8 % de MC (31).

#### 1.4.3. Nuevas tendencias

En este contexto, y si bien la acción y eficiencia de la lecitina de soja es ampliamente conocida, la evaluación de nuevos emulsionantes es una temática en constante renovación para las áreas de investigación y desarrollo de la industria alimentaria. En ella están involucrados factores nutricionales (por ej., alimentos más saludables), aspectos científicos (por ej., modulación de sabores) y tecnológicos (por ej., optimización del contacto entre materias primas que permitan el uso de temperaturas más bajas) (40). En la gran mayoría de los casos, estos desarrollos están focalizados en el uso de moléculas anfipáticas de pequeño tamaño, generalmente derivados de moléculas de naturaleza grasa, entre los cuales la misma lecitina constituye el mejor ejemplo. Sumado a esto, el hecho que casi la

totalidad de la soja cultivada en todo el mundo es proveniente de organismos genéticamente modificados (OGM), hace que muchos países (principalmente en la Unión Europea) comiencen a interponer restricciones al ingreso de productos que incluyan ingredientes derivados de estos materiales manipulados genéticamente. De esta manera, el estudio de nuevos modificadores reológicos para el chocolate sin leche, pero siguiendo una tendencia de los últimos años en la industria alimentaria sobre la base del uso de moléculas poliméricas con actividad de superficie, representa un importante desafío. En forma genérica, los *surfactantes poliméricos* (*polymeric surfactants*), presentan características extra respecto de las moléculas pequeñas, que contribuyen a la estabilización de emulsiones y suspensiones a través de mecanismos adicionales. Para comprender estos mecanismos, es necesario comprender las bases del proceso de formación de emulsiones y suspensiones.

## 1.5. Teoría general de las emulsiones

### 1.5.1. Emulsiones con una de sus fases acuosa: composición, estructura y elección de los emulsionantes adecuados

La capacidad estabilizadora de emulsiones y suspensiones de un emulsionante está dada por las características fisicoquímicas de su molécula. Este aspecto encierra la característica más importante de las emulsiones: son estructuras de organización molecular inherentemente inestables. En su forma más simple, las emulsiones son sistemas bifásicos formados por dos líquidos inmiscibles. Uno de estos fluidos es dispersado (la *fase dispersa*) por acción mecánica en el otro (la *fase continua*) en forma de gotas microscópicas. Esta dispersión es termodinámicamente inestable y su existencia en el tiempo (o sea, su estabilización cinética) dependerá de la acción de los emulsionantes a través de sus propiedades anfífilas y su adsorción interfacial, tal como se expuso en la sección 1.4.2 para el chocolate. Desde el punto de vista tecnológico, la preparación de emulsiones ha sido generalmente reducida a dispersar una fase oleosa en el seno de una fase acuosa, obteniendo lo que se conoce como emulsión *o/w* (del inglés *oil-in-water*, aceite-en-agua, Figura 13-a). Esto también es así en la industria alimentaria, donde podemos citar como ejemplos relativamente simples a la mayonesa, y la crema de leche. La forma inversa, donde la fase continua es una fase oleosa donde se ha dispersado el

agua, es mucho menos común y se obtiene una emulsión *w/o* (*water-in-oil*, agua-en-aceite, Figura 13-b). Ejemplo de este tipo de emulsión es la manteca (41,42).

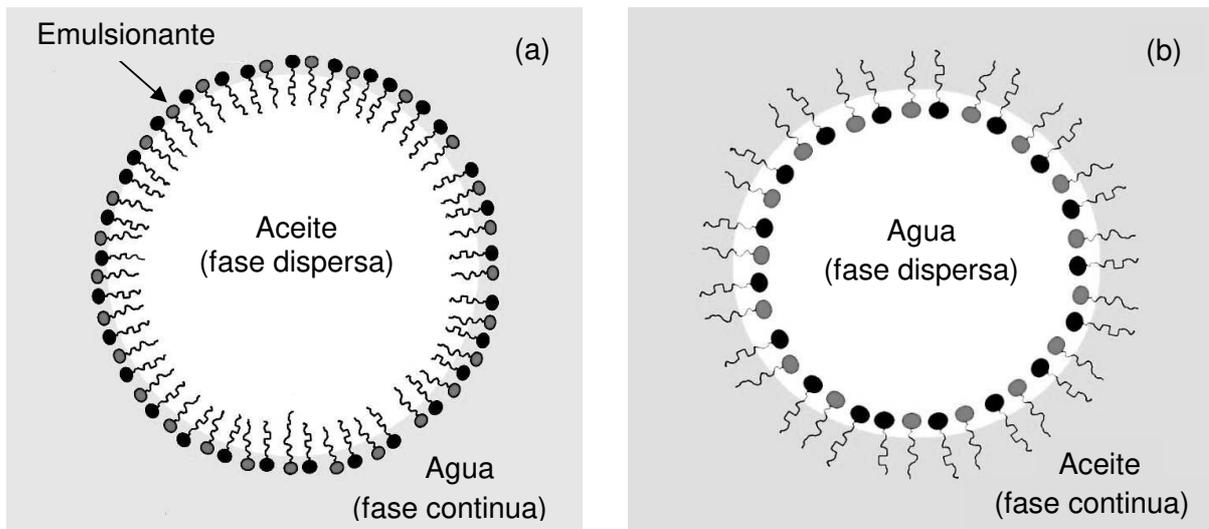


Figura 13. Representación muy esquemática de la estructura de emulsiones *o/w* (a) y *w/o* (b). Este tipo de representación es muy habitual en la literatura, pero en general no guarda las proporciones reales de tamaños. No obstante, es útil para entender la disposición que adoptan las diferentes partes de la molécula del emulsionante de acuerdo a su polaridad, cuando se adsorbe en la interface (ver Figura 11).

Como se ha mencionado anteriormente, los productos alimentarios en general constituyen las emulsiones más complejas y su estabilización siempre representa un desafío para los fabricantes de alimentos. En este contexto, la aplicación de agentes con actividad de superficie incluye su uso como estabilizador de textura espumosa en cremas para tortas, fortalecimiento de la masa en panificados, enturbiamiento en jugos de frutas, prevención de cristalización en aceites que forman parte de aderezos, antiadherentes en caramelos, regulación del empaquetamiento de las grasas cristalizadas en helados, realce del brillo en coberturas de confitería, etc. (32,43).

Al momento de seleccionar el emulsionante más adecuado, una de las primeras cuestiones que se plantean tiene que ver con el origen de las moléculas a utilizar. Así, durante más de 150 años de manipulación química de aceites y grasas, se han sintetizado emulsionantes no metabolizables (44). Por otro lado, en la búsqueda de emulsionantes naturales, se han extraído moléculas con actividad de superficie desde diversas fuentes naturales, así como también se han obtenido a partir de procesos biotecnológicos. Estas moléculas, a su vez, también han sido

manipuladas química o enzimáticamente para modificar sus propiedades emulsionantes y adaptarlas a requerimientos específicos.

Otra cuestión que se pone en juego a la hora de elegir un emulsionante, está relacionada con el mecanismo estabilizador. La bibliografía consultada revela que hasta los últimos 15 años, la gran mayoría de los trabajos sobre emulsionantes estuvieron focalizados en aquellas moléculas que ejercen su acción estabilizadora estrictamente a través de su adsorción interfacial, excluyendo aquellas que estabilizan emulsiones por viscosamiento de la fase continua.

Un tercer aspecto que contribuye a la selección de un emulsionante, está relacionado con la posibilidad de poder predecir, dentro de ciertos límites, qué tipo de emulsión se formará (Figura 13) y su consecuente estabilidad. En este sentido, los principales aspectos estudiados están relacionados con la fuerza iónica, el pH y la concentración de electrolitos, junto con aspectos termodinámicos y cinéticos. Dentro de estos estudios, pocas moléculas con actividad de superficie han sido clasificadas considerando en conjunto sus propiedades físicas y químicas, ya sea a través de la Regla de Bancroft, el número HLB (Balance hidrofílico – lipofílico; del inglés: hydrophilic - lipophilic balance) y la geometría molecular (45).

Muy brevemente, la *Regla de Bancroft* establece que la fase en la cual se disuelve el emulsionante, será finalmente la fase continua de la emulsión. De esta forma, la solubilidad del emulsionante determinará qué tipo de emulsión se formará: un emulsionante soluble en materiales oleosos, generalmente permitirá obtener una fase continua oleosa, y un emulsionante soluble en agua dará una fase continua acuosa. Esto fue establecido para surfactantes de bajo peso molecular (PM), aunque también puede ser utilizado para moléculas poliméricas. No obstante, siempre habrá algunas excepciones.

Por otro lado, el número HLB es una escala empírica basada en la comparación de las proporciones que existen en las distintas moléculas de emulsionante, de grupos funcionales hidrofóbicos e hidrofílicos. Generalmente, surfactantes con valores HLB entre 4 y 6, tienen más probabilidad de formar emulsiones w/o, mientras que aquellas moléculas cuyo valor HLB se encuentra entre 8 y 18, formarán más fácilmente emulsiones o/w.

La estabilidad de una emulsión es un fenómeno complejo, y su estudio involucra diversos aspectos que no siempre son observables en sistemas modelo. El desafío es mayor aún si se trata de sistemas reales, como los alimentos procesados. Así, además de la inestabilidad termodinámica inherente de las emulsiones, deben

agregarse otros aspectos tales como fuerzas de repulsión electrostáticas, impedimentos estéricos, otros componentes con actividad de superficie, estado físico de las fases constituyentes, tratamientos térmicos, etc. (46-48).

La desestabilización de una emulsión se puede producir a través de los siguientes mecanismos (Figura 14):

A – Inversión

B – Separación en forma similar a la “crema de leche” (Creaming)

C – Sedimentación

D – Floculación

E – Coalescencia

F – Maduración de Ostwald

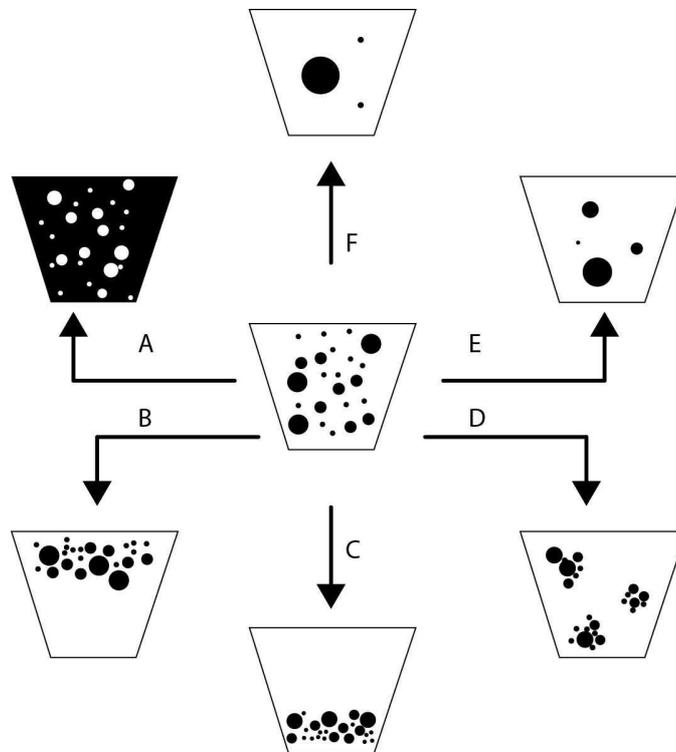


Figura 14. Mecanismos de desestabilización de emulsiones. A – Inversión, B – Separación en forma similar a la “crema de leche” (Creaming), C – Sedimentación, D – Floculación, E – Coalescencia, F – Maduración de Ostwald.

Estos mecanismos han sido muy bien estudiados y puede encontrarse una detallada explicación de cada uno en Tadros (49). La IUPAC define a un emulsionante como define a un emulsionante como “un agente surfactante que es positivamente adsorbido en las interfases y disminuye la tensión interfacial. Cuando está presente en pequeñas cantidades, facilita la formación de una emulsión, o

incrementa su estabilidad coloidal a través de la disminución concomitante o en forma separada de las velocidades de agregación y coalescencia” (46).

Estos elementos constituyen la base sobre la cual generalmente es posible predecir la formación, estabilidad, comportamiento reológico y propiedades de transporte de estos sistemas dispersos. Los aspectos generales y las propiedades más importantes de las emulsiones en las cuales una de las fases es el agua (las emulsiones tipo o/w ó w/o) han sido exhaustivamente caracterizados (41,42,49).

Sin embargo, la aplicación en tales sistemas no es tan directa, y sus resultados muchas veces no proveen el soporte predictivo por el cual fueron ideados. Es entonces relativamente simple comprender que su uso en sistemas no acuosos como el chocolate, implicará dificultades aún mayores, donde conceptos como concentración de electrolitos y pH generalmente no pueden ser aplicados.

#### 1.5.2. Emulsiones no acuosas y emulsionantes poliméricos

Existe otros tipos de emulsiones muchos menos comunes pero no por eso menos importantes, como son las emulsiones *w/w* (del inglés, *water-in-water*, agua-en-agua) y *o/o* (*oil-in-oil*, aceite-en-aceite). Estas últimas pueden aparecer en la literatura mencionadas también como **emulsiones no acuosas (ENA)** (*non-aqueous emulsions*), emulsiones anhidras (*anhydrous emulsions*), o emulsiones sin agua (*waterless emulsions*), y han sido de interés para el desarrollo de este estudio.

Cómo ya se ha mencionado, el chocolate es una suspensión de partículas sólidas polares e hidrofílicas (principalmente, azúcar) dentro del seno de una fase continua apolar y lipofílica (la manteca de cacao). Esta estructura se encuadra dentro de las dispersiones con la forma w/o, pero donde el agua está prácticamente ausente (ver sección 1.2.3.). Esta condición de anhidro, sumado a su elevada viscosidad propia del comportamiento pseudoplástico, y el color oscuro de la matriz chocolate, se presentan como obstáculos al momento de utilizar las herramientas analíticas que más comúnmente sirven de apoyo en las investigaciones donde están involucrados agentes emulsionantes. Como ejemplos podemos citar la reflectometría para el estudio de cinéticas de adsorción-desorción, donde es privativo el uso de soluciones acuosas y muy fluidas para su fácil circulación por las conexiones de pequeño diámetro de los equipos; y la microscopía óptica para el estudio de la microestructura resultante, donde el color oscuro no permite su uso.

En este sentido, las emulsiones no acuosas (ENA) se presentan como una muy buena opción para el estudio de los mecanismos involucrados en la acción estabilizadora de diferentes emulsionantes.

Sin embargo, las ENA son sistemas escasamente estudiados. Los primeros resultados fueron publicados hace aproximadamente 50 años, cuando Petersen y Hamill caracterizaron la preparación de emulsiones de este tipo para su uso en cosmetología (50). Más recientemente, las investigaciones se han dirigido hacia su estudio como transportadores de drogas en sistemas de liberación de fármacos (51,52). Relacionado a potenciales aplicaciones en productos alimenticios, esta escasez de investigaciones es aún mayor. Patel, Schmid, and Lawrence (53) estudiaron ENA obtenidas con componentes de uso permitido en alimentos. Así, reemplazaron el agua con glicerol y propilenglicol (PG) como fases polares no acuosas, usando lecitina de soja como emulsionante. Con este diseño experimental, lograron obtener las ENA más estables cuando se dispersó la fase oleosa en una fase continua de propilenglicol, por lo que se dice que se obtuvo una emulsión del tipo *aceite-en-PG*. La estabilidad de estas emulsiones dependió de la solubilidad de la lecitina en la fase PG, lo cual está de acuerdo con lo establecido por la Regla de Bancroft (ver sección 1.5.1). Sin embargo, un aspecto importante a tener en cuenta es el hecho que esa mayor estabilidad se logró con la adición de un co-surfactante al sistema (53).

Como en el ejemplo anterior, se puede encontrar en la literatura que **casi invariablemente las ENA han sido producidas y estabilizadas a través del uso de moléculas anfifílicas relativamente pequeñas**, con las que el mecanismo de estabilización depende generalmente de la adsorción del emulsionante a la interfase producida entre las fases continua y dispersa. Este fenómeno, provoca una disminución en la energía libre de interfase, evitando la coalescencia de las gotas y consecuentemente la separación de fases.

Sin embargo, también se han usado moléculas poliméricas para obtener ENA estables, aspecto que se ha visto favorecido por la mayor inestabilidad que inherentemente presentan las ENA comparadas con las emulsiones acuosas: las ENA pueden necesitar mecanismos de estabilización adicionales que afecten principalmente la velocidad de coalescencia de las gotas de la fase dispersa, ya que la adsorción interfacial del surfactante puede no ser suficiente. De esta manera, la posibilidad de que las gotas dispersas puedan viajar, encontrarse, fusionarse y coalescer, podrá ser restringida si se incrementa la viscosidad de la fase continua.

Una de las formas más simples de llevar adelante este efecto cinético, es a través del uso de polímeros de diversos tipos: *esta ha sido la base del uso de polímeros como estabilizadores de emulsiones, ya sean estas acuosas o no acuosas.*

De un tiempo a esta parte, se han desarrollado numerosos polímeros con actividad de superficie para ser utilizados en el campo de la estabilización de emulsiones, en la mayoría de los cuales se pueden reconocer al menos dos mecanismos a través de los cuales logran este efecto: uno termodinámico (a través de la reducción de la energía libre de interfase) y otro cinético (a través del incremento de la viscosidad de la fase continua, que produce disminución de la velocidad de coalescencia de las gotas de la fase dispersa).

Este desarrollo de moléculas poliméricas está basado en la gran potencialidad de muchas macromoléculas de ser manipuladas químicamente, permitiendo el agregado de grupos funcionales a voluntad sobre la cadena polimérica principal. De esta manera, dentro de ciertos límites es posible manipular a voluntad la polaridad de un emulsionante, de acuerdo a requerimientos específicos.

Por otro lado, la mayor parte de las investigaciones sobre ENA se ha realizado sobre emulsiones en las que la fase dispersa *es la menos polar*, de lo que se desprende que la fase continua será la de mayor polaridad. Esta fase continua en general será menos viscosa, y tendrá menor capacidad de estabilizar la emulsión a través del mecanismo cinético antes descrito.

Considerando estos aspectos y los conceptos involucrados en la Regla de Bancroft y el número HLB, se han evaluado dos aproximaciones para la obtención y estabilización de ENA (54,55):

- Diseño de surfactantes cuya molécula cuente con dos porciones estructuralmente incompatibles, cada una soluble selectivamente en uno de los dos líquidos inmiscibles involucrados en una emulsión.
- Hallar líquidos polares inmiscibles con fases oleosas, que puedan servir de reemplazo del agua. Como una característica adicional, estos líquidos deberían mostrar compatibilidad con emulsionantes de demostrada solubilidad en líquidos polares.

### 1.5.3. Estructura modificable de los emulsionantes poliméricos y etilcelulosa como polímero hidrofóbico comestible con actividad de superficie.

La EC representa un emulsionante polimérico casi único si se tienen en cuenta tres características esenciales: su carácter comestible, su actividad de superficie y sus propiedades hidrofóbicas que le otorgan la posibilidad de disolverse en aceites y grasas de uso culinario. Existe una variedad interesante de polímeros hidrofóbicos, pero muchos de ellos no son aptos para uso alimentario, y a pesar de disolverse en aceites y grasas no siempre presentan actividad de superficie, lo cual no los habilita para ser usados como estabilizadores de emulsiones.

Son las características estructurales de la molécula de EC las que le otorgan estas propiedades, y para poder entender su origen es necesaria una breve descripción general comparativa con otros polímeros. De esta manera, un *homopolímero* es aquel cuyos monómeros son todos idénticos. Por otro lado, un *copolímero* es sintetizado usando dos o más monómeros diferentes. Los copolímeros tienen propiedades especiales que son alcanzadas a través de la combinación de las características de sus monómeros individuales. Adicionalmente, estas propiedades no dependen únicamente de la naturaleza química de sus monómeros, sino también de su configuración. Debido a esto, los copolímeros son frecuentemente clasificados dentro de cuatro categorías: alternado, al azar, en bloque y de injerto (Figura 15).

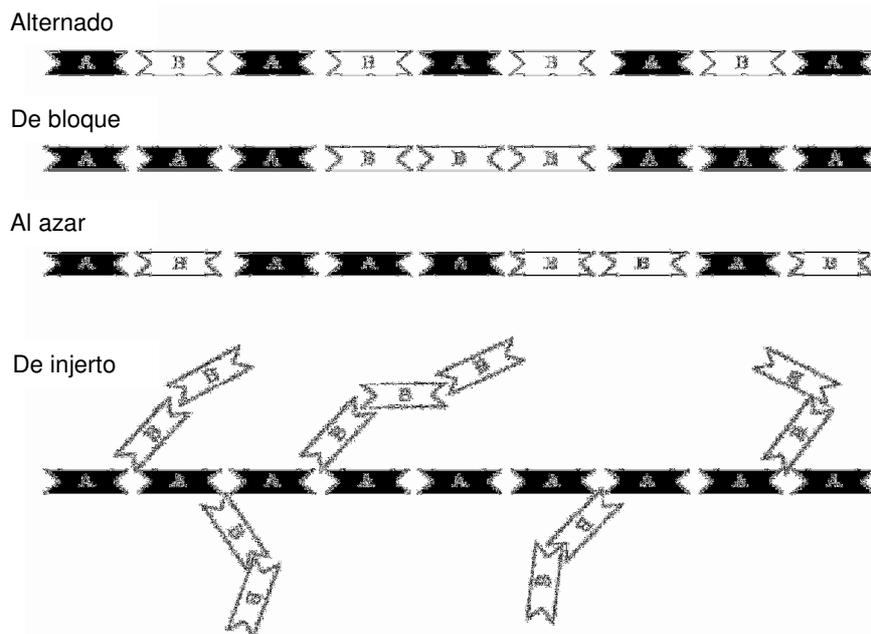


Figura 15. Estructura de los copolímeros según la disposición de sus monómeros en la molécula.

Los copolímeros de injerto (del inglés: *graft*) y de bloque (del inglés: *block*) han sido los polímeros más usados en estabilización de ENA (54,56,57). Los copolímeros de bloque son macromoléculas formadas por bloques dispuestos en secuencia lineal. Cada bloque es una porción definida que tiene algunas características diferenciales con respecto a los bloques adyacentes. De esta forma, si A y B son dos bloques poliméricos diferentes, su disposición en la molécula puede ser AB (copolímero dibloque) y ABA o BAB (copolímeros tribloque). Por su parte, los copolímeros de injerto son polímeros en los que uno o más bloques poliméricos están unidos a una cadena principal de la macromolécula, formando un polímero ramificado.

Estas ramificaciones pueden tener diferentes propiedades respecto de la cadena principal, haciendo que el polímero sea susceptible de ser intervenido químicamente para modificar su anfipaticidad. Ya sea en polímeros de injerto o polímeros de bloque, numerosos “bloques poliméricos” han sido usados en la confección de surfactantes poliméricos, en diferentes combinaciones y longitudes. (44, 54, 56, 58-61).

Sin embargo, en muchos casos su eficiencia no ha sido total, y desde hace un tiempo ha comenzado a ponerse atención a la síntesis de nuevos polímeros de injerto para ser usados como emulsionantes (46,57,60). Entre ellos se encuentran diversos *ésteres de celulosa*. Entre los de naturaleza hidrofílica, quizás el más estudiado en su capacidad emulsionante en el área farmacéutica, ha sido la *hidroxipropil metilcelulosa (HPMC)* o “hipromelosa” (62-64). Entre los de naturaleza hidrofóbica, sobresale la EC. Como los demás ésteres, la EC deriva de la celulosa, un polímero natural formado por la unión de restos de glucosa a través de enlaces  $\beta$  (1-4) (Figura 16).

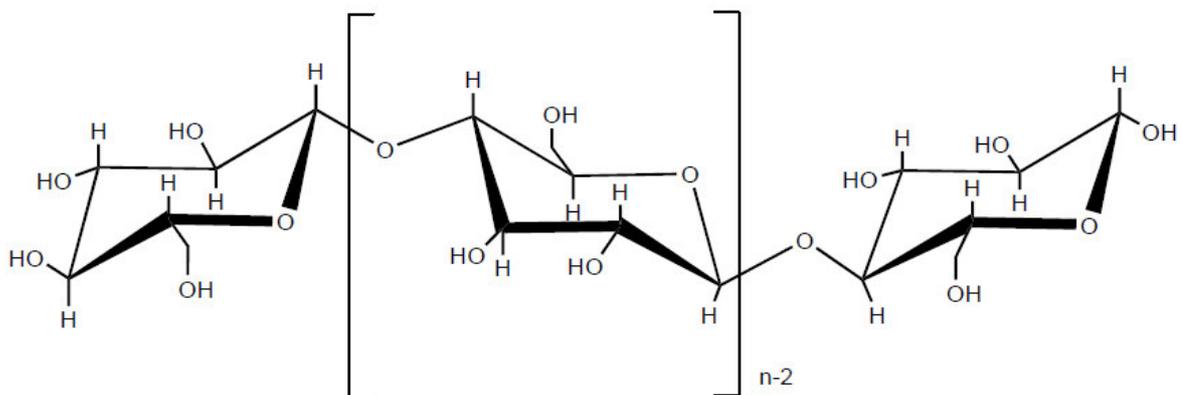


Figura 16. Estructura química de la celulosa.

Cada anillo de glucosa, tiene tres grupos hidroxilo que pueden reaccionar para dar una estructura “injertada”. Al insertar grupos hidrofílicos, la estructura resultante tendrá mayor capacidad de retención de agua y experimentará hinchazón en medios acuosos. Por otro lado, si a la cadena principal se le introducen grupos más lipofílicos, le proporcionarán mayor actividad de superficie a la molécula resultante. Así, cuando la celulosa es tratada con cloruro de etilo bajo determinadas condiciones, la reacción dará etilcelulosa (Figura 17). En este caso, el grado de sustitución estará determinado por las condiciones de reacción y la relación entre los reactantes (44).

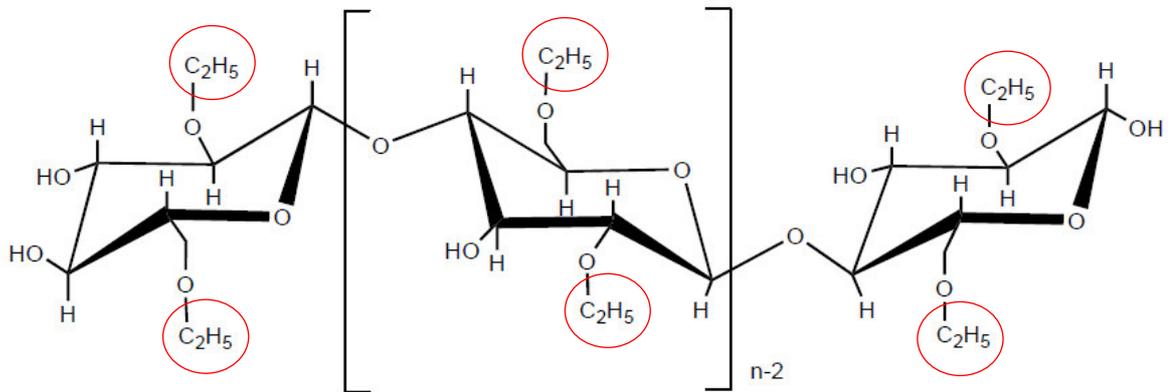


Figura 17. Estructura química de la etilcelulosa.

La EC ha sido evaluada en sus propiedades para desarrollos en el área alimenticia y en el área farmacéutica, aunque esas aplicaciones en la gran mayoría de los casos fueron a altas concentraciones, en manufactura de micropartículas (65) o como agente estructurante en aceites líquidos de origen vegetal (66-69). Mucho menos explorado ha sido su uso a bajas concentraciones como estabilizador de suspensiones y emulsiones, y en esos casos la mayor parte se realizó en sistemas de base acuosa (44,46,57).

La conjunción de estos aspectos, derivados de la hidrofobicidad de su molécula como característica estructural sobresaliente, presentaba a la EC como un potencial agente estabilizador de la suspensión chocolate (de acuerdo a la Regla de Bancroft) y representó la base de este estudio.

Sin embargo, las investigaciones mencionadas demostraban que más allá de su actividad interfacial, la estabilidad de las emulsiones preparadas con EC puede no sólo deberse a la adsorción interfacial del polímero. Un segundo efecto estabilizador puede estar derivado de su solubilidad en aceites, por lo cual actuaría

como un espesante de la fase continua en emulsiones w/o, evitando su ruptura a través de estabilización estérica (60). Imágenes obtenidas a través del microscopio electrónico de transmisión (TEM), sugieren que en ciertas emulsiones, la EC coloidal precipita en la interfase (46), con la consecuente estabilización de esas emulsiones. Este tipo de sistemas suele clasificarse como “emulsiones estabilizadas por sólidos”, o “emulsiones Pickering”.

Lo anterior permite ver que puede ser difícil desentrañar el mecanismo por el cual la EC ejerce su acción estabilizadora en determinados sistemas, más aún si se trata de sistemas complejos como los alimentos.

## 1.6. Polimorfismo cristalino y transición líquido – sólido del chocolate durante el temperado.

1.6.1. Composición química de la manteca de cacao como base de su comportamiento cristalino.

Cómo se mencionó brevemente en la sección 1.2.4, la solidificación de los lípidos se produce a través de la cristalización ordenada de sus TG constituyentes, pudiendo existir para una misma composición química, entidades sólidas con diferentes ordenamientos cristalinos, o *polimorfos*. El tipo, número y estabilidad de polimorfos que pueden obtenerse, dependerá de la composición en ácidos grasos (AG) de esos TG, el largo de su cadena hidrocarbonada y de su posición en la molécula de glicerol (Figura 18); así como de varios agentes externos tales como temperatura, presión, solvente, velocidad de cristalización e impurezas, entre otros.

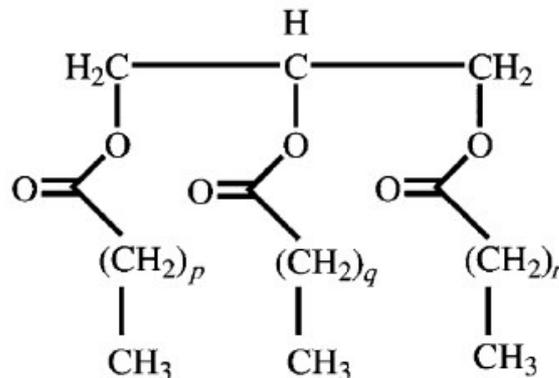


Figura 18. Esquema de la estructura química de un triglicérido saturado. Los tres residuos de ácido graso pueden tener diferentes longitudes, representadas por p, q y r (15).

De acuerdo a esto y debido a su composición en TG, las grasas en su gran mayoría presentan tres formas polimórficas diferentes, llamadas  $\alpha$ ,  $\beta'$  y  $\beta$  en orden creciente de estabilidad, según la clasificación de Larsson (70). Comparada con la mayoría de las grasas, la MC presenta una composición en AG relativamente simple, dado que sólo tres representan algo más del 95 % de sus AG: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1), simbolizados aquí como P, S (del inglés: stearic) y O.

Esto hace que la composición en TG de la MC también sea simple, pero además muy específica: más allá que se pueden identificar entre 40 y 50 TG diferentes en la MC, la mayoría de los TG tendrán la forma *ácido graso saturado – O – ácido graso saturado*, y dentro de esta distribución, predominan las formas POS (35 %), SOS (23 %) y POP (15 %) (15,71).

Esta escasa variabilidad en sus TG, permite que estos puedan empaquetarse de diferentes maneras en la red cristalográfica, cada vez más compactados según el proceso térmico a que se los someta, dando lugar a la posibilidad de cristalizar hasta en seis formas cristalinas diferentes, cada una con su rango de fusión definido, tal como se muestra en la Tabla I:

Tabla I. Formas polimórficas de la manteca de cacao. Diferentes nomenclaturas, puntos de fusión y empaquetamiento de las cadenas de TG (12).

Willie y Lutton	Larsson	PF (°C)	Empaquetamiento
Forma I	$\beta'$ 2	16 – 18	Doble
Forma II	$\alpha$	21 – 22	Doble
Forma III	Mezcla de II y VI	25,5	Doble
Forma IV	$\beta'$ 1	27 – 29	Doble
Forma V	$\beta$ 2	32 – 34	Triple
Forma VI	$\beta$ 1	34 – 36	Triple

El polimorfismo de los TG es monotrópico, lo cual significa que sólo uno de los polimorfos es estable, y el menos estable siempre termina transformándose en el más estable (72). Así, las formas I a la IV son las más inestables, y pueden obtenerse bajo determinadas condiciones. La forma I rápidamente se transforma en la II, y ésta en la III y IV, aunque a velocidades más lentas. Como un ejemplo, si a un

chocolate todavía líquido a 30 °C, se lo somete a un enfriamiento con corriente de aire a unos 13 °C durante 15 minutos, la forma IV será el principal tipo de cristal que se halle presente en el chocolate sólido. Esta forma polimórfica es relativamente blanda, por lo que el chocolate no tendrá un buen “chasquido” (del inglés “snap”) al quebrarse, uno de los parámetros de aceptación más importante a nivel del consumidor. Por otro lado, el polimorfo IV en unos pocos días se transformará en la forma V. La Difracción de Rayos X (DRX) permite identificar los diferentes polimorfos a partir de la forma II, generándose *patrones de difracción* como los que se muestran en la Figura 19.

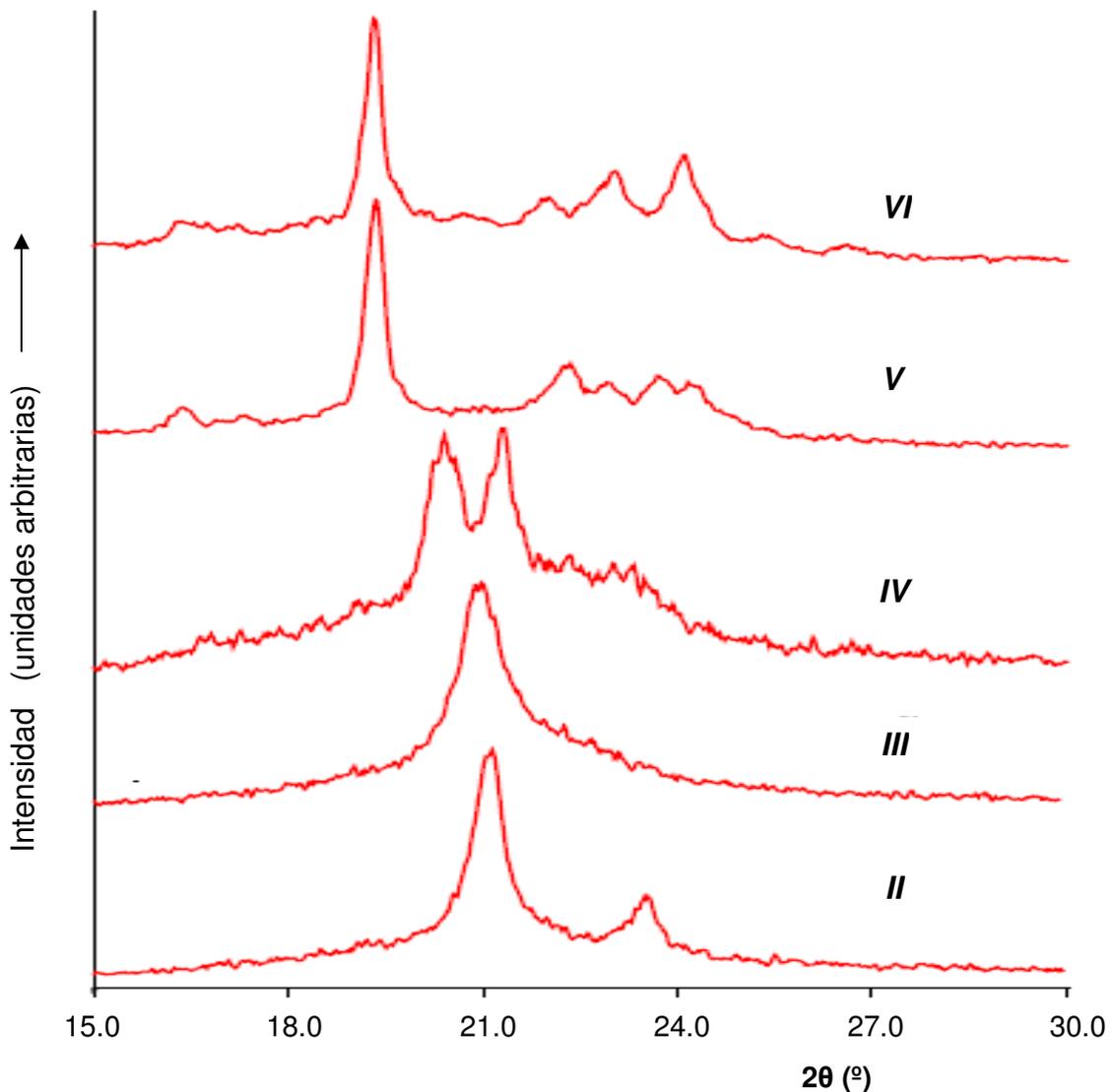


Figura 19. Polimorfos de la manteca de cacao y su identificación por DRX (modificado de la referencia 15).

