



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

**INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE HIDROCOLOIDES SOBRE  
LA ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE  
EMULSIONES W/O: MARGARINAS DE PANIFICACIÓN**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS**

**PRESENTA:**

**M.C. MARISOL CORDOVA BARRAGAN**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. ELENA DIBILDOX ALVARADO**

**SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.**

**ENERO DE 2021**



Influencia de la adición de hidrocoloides sobre la estructura y propiedades fisicoquímicas de emulsiones W/O: margarinas de panificación por Marisol Córdova Barragán se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Biopolímeros Alimentarios de la Facultad de Ciencias Químicas de  
la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de:

Beca-Tesis del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

387530

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A mi directora de tesis, Dra. Elena Dibildox Alvarado... Gracias infinitas por acompañarme en este largo viaje de crecimiento profesional... Siempre gracias por motivarme a ir siempre más allá de lo común.

A mi comité tutorial: Dr. Jorge Fernando Toro Vázquez, Dr. Jaime David Pérez Martínez, Dr. Mario Moscosa Santillán y Dra. Fernanda Peyronel... Gracias por el tiempo dedicado y las valiosas aportaciones realizadas a la investigación.

A la empresa *Palsgaard Industri de México, S. de R.L. de C.V.*, por el gran interés mostrado en el proyecto y por el suministro de sus instalaciones y de materia prima para poder elaborar las emulsiones W/O y las margarinas de panificación... Gracias especiales a Emma, Daniel y Andrés.

A CONACyT, por su apoyo financiero con la Beca-Tesis 387530 para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Dr. Alejandro Marangoni... Gracias sería poco para mostrar el gran agradecimiento por el tiempo y los conocimientos dedicados a la investigación.

A la Universidad de Guelph (Ontario, Canadá), por adoptarme como alumna durante mi estancia académica y hacerme sentir como en casa.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, por darme tiempo, pinceles y pinturas para poder plasmar mis sueños en una acuarela.

A *Dedotes* y *Chelito*, por brindarme las herramientas necesarias para poder conseguir mis metas... Gracias por enseñarme el valor de la familia por sobre todas las cosas.

A Marce y Carla, por el cariño, la fuerza y los consejos siempre en los momentos indicados.

A mis compañeros del Laboratorio de Biopolímeros Alimentarios, por los conocimientos y momentos compartidos que me permitieron seguir aprendiendo... Gracias por hacer amenos los días más pesados.

En verdad a todos y cada uno de ustedes, infinitas gracias.

*En memoria de los abuelos...*

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>1</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>2</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>10</b>
2.1. Aceite de palma	10
2.2. Uso de estabilizantes en grasas y aceites comestibles	11
2.3. Emulsiones	12
2.3.1. Emulsiones agua en aceite W/O	13
2.3.2. Emulsiones agua en aceite W/O reducidas en grasa	14
2.4. Uso de hidrocoloides en emulsiones alimentarias	14
2.5. Margarinas	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>18</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
5.1. Objetivo general	20
5.2. Objetivos específicos	20
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
6.1. Materiales	21
6.2. Preparación de las fases oleosa y acuosa y las emulsiones W/O	22
6.3. Preparación de las margarinas de panificación	22
6.4. Métodos	23
6.5. Análisis estadístico	27
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
7.1. Adición de HBS a la fase oleosa de la emulsión W/O	28
7.1.1. Perfil de triacilglicéridos	28
7.1.2. Comportamiento térmico	28
7.1.3. Microestructura	33
7.1.4. Contenido de sólidos grasos	37
7.2. Adición de pectina de alto metoxilo y goma xantana a la fase acuosa de la emulsión W/O	38
7.2.1. Comportamiento térmico	38
7.2.2. Tensión interfacial	40
7.2.3. Contenido de sólidos grasos	42
7.2.4. Dureza	43
7.3. Margarinas de panificación	45
7.3.1. Contenido de sólidos	45
7.3.2. Dureza	45
7.3.3. Estabilidad térmica	48
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>51</b>

<b>10.ANEXO 1. CURSOS, EXPOSICIONES Y CONGRESOS DERIVADOS DE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO</b>	<b>59</b>
<b>11.ANEXO 2. CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULO CIENTÍFICO</b>	<b>61</b>
<b>12.ANEXO 3. ARTÍCULO CIENTÍFICO ACEPTADO</b>	<b>62</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>2.1</b>	Clasificación de las margarinas en base a sus características físicas, nutricionales y de aplicación	17
<b>7.1.</b>	Composición de triacilglicéridos de la fase oleosa y del estabilizante alto en ácido behénico	29
<b>7.2.</b>	Parámetros microestructurales a 18 °C de la emulsión W/O 35/65 en función de la concentración de estabilizante alto en ácido behénico y de la emulsión W/O tradicional	35
<b>7.3.</b>	Contenido de sólidos grasos a 18 °C de la emulsión W/O 35/65 en función de la concentración de estabilizante alto en ácido behénico y de la emulsión W/O tradicional	37
<b>7.4.</b>	Tensión interfacial de la fase oleosa con la fase acuosa adicionada con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana a 75 °C	41
<b>7.5.</b>	Contenido de sólidos a 18 °C de la emulsión W/O 35/65 adicionada con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa y de la emulsión W/O tradicional	43
<b>7.6.</b>	Dureza a 18 °C de la emulsión W/O 35/65 adicionada con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa y de la emulsión W/O tradicional	44



ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
7.1. Perfil de cristalización y de fusión del estabilizante alto en ácido behénico	30
7.2. Perfil de cristalización de la fase oleosa de la emulsión W/O 35/65 en función de la concentración de estabilizante alto en ácido behénico	31
7.3. (A) Perfil de cristalización y (B) ampliación de las exotermas 1 y 2 de la emulsión W/O 35/65 en función de la concentración de estabilizante alto en ácido behénico	34
7.4. Microestructura a 18 °C de la emulsión W/O 35/65 con su dimensión fractal en 2D en función de la concentración de estabilizante alto en ácido behénico y de la emulsión W/O tradicional	36
7.5. (A) Perfil de cristalización y (B) ampliación de las exotermas 1 y 2 de la emulsión W/O 35/65 adicionada con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa	39
7.6. Contenido de sólidos a 18 °C de las margarinas adicionadas con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa	46
7.7. Dureza a 18 °C de las margarinas adicionadas con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa	47
7.8. Estabilidad térmica, expresada como sinéresis, a 40 °C de las margarinas adicionadas con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa	48

**RESUMEN**

Un estabilizante alto en ácido behénico (HBS) en concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.9% p/p fue añadido a la fase oleosa de una emulsión agua en aceite reducida en grasa (W/O 35/65) para su aplicación en margarinas de panificación, cuyo contenido tradicional de grasa es del 80%. Además, fue adicionado 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa de la emulsión W/O. La cinética de cristalización, el comportamiento térmico, la microestructura, el contenido de sólidos grasos (SFC), la dureza, la tensión interfacial y la estabilidad térmica fueron evaluados y comparados con aquéllos obtenidos en una emulsión W/O tradicional con 80% de grasa. La calorimetría diferencial de barrido mostró que la adición de 0.9% p/p del estabilizante propició que la cristalización comenzara 2.5 °C antes que cuando no se adicionó HBS, reduciendo también el tiempo necesario para estructurar el sistema. Este aumento en la temperatura de inicio de la cristalización, aunado al incremento en la temperatura del pico correspondiente a la cristalización de los triacilglicéridos de alto punto de fusión (HMT), fue atribuido a la co-cristalización entre el HBS y los HMT de la fase oleosa a base de aceite de palma. Los resultados de microscopía de luz polarizada mostraron que la co-cristalización de los triacilglicéridos de alto punto de fusión de la fase oleosa con el HBS disminuyó significativamente el tamaño de los cristales de grasa e incrementó la cantidad de cristales, otorgándole una mejor estructuración al sistema. El SFC también se vio incrementado hasta en 4.4% con la adición de HBS. Los experimentos de tensión interfacial corroboraron que el HBS actuó sobre la fase oleosa y no en la interfase de la emulsión. De los resultados obtenidos utilizando 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa de la emulsión, se observó un aumento significativo en el contenido de sólidos y en la dureza debido al aumento de la viscosidad proporcionado por la adición de dichos hidrocoloides. Las margarinas de panificación mostraron un comportamiento similar al observado en sus respectivas emulsiones W/O, aunado a una mejor estabilidad térmica en el caso de la margarina elaborada con goma xantana. La presente investigación sugiere que el contenido de grasa total puede disminuirse de 80% a 65% en la emulsión W/O y en la

margarina de panificación sin cambiar su funcionalidad añadiendo entre 0.3% p/p y 0.9% p/p de HBS en su fase oleosa o bien, 0.3% p/p de HBS en la fase oleosa en conjunto con 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa. La emulsión W/O reducida en grasa adicionada con 0.3% p/p de HBS en la fase oleosa y con 0.2% p/p de goma xantana en la fase acuosa igualó el contenido de sólidos y mejoró la dureza en relación con la emulsión W/O tradicional con 80% de grasa. Concordantemente, la margarina de panificación adicionada con estos mismos componentes fue la mejor evaluada al obtener un incremento significativo en el contenido de sólidos y en la dureza, así como una mejor estabilidad térmica. La presente investigación proveyó información novel sobre el efecto de estabilizantes o promotores de cristalización en emulsiones W/O reducidas en grasa y generó información sobre el uso de agentes estabilizantes tanto en la fase oleosa (HBS) como en la fase acuosa (hidrocoloides) de emulsiones tales como margarinas de panificación.

**ABSTRACT**

A high behenic stabilizer (HBS) at concentrations of 0.3, 0.6 and 0.9% w/w was added to the oil phase of a fat-reduced water-in-oil (W/O 35/65) emulsion for its application in bakery margarines, whose traditional fat content is 80%. In addition, 0.2% w/w of high ester (HE) pectin or xanthan gum was added to the aqueous phase of the W/O emulsion. The crystallization kinetics, thermal behavior, microstructure, solid fat content (SFC), hardness, interfacial tension, and thermal stability were studied and compared with those obtained in a traditional W/O emulsion with 80% fat. Differential scanning calorimetry results showed that when 0.9% w/w of HBS was added, the crystallization started 2.5 °C higher than when no HBS was added, hence reducing the time that is needed to structure the system. This increase in the crystallization onset temperature, together with the increase in the peak temperature corresponding to the high melting point triacylglycerols (HMT) crystallization, was attributed to the co-crystallization between the HBS and the HMT of the palm oil-based oil phase. Polarized light microscopy showed that the co-crystallization of the high melting triacylglycerols of the oil phase with the HBS significantly decreased the fat crystal size and increased the number of crystals, giving the system a better structuring. The SFC also was increased up to 4.4% when HBS was added. Interfacial tension experiments corroborated that HBS was located in the oil phase and not at the emulsion interface. From the results using 0.2% w/w of HE pectin or xanthan gum in the aqueous phase of the emulsion, a significant increase in the solid content and hardness was observed because of the increase in viscosity provided by the addition of these hydrocolloids. The bakery margarines showed a similar behavior to that observed in their respective W/O emulsions, besides with a higher thermal stability in the case of the margarine manufactured with xanthan gum. This work suggests that the total fat content can be diminished from 80% to 65% in both systems without changing functionality by merely adding between either 0.3% w/w or 0.9% w/w HBS in its oil phase, or 0.3% w/w HBS in its oil phase and 0.2% w/w HE pectin or xanthan gum in its aqueous phase. The reduced fat W/O emulsion added with 0.3% w/w HBS in the oil phase and with 0.2% w/w of xanthan gum in the

## **ABSTRACT**

aqueous phase matched the solid content and improved the hardness of the traditional W/O emulsion with 80% fat. Accordingly, the bakery margarine added with these same components was the best evaluated by obtaining a significant increase in solid content and hardness, as well as better thermal stability.

This research provided novel information on the effect of stabilizers or crystallization promoters in reduced-fat W/O emulsions, and originated information about the use of stabilizing agents both in the oil phase (HBS) and in the aqueous phase (hydrocolloids) of emulsions, such as bakery margarines.

### 1. INTRODUCCIÓN

A pesar de las críticas a la producción de aceite de palma debido a la destrucción del hábitat y las prácticas de baja sostenibilidad, la demanda actual de aceite de palma continúa aumentando y sigue siendo una fuente importante de alimentación en la mayor parte del mundo (Clemens y col., 2017).

El aceite de palma es una fuente natural de grasas saturadas de origen vegetal, económico y de amplia disponibilidad, que se utiliza en muchas aplicaciones alimentarias (Henson, 2012). El aceite de palma y sus derivados (ej., estearina de palma, oleína de palma y aceite de palmiste) son componentes importantes y funcionales en la fabricación de margarinas, productos untables y grasas de panificación (Henson, 2012). Con casi 71 millones de toneladas métricas de aceite producidas entre 2019 y 2020, el aceite de palma es el aceite comestible más abundante en el mundo, seguido sólo por el aceite de soya con ~55 millones de toneladas métricas en el mismo periodo (Shahbandeh, 2020). Una de las grandes ventajas del aceite de palma es que tiene la mayor productividad por unidad de tierra utilizada. Con 6 toneladas de aceite producidas por hectárea, el rendimiento de aceite de palma es superior al de otros cultivos de semillas oleaginosas, como el aceite de coco (2.7 t/ha), aceite de aguacate (2.6 t/ha), aceite de oliva (1.2 t/ha), aceite de colza (1,2 t/ha), aceite de girasol (1.0 t/ha) y aceite de soya (0.4 t/ha) (Journey to Forever, 2020). Debido a lo anterior, podría argumentarse que, desde una perspectiva de sostenibilidad, el aceite de palma tiene una huella de carbono más pequeña que otras semillas oleaginosas.