De esta manera, es posible el seguimiento de la evolución de estas transiciones, aunque esto dependerá de las diferentes configuraciones

instrumentales de los difractómetros. Las formas V y VI (o las formas  $\beta$ ) son las más estables en la manteca de cacao. Cuando el temperado se realiza de manera correcta (esto es, a través de un ciclo de temperatura – tiempo diseñado y seguido de manera precisa), se obtiene un chocolate con la forma polimórfica V, ya que la forma VI es difícil de obtener en las condiciones del proceso habitual (71,12).

#### 1.6.2. Transiciones polimórficas y desarrollo del florecimiento graso (*fat bloom*).

Todas las transformaciones polimórficas que se han mencionado, ocurren con un reacomodo de los TG cada vez más compacto y en consecuencia más estable. No obstante, en todo momento durante el proceso térmico hay una parte de esa grasa que permanece líquida (aunque no pueda percibirse macroscópicamente), y al producirse ese empaquetamiento cada vez más compacto esos TG líquidos no pueden acomodarse en la red cristalina y son segregados desde el centro de la pieza de chocolate hacia la superficie, donde en un determinado momento cristalizarán. Esto se percibe visualmente como un polvo blanco-amarillento, que incluso puede parecer un chocolate que ha desarrollado mohos; no obstante se trata de cristales de grasa segregada (Figura 20). Este fenómeno se conoce como *floreCIMIENTO graso* o *eflorescencia graso* (del inglés *fat bloom*), y representa la mayor causa de pérdidas económicas en la industria del chocolate.

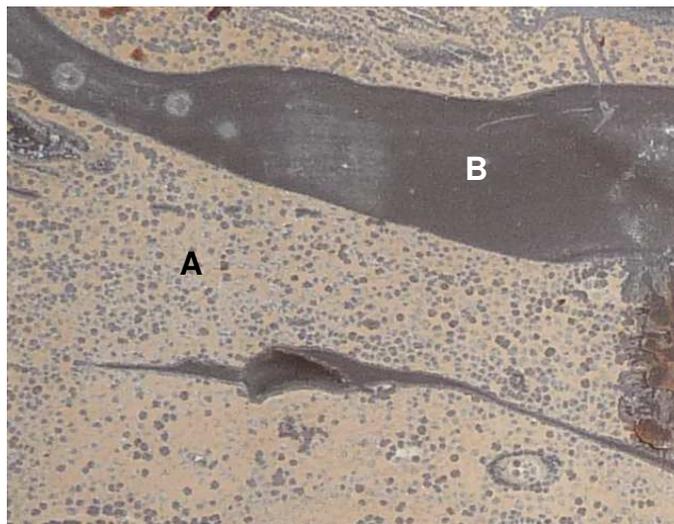


Figura 20. Porción de una tableta de chocolate donde se muestran zonas con desarrollo de fat bloom (A) junto a zonas sin desarrollo (B).

Así, la forma polimórfica V (o comúnmente llamada,  $\beta$ -V) es la más buscada y el proceso de temperado se diseñará para obtenerla. El chocolate bien temperado, tendrá buen brillo, buena resistencia al fat bloom, buena contracción para un correcto desmolde y buen chasquido al quebrarlo (12). No obstante, la transformación  $V \rightarrow VI$  es un proceso inevitable en la actualidad, acompañada del desarrollo de fat bloom. Si bien este cambio polimórfico es cinéticamente poco favorable (puede llevar meses en condiciones de almacenamiento adecuadas), se acelera en chocolates con almacenamiento defectuoso, como por ejemplo que hayan estado al sol o en ambientes donde en algún momento del día sufren altas temperaturas; o que han tenido un temperado incorrecto. De esta manera, un chocolate bien temperado pone de manifiesto el aspecto más especial de la MC: el rango de fusión del polimorfo  $\beta$ -V es muy estrecho, a comparación de la gran mayoría de las grasas, haciendo que funda muy rápidamente y a una temperatura justo entre la temperatura ambiente y la de la boca (73).

En el proceso de producción, los eventos del temperado se dan en dos etapas. Primero, durante la *pre-cristalización*, se produce el temperado<sup>c</sup> propiamente dicho (esto es: el enfriado de la masa del chocolate proveniente del concado). Esta etapa puede eventualmente ser inducida por la adición de diferentes aditivos, que apuntan a regular la reología de la masa del chocolate mientras se enfría, acelerando el proceso de cristalización. La acción de cristalizar la MC mientras la masa entera del chocolate se está agitando, se conoce como *cristalización dinámica*. Segundo, durante la *cristalización final*, se produce el endurecimiento de toda la masa del chocolate (74).

Como se estableció en la descripción de la etapa de concado, la eficiencia de los eventos producidos durante el mismo tendrá impacto en el temperado (9,75). Así, con el uso de emulsionantes novedosos, que si bien pueden ser totalmente eficientes en su rol de modificadores reológicos, se debe evaluar la posibilidad que eventualmente puedan facilitar o desestabilizar el correcto ensamble de la red cristalina de los TG (29). Toma aquí importancia el concepto de “*materiales minoritarios*”, donde determinadas moléculas, muchas veces en muy pequeñas concentraciones e incluso a veces no intencionalmente presentes en el material a cristalizar, pueden afectar marcadamente la obtención del polimorfo más estable. Si esto ocurre, el principal impacto se traducirá en el retardo o la aceleración de la aparición del fenómeno de fat bloom.

---

<sup>c</sup> Del inglés *temper*: templar, moderar. Usado como sinónimo de *quenching*: enfriar.

## 1.7. Manteca de cacao y chocolate como vehículos de principios activos.

La posibilidad de utilizar el chocolate como vehículo de principios activos con actividad biológica o bien principios activos farmacéuticos, ha sido atractiva en diferente magnitud a lo largo del tiempo, relacionado generalmente a su capacidad de enmascarar sabores agresivos (76-79). Quizás su principal obstáculo, haya sido su “baja popularidad nutricional”, considerando su alto contenido en grasas y azúcares (aproximadamente 30 % y 45 % respectivamente), que haría inviable la administración de un medicamento diseñado para cubrir un tratamiento largo y con numerosas tomas diarias.

No obstante, continúa generándose investigación relacionada a este tema, principalmente en lo que hace a *principios activos naturales* que provienen del grano de cacao y a los que tradicionalmente se les ha asignado un rol beneficioso para la salud: los polifenoles y su conocida actividad antioxidante *in vitro* (80-84). Sin embargo, no existen estudios definitivos sobre su acción antioxidante en humanos, o los existentes generan no pocas críticas acerca de su falta de planificación o diseño defectuoso (85). No debe dejar de observarse que la mayoría de esos estudios cuentan con el apoyo de empresas fabricantes de chocolates y productos del cacao, lo cual transforma a esos estudios en al menos discutibles.

Por otro lado, la posibilidad de utilizar al chocolate o la manteca de cacao como vehículos para diferentes principios activos farmacéuticos, no cuenta con tanta popularidad (si bien la MC es un excipiente muy usado en la industria farmacéutica), y la revisión bibliográfica arroja escasos y antiguos resultados (76,77). Así, estos *principios activos añadidos*, generalmente son moléculas de naturaleza hidrofóbica y muchas veces pasibles de acción hidrolítica, para los cuales la fase grasa del chocolate representa un aspecto atractivo por su composición y consecuente comportamiento térmico.

### 1.7.1. Principios activos añadidos al chocolate: estrategias de formulación para fármacos poco solubles en agua.

La industria farmacéutica enfrenta desde hace un tiempo, el desafío que representan los fármacos poco solubles en agua y la afectación que esto produce a su acción terapéutica (86). Uno de esos fármacos es el *mebendazol* (MBZ, Figura

21), un antiparasitario muy difundido de uso humano y animal, de probada eficacia contra un amplio espectro de helmintos.

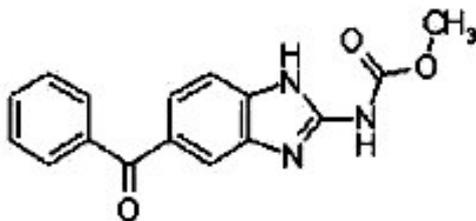


Figura 21. Estructura química del MBZ (87).

Sin embargo, la molécula de MBZ tiene la propiedad de cristalizar en tres polimorfos diferentes en determinadas condiciones, denominados A, B y C. El principal inconveniente de este fenómeno, radica en que el de mayor potencia terapéutica (el polimorfo C) es el menos soluble, y de los otros dos, el A es inactivo mientras que el B tiene descritos efectos tóxicos, más allá que presenta buena acción terapéutica. Sumado a esto, el polimorfo A es el más abundante y estable, por lo que la transformación del C en A es un evento energéticamente favorable (88). Como en el caso de la MC, la DRX permite la identificación de estos polimorfos en el MBZ (Figura 22).

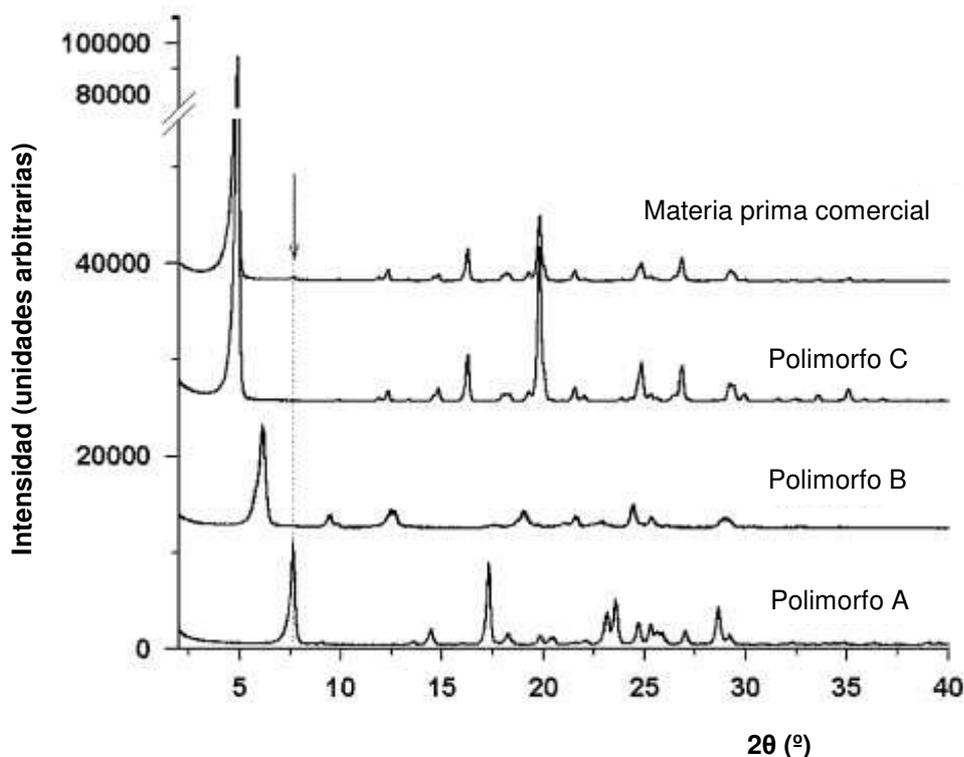


Figura 22. Difractogramas de los tres polimorfos puros del MBZ, comparado con el obtenido para una materia prima comercial. La flecha indica una pequeña cantidad de la forma A en la muestra comercial (modificado de la referencia 89).

En el área farmacéutica esta metodología analítica se ha transformado en una herramienta esencial para la detección de preparaciones que presentan problemas asociados a esta arista de las propiedades moleculares.

Asociado a esto, el MBZ es prácticamente insoluble en agua y de muy baja solubilidad en un amplísimo abanico de solventes, incluidos algunos de los menos polares conocidos (90). De hecho, la forma más simple de disolverlo es en ácido fórmico concentrado. Por otro lado, sólo entre el 5 % y el 10 % de la droga ingerida es absorbida a nivel intestinal. Esa absorción mejora si es ingerido junto con alimentos, y más aún si esos alimentos son de base grasa (91). Por último, este fármaco tiene un fuerte sabor amargo, característica no menor si se considera que los principales afectados al tratamiento con antiparasitarios son los niños.

Considerando todos estos aspectos, el chocolate representa una atractiva opción para la vehiculización de este fármaco.

#### 1.7.2. Principios activos añadidos al chocolate: fármacos solubles en aceites y grasas, con problemas de fotosensibilidad y dosificación.

El *altrenogest* es un progestágeno sintético de uso veterinario, y se utiliza como regulador del ciclo estral en ganado porcino y equino (Figura 23).

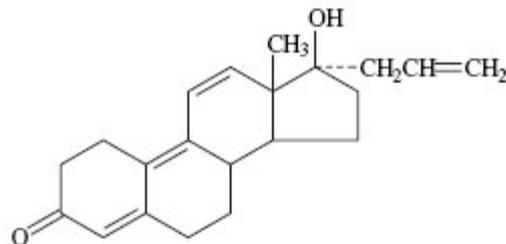


Figura 23. Estructura química del altrenogest (92).

Presenta una buena solubilidad en materias grasas; de hecho, su presentación comercial habitual es una solución del principio activo en aceites comestibles, cuyo envase se encuentra provisto de un sistema de dosificación que permite entregar el volumen medido que contiene la cantidad del fármaco necesario para una dosis.

La molécula de este principio activo presenta una marcada fotosensibilidad, característica que junto a su presentación comercial habitual en forma líquida, suelen representar en diversa medida desventajas para el personal encargado del

tratamiento de los animales en criaderos. Estas desventajas y algunas otras, están dadas fundamentalmente por el sistema de dosificación, ya que en algunas presentaciones donde el recipiente está provisto de manguera, no sólo puede producirse una exposición del contenido demasiado prolongada a la luz, sino que esa manguera no permite una adecuada higienización post-dosificación, facilitando el enranciamiento del aceite vehículo. Relacionado a esto, y ya considerando el tamaño de dosis, la entrega de la solución líquida se hace sobre el alimento de los animales, o bien directamente en la boca de los mismos. Si se tiene en cuenta que en algunos criaderos puede haber hasta más de un centenar de animales, es muy difícil evaluar si el animal ha ingerido la totalidad de la dosis.

Varios de estos aspectos pueden ser mejorados a través de la dosificación de este principio activo en manteca de cacao o incluso chocolate.

## 2. ANTECEDENTES

Los emulsionantes son esenciales para la fabricación del chocolate, y si bien se investiga constantemente sobre nuevas moléculas con actividad de superficie, hay aspectos aún desconocidos que pueden acelerar el deterioro del producto con consecuentes pérdidas económicas.

Adicionalmente, el creciente número de consumidores que optan por alimentos que no contengan derivados de OGM, ha planteado encontrar alternativas al uso de la lecitina de soja.

Finalmente, el desarrollo y uso de surfactantes poliméricos es una tendencia en la industria farmacéutica que gradualmente está abarcando a la industria alimentaria, estudiándose principalmente en la estabilización de emulsiones acuosas.

Por lo expuesto, nos planteamos estudiar el sistema chocolate, para incrementar el conocimiento en el uso de surfactantes poliméricos sobre sistemas anhidros y para aportar soluciones tecnológicas para la fabricación de este alimento.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Estudiar y caracterizar las interacciones que se establecen entre emulsionantes y sistemas lipídicos complejos como manteca de cacao y chocolate, evaluando su efecto sobre propiedades reológicas y del estado sólido, y el impacto sobre la estabilidad de principios activos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de diferentes mezclas de emulsionantes en las propiedades de cristalización de la manteca de cacao, a fin de adquirir conocimientos básicos que puedan ser aplicados a predecir el comportamiento del producto final respecto de su estabilidad frente al florecimiento graso (*fat bloom*).
- Caracterizar el impacto de emulsionantes sobre el comportamiento reológico de la masa de chocolate sin leche en las etapas de concado y temperado, evaluando principalmente el impacto sobre los parámetros viscosidad y límite de fluencia.
- Explorar los mecanismos a través de los cuales las moléculas evaluadas producen la estabilización de la suspensión chocolate, aplicándolas a sistemas anhidros más simples como las emulsiones no-acuosas.
- Estudiar el efecto de modificaciones en la composición o en el proceso de fabricación por el uso de diferentes emulsionantes, sobre la estabilidad de distintos principios activos añadidos al chocolate o manteca de cacao.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

- *Chocolate sin leche, sin emulsionante*: estas muestras fueron provistas por la firma Arcor. Se prepararon en planta piloto siguiendo las condiciones de elaboración establecidas para su producto comercial de estas características, pero con modificaciones. Brevemente, el chocolate fue refinado y concado (24 h a 60 °C), pero no se le agregaron emulsionantes y no fue temperado. La composición de estas muestras se detalla en la Tabla II:

Tabla II. Composición porcentual del chocolate sin leche y sin emulsionantes usado en esta tesis.

Ingrediente	Proporción (%)
Azúcar	44,4
Licor de cacao	46,3
MC	9,3

Posteriormente, a estas muestras se adicionaron los emulsionantes evaluados.

- Manteca de cacao: de uso en la industria, provista por la empresa Arcor.
- Lecitina de soja (Solae) y PGPR (Danisco): emulsionantes provistos por la empresa Arcor.
- Etilcelulosa (EC): Ethocel™ Standard Premium 10, 20, 45 y 100 (denominación comercial que hace referencia a cuatro productos de viscosidades distintas), con un contenido de etoxilo entre 48,0 % y 49,5 % (según información del proveedor). Provistos por Dow Chemicals, Brasil.
- Triglicéridos de cadena media (TCM): Neobee™ M-5. Este aceite contiene 98 % de una mezcla de los ácidos octanoico (Nombre común: caprílico; C 8:0; 66 % en el TCM) y decanoico (Nombre común: cáprico; C 10:0; 32 % en el TCM). (Stepan Co., USA).
- Aceite comestible puro de soja: Sojola® (AGD, Argentina). Adquirido en comercios locales.
- Propilenglicol (PG): Calidad: para análisis. Cicarelli (Rosario, Argentina).

- Azul de metileno: Calidad: para análisis. Cicarelli (Rosario, Argentina).

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Preparación de las muestras.

Se diseñó de manera tal que los procesos usados en el laboratorio imitaran lo más fielmente posible los procedimientos industriales de concado y temperado. Para esto se tomó como base la norma estandarizada de la International Confectionery Association (ICA), Analytical Method 12 – Manufacturing Process of Small Scale Chocolate Samples (93); así como la experiencia en escala piloto del personal del área Desarrollo de la firma Arcor.

#### 4.2.1.1. Procedimiento para la adición de emulsionantes y principios activos farmacéuticos a chocolate y MC.

La mezcla emulsionante EC-TCM, la lecitina de soja y los principios activos evaluados, fueron agregados al chocolate sin emulsionante (sección 4.1.) y a la MC, fundidos a 55 °C. La mezcla se homogeneizó durante 2 horas a esa temperatura en un mezclador de paletas, a 20 r.p.m.

#### 4.2.1.2. Procedimiento para el temperado manual, moldeado y desmolde de chocolate, MC y sus mezclas con principios activos farmacéuticos.

Este procedimiento se diseñó para la obtención del polimorfo  $\beta$ -V en todas las muestras mencionadas.

El chocolate se fundió totalmente a 50 °C, para eliminar todos los cristales de grasa. Siempre removiendo la masa, se enfrió a 29 °C en un primer baño de agua con hielo ( $T_{\text{baño 1}} \approx 18$  °C). Sin dejar de remover la masa, se llevó hasta 29,5 / 29,7 °C en un segundo baño de agua ( $T_{\text{baño 2}} \approx 30$  °C). Se vertió el chocolate en el molde precalentado a 25 °C. El molde se colocó en heladera, luego en freezer, y por último nuevamente en heladera; durante 10 min en cada caso. Finalmente se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min y se desmoldó. Luego de envolverlo en papel de aluminio, se conservó entre 20 y 25 °C hasta su análisis.

Los eventos involucrados en el temperado se resumen en el esquema siguiente (Figura 24).

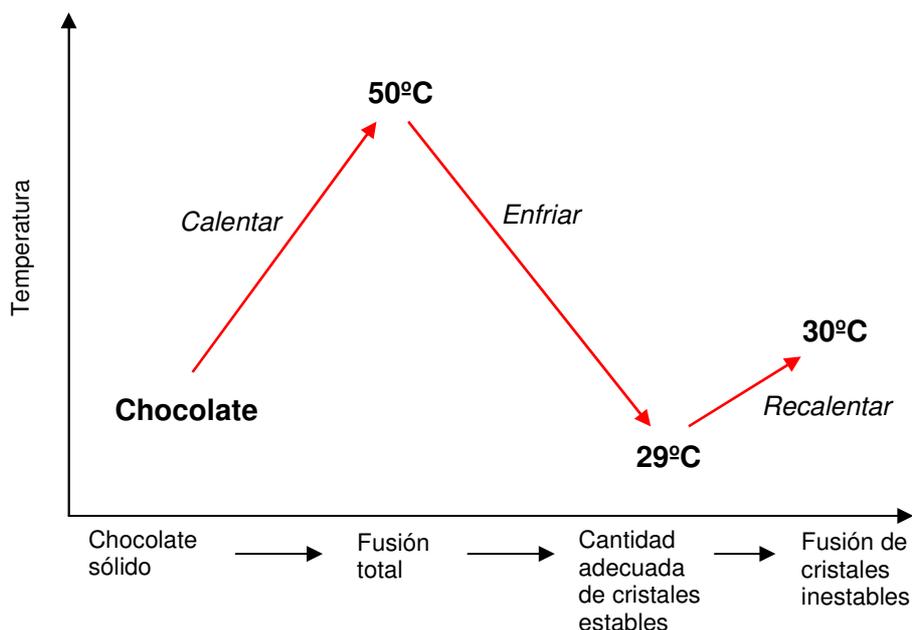


Figura 24. Secuencia de temperado para la cristalización de la MC en el chocolate (modificado de la referencia 11).

#### 4.2.1.3. Preparación de las muestras para DRX de polvos.

Para estas determinaciones, las muestras temperadas según el método descrito en la sección 4.2.1.2, debieron ser reducidas de tamaño. De esta manera, se uniformiza el tamaño de partícula y se busca reducir el fenómeno de orientación preferencial (Capítulo 4, sección 5.4.1). Para lograr esto, las muestras fueron ralladas y depositadas en los portamuestras del equipo evitando su compactación.

#### 4.2.1.4. Preparación de las soluciones (mezcla emulsionante y EC para cobertura) y oleogeles de EC en TCM y aceite de soja.

Para obtener una suspensión homogénea, la EC junto con cada uno de los aceites evaluados, fueron calentados durante 5 min con agitación magnética constante. La plancha de calentamiento está provista de sonda digital para el control de la temperatura, y fue previamente estabilizada a 90 °C. Luego de este tiempo, la temperatura se incrementó hasta alcanzar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de la EC (entre 130 °C y 150 °C, dependiendo del PM del polímero), lo cual ocurrió aproximadamente a los 10 min. De acuerdo a nuestra experiencia, todos los

polímeros de EC evaluados en este trabajo, en 50g de mezcla con los aceites, dieron una solución clara en menos de 5 min luego de que la Tg fuese alcanzada.

Las soluciones con una concentración mayor al 6 % de EC, y que generaron oleogeles, fueron trasvasadas en caliente y los recipientes llevados a una estufa de incubación a 20 °C (Shel Lab, USA), donde se dejaron reposar durante 1 h. Después de este tiempo, los viales fueron almacenados a 4 °C durante 24 h antes de ser sometidas a ensayo. Estos oleogeles fueron evaluados a través del método de extrusión hacia atrás (*back extrusion*), según se describe en la sección 4.2.2.2.

Las soluciones de EC con concentración por debajo del 2 % (p/p), que no gelificaron, se dejaron a temperatura ambiente. Estas muestras fueron analizadas utilizando un reómetro con geometría de cono y plato, según se describe en la sección 4.2.2.1.

#### 4.2.1.5. Preparación de las emulsiones de PG en TCM y aceite de soja.

Se usaron como punto de partida las soluciones y oleogeles obtenidos en la sección 4.2.1.3. Los oleogeles fueron previamente fundidos a 80 °C para hacerlos más fluidos y fáciles de mezclar con el PG. Éste fue luego agregado lentamente en las diferentes proporciones, y las mezclas resultantes fueron dispersadas utilizando vibración vórtex a 3.200 r.p.m. (Vortex-Genie 2; Scientific Industries Inc.; USA) ó un homogeneizador del tipo rotor-estator de alta velocidad de cizalladura (Ultra Turrax; Janke & Kunkel; Alemania).

En ambos procedimientos de mezcla, la homogeneización se mantuvo durante un minuto, una vez alcanzada la proporción deseada de PG (10, 30 y 50 % PG).

#### 4.2.1.6. Preparación de las soluciones de EC para los ensayos de compresión en monocapas de Langmuir.

La técnica requiere la siembra en superficie de muy pequeñas cantidades de las moléculas a evaluar, para lo cual se prepara una solución madre de cada EC, que luego se diluyen convenientemente para obtener soluciones de trabajo.

El solvente usado fue una mezcla de cloroformo:etanol 4:1 (v/v).

Solución madre de EC: se disolvieron 10 mg en 10 ml de la mezcla solvente.

Concentración: 1 mg/ml.

Solución de trabajo: se diluyó la solución madre por un factor de 20. Concentración final de trabajo: 0,05 mg/ml.

#### 4.2.2. Procedimientos analíticos

##### 4.2.2.1. Medición de las propiedades reológicas.

Para el estudio de las propiedades reológicas en las diferentes muestras evaluadas, se utilizó un reómetro rotacional de esfuerzo controlado marca Anton-Paar (Austria), modelo Physica MCR301; provisto del software Rheoplus Versión 3.0x (2007) para el análisis de los resultados (Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC).

- Las propiedades de flujo del chocolate fundido, se caracterizaron siguiendo el protocolo estandarizado en el Analytical Method 46 de la International Confectionery Association (ICA) (17). *Modificación al método:* se utilizó de geometría de cono y plato (CP50-1) en lugar del arreglo de cilindros concéntricos recomendado por la norma (ver Figura 5). Esta modificación fue posible dada la naturaleza comparativa (y no absoluta) de las mediciones realizadas.

- Las características físicas de las soluciones de EC con concentraciones menores al 2 % (p/p), así como las correspondientes a las emulsiones derivadas de ellas, fueron evaluadas siguiendo el método descrito por Ruíz Martínez *et al* (94).

- Para tener acceso a las propiedades de aquellas soluciones que formaron geles rígidos a temperatura ambiente (Capítulo 2), esto es entre 4 % y 23 % de EC (p/p), se fluidificaron los geles por calentamiento y las mediciones reológicas se realizaron a 40 °C, en un rango de velocidades de cizalla de 2 a 50 s<sup>-1</sup>.

En todos los casos, los resultados fueron el promedio de 3 mediciones.

##### 4.2.2.2. Mediciones de extrusión hacia atrás (back extrusion) en texturómetro.

Como se expresó anteriormente, las soluciones con contenido de EC por encima del 7 % p/p, generaron geles rígidos a temperatura ambiente, por lo que podían ser medidos a través de un analizador de textura o texturómetro, utilizando fuerzas de compresión. Se analizaron por el mismo método las emulsiones obtenidas a partir de estos geles, según se expone en el Capítulo 3.

Se consideró entonces este ensayo según se describe en Zetzi *et al*, 2012 (68). Se utilizó el analizador de textura marca Stable Micro Systems (UK), modelo TA.XT2i, provisto del software Texture Expert para el análisis de los resultados. Se utilizó una sonda de plástico con cuerpo cilíndrico y punta semiesférica de 13 mm de diámetro (Nº de parte: P/0.5 HS). Se utilizaron sonda y viales para la muestra de dimensiones más pequeñas que aquellas reportadas en el trabajo de referencia. No obstante, las relaciones existentes entre las dimensiones de la sonda y el vial, fueron las mismas (Figura 25).

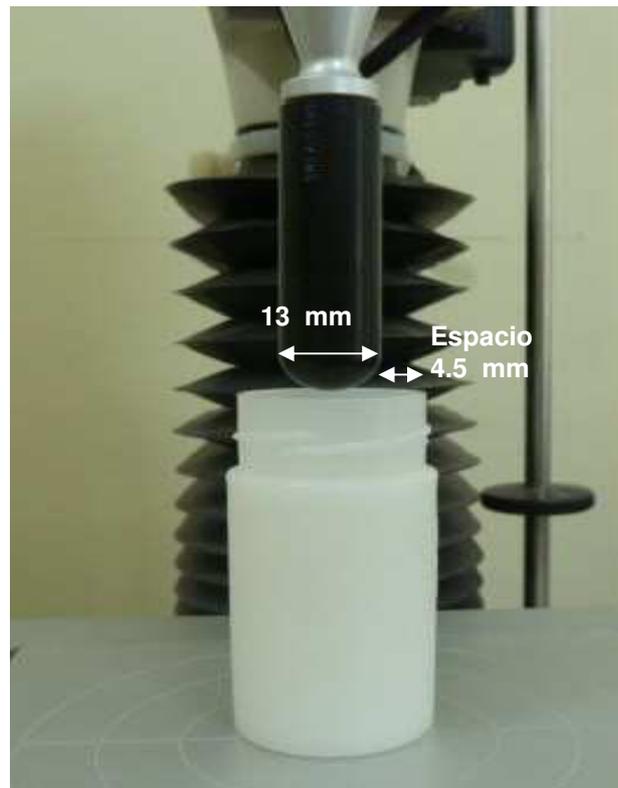


Figura 25. Parámetros del sistema de medición para el ensayo de extrusión hacia atrás.

Después de almacenar las muestras durante 24 h a 4 °C, se utilizó la sonda para penetrar 20 mm dentro de cada muestra a una velocidad de 1,5 mm/s, registrándose la fuerza generada por el gel como respuesta. Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado a 4 °C (apenas fueron retiradas desde la heladera), y el error experimental fue cercano al 5 %.

#### 4.2.2.3. Difracción de Rayos X (DRX)

Características del equipamiento y condiciones de medición:

- Difractómetro marca Bruker (USA), modelo D8 Advance. Arreglo instrumental: ánodo de Cu, radiación  $K\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ , 40 kV, 40 mA), monocromador de grafito para haz difractado y configuración de Bragg-Brentano. El intervalo de medición fue entre  $2\theta = 2^\circ$  y  $40^\circ$ . El procesamiento de los resultados se realizó por medio del software DIFFRACplus EVA, incluido en el difractómetro.

#### 4.2.2.4. Caracterización de las propiedades de superficie de la EC en monocapas de Langmuir.

Se sembraron en superficie 10  $\mu\text{l}$  de cada una de las soluciones de trabajo preparadas según se describe en la sección 4.2.1.6. La subfase utilizada fue agua Tipo 1 (filtrada y desionizada por ósmosis inversa hasta una resistividad de 18,2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ). Los eventos relacionados con la compresión de la capa monomolecular de EC en la superficie del agua, se describen en el Capítulo 3.

#### 4.2.2.5. Microscopía óptica

Aprovechando la buena solubilidad del azul de metileno en PG, y su insolubilidad en el TCM y el aceite de soja, una alícuota del pigmento sólido se disolvió en PG previo a su emulsificación con las mezclas EC-aceites.

Una vez preparadas las emulsiones, fueron observadas en microscopio óptico (Axiovert 135M) equipado con cámara digital (ERc5s), y las imágenes obtenidas fueron evaluadas a través de un software para procesamiento de imágenes (ZEN 2011); (todos estos elementos provenientes de la firma Zeiss; Germany).

#### 4.2.2.6. Análisis Estadístico

Los oleogeles y chocolates se trataron considerando la influencia del PM (bloques) y la concentración (tratamientos) de EC sobre la viscosidad y el LF. Para esto se aplicó el test ANOVA para un diseño experimental en bloques, con un nivel de significación del 5% (diferencias estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ ). Luego, para la evaluación de la influencia del PM (bloques), se aplicó el test de Tukey.

Estas aplicaciones se realizaron a través del programa informático InfoStat (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba).

## 5. RESULTADOS:

### 5.1. CAPÍTULO 1: Influencia de emulsionantes en las propiedades de cristalización de la manteca de cacao.

La aceptación por parte de los consumidores del producto chocolate, y en general de todos los alimentos donde la grasa forma una estructura continua (como por ejemplo, la manteca), está condicionada por las propiedades plásticas de esta fase lipídica, considerando principalmente sus características de fusión/cristalización, las cuales dependen exclusivamente de su composición en TG (sección 1.6). Esa estructura provee las principales características organolépticas de una grasa, y hará que el alimento pueda percibirse como cremoso o quebradizo; o bien suave o arenoso (95).

De esta manera, poder evaluar si las mezclas de MC con otros materiales (tales como grasas vegetales de uso permitido distintas de MC, y emulsionantes) influyen en esas propiedades de cristalización, representa un punto de partida fundamental para este estudio. Estos materiales agregados, están englobados en el concepto<sup>d</sup> de “*materiales minoritarios*” (MM), que incluye aquellas sustancias que pueden tener efectos en la cristalización de la fase continua grasa, ya sea a nivel macroscópico como microscópico. A nivel microestructural el efecto puede darse en cualquiera de las distintas etapas del proceso de cristalización, las cuales son nucleación, crecimiento cristalino, morfología de los cristales, capacidad calorífica y estabilidad polimórfica. En lo que refiere al chocolate, cualquiera de estas etapas que se vea afectada, puede traducirse macroscópicamente en la aparición del florecimiento graso, además de sufrir alteración de los perfiles de fusión, sobreendurecimiento y comportamiento reológico anómalo.

Sin embargo, no está definido qué cantidad hace que un componente sea “minoritario”, y en la práctica esto depende de la concentración de los componentes “mayoritarios”. De esta manera, hasta un componente que esté cercano al 10 % puede ser considerado como MM. No obstante, en muchos casos están en mucha menor proporción (incluso <1 %). Estas variaciones están reguladas por el mecanismo a través del cual un determinado MM produce alguno de los efectos mencionados en el comportamiento cristalino. Así, se acepta en general que la

---

<sup>d</sup> El concepto de MM involucra no sólo materiales agregados, sino también diferentes componentes nativos en la grasa, que en algunos casos incluso hasta deben ser removidos para obtener un producto de mejor calidad, como por ejemplo, los ácidos grasos libres.

incorporación de un MM dentro de la red cristalina grasa necesario para producir alteraciones en la formación y comportamiento de la misma, debe estar entre el 0,5 y 5 % (95).

La puesta en uso de técnicas para la detección y cuantificación de Equivalentes de Manteca de Cacao (CBE, del inglés Cocoa Butter Equivalents), sirvió como introducción a la temática de MM presentada en este estudio, dado que estas grasas similares a la MC pueden añadirse al chocolate en cantidades que permiten considerarlas como MM. Estas grasas de uso permitido, no tuvieron impacto en la cristalización de la MC (datos no mostrados).

Se tuvo en cuenta entonces que los emulsionantes se utilizan en la industria del chocolate en concentraciones cercanas al 0,5 % (principalmente la lecitina), y en el caso de la mezcla emulsionante estudiada, se trató a la EC como un MM, evaluándose su efecto sobre la cristalización del chocolate.

En la Figura 26 se muestran los perfiles de difracción característicos de los polimorfos  $\beta$ -V (Figura 26-a) y  $\beta$ -VI (Figura 26-b), obtenidos de MC pura. En ambos casos, las flechas de color indican las reflexiones características que los diferencian entre sí y de las demás formas cristalinas posibles para la MC (ver Figura 19).

La correcta selección de un emulsionante en la industria el chocolate está relacionada no sólo con su eficiencia como regulador del comportamiento reológico del chocolate líquido, sino que además no debería impedir la aparición del polimorfo  $\beta$ -V como forma cristalina más estable durante la transición líquido-sólido del producto. Adicionalmente podría retardar la aparición del polimorfo  $\beta$ -VI, fenómeno indicativo de deterioro por florecimiento graso. Estos eventos suelen describirse como la capacidad de *retención del polimorfo  $\beta$ -V*.

Se ha estudiado, de diferentes maneras la influencia de diversos emulsionantes sobre el comportamiento cristalino de distintos sistemas grasos, incluyendo la MC (96-98). Dada la variabilidad en la composición de la lecitina de uso industrial, y a modo comparativo con la mezcla emulsionante EC-TCM, se estudió el efecto de diferentes proporciones de lecitina de soja sobre la cristalización de MC en el polimorfo  $\beta$ -V (Figura 27). Puede verse que la lecitina de soja no influyó en el proceso de cristalización de la MC en todo el rango estudiado (Figuras 27-a, a la 27-e).