Si bien es utilizado ampliamente en la industria alimentaria, el aceite de palma tiene algunas carencias tecnológicas. Se sabe que la cristalización del aceite de palma es un proceso bastante complejo debido a su lento comportamiento de cristalización en comparación con otras grasas naturales, lo que conduce a un post-endurecimiento durante su almacenamiento, propiciando la formación de cristales granulares de entre 20 y 50  $\mu\text{m}$  que pueden causar una sensación arenosa en la boca, fraccionamiento y sinéresis en el producto terminado (de Oliveira y col., 2015; Hishamuddin y col., 2011; Nor Aini y Miskandar, 2007; Garbolino y col., 2005; Zaliha

y col., 2005; Zaliha y col., 2004; Timms, 1984). Algunas estrategias utilizadas para acelerar la cristalización del aceite de palma incluyen la adición de promotores de cristalización, también llamados estabilizantes, tales como mono- y diacilglicéridos (MAGs y DAGs, respectivamente), aceites vegetales totalmente hidrogenados o triacilglicéridos (TAGs) fraccionados, simples, saturados, de cadena larga y con altos puntos de fusión ( $>40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (de Oliveira y col., 2015; Ribeiro y col., 2014; Basso y col., 2010).

Un estabilizante o promotor de cristalización avanzado empleado en los últimos años y elaborado a partir de una mezcla de aceites totalmente hidrogenados de colza y soya, provee una grasa predominantemente compuesta de ácidos esteárico y behénico, en concentraciones de  $\sim 50\%$  y  $\sim 40\%$  y con longitudes de cadena de 18 y 22 átomos de carbono, respectivamente. Recientemente, Kim y Marangoni (2017) y Peyronel y col. (2016) han demostrado que este estabilizante alto en ácido behénico (HBS) co-cristaliza con los triacilglicéridos (TAGs) de alto punto de fusión presentes en las grasas, ya sea formando un cristal mixto o nucleando en su superficie. A pesar de que los efectos del HBS sobre la cristalización directamente en el aceite de palma han sido estudiados como se mencionó anteriormente, no han sido reportados los efectos de este estabilizante en la cristalización de emulsiones agua en aceite (W/O), tales como margarinas y productos untables.

Al respecto de las emulsiones, una gran diversidad de alimentos contiene dos fases inmiscibles (ej., agua y aceite) como parte de sus ingredientes (ej., margarinas, productos untables, mayonesas, aderezos y leche), y es crucial mezclarlas y estabilizarlas para producir alimentos de alta calidad y estabilidad (Chung y McClements, 2014). Generalmente, estas dos fases inmiscibles son incorporadas a los alimentos como emulsiones las cuales se forman dispersando, con la ayuda de un emulsificante, una fase en otra en forma de pequeñas gotas (McClements, 2015; Santana y col., 2013; Windhab y col., 2005). Así, una emulsión puede ser definida como un sistema coloidal en donde un líquido está dispersado en forma de gotas microscópicas en una fase continua líquida o semisólida de diferente composición (Schramm, 2005). Si el aceite se encuentra en forma de gotas

dispersas en agua, la emulsión es llamada aceite en agua (O/W), mientras que al ser el agua la fase dispersa en aceite, la emulsión se denomina agua en aceite (W/O) (McClements, 2015).

En décadas pasadas, los alimentos elaborados a partir de emulsiones W/O, como las margarinas, contenían tradicionalmente un 80% de grasa (NMX-F-165-S-1978); sin embargo, los temas de salud asociados con dietas altas en calorías han propiciado que la industria alimentaria actual se enfoque en desarrollar productos reducidos en grasa (Chung y col., 2013; Lee y col., 2013; Nehir El y Simsek, 2012; van Kleef y col., 2012). No obstante, una disminución en la cantidad de grasa de las emulsiones W/O implicaría un incremento en la proporción de la fase acuosa, lo que compromete la estabilidad de dichas emulsiones, que llevaría una limitada aceptación en el mercado. Por lo anterior y aunado uso de emulsificantes tradicionales, definidos como sustancias tensioactivas que facilitan la formación de emulsiones y promueven su estabilidad (ej., mono- y diacilglicéridos) (Dickinson, 2009; Dagleish, 2006; Riego y Gómez, 1988a), es bien sabido que el uso de hidrocoloides, como la pectina y la goma xantana, dispersados en la fase acuosa, puede mejorar la estabilidad de emulsiones (Ozturk y McClements, 2016; Cui y Chang, 2014; Desplanques y col., 2012; Huang y col., 2001).

Por lo anteriormente expuesto, en esta investigación mostramos los efectos de la adición de un estabilizante alto en ácido behénico (HBS) en la cinética de cristalización y microestructura de una fase oleosa a base de aceite de palma y su emulsión W/O reducida en grasa (W/O 65/35). Así también, fue estudiado el efecto de la adición de pectina de alto metoxilo y goma xantana en la fase acuosa de dicha emulsión y de la margarina con ella elaborada sobre sus propiedades fisicoquímicas. Lo anterior, con el fin de mejorar la estructura que se ha perdido al reducir un 15% el contenido de grasa total y entonces pueda ser utilizada como margarina de panificación sin comprometer sus atributos fisicoquímicos.



**2. MARCO TEÓRICO****2.1. Aceite de palma**

El aceite de palma, que representa del 20 al 24% de la fruta fresca y que es obtenido del mesocarpio del fruto de *Elaeis guineensis*, tiene un olor agradable característico, es muy estable a la oxidación y es semisólido a temperatura ambiente (25 °C) (Gunstone, 1997). Además, por su elevado contenido de carotenos (0.05–0.20% p/p), tiene un fuerte color anaranjado que no es afectado por la neutralización, aunque se puede blanquear hasta un color amarillo semejante al de otros aceites vegetales que han sido obtenidos por hidrogenación, con tierras decolorantes, a altas temperaturas o por oxidación con aire o con agentes químicos (Bailey, 1951).

Actualmente, el aceite de palma es considerado como el aceite vegetal comestible más importante, ya que participa con el 24.8% de la producción mundial de grasas y aceites, superando al aceite de soya. La mayoría de su producción proviene del sureste de Asia, particularmente de Malasia e Indonesia, siendo el primero el más grande proveedor a nivel mundial (Sundram y col., 2003). Con 6 toneladas de aceite producidas por hectárea, los rendimientos de aceite de palma superan los de los cultivos de otras semillas oleaginosas, como el aceite de coco (2.7 t/ha), aceite de aguacate (2.6 t/ha), aceite de oliva (1.2 t/ha), aceite de colza (1.2 t/ha), aceite de girasol (1.0 t/ha) y aceite de soya (0.4 t/ha) (Journey to forever, 2020).

Si bien son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, el aceite de palma y sus derivados tienen algunas fallas tecnológicas. Los principales problemas del aceite de palma son su cinética de cristalización lenta y la tendencia a endurecerse durante el almacenamiento formando cristales granulares de entre 20 y 50  $\mu\text{m}$ , pudiendo causar una sensación arenosa en la boca, fraccionamiento y sinéresis de aceite en los productos terminados (Nor Aini y Miskandar, 2007; Garbolino y col., 2005). Algunas estrategias que han sido utilizadas para acelerar la cristalización del aceite de palma incluyen la adición de promotores de cristalización como mono- y

diacilglicéridos (MAGs y DAGs, respectivamente), aceites vegetales completamente hidrogenados o triacilglicéridos (TAGs) saturados, simples y de cadena larga con temperaturas de fusión altas ( $>40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (de Oliveira y col., 2015; Ribeiro y col., 2014; Basso y col., 2010).

### **2.2. Uso de estabilizantes en grasas y aceites comestibles**

Diversos productos alimentarios ricos en aceite de palma, tales como margarinas, productos untables y grasas de panificación, pueden presentar una cinética de cristalización lenta (Nor Aini y Miskandar, 2007; Garbolino y col., 2005), afectando desde la organización de los TAGs hasta las propiedades fisicoquímicas finales de los productos grasos (de Oliveira y col., 2015; Sato y col., 2013). Adicionalmente, la eliminación parcial o total de la grasa de los alimentos también compromete los atributos fisicoquímicos y la calidad sensorial de los alimentos (Bayarri y col., 2006). Como alternativa para mejorar dichos atributos fisicoquímicos, es posible utilizar estabilizantes, definidos como modificadores del proceso de cristalización que pueden actuar como núcleos preferenciales en el ordenamiento de la red cristalina e inducir hábitos polimórficos específicos (de Oliveira y col., 2015).

Un ejemplo de estabilizantes son las grasas duras, consideradas TAGs simples, saturados, de cadena larga y alto punto de fusión ( $>40^{\circ}\text{C}$ ). Al respecto, diversos investigadores han estudiado el efecto de diferentes estabilizantes en la cristalización de productos grasos. Así, por ejemplo, Ribeiro y col. (2013b) utilizaron grasas duras de aceites de palma, algodón, soya y crambe para modular la cinética de cristalización y el comportamiento térmico de la manteca de cacao. En otro estudio, de Oliveira y col. (2015) adicionaron grasas duras, tales como aceites totalmente hidrogenados de palmiste, palma, algodón, soya y crambe, a aceite de palma para incrementar la temperatura de inicio de la cristalización ( $T_{\text{onset}}$ ) y favorecer una cristalización  $\beta'$ . Más recientemente, Peyronel y col. (2016) utilizaron un estabilizante rico en ácido behénico (HBS) en mezclas de oleína de palma y fracción intermedia de aceite de palma, observando un decremento en el tamaño

de los cristales, la formación de una red cristalina más densa y una reducción significativa en la pérdida de aceite. Además, investigadores como Kim y Marangoni (2017) y Peyronel y col. (2016) han demostrado que este estabilizante alto en ácido behénico (HBS) co-cristaliza con los TAGs de alto punto de fusión presentes naturalmente en las grasas, ya sea formando cristales mixtos o nucleando en su superficie. Si bien los efectos del HBS han sido bien estudiados en la cinética de cristalización de grasas comestibles como el aceite de palma, las concentraciones utilizadas han sido más altas que las sugeridas para su aplicación industrial (0.2-2.0% p/p). Aunado a lo anterior, se carece de información sobre el efecto de este estabilizante en sistemas emulsionados tales como margarinas y productos untables, ya que la incorporación de grasa en este tipo de productos es en forma de emulsión.

### 2.3. Emulsiones

Las emulsiones pueden definirse como sistemas coloidales en donde un líquido está dispersado en forma de gotas microscópicas en una fase líquida continua de diferente composición (Schramm, 2005). De manera general, las emulsiones se clasifican como (1) emulsiones aceite en agua (O/W), en donde el aceite forma la fase dispersa y el agua forma la fase continua (ej., leche y mayonesa), y (2) emulsiones agua en aceite (W/O), en donde el agua forma la fase dispersa y el aceite forma la fase continua (ej., mantequillas, margarinas y productos untables) (McClements, 2015).

Las emulsiones cinéticamente estables se forman utilizando compuestos ambifílicos, también llamados emulsificantes, que facilitan la formación de la emulsión e incrementan su estabilidad (Santana y col., 2013; Dickinson, 2009). Después de la formación de las gotas, los emulsificantes forman una capa alrededor de éstas, lo que inhibe su agregación debido a la generación de fuerzas repulsivas entre ellas (Chung y McClements, 2014). Por otro lado, la presencia de cristales de grasa tiene un impacto significativo en la estabilización de cada tipo de emulsión (Rosseau y Hodge, 2005). Así, en la fase dispersa (i.e., emulsiones O/W), los

cristales de grasa pueden incrementar la desestabilización de la emulsión (Rosseau, 2000). Pero, la presencia de cristales de grasa en la fase continua (i.e., emulsión W/O), estabiliza la emulsión ya sea: (1) entrando en contacto con la interfase y adsorbiéndose en la superficie de la gota (Aronson, 1991); (2) originándose mediante la solidificación de los emulsificantes en la interfase [predominantemente monoacilglicéridos (MAGs)] y/o mediante la migración de cristales previamente formados hacia la interfase (Friberg, 1997); o (3) vía cristalización de la fase continua, formando una red tridimensional de cristales de grasa capaz de retardar el movimiento de las gotas de agua (McClements, 2015; Ghosh y Rosseau, 2011; Rosseau y Hodge, 2005). Por lo anterior, esta red cristalina juega un rol importante en la determinación de las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del alimento (Chung y McClements, 2014).

### **2.3.1. Emulsiones agua en aceite W/O**

Existen diversos productos en el área de los alimentos que están compuestos por emulsiones W/O, tales como mantequilla, margarina, productos untables, vinagreta y algunos aderezos.

El mecanismo de estabilización de estas emulsiones difiere del de las emulsiones O/W, las cuales pueden ser estabilizadas por repulsión tanto estérica como electrostática (Ushikubo y Cunha, 2014); mientras que en el caso de las emulsiones W/O, se espera que solamente las fuerzas estéricas estabilicen la emulsión, debido a la baja conductividad de la fase continua (Claesson y col., 2004). De hecho, la mayoría de las emulsiones W/O se encuentran en un estado sólido o semisólido (ej., margarinas y productos untables), lo que previene la sedimentación de las gotas de agua mediante la formación de una red tridimensional de grasa (McClements, 2015; Rousseau, 2000). Además, las propiedades fisicoquímicas también son importantes para la formación y estabilidad de la emulsión W/O; así, por ejemplo, (1) la densidad es decisiva en la estabilidad a la sedimentación, ya que la separación gravitacional entre la fase continua y la fase dispersa se debe a la diferencia de sus densidades (Berton-Carabin y Schroën, 2019), (2) la viscosidad

tiene influencia en la movilidad de las gotas de agua, en donde las emulsiones fluidas W/O generalmente presentan una baja estabilidad debido a la alta movilidad de las gotas de agua, que pueden sedimentar, flocular o coalescer fácilmente (Ushikubo y Cunha, 2014), y (3) la polaridad del aceite puede afectar el tiempo de cristalización de la emulsión, ya que el tiempo de cristalización tiende a disminuir con la disminución de la polaridad relativa del aceite (Masalova y col., 2018).

### **2.3.2. Emulsiones agua en aceite W/O reducidas en grasa**

Actualmente, existe un fuerte enfoque de la industria alimentaria en el desarrollo de productos reducidos en grasa debido a los temas de salud asociados con dietas altas en calorías, como sobrepeso, obesidad, enfermedades del corazón, hipertensión y diabetes (Chung y col., 2013; Lee y col., 2013). Sin embargo, los alimentos reducidos en grasa frecuentemente comprometen los atributos fisicoquímicos y la calidad sensorial de los alimentos, provocando una limitada aceptación del consumidor (McClements, 2015; Bayarri y col., 2006). Lo anterior, debido a que la grasa juega múltiples roles en la determinación de las propiedades fisicoquímicas de los alimentos, particularmente cuando se encuentran emulsificados (Chung y col., 2013).

Debido a lo anterior, el uso de emulsificantes tradicionales, tales como monoacilglicéridos y diacilglicéridos, es uno de los métodos más utilizados para mejorar la estabilidad de las emulsiones (Dickinson, 2009; Dalglish, 2006). Sin embargo, otros medios han sido propuestos para mejorar su estabilidad, en conjunto con el uso de emulsificantes. Así, diversos estudios han demostrado ventajas del uso de hidrocoloides en la estabilidad de emulsiones como agentes emulsificantes (Cui y Chang, 2014), disminución del diámetro de las gotas (Desplanques y col., 2012; Huang y col., 2001) y reducción de la tensión interfacial (Huang y col., 2001).

### **2.4. Uso de hidrocoloides en emulsiones alimentarias**

Los hidrocoloides, tales como pectinas, gomas, carrageninas y celulosa, son biopolímeros de alto peso molecular usados ampliamente como ingredientes en la

industria de los alimentos como espesantes y gelificantes de soluciones acuosas (Saha y Bhattacharya, 2010; Philips y Williams, 2009), como agentes emulsificantes en emulsiones y dispersiones (Cui y Chang, 2014; Desplanques y col., 2012; Dickinson, 2009), entre otros.

Por ejemplo, la pectina es utilizada en una gran variedad de alimentos, debido a que puede actuar como agente emulsificante y estabilizante, contribuye a la actividad interfacial y aumenta la viscosidad, utilizándose en concentraciones desde 0.1 y hasta 8.0% p/p, de acuerdo con lo reportado por Massel y col. (2015), Cui y Chang (2014), Gülseren y Corredig (2014), Ayuningtias y col. (2013) y Fissore y col. (2013).

Por otro lado, es bien sabido que las gomas, como la goma xantana, forman soluciones viscosas, actúan como mejoradores de textura e incluso pueden actuar también como agentes emulsificantes y estabilizantes (Milani y Maleki, 2012; Gurkin, 2002). Particularmente, las soluciones formadas con goma xantana son altamente pseudoplásticas y tienen una viscosidad muy alta (Viebke y Williams, 2000; Katzbauer, 1998), por lo que esta goma es comúnmente añadida a emulsiones O/W para mejorar la viscosidad de la fase continua y retardar el cremado en concentraciones desde 0.01 y hasta 0.2%, de acuerdo con lo reportado por Krstonošić y col. en 2009.

A pesar de la gran variedad de estudios sobre el empleo de hidrocoloides en emulsiones, sólo dos investigaciones han sido encontradas en productos aplicados como margarinas (Ayuningtias y col., 2013; Clegg y col., 1996). Además, actualmente no existen estudios que utilicen agentes estabilizantes tanto en la fase oleosa como en la fase acuosa (i.e., promotor de la cristalización e hidrocoloides, respectivamente), de emulsiones como margarinas y productos untables, con el fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas.

### **2.5. Margarinas**

Las margarinas se definen como emulsiones W/O, en donde las gotas de agua se mantienen separadas por una red tridimensional que contiene aceite líquido y

cristales de grasa (Riego y Gómez, 1988b; Haighton, 1976). La mayoría de las margarinas, que tradicionalmente contienen un 80% de grasa (Codex Alimentarius, 1981), se encuentran ya sea en estado sólido o semisólido a temperatura ambiente (25 °C) y están estabilizadas mediante la cristalización de la grasa (McClements, 2015).

Durante la formulación de la base grasa (mezcla de grasas y aceites) de las margarinas, es conveniente incluir aceites con tendencia a cristalizar en  $\beta'$ , ya que este cristal tiende a estructurarse como una red tridimensional capaz de inmovilizar grandes cantidades de aceite líquido, brindándole a la margarina la consistencia y la dureza deseadas (Liu y col., 2010; Tanaka y col., 2007). Tradicionalmente, estas propiedades habían sido logradas con el uso de aceites parcialmente hidrogenados; sin embargo, al constituir una fuente de isómeros *trans* en la dieta, tienen efectos adversos en la salud tales como elevar el nivel de colesterol LDL en la sangre y aumentando el riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas (FDA, 2013; FAO, 1993). Debido a esto, la industria margarina ha buscado fuentes alternativas de grasas y/o aceites que le otorguen a éstas las propiedades fisicoquímicas deseadas pese al cambio en su composición, pero cuidando la salud del consumidor. Un caso particular es el aceite de palma y su fracción sólida conocida como estearina de palma, la cual es obtenida por fraccionamiento, sin necesidad de hidrogenar.

Adicionalmente, la base grasa debe ser formulada de acuerdo con el tipo de margarina que se desee producir. Así, se han originado diversos tipos de margarinas que se clasifican de acuerdo con sus características físicas, nutricionales y de aplicación o funcionalidad. Al respecto, en la Tabla 2.1 se puede observar una amplia clasificación de las margarinas, en donde se destaca la margarina de panificación, cuyas características son: (1) contenido de grasa mínimo del 60%, (2) punto de fusión de entre 38 y 42 °C, (3) gran capacidad de integración en la masa y (4) otorgarle homogeneidad a la miga (IMASA, 2020).

**Tabla 2.1.** Clasificación de las margarinas en base a sus características físicas, nutricionales y de aplicación (O'Brien, 2009; Vaisey-Genser, 2003).

<b>Clasificación</b>	<b>Margarina</b>
Por tipo de consumidor	Consumidor directo (uso doméstico) Industrial
Por contenido de grasa	Para mesa (mínimo 78%) Reducida en grasa (60-78%) Light (menos de 60%)
Por contenido de sal	Sin sal (máximo 0.5%) Con sal (más de 0.5%)
Por consistencia	Plástica o semisólida Suave Fluida
Por funcionalidad	Untable En barra Para panificación



### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la tendencia actual de la industria alimentaria de reducir la cantidad de grasa en los alimentos debido a los temas de salud asociados con dietas altas en calorías (Chung y col., 2013; Lee y col., 2013; Nehir El y Simsek, 2012; van Kleef y col., 2012), se ha producido una pérdida en su estructura, estabilidad y funcionalidad. Lo anterior, debido a que la grasa juega múltiples roles en la determinación de las propiedades fisicoquímicas de los alimentos, particularmente cuando se encuentran emulsificados (Chung y col., 2013). Aunado a lo anterior y, a pesar de que es ampliamente utilizado en la industria alimentaria, el aceite de palma tiene una cinética de cristalización lenta y tiende a la post-dureza en el almacenamiento; por lo que dicha industria se ha dado a la tarea de diseñar nuevos ingredientes que actúen como estabilizantes en grasas de panificación y emulsiones y que mejoren así sus propiedades fisicoquímicas finales.

Adicionalmente, se sabe que los hidrocoloides, añadidos en la fase acuosa, pueden actuar también sobre la estabilidad de las emulsiones (Cui y Chang, 2014; Desplanques y col., 2012; Huang y col., 2001). Sin embargo y a pesar del gran número de estudios sobre el empleo de estabilizantes en productos ricos en grasa (ej., Peyronel y col., 2016; Ribeiro y col., 2013a; Arishima y McBrayer, 2002) e hidrocoloides en emulsiones alimentarias, no han sido encontradas investigaciones que utilicen ambos componentes para estabilizar tanto la fase oleosa como la fase acuosa en emulsiones W/O, como las margarinas. Por lo anteriormente expuesto, surge la necesidad de investigar el efecto de la adición de un estabilizante alto en ácido behénico (HBS) en la fase oleosa en concentraciones dentro del rango sugerido por la hoja técnica para su aplicación industrial (0.2-2.0% p/p; partiendo de la mínima concentración por sugerencia del proveedor), así como de un hidrocoloide, ya sea pectina de alto metoxilo o goma xantana (0.2% p/p), en la fase acuosa en la formulación de emulsiones W/O, con el fin de mejorar la estructura de ambas fases en una emulsión W/O reducida en grasa (W/O 35/65) a base de aceite de palma para su aplicación como margarina de panificación.

### 4. HIPÓTESIS

La adición de una concentración igual o menor a 0.9% p/p de un estabilizante alto en ácido behénico en la fase oleosa y de 0.2% p/p de un hidrocoloide (pectina de alto metoxilo o goma xantana) en la fase acuosa mejoran la cinética de cristalización y la estabilidad fisicoquímica de una emulsión W/O reducida en grasa y a base de aceite de palma para su aplicación como margarina de panificación.

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de la adición de un estabilizante alto en ácido behénico (HBS) en la fase oleosa y de la adición de pectina de alto metoxilo y goma xantana en la fase acuosa sobre las propiedades fisicoquímicas de una emulsión W/O reducida en grasa (W/O 35/65) elaborada a base de aceite de palma.

#### 5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar composicional y térmicamente la fase oleosa y el estabilizante alto en ácido behénico (HBS).
- Estudiar el efecto de la adición de 0.3, 0.6 y 0.9% p/p del estabilizante alto en ácido behénico (HBS) en la fase oleosa sobre el comportamiento térmico, la microestructura y el contenido de sólidos grasos de una emulsión W/O reducida en grasa. Así, seleccionar la concentración mejor evaluada al ser comparada con una emulsión tradicional W/O elaborada con 80% de grasa.
- Evaluar el efecto de la adición de 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo y goma xantana en la fase acuosa de la emulsión W/O reducida en grasa adicionada con HBS sobre sus propiedades fisicoquímicas, tales como comportamiento térmico, tensión interfacial, contenido de sólidos grasos y dureza. Asimismo, comparar los resultados con aquéllos obtenidos en una emulsión tradicional W/O elaborada con 80% de grasa.
- Evaluar el efecto de la concentración mejor evaluada de HBS y de la pectina de alto metoxilo y la goma xantana sobre las propiedades fisicoquímicas de margarinas de panificación, mediante contenido de sólidos grasos, dureza y resistencia térmica.

### 6. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 6.1. Materiales

Para fines prácticos de la presente investigación y aunque el concepto es el mismo, fue denominada emulsión W/O a aquella elaborada a nivel laboratorio y margarina de panificación a aquella elaborada a nivel piloto.

Los materiales utilizados en ambos sistemas, en porcentaje peso/peso (p/p) del total de la emulsión, fueron los siguientes:

(1) Una fase oleosa, correspondiente al 65% de la emulsión, que consistió en (a) una base grasa a base de aceite de palma (60% de aceite de palma, 25% de estearina de palma y 15% de aceite de palmiste), con un balance final de 59/41% de ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados; (b) una mezcla de tres emulsificantes: 0.5% de lecitina de soya, 0.5% de monoacilglicéridos de ácidos grasos insaturados de aceite de colza (código comercial DMG0291) y 0.3% de monoacilglicéridos de ácidos grasos saturados de aceite de palma (código comercial DMG0093); y (c) un estabilizante alto en ácido behénico (HBS, código comercial P6111) en concentraciones de 0.0, 0.3, 0.6 y 0.9%.

(2) Una fase acuosa, correspondiente al 35% de la emulsión, fue elaborada con agua potable adicionada de 1% de cloruro de sodio, 0.2% de cualquiera de los hidrocoloides: pectina de alto metoxilo o goma xantana y 0.05% de cada uno los siguientes componentes: ácido cítrico, benzoato de sodio y sorbato de potasio. Adicionalmente, fue considerada una fase acuosa control sin adición de pectina de alto metoxilo ni goma xantana.

Los hidrocoloides empleados en la formulación de la fase acuosa fueron adquiridos de la empresa *Danisco México, S.A. de C.V.* y el resto de los ingredientes fue amablemente provisto por *Palsgaard Industri de México, S. de R.L. de C.V.* Esta empresa también facilitó sus instalaciones para la elaboración de las margarinas de panificación.