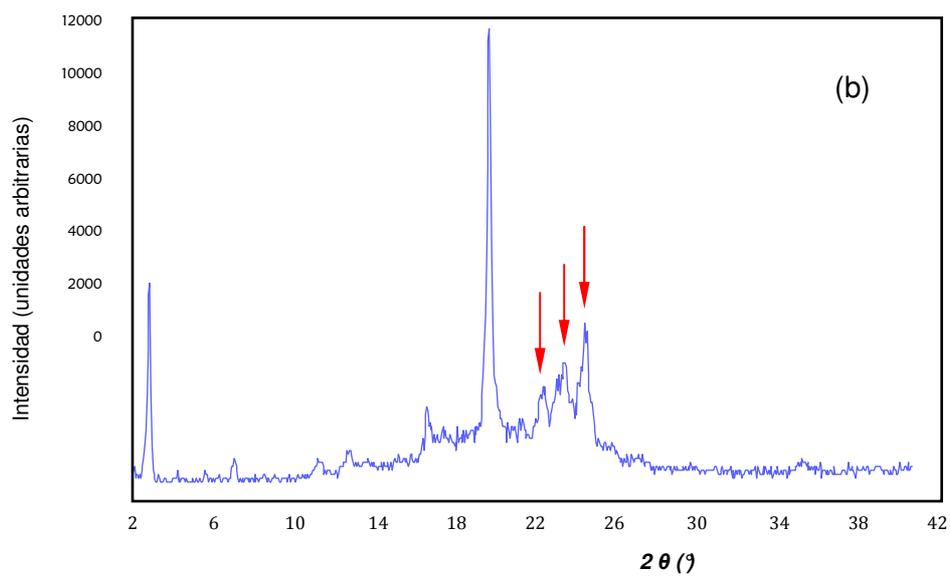
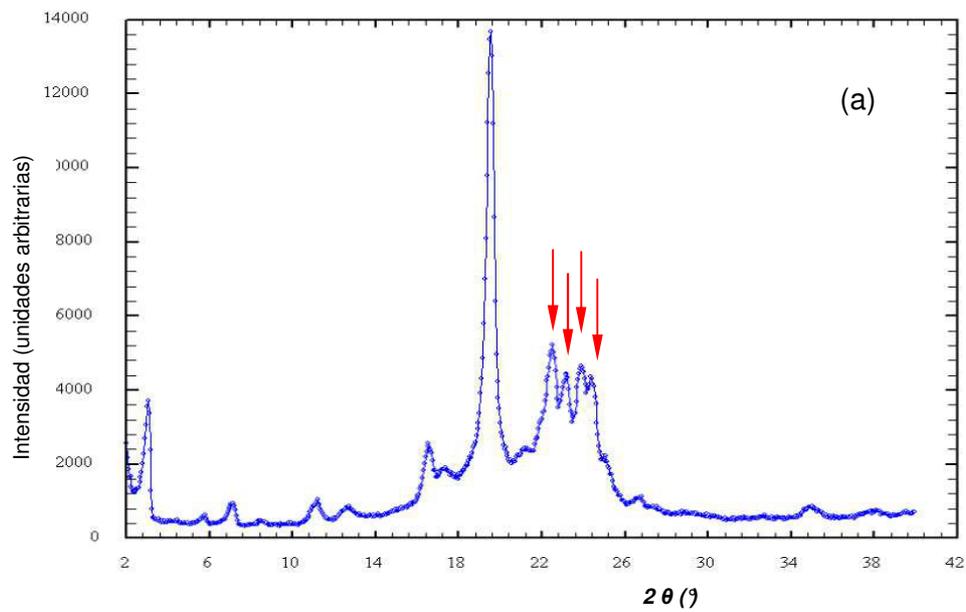


Figura 26. Patrones de difracción de MC, donde se señalan las reflexiones que permiten diferenciar al polimorfo  $\beta$ -V (a) del  $\beta$ -VI (b), y del resto de las formas cristalinas (Ver Figura 19).

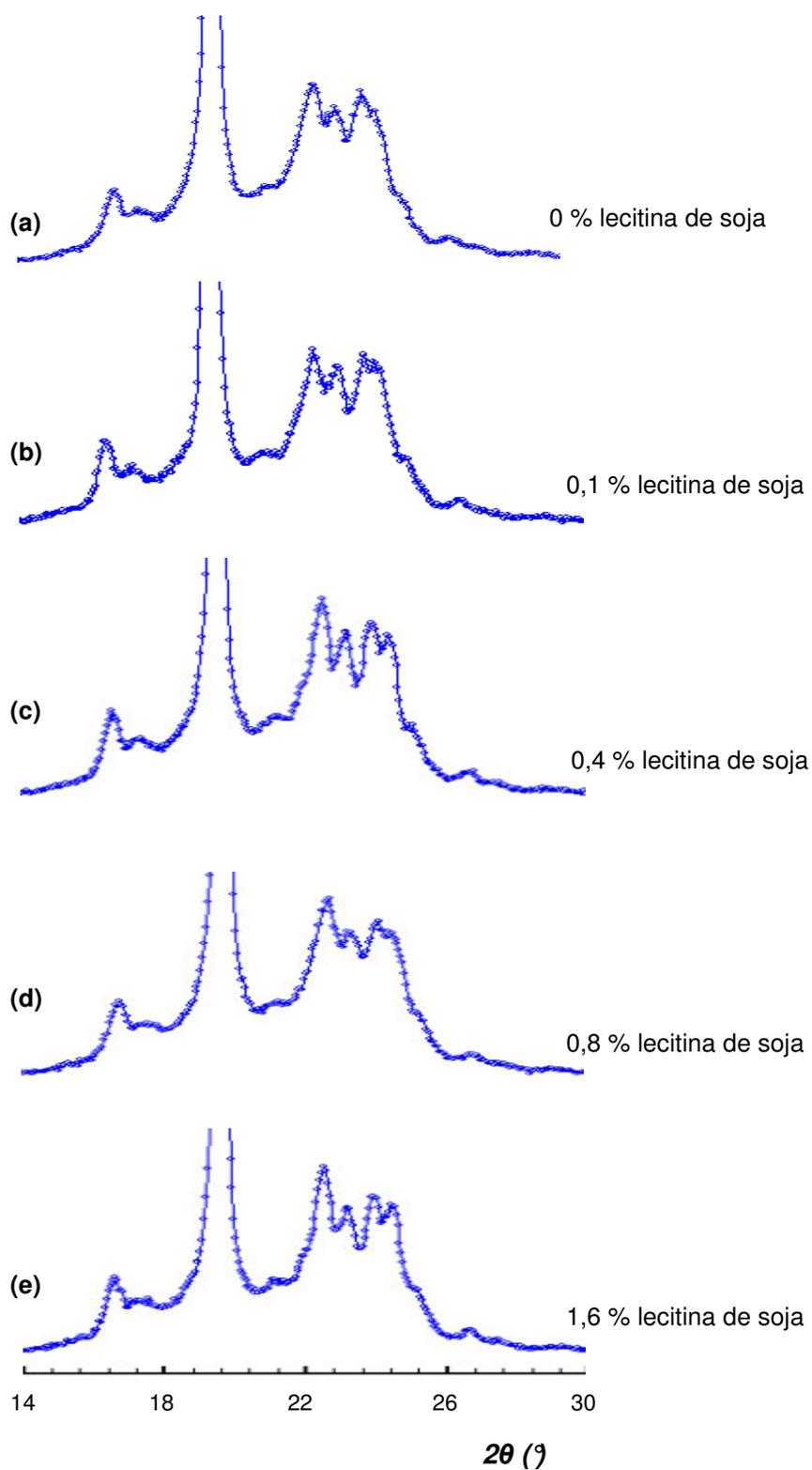


Figura 27. Patrones de DRX para mezclas de MC con diferentes proporciones de lecitina de soja.

### 5.1.1. Etilcelulosa y efecto de surfactantes poliméricos sobre la cristalización de la MC.

No se han encontrado en la bibliografía consultada, antecedentes del estudio de cristalización de materias grasas en presencia de materiales poliméricos usados como surfactantes.

La diferencia en tamaños moleculares entre la EC y las distintas moléculas que componen la lecitina de soja, e inclusive entre las cuatro moléculas de EC entre sí (Tabla III), hacían pensar en que el posible efecto perturbador sobre la red cristalina de la MC podría ser de naturaleza estérica, haciéndose potencialmente más drástico hacia los PM mayores. Esto es, a mayor tamaño de las moléculas que deben ser “acomodadas” en la red cristalina, mayor podría ser la probabilidad de provocar alteraciones en el acomodamiento de las moléculas de TG en esa red.

Tabla III. Pesos moleculares de la EC (57).

<b>Polímero</b>	<b>PM (kDa)</b>
EC-10	77
EC-20	120
EC-45	158
EC-100	220

En la Figura 28 se muestran los patrones de DRX obtenidos para la MC y sus mezclas con los diferentes PM de la EC. Se evaluó la influencia a muy bajas concentraciones del polímero sobre la cristalización de la MC, en concordancia con las proporciones en que fue eficiente como regulador del comportamiento reológico en el chocolate. Como puede verse, la MC cristalizó sin problemas en el polimorfo  $\beta$ -V independientemente del PM de la EC.

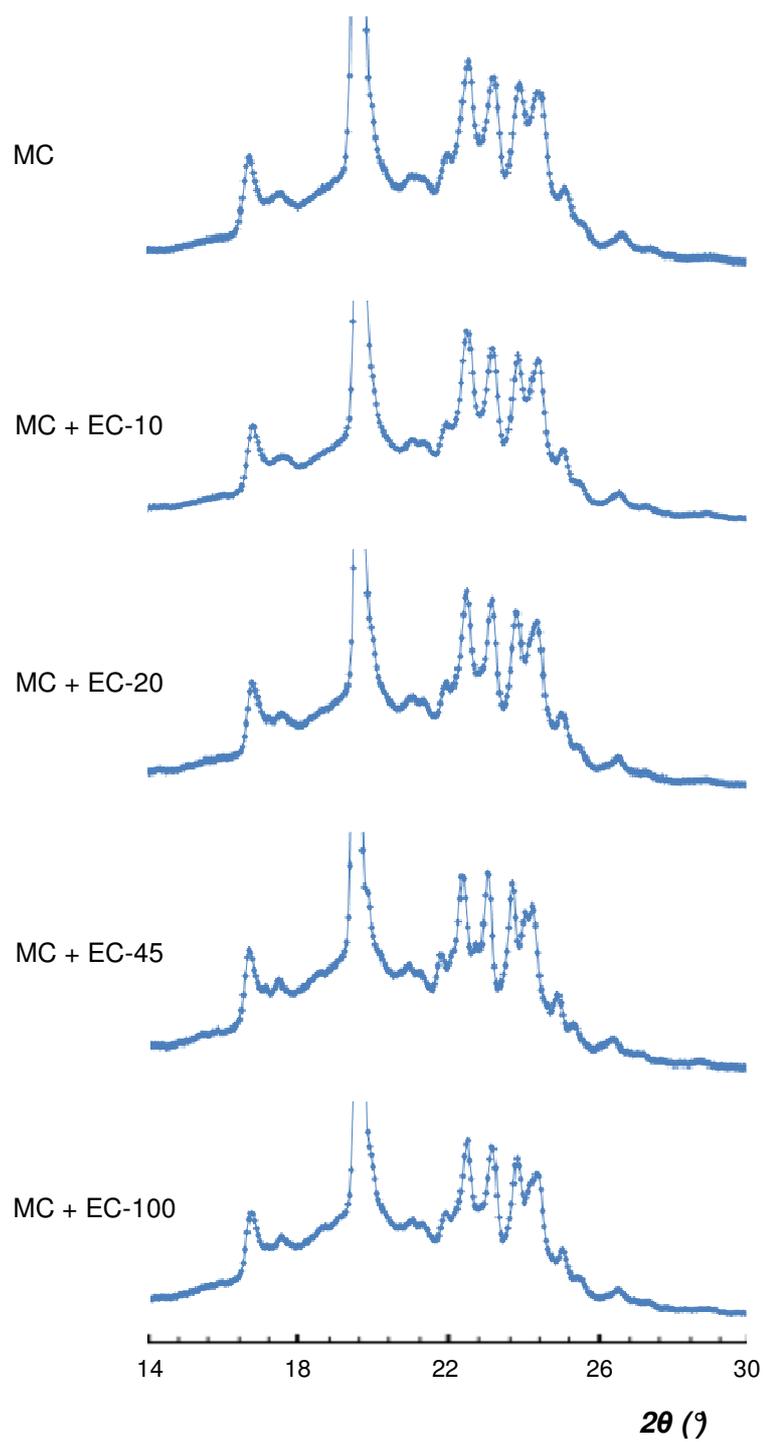


Figura 28. Patrones de DRX para mezclas de MC con EC de diferentes PM. En todos los casos, el polímero se adicionó en una concentración del 0,08 % p/p.

## 5.2. CAPÍTULO 2: ETILCELULOSA (EC) COMO EMULSIONANTE POLIMÉRICO. Impacto en la reología del chocolate fundido.

### 5.2.1. Solubilidad de la EC en vehículos grasos como base de su acción surfactante

La hidrofobicidad y la actividad de superficie de la EC son resultado de la presencia de los residuos etoxilo. Esto le permite ser solubilizada en grasas y aceites, lo que representa la base de sus aplicaciones en la literatura (ver sección 1.5.3). Esa solubilidad también se da en la MC, lo cual permitiría predecir que al incorporar este polímero en la suspensión chocolate, debería cumplirse lo establecido por la regla de Bancroft, facilitando la formación y estabilización de una dispersión donde la fase continua sea precisamente la MC (sección 1.5.1).

En las aplicaciones de investigaciones publicadas, la EC se solubilizó directamente en la materia grasa en que se probaría su efecto, siendo los aceites más usados los de soja, canola, colza, oliva, palma y lino, todos ellos compuestos por TG de ácidos grasos de cadena larga (99,100). Para lograr la solubilización total, debe calentarse la mezcla entre 30 y 45 min a la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de la EC (130 - 150 °C), lo cual puede conferir al producto final olores y sabores propios de la degradación oxidativa de las grasas.

En este sentido, para la aplicación prevista en este estudio se utilizó la estrategia de disolver la EC previamente en un aceite compuesto por TCM, para luego incorporar esta mezcla a la MC. Las principales ventajas de este vehículo oleoso son derivadas de su composición total en ácidos grasos saturados de cadena media, en un 98 % compuesto por ácidos grasos caprílico – cáprico (ver sección 4.1.): alta estabilidad frente a los procesos oxidativos, sean térmicos o no; no contiene ácidos grasos *trans*; y es un aceite (líquido a temperatura ambiente) de características organolépticas óptimas, ya que presenta muy poco color, es inodoro y con sabor característico muy suave. Esto permite controlar fácilmente si el calentamiento degrada el aceite y se producen olores y sabores no deseados. Pero probablemente su principal característica sea que es totalmente compatible con la MC, esto significa que se mezcla en todas las proporciones cuando la MC está fundida, y además no es segregado por ella cuando solidifica.

Considerando las proporciones habituales de uso de emulsionantes en chocolate, era de esperar que la acción surfactante de la EC fuese puesta de manifiesto a bajas concentraciones. Al disolver cantidades pequeñas, el tiempo de

calentamiento a la Tg disminuye drásticamente, minimizando la generación de características organolépticas desagradables. No obstante, se genera un bajo nivel de un olor característico luego de la preparación de la mezcla, pero que no es desagradable ni es transferido al chocolate. Este aspecto guarda cierto paralelismo respecto de la lecitina de soja cruda que se usa en la industria del chocolate, en cuanto esta presenta olor característico bastante marcado, y sin embargo no es detectado luego en el chocolate. Al probar la capacidad solubilizante del TCM se lo comparó con aceite de soja, como un ejemplo de aceite con TG de cadena larga, encontrando una mejor velocidad de disolución con el primero (aproximadamente 10 g/min vs. 7,5 g/min). Este hallazgo favorece aún más la disminución del tiempo de calentamiento a la Tg. En cuanto al color, las soluciones de baja concentración de EC son relativamente límpidas, sobre todo si se las compara nuevamente con la lecitina y además con el PGPR (Figura 29).

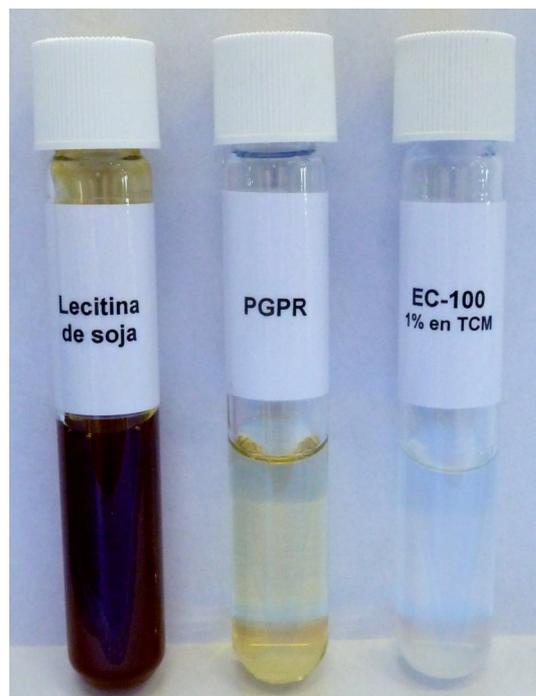


Figura 29. Una de las variantes de la mezcla emulsionante desarrollada, comparada con los emulsionantes más utilizados en la industria del chocolate local, la lecitina de soja y el PGPR.

Otra ventaja respecto de las preparaciones en aceite de soja, es que en este caso se produce un enranciamiento muy marcado y fácilmente detectable por el olor, a las pocas semanas de obtenida la solución del polímero, mientras que las

diluciones e incluso los geles (con mucha mayor concentración de EC) en TCM no desarrollaron olores incluso después de dos años de preparados.

Si bien como ya se expuso más arriba, la aplicación de la EC como surfactante polimérico muy probablemente implicaría el uso de soluciones de baja concentración, se consideró importante investigar el comportamiento de este polímero en un amplio rango de concentraciones, principalmente para evaluar el grado de complejidad en la dosificación, considerando que era de esperarse que se obtuviesen desde soluciones de baja viscosidad hasta geles de elevada rigidez. Con esto se buscó encontrar una concentración tal que la mezcla fuese lo más fluida posible, aunque de comportamiento no Newtoniano, y que pudiese ser adicionada en la menor proporción posible al chocolate, considerando el uso habitual de los emulsionantes en este. Así, se prepararon soluciones de EC de los cuatro PM con concentraciones entre 1 % y 23 %. Por debajo del 5 % y a temperatura ambiente, se obtuvieron soluciones viscosas con todas las EC. A concentraciones entre 5 y 7 % las soluciones gelificaron y los geles resultantes fueron tixotrópicos, ya que bajo una mínima fuerza de agitación manual se fluidificaron totalmente. En reposo durante toda la noche, volvieron a gelificar. Por encima del 7 % p/p, la EC indujo la formación de geles cuya fuerza fue dependiente del PM del polímero, de la composición del aceite y su estado de conservación, lo cual fue equivalente a los resultados previos con aceites compuestos por triglicéridos de cadena larga (66-68).

En todas las soluciones se midió viscosidad en función del incremento de velocidad de cizallamiento. A partir del 4 % de EC esa medición se realizó a 40 °C, dada la elevada viscosidad de estas muestras a temperatura ambiente. Un buen valor comparativo de viscosidad de estos *oleogeles* puede extraerse a una velocidad de cizallamiento (shear rate) de 40 1/s (Tabla IV). Se incluyen sólo los resultados para las concentraciones > 4 %, ya que a esta temperatura las soluciones de concentraciones < 4 % mostraron un comportamiento totalmente Newtoniano, indiferenciables entre las de un mismo PM.

Cuando se considera todo el rango de velocidades de cizallamiento medidas, por ejemplo para las soluciones de EC-10 (Figura 30), puede verse que la curva correspondiente al 4 % muestra un comportamiento ligeramente pseudoplástico, con los valores más bajos de viscosidad en todo el rango de medición. Las soluciones de concentraciones < 4 % presentaron líneas rectas indicativas de su comportamiento Newtoniano, y sus reogramas se ubicaron a la izquierda del obtenido para 4 % (no se incluyeron en la Figura para mayor claridad visual).

Tabla IV. Viscosidad aparente a velocidad de cizallamiento = 40 1/s para oleogeles preparados con diferentes concentraciones de EC de 4 PM, en TCM. Las mediciones fueron realizadas a 40 °C. (\*) = Geles de consistencia muy elevada, que no pudieron medirse en estas condiciones experimentales.

Concentración (% p/p)	EC-10	EC-20	EC-45	EC-100
	(Pa.s; media $\pm$ DE de triplicado)			
4	0,20 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,02
5	0,33 $\pm$ 0,03	0,80 $\pm$ 0,04	1,37 $\pm$ 0,02	1,98 $\pm$ 0,18
7	0,58 $\pm$ 0,01	1,16 $\pm$ 0,02	2,56 $\pm$ 0,09	2,90 $\pm$ 0,12
9	1,24 $\pm$ 0,02	2,45 $\pm$ 0,03	4,43 $\pm$ 0,17	8,95 $\pm$ 0,39
12	3,26 $\pm$ 0,11	6,80 $\pm$ 0,32	13,76 $\pm$ 0,74	--- (*)
17	12,30 $\pm$ 0,23	31,53 $\pm$ 1,16	27,48 $\pm$ 1,33	--- (*)
23	64,16 $\pm$ 2,54	79,11 $\pm$ 2,15	--- (*)	--- (*)

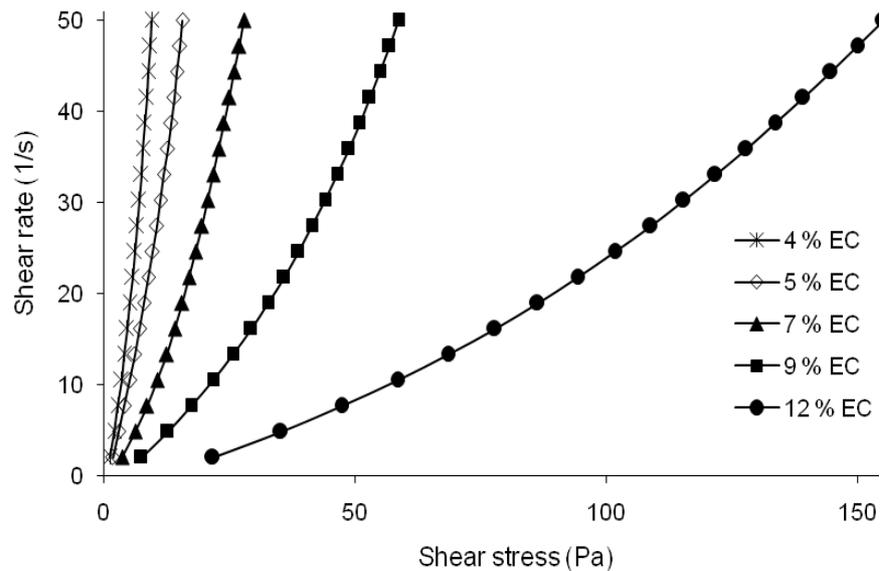


Figura 30. Reogramas obtenidos para soluciones de EC-10 de diferentes concentraciones en TCM, a 40 °C.

Por otro lado, a partir del 5 %, las muestras comienzan a presentar un apreciable límite de fluencia (LF), que es la fuerza necesaria que debe entregárseles para que comiencen a fluir. Esto está de acuerdo con la tixotropía observada macroscópicamente a temperatura ambiente en los geles cuya concentración estaba entre 5 y 7 %. El alto valor de  $LF \approx 25$  Pa para la solución de EC-10 al 12 %, ilustra claramente la elevada consistencia que pueden adquirir a temperatura ambiente

(considerar que estas mediciones se hicieron a 40 °C, para facilitar la fluidez de las soluciones). De acuerdo a estos datos y tal como era esperable, las muestras mostraron un incremento en la viscosidad aparente que fue dependiente de la concentración y del PM del polímero.

Para el caso de las muestras marcadas con (\*) en la Tabla IV, se obtuvieron geles de consistencia tan elevada, que no pudieron ser medidos en el reómetro. Considerando la geometría de cono y plato usada en la medición (Figura 5-b), el cono resbala sobre la superficie de la muestra, y no permite la interacción cono-muestra necesaria para que pueda registrarse la fuerza de cizallamiento real.

La obtención de estos oleogeles con muy buenas características organolépticas (en la Figura 31 puede apreciarse la limpidez y homogeneidad de oleogeles obtenidos a partir de soluciones de EC al 8 % en TCM) y sus potenciales aplicaciones en alimentos de base grasa, fue un aspecto derivado de esta tesis y sirvió de punto de partida para otros desarrollos, uno de los cuales (la obtención de emulsiones no acuosas) fue de utilidad para explicar el mecanismo por el cual la EC ejerce su acción emulsionante, y será analizado en un capítulo posterior.

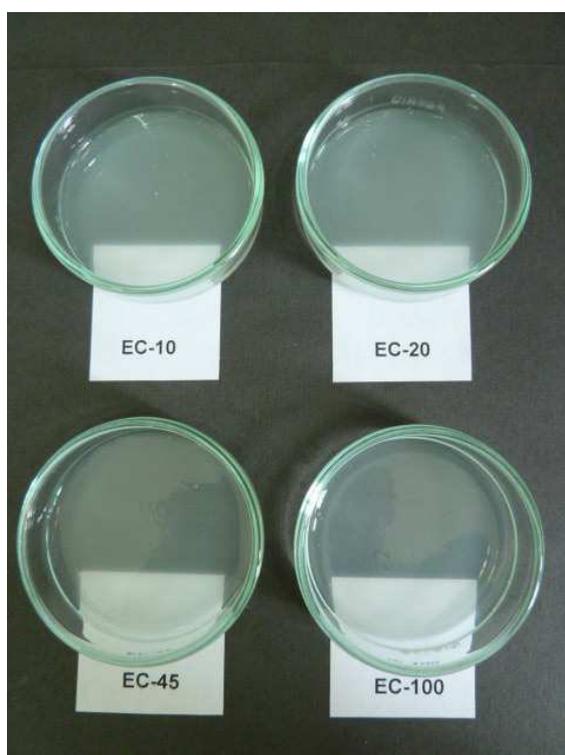


Figura 31. Oleogeles de EC al 8 % p/p en TCM.

### 5.2.2. Efecto dual de la mezcla EC – TCM sobre los parámetros viscosidad y límite de fluencia.

Desde el avance de la reología en general, y la identificación de aspectos independientes en el comportamiento de flujo del chocolate fundido en particular, en la industria del chocolate es habitual el uso de más de un agente emulsionante para lograr diferentes resultados en un mismo producto (sección 1.4.2). El TCM fue utilizado como vehículo para disolver un sólido (la EC) que de otra manera muy difícilmente podría haber sido incorporado a la masa del chocolate, y también permitió utilizar la estrategia de mezcla de emulsionantes, ya que como pudo verse previamente estos TG poseen una capacidad reguladora sobre las propiedades de flujo de la MC y el chocolate.

El estado físico líquido a temperatura ambiente del TCM, provoca un efecto fluidificante sobre la MC. Además de este, consideramos importante evaluar tres aspectos derivados de esta interacción MC-TCM, algunos de los cuales ya fueron mencionados: (a) su compatibilidad con la MC en estado fluido; (b) que luego de solidificada la MC no fuese segregado en *forma fluida*<sup>e</sup>; y (c) como se comportaría en presencia de azúcar, antes de ser incorporado a la matriz chocolate.

De esta manera, las primeras experiencias desarrolladas fueron la evaluación de la compatibilidad del TCM con la MC, junto al efecto sobre los parámetros reológicos que tiene el agregado del TCM en diferentes proporciones, en presencia y ausencia de azúcar como el componente más importante en el chocolate luego de la MC.

Las mediciones reológicas se realizaron según la técnica descrita en la sección 4.2.2.1. (17), obteniéndose un reograma compuesto de dos curvas de flujo, una ascendente y otra descendente en cuanto al barrido en velocidades de cizalla (Figura 9). De ambas curvas se obtiene una única curva promedio, a partir de la cual se calculan los parámetros Viscosidad aparente y Límite de fluencia (en adelante, serán mencionados como Viscosidad y LF). Dado que en la mayoría de las Figuras fue necesario incluir varios reogramas con fines comparativos, para mayor claridad visual sólo se muestran las curvas promedio. Cuando sea necesario explicar la aparición de fenómenos de histéresis, relacionados con la tixotropía de algunas muestras de chocolates, se incluirán las correspondientes curvas experimentales ascendente y descendente.

---

<sup>e</sup> Es importante no confundir este fenómeno con el de florecimiento graso.

Se midió entonces el comportamiento de flujo de la MC pura y en mezclas con diferentes cantidades de TCM, en concentraciones de 1,5 a 15 % p/p. Con fines comparativos se incluyó una muestra de MC adicionada de 0,5 % de lecitina. En la Figura 32 se muestran los reogramas obtenidos para estas mezclas, aunque para mejor visualización se incluyen los correspondientes a los agregados de TCM en los extremos analizados, esto es 1,5 y 15 %.

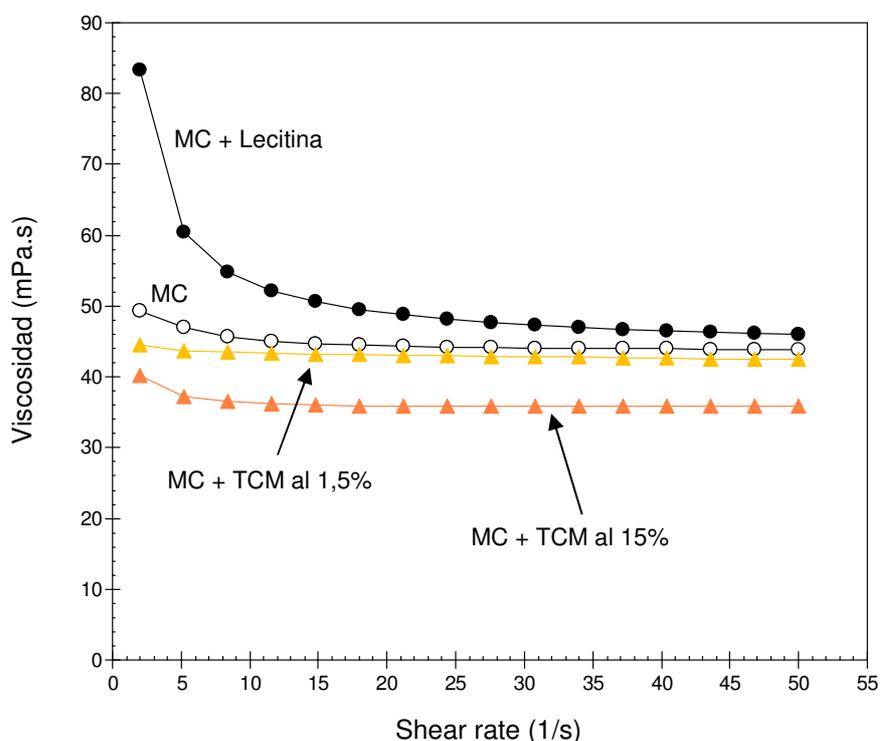


Figura 32. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento, para MC y sus mezclas con diferentes proporciones de TCM. Se incluye una muestra con el agregado de lecitina con fines comparativos.

Teniendo en cuenta que las mediciones se realizaron a 40 °C, era predecible el comportamiento prácticamente Newtoniano de la MC pura. Sus mezclas con el TCM no se alejan de este comportamiento, y se observó el efecto fluidificante de este aceite, con viscosidades menores en todo el rango de velocidades de cizallamiento. Este efecto es mayor a medida que aumenta la proporción de TCM añadida. Finalmente, el aspecto más importante mostrado en esta figura está relacionado con el efecto opuesto del TCM frente a la lecitina, ya que esta provoca no sólo el aumento de la viscosidad en la MC para todo el rango de medición sino también la aparición de LF, parámetro indicativo de un efecto espesante en la mezcla. Adicionalmente, el TCM tiene efecto fluidificante aún cuando se lo adiciona a

MC que previamente ha sido mezclada con lecitina, tal como se muestra en la Figura 33.

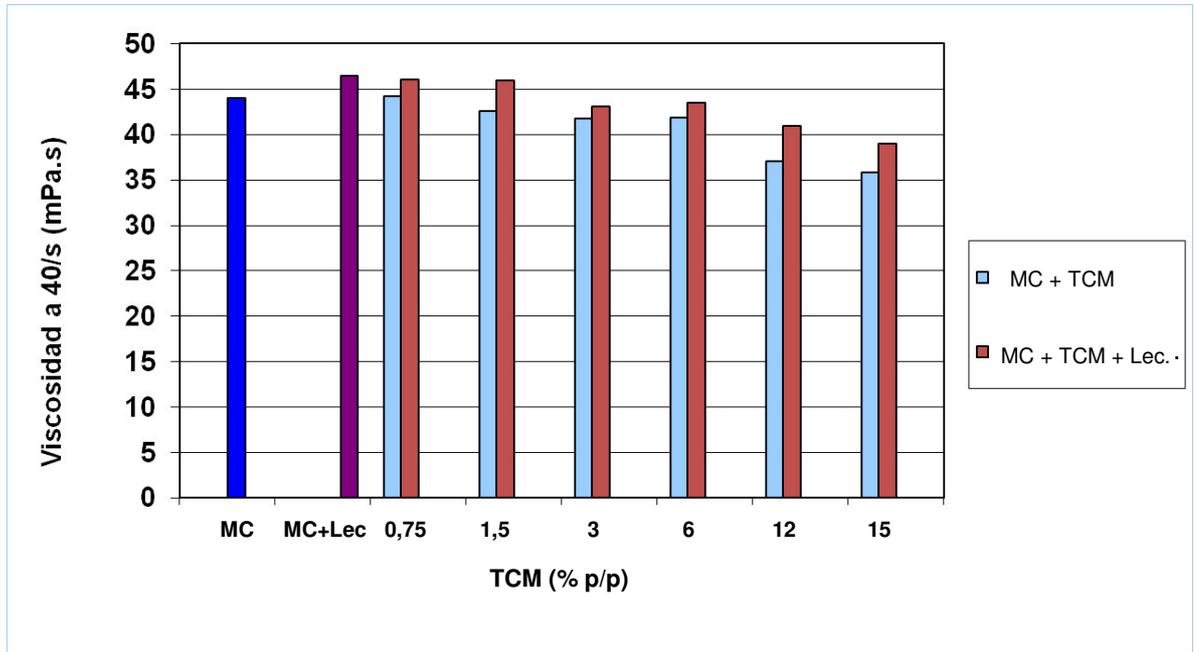


Figura 33. Efecto del agregado de diferentes concentraciones de TCM sobre la viscosidad a velocidades de cizalla = 40/s para MC y mezclas de MC + lecitina 0,5 %.

El siguiente efecto a evaluar fue el comportamiento en presencia de azúcar, dado que es en suspensión donde la acción de un surfactante debe ser evidenciada, al facilitar el flujo por disminución de la fricción entre las partículas suspendidas.

En la Figura 34 se muestran los reogramas obtenidos para muestras de MC + azúcar, con el posterior agregado de TCM. Se incluyó además un primer agregado de la mezcla emulsionante TCM+EC, a fines comparativos. Nuevamente, la acción de adicionar un aceite más liviano a la MC produce su fluidificación, y este efecto cobra gran importancia respecto del mostrado en la Figura 32, cuando se considera la elevada proporción de sacarosa que se usa en chocolates (relación MC/azúcar = 0,75). Debe observarse que la lecitina produce un incremento en el límite de fluencia de esta suspensión, mientras que por el contrario, favorece una disminución en la viscosidad a 40/s, disminución que es incluso menor que la producida por el TCM. En este mismo gráfico, puede verse que una muy pequeña cantidad de EC-10 (la de más bajo PM), produce un efecto muy similar al de la lecitina, con un apreciable incremento en el LF pero disminuyendo la viscosidad a 40/s, aunque en una forma mucho menos drástica que el fosfolípido.

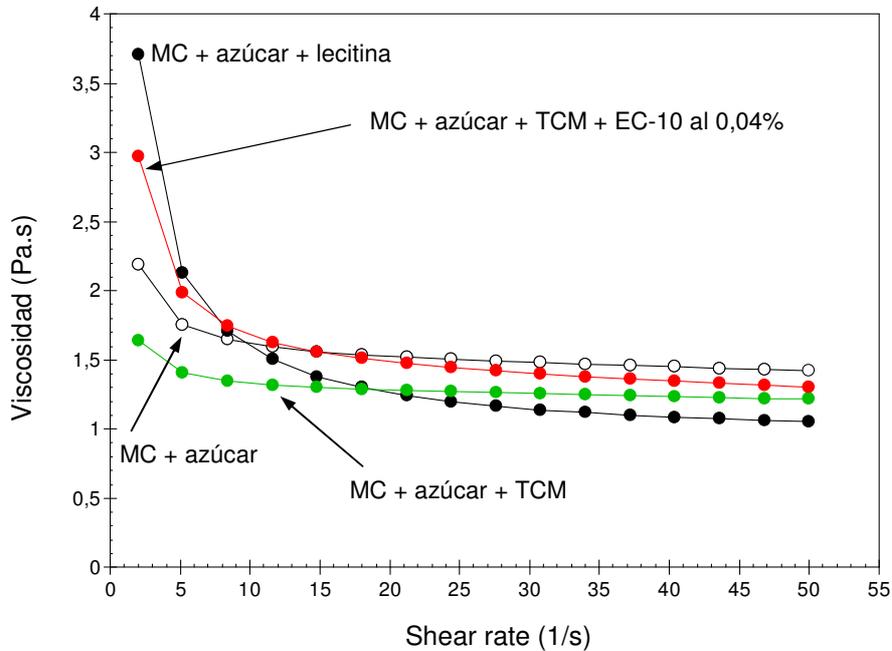


Figura 34. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento, para MC + azúcar, y la posterior mezcla de esta suspensión con TCM y TCM + EC-10. Se incluye una muestra con el agregado de lecitina con fines comparativos.

En las Figuras 32 y 34 debe tenerse en cuenta que el efecto sobre los valores de viscosidad es bastante sutil, en cuanto se producen a valores bajos. En la Figura 35, vemos que si incrementamos la concentración de EC añadida, el efecto sobre todo el rango de medición es mucho más notorio, aunque es más drástico sobre el LF que sobre la viscosidad a 40/s. El incremento de pequeñas cantidades de EC produce un efecto estructurante muy evidente, mostrando la suspensión un comportamiento pseudoplástico cada vez más marcado. De esta manera, la EC a concentraciones más altas podría actuar como un gelificante del TCM, y también de la MC una vez incorporada la mezcla emulsionante a la suspensión final. Así, la EC muestra su rol de componente activo en la dispersión, que puede ser no sólo con un efecto lubricante/fluidificante (como el de un emulsionante típico), sino también como estabilizador estérico de la red cristalina sólida de la MC cuando sea temperada en el chocolate. En la sección 1.5.2. se han mencionado estos dos potenciales efectos estabilizantes, y en el Capítulo 3 se describe cuál de ellos podría ser el preponderante en la estabilización de la suspensión chocolate. Como ya se ha expresado numerosas veces a lo largo de este estudio, el chocolate sin leche está compuesto por partículas sólidas de azúcar y sólidos de cacao, suspendidos en una matriz cristalina de MC.

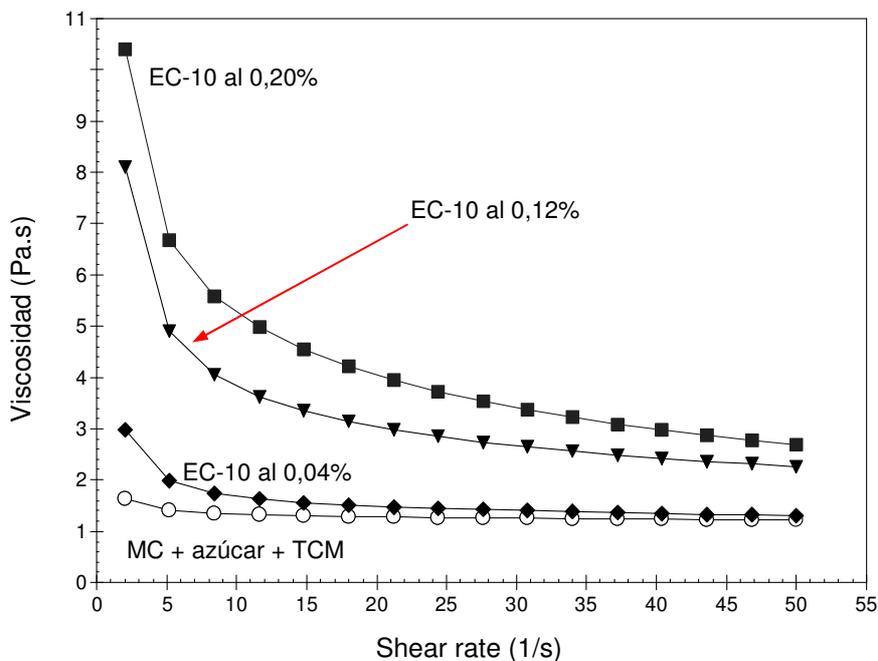


Figura 35. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento, para suspensiones de MC + azúcar con agregado de la mezcla emulsionante TCM + EC-10, a diferentes concentraciones de EC. Se incluye una muestra con el agregado sólo de TCM a fines comparativos.

La importancia de la correcta estabilización de la dispersión por el agregado de emulsionantes, está asociada con las experiencias sensoriales de los consumidores (101-104). Industrialmente, esto significa un buen proceso de concado, y el seguimiento de este proceso se traduce en la obtención de curvas reológicas continuas y sin variaciones abruptas en la viscosidad, tales como las mostradas aquí. El agregado del TCM a chocolates sin emulsionantes mostró también un efecto fluidificante muy marcado en todo el rango de velocidades de cizallamiento medidas y para todas las concentraciones evaluadas (Figura 36-a), con significativas disminuciones en los parámetros viscosidad y LF (Figura 36-b). El efecto de disminución en todo el rango de velocidades de cizallamiento (Figura 36-a), indica un efecto fluidificante al igual que se observó en MC pura y en las suspensiones de MC + azúcar.

Sin embargo, en este punto donde todos los ingredientes del chocolate están presentes, cobra una importancia fundamental, ya que indicaría que su principal interacción es con la MC del chocolate, y ejercería una acción netamente lubricante sobre las partículas de azúcar. Como ya se expuso, la lecitina cuenta con una porción netamente hidrofílica que interactúa con el azúcar, y con sus ácidos grasos de cadena larga netamente hidrofóbicos y de fuerte interacción con la fase grasa (ver sección 1.4.2.).

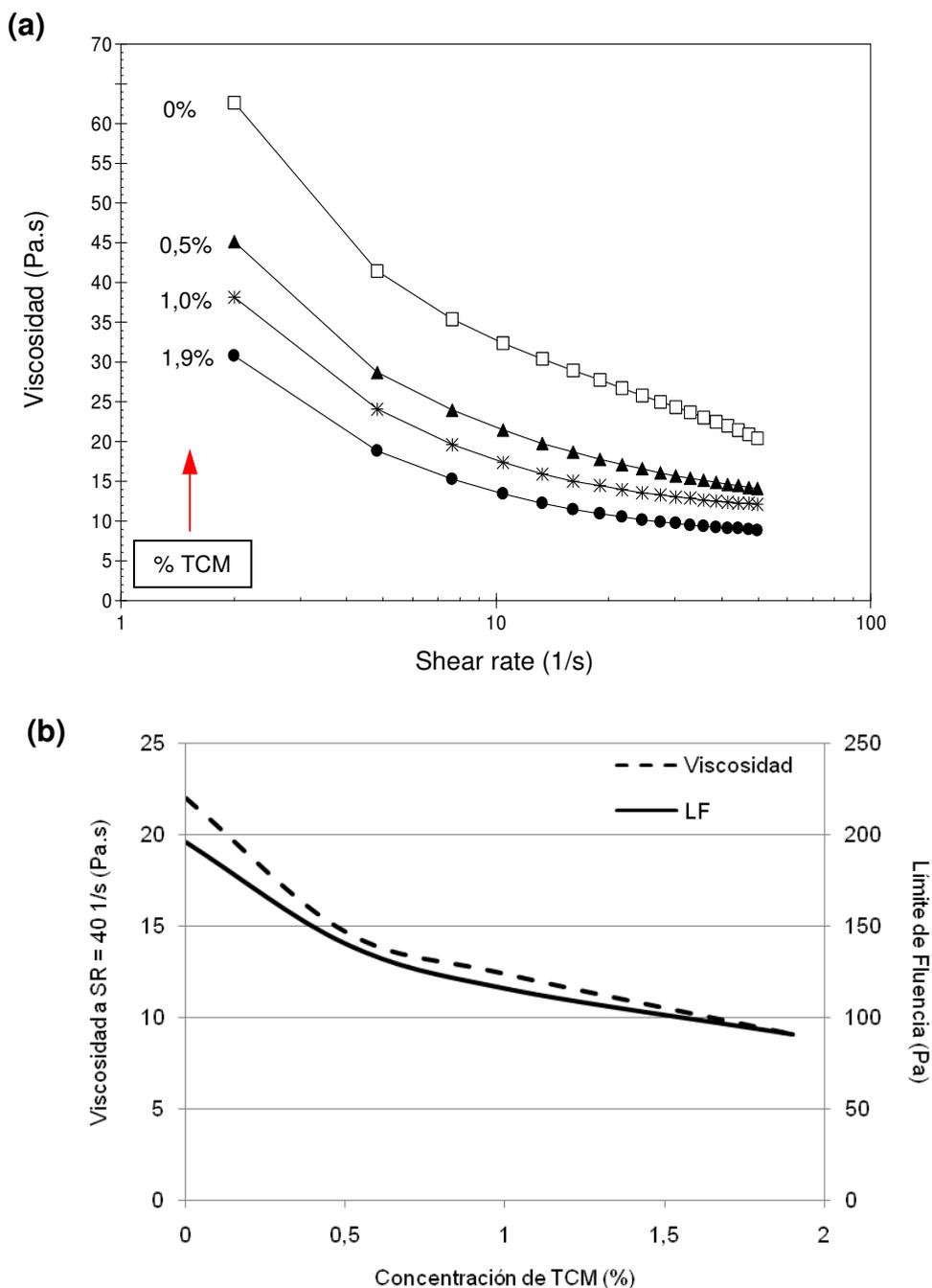


Figura 36. Efecto de la concentración de TCM sobre el comportamiento de flujo del chocolate en todo el rango de velocidades de cizallamiento (a) y particularmente sobre la viscosidad a 40 1/s y el LF (b).

El TCM no cuenta con un grupo netamente polar como la lecitina, aunque podría esperarse que dada la menor longitud de cadena de los ácidos grasos cáprico y caprílico de este TG, la molécula en su conjunto presentase un carácter ligeramente más polar que la MC, con probabilidades de no producir una disminución tan marcada en los parámetros reológicos del chocolate por mayor interacción con el azúcar. Esto no fue así, y en este sentido, quizás la acción del

TCM sea más parecida a la del PGPR y no se estructure formando parte de la suspensión, sino que se incorpore a la MC incrementando la fracción de volumen de la fase continua, lo cual se pone de manifiesto macroscópicamente en la ausencia de segregación del TCM desde el chocolate luego del temperado.

Uno de los efectos más interesantes del TCM respecto de la lecitina, se muestra en la Figura 37.

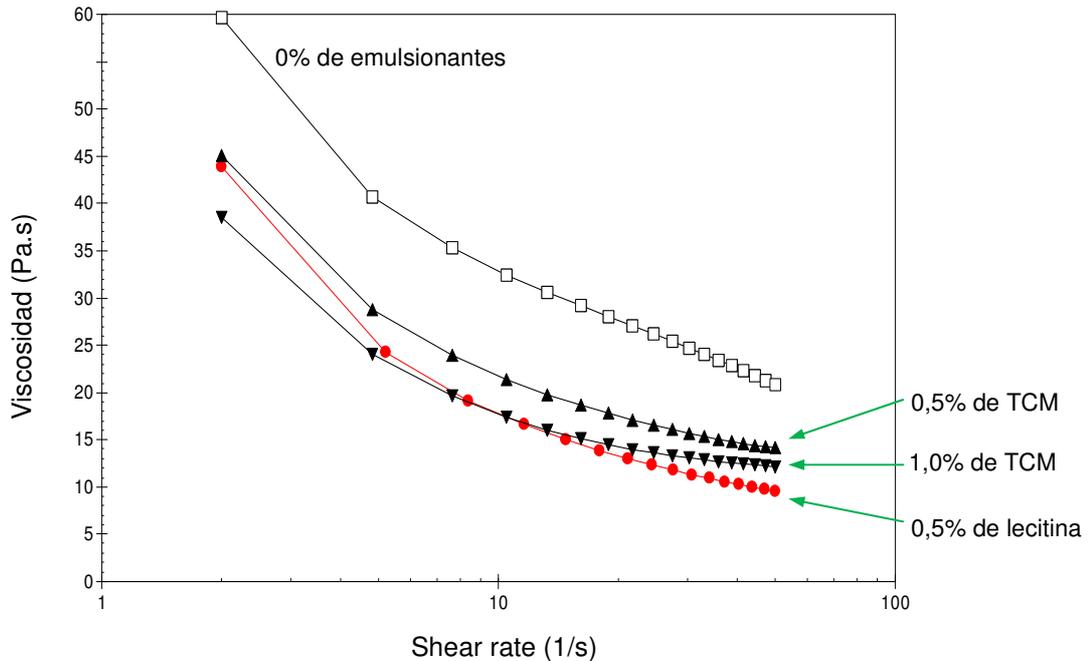


Figura 37. Efecto del TCM sobre el comportamiento de flujo del chocolate en comparación con el efecto de lecitina al 0,5 %.

Si bien como se mostró en la Figura 36-a, el TCM en todas las concentraciones evaluadas afecta el comportamiento de flujo en todo el rango de shear rates medidas, disminuyendo tanto la viscosidad como el LF, en la Figura 37 donde se lo compara con la lecitina, vemos que el mayor efecto se da sobre el LF (a bajas velocidades de cizalla), disminuyéndolo en una proporción aún mayor. Si bien no está muy claro el mecanismo por el cual esto ocurre, este efecto lo asemeja aún más al PGPR en lo que respecta a su forma de acción.

La acción emulsionante de la mezcla TCM+EC se evaluó a diferentes concentraciones para los cuatro PM del polímero, con una concentración constante de TCM del 1 %. Los resultados presentados en la Tabla IV y en la Figura 36, mostraron que los efectos de la concentración y el PM de la EC estuvieron dentro de lo esperado ya que incrementaban la viscosidad de las soluciones o suspensiones a los que el polímero se agregaba. Algo esperado también pudo observarse en

relación al agregado de diferentes cantidades del TCM, aunque en este caso con disminución en los valores de los parámetros reológicos de los diferentes materiales donde se añadieron.

Sin embargo, la mezcla emulsionante presentó un comportamiento no tan predecible, que sirvió como base para comprender el mecanismo a través del cual este surfactante de base polimérica, facilitó la obtención de un chocolate de adecuadas propiedades reológicas. Para una mejor visualización, el efecto de ambas modificaciones (concentración y PM de la EC) sobre los parámetros viscosidad y LF, se muestran juntos en la Figura 38.

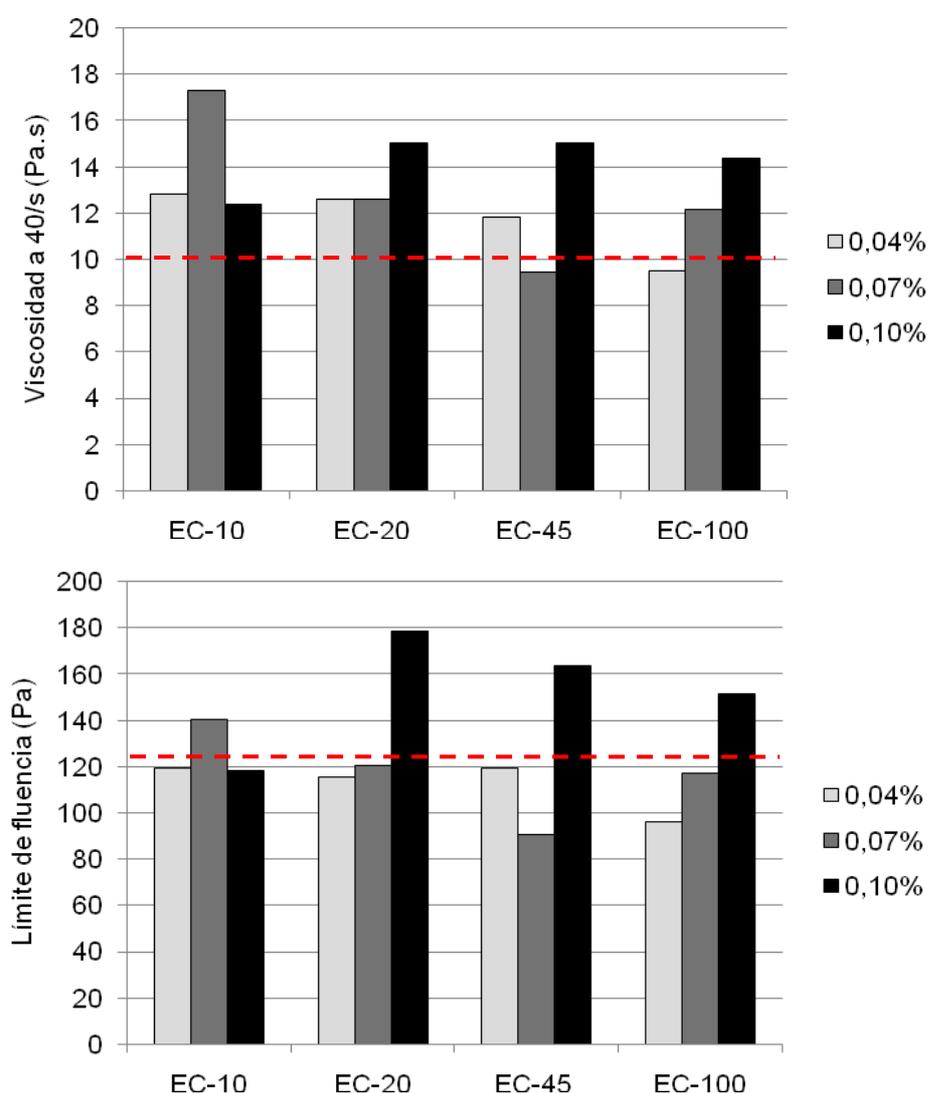


Figura 38. Efecto de la concentración y PM de la EC sobre la viscosidad y LF del chocolate sin leche. A modo comparativo, se incluyen los valores para lecitina de soja (línea discontinua roja).

Ante todo, deben considerarse las muy bajas concentraciones a las que el polímero presenta efectos que pueden ser detectados mediante las mediciones reológicas. Esto representa una ventaja respecto de los emulsionantes clásicos

usados en la industria, ya que además de ser agregados en muy baja proporción, la dosificación es muy sencilla y práctica de realizar considerando la baja densidad de la mezcla EC-TCM.

Para las tres concentraciones en general se observa un efecto inverso al esperado, ya que tanto la viscosidad como el LF disminuyen o permanecen sin cambio a medida que aumenta el PM, si bien en el caso de la EC-100 se revierte esta tendencia cuando este polímero se usa al 0,07 %. No obstante, para los tres PM más altos, la concentración de 0,10 % es la que claramente se diferencia, produciendo un incremento mucho más marcado en ambos parámetros, aunque proporcionalmente ese aumento es mayor para el LF. Este efecto permite predecir que a partir de esta concentración, la EC puede usarse para incrementar el LF en aquellos chocolates que así lo requieran, como por ejemplo, el chocolate cobertura, el cual luego de ser depositado en finas capas y solidificado, no sea tan simplemente removido al menor incremento de la temperatura, ya que guardará su forma durante más tiempo.

Por otro lado, observando la Figura 37, podemos ver que las mezclas de TCM-EC con mayores proporciones de TCM, actuarán disminuyendo el LF, lo cual puede ser útil para obtener chocolates en los que la fluidificación debe ser rápida al momento de ponerse en contacto con un medio a altas temperaturas (ejemplo: chocolate para taza). Claramente, estos efectos de incremento y disminución también se registrarían en la viscosidad, pero su importancia se circunscribe más al ámbito de la preparación industrial durante el concado de la masa del chocolate fundido. A concentraciones mayores a 0,10 % de EC, la masa de chocolate se torna demasiado plástica, y requiere mayor trabajo su manipulación durante el mezclado del emulsionante.

Los resultados obtenidos muestran que la solubilización de la EC en el TCM, permite que una única mezcla pueda ser utilizada para regular ambos parámetros en el chocolate, incrementándolos o disminuyéndolos según la necesidad, a través de la dosificación de sus componentes.

### 5.2.3. Eficiencia emulsionante de la mezcla TCM-EC.

El chocolate es un fluido no Newtoniano que exhibe un comportamiento pseudoplástico, esto es, un comportamiento plástico no ideal. En este material, una vez que se ha sobrepasado el LF, ocurre la fluidificación por cizallamiento, fenómeno

que claramente se muestra como dependiente del tiempo (sección 1.3.2.). Este fenómeno se da porque cuando se lo somete a fuerzas de cizalla, se produce el colapso de la estructura cristalina tridimensional del chocolate semi-sólido, y las partículas “liberadas” de esa estructura (azúcar, sólidos de cacao) que presentan formas asimétricas, comienzan a alinearse con la dirección del flujo resultante, lo cual causa una disminución en la viscosidad que se hace prácticamente independiente de la cizalla a altas shear rates (11). En este punto, el chocolate prácticamente se convierte en un fluido Newtoniano. Una representación esquemática de este reajuste estructural, se muestra en la Figura 39, sobre una curva de viscosidad típica que se obtiene con las mediciones reológicas.

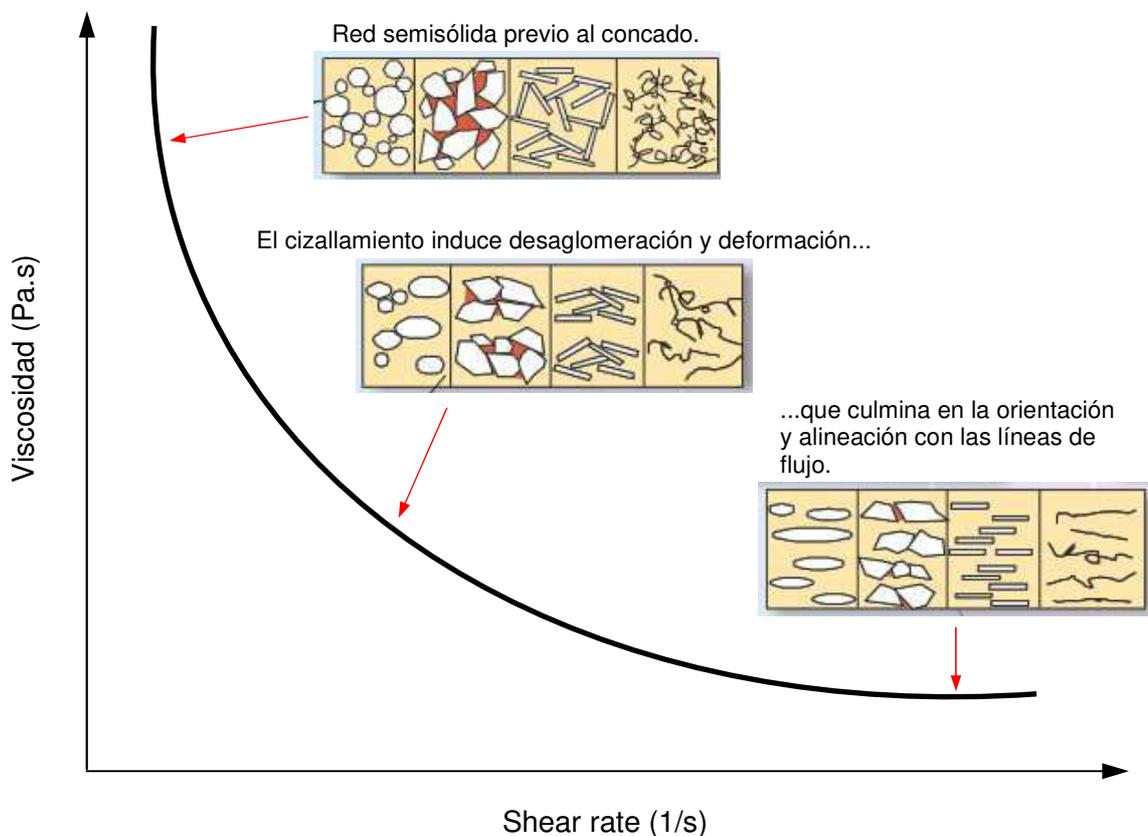


Figura 39. Representación esquemática de la microestructura de las partículas del chocolate bajo fuerzas de cizalla. El incremento en el orden de las partículas lleva a una disminución de la viscosidad (modificado de la referencia 105).

En el procesamiento industrial, la masa de chocolate que proviene del refinado, presenta estas partículas también en una estructura plástica, con una alta proporción de estas partículas en estado de aglomeración. El concado es básicamente un proceso de ruptura de esas aglomeraciones, donde también se da

el ordenamiento con el flujo mencionado arriba (105). Esta acción favorece el recubrimiento de grasa de cada partícula individual que se va liberando de los grumos. Si un emulsionante es eficiente, este proceso se verá favorecido, contribuyendo no sólo a obtener un chocolate más cremoso, sino también reduciendo el gasto en materias primas (MC) y energía.

A partir del año 2000 y luego de diferentes ensayos interlaboratorio, la ICA concluyó que un protocolo de medición y seguimiento del comportamiento de flujo que reflejara el grado de eficiencia del proceso de concado, debía ser realizado de forma tal que el LF se midiera a bajas shear rates, y la viscosidad a altas shear rates. De esta manera, sugirió el protocolo mediante el cual la muestra es sometida a un pre-cizallamiento de 5 min a 5 1/s, seguido de un incremento en la velocidad de cizalla de 2 a 50 1/s en 3 min; luego de lo cual se mantiene la velocidad de cizalla en 50 1/s durante 1 min, antes de que sea finalmente disminuida de 50 a 2 1/s también en 3 min.

En la Figura 40 se muestra el resultado de esta forma de medición completa para tres muestras de chocolate con diferentes tratamientos.

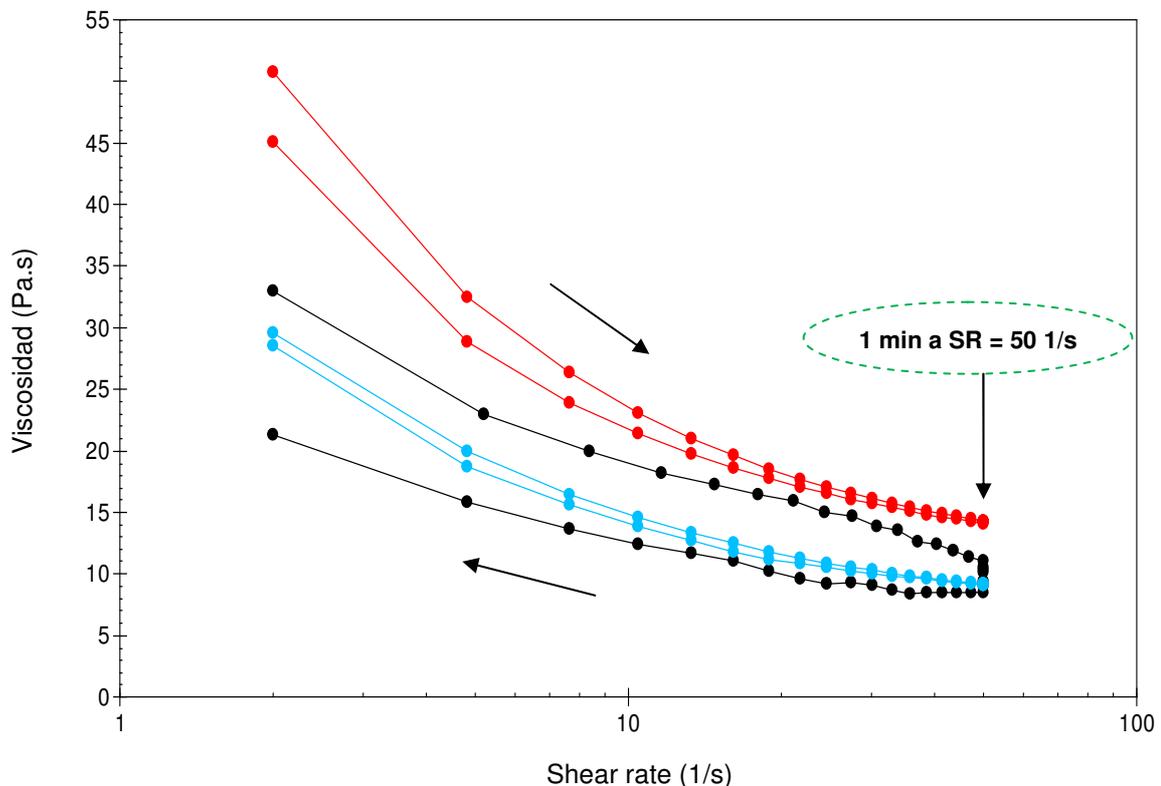


Figura 40. Viscosidad como una función de la velocidad de cizalla para tres muestras de chocolate. Rojo: chocolate sólo con TCM. Negro y azul: chocolates con la misma mezcla emulsionante de TCM + EC-45. Los chocolates rojo y azul, fueron preparados íntegramente en planta piloto, con un concado de 24h; el negro fue mezclado en laboratorio con homogeneizador del tipo rotor-estator (ultraturrax) durante 3 min.

El reograma rojo corresponde a un chocolate que contiene sólo TCM, mientras que los reogramas negro y azul corresponden a chocolates que contienen la misma mezcla emulsionante (TCM + EC-45). Los chocolates representados en rojo y azul fueron preparados en planta piloto, mientras que el chocolate representado en negro fue preparado en el laboratorio. La diferencia entre ellas, implica la existencia de una mayor o menor histéresis, cuya magnitud será indicativa tanto de la eficiencia del proceso de concado, como del efecto con mayor detalle de diferentes emulsionantes.

Como vemos, la disminución de la viscosidad se da en la porción de la curva donde la velocidad de cizallamiento es ascendente, lo cual como vimos en la Figura 39 implica un cambio estructural en el chocolate dado principalmente por la desaglomeración y ordenamiento de las partículas. Cuando la velocidad de cizalla se mantiene constante a 50 1/s durante 1 min, la viscosidad sigue disminuyendo para el chocolate homogeneizado en laboratorio (curva negra), lo cual implica que las partículas continúan sufriendo un proceso de desaglomeración y cubriéndose de fase grasa. Para las otras dos muestras, la viscosidad permanece constante, indicando que el concado ha sido tan eficiente que las partículas han sido separadas unas de otras en su totalidad.

Cuando la velocidad de cizalla comience a disminuir, lo anterior se traducirá en una mayor histéresis para ese chocolate “de laboratorio” que para los dos restantes. Se dice en este caso, que el chocolate homogeneizado en el laboratorio, tiene un comportamiento de flujo más dependiente del tiempo que los restantes, propiedad que se conoce como *tixotropía*. En consecuencia, un chocolate bien concado, no debe ser tixotrópico. Al comparar la curva de este chocolate (curva negra) con la de otro con el mismo emulsionante pero concado en planta piloto (curva azul), puede verse en este último prácticamente la ausencia de histéresis entre las rampas ascendente y descendente, implicando que el concado ha sido eficiente y ya no hay partículas agregadas.

Con el chocolate que contiene agregado sólo el TCM, también puede verse que no se produce disminución de la viscosidad cuando se deja constante la velocidad de cizalla en 50 1/s, indicando también un correcto concado. Sin embargo, la rampa descendente comienza a separarse de la rampa ascendente en la región de las velocidades de cizalla más bajas, lo cual podría quizás significar que existe fraccionamiento graso por diferencia de tamaño de los TG. Si bien se dijo previamente que el TCM no era segregado del chocolate cuando este solidifica

(sección 5.2.2), se debe tener en cuenta que las mediciones reológicas se realizan a 40°C, lo cual sumado al cizallamiento, probablemente generen una mínima separación por PM que la sensibilidad del equipo puede detectar.

No obstante, este último dato permite observar que la EC no sólo contribuye a la estabilidad de la suspensión, sino también favorece su formación, ya que hace que el concado sea más eficiente que en caso que se utilice el TCM únicamente. Es importante destacar que los chocolates con lecitina tampoco son tixotrópicos, con una curva de viscosidad con la mínima histéresis como ocurre para el mostrado aquí en la curva azul, gráfico que no se ha incluido para mayor claridad visual.

### 5.3. CAPÍTULO 3: MECANISMO EMULSIONANTE DE ETILCELULOSA. Efecto de un surfactante polimérico sobre la formación y estabilidad de emulsiones no acuosas (ENA).

#### 5.3.1. Emulsiones no acuosas de estructura *fase dispersa polar - en - fase continua grasa* como modelos de suspensión chocolate.

La ausencia de agua en el chocolate, requirió la búsqueda de sistemas más simples para poder explicar el mecanismo subyacente en la estabilización que la EC produce en el chocolate fundido. Las técnicas habituales para medir adsorción de surfactantes no pudieron usarse por estar diseñadas para su aplicación en sistemas acuosos. Sin embargo, pudimos tener una estimación inicial de la actividad de superficie de la EC utilizando la técnica de *monocapas de Langmuir*, mediante un ensayo de compresión. Esto permite medir la variación de la presión superficial ( $\pi$ ) en la interfase agua-aire cuando se deposita sobre la superficie del agua una capa monomolecular de una entidad química y se la comprime bidimensionalmente. Esta determinación se realiza en una cuba de Langmuir equipada con una balanza de Wilhelmy. Un esquema simplificado de este equipo se muestra en la Figura 41.

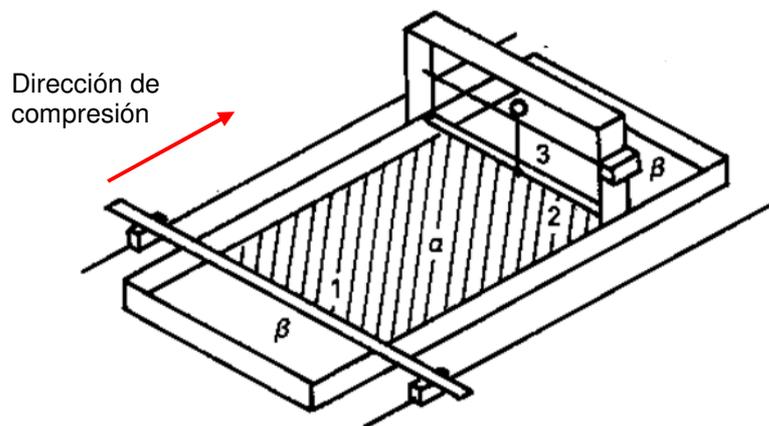


Figura 41. Esquema de una cuba de Langmuir equipada con balanza de Wilhelmy.  $\alpha$ : superficie de la subfase (agua) cubierta por la monocapa,  $\beta$ : superficie libre de la subfase, 1: barrera móvil, 2: elemento sensor en contacto con la superficie (flotador), 3: manómetro de tensión. 2 y 3 son elementos de la Balanza de Wilhelmy, sistema que permite medir las variaciones en la presión de superficie.

Muy resumidamente, la subfase agua pura tiene una tensión superficial determinada (inicial). Por medio de una microjeringa, se inyecta una cantidad tal de

moléculas en la superficie del agua, para que se forme la monocapa. Si esas moléculas presentan actividad de superficie,  $\pi$  cambiará y la balanza de Wilhelmy podrá sentir esa variación.

El diseño del aparato de medición limita la aplicación sólo a líquidos acuosos como subfase, donde puede aprovecharse su elevada tensión superficial como punto de partida para las determinaciones. En este sentido, lo ideal para este estudio hubiese sido utilizar como subfase un líquido apolar no acuoso, pero no pudimos encontrar un líquido que reuniera estas características. No obstante pudimos obtener una aproximación al comportamiento de superficie de la EC utilizando la interfase agua-aire. En la Figura 42 se muestra una isoterma (25°C) de compresión de la EC-10 en esa interfase.