### 6.2. Preparación de las fases oleosa y acuosa y las emulsiones W/O

Muestras de 100 gramos de la fase oleosa control (sin HBS añadido) y de las fases oleosas con diferentes concentraciones de HBS (0.3, 0.6 y 0.9%) fueron pesadas en vasos de precipitado de 150 mL para ser fundidas en una placa caliente a 75 °C con una agitación magnética de 400 rpm durante 10 minutos para eliminar su memoria térmica. Las cuatro fases oleosas se sometieron luego a un enfriamiento controlado por inmersión en dos baños de agua en secuencia, ajustados a 2 y -6 °C respectivamente. Las muestras se retiraron del primer baño de agua cuando su temperatura alcanzó los 22 °C y se transfirieron rápidamente al segundo baño de agua, manteniéndose ahí hasta que su temperatura interna alcanzó los 12 °C. En ambos baños de enfriamiento, fue aplicada agitación manual para favorecer la cristalización homogénea de la muestra. Al final del enfriamiento controlado, las muestras fueron almacenadas a 18 °C para su estabilización y todos los experimentos fueron llevados a cabo después de 72 horas de almacenamiento.

Para la elaboración de las emulsiones W/O, las fases acuosas precalentadas a 75 °C fueron añadidas a la fase oleosa previamente preparada a la misma temperatura, aplicando una agitación magnética de 700 rpm por 10 minutos para favorecer la formación de la emulsión. Posteriormente, fueron seguidos los mismos procesos de enfriamiento y almacenamiento a 18 °C indicados en la preparación de las fases oleosas para su análisis después de 72 horas. Cabe mencionar que las emulsiones adicionadas con pectina de alto metoxilo o goma xantana en su fase acuosa, fueron elaboradas con la fase oleosa añadida de la concentración de HBS mejor evaluada.

Bajo las mismas condiciones de proceso, fue elaborada una emulsión W/O 80/20 considerada como emulsión tradicional, con el fin de comparar las propiedades fisicoquímicas evaluadas en las emulsiones W/O reducidas en grasa.

### 6.3. Preparación de las margarinas de panificación

Para la elaboración de las margarinas de panificación, se tomó como control aquella con la fase oleosa adicionada de la concentración de HBS mejor evaluada

y la fase acuosa sin hidrocoloide añadido. Adicionalmente, fueron elaboradas aquéllas cuya fase acuosa esté adicionada con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana.

El proceso de elaboración de las margarinas de panificación se desarrolló de la siguiente manera. Inicialmente, la base grasa fue preparada de acuerdo con la formulación indicada en la Sección 6.1. Posteriormente, pasó a un tanque de preparación donde fue elaborada la fase oleosa a 75 °C. A la par, la fase acuosa fue formada en otro tanque de preparación a la misma temperatura (ver Sección 6.1 para composición de ambas fases). En seguida, ambas fases fueron mezcladas en otro tanque con agitación constante donde fue formada la emulsión W/O, que se logró añadiendo la fase acuosa a la fase oleosa. Ya formada, ésta pasó a un primer cristizador de un equipo de cristalización Perfector 57 (Gerstenberg Schröder, SPX FLOW, Alemania), utilizando un flujo másico de alimentación de 60 kg/h, donde la emulsión se enfrió y cristalizó hasta alcanzar los 22 °C. Posteriormente, la emulsión pasó por un segundo cristizador, donde alcanzó una temperatura interna de 12 °C; para después circular a través de un tubo de reposo, a temperatura ambiente, donde tomaron las características de consistencia y dureza deseadas. Finalmente, las margarinas (6x15x6 cm; volumen de 540 cm<sup>3</sup>), fueron empacadas y almacenadas a 18 °C por 72 horas para su estabilización. Después de este tiempo, fueron determinados su contenido de sólidos grasos y su dureza a 18 °C, así como su estabilidad térmica, representada como sinéresis, a 40 °C.

### **6.4. Métodos**

Perfil de triacilglicéridos (TAGs). Un cromatógrafo de fases equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar B-17HT (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, E.U.A.) fue utilizado para elucidar el perfil de TAGs de la fase oleosa control y el HBS. Fue seguida una versión modificada del Método Oficial AOCS Ce 5-86 (AOCS, 2009); en donde la temperatura inicial de la columna fue fijada en 200 °C, para luego ser aplicadas dos rampas de calentamiento: la

primera a 300 °C a una velocidad de 25 °C/min y la segunda a 350 °C a 30 °C/min. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 360 y 370 °C, respectivamente. Las muestras se disolvieron en cloroformo (20 mg/mL) y la inyección fue hecha en modo split en una proporción 50:1. Estándares de TAGs (Supelco) fueron inyectados en el cromatógrafo para identificar el tiempo de retención de cada TAG y fue utilizado el software ChemStation (Rev. B.04.02, Agilent Technologies) para el análisis de las muestras. La identificación fue llevada a cabo utilizando el número total de carbonos para aquellos TAGs con menos de 50 carbonos. Para los TAGs con un número total de carbonos igual o superior a 50, fue asumida una distribución aleatoria de los ácidos grasos en la molécula de glicerol, siguiendo el método directo de composición posicional reportado por Vander Wal (1963). Este análisis fue realizado con dos réplicas por duplicado.

Comportamiento térmico. El perfil de cristalización y fusión del estabilizante HBS y los perfiles de cristalización de las fases oleosas y las emulsiones W/O formadas con ellas y con la fase acuosa adicionada de pectina de alto metoxilo o goma xantana, fueron determinados con un calorímetro diferencial de barrido (DSC 2920, TA Instruments, New Castle, DE, EUA) siguiendo el Método Oficial AOCS Cj 1-94 (AOCS, 2009). El método utilizado consistió en enfriar la muestra desde 80 °C hasta -40 °C a 10 °C/min (previo borrado de memoria térmica a 80 °C por 10 minutos), mantenerla a -40 °C por 30 minutos y, después, calentar hasta 80 °C a una velocidad de 5 °C/min. Fueron pesados entre 6 y 9 mg de muestra en una celda de aluminio (TA Instruments) sellada herméticamente. Fue utilizada una celda vacía como referencia. Para el análisis, fue utilizado el software TA Universal Analysis, obteniéndose los siguientes parámetros: la temperatura de inicio de la cristalización ( $T_{\text{onset}}$ ), la temperatura del pico de cristalización ( $T_c$ ) y de fusión ( $T_m$ ) (para ambos casos, el número en el subíndice indica el número de exoterma o endoterma en el termograma), y las entalpías de transición de fase correspondientes de cristalización y de fusión ( $\Delta H_c$  o  $\Delta H_m$ , respectivamente). El análisis de comportamiento térmico fue realizado con dos réplicas por duplicado.

Microestructura. Las emulsiones W/O 35/65 cuya fase oleosa fue adicionada con 0.0, 0.3, 0.6 y 0.9%, así como la emulsión W/O tradicional (20/80), fueron analizadas mediante microscopía de luz polarizada. Los frotis fueron realizados en portaobjetos de vidrio para posteriormente ser colocados en un microscopio de luz polarizada (Eclipse LV100 NPOL, Nikon Instruments, Melville, NY, EUA) y captar las imágenes (MicroPublisher 3.3. RTV, QImaging) de los cristales desarrollados en las emulsiones previamente estabilizadas a 18 °C durante 72 horas. Las imágenes fueron utilizadas para obtener el número y el diámetro equivalente de los cristales, así como el porcentaje de material sólido (blanco versus negro), utilizando el software NIS Elements AR 4.30 (Nikon Instruments). Las imágenes fueron umbralizadas (ImageJ, NIH Image) y analizadas con el software Benoit 1.3 (TruSoft International Inc.) para obtener su dimensión fractal bidimensional  $D_f$  mediante el método de conteo de cajas. Dos réplicas por duplicado fueron analizadas para el estudio de la microestructura.

Tensión interfacial. Un tensiómetro interfacial Du Nuoy (Modelo 70545, CSC Scientific Company Inc., Fairfax, VA, EUA) para determinar la tensión interfacial estática  $\gamma$  entre la fase oleosa con la concentración de HBS mejor evaluada y las fases acuosas control y adicionada con pectina de alto metoxilo o goma xantana. La fase oleosa y las fases acuosas se mantuvieron a 75 °C (temperatura de formación de la emulsión W/O) previo al análisis en un horno con control automático de temperatura. Fueron colocados 28 mL de la fase acuosa en un recipiente de vidrio (70x50 mm), el cual se colocó en el brazo de la palanca del equipo y fue colocado el anillo Du Nuoy de tal manera que quedara completamente cubierto por la fase acuosa. Posteriormente, se colocaron 62 mL de la fase oleosa, manteniendo la temperatura a 75 °C. La medida consistió en registrar la fuerza necesaria, en dinas/cm, para retirar el anillo Du Nuoy hacia arriba de la interface de ambos líquidos. El análisis de tensión interfacial fue realizado con dos réplicas por triplicado.



Contenido de sólidos grasos (SFC). Un espectrómetro Minispec mq20 de 4000 Hz (Bruker Optics, Billerica, MA, EUA) fue utilizado para medir el SFC de todas las emulsiones W/O y las margarinas de panificación por resonancia magnética nuclear. Para todas las mediciones, el *daily check* fue realizado cada 24 horas con tres estándares de calibración suministrados por Bruker. Las emulsiones almacenadas a 18 °C se colocaron en tubos de vidrio de 10 mm de diámetro hasta alcanzar 4 cm de altura, para luego ser analizadas. Los valores de las mediciones fueron capturados con el software del espectrómetro (Minispec V1.13, Bruker Biospin). Este análisis fue realizado con dos réplicas, cada una por triplicado.

Dureza. Para determinar la dureza de las emulsiones W/O 35/65 adicionadas de pectina de alto metoxilo o goma xantana en su fase acuosa, así como de la emulsión W/O tradicional (W/O 20/80), fue utilizado un texturómetro TA.XT2 (Stable MicroSystems), mediante el método de *back extrusion*. Para medir la dureza, las muestras a 18 °C fueron colocadas en tubos de vidrio de 10 cm de altura y 2.5 cm de diámetro y fue utilizada una sonda de acero inoxidable con un eje cilíndrico (9.8 cm de altura y 1.8 cm de diámetro) y una punta esférica truncada (1.3 cm de altura y 2.0 cm de diámetro) para penetrar 30 mm de muestra a una velocidad de 1.5 mm/s, con una duración total de la prueba de 20 s. El resultado de dureza, en términos de fuerza (N), fue obtenido mediante el software del equipo (Exponent Lite Express) y correspondió al promedio de los datos del último cuarto del análisis (15-20 s). Por otro lado, la dureza de las margarinas de panificación fue obtenida en un texturómetro TA.XT Plus (Stable MicroSystems) con la cuchilla rectangular y la plataforma del set Warner-Bratzler (HDP/BSK). El resultado de dureza fue obtenido mediante el software *Exponent Lite Express* y correspondió a la carga máxima registrada por el equipo. Para el estudio de dureza, dos réplicas por triplicado fueron analizadas.

Estabilidad térmica. Para determinar la estabilidad térmica de las margarinas de panificación, las barras de margarina fueron colocadas en una incubadora

*Thermolyne* Type 42000 a 40 °C durante 72 horas, simulando condiciones extremas de almacenamiento. Una vez finalizado el tiempo de almacenamiento, el volumen de muestra fundida, en mL, fue medido con una probeta y calculado el porcentaje de sinéresis en base al volumen total de cada sistema ( $V_{\text{total}}$ : 540 cm<sup>3</sup>), obtenido de multiplicar la longitud, la altura y la profundidad, en centímetros, de la margarina (1 cm<sup>3</sup> = 1 mL). Este análisis fue realizado con dos réplicas por triplicado.

### 6.5. Análisis estadístico

Las muestras fueron seleccionadas al azar y los resultados fueron procesados con el software STATISTICA V.12 (Statsoft Inc.; Tulsa, OK 74101, E.U.A.). Fue realizado un ANOVA de una vía con contrastes ortogonales y un nivel de significancia de 0.05. Las muestras y sus respectivas réplicas fueron analizadas y reportadas sus medias  $\pm$  desviaciones estándar.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Adición de HBS a la fase oleosa de la emulsión W/O

#### 7.1.1. Perfil de triacilglicéridos

El perfil de triacilglicéridos (TAGs) de la fase oleosa control (sin HBS añadido) y del estabilizante alto en ácido behénico (HBS) se muestra en la Tabla 7.1. Los valores de temperatura de fusión ( $T_m$ ) de TAGs de aceite de palma y sus derivados reportados por Kim y Marangoni (2017), fueron utilizados para agrupar los TAGs en moléculas con alto ( $HMT > 30\text{ °C}$ ), medio ( $18\text{ °C} < MMT < 30\text{ °C}$ ) y bajo punto de fusión ( $LMT < 18\text{ °C}$ ).

Los HMT predominantes en la fase oleosa control fueron TAGs di- y trisaturados, tales como POP/PPO, PPP y POS/PSO, los cuales representaron el 51.8% p/p del total de TAGs. Los MMT mono-, di- y trisaturados, como PPL y SOO, constituyeron el 14.7% p/p del total de TAGs de la fase oleosa. Finalmente, el 26.9% p/p de la fase oleosa estuvo compuesto por LMT, principalmente POO y PLO. Es bien sabido que estos TAGs son predominantes en el aceite de palma y sus derivados (Nor Aini y Miskandar, 2007).

Los TAGs presentes en el HBS fueron trisaturados, con moléculas con 52 o más carbonos como BBS, SSS, BSA, SSB, BSP y PSS. Estas moléculas de cadena larga con temperaturas de fusión superiores a los  $50\text{ °C}$  (Kim y Marangoni, 2017) podrían ser las responsables de mejorar la cristalización del sistema, al interactuar con los TAGs di- y trisaturados de la fase oleosa elaborada a base de aceite de palma.