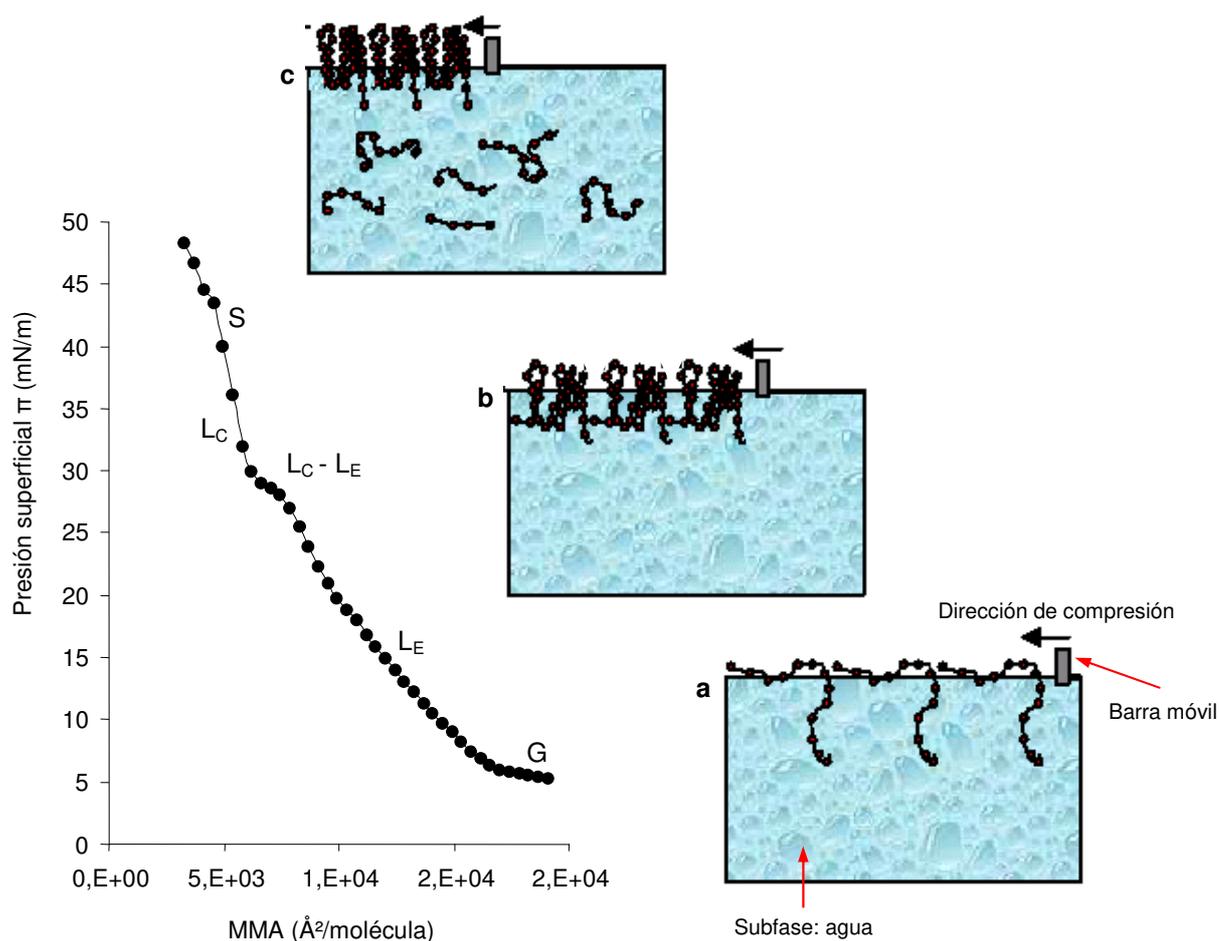


Figura 42. Isoterma de compresión (curva *presión – área*;  $\pi$  - A) para una monocapa de EC-10 en la interfase agua-aire (25°C), incluyendo una representación esquemática de los eventos ocurridos durante la compresión. G: fase gaseosa.  $L_C$  y  $L_E$ : Fases líquida condensada y expandida, respectivamente. S: fase sólida.

La curva (isoterma) se obtiene mientras se comprime la monocapa, y puede medirse  $\pi$  como una función del área de la superficie que está disponible para cada molécula. Así, la barra móvil va disminuyendo cada vez más el área en la superficie donde pueden ubicarse las moléculas, produciéndose variaciones en  $\pi$ . Por esto, pueden aparecer en la isoterma diferentes regiones llamadas *fases*, y las obtenidas en la Figura 42 son las características de una molécula anfifílica, y comunes para algunos polímeros (106). Puede obtenerse una extensa explicación acerca de la aparición de estas fases en la bibliografía, pero lo que interesa en este estudio, es la alta presión de colapso registrada ( $\pi \approx 50$  mN/m), que denota una importante actividad de superficie. Esto implica que la distancia entre las moléculas comienza a reducirse (Figura 42-b) luego de iniciada la compresión mostrada en 42-a, logrando un acomodamiento tan favorable y estable que pueden mantenerse en la superficie soportando altos valores de compresión, hasta que finalmente ya no pueden ser acomodadas en la pequeña área superficial que resulta en 42-c, y deben distribuirse en la subfase, provocando así el *colapso* de la monocapa.

Este comportamiento depende de las propiedades físicas y químicas del anfifilo, e implica que una molécula de EC presenta regiones de diferente polaridad, que le permiten interactuar indistintamente no sólo con ambas fases agua (polar) y aire (apolar), sino también con las moléculas adyacentes, eventos todos que se ven traducidos en la estabilidad de la monocapa y se manifiesta en las diferentes regiones de la isoterma. Además de esto, el comportamiento de la monocapa también depende de la temperatura y de la composición de la subfase, y si bien el agua no es la ideal para nuestro sistema, nos permitió observar que la EC podía interactuar con estructuras de diferentes polaridades, y mostrar así su carácter anfifílico.

En este contexto y de acuerdo a lo expuesto en las secciones 1.5.2. y 1.5.3., las posibilidades de evaluar los mecanismos de estabilización de la EC, se focalizaron en encontrar un sistema disperso simple que pudiera emular la estructura "*fase dispersa polar no acuosa - en - fase continua grasa*" presente en el chocolate. Partiendo de las soluciones y oleogeles descritos en el Capítulo 2, un primer paso lógico fue la evaluación del cumplimiento de la Regla de Bancroft, considerando que la solubilidad de la EC en el TCM debía ser capaz de llevar a estos TG a formar una fase continua, donde posteriormente poder dispersar un líquido polar no acuoso. Entre diferentes candidatos evaluados, el propilenglicol (PG) fue el que mejor resultado nos permitió obtener y que además presenta ventajas considerables, entre

las que podemos citar su aptitud para uso alimentario, su inmiscibilidad en toda proporción con los aceites evaluados, su limpidez y su simpleza para ser manipulado.

Obtuvimos así *emulsiones no acuosas (ENA)* que no sólo nos permitieron explicar el mecanismo de acción de la EC, sino también iniciar una línea de investigación poco explorada y con potencial para futuros desarrollos, ya que estas emulsiones presentan interesantes propiedades estructurales y de flujo, que las hacen atractivas para ser utilizadas en formulaciones de alimentos, ya sea como emulsiones propiamente dichas o como vehículos para principios activos en alimentos funcionales.

Ya se expuso que los polímeros que presentan actividad estabilizante de emulsiones o suspensiones, pueden realizarlo principalmente a través de dos mecanismos posibles: por actividad surfactante propiamente dicha, al ubicarse en la interfase de los sistemas dispersos, o por incremento de la viscosidad de la fase continua de tales sistemas. A través del primer mecanismo se logra la forma más habitual y de características netamente termodinámicas de obtener una emulsión estable: la molécula con actividad de superficie se sitúa en la interfase formada entre las fases continua y dispersa, disminuyendo la energía libre de interfase y evitando así la fusión entre las gotas de fase dispersa. El segundo mecanismo, de base cinética y habitualmente observado en macromoléculas, implica que el incremento en la viscosidad de la fase continua restringirá la movilidad de las gotas de fase dispersa, disminuyendo así la probabilidad de que las mismas experimenten colisiones y la posterior agregación que lleve a la separación de fases. Este último es un mecanismo que a priori podría considerarse como el más probable, dado el avance en las investigaciones sobre el uso del polímero EC en la estructuración de aceites líquidos para la obtención de geles de base oleosa (“oleogeles”; sección 5.2.1).

Resultaba entonces lógico comenzar este estudio con el efecto de la concentración de EC sobre la fase dispersa, como punto de partida para la obtención de ENA. En este sentido se utilizaron tanto los oleogeles como las soluciones de baja concentración (Capítulo 2) y se caracterizaron sus propiedades mecánicas y de flujo. Posteriormente, el cambio experimentado por esas propiedades cuando se añadió el componente a dispersar (PG), permitió obtener conclusiones relacionadas al mecanismo estabilizador del polímero.

### 5.3.2. Efecto de la EC sobre el comportamiento mecánico de los oleogeles

La disolución de la EC a niveles de concentración por encima de 7 % p/p lleva a la formación de oleogeles (sección 5.2.1), los cuales han sido estudiados en cierta extensión. Mencionamos que debido a su elevada consistencia, esos geles no pudieron ser medidos en reómetro, por lo cual la estructura de estas muestras fue caracterizada en texturómetro, midiendo la fuerza a la máxima distancia de penetración (FMDP) registrada en el ensayo de extrusión hacia atrás (*back extrusion test*) (ver sección 4.2.2.2). Un perfil típico obtenido en nuestro laboratorio durante este ensayo se muestra en la Figura 43. De acuerdo con Zetzi *et al.* (68), usamos la FMDP como una medida de la dureza, firmeza o rigidez de los geles (Figura 43, punto B).

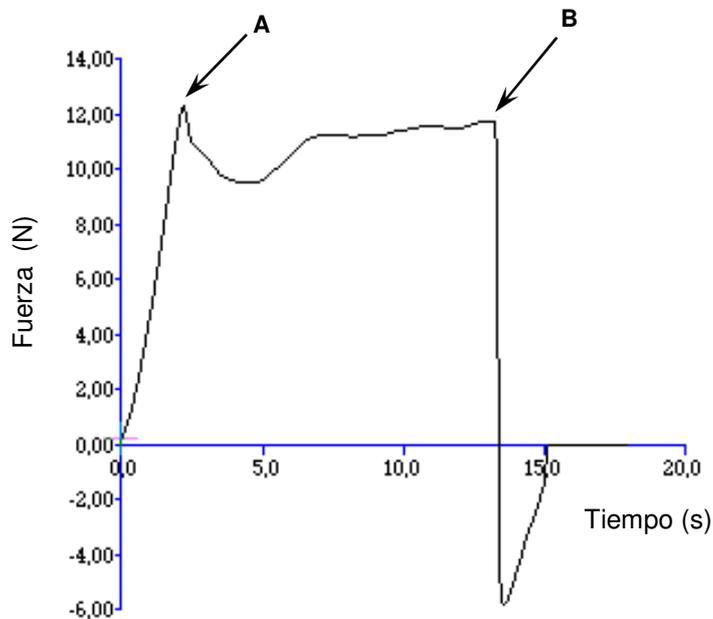


Figura 43. Perfil de extrusión hacia atrás (*back extrusion*) típico, para un oleogel obtenido con 9 % de EC-10 en TCM. Puntos A y B: ver texto.

Además, consideramos la distancia a la que la sonda penetra antes que se alcance el valor de fuerza en el punto A (Figura 43), como un indicador de la elasticidad de los geles.

La Figura 44-a resume la dependencia con la concentración que presenta la FMDP para oleogeles hechos con EC de cuatro pesos moleculares diferentes. Para comparación, se caracterizaron oleogeles de aceite de soja preparados con los mismos polímeros (Figura 44-b).

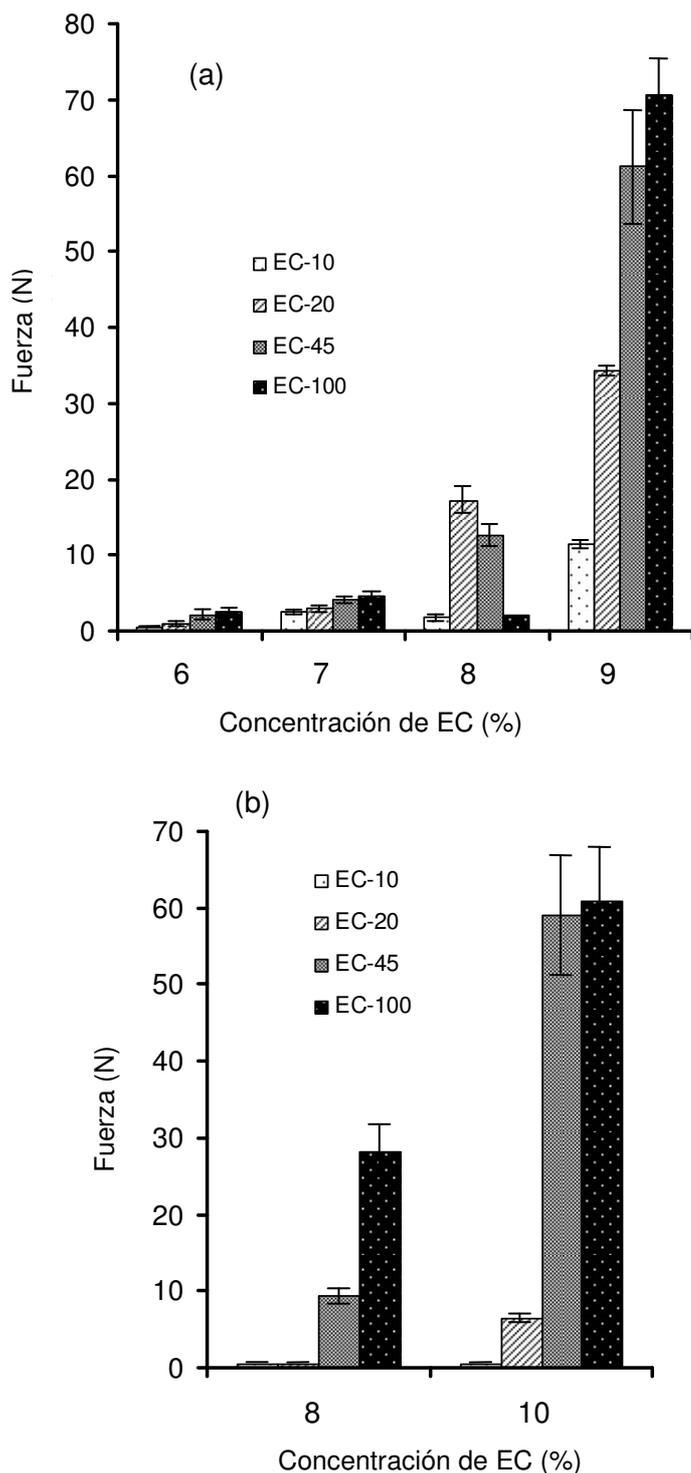


Figura 44. Fuerza a la máxima distancia de penetración (FMDP) para el ensayo de extrusión hacia atrás (back extrusion) en oleogeles preparados con diferentes concentraciones de EC en TCM (a) y aceite de soja (b).

Es interesante notar que, a concentraciones de EC entre 6 y 7 % p/p, la FMDP se incrementó a medida que aumentaba el PM del polímero, pero con pequeñas diferencias entre muestras. No obstante, al 8 % de EC se observó un

efecto bifásico con una caída en la fuerza de penetración estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para los dos polímeros de mayor PM cuando se disuelven en el TCM (Figura 44-a). Para descartar la posibilidad de que este resultado pudiera deberse a la necesidad de un mayor tiempo de gelificación para estas dos EC (por lo que los geles podrían mostrar la disminución que se aprecia en la Figura 44-a), estudiamos la dependencia en el tiempo que podrían tener las propiedades estructurales de los geles para los cuatro PM al 8 % en el TCM, y también seguimos este estudio a través de un ensayo de extrusión hacia atrás (back extrusion). Como puede verse en la Figura 45, este experimento mostró que la máxima fuerza de los geles se alcanzó después de 24 h de incubación a 4 °C de temperatura (Figura 45).

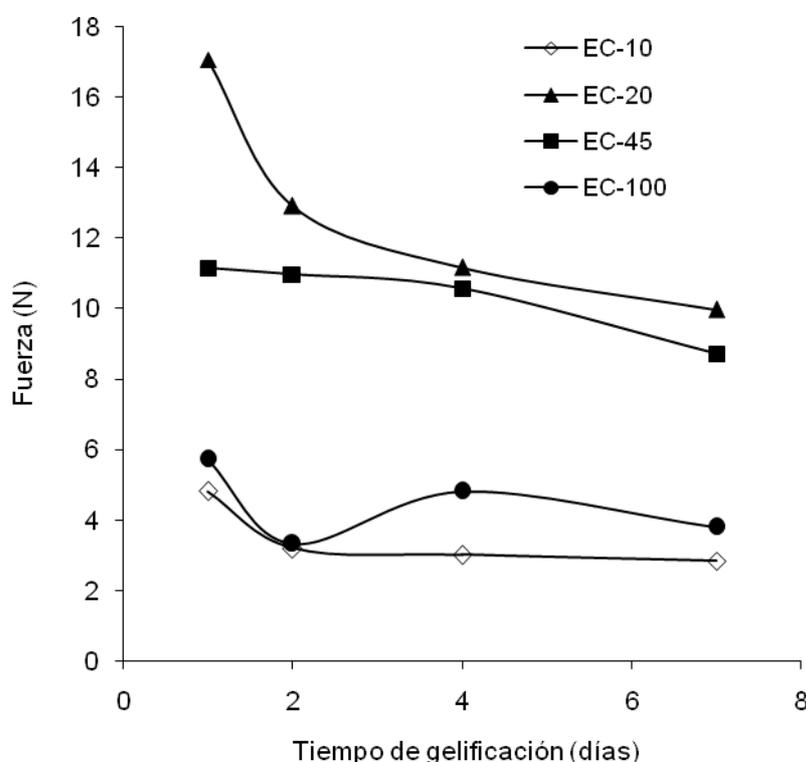


Figura 45. Evolución en el tiempo de la fuerza a la máxima penetración en el test de back extrusion para geles de EC de cuatro pesos moleculares, al 8 % en el TCM.

Estructuralmente, las interacciones entre la red tridimensional del gel y la fase líquida determinan el comportamiento mecánico y la estabilidad del sistema (66,107). Además, al aumentar el PM del polímero, se pueden generar un mayor número de interacciones intermoleculares entre las cadenas poliméricas, en detrimento de las interacciones polímero-aceite, afectando en consecuencia la rigidez global del gel (68). Esta podría ser una de las razones por las que los geles formados con el 8 %

de EC muestran esa caída en la FMDP para los dos polímeros de mayor PM. Al 9 % de EC es posible que el efecto sobre la elasticidad del gel y la dureza superen cualquier efecto producido por el incremento de las interacciones intermoleculares que podría estar sucediendo en el caso de los dos polímeros de mayor PM. Esto puede verse al considerar la distancia que la sonda penetra antes de alcanzar la fuerza del punto A (Figuras 43 y 46). Una distancia de penetración corta previo al punto A indica un gel quebradizo mientras que una distancia de penetración mayor antes de la ruptura indica un gel más elástico. Para los geles al 8 % de la cuatro EC, esta distancia permanece prácticamente constante y es corta, sugiriendo que el incremento en el PM del polímero es compensado por las interacciones intermoleculares, dando lugar a geles quebradizos con elasticidad similar.

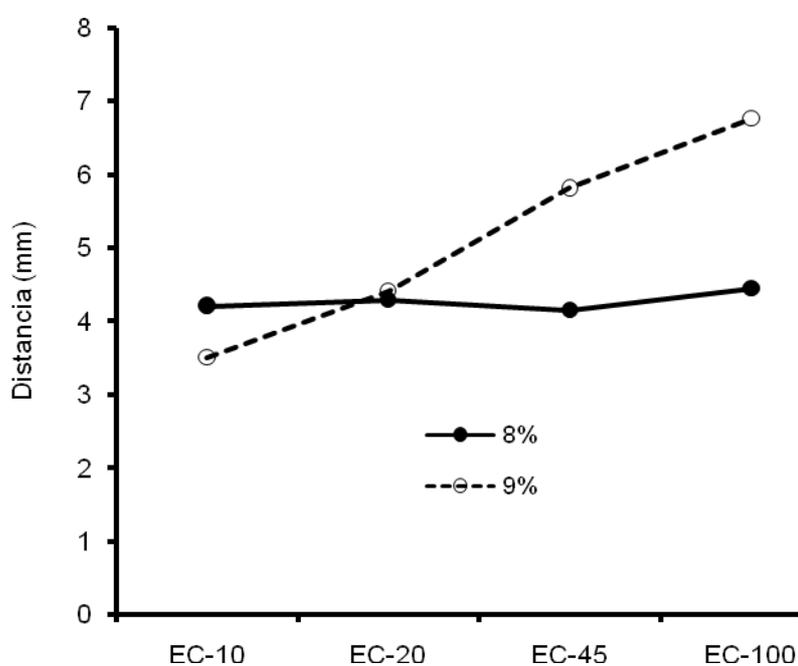


Figura 46. Distancia que la sonda penetra en el oleogel antes que la distancia en el punto A (Figura 43) sea alcanzada, durante el ensayo de extrusión hacia atrás, para todos los PM de EC a concentraciones de 8 % y 9 %.

Por último, de acuerdo con la tendencia observada en la fuerza de penetración, los geles al 9 % de EC mostraron un incremento en la elasticidad a medida que aumentó el PM de la EC, sugiriendo que a esta concentración de polímero los efectos estructurantes derivados de la interacción red polimérica-fase líquida, predominan sobre las interacciones intermoleculares polímero-polímero (Figura 46).

### 5.3.3. Preparación y estabilidad de emulsiones de PG en TCM.

Estudios recientes del efecto de surfactantes sobre organogeles formados por EC en aceite de soja, mostraron que la red del gel no es sostenida únicamente por enlaces puente hidrógeno entre las moléculas de EC, sino también por interacción entre los grupos oxhidrilos del polímero y el surfactante (67). Por ello nos interesamos en explorar si la EC podría estabilizar estas emulsiones no acuosas de PG en TCM. Es válido mencionar como punto de partida, que las “emulsiones” de PG tanto en TCM como aceite de soja, en cualquier proporción de éstos y en ausencia de surfactante, son altamente inestables y se separan espontáneamente en las dos fases constituyentes, entre 20 y 30 s (Figura 47).

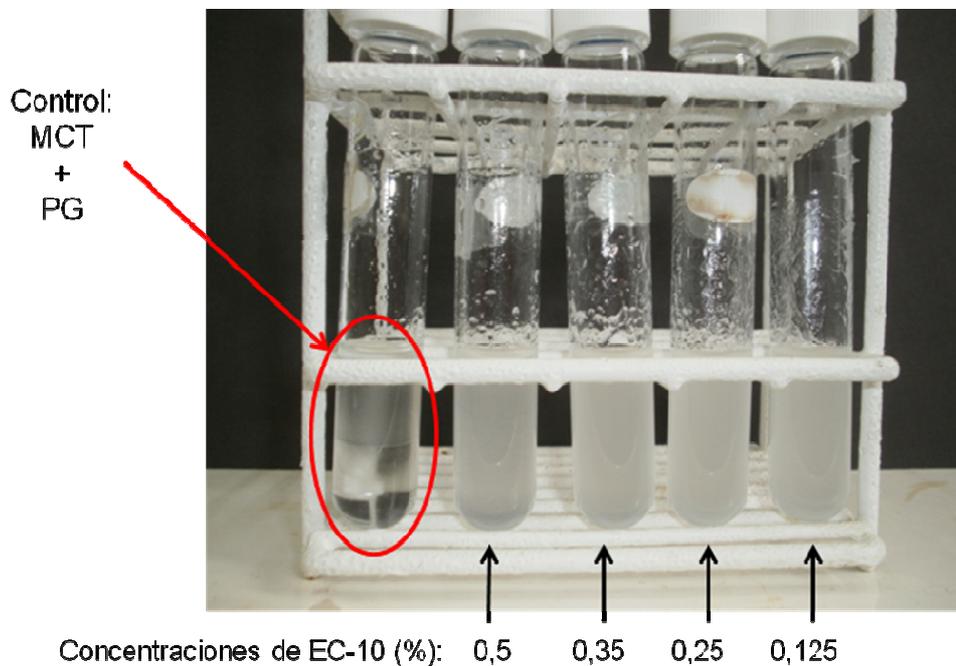


Figura 47. Apariencia de emulsiones 50/50 de PG en TCM, estabilizadas con diferentes concentraciones de EC-10 disuelta en la fase grasa. La separación de fases en el tubo control, se produce muy rápidamente.

Es muy interesante notar que, aunque la EC es insoluble en PG, se obtuvieron emulsiones tipo cremosas a temperatura ambiente luego de unos pocos segundos después de la adición de PG a las mezclas de EC y aceite. No obstante, se usaron diferentes fuerzas de homogeneización para estandarizar el proceso de obtención de las emulsiones (sección 4.2.1.5). De esta manera, todas las emulsiones se obtuvieron dentro de los 10 s de aplicada la fuerza, ya sea esta en vórtice (vórtex) o en el sistema rotor-estator de alto cizallamiento (ultraturrax). Como

era de esperar, la apariencia macroscópica de las emulsiones fue más homogénea cuando se utilizó el sistema de rotor-estator, principalmente debido a la intensa fuerza de cizallamiento característica de este equipo. No obstante, la microestructura de las emulsiones fue similar independientemente del aceite o el procedimiento de homogeneización utilizado en su preparación. En cualquier caso, la formación de las emulsiones llevó a una estructuración del sistema en conjunto de tal forma que al invertir el tubo, su contenido no fluía. Las emulsiones obtenidas de esta manera fueron estables macroscópicamente por lo menos un mes a temperatura ambiente, con muy poca presencia de exudado.

Estos resultados indican que independientemente del mecanismo por el cual se produce la estabilización de las emulsiones, la EC es un agente emulsionante muy efectivo para emulsiones no acuosas. Por otra parte, un aspecto importante de destacar es la simplicidad en la preparación, especialmente si se considera que las emulsiones no acuosas generalmente presentan mayor número de dificultades técnicas que las emulsiones en base agua (tanto w/o como o/w), frecuentemente relacionadas con el uso de equipamiento específico para su preparación.

#### 5.3.3.1. Caracterización de la estructura de las emulsiones.

A través del microscopio óptico, se observó que la microestructura de las emulsiones PG-en-aceite estabilizadas por EC fue similar para los diferentes aceites y procedimientos de preparación empleados, así como para los diferentes PM del polímero y su concentración (Figuras 48-a y 48-b). Además, la Figura 48-c muestra que las emulsiones formadas son estables en presencia de un co-surfactante como PGPR. De acuerdo a aspectos teóricos de la función de moléculas tensoactivas, la solubilidad de la EC en la fase oleosa y su insolubilidad en el PG bajo todas las condiciones aquí evaluadas (calentamiento, agitación, co-surfactante) es razonable esperar que debería obtenerse una emulsión del tipo PG-en-aceite (32). Sin embargo, Melzer *et al.* describen que en las emulsiones estabilizadas por EC y dependiendo de la temperatura, puede ocurrir una inversión de fase (46).

Por esto, y en la intención de identificar la fase dispersa de nuestros sistemas, las emulsiones fueron teñidas con azul de metileno. Este colorante de naturaleza polar, es totalmente soluble en PG pero es insoluble en los aceites evaluados. De esta manera, comprobamos que siempre se formó una emulsión del tipo PG-en-aceite, sin inversión de fase. Aún cuando en algunos casos las gotas no fueron

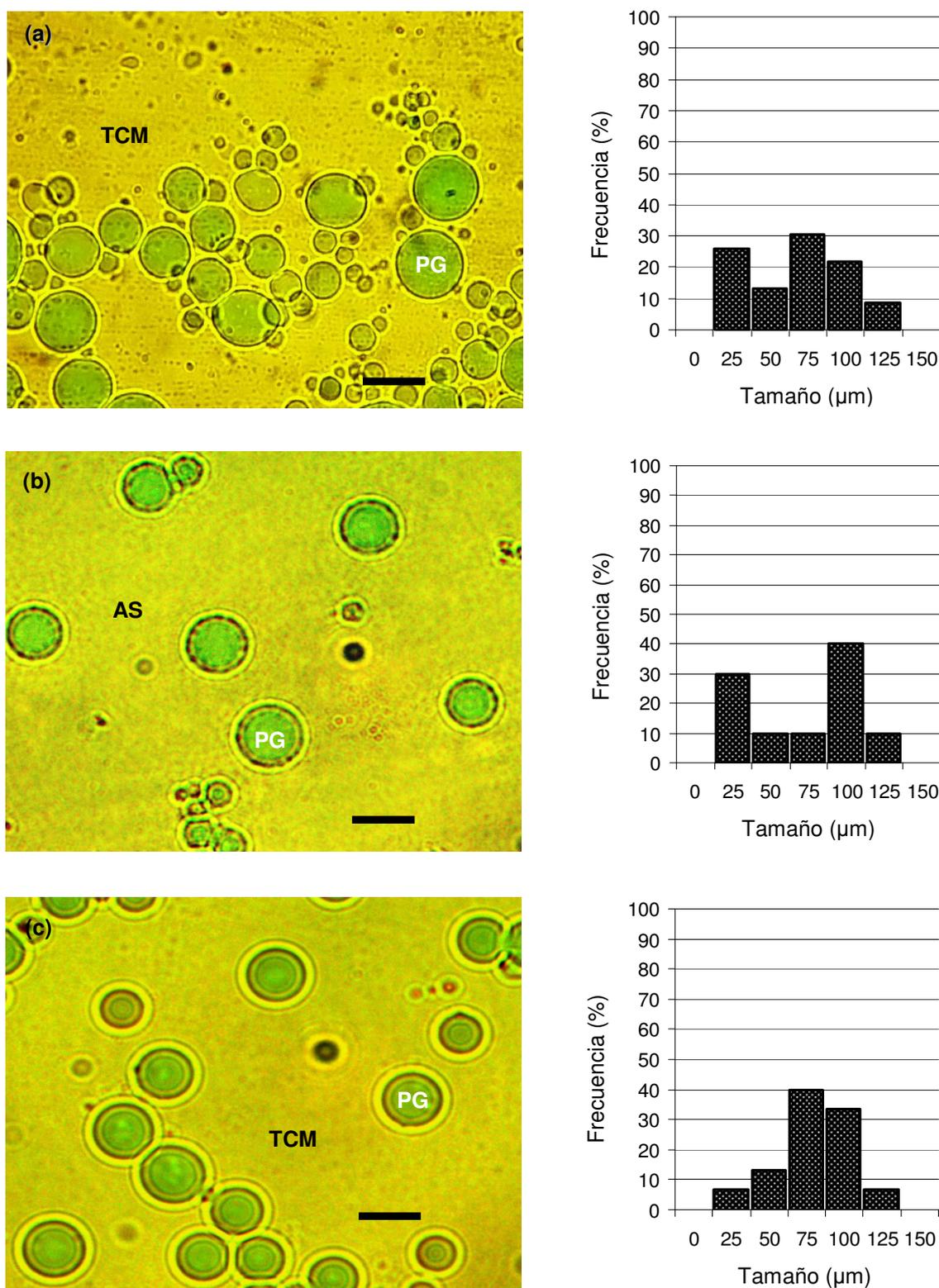


Figura 48. Ejemplos de fotomicrografías de emulsiones no acuosas y frecuencia de tamaño de gotas de fase dispersa (PG). (a) Emulsión de PG en TCM (2:1) estabilizada con 2 % de EC-10 p/p en el TCM. (b) Emulsión de PG en aceite de soja (1:1) estabilizada con 1 % p/p de EC-20 p/p en el TCM. (c) Emulsión de PG en TCM estabilizada con 2 % de EC-20 p/p y 1 % de PGPR p/p en el TCM. Las muestras (a) y (c) fueron preparadas con homogeneizador de alto cizallamiento a 8000 r.p.m., y la muestra (b) fue preparada con homogeneizador vórtex a 3200 r.p.m. Aumento: 100x (barra = 100  $\mu\text{m}$ ).

totalmente uniformes en su tamaño (Figura 48), su forma fue perfectamente esférica y con mínimas deformaciones. El hecho que la presencia del co-surfactante PGPR no afectó la estabilidad del sistema, suma otro elemento indicativo de la estabilidad de las emulsiones obtenidas.

### 5.3.3.2. Propiedades de flujo de las emulsiones obtenidas usando concentraciones bajas de EC.

Teniendo en cuenta que a concentraciones por debajo del 5 % p/p, las soluciones de EC tanto en TCM como en aceite de soja (así como también las emulsiones PG-en-aceite resultantes de usar esas soluciones) son viscosas pero fluidas, para caracterizar sus propiedades de flujo se optó por la medición de las mismas en reómetro.

### 5.3.3.3. Efecto del PM y concentración de EC.

Como puede verse en la Figura 49, las soluciones de EC en TCM se comportan como fluidos Newtonianos clásicos.

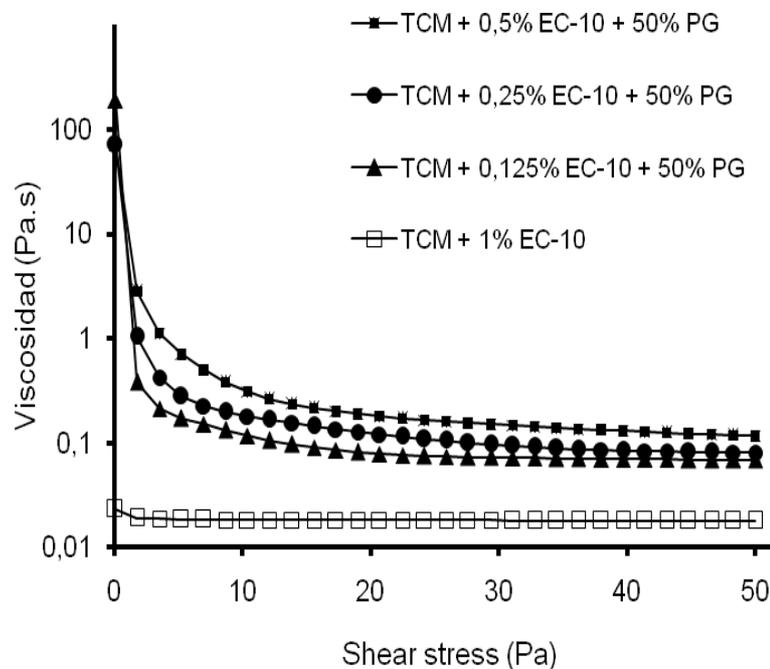


Figura 49. Evolución de la viscosidad a 25 °C en función de la fuerza de cizalla (shear stress) para TCM con 1 % p/p de EC-10, y emulsiones preparadas con 50/50 de PG/TCM y estabilizadas con 0,125 %, 0,25 % y 0,50 % de EC-10 disuelta en la fase continua grasa. Las emulsiones fueron obtenidas por homogeneización con vórtex a 3.200 r.p.m. durante 30 s.

Cuando se adicionó 50 % p/p de PG a soluciones de diferentes concentraciones de EC en TCM, las emulsiones que se obtuvieron presentaron propiedades de flujo totalmente diferentes. Esto puede verse a bajas fuerza de cizalla, donde se produce la aparición de un límite de fluencia típico de los fluidos pseudoplásticos. Este comportamiento fue similar para las emulsiones obtenidas con 10 % y 30 %. Cómo era de esperar, el aumento en la concentración de EC causó un desplazamiento de las isothermas hacia valores de viscosidad aparente más altos.

Cuando usamos aceite de soja en lugar del TCM, la tendencia general en las propiedades de flujo fue similar, excepto que el comportamiento fue pseudoplástico aún en ausencia de PG (Figura 50).

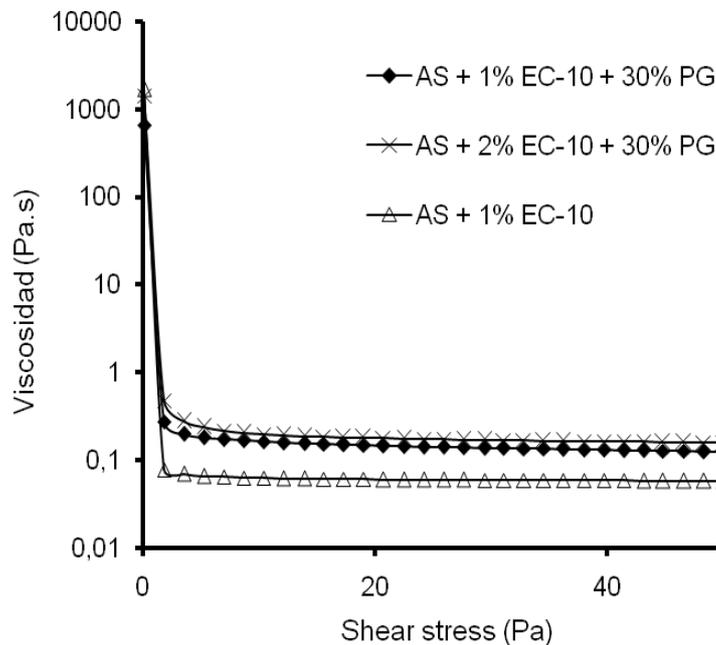


Figura 50. Evolución de la viscosidad a 25 °C en función de la fuerza de cizalla (shear stress) para aceite de soja (AS) con 1 % p/p de EC-10, y emulsiones preparadas con 30/70 de PG/AS y estabilizadas con 1 % y 2 % de EC-10 disuelta en la fase continua grasa. Las emulsiones fueron obtenidas por homogeneización con vórtex a 3.200 r.p.m. durante 30 s.