#### 7.1.2. Comportamiento térmico

Los perfiles de cristalización y fusión del HBS se muestran en la Figura 7.1. Una exoterma de cristalización fue detectado en  $T_c$ :  $51.6\text{ °C}$  con una entalpía de cristalización  $\Delta H_c$  de  $132.4\text{ J/g}$  y una endoterma de fusión en  $T_m$ :  $58.7\text{ °C}$  con una entalpía de fusión  $\Delta H_m$  de  $132.1\text{ J/g}$ . Estos resultados coinciden con la composición de TAGs del HBS (Tabla 7.1), dado que este estabilizante está principalmente compuesto de moléculas trisaturadas con 52 o más carbonos y temperaturas de fusión por encima de  $50\text{ °C}$ .

**Tabla 7.1.** Composición de triacilglicéridos (TAGs) de la fase oleosa y del estabilizante alto en ácido behénico (HBS).

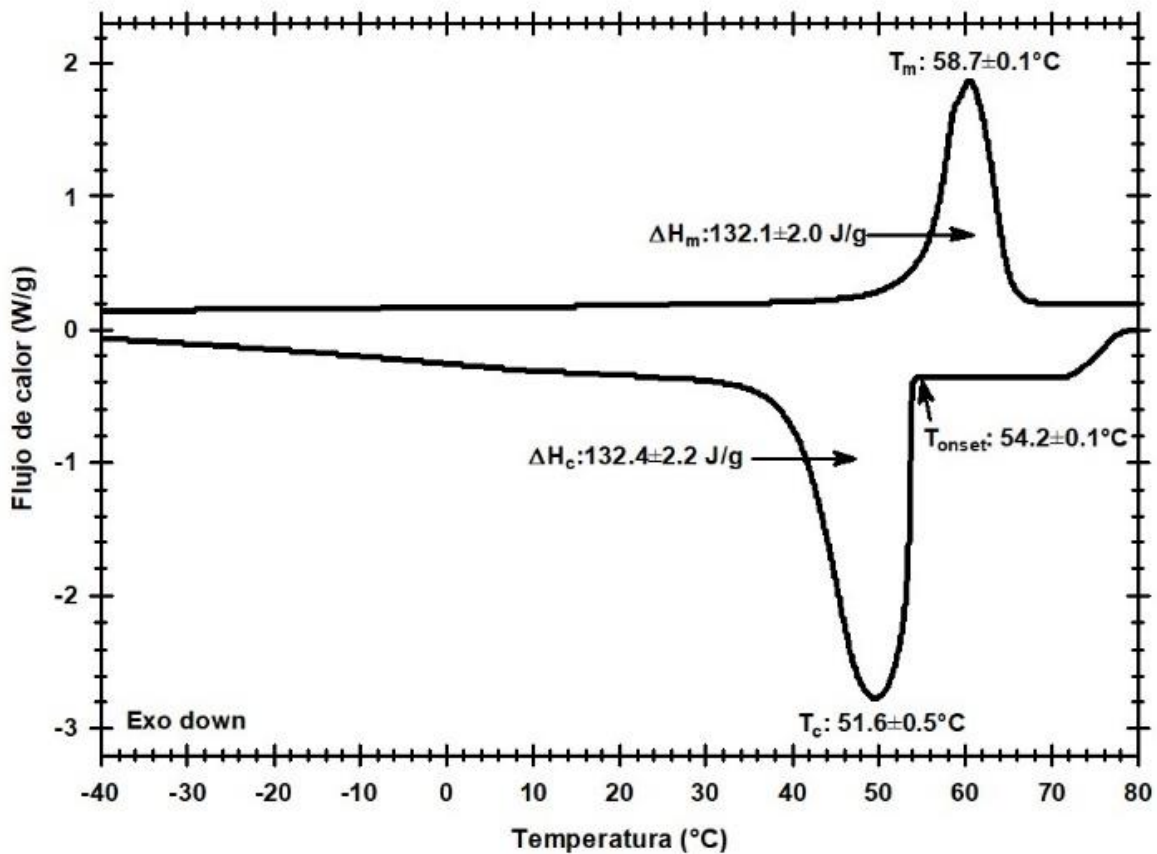
Número de carbonos <sup>a</sup>	TAGs <sup>b</sup>	Composición (% p/p) <sup>*</sup>	
		Fase oleosa control	HBS
32	CLaLa	1.9±0.1	-
36	LaLaLa	4.6±0.3	-
40	LaMM	3.6±0.3	-
42	MMM	0.7±0.1	-
42	LaLaO	0.6±0.1	-
44	LaOM	0.7±0.1	-
46	MMO	0.7±0.1	-
48	PPP	7.9±0.4	-
48	MPL	1.5±0.1	-
50	PPS	1.9±0.1	-
50	POP/PPO	25.7±0.1	-
50	PPL	6.5±0.3	-
52	PSS	-	4.8±0.7
52	POS/PSO	5.0±0.3	-
52	POO	18.0±0.9	-
52	PLO	6.5±0.3	-
52	PLL	1.2±0.0	-
54	SSS	0.5±0.1	19.4±1.6
54	SOS	1.9±0.2	-
54	SOO	2.8±0.3	-
54	OOO	1.2±0.1	-
56	BSP	-	16.3±0.5
58	SSB	-	16.5±0.3
60	BSA	-	18.0±1.1
62	BBS	-	25.0±1.4
<b>SSS</b>	-	<b>21.1±0.4</b>	<b>100.0±1.6</b>
<b>SUS-SSU</b>	-	<b>42.6±0.3</b>	-
<b>SUU</b>	-	<b>28.5±0.9</b>	-
<b>UUU</b>	-	<b>1.2±0.1</b>	-

C: Caprílico; La: Láurico; M: Mirístico; P: Palmítico; S: Esteárico; O: Oleico, L: Linoleico; A: Araquídico; B: Behénico; SSS: Saturado-Saturado-Saturado; SUS: Saturado-Insaturado-Saturado; SSU: Saturado-Saturado-Insaturado; UUU: Insaturado-Insaturado-Insaturado.

<sup>\*</sup>Media±desviación estándar, *n*=2

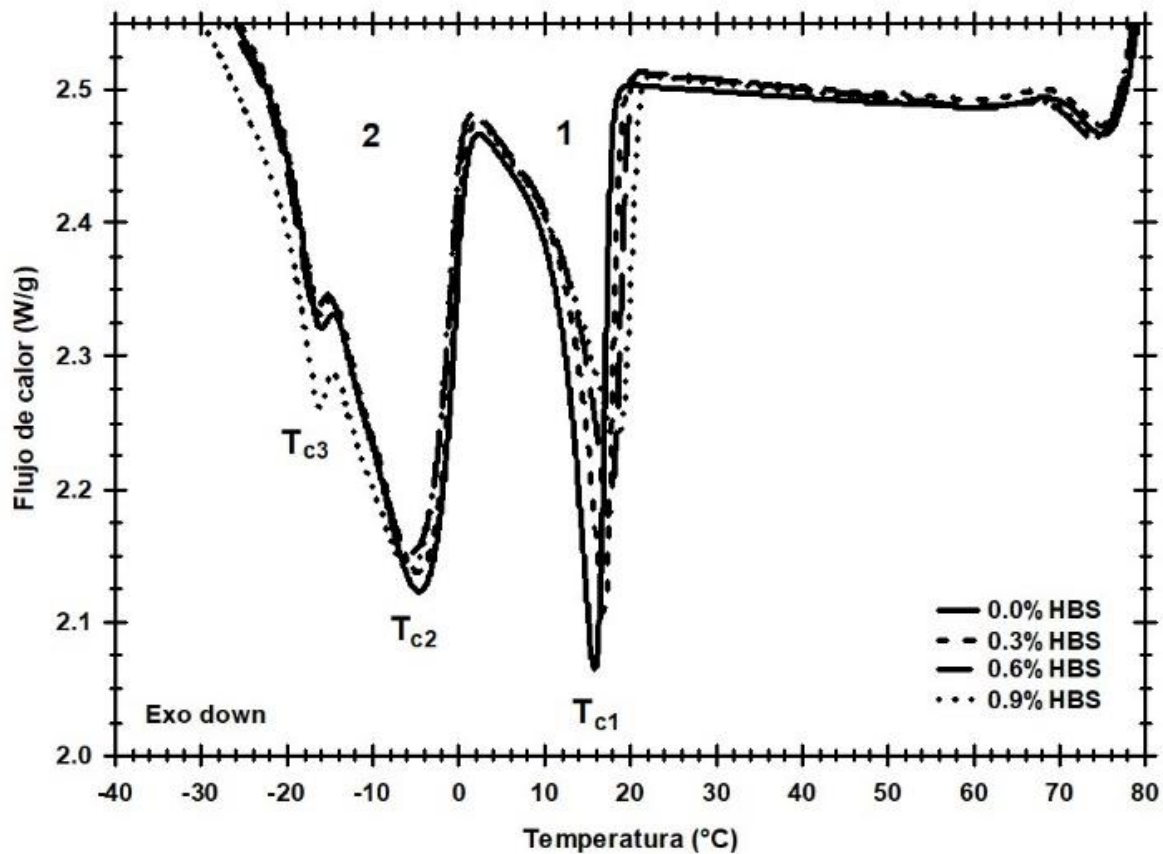
<sup>a</sup>Determinado experimentalmente por cromatografía de gases.

<sup>b</sup>Triacilglicerol más probable, asumiendo una distribución aleatoria de los ácidos grasos en la molécula de glicerol.



**Figura 7.1.** Perfil de cristalización y de fusión del estabilizante alto en ácido behénico (HBS).

El perfil de cristalización de la fase oleosa adicionada con diferentes concentraciones de HBS se muestra en la Figura 7.2. En todas las muestras, fueron evidentes dos regiones exotérmicas, indicadas como 1 y 2 (Figura 7.2A). La región exotérmica 1 tuvo un pico distintivo denotado como  $T_{c1}$  y la región exotérmica 2 tuvo dos picos distintivos denotados como  $T_{c2}$  y  $T_{c3}$ . Con base en la posición de los picos de cristalización, la región exotérmica 1 se debe a los TAGs de alto y medio punto de fusión, tales como POP/PPO, PPP, PPL y POS; mientras que la región exotérmica 2 se debe a los TAGs de bajo punto de fusión, como POO y PLO (Tan y Nehdi, 2012). La región exotérmica 2 no mostró cambios significativos en los valores de temperatura  $T_{c2}$  y  $T_{c3}$  entre la fase oleosa control y las fases oleosas adicionadas con HBS, con valores promedio de  $\overline{T_{c2}}$ :  $-4.1 \pm 0.1$  °C y  $\overline{T_{c3}}$ :  $-16.1 \pm 0.2$  °C ( $P > 0.05$ ). Asimismo, la entalpía de cristalización en la región exotérmica 2 fue de  $\overline{\Delta H_{c2}}$ :  $28.3 \pm 1.2$  J/g para las cuatro muestras ( $P > 0.05$ ).



**Figura 7.2.** Perfil de cristalización de la fase oleosa de la emulsión W/O 35/65 en función de la concentración de estabilizante alto en ácido behénico (HBS).

A pesar de que la entalpía se mantuvo constante en la región exotérmica 1 ( $\overline{\Delta H_{c1}}$ :  $13.5 \pm 1.3$  J/g;  $P > 0.05$ ), los cambios en la cinética de cristalización debido a la adición de HBS ocurrieron al verse incrementadas significativamente las temperaturas onset ( $T_{onset}$ ) y del primer pico ( $T_{c1}$ ). A este respecto,  $T_{onset}$  y  $T_{c1}$  aumentaron desde  $17.9 \pm 0.3$  °C y  $16.1 \pm 0.3$  °C hasta  $21.4 \pm 0.2$  °C y  $19.0 \pm 0.2$  °C para la fase oleosa control y la fase oleosa con 0.9% p/p de HBS añadido, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Estos cambios pueden atribuirse a la co-cristalización entre el HBS y los HMT de la fase oleosa a base de aceite de palma, de acuerdo con investigaciones realizadas por Kim y Marangoni (2017) y Peyronel y col. (2016). Estos autores propusieron que el HBS actúa como una semilla heterogénea para TAGs saturados tales como PPP y SSS, ambos presentes en la fase oleosa en concentraciones de 7.9 y 0.5% p/p,

respectivamente, cristalizando primero y sirviendo como una superficie sobre la que cristalizarían estos TAGs. Particularmente, Peyronel y col. (2016) establecieron también una posible relación entre la prevención de la pérdida de aceite del sistema graso con el aumento en la  $T_{onset}$  y  $T_{c1}$ , correspondientes a la región exotérmica donde ocurrió la cristalización de los HMT. De esta manera, la adición de HBS en concentraciones de hasta 0.9% p/p estaría brindándole una mejor estructuración al sistema, al propiciar el comienzo de la cristalización a una temperatura más alta.

La Figura 7.3 muestra el perfil de cristalización de las emulsiones control y con HBS adicionado a su fase oleosa en concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.9% p/p; en donde las tres regiones exotérmicas de cristalización observadas fueron denotadas como 1, 2 y 3. Las regiones exotérmicas 1 y 2 incluyeron los picos  $T_{c1}$ ,  $T_{c2}$  y  $T_{c3}$  y fueron asociadas con la cristalización de los TAGs presentes en la fase oleosa a base de aceite de palma (Figura 7.3B), conforme al comportamiento de cristalización de la fase oleosa mostrado en la Figura 7.2. La región exotérmica 3 fue asociada a la cristalización de la fase acuosa en concordancia con lo reportado por Nor Hayati y col. (2009), mostrando la misma temperatura del pico de cristalización para todas las emulsiones  $\overline{T}_{c4}$ :  $-19.4 \pm 2.3$  °C ( $P > 0.05$ ).