Es interesante notar que las propiedades de flujo de las emulsiones de PG en TCM fueron más sensibles a la adición de muy pequeñas concentraciones de EC, en comparación a aquellas obtenidas con aceite de soja. Quizás el hallazgo más inesperado relacionado con las emulsiones de PG en TCM fue la independencia de los efectos observados con el PM de la EC cuando se los observa a altas fuerzas de cizallamiento, mientras que se observó un efecto inversamente proporcional a bajas fuerzas (Figura 51). Es sorprendente si se tiene en cuenta que la tendencia habitual

para la mayoría de los polímeros es que en solución su viscosidad aumente a medida que aumenta el PM.

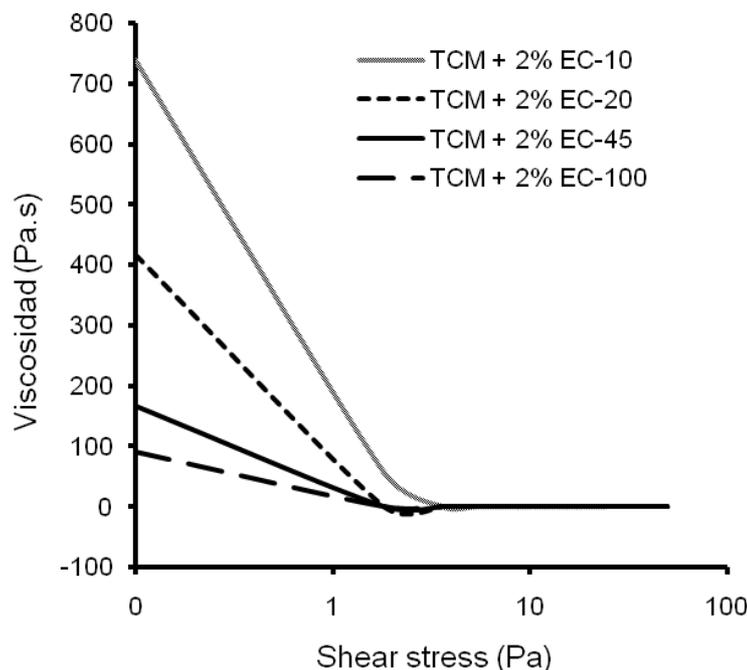


Figura 51. Viscosidad a 25 °C en función de la fuerza de cizalla (shear stress) para emulsiones PG/TCM 1:1 estabilizadas con EC de diferentes PM, disueltas en la fase continua grasa. Todas las emulsiones fueron obtenidas por homogeneización con vórtex a 3.200 r.p.m. durante 30 s.

En este contexto y como ya hemos mencionado, se ha sugerido que el efecto estabilizador de determinados polímeros sobre emulsiones podría deberse a un incremento en la viscosidad de la fase continua (efecto cinético). La independencia observada respecto del PM del polímero, o incluso la dependencia inversa, indica que la estabilización que la EC produce sobre las emulsiones PG-en-aceite, es debida a la presencia del polímero en la interfase y por lo tanto de tipo termodinámico.

#### 5.3.3.4. Dependencia de las propiedades de flujo de las emulsiones respecto de la proporción de PG

Como se ha establecido más arriba, la incorporación de PG al TCM o al aceite de soja con EC, lleva a la formación de emulsiones de PG en una fase continua oleosa. Interesantemente, se observó un importante incremento en la viscosidad y el comportamiento pseudoplástico de las emulsiones cuando se incrementó la proporción de PG.

En la Figura 52-a se muestran como un ejemplo de esto las curvas de flujo para las emulsiones obtenidas a partir de una solución de EC-45 al 2 % p/p. Una tendencia similar se observó para las otras EC de diferentes PM (datos no mostrados). Cuando las emulsiones se prepararon usando aceite de soja como fase oleosa, el incremento en la viscosidad aparente y en el límite de fluencia fue menor que cuando se usó TCM con 10 % y 30 % p/p de PG.

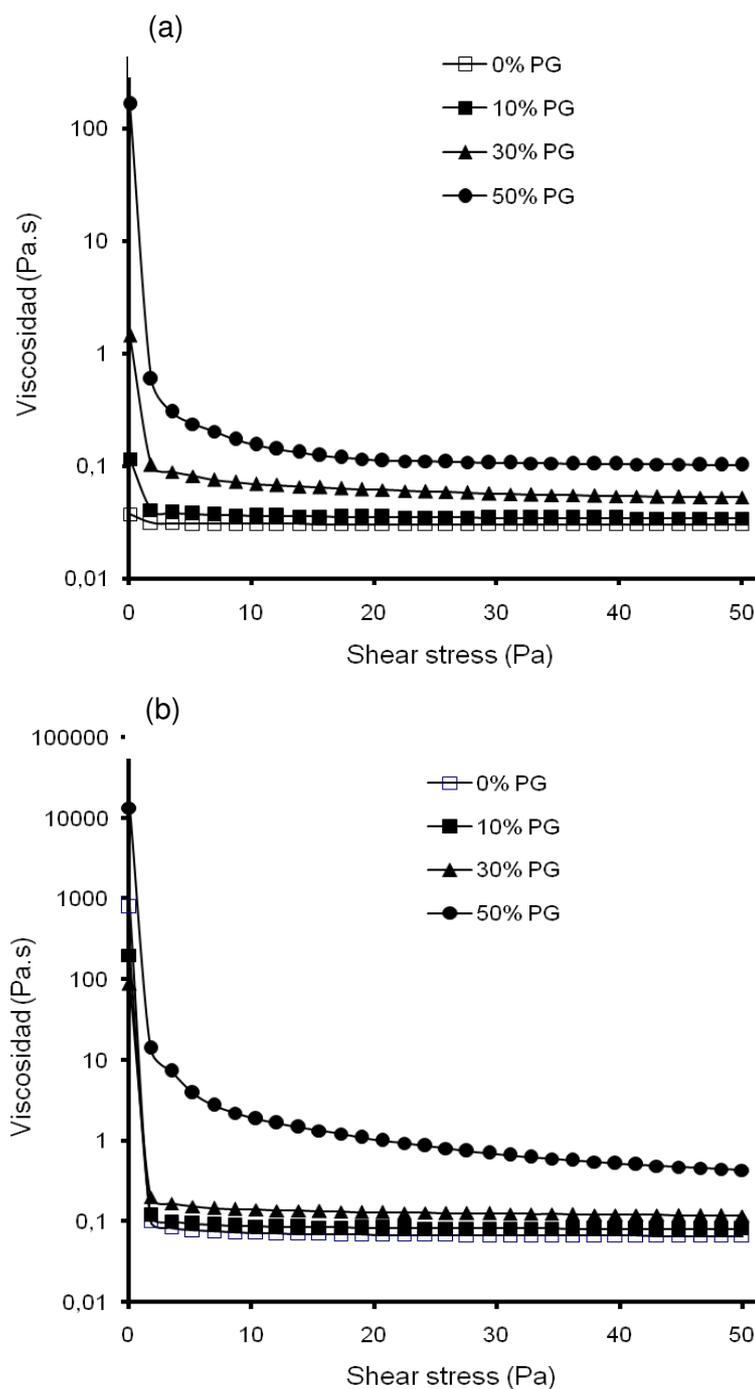


Figura 52. Efecto de la concentración de PG sobre la viscosidad y el LF a 25 °C, para emulsiones estabilizadas con 2 % p/p de EC-45 disuelta en (a) TCM y (b) aceite de soja (AS).

No obstante, un incremento significativo en la viscosidad aparente de la emulsión fue observado cuando se utilizó 50 % p/p de PG (Figura 52-b). De modo contrario a lo que podría intuirse, las emulsiones formadas usando TCM como fase oleosa, mostraron mayores viscosidades cuando fueron estabilizadas con las EC de PM más bajos (Figura 53).

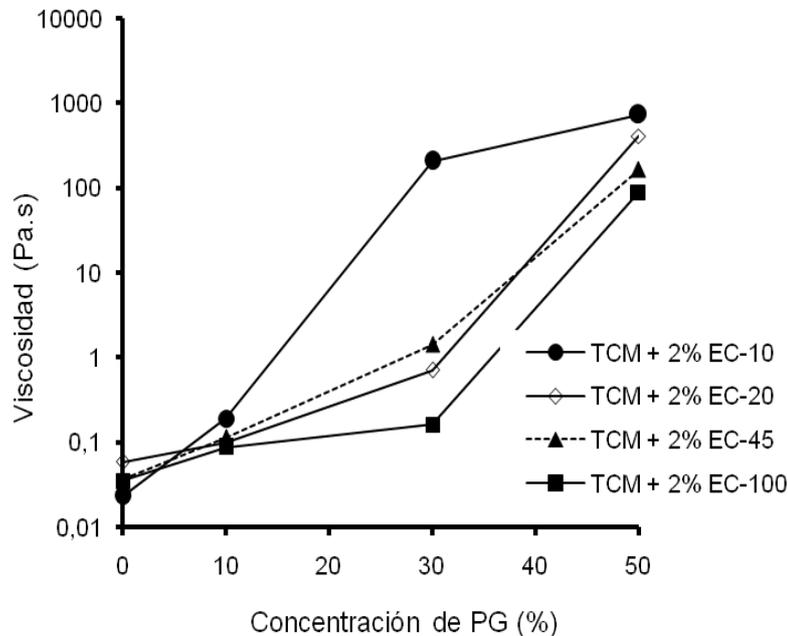


Figura 53. Viscosidad a la mínima fuerza de cizalla registrada (0,1 Pa; 25 °C) como una función de la concentración de PG, para emulsiones de PG en TCM estabilizadas con 2 % de EC de diferentes PM.

Estos resultados avalan la interpretación realizada anteriormente, en cuanto a que los efectos estabilizadores de la EC no son debidos a un incremento en la viscosidad de la fase continua sino a la actividad de superficie del polímero.

#### 5.3.3.5. Emulsiones obtenidas de soluciones de EC a altas concentraciones y mediciones de extrusión hacia atrás

Cuando la concentración de EC en el TCM estuvo entre 5 y 7 % p/p, se produce la gelificación de dichas soluciones; los geles resultantes fueron blandos y algunos de ellos tixotrópicos, porque su estructura rígida se pierde, haciéndose totalmente fluidos cuando se aplica una mínima fuerza (Capítulo 2). En base a esto, se utilizó un test de extrusión hacia atrás (back extrusion) para caracterizar las propiedades estructurales de las emulsiones obtenidas.

Contrariamente a lo que se observó a bajas concentraciones de EC, donde el agregado de PG promueve la estructuración de la solución oleosa al formar las emulsiones, en este caso se observó un dramático efecto desestructurante sobre los oleogeles luego de la preparación de las emulsiones (Figura 54). Este resultado es probablemente debido a la interrupción de la red del gel por parte de las gotas líquidas del PG.

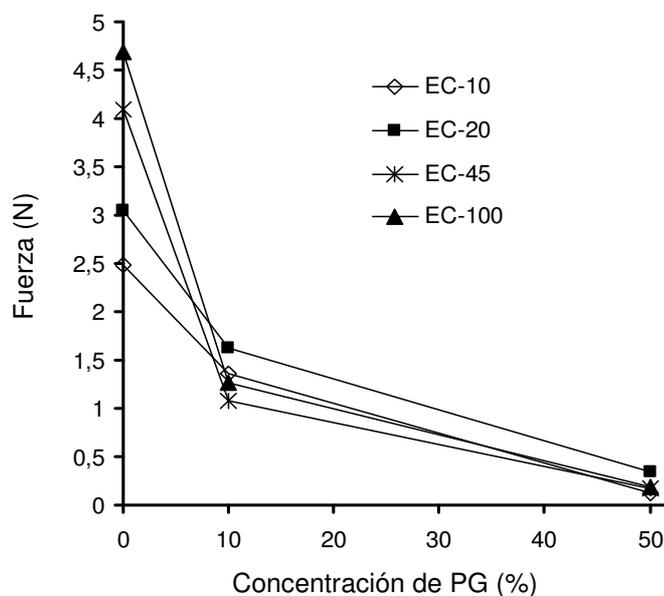


Figura 54. Fuerza a la máxima distancia de penetración (FMDP; 20 mm) en el ensayo de back extrusión como una función de la concentración de PG, para emulsiones de PG en TCM obtenidas a partir de oleogeles de EC al 7 %. 0 % de PG corresponde al oleogel de partida, y es incluido con fines comparativos. Las líneas son simplemente una guía visual.

Vemos así que la EC disuelta en el TCM o aceite de soja puede estabilizar emulsiones no acuosas de PG como fase dispersa sin el requerimiento de co-surfactantes. Las emulsiones formadas de esta manera son fáciles de obtener y muestran una muy buena estabilidad macroscópica, de al menos un mes a temperatura ambiente. Además, los efectos de la EC sobre las propiedades de flujo de las emulsiones de PG en aceite son independientes del PM del polímero, sugiriendo que la molécula polimérica estabiliza la emulsión por su actividad de superficie más que por su capacidad de incrementar la viscosidad de la fase oleosa.

#### **5.4. CAPÍTULO 4: CHOCOLATE Y MANTECA DE CACAO COMO VEHÍCULOS DE PRINCIPIOS ACTIVOS FARMACÉUTICOS. Formulaciones novedosas para fármacos poco solubles en agua.**

Al 2013, aproximadamente el 40% de los nuevos fármacos son escasamente solubles en agua (86). Este tipo de principios activos genera numerosas dificultades a la hora de desarrollar las formulaciones que los llevarán incluidos como agentes terapéuticos. Los principales inconvenientes se relacionan con el perfil de liberación del fármaco, su estabilidad, la identificación de excipientes adecuados, polimorfismo, efecto de los alimentos sobre la absorción, enmascaramiento del sabor y uniformidad de dosis. En consecuencia, la formulación resultante presentará gran complejidad en su composición, llevando a mayor dificultad en las etapas tecnológicas de fabricación, con el consecuente encarecimiento del producto (86). Considerando la naturaleza hidrofóbica de la MC y sus propiedades ya descritas en los capítulos previos, en esta etapa se seleccionaron dos fármacos de escasa solubilidad en agua para la obtención de nuevas formulaciones terapéuticas. Estas preparaciones fueron diseñadas no sólo pensando en la estricta vehiculización del principio activo, sino también observando el resto de los aspectos problemáticos relacionados con este tipo de drogas.

##### **5.4.1. Mebendazol (MBZ). Antiparasitario de uso humano y animal, con problemas de polimorfismo.**

El MBZ (Figura 22) es un potente antihelmíntico de amplio espectro, usado habitualmente en el tratamiento de ascariasis, uncinariasis, oxiuriasis y trichuriasis (88). Como otros antihelmínticos benzimidazoles, el mecanismo de acción primario del MBZ ha sido explicado a través de su unión a las proteínas del citoesqueleto (tubulinas) de los parásitos, impidiendo así la reproducción de los mismos (88).

El principal atractivo para la formulación de una especialidad farmacéutica que incluyera el MBZ, radica en la posibilidad que la fase grasa del chocolate pudiese actuar como solvente para este principio activo, sumado al posible enmascaramiento del sabor que puede proveer el chocolate, considerando que se trata de una droga extremadamente amarga. Sin embargo, nuestros intentos de solubilizarlo en forma directa en la MC no fueron exitosos; incluso aún en el vehículo oleoso que utilizamos para la disolución previa de la EC como surfactante

polimérico. Confirmamos así lo descrito en la sección 1.7.1., definiendo al MBZ como una droga insoluble en un amplio abanico de solventes, incluyendo algunos de los más apolares conocidos.

Se aprovecharon entonces las propiedades de fusión de la MC (sección 1.6.1.), lo que permitió la obtención de suspensiones sólidas de muy buena homogeneidad. La dispersión total de la droga se logró en MC fundida a 50 °C, fraccionando luego esta dispersión en pequeñas unidades que incluyeron la dosis terapéutica. El enfriamiento rápido de estas se realizó para evitar la sedimentación de la droga, evento cinéticamente poco favorable dado que la viscosidad de la MC líquida es un obstáculo en sí misma para el movimiento de las partículas de MBZ dispersas.

Dado que la preparación de las suspensiones implica la fusión y re-solidificación del chocolate a través del temperado, debíamos considerar si ese proceso térmico no afectaría el polimorfismo del fármaco, aspecto clave de su acción terapéutica (sección 1.7.1.). También debíamos evaluar si la mezcla emulsionante EC + TCM tampoco tenía efecto sobre el estado cristalino de la droga. Para esto se prepararon pastillas de MBZ disperso en chocolate y MC, y se obtuvieron sus perfiles de DRX. La dispersión en MC fue necesaria para descartar que el fármaco no produjera el efecto contrario sobre el polimorfismo de la MC; esto es, que no afectara su cristalización. Esta precaución debe considerarse no desde el punto de vista del florecimiento graso derivado de una cristalización deficiente, transformación que el chocolate también podría experimentar en la formulación, sino que está mayormente relacionado con la resistencia mecánica de cada una de las unidades de dosis: la MC mal temperada, tiene el efecto inmediato de ser muy friable y quebradiza, además de fundir a una temperatura mucho menor.

Con estos antecedentes, en primer lugar se estudió la detección de los diferentes polimorfos del MBZ en una mezcla con chocolate, usando DRX. Esta técnica se ha transformado en la herramienta inequívoca para determinar la cristalinidad e identificar la forma polimórfica de una sustancia. El patrón de difracción de una forma sólida es característico de la misma, y da información directa sobre el arreglo molecular dentro del cristal (90). En el chocolate la situación se complejiza por la superposición de patrones de DRX de diferentes moléculas, ya que al estado cristalino de la MC debe sumarse la presencia de la sacarosa, la cual debe permanecer en ese estado de cristalinidad hasta el final del procesado (sección 1.2.2).

No obstante, la DRX otorga elementos que permiten la diferenciación de sus patrones de difracción en la mezcla compleja. En la Figura 55 se muestran los difractogramas del chocolate sin leche (Figura 55-a), del polimorfo C del MBZ puro (Figura 55-b), y de una mezcla de ambos (Figura 55-c). Si se comparan estos patrones con el de MC (Capítulo 1), puede verse la mayor complejidad de los presentados aquí. Sin embargo, la tarea de identificar la presencia de los polimorfos del principio activo se simplifica evaluando los perfiles a bajos ángulos de difracción. Si bien aquí se muestra sólo el polimorfo C, en la Figura 22 puede verse que a valores menores a  $2\theta \approx 10^\circ$ , aparecen reflexiones de muy buena intensidad que no sólo permiten la diferenciación entre sí de los tres polimorfos de la droga en estado puro, sino también permitirían identificar a cada uno de ellos en su mezcla con chocolate, dado que las reflexiones más intensas del azúcar y la MC aparecen a valores de  $2\theta > 11^\circ$ .

En la región de  $2\theta < 10^\circ$ , el chocolate puro (Figura 55-a) muestra ausencia de reflexiones que pudiesen coincidir con alguna señal proveniente de la droga. En el caso del polimorfo C (Figura 55-b), a  $2\theta = 5^\circ$  presenta una reflexión de muy buena intensidad (flecha azul) que permite identificar esa forma cristalina cuando esa misma reflexión está presente en el chocolate (Figura 55-c, flecha azul). Debe tenerse en cuenta que el principio activo se utilizará en una proporción muy baja en el chocolate, haciendo que esa señal sea de intensidad mucho menor si se lo compara con la droga pura (Figura 55-b).

Posteriormente, el MBZ fue adicionado al chocolate en diferentes proporciones, incluso a concentraciones por encima de la dosis terapéutica, para confirmar su detección por DRX. En todos los casos, las suspensiones fueron estabilizadas con 0,05 % de EC-10.

Considerando que la droga dispersa presentaba la forma polimórfica C, al poner una proporción alta esperábamos poder ver las transformaciones polimórficas  $C \rightarrow A$  ó  $C \rightarrow B$ , en caso que se produjeran durante el tratamiento térmico del chocolate. Si esto ocurría, muy probablemente las reflexiones correspondientes a los polimorfos A ó B serían de mucha menor intensidad que las registradas para el polimorfo C. En la Figura 56 se recoge la porción de los perfiles de DRX para la región de valores de  $2\theta$  entre  $4^\circ$  y  $10^\circ$ , para chocolates sin leche adicionados con diferentes concentraciones del polimorfo C.

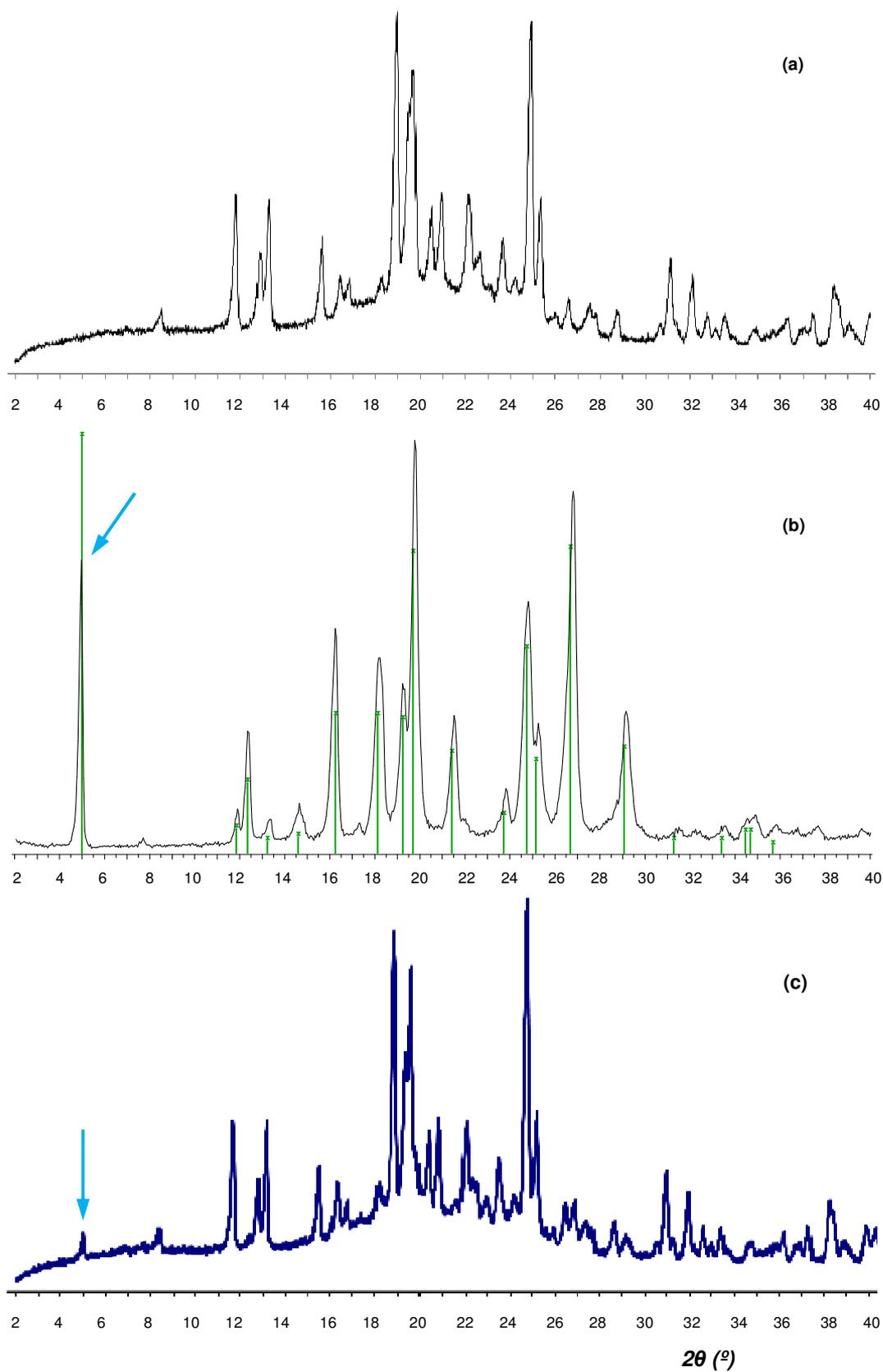


Figura 55. Patrones de DRX de chocolate sin leche (a), polimorfo C del MBZ (b) y mezcla de ambos (c).

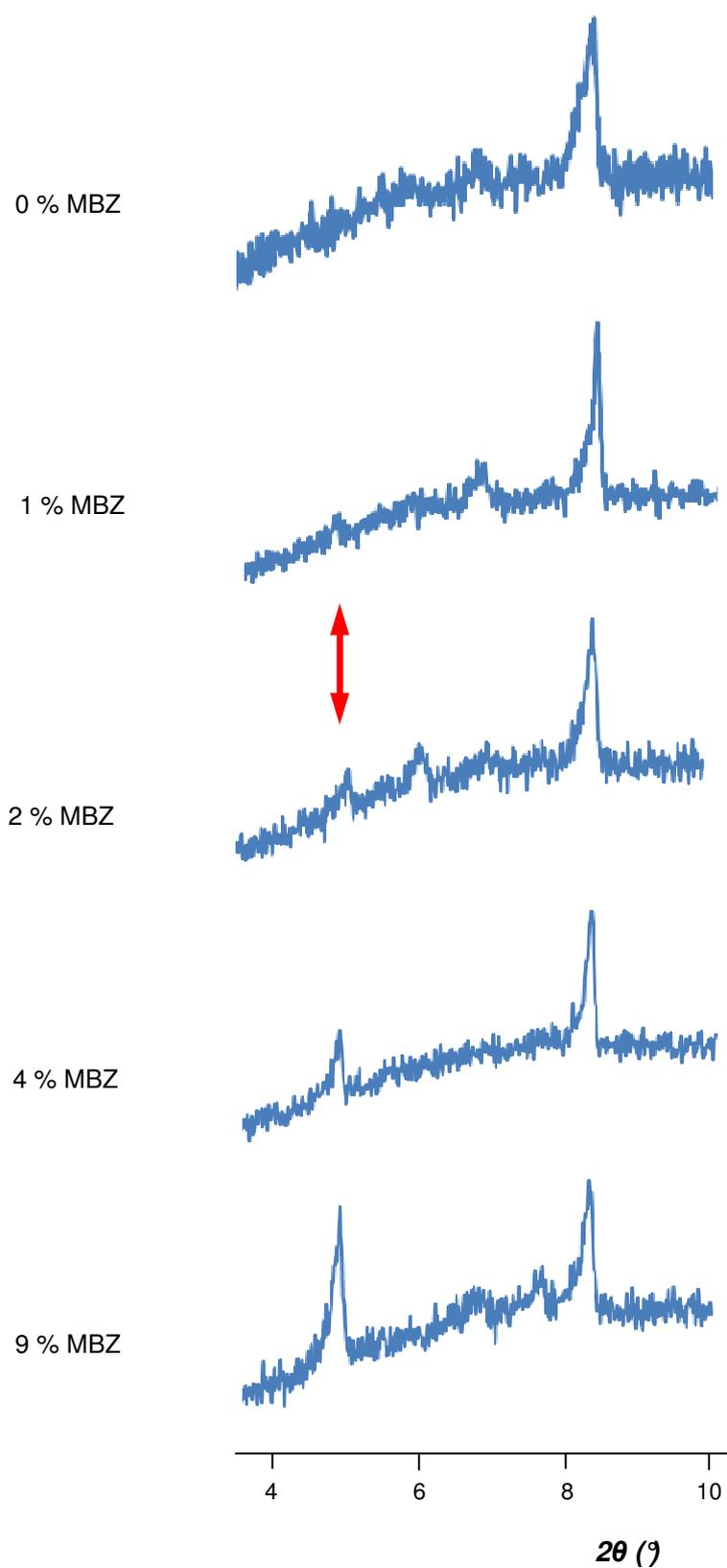


Figura 56. Patrones de DRX a valores de  $2\theta$  entre  $4^\circ$  y  $10^\circ$  para chocolates sin leche con concentraciones crecientes del polimorfo C de MBZ, el cual puede identificarse a través de la reflexión a  $\theta = 5^\circ$  (flecha roja).

Puede verse entonces que es posible la identificación del polimorfo C por DRX a concentraciones entre 1 y 2 % en chocolate. Esto permite diseñar la presentación de las formulaciones para que tengan una concentración final de MBZ detectable por DRX, y pueda usarse la técnica para el control de calidad de la preparación. Por ejemplo, considerando una dosis única de 500 mg de MBZ como tratamiento completo de una parasitosis determinada (88), y se dispersa esa cantidad en una pieza de 5 g de chocolate, tendremos una concentración de 10 % de MBZ, suficiente para ser fácilmente detectado por DRX. Como se expresó más arriba, estas suspensiones se estabilizaron utilizando 0,05 % de EC-10. Además se obtuvieron los patrones de DRX para suspensiones de MBZ en chocolate estabilizadas con el resto de las EC (EC-20, EC-45 y EC-100), sin observarse efectos adversos en la detección e identificación del polimorfo C, con el cual se prepararon estas muestras (perfiles de DRX no mostrados).

El patrón de difracción de la Figura 57, muestra que la MC puede ser perfectamente temperada para la obtención de sus polimorfos más estables (en este caso, para el  $\beta$ -V) aún en presencia del antiparasitario, si bien en este caso se utilizó una cantidad muy pequeña del fármaco (1,5 %). La droga utilizada en la mezcla de la Figura 57-b contenía una elevada proporción del polimorfo A, y específicamente en el caso de este lote de MBZ una de las reflexiones más importante se daba a  $2\theta = 17,5^\circ$  (flecha roja) en lugar de la cercana a  $2\theta = 7,5^\circ$  (ver Figura 22)<sup>f</sup>.

Si bien las tres formas polimórficas del MBZ presentaban reflexiones a valores  $2\theta < 10^\circ$  que nos permitían identificar cada una de las estructuras, en el caso de la Figura 57-b, se aprovechó esa reflexión más intensa a  $2\theta = 17,5^\circ$ . Aquí también es posible hacer este análisis dada la mayor simplicidad del patrón de DRX de la MC frente al del chocolate, ya que en este último no sería posible ver con tanta claridad la reflexión más intensa. Más allá de estas consideraciones, la importancia del resultado mostrado en esta figura nos permite ver que la forma polimórfica de la MC no se ve afectada por el fármaco, independientemente del hecho que en este caso se haya usado una materia prima donde el principio activo está mayormente en la forma cristalina A.

---

<sup>f</sup> Para una determinada forma polimórfica, pueden obtenerse dos perfiles de DRX donde aparezcan todas las reflexiones características, pero que algunas de ellas difieran en sus intensidades relativas. Por ejemplo, el polimorfo A del MBZ habitualmente presenta dos reflexiones muy intensas a  $2\theta = 7,5^\circ$  y  $17,5^\circ$ , donde la relación de intensidades es generalmente  $\text{refl. } 7,5^\circ > \text{refl. } 17,5^\circ$ . No obstante, esta relación puede invertirse, lo cual no representa una alteración en las propiedades del sólido, sino una preparación de la muestra no del todo correcta al momento de obtener su difractograma. Este artificio técnico se conoce como "orientación preferencial".

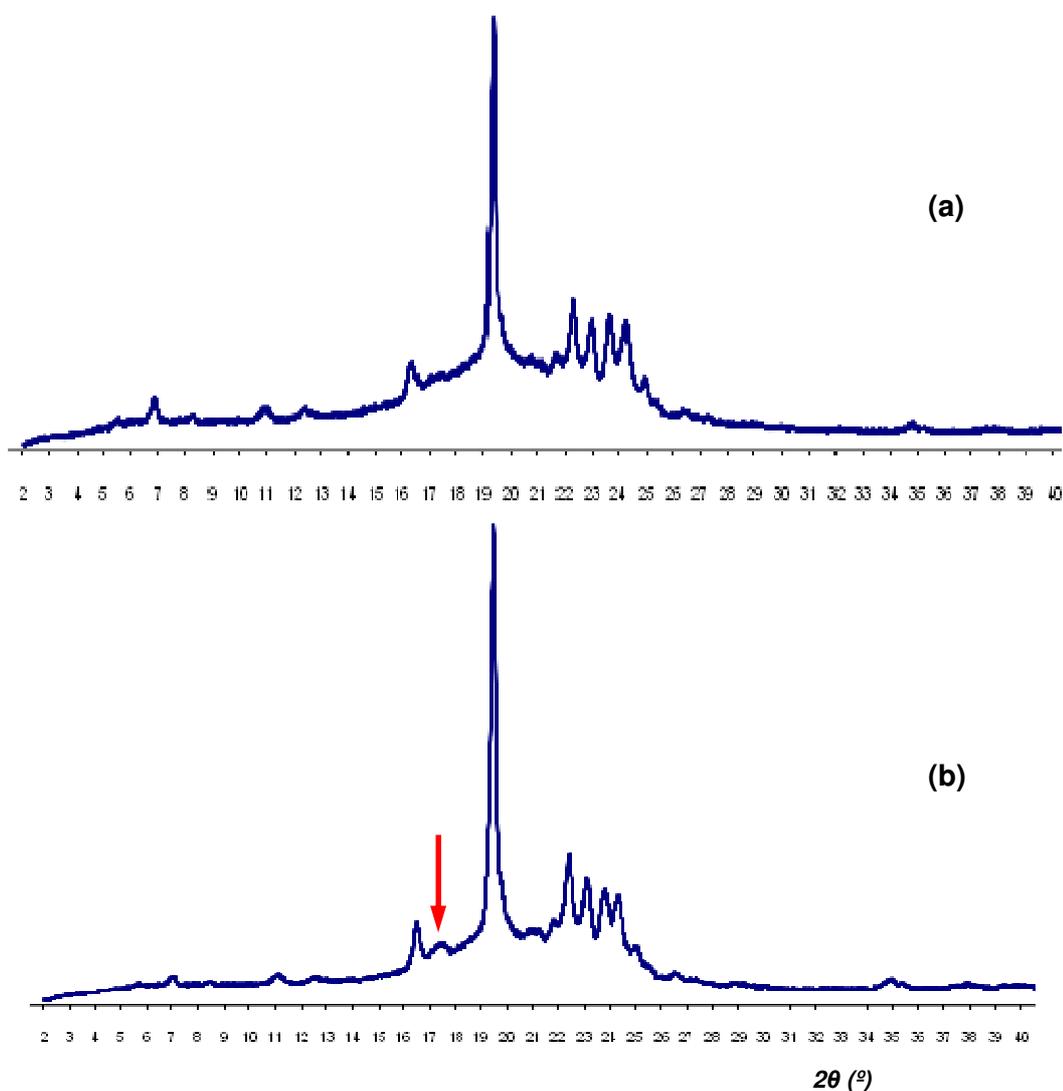


Figura 57. Patrón de DRX para una muestra de MC pura (a) y una mezcla de MC con 1,5 % de MBZ con prevalencia del polimorfo A (b). La flecha roja señala una reflexión característica de esta forma cristalina.

Las características nutricionales del chocolate no lo favorecen para ser seleccionado como agente de transporte de fármacos, ya que en el caso de tratamientos largos se deberían administrar varias dosis en pocos días, y esto implicaría la ingesta de considerables cantidades de grasas y azúcares. Sin embargo, la misma forma de administración del MBZ elimina esa posibilidad, ya que la posología más habitual es a través de dosis única, o bien en una única toma diaria que sólo se prolonga por tres días. Sumado a esto, la manufactura de estas preparaciones se hizo utilizando bajas proporciones de chocolate y una concentración tal del principio activo que permita el tratamiento de una parasitosis con la menor ingesta posible del alimento, pero sin descuidar la dosis terapéutica. Cuidando estos dos aspectos de la formulación, la ingesta de azúcares y grasas por

parte del paciente se pueden considerar insignificantes en la ingesta normal diaria de calorías.

Otra etapa en el control por DRX de estas formulaciones, deberá ser el seguimiento de la estabilidad del polimorfo C. Si bien esta forma es la de mayor actividad terapéutica, es la menos estable y se transforma con el tiempo en la más estable forma A; habiéndose descrito que un 30 % de esta última inactiva la acción antihelmíntica de cualquier formulación de la droga (89). No obstante, existen estudios que establecen que el polimorfo C es estable a temperaturas entre la ambiental y los 179 °C, comenzando su migración a la forma A entre 205 °C y 220 °C (91). Esto es crítico en la industria farmacéutica, ya que la compresión de polvos para transformarlos en tabletas involucra un incremento considerable de la temperatura, por lo que debe hacerse el seguimiento del producto terminado a través de DRX para verificar si ha ocurrido o no la transformación polimórfica C → A. Las formulaciones a base de chocolate cuentan con la ventaja que no deben comprimirse, y si bien debe calentarse a 50 °C para realizar la dispersión de la droga, esa temperatura está muy por debajo de las que favorecen la transformación polimórfica no deseada. Sumado a esto, el paso posterior destinado a darle forma al comprimido o tableta, involucra el moldeado y post-enfriado y no la compresión de la formulación.

5.4.2. Altrenogest. Progestágeno sintético, programador y sincronizador del ciclo estral en ganado porcino y equino, con marcada fotosensibilidad y problemas de dosificación.

El altrenogest simula la acción de la progesterona endógena e induce un estado hormonal similar a la preñez. Durante el tratamiento, la liberación cíclica de gonadotrofinas se ve suprimida bloqueando el desarrollo de folículos y, por lo tanto, del período de celo. Cuando el tratamiento se discontinúa, la inhibición pituitaria se interrumpe lo que permite un rápido aumento del desarrollo folicular y posterior ovulación (108). Así se logra que todas las hembras presenten el período de celo al mismo tiempo, procediendo en estas condiciones a la inseminación de las mismas.

Las presentaciones comerciales de este principio activo involucran el uso de aceites vegetales, los cuales son líquidos a temperatura ambiente debido a su composición en AG y son buenos solventes para este fármaco, con velocidades de disolución logradas en nuestro laboratorio de aproximadamente 5 mg/h en aceite de

soja (a 37°C y 60 r.p.m.). Se disolvió también fácilmente en MC y CBE fundidos (30 mg/h, a 55°C y 75 r.p.m), moldeándose tabletas con esta solución. La única precaución extra fue la protección de la formulación de la acción lítica de la luz a lo largo de todo el proceso de preparación.

La obtención de formas sólidas para la formulación resultó crítica comparada con la formulación líquida comercial, ya que esta presenta dos desventajas importantes: la dosificación y la estabilidad (no sólo del principio activo, sino también del aceite usado como excipiente). El envase de la fórmula líquida está provisto de un sistema de dosificación para entregar el volumen medido con la cantidad del fármaco necesario para una dosis. Este volumen se dispensa a través de una pequeña manguera con una boquilla en el extremo de salida, y así el líquido puede ser vertido sobre la comida o bien directamente sobre la boca de los animales. En primer lugar, esta dosificación tiene altas probabilidades de ser cuantitativamente defectuosa, por errores en la medición del volumen o por pérdidas de líquido fuera de la boca del animal o de la ración. En cualquier caso, puede existir un error adicional si el animal no ingiere toda la ración. Este no es un error menor ni poco común, ya que puede ser difícil el control de ingesta de todos los animales, máxime si se trata de granjas numerosas. En segundo lugar, el líquido es límpido y está más expuesto a la luz, pudiendo afectar en muy corto plazo el contenido de droga en la formulación. Esta fotosensibilidad sumada a la exposición al oxígeno del aire, también favorecen la descomposición del vehículo oleoso por enranciamiento de sus ácidos grasos insaturados, algo que influirá en la ingesta del mismo por parte de los animales debido a su mal sabor. Debido a esto, es común el uso de antioxidantes en las formulaciones líquidas.

El estado sólido de la formulación evaluada en este estudio representa una ventaja al permitir una dosificación más sencilla. También puede ser mezclada con la comida de los animales, aunque las tabletas pueden ser colocadas directamente en la boca de los animales. Esta práctica no representa un riesgo para el personal, ya que se trata de animales criados en granjas y en condiciones que permiten desarrollar una alta docilidad para con sus cuidadores.

El CBE en estado líquido es límpido y prácticamente incoloro, pero al solidificar es blanquecino y pierde su transparencia, proporcionando al principio activo una protección contra la fotólisis.

Por último, la composición casi total en ácidos grasos saturados, hace que el CBE sea una grasa muy estable a la acción oxidativa del aire, constituyéndose en un

excipiente estable y sin la necesidad del uso de antioxidantes. En relación a esto, se realizaron estudios de estabilidad del altrenogest extraído de las formulaciones líquida y sólida. La primera se conservó refrigerada, y se determinó una pérdida en la concentración del principio activo luego de 11 meses de preparada. En cambio, la forma sólida resultó ser muy estable, ya que fue conservada a temperatura ambiente y se recuperó más del 98% del principio activo luego de 4 años de preparada la solución. Estas determinaciones se realizaron por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento, acoplada a detección por UV con arreglo de diodos (HPLC-UV-DAD), en el laboratorio de Análisis Farmacéutico del CEPROCOR (datos no mostrados).

A partir del resultado del estudio de estabilidad, es posible extraer datos acerca de la uniformidad en la preparación de las tabletas, ya que el análisis simultáneo de cinco tabletas obtenidas a partir de la solución original de altrenogest en CBE sobre las que se realizó ese estudio, arrojó una desviación estándar de 0,02 mg/g. Este resultado sirve de punto de inicio para un estudio de uniformidad de dosis diseñado con todos los requisitos analíticos necesarios.

En la Figura 58, se muestra la forma de las preparaciones obtenidas para MBZ y altrenogest. Para otorgarles mayor resistencia mecánica y estabilidad térmica, fueron recubiertas con una película de EC.



Figura 58. Tabletas obtenidas en el laboratorio para la vehiculización de MBZ y altrenogest.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio se caracterizó el efecto de una mezcla emulsionante diseñada para la estabilización de una suspensión libre de agua, el chocolate. Dicha mezcla se preparó por solubilización de un copolímero de injerto hidrofóbico, la etilcelulosa, en un vehículo oleoso compuesto por triglicéridos de cadena media. La acción de este emulsionante no sólo se estudió a través de las propiedades de flujo del sistema en estado fluido (caracterización habitual de las moléculas con actividad surfactante), sino también dimensionando las consecuencias que estos agentes surfactantes podían tener sobre la transición líquido-sólido de este alimento, a través del estudio de sus propiedades cristalográficas. Ambos eventos resultan determinantes para alcanzar las propiedades organolépticas óptimas en un chocolate de buena calidad. No obstante, si el emulsionante utilizado interfiere negativamente en alguna de estas transformaciones, puede situar al producto en el otro extremo de su aceptación de calidad, con baja resistencia térmica y alta susceptibilidad al fat bloom.

Por diversas razones ligadas principalmente a la ausencia de agua del sistema en estudio y a sus características de suspensión sólido-líquido de color oscuro, que limitaban el uso de determinadas técnicas de análisis disponibles, el estudio del mecanismo estabilizador de esta mezcla surfactante fue realizado utilizando como modelo emulsiones no acuosas de PG en aceite. La sencillez en la obtención y la muy alta estabilidad lograda con este sistema, no sólo nos permitió explicar satisfactoriamente tal mecanismo sino también iniciar una nueva temática de estudio relacionada con su potencial aplicación en alimentos de base grasa y vehiculización de principios activos de naturaleza hidrofóbica.

Por último, el estatus de *libre de agua* del chocolate junto a las diferenciales propiedades de fusión la manteca de cacao, nos permitieron el diseño y caracterización de formulaciones farmacéuticas de principios activos de escasa o nula solubilidad en agua. Este enfoque permitió simplificar en gran medida la compleja vehiculización con la que este tipo de formulaciones es preparado en la industria farmacéutica.

### 6.1. Ventajas de la disolución de la EC en un TCM previo a su incorporación a la masa de chocolate.

Nuestro conocimiento previo en química de polímeros y su aplicación en alimentos, el creciente uso de macromoléculas como agentes emulsionantes, y la escasez de polímeros hidrofóbicos con actividad surfactante, hacían de la EC una molécula de características muy adecuadas para el desafío de desarrollar un estabilizante para la suspensión chocolate, pero sin descuidar los aspectos relacionados con sus propiedades de estado sólido.

La estrategia de vehiculización de este polímero en un aceite totalmente compatible con la MC (Capítulo 2) fue central y es quizás el aspecto tecnológico diferencial de nuestro trabajo. Esto permitió incorporar la mezcla surfactante directamente al alimento sin necesidad de calentar previamente la MC a altas temperaturas, y lograr el sinergismo adecuado para un manejo relativamente independiente de la viscosidad y el límite de fluencia en la masa de chocolate fundido. Esto último, algo habitual en la industria (por ejemplo, a través del uso combinado de lecitina de soja y PGPR), en nuestro caso puede alcanzarse sólo manipulando la composición de esa pre-mezcla TCM-EC, ya que cada componente de esta presenta un efecto propio sobre la reología de la masa.

Las escasas referencias previas de utilización de la EC como estabilizante de emulsiones y suspensiones, implicaban su uso disuelta directamente en la fase grasa continua. Además, la descripción de los mecanismos subyacentes en la estabilización, se lograba a través del uso de sistemas modelo donde indefectiblemente se involucraba al agua (46,57).

En este sentido, el aceite y su composición en TCM permitió que el inevitable calentamiento a alta temperatura (por encima de la  $T_g$  de la EC), se realice en un tiempo mucho más corto y sin desarrollo de olores y sabores indeseables, lográndose una mezcla emulsionante cuyas características organolépticas fueron incluso mejoradoras de aquellas que presenta la lecitina de soja cruda que normalmente se usa en la industria del chocolate (Figura 39). Muy probablemente, la mejor acción disolvente del TCM esté relacionada con el largo de su cadena de TG de entre 8 y 10 átomos de carbono y la posibilidad de una interacción más sencilla de el punto de vista estérico con los restos etoxilo de la EC, en contraposición con los TG de cadena mucho más larga que presenta la MC, e incluso el aceite de soja con el que se lo ha comparado en este estudio.

La mezcla puede adicionarse al chocolate *durante* el concado (como cualquier emulsionante de uso habitual) y realizar correcciones de flujo en el momento, y no estará limitado a la adición del polímero a la MC *antes* que se prepare la masa de chocolate, donde la MC ya está prevista en peso para la formulación.

6.2. La EC estabiliza la suspensión chocolate a través de un mecanismo interfacial, efecto favorecido por su muy baja concentración de uso.

La acción estabilizante de la suspensión chocolate está de acuerdo con la descripción de la EC como un agente emulsionante hecha por Melzer *et al* (46), donde se describe la deposición del polímero en la interfase de emulsiones o/w. Sin embargo, en nuestro caso y considerando a la naturaleza anhidra del chocolate y su estructura de emulsión inversa (w/o), necesitábamos diseñar un sistema donde el agua estuviese ausente. Considerando que la fase continua grasa debía necesariamente llevar disuelta la molécula estabilizante (de acuerdo a la regla de Bancroft), probamos que la EC produce la estabilización de la suspensión a través de su acción interfacial y no por acción cinética de viscosamiento de la fase grasa. La importancia de este resultado radica en que la acción de estos surfactantes poliméricos generalmente es consecuencia de la combinación de estos mecanismos (sección 1.5.2). Además de los resultados mostrados en este sentido en el Capítulo 3, donde la independencia del PM del polímero fue determinante, esta afirmación está avalada por la escasa concentración de EC necesaria para lograr una adecuada estabilización (entre 0,04 % y 0,07 %).

Como se describió oportunamente, los mecanismos que explican los fenómenos de estabilización-desestabilización de emulsiones y suspensiones, involucran invariablemente la presencia del agua. No obstante, pueden ser considerados al momento de intentar explicar las observaciones logradas en sistemas anhidros como las ENA y el chocolate.

Tadros (60) establece que los surfactantes poliméricos de injerto (*graft*) se comportan de manera tal que sus porciones hidrofóbicas interaccionarán con la fase de la emulsión que sea mayormente hidrofóbica, disponiendo sus porciones hidrofílicas para que interaccionen con la fase mayormente hidrofílica de la emulsión o suspensión. Estas posibilidades que aparecen como muy obvias, en la práctica no lo son, ya que dependen de diversos factores que involucran desde el porcentaje de injertos que presente la cadena principal hasta las propiedades de solubilidad que

presenten las diferentes porciones del polímero en diferentes solventes. La predicción de cuál será la tendencia que seguirán las diferentes porciones de un polímero de injerto, involucra aspectos probabilísticos con sus correspondientes cálculos asociados y modelizaciones estadísticas, cuyo desarrollo no es objeto de esta tesis. Como una de las posibilidades para un polímero de injerto, los resultados obtenidos se ajustan a un modelo de adsorción a la superficie de la partícula dispersa que se muestra en la Figura 59.

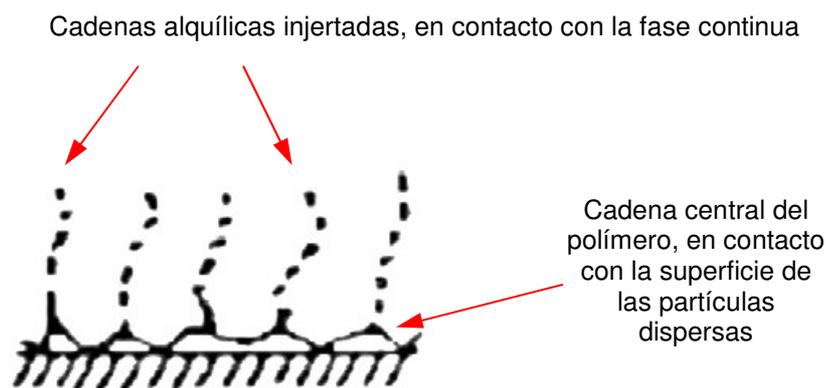


Figura 59. Modelo de interacción para un polímero de injerto en una emulsión o suspensión, por lo cual las “partículas” deben entenderse como gotas o restos sólidos respectivamente.

Estas probabilidades están calculadas en base a sistemas acuosos, donde la concentración de electrolitos y en consecuencia la fuerza iónica y el pH, juegan roles determinantes para decidir el mecanismo de adsorción.

*En el sistema chocolate, la conjunción de dos aspectos como la ausencia de agua y la elevada hidrofobicidad de la EC, acota el número de opciones de solubilización e interacción de la cadena principal hidrofílica y las cadenas injertadas hidrofóbicas de este polímero, permitiéndonos proponer un mecanismo de estabilización tal como se muestra en la Figura 60, donde la interacción con la superficie del azúcar muy probablemente se produciría como se muestra en la Figura 59.*

De esta manera, ya sabemos que la EC se disuelve en la fase continua grasa, lo cual necesariamente se logra a través de los restos etoxilo “injertados” en la molécula de celulosa.

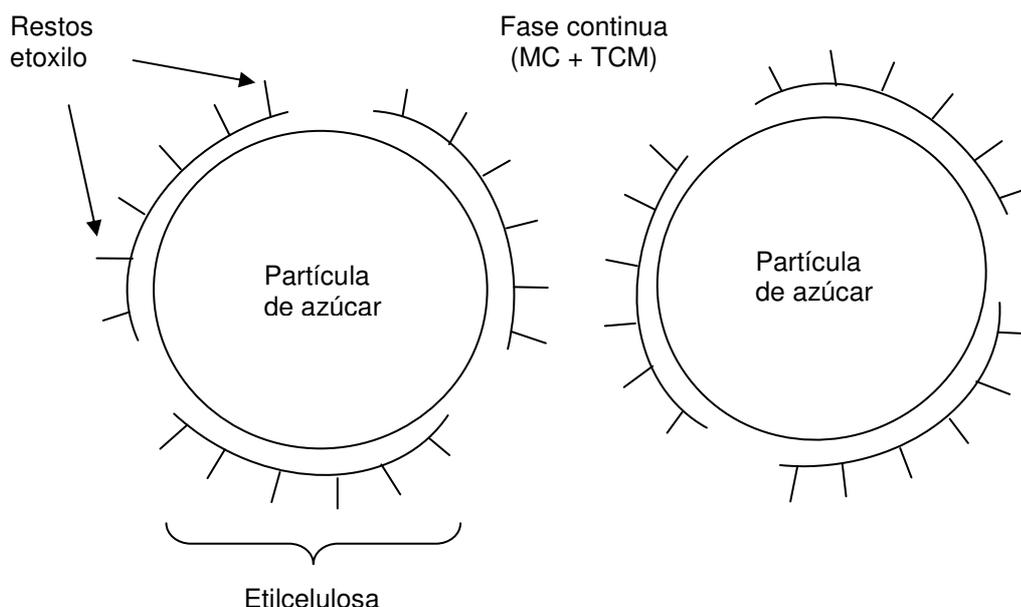


Figura 60. Modelo de estabilización de la suspensión chocolate por el polímero etilcelulosa.

Así, la cadena central más polar del polímero quedará disponible para interactuar con la superficie hidrofílica del azúcar, provocando así la necesaria disminución de la energía libre interfacial que debe ocurrir para evitar la desestabilización de la suspensión y su separación de fases. No obstante, la dependencia directa y muy marcada de la concentración y el PM de la EC sobre su acción viscosante probada en el Capítulo 3 con la formación de oleogeles rígidos, hacían pensar que podría haber una alta dependencia de mecanismos cinéticos por viscosamiento e impedimento de la coalescencia en las emulsiones no acuosas. Si bien en este sistema, los resultados demostraron que el mecanismo estabilizador es por acción interfacial, la baja concentración final del polímero aporta un elemento probatorio adicional, más aún cuando se lo piensa en el chocolate.

Considerando los mecanismos de desestabilización planteados en la sección 1.5.1, los de floculación y coalescencia están descriptos como los más comunes en relación a la desestabilización de emulsiones y suspensiones (42), y ambos son mecanismos altamente dependientes de la concentración de surfactante. En este sentido, el modelo propuesto en la Figura 60 para el chocolate, donde el polímero “tapiza” la superficie de cada cristal de azúcar evitando que estos cristales interactúen entre sí y se provoquen grumos, *es sólo posible a bajas concentraciones de polímero*. Este modelo está de acuerdo con nuestros resultados

reológicos, donde la ausencia de tixotropía en un chocolate bien concado indica la ausencia de grumos formados por asociaciones de partículas de azúcar (Capítulo 2). Pero si esta concentración excede un cierto valor crítico, habrá exceso de moléculas de EC en la fase continua, y esto podría pensarse como favorecedor de la estabilización cinética de la suspensión. Sin embargo, los resultados reológicos muestran que al aumentar la concentración de EC por encima de 0,10 %, la viscosidad del chocolate aumenta drásticamente. En mayor o menor medida, puede darse alguno (o coexistir varios) de los siguientes fenómenos que explique este efecto:

- En primer lugar, el aumento de la cantidad de polímero o de su PM provoca el incremento de la viscosidad como se describió para las soluciones de EC (Capítulo 2), lo cual se hace muy drástico en el chocolate dada la baja fracción de volumen de su fase continua, la MC, comparada con otras suspensiones.
- En segundo lugar, el aumento de concentración de polímero provoca un efecto osmótico en la región entre dos partículas de azúcar, haciendo que las cadenas de EC de esa región tiendan a separarse de su unión con las partículas de azúcar y migren hacia la fase grasa. Así, se provoca el acercamiento inter-partículas y la interacción entre ellas que lleva a la formación de grumos. Este modelo está de acuerdo con el propuesto por Blijdenstein, descrito por Bouyer *et al* (109) para el mecanismo conocido como *floculación por depleción* (Figura 70).

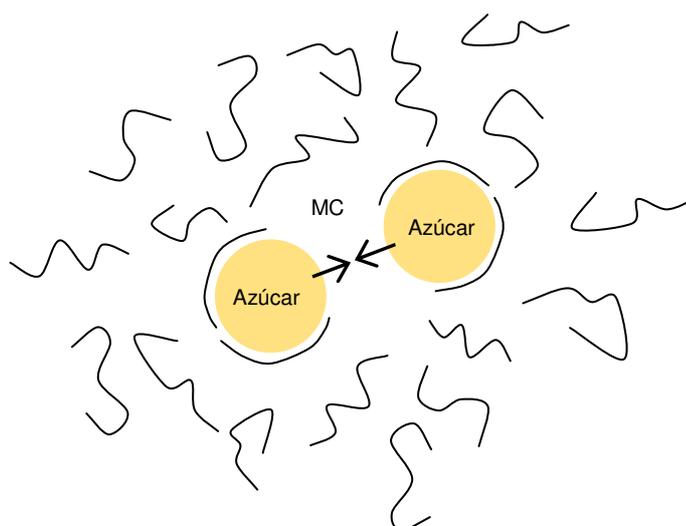


Figura 61. Modelo de floculación por depleción para la suspensión chocolate, de acuerdo al modelo de Blijdenstein. La falta de cobertura por EC en parte de la superficie de cada partícula, lleva a la formación de grumos por incremento en la interacción entre partículas de azúcar (modificado de la referencia 109).

➤ En tercer lugar, estos mismos autores proponen también el mecanismo de *floculación por formación de puentes* (Figura 62), que establece que a mayores concentraciones de polímero, puede darse que cada molécula de este pueda interactuar con más de una partícula de azúcar, formando “puentes” entre ellas y no favoreciendo su libre movimiento, por lo que podrían formarse grumos (en este punto debe de nuevo considerarse que la elevada concentración de azúcar también favorece que una cadena de EC pueda tener el “alcance” necesario para unirse a dos partículas).

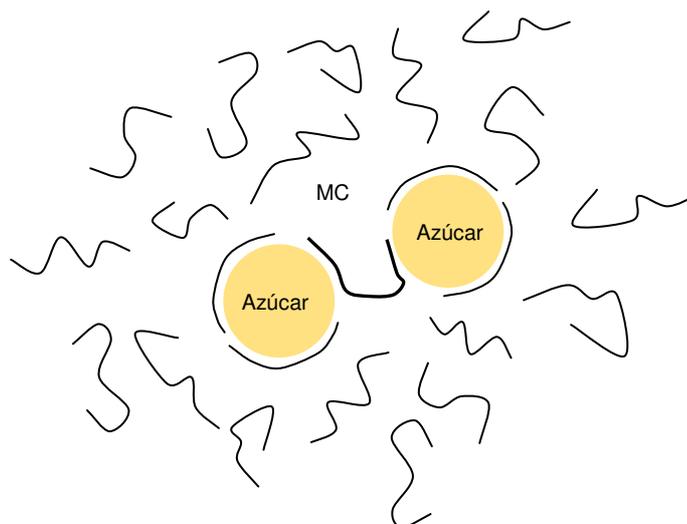


Figura 62. Modelo de floculación por formación de puentes para el chocolate, de acuerdo al modelo de Blijdenstein. En este caso, la formación de grumos se da porque una misma molécula de EC interacciona con más de una partícula de azúcar (modificado de la referencia 109).

De esta manera, una pequeña concentración de polímero logra una correcta estabilización reológica de la masa del chocolate fundido, haciendo que el modelo de la Figura 60 sea muy apto para explicar lo que sucede en nuestro sistema.

6.3. La EC no produce perturbaciones en la formación de la estructura polimórfica más estable de la MC.

Como ya se mencionó, de la interacción con la industria local se desprende que el uso de los emulsionantes como reguladores de flujo en el chocolate fundido se realiza muchas veces sobre el uso pragmático de prueba y error. Esto sucede más aún si se considera específicamente la influencia que pueden tener estos *componentes minoritarios aditivados* (Capítulo 1), sobre la cristalización de los sistemas continuos grasos. Si bien sobre este tópico existe abundante bibliografía

que puede ser utilizada como base para el trabajo industrial, la mayoría de estas investigaciones arrojan resultados que sólo comprueban y avalan usos o efectos ya observados empíricamente (95,96). En este sentido, el trabajo de Gardi *et al* durante la década del '80 sea el más exhaustivo, intentando explicar los mecanismos a través de los cuales la obtención del estado cristalino en una matriz grasa durante la transición líquido-sólido, puede ser perturbada por la inclusión de emulsionantes en la red de los cristales de los TG. Casi en su totalidad, sus investigaciones han sido orientadas hacia fracciones de TG constituyentes de la MC o sobre esta misma, y sus consecuencias sobre la formación de la red cristalina en el chocolate (96,110-118). Las investigaciones posteriores de otros autores, han sido fuertemente influenciadas por el trabajo de Gardi (98,119-121).

En ningún caso se han incluido emulsionantes poliméricos entre las moléculas estudiadas, y mucho menos la EC. El trabajo de Marangoni ha incluido las diferentes propiedades de esta celulosa modificada y su efecto sobre aceites líquidos y grasas sólidas incluyendo la MC y el chocolate, pero siempre desde un punto de vista estructurante (gelificante) (67,68,100,122,123), lo cual se logra a altas concentraciones ( $\approx 5\%$  p/p o mayor); efecto que incluso ha sido revisado en esta tesis. Este autor también ha estudiado los efectos de MM sobre la cristalización de materiales grasos, pero no ha incluido a la EC a bajas concentraciones como potencial agente perturbador de la red polimórfica (124,125).

En diferentes secciones de este estudio se estableció claramente que un buen emulsionante para el chocolate será aquel que permita controlar su comportamiento reológico dentro de determinados límites cuando está fundido, y que además no perturbe la formación del polimorfo  $\beta$ -V cuando se produce la solidificación del producto.

Esa perturbación puede darse de dos formas, donde la primera está relacionada con el enlentecimiento de la transformación  $\beta$ -IV  $\rightarrow$   $\beta$ -V, y la segunda con la aceleración de la transición  $\beta$ -V  $\rightarrow$   $\beta$ -VI. Si bien esta última lleva a la aparición del fat bloom, la primera lleva a la obtención de un chocolate de baja resistencia térmica. Se dice entonces que un buen balance entre ambas transformaciones provoca una *retención del polimorfo  $\beta$ -V*, y da lugar a un chocolate de buena calidad, cuyo proceso de temperado no fue afectado por MM.

Esto nos deja ver que la MC, los equivalentes de MC, y sus mezclas, deben ser temperados *como una consecuencia* de su capacidad de cristalizar en diferentes polimorfos. Al someterlos a este proceso térmico, manipulamos las condiciones y el

equipamiento para lograr la forma termodinámicamente buscada en el chocolate. El temperado involucra la reducción de la temperatura del chocolate fundido para inducir la cristalización conjunta de polimorfos estables e inestables. Luego, la temperatura se incrementa a un punto lo suficientemente preciso como para que los polimorfos inestables se fundan, dejando solamente los cristales estables. Estos servirán entonces de *semilla* para que la masa total del chocolate cristalice en la forma polimórfica estable.

Estos conceptos están resumidos en la Figura 27, donde se muestra el esquema de temperado que hemos utilizado en esta tesis. Existe una importante variedad de combinaciones de tiempos, temperaturas y velocidades de mezclado para lograr este propósito, haciendo que diferentes diseños de procedimiento muy probablemente hagan que el camino por el cual se llega al polimorfo final, sea variable según el procedimiento usado. De esta manera, pueden verse favorecidos o inhibidos los eventos involucrados en la retención del polimorfo  $\beta$ -V, favoreciendo o retardando la aparición del fat bloom (126) (Figura 72).



Figura 63. Desarrollo de florecimiento graso (fat bloom) en un mismo lote de chocolate sin leche temperado en nuestro laboratorio a través de tres métodos diferentes. La muestra de la izquierda no presenta desarrollo de fat bloom.

Esta explicación es necesaria para comprender que nos propusimos evaluar el efecto en el polimorfo obtenido *al final* de nuestro proceso de temperado de MC y sus mezclas, y predecir que será el mismo en el chocolate sólido finalmente listo para consumir, prescindiendo de la cinética de cristalización a través de la cual se obtuvo ese estado final. Esto está relacionado no sólo con una cuestión netamente

de aplicación práctica, sino también con nuestras posibilidades del equipamiento de DRX. De haber ocurrido alteraciones o “errores” durante la cristalización de los TG, esto se habría traducido en patrones de difracción con determinadas diferencias en reflexiones particulares, al ser comparadas con difractogramas obtenidos para MC temperada en las mismas condiciones.

A través del estudio por DRX, nuestro trabajo ha demostrado que la mezcla emulsionante desarrollada, con muy baja concentración de EC como surfactante polimérico (menor a 0,1 %):

- No inhibe la aparición del polimorfo  $\beta$ -V ni favorece la aparición del polimorfo  $\beta$ -VI en la manteca de cacao. Ambos efectos tampoco fueron observados para la lecitina de soja.
- No produce segregación grasa. Este efecto está relacionado principalmente al TCM usado como su vehículo, ya que por su relativamente amplia diferencia en el largo de cadena (y en consecuencia, su menor punto de fusión) con los TG de la MC, podría eventualmente ser fácilmente excluido de la red cristalina y afectar las reflexiones obtenidas por DRX. Una explicación posible de este efecto, puede atribuirse a la acción gelificante que la EC produce sobre el TCM, transformándolo en una entidad molecular más cercana a una grasa sólida (con mayor similitud a la MC) y alejándolo de su naturaleza de aceite líquido.
- Permitió estandarizar un procedimiento de temperado de laboratorio, con la identificación de los polimorfos más importantes para el chocolate en diferentes formas de temperado. Utilizamos un procedimiento de temperado totalmente manual, tal como se realizaba antiguamente, pero la base teórica de los eventos es la misma.

#### 6.4. MC y grasas equivalentes como alternativas para el transporte de principios activos farmacéuticos: sencillez en el desarrollo de las formulaciones

La base del uso de estas grasas como agentes de solubilización (altrenogest) o dispersión (MBZ) de principios activos de muy baja solubilidad en agua, fueron su hidrofobicidad y sus particulares características de fusión, respectivamente. En ambos casos, la mayor ventaja lograda ha sido sin lugar a dudas, la sencillez que involucró su preparación, quizás el aspecto más laborioso en relación al desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas para este tipo de drogas.

Para el caso del MBZ, el uso de la DRX permite el seguimiento del comportamiento polimórfico del fármaco y el control de la cristalización de la grasa, ya que al igual que lo descrito anteriormente, la retención del polimorfo  $\beta$ -V es fundamental para lograr una buena resistencia térmica y mecánica.

La buena solubilidad del altrenogest en las grasas usadas plantea una buscada estrategia de dosificación de este fármaco en formulados sólidos, con un incremento en la estabilidad relacionada con la fotosensibilidad del principio activo y de la oxidación y lipólisis del vehículo, respecto de los aceites vegetales normalmente usados en los preparados comerciales.

Si se tienen en cuenta entonces los principales inconvenientes para el desarrollo para una formulación de este tipo, en este estudio mostramos que el uso de grasas vegetales similares a la MC, o incluso el chocolate mismo, brindan soluciones sencillas para muchos de esos inconvenientes, algunas de las cuales deberán ser corroboradas y reafirmadas en posteriores pruebas *in vivo*:

- Estabilidad mejorada *in vitro*, incluyendo los aspectos relacionados al comportamiento polimórfico.
- Necesidad de excipientes prácticamente nula.
- La presencia de grasa es un potencial mejorador de la absorción intestinal para cualquier fármaco de baja solubilidad acuosa (86).
- Buena uniformidad de dosis.
- Buen enmascaramiento del sabor, principalmente en la formulación del MBZ en chocolate, cuando se considera el elevado sabor amargo de este fármaco y su uso en niños.

Una desventaja para este tipo de formulaciones se planteaba al momento de la manipulación de las tabletas para su dosificación: dadas las características de fusión de estas grasas, en relativamente poco tiempo se daría el derretimiento de la formulación en los dedos, por efecto de la misma temperatura corporal. En este sentido, se hacía indispensable la cobertura de las tabletas, sin que esto interfiriera en el desarmado por fusión que sufren los chocolates cuando son colocados en la boca.

En ambas formulaciones aprovechamos otra característica de la EC que ya tiene aplicaciones en la industria farmacéutica, como es su habilidad para formar películas de cobertura de muy buena resistencia mecánica. La EC generó películas de muy buena adherencia, haciendo que la cobertura de las tabletas fuese muy uniforme.

## 7. CONCLUSIONES

En este estudio se demostró la acción estabilizante sobre un sistema disperso inverso (de estructura w/o) y anhidro, el chocolate, a través del uso combinado y sinérgico de un polímero hidrofóbico con actividad surfactante dispersado en un aceite comestible de alta pureza, compuesto por triglicéridos de cadena media. El polímero de injerto EC en su mezcla con el TCM, fue eficiente en la estabilización reológica indispensable durante el manejo de la masa del chocolate fundido, a través de la posibilidad de regular en forma independiente los parámetros viscosidad y límite de fluencia.

Durante la posterior transición líquido-sólido de este alimento, se estableció que la mezcla emulsionante no impidió el temperado de la MC en su forma cristalina más estable, el polimorfo  $\beta$ -V. La retención de este polimorfo representa el evento clave para la obtención de un chocolate de óptimas cualidades organolépticas, y permite predecir su máxima resistencia térmica al desarrollo de defectos tales como el florecimiento graso.

A través de emulsiones no acuosas, un sistema disperso de similar disposición estructural pero de mayor simpleza que el chocolate, se puso en evidencia el mecanismo estabilizador de la mezcla, confirmando la buena actividad de superficie del polímero previamente observada a través de sistemas de capas monomoleculares. Esta actividad de superficie en el chocolate se vio favorecida por la baja concentración de EC en la mezcla. La obtención de emulsiones no acuosas de preparación muy sencilla y alta estabilidad, abrió la posibilidad de novedosas aplicaciones en las áreas farmacéuticas y alimenticias cuando deba evitarse la presencia de agua.

Se demostró además que la MC y grasas similares como los equivalentes de MC, constituyen eficientes vehículos para principios activos farmacéuticos de baja solubilidad en agua. En este caso, la naturaleza apolar de los TG de la MC es fundamental para la solubilización de las drogas (lo que se demostró en relación al altrenogest), y dado que esos TG solidifican en un estrecho margen de temperatura permite obtener dispersiones homogéneas cuando el principio activo no es muy soluble (como fue el caso del MBZ). El polímero además permitió la cobertura sencilla de las formulaciones obtenidas, como una forma de protección mecánica y térmica.

En forma resumida, la matriz chocolate sirvió como iniciadora para diferentes aspectos de este estudio que consideramos relacionados entre sí, lo que se muestra en la Figura 64.



Figura 64. Relación de los conceptos desarrollados en este estudio.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

La solubilización de la EC en aceites y su estudio en un amplio rango de concentraciones abrió diferentes posibilidades de aplicación de este polímero, todas relacionadas con su hidrofobicidad.

Es relevante la obtención técnicamente simple de las emulsiones no acuosas (ENA) y su elevada estabilidad, donde se destaca el amplio rango de modificación de su fase dispersa polar (el PG) sin que se observaran inversiones de fase. Esto es muy significativo considerando que se evaluaron fracciones de volumen de hasta un 50 % de PG. Estos sistemas dispersos estables pueden usarse para el transporte de fármacos donde es indispensable evitar el agua, y para el diseño de estructuras para la reducción del contenido de grasa y agua en alimentos.

Esto último ha comenzado a evaluarse en nuestro grupo, a través de la formulación de un alimento untable a base de manteca. La obtención de mantecas de bajo contenido graso ha sido bastante estudiada, pero siempre a expensas del aumento en el contenido de agua (127-131). Las ENA estabilizadas con EC sirven para reducir la humedad, y genera aplicaciones relacionadas con los *untables* (“spreads”) aptos para freír. Adicionalmente, la estructuración de la materia grasa con EC, otorga al producto una característica extra muy buscada y pocas veces lograda, como es el mantenimiento de la forma en una manteca durante mayor tiempo una vez retirada de la heladera. Los resultados obtenidos están siendo redactados para su publicación (Figura 65).

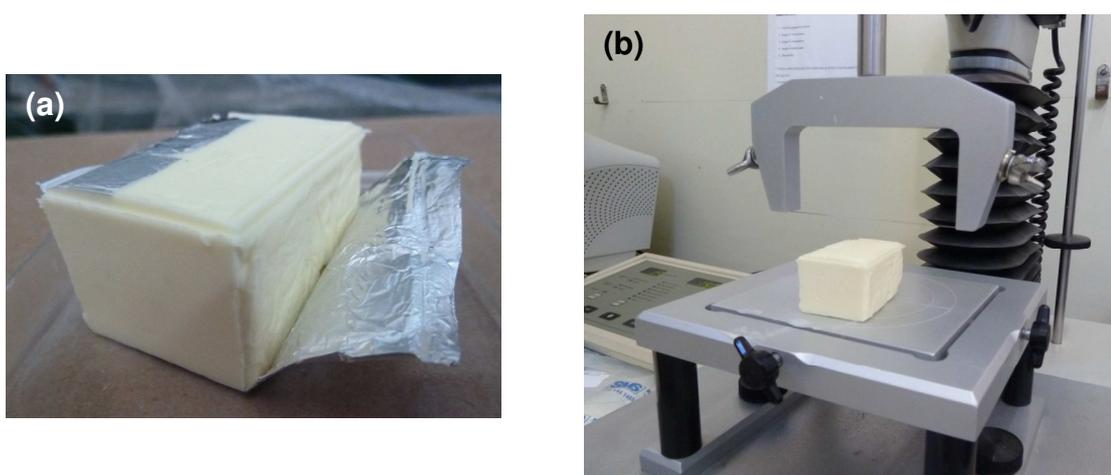


Figura 65. Manteca reducida en contenido acuoso y graso. (a) Luego de 10 min del desmolde. (b) Ensayo de resistencia al corte en texturómetro (caracterización reológica y textural).

La obtención de oleogeles posibilita un campo de aplicación no explorado en nuestro medio, usándolos como generadores de aceites estructurados que puedan reemplazar grasas sólidas obtenidas a través de tratamientos térmicos generadores de grasas *trans*. Este camino hacia la obtención de alimentos más saludables aún necesita mucho desarrollo. Hemos avanzado en el manejo térmico necesario para la preparación de estos geles, obteniendo materiales muy rígidos, altamente límpidos y homogéneos (Figura 31). Parte de los resultados obtenidos en la caracterización textural de los mismos forma parte de este estudio.