Al igual que en la fase oleosa, la adición de HBS modificó la cinética de cristalización de la región exotérmica 1 de la emulsión, al incrementar las temperaturas  $T_{onset}$  y  $T_{c1}$ . Así, la  $T_{onset}$  aumentó de  $19.7 \pm 0.2$  °C a  $21.7 \pm 0.1$  °C y la  $T_{c1}$  de  $18.3 \pm 0.3$  °C a  $19.3 \pm 0.3$  °C en las emulsiones sin y con 0.9% p/p de HBS, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Dicho incremento en  $T_{onset}$  y  $T_{c1}$  de la emulsión W/O ocurrió en menor grado en comparación al observado en la fase oleosa, debido a la adición del 35% p/p de fase acuosa al sistema, la cual cristalizó hasta  $\overline{T}_{c4}$ :  $-19.4$  °C. En contraste a las observaciones de la fase oleosa, la adición de HBS en la emulsión W/O sí causó cambios significativos en la entalpía de cristalización de las regiones exotérmicas 1 y 2, yendo de  $\Delta H_{c1}$ :  $10.0 \pm 0.5$  J/g a  $9.2 \pm 0.1$  J/g y de  $\Delta H_{c2}$ :  $21.9 \pm 2.5$  J/g a  $16.3 \pm 1.3$  J/g para las emulsiones sin y con 0.9% p/p de HBS, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Estos resultados, en acorde con los obtenidos en la fase oleosa, indican que el proceso de cristalización de la emulsión W/O reducida en grasa inició a una

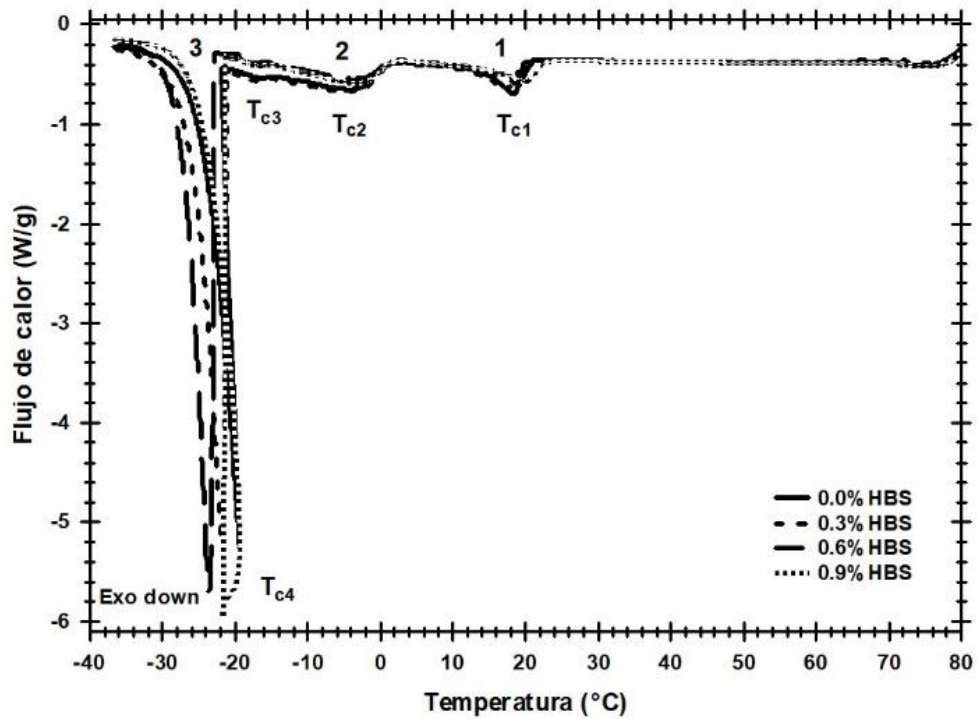
temperatura más alta al ser adicionada con HBS en concentraciones de hasta 0.9% p/p, pero también lo hizo con una entalpía de cristalización menor ( $\Delta H_{c1}$ :  $13.5 \pm 1.3$  J/g versus  $9.2 \pm 0.1$  J/g para la fase oleosa y la emulsión W/O con 0.9% p/p de HBS, respectivamente;  $P < 0.05$ ). Este comportamiento resulta benéfico ya que el estabilizante tuvo un efecto significativo en la cinética de cristalización de la emulsión, pese a la adición de una fase acuosa al sistema.

### 7.1.3. Microestructura

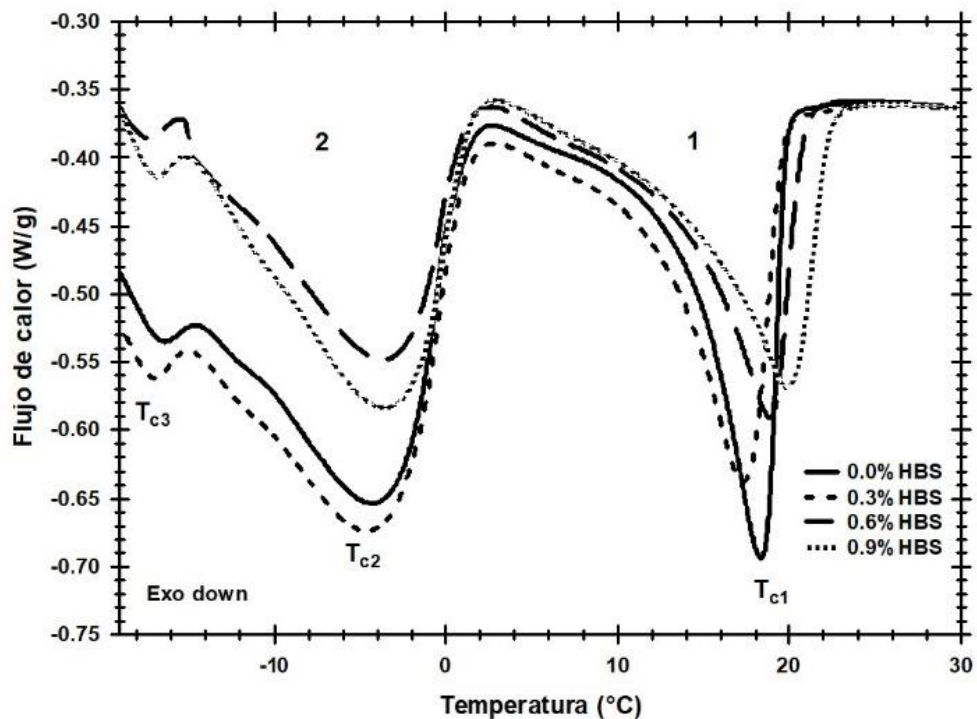
Los parámetros microestructurales a 18 °C de las emulsiones W/O 35/65 con 0.0, 0.3, 0.6 y 0.9% p/p HBS y de la emulsión tradicional con 80% de grasa se muestran en la Tabla 7.2. La adición de HBS provocó un incremento en la cantidad de material cristalizado y en el número de cristales, así como un decremento del diámetro equivalente de dichos cristales ( $P < 0.05$ ). La cantidad de material cristalizado aumentó de  $11.9 \pm 0.3\%$  para la emulsión W/O control a  $23.8 \pm 0.2\%$  cuando se añadió 0.9% p/p de HBS ( $P < 0.05$ ). Esto indica un incremento de casi 12% de material sólido tan sólo con la adición de 0.9% p/p de HBS; resultados que coinciden con los reportados por Kim y Marangoni (2017) y por Peyronel y col. (2016). Asimismo, la disminución en el tamaño de los cristales de  $3.0 \mu\text{m}$  a  $2.6 \mu\text{m}$  con 0.9% p/p de HBS ( $P < 0.05$ ), relacionada a una mayor tasa de nucleación, puede ayudar a prevenir la migración del aceite y la sensación de textura arenosa en las grasas, así como también a mejorar la funcionalidad del producto final, de acuerdo con lo reportado por Dibildox-Alvarado y col. en 2004 y por Ghotra y col. en 2002.

Una comparativa de los parámetros microestructurales de las emulsiones W/O 35/65 adicionadas con HBS con los de la emulsión tradicional con 80% de grasa hace notar que: (1) a partir de la adición de 0.3% p/p de HBS, el número de cristales es mayor al de la emulsión tradicional, (2) el diámetro equivalente de los cristales disminuye a partir de la adición de 0.6% p/p de HBS, y (3) la cantidad de material cristalizado es mayor (Tabla 7.2). Así, adicionar HBS en concentraciones desde 0.3% p/p a una emulsión W/O reducida en grasa (35/65) contribuye significativamente a su microestructura, con valores similares o incluso mejores al de una emulsión W/O tradicional con 80% de grasa.





A



B

Figura 7.3. (A) Perfil de cristalización y (B) ampliación de las exotermas 1 y 2 de la emulsión W/O 35/65 en función de la concentración de estabilizante alto en ácido behénico (HBS).

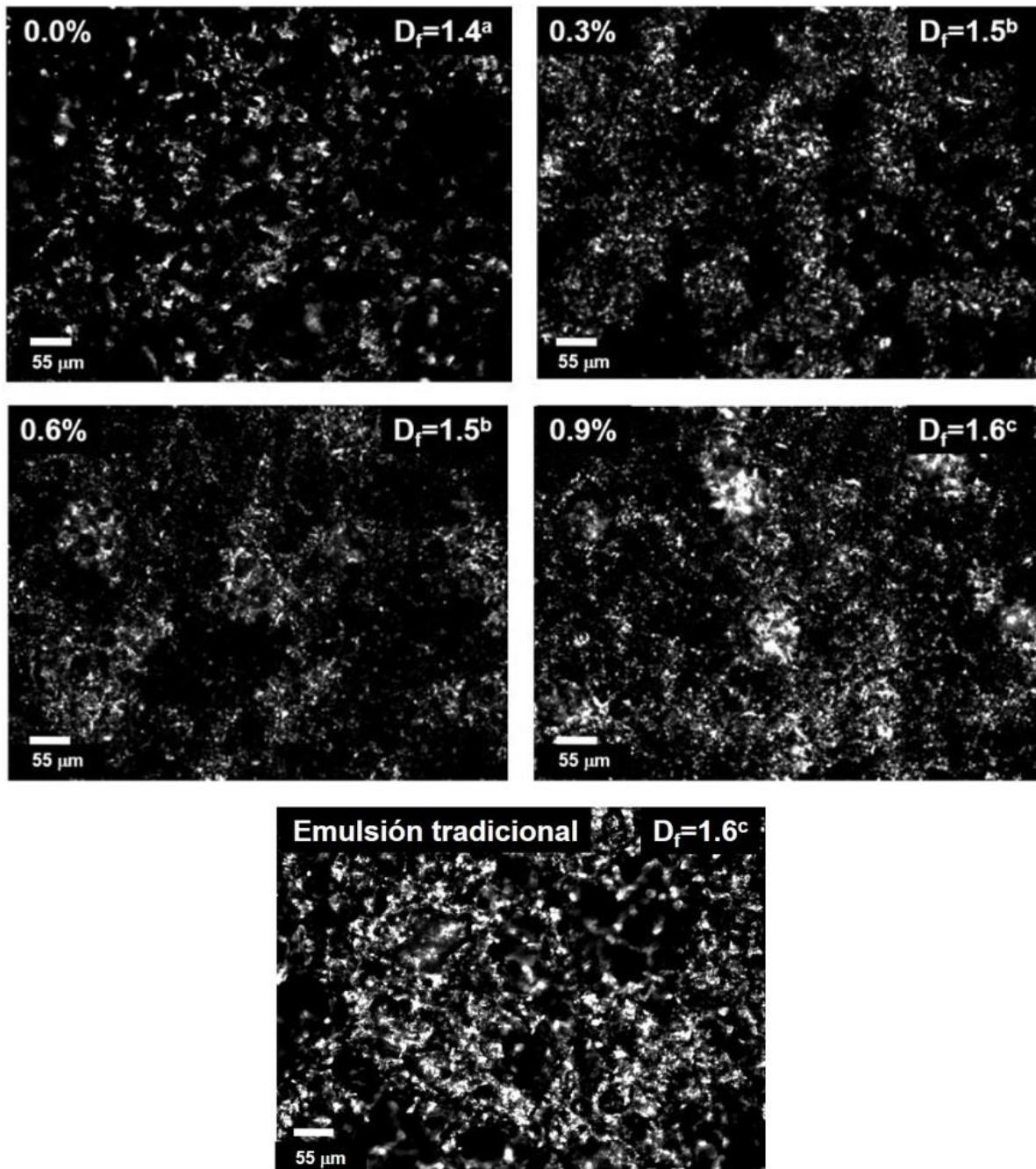
**Tabla 7.2.** Parámetros microestructurales a 18 °C de la emulsión W/O 35/65 en función de la concentración de estabilizante alto en ácido behénico (HBS) y de la emulsión W/O tradicional.

Emulsión W/O	Material cristalizado (%)*	Número de cristales*	Diámetro equivalente (µm)*
35/65 con 0.0% de HBS	11.9±0.3 <sup>a</sup>	1098±42 <sup>a</sup>	3.0±0.1 <sup>a</sup>
35/65 con 0.3% de HBS	15.6±0.8 <sup>b</sup>	1396±57 <sup>b</sup>	3.0±0.1 <sup>a</sup>
35/65 con 0.6% de HBS	17.2±0.1 <sup>c</sup>	1835±76 <sup>c</sup>	2.7±0.1 <sup>b</sup>
35/65 con 0.9% de HBS	23.8±0.2 <sup>d</sup>	2205±42 <sup>d</sup>	2.6±0.1 <sup>b</sup>
20/80 (tradicional)	20.4±1.0 <sup>e</sup>	1024±98 <sup>a</sup>	3.1±0.1 <sup>a</sup>

\*Media±desviación estándar,  $n=4$

<sup>a</sup>Para la misma columna, letras diferentes indican diferencia significativa ( $P<0.05$ )

Los valores obtenidos de dimensión fractal ( $D_f$ ) se muestran dentro de las microfotografías de las emulsiones W/O en la Figura 7.4. La dimensión fractal  $D_f$  incrementó significativamente a partir de la adición de 0.3% p/p de HBS en las emulsiones reducidas en grasa. Así,  $D_f$  aumentó desde 1.4 para la emulsión control hasta 1.6 para la emulsión adicionada con 0.9% p/p de HBS ( $P<0.05$ ). Este ligero, pero significativo incremento en la dimensión fractal,  $D_f$ , es indicativo de que los cristales llenan el espacio de una manera más homogénea y densa al aumentar la cantidad de HBS, coincidente con una mayor nucleación, como lo muestran Tang y Marangoni (2006) y Ghotra y col. (2002). Además, una  $D_f$  igual a 1.6 tanto en la emulsión reducida en grasa con 0.9% p/p de HBS como en la emulsión tradicional con 80% de grasa, supone la misma densidad cristalina para ambos casos ( $P>0.05$ ), con la ventaja de tener un contenido total de grasa 15% menor en la emulsión W/O 35/65 con 0.9% p/p de HBS, así como un mayor número de cristales de menor tamaño, en concordancia con lo observado en la Tabla 7.2. De esta manera, la adición de HBS en concentraciones de 0.9% p/p y menores estaría proporcionándole a una emulsión W/O reducida en grasa (35/65) una microestructura equiparable a la de una emulsión W/O tradicional con 80% de grasa.



**Figura 7.4.** Microestructura a 18 °C de la emulsión W/O 35/65 con su dimensión fractal en 2D ( $D_f$ ) en función de la concentración de estabilizante alto en ácido behénico (HBS) y de la emulsión W/O tradicional (letras diferentes indican diferencia significativa;  $P < 0.05$ ).

**7.1.4. Contenido de sólidos grasos**

La Tabla 7.3 muestra el contenido de sólidos grasos (SFC) a 18 °C de las emulsiones W/O reducidas en grasa y tradicional con 80% de grasa. El SFC incrementa al adicionar HBS, desde 19.4% para la emulsión control hasta 23.8% para la emulsión con 0.9% p/p de HBS ( $P<0.05$ ). Dicho aumento en el SFC por efecto de la adición de HBS es consecuencia de la co-cristalización del HBS con los HMT de la fase oleosa, debido a la generación de una mayor cantidad de sólidos grasos a la que se está adicionando al sistema, con un aumento de 4.4% de SFC adicionando 0.9% p/p de HBS. Estos resultados concuerdan con el incremento en el número de cristales y en la cantidad de material cristalizado, como se observa en la Tabla 7.2 y como fue anteriormente reportado por Kim y Marangoni (2017), Peyronel y col. (2016) y Nor Hayati y col. (2009).

**Tabla 7.3.** Contenido de sólidos grasos (SFC) a 18 °C de la emulsión W/O 35/65 en función de la concentración de estabilizante alto en ácido behénico (HBS) y de la emulsión W/O tradicional.

Emulsión W/O	SFC a 18 °C (%)*
35/65 con 0.0% de HBS	19.4±0.4 <sup>a</sup>
35/65 con 0.3% de HBS	21.3±0.4 <sup>b</sup>
35/65 con 0.6% de HBS	22.4±0.4 <sup>c</sup>
35/65 con 0.9% de HBS	23.8±0.2 <sup>d</sup>
20/80 (tradicional)	22.0±0.5 <sup>b</sup>

\*Media±desviación estándar,  $n=6$

<sup>a</sup>Para la misma columna, letras diferentes indican diferencia significativa ( $P<0.05$ )

En la Tabla 7.3, también puede observarse que la adición de 0.3% p/p de HBS a la emulsión W/O reducida en grasa (35/65) originó un incremento tal en el SFC, que igualó el valor de la emulsión tradicional con 80 % de grasa. Similar a lo que fue observado en la microestructura, el uso de tan sólo 0.3% p/p de HBS en la emulsión W/O 35/65 está compensando la pérdida de sólidos grasos atribuida a la

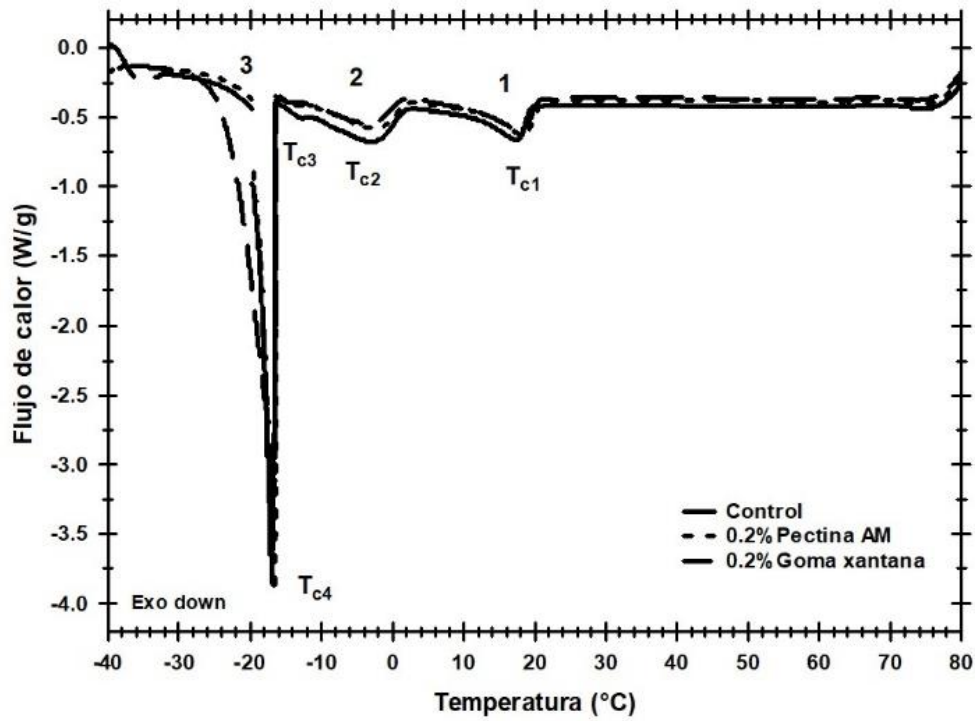
reducción del 15% de grasa total del sistema. Si bien esto implica un gran beneficio en la estructura cristalina de la emulsión, también existe un beneficio en cuestiones de salud. Haciendo una comparativa en el contenido de ácidos grasos saturados (AGS) y de acuerdo con la composición de ácidos grasos de aceite de palma, estearina de palma y aceite de palmiste reportada por Nor Aini y Miskandar (2007) y la proporción utilizada de dichos componentes en los sistemas trabajados en la presente investigación, la emulsión W/O tradicional con 80% de grasa contaría con 46.0% p/p de AGS, mientras que la emulsión W/O 35/65 con 0.9% p/p de HBS (concentración máxima utilizada) tendría un contenido de 37.5% p/p de AGS.

### **7.2. Adición de pectina de alto metoxilo y goma xantana a la fase acuosa de la emulsión W/O**

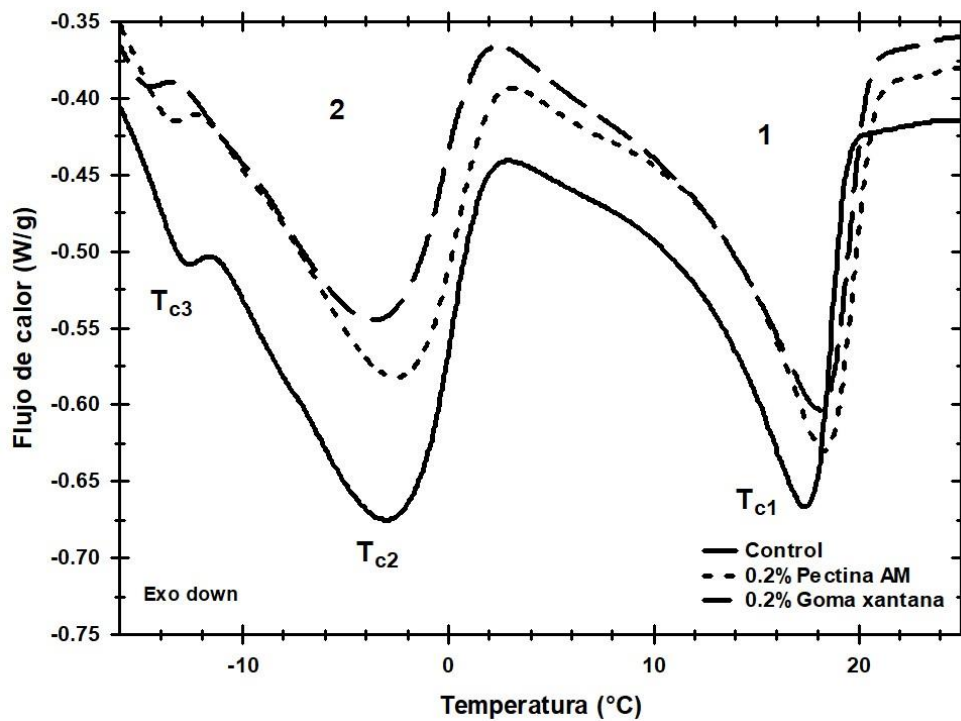
La adición de 0.3% p/p de HBS en la fase oleosa de la emulsión W/O reducida en grasa originó tal incremento en el número de cristales y en el contenido de sólidos grasos que equiparó o incluso superó a los valores obtenidos en la emulsión tradicional con 80% de grasa. Así, dicha emulsión W/O fue tomada como sistema control para el estudio del efecto de la adición de pectina de alto metoxilo y goma xantana en la fase acuosa sobre las propiedades fisicoquímicas de la emulsión W/O reducida en grasa.

#### **7.2.1. Comportamiento térmico**

El perfil de cristalización de las emulsiones W/O adicionadas con 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo o goma xantana en su fase acuosa, se muestra en la Figura 7.5. Para todos los casos, fueron observadas tres regiones exotérmicas, indicadas como 1, 2 y 3 (Figura 7.5A). Las regiones exotérmicas 1 y 2, con temperaturas de cristalización  $T_{c1}$ ,  $T_{c2}$  y  $T_{c3}$ , corresponden a la cristalización de los TAGs de la fase oleosa adicionada con 0.3% p/p de HBS de la emulsión W/O (Sección 7.1.2). Como era esperado al no tener cambios en la composición de la fase oleosa de la emulsión, no hubo cambios significativos en las temperaturas  $T_{c1}$ ,  $T_{c2}$  y  $T_{c3}$  ( $P > 0.05$ ), cuyos valores promedio para todas las emulsiones fueron  $18.0 \pm 0.5$  °C,  $-3.8 \pm 0.7$  °C y  $-16.1 \pm 0.6$  °C, respectivamente.



A



B

**Figura 7.5.** (A) Perfil de cristalización y (B) ampliación de las exotermas 1 y 2 de la emulsión W/O 35/65 adicionada con 0.2% de pectina de alto metoxilo (AM) o goma xantana en la fase acuosa.

La entalpía de cristalización de la región exotérmica 1 no tuvo un cambio significativo con la adición de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa de la emulsión, con un valor promedio de  $\overline{\Delta H_{c1}}$ :  $10.0 \pm 0.9$  J/g ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, sí se observó una disminución significativa en la entalpía de cristalización de la región exotérmica 2,  $\Delta H_{c2}$ , en la emulsión W/O añadida con goma xantana ( $22.1 \pm 2.6$  J/g versus  $15.8 \pm 1.9$  J/g para la emulsión W/O control y la emulsión W/O con goma xantana, respectivamente;  $P < 0.05$ ) (Figura 7.5B). Este comportamiento resulta interesante, ya que es bien sabido que la goma xantana se solubiliza fácilmente en agua debido a su estructura helicoidal y su alto peso molecular (Viebke y Williams, 2000; Katzbauer, 1998). Sin embargo, una disminución en la entalpía  $\Delta H_{c2}$  correspondiente a la cristalización de los TAGs de bajo punto de fusión, podría dar un indicio de que parte de la goma xantana pudo haberse dispersado en la fase oleosa (Silverson, 2020).

Por su parte, la región exotérmica 3, con temperatura de cristalización  $T_{c4}$  (Figura 7.5A), correspondió a la cristalización de la fase acuosa de la emulsión W/O (Nor Hayati y col., 2009), mostrando la misma temperatura del pico de cristalización para todas las emulsiones,  $\overline{T_{c4}}$ :  $-19.1 \pm 2.1$  °C ( $P > 0.05$ ). Esto indica que los hidrocoloides utilizados con una concentración de 0.2% p/p, no tuvieron efecto en el nivel de estructura que implica la calorimetría diferencial de barrido.