Derivado de las soluciones de EC usadas en la cobertura de las formulaciones farmacéuticas, surgió el estudio de la capacidad de la EC para formar películas de elevada adherencia y sumamente uniformes (Figura 66). La sencillez de su obtención a partir de la evaporación de un solvente orgánico donde previamente se ha disuelto la EC, las hace manipulables respecto de su espesor y flexibilidad, características que afectan su permeabilidad y estamos estudiando en nuestro laboratorio.

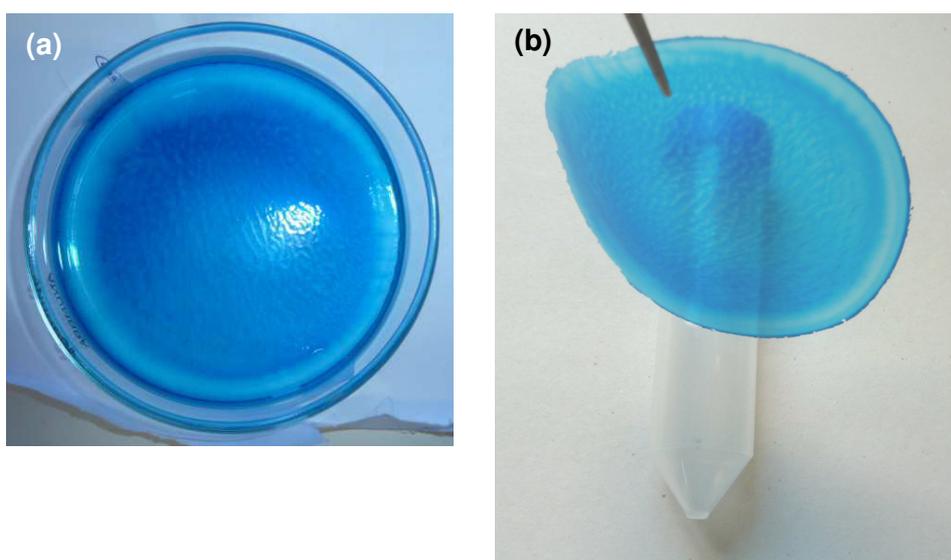


Figura 66. Película de EC-100 teñida con azul brillante. (a) Película adherida al recipiente donde fue obtenida. (b) Película retirada del molde anterior. Pueden observarse su transparencia y flexibilidad.

En nuestra experiencia, su aspecto más importante es su alta hidrofobicidad, mostrada en la cobertura uniforme de nuestras tabletas frente a otros polímeros de naturaleza más hidrofílica (Figura 67).

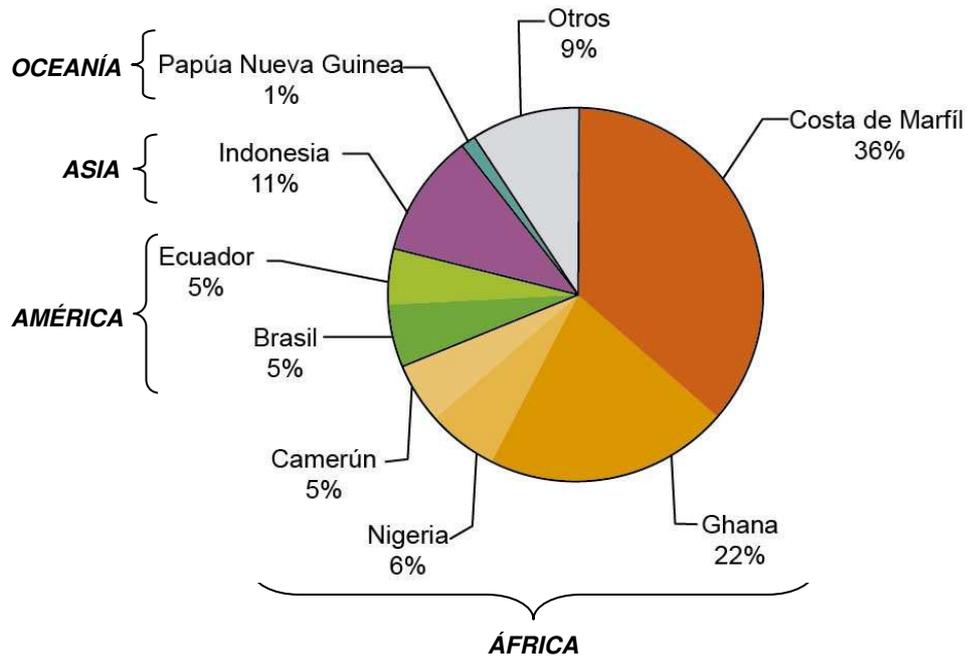


Figura 67. Tableta de formulado sólido (CBE) para Altrenogest con cobertura de EC (a) y cobertura de alginato gelificado (b). Nótese la diferencia en la uniformidad de la textura en las coberturas. En (b), la hidrofobicidad de la superficie del CBE produce la retracción de la película de alginato a tal punto que se produce la separación del polímero y la rotura de la cobertura (flecha).

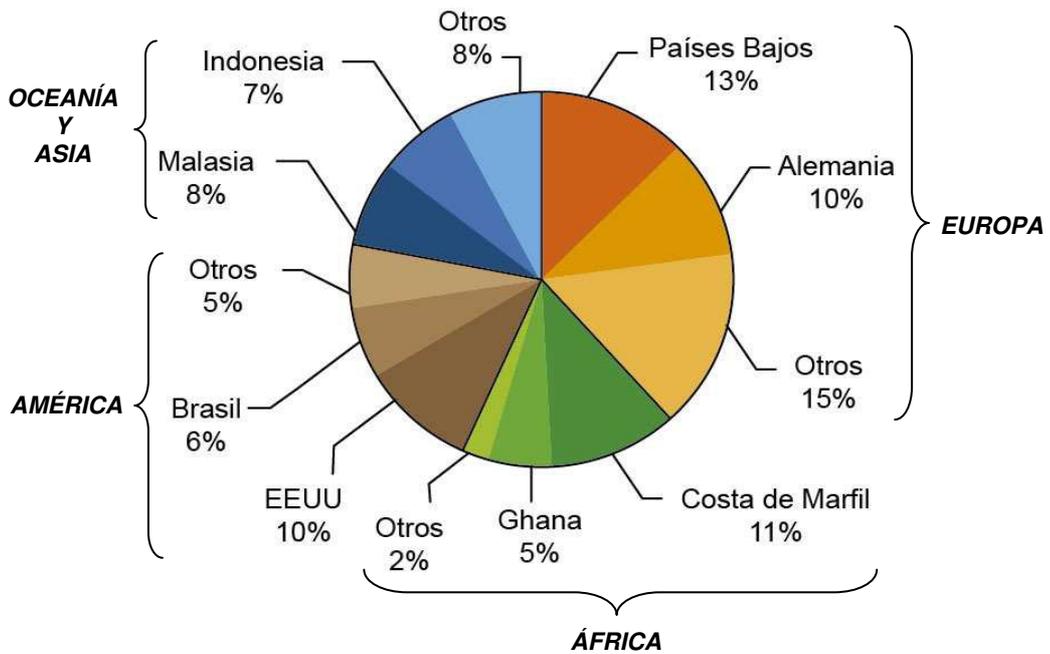
El uso del chocolate, MC o CBE como vehículos para principios activos farmacéuticos de baja solubilidad en agua, presenta gran potencialidad. Son necesarios estudios complementarios *in vitro*, así como también la caracterización de la farmacodinámica relativa a la eficiencia terapéutica y biodisponibilidad *in vivo*. En este sentido estamos trabajando en conjunto con otro grupo de investigación, y al momento de la finalización de este manuscrito, se están llevando adelante pruebas de campo en cerdos, evaluando la eficiencia de la vehiculización sólida de altrenogest desarrollada en este estudio.

9. ANEXOS

Anexo A:



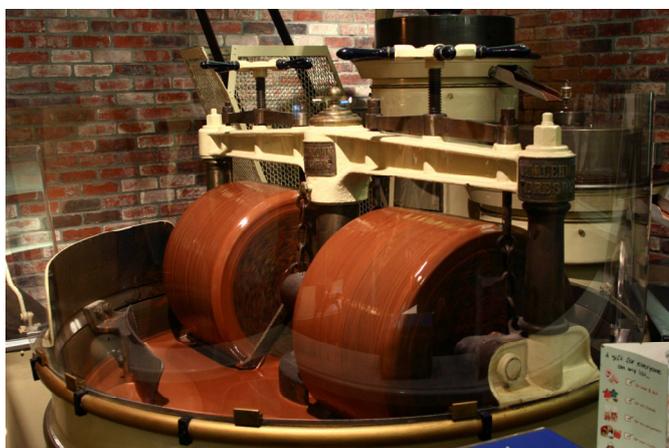
Producción mundial de granos de cacao al año 2012 (Fuente: ICCO 2014).



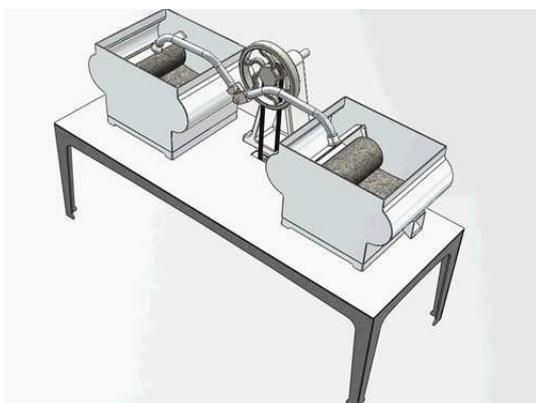
Procesado mundial de granos de cacao para la producción de MC y licor de cacao (Fuente: ICCO 2014).

## Anexo B: algunos modelos de concas usadas en la industria.

### Concas redondas



### Conca longitudinal



## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Beckett, S. T. Traditional chocolate making. En *Industrial chocolate manufacture and use*; Beckett S. T., Ed.; Chapman & Hall; London, 1994; pp 1-7.
- (2) Afoakwa, E. O. Chocolate production and consumption patterns. En *Chocolate Science and Technology*; Afoakwa E. O., Ed.; Wiley-Blackwell; United Kingdom, 2010; pp 1-11.
- (3) Bolenz, S.; Thiessenhusen, T.; Schäpe, R. Fast conching for milk chocolate. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *218*, 62–67.
- (4) Jolly, M. S.; Blackburn, S.; Beckett, S. T. Energy reduction during chocolate conching using a reciprocating multihole extruder. *J. Food Eng.* **2003**, *59*, 137-142.
- (5) Engmann, J.; Mackley, M. R. Semi-solid processing of chocolate and cocoa butter. The Experimental Correlation of Process Rheology with Microstructure. *Food Bioprod. Process.* **2006**, *84 (C2)*, 95–101.
- (6) Niediek, E. A. Particle size reduction. En *Industrial chocolate manufacture and use*; Beckett S. T., Ed.; Chapman & Hall; London, 1994; pp 83-101.
- (7) International Cocoa Organization (ICCO). <http://www.icco.org/statistics/production-and-grindings/production.html>. (Consultado: febrero de 2015).
- (8) Gloria, H.; Sievert, D. Changes in the physical state of sucrose during dark chocolate processing. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2433-2436.
- (9) Do, T-A. L.; Hargreaves, J. M.; Wolf, B.; Hort, J.; Mitchell, J. R. Impact of particle size distribution on rheological and textural properties of chocolate models with reduced fat content. *J. Food Sci. E: Food Eng. Phys. Prop.* **2007**, *72 (9)*, E541-E552.
- (10) Kleinert, J. Cleaning, roasting and winnowing. En *Industrial chocolate manufacture and use*; Beckett S. T., Ed.; Chapman & Hall; London, 1994; pp 55-69.
- (11) Afoakwa E. O.; Paterson, A.; Fowler, M. Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 290-298.

- (12) Afoakwa, E. O. Industrial chocolate manufacture – processes and factors influencing quality. En *Chocolate Science and Technology*; Afoakwa E. O., Ed.; Wiley-Blackwell; United Kingdom, 2010; pp 35-57.
- (13) Krüger, Ch. Sugar. En *Industrial chocolate manufacture and use*; Beckett S. T., Ed.; Chapman & Hall; London, 1994; pp 25-42.
- (14) Ley, D. Conching. En *Industrial chocolate manufacture and use*; Beckett S. T., Ed.; Chapman & Hall; London, 1994; pp 117-138.
- (15) Schenk, H.; Peschar, R. Understanding the structure of chocolate. *Radiat. Phys. Chem.* **2004**, *71*, 829-835.
- (16) Van Vliet, T. Rheological classification of foods and instrumental techniques for their study. En *Food texture. Measurement and perception*; Rosenthal A. J., Ed.; Aspen Publishers; Maryland, 1999; pp 65-98.
- (17) International Confectionery Association (ICA). *Viscosity of cocoa and chocolate products*. Analytical Method 46. Belgium, 2012.
- (18) Chevalley, J. Chocolate flow properties. En *Industrial chocolate manufacture and use*; Beckett S. T., Ed.; Chapman & Hall; London, 1994; pp 139-155.
- (19) Tanner, R. I.; Walters, K. Interlude: Rheology Becomes an Independent Science: Societies, Congresses and Journals. En *Rheology: An Historical Perspective*; Elsevier Science, Ed.; Elsevier; Amsterdam, 1999; 43-71.
- (20) Van Vliet, T.; Lyklema, H. Rheology. En *Fundamentals of Interface and Colloid Science*; Lyklema H., Ed.; Elsevier; Amsterdam, 2005; pp 6.1-6.88.
- (21) Shaw, D. J. Rheology. En *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*; Butterworth-Heinemann, Ed.; Elsevier; Amsterdam, 1992; pp 244-261.
- (22) Picout, D. R.; Ross-Murphy, S. B. Rheology of Biopolymer Solutions and Gels. *Sci. World J.* **2003**, *3*, 105-121.
- (23) Tanner, R. I. The changing face of rheology. *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* **2009**, *157*, 141–144.

- (24) Malkin, A. Y.; Isayev, A. I. Introduction. Rheology: Subject and Goals. En *Rheology Concepts, Methods, and Applications*; ChemTec Publishing, Ed.; Elsevier; Amsterdam, 2012; pp 1-8.
- (25) Dobraszczyk, B. J.; Vincent J. F. V. Measurement of mechanical properties of food materials in relation to texture: The materials approach. En *Food texture. Measurement and perception*; Rosenthal A. J., Ed.; Aspen Publishers; Maryland, 1999; pp 99-151.
- (26) Bair, S. An Introduction to the Rheology of Polymeric Liquids. En *High Pressure Rheology for Quantitative Elastohydrodynamics*; Briscoe, B. J., Ed.; Elsevier; Amsterdam, 2007; pp 15-34.
- (27) Afoakwa E. O.; Paterson, A.; Fowler, M.; Vieira, J. Comparison of rheological models for determining dark chocolate viscosity. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*, 162-167.
- (28) Fischer, P.; Pollard, M.; Erni, P.; Marti, I.; Padar, S. Rheological approaches to food systems. *C. R. Phys.* **2009**, *10*, 740–750.
- (29) Gonçalves, E. V.; Da Silva Lannes, S. C. Chocolate rheology. *Cienc. Tecnol. Aliment. (Campinas, Braz.)*. **2010**, *30* (4), 845-851.
- (30) Fernandes, V. A.; Müller, A. J.; Sandoval, A. J. Thermal, structural and rheological characteristics of dark chocolate with different compositions. *J. Food Eng.* **2013**, *116*, 97-108.
- (31) Weyland, M.; Hartel, R. Emulsifiers in confectionery. En *Food emulsifiers and their applications*; Hasenhuettl, G. L. & Hartel, R. W., Ed.; Springer; New York, 2010; pp 285-305.
- (32) Hasenhuettl, G. L. Overview of Food Emulsifiers. En *Food emulsifiers and their applications*; Hasenhuettl, G. L. & Hartel, R. W., Ed.; Springer; New York, 2010; pp 1-9.
- (33) Schantz, B.; Rohm, H. Influence of lecithin–PGPR blends on the rheological properties of chocolate. *LWT-Food Sci. Technol.* **2005**, *38*, 41–45.
- (34) Schantz, B.; Linke, L.; Rohm, H. Effect of different emulsifiers on rheological and physical properties of chocolate. En: *Proceedings of the 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure*. Zürich, 2003; pp 329-333.

- (35) Rousset, P.; Sellappan, P.; Daoud, P. Effect of emulsifiers on surface properties of sucrose by inverse gas chromatography. *J. Chromatogr. A*. **2002**, *969*, 97-101.
- (36) Karnjanolarn, R., McCarthy, K. L. Rheology of different formulations of milk chocolate and the effect on coating thickness. *J. Texture Stud.* **2006**, *37*, 668–680.
- (37) Norton, J. E.; Fryer, P. J.; Parkinson, J.; Cox, P. W. Development and characterisation of tempered cocoa butter emulsions containing up to 60% water. *J. Food Eng.* **2009**, *95*, 172–178.
- (38) Dickinson, E. Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers. *Food Biophys.* **2011**, *6* (1), 1-11.
- (39) McCarthy, K. L.; McCarthy, M. J. Oil migration in chocolate–peanut butter paste confectionery as a function of chocolate formulation. *J. Food Sci. E: Food Eng. Phys. Prop.* **2008**, *73* (6), 266-273.
- (40) Hasenhuettl, G. L. Forecasting the future of food emulsifiers. En *Food emulsifiers and their applications*; Hasenhuettl G. L. & Hartel R. W., Eds.; Springer; New York, 2010; pp 395 - 402.
- (41) Tadros, T. F.; Vincent, B. Emulsion stability. En *Encyclopedia of Emulsion Technology*; Becher P., Ed.; Marcel Dekker; New York, 1983; pp 129-285.
- (42) Walstra, P. Physical principles of emulsion science. En *Food Structure and Behaviour*; Blanshard J.; Lillford P. J.; Eds., Academic Press; London, 1987; pp 87-106.
- (43) Garti, N. What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress?. *Colloids Surf. A*. **1999**, *152*, 125-146.
- (44) Hasenhuettl, G. L. Synthesis and Commercial Preparation of Food Emulsifiers. En *Food emulsifiers and their applications*; Hasenhuettl G. L. & Hartel R. W., Eds.; Springer; New York, 2010; pp 11-37.
- (45) Narsimhan, G.; Wang, Z. Guidelines for Processing Emulsion-Based Foods. En *Food emulsifiers and their applications*; Hasenhuettl G. L. & Hartel R. W., Eds.; Springer; New York, 2010; pp 349-394.

- (46) Melzer, E.; Kreuter, J.; Daniels, R. Ethylcellulose: A new type of emulsion stabilizer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, *56*, 23-27.
- (47) Ushikubo, F. Y.; Cunha, R. L. Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food Hydrocoll.* **2014**, *34*, 143-153.
- (48) Nylander, T.; Arnebrant, T.; Bos, M.; Wilde, P. Protein/Emulsifier Interactions. En *Food emulsifiers and their applications*; Hasenhuettl G. L. & Hartel R. W., Eds.; Springer; New York, 2010; pp 89-171.
- (49) Tadros, T. F. Emulsion Formation, Stability, and Rheology. En *Emulsion Formation and Stability*; Tadros T. F., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim, 2013; pp 1-75.
- (50) Petersen, R. V.; Hamill, R. D. Studies in nonaqueous emulsions. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1968**, *19*, 627-640.
- (51) Suitthimeathegorn, O.; Jaitely, V.; Florence, A.T. Novel anhydrous emulsions: Formulation as controlled release vehicles. *Int. J. Pharm.* **2005**, *298*, 367-371.
- (52) Atanase, L-I.; Riess, G. Block copolymer stabilized nonaqueous biocompatible sub-micron emulsions for topical applications. *Int. J. Pharm.* **2013**, *448*, 339-345.
- (53) Patel, N.; Schmid, U.; Lawrence, M. J. Phospholipid-based microemulsions suitable for use in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7817-7824.
- (54) Imhof, A.; Pine, D. J. Stability of Nonaqueous Emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *192*, 368-374.
- (55) Sakthivel, T.; Jaitely, V.; Patel, N. V.; Florence, A. T. Non-aqueous emulsions: hydrocarbon-formamide systems. *Int. J. Pharm.* **2001**, *214*, 43-48.
- (56) Riess, G.; Cheymol, A.; Hoerner, P.; Krikorian, R. Non-aqueous emulsions stabilized by block copolymers: application to liquid disinfectant-filled elastomeric films. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, *108-109*, 43-48.
- (57) Do, T-A. L.; Mitchell, J. R.; Wolf, B.; Vieira, J. Use of ethylcellulose polymers as stabilizer in fat-based food suspensions examined on the example of model reduced-fat chocolate. *React. Funct. Polym.* **2010**, *70*, 856-862.

- (58) Rutledge, T. F.; Hughes, F. A.; Galvin, T. J.; Zech, J. D. New Polymeric Surfactants from Butadiene, Urea and Sulfuric Acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1967**, *44*, 367-371.
- (59) Kuwamura, T.; Takahashi, H.; Hatori, T. Surface Active Block Copolymers: I. The Preparation and Some Surface Active Properties of Block Copolymers of Tetrahydrofuran and Ethylene Oxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1971**, *48*, 29-34.
- (60) Tadros, T. Polymeric surfactants in disperse systems. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147-148*, 281-299.
- (61) Xie, H.-Q.; Xie, D. Molecular design, synthesis and properties of block and graft copolymers containing polyoxyethylene segments. *Prog. Polym. Sci.* **1999**, *24*, 275-313.
- (62) Hayakawa, K.; Kawaguchi, M.; Kato, T. Protective colloidal effects of hydroxypropyl methyl cellulose on the stability of silicone oil emulsions. *Langmuir.* **1997**, *13*, 6069-6073.
- (63) Sun, W.; Sun, D.; Wei, Y.; Liu, S.; Zhang, S. Oil-in-water emulsions stabilized by hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose: Adsorption and thickening effect. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *311*, 228-236.
- (64) Schulz, M.; Daniels, R. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions: influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after homogenization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *49*, 231-236.
- (65) Alhnan, M. A.; Basit, A. W. Engineering polymer blend microparticles: An investigation into the influence of polymer blend distribution and interaction. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, *42*, 30-36.
- (66) Aiache, J. M.; Gauthier, P.; Aiache, S. New gelification method for vegetable oils I: Cosmetic application. *Int. J. Cosmetic Sci.* **1992**, *14*, 228-234.
- (67) Gravelle, A. J.; Barbut, S.; Marangoni, A. G. Ethylcellulose oleogels: Manufacturing considerations and effects of oil oxidation. *Food Res. Int.* **2012**, *48*, 578-583.
- (68) Zetzl, A. K.; Marangoni, A. G.; Barbut, S. Mechanical properties of ethylcellulose oleogels and their potential for saturated fat reduction in frankfurters. *Food Funct.* **2012**, *3*, 327-337.

- (69) Almeida, I. F.; Bahia, M. F. Evaluation of the physical stability of two oleogels. *Int. J. Pharm.* **2006**, *327*, 73–77.
- (70) Sato, K. Crystallization behaviour of fats and lipids - a review. *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*, 2255-2265.
- (71) Talbot, G. Vegetable fats. En *Industrial chocolate manufacture and use*; Beckett S. T., Ed.; Chapman & Hall; London, 1994; pp 242-257.
- (72) Van Mechelen, J. B. Triacylglycerol structures and the chocolate fat bloom mechanism. A high resolution powder diffraction study. Tesis Doctoral, University of Amsterdam, The Netherlands, 2008.
- (73) Beckett, S. T. Cristalización de la grasa en el chocolate. En *La ciencia del chocolate*; Beckett, S. T., Ed.; Editorial Acirbia (de la edición en español); Zaragoza, España, 2000.
- (74) Jovanovic, O.; Pajin, B. Influence of lactic acid ester on chocolate quality. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 128-136.
- (75) Afoakwa E. O.; Paterson, A.; Fowler, M.; Vieira, J. Effects of tempering and fat crystallisation behaviour on microstructure, mechanical properties and appearance in dark chocolate systems. *J. Food Eng.* **2008**, *89*, 128-136.
- (76) Drugs in chocolate paste. Annotations. *The Lancet.* **1964**, *283 (7323)*, 31.
- (77) Herxheimer, A.; Douglas, M.B. A new method of administering drugs by mouth to animals. *J. Pharm. Pharmacol.* **1963**, *15*, 849.
- (78) Vinson, J.; Hao, Y.; Su, X.; Zubik, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3630-3634.
- (79) Vinson, J.; Proch, J.; Zubik, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47(12)*, 4821-4824.
- (80) Gu, L.; House, S.; Wu, X.; Ou, B.; Prior, R. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4057-4061.

- (81) Araujo Pimentel, M.; Nitzke, J.; Klipel, C.; Vogt De Jong, E. Chocolate and red wine - A comparison between flavonoids contents. *Food Chem.* **2010**, *120*, 109-112.
- (82) Visioli, F.; Bernaert, H.; Corti, R.; Ferri, C.; Heptinstall, S.; Molinari, E.; Poli, A.; Serafini, M.; Smit, H.; Vinson, J.; Violi, F.; Paoletti, R. Chocolate, lifestyle, and health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, *49*, 299-312.
- (83) Grassi, D.; Desideri, G.; Necozione, S.; Lippi, C.; Casale, R.; Properzi, G.; Blumberg, J.; Ferri, C. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1671-1676.
- (84) Greenberg, J. A. Chocolate intake and diabetes risk. *Clin. Nutr.* **2015**, *34*, 129-133.
- (85) Rimbach, G.; Melchin, M.; Moehring, J.; Wagner, A. Polyphenols from cocoa and vascular health - A critical review. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 4290-4309.
- (86) Siew, A.; Van Arnum, P. (Traducción: Segal, M; Arellano, V.). Soluciones para el desafío que plantean los fármacos poco solubles en agua. *Pharm. Technol. Sudamérica.* **2013**, *124*, 42-47.
- (87) Dayan, A. D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.* **2003**, *86*, 141-159.
- (88) Martins, F. T.; Neves, P. P.; Ellena, J.; Camí, G. E.; Brusau, E. V.; Narda, G. E. Intermolecular contacts influencing the conformational and geometric features of the pharmaceutically preferred mebendazole polymorph C. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *98* (7), 2336-2344.
- (89) Kachrimanis, K.; Rontogianni, M.; Malamataris, S. Simultaneous quantitative analysis of mebendazole polymorphs A–C in powder mixtures by DRIFTS spectroscopy and ANN modeling. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 512-520.
- (90) Kumar, S.; Chawla, G.; Bansal, A. K. Role of additives like polymers and surfactants in the crystallization of mebendazole. *Yakugaku Zasshi, J. Pharm. Soc. Jpn.* **2008**, *128* (2), 281-289.

- (91) Agatonovic-Kustrin, S.; Glass, B. D.; Mangan, M.; Smithson, J. Analysing the crystal purity of mebendazole raw material and its stability in a suspension formulation. *Int. J. Pharm.* **2008**, *361*, 245-250.
- (92) Machnik, M.; Hegger, I.; Kietzmann, M.; Thevis, M.; Guddat, S.; Schänzer, W. Pharmacokinetics of altrenogest in horses. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2007**, *30*, 86-90.
- (93) International Confectionery Association (ICA). *Manufacturing Process of Small Scale Chocolate Samples*. Analytical Method 12. Belgium, 2012.
- (94) Ruíz Martínez, Ma. A.; Muñoz De Benavides, M.; Morales Hernández, Ma. E.; Gallardo Lara, V. Influence of the concentration of a gelling agent and the type of surfactant on the rheological characteristics of oleogels. *II Farmaco.* **2003**, *58*, 1289-1294.
- (95) Smith, K. W.; Bhaggan, K.; Talbot, G.; Van Malssen, K. F. Crystallization of Fats: Influence of Minor Components and Additives. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2011**, *88*, 1085-1101.
- (96) Garti, N.; Schlichter, J.; Sarig, S. Effect of Food Emulsifiers on Polymorphic Transitions of Cocoa Butter. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1986**, *63* (2), 230-236.
- (97) Dhonsi, D.; Stapley, A. G. F. The effect of shear rate, temperature, sugar and emulsifier on the tempering of cocoa butter. *J. Food Eng.* **2006**, *77*, 936-942.
- (98) Miskandar, M. S.; Che Man, Y. B.; Abdul Rahman, R.; Nor Aini, I.; Yusoff, M. S. A. Effects of emulsifiers on crystal behavior of palm oil blends on slow crystallization. *J. Food Lipids.* **2007**, *14*, 1-18.
- (99) Gauthier, P.; Aiache, S.; Aiache, J. M. Novel glyceride gels II. Viscosity characteristics. *Int. J. Cosmet. Sci.* **1994**, *18*, 229-235.
- (100) Stortz, T. A.; Zetzi, A. K.; Barbut, S.; Cattaruzza, A.; Marangoni, A. G. Edible oleogels in food products to help maximize health benefits and improve nutritional profiles. *Lipid Technol.* **2012**, *24* (7), 151-154.
- (101) Morgan, J. Chocolate: a flavor and texture unlike any other. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 1065S-1067S.

- (102) Bruinsma, K.; Taren, D. L. Chocolate: food or drug?. *J. Am. Diet. Assoc.* **1999**, *99*, 1249-1256.
- (103) Hoskin, J. C. Sensory properties of chocolate and their development. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 1068S-1070S.
- (104) Tannenbaum, G. Chocolate: A Marvelous Natural Product of Chemistry. *J. Chem. Educ.* **2004**, *81(8)*, 1131-1135.
- (105) Windhab, E. What makes for smooth, creamy chocolate. *Phys. Today* [en línea]. **2006**, *59 (6)*, 82.
- (106) Gaines, Jr., G. L. Monolayers of polymers. *Langmuir.* **1991**, *7*, 834-839.
- (107) Shapiro, Y. E. Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 1184-1253.
- (108) MSD Salud Animal. *Regumate® Equinos*. <http://www.msd-salud-animal.com.ar/products/regumate/productdetails-regumate.aspx>. [Consultado: marzo 2015].
- (109) Bouyer, E.; Mekhloufi, G.; Rosilio, V.; Grossiord, J. L.; Agnely, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *Int. J. Pharm.* **2012**, *436 (1-2)*, 359-378.
- (110) Schlichter, J.; Sarig, S.; Garti, N. Polymorphic transformations of cocoa butter in the presence of emulsifier, studied by the DSC. *Thermochim. Acta.* **1985**, *85*, 517-520.
- (111) Schlichter, J.; Sarig, S.; Garti, N. Mechanistic considerations of polymorphic transformations of tristearin in the presence of emulsifiers. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1987**, *64(4)*, 529-533.
- (112) Garti, N.; Sato, K. Effects of surfactants on transition kinetics of stearic acid polymorphs. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1986**, *63 (2)*, 236-239.
- (113) Garti, N.; Wellner, E.; Sarig, S. Effect of food emulsifiers on crystal structure and habit of stearic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*, 1058-1060.

- (114) Schlichter, J.; Sarig, S.; Garti, N. Dynamic control of polymorphic transformation in triglycerides by surfactants: the button syndrome. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65* (7), 1144-1150.
- (115) Garti, N.; Aronhime, J. S.; Sarig, S. The role of chain length and an emulsifier on the polymorphism of mixtures of triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1989**, *66* (8), 1085-1089.
- (116) Garti, N.; Wellner, E.; Sarig, S. Crystal Structure Modifications of Tristearin by Food Emulsifiers. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1982**, *59* (4), 181-185.
- (117) Schlichter, Aronhime, J.; Sarig, S.; Garti, N. Reconsideration of Polymorphic Transformations in Cocoa Butter Using the DSC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1988**, *65* (7), 1140-1143.
- (118) Guth, O. J.; Aronhime, J.; Garti, N. Polymorphic transitions of mixed triglycerides, SOS, in the presence of sorbitan monostearate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1989**, *66* (11), 1606-1613.
- (119) Miskandar, M. S.; Che Man, Y. B.; Abdul Rahman, R.; Nor Aini, I.; Yusoff, M. S. A. Effects of emulsifiers on crystallization properties of low-melting blends of palm oil and olein. *J. Food Lipids.* **2006**, *13*, 57-72.
- (120) Walter, P.; Cornillon, P. Influence of thermal conditions and presence of additives on fat bloom in chocolate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, *78* (9), 927-932.
- (121) Elisabettini, E.; Desmedt, A.; Durant, F. Polymorphism of stabilized and nonstabilized tristearin, pure and in the presence of food emulsifiers. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73* (2), 187-192.
- (122) Marangoni, A. Novel strategies for nanostructuring liquid oils into functional fats. En: *Proceedings of the 5rd International Symposium on Food Rheology and Structure*. Zürich, 2009; pp 38-44.
- (123) Co, E. D.; Marangoni, A. G. Organogels: an alternative edible oil-structuring method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *89*, 749-780.
- (124) Wright, A. J.; Hartel, R. W.; Narine, S. S.; Marangoni, A. G. The effect of minor components on milk fat crystallization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77* (5), 463-475.

- (125) Wright, A. J.; Marangoni, A. G. The effect of minor components on milk fat microstructure and mechanical properties. *J. Food Sci.* **2003**, *68* (1), 182-186.
- (126) Loisel, C.; Lecq, G.; Keller, G.; Ollivon, M. Dynamic crystallization of dark chocolate as affected by temperature and lipid additives. *J. Food Sci.* **1998**, *63* (1), 73-79.
- (127) Lanzani, A.; Bondioli, P.; Mariani, C.; Folegatti, L.; Venturini, S., Fedeli, E.; Barreteau, P. A. New short-path distillation system applied to the reduction of cholesterol in butter and lard. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, *71* (6), 609-614.
- (128) Chronakis, I. S.; Kasapis, S. A rheological study on the application of carbohydrate-protein incompatibility to the development of low fat commercial spreads. *Carbohydr. Polym.* **1995**, *28*, 361-313.
- (129) Chronakis, I. S. Structural-functional and water-holding studies of biopolymers in low fat content spreads. *LWT-Food Sci. Technol.* **1997**, *30*, 36-44.
- (130) Kok, L. L.; Fehr, W. R.; Hammond, E. G.; White, P. J. *Trans*-free margarine from highly saturated soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76* (10), 1175-1181.
- (131) Costales-Rodríguez, R.; Gibon, V.; Verhé, R.; De Greyt, W. Chemical and enzymatic interesterification of a blend of palm stearin: soybean oil for low *trans*-margarine formulation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, *86*, 681-697.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

### *Publicaciones con referato:*

#### ➤ Publicación periódica:

**Marcelo R. Ceballos**; Valentina Brailovsky; Karina L. Bierbrauer; Silvia L. Cuffini; Dante M. Beltramo; Ismael D. Bianco. Effect of ethylcellulose on the structure and stability of non-aqueous oil based propylene glycol emulsions. *Food Research International*. **2014**, 62, 416-423.

#### ➤ Capítulo de libro:

**Marcelo R. Ceballos**; Dante. M. Beltramo; Ismael D. Bianco. Biopolymers in non-aqueous emulsions for food and pharmaceutical applications. En *Frontiers in Biomaterials. Unfolding the Biopolymer Landscape, Vol.2*; Pillay, V., Ed.; Bentham Sciences; South Africa, 2016; pp 326-352.

### ***Presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas:***

II ENCUENTRO REGIONAL DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA RIOJA. (Organizado por SECyT de la Universidad Nacional de La Rioja, La Rioja, 7 de septiembre de 2012). "Sistemas nanoestructurados autoensamblados y sus aplicaciones farmacéuticas y alimenticias".

I.D. Bianco, R.V. Alasino, V. Leonhard, A. Garro, V. Heredia, M.R. Ceballos, K. Bierbrauer y D. M. Beltramo.

IV CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS (organizado por la UNC y el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba. Córdoba. 14, 15 y 16 de noviembre de 2012). "NUEVO PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE OLEOGELES DE ETILCELULOSA".

Ceballos MR, Bierbrauer K, Alasino R, Beltramo D, Cuffini S, Bianco I.

IV ENCUENTRO NANOMERCOSUR 2013 (organizado por la Fundación Argentina de Nanotecnología (FAN). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 12, 13 y 14 de

noviembre de 2013). “NON-AQUEOUS OIL / PROPYLENE GLYCOL EMULSIONS: PREPARATION ADVANTAGES AND STABILIZATION”

Ceballos MR, Brailovsky V, Bierbrauer K, Alasino R, Beltramo D, Cuffini S, Bianco I.

III REUNIÓN NANOCÓRDOBA 2014. Organizado por la UNC. Córdoba, 22 al 24 de octubre de 2014. “Efectos de etilcelulosa sobre la estructura y estabilidad de emulsiones no-acuosas y oleogeles”.

Bianco ID, Ceballos MR, Brailovsky V, Bierbrauer KL, Cuffini SL, Beltramo DM.