### **7.2.2. Tensión interfacial**

La Tabla 7.4 muestra la tensión interfacial a 75 °C de la fase oleosa control con las fases acuosas control y añadidas con 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo o goma xantana. Al respecto, la adición de pectina de alto metoxilo no modificó la tensión interfacial entre ambas fases ( $P > 0.05$ ), indicando que estaría actuando meramente en la fase acuosa de la emulsión, sin modificar su interfase ni su fase oleosa, en concordancia con los resultados obtenidos en el comportamiento de cristalización (Sección 7.2.1). Investigaciones previas en emulsiones aceite en agua (O/W) adicionadas de pectina en la fase acuosa, reportaron tensiones interfaciales entre 12 y 60 mN/m (12 y 60 dinas/cm) a temperatura ambiente (Schmidt y col., 2015; Zykwincka y col., 2009).

**Tabla 7.4.** Tensión interfacial de la fase oleosa con la fase acuosa adicionada con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana a 75 °C.

<b>Muestra</b>	<b><math>\gamma</math> a 75 °C (dinas/cm)*</b>
Fase oleosa / fase acuosa control	2.1±0.1 <sup>a</sup>
Fase oleosa / fase acuosa con 0.2% de pectina de alto metoxilo	2.3±0.2 <sup>a</sup>
Fase oleosa / fase acuosa con 0.2% de goma xantana	6.2±0.4 <sup>b</sup>

\*Media±desviación estándar,  $n=6$

<sup>a</sup>Para la misma columna, letras diferentes indican diferencia significativa( $P<0.05$ )

Por otro lado, la adición de goma xantana sí modificó significativamente la tensión interfacial entre las fases oleosa y acuosa de la emulsión W/O, incrementándola desde 2.1 hasta 6.2 dinas/cm a 75 °C ( $P<0.05$ ). Ha sido reportado previamente que la goma xantana disminuye la tensión interfacial, pero en emulsiones O/W, actuando como emulsificante en sinergia con yema de huevo (Henlock y col., 1984; Prud'homme y Long, 1983). A pesar de que no han sido encontradas investigaciones que evalúen tensión interfacial en emulsiones W/O con hidrocoloides en su fase acuosa, un estudio realizado por Ahmadi-Dastgerdi y col. (2015) en emulsiones O/W adicionadas con goma xantana, goma guar y carboximetilcelulosa relacionó un aumento en la viscosidad de la fase acuosa con un incremento en la tensión interfacial; sin embargo, las emulsiones con valores de entre 40 y 70 mN/m (40-70 dinas/cm) fueron reportadas como estables a temperatura ambiente. Los valores mencionados están muy por encima del encontrado en la emulsión W/O reducida en grasa adicionada con 0.2% p/p de goma xantana en la fase acuosa (6.2 dinas/cm a 75 °C; Tabla 7.4). De acuerdo con lo reportado por Huang y col. (2001), algunas gomas, como la goma xantana, migran lentamente a la interfase aceite-agua y exhiben actividad interfacial cuando son utilizadas como estabilizantes en emulsiones alimentarias. Pareciera entonces, acorde a lo reportado por investigadores como Ahmadi-Dastgerdi y col. (2015) y Huang y col. (2001) que, a mayores concentraciones de goma, el efecto de la viscosidad se ve representado en un aumento de la actividad interfacial. Por lo



anterior, análisis adicionales de viscosidad y tamaño de gota con diferentes concentraciones de pectina de alto metoxilo y de goma xantana (ej., 0.2 y 0.3% p/p) en la fase acuosa de la emulsión, serán de gran ayuda para aunar más sobre el comportamiento observado.

### 7.2.3. Contenido de sólidos grasos

Los resultados de contenido de sólidos (SFC) a 18 °C de las emulsiones W/O 35/65 control y adicionadas con 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo o goma xantana, así como de la emulsión W/O tradicional con 80% de grasa, se muestran en la Tabla 7.5. A pesar de que es bien sabido que los TAGs en estado sólido de la fase oleosa, la cual se mantuvo constante en este caso, son los que proporcionan el contenido de sólidos grasos (SFC) en una emulsión, este parámetro fue significativamente mayor a la emulsión control tanto para la emulsión con pectina de alto metoxilo como para la emulsión con goma xantana ( $P < 0.05$ ), pero sin existir diferencia entre los dos hidrocoloides ( $P > 0.05$ ). De esta manera, los resultados obtenidos podrían explicarse con el fundamento del método directo (TD-NMR) utilizado en el equipo de resonancia magnética nuclear. Este método se basa en el hecho de que la señal analítica del componente sólido decae rápidamente, mientras que la señal analítica del componente líquido se conserva mucho más tiempo; por lo tanto, el valor de SFC se define como la relación de la señal del componente sólido, dividida entre la señal de NMR total (Bruker BioSpin, 2014). Así y considerando el hecho de que tanto la pectina como la goma xantana incrementan la viscosidad de la fase acuosa de una emulsión (Schmidt y col., 2015; Viebke y Williams, 2000; Katzbauer, 1998), el equipo pudo haber tomado como componente sólido dicho aumento en la viscosidad de la fase acuosa de la emulsión, originando un incremento en el contenido de sólidos “grasos” y, consecuentemente, una posible disminución en la movilidad de la fase acuosa de la emulsión W/O. Considerando lo anterior, los resultados de este análisis fueron reportados solamente como contenido de sólidos.

**Tabla 7.5.** Contenido de sólidos (SC) a 18 °C de la emulsión W/O 35/65 adicionada con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa y de la emulsión W/O tradicional.

<b>Emulsión W/O</b>	<b>SC a 18 °C (%)*</b>
35/65 control	21.3±0.4 <sup>a</sup>
35/65 con 0.2% de pectina de alto metoxilo	23.3±0.8 <sup>b</sup>
35/65 con 0.2% de goma xantana	24.1±0.2 <sup>b</sup>
20/80 (tradicional)	22.0±0.5 <sup>a</sup>

\*Media±desviación estándar, *n*=6

<sup>a</sup>Para la misma columna, letras diferentes indican diferencia significativa (P<0.05)

De acuerdo con McClements (2015), Dickinson (2009), Chanamai y McClements (2000) y Dickinson y Goldin (1998), la movilidad de la fase acuosa como fase dispersa de la emulsión W/O puede verse minimizada mediante (1) el decremento en la diferencia de densidades entre las fases acuosa y oleosa, (2) la reducción del tamaño de gota, (3) el incremento de la viscosidad de la fase oleosa y/o (4) el incremento de la concentración de las gotas. De esta manera, un aumento en la viscosidad de la fase acuosa es un resultado benéfico, ya que existirá menor libertad de movimiento de las gotas de agua, reduciendo la posibilidad de coalescencia; lo cual, aunado a la cristalización de la fase oleosa, podría brindarle a la emulsión W/O una mayor estabilidad en función del tiempo.

Como consecuencia a lo discutido previamente, los valores obtenidos de contenido de sólidos en las emulsiones W/O reducidas en grasa adicionadas con 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo o goma xantana fueron significativamente superiores al SFC de la emulsión tradicional con 80% de grasa (Tabla 7.5).

#### **7.2.4. Dureza**

La Tabla 7.6 muestra la dureza a 18 °C de las emulsiones W/O 35/65 control y adicionadas con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana en su fase acuosa, así como de la emulsión W/O tradicional con 80% de grasa. Como se puede observar, existió un aumento significativo en la dureza al añadir los hidrocoloides a

la fase acuosa de la emulsión ( $P < 0.05$ ), sin existir diferencia alguna en relación con el tipo de hidrocoloide ( $19.4 \pm 0.7$  N versus  $20.5 \pm 1.0$  N para pectina de alto metoxilo y goma xantana, respectivamente;  $P > 0.05$ ). Al ser la pectina y la goma xantana consideradas espesantes, aumentan la viscosidad de la fase acuosa de las emulsiones, dando lugar a un aumento en su dureza, de acuerdo con lo reportado por Kowalska y col. (2020) y Zhuang y col. (2019). Los análisis de viscosidad y tamaño de gota con diferentes concentraciones de pectina de alto metoxilo y de goma xantana sugeridos en la Sección 7.2.2, contribuirán a confirmar si el aumento en la dureza de las emulsiones fue debido a estos factores.

**Tabla 7.6.** Dureza a 18 °C de la emulsión W/O 35/65 adicionada con 0.2% de pectina de alto metoxilo o goma xantana en la fase acuosa y de la emulsión W/O tradicional.

<b>Emulsión W/O</b>	<b>Dureza a 18 °C (N)*</b>
35/65 control	$16.7 \pm 0.7^a$
35/65 con 0.2% de pectina de alto metoxilo	$19.4 \pm 0.7^b$
35/65 con 0.2% de goma xantana	$20.5 \pm 1.0^{b,c}$
20/80 (tradicional)	$23.0 \pm 1.6^c$

\*Media  $\pm$  desviación estándar,  $n=6$

<sup>a</sup>Para la misma columna, letras diferentes indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

La emulsión W/O 35/65 adicionada de 0.2% p/p de goma xantana en su fase acuosa, tuvo un incremento tal en su dureza que equiparó el valor de dureza obtenido en la emulsión W/O tradicional con 80% de grasa:  $20.5 \pm 1.0$  N versus  $23.0 \pm 1.6$  N, respectivamente ( $P > 0.05$ ). Este comportamiento, aunado a lo reportado en contenido de sólidos, resulta benéfico para la emulsión W/O reducida en grasa, ya que la adición de tan sólo 0.3% p/p de HBS en su fase oleosa y 0.2% p/p de goma xantana en su fase acuosa iguala o incluso supera las propiedades fisicoquímicas macroscópicas de la emulsión W/O tradicional con 80% de grasa, brindándole una mejor estructura aún con un contenido de grasa 15% menor.

### **7.3. Margarinas de panificación**

Las margarinas de panificación fueron elaboradas a nivel piloto utilizando la misma composición empleada en las emulsiones W/O reducidas en grasa con 0.3% p/p de HBS en la fase oleosa y 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo o de goma xantana en la fase acuosa, bajo las condiciones descritas en la Sección 6.3.

#### **7.3.1. Contenido de sólidos**

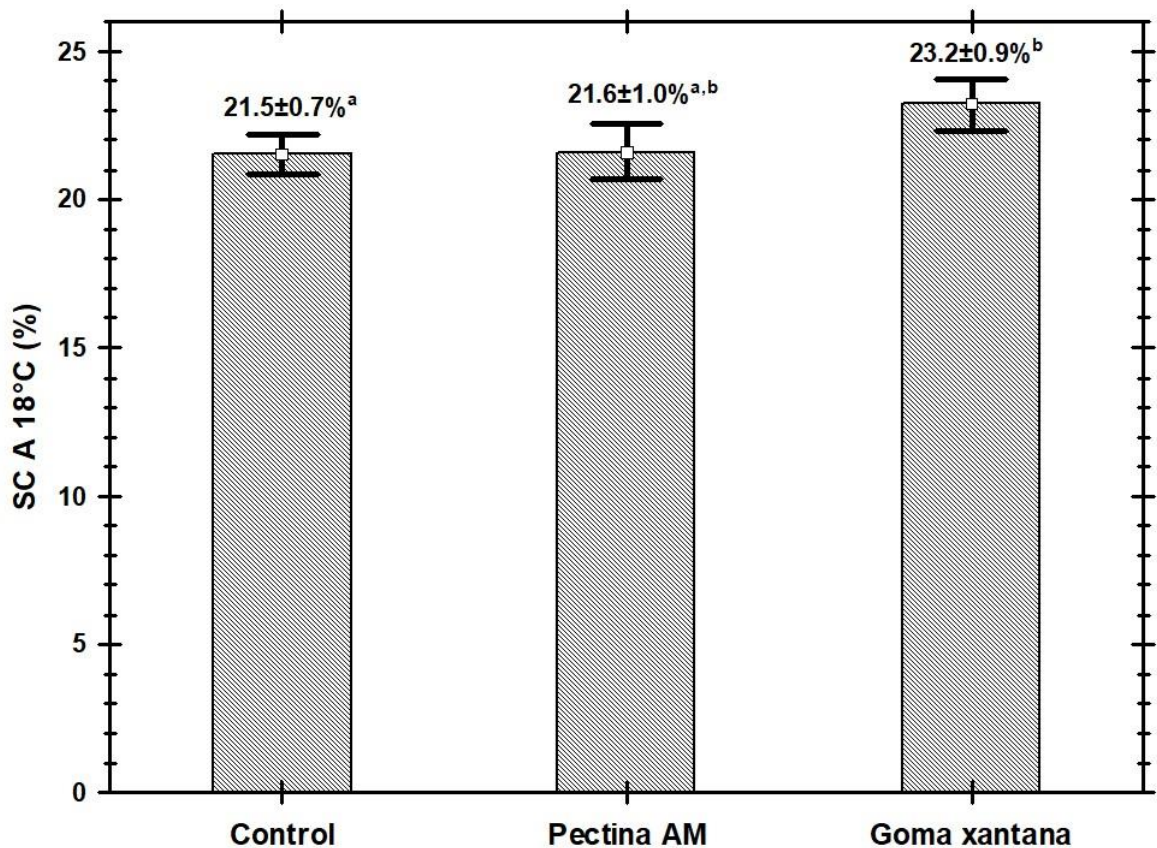
El contenido de sólidos (SC) a 18 °C de las margarinas de panificación control y elaboradas con 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo o goma xantana se muestra en la Figura 7.6. La adición de pectina de alto metoxilo no generó ningún cambio significativo en el SC de la margarina ( $P>0.05$ ). Sin embargo, la goma xantana sí provocó un incremento de SC de  $21.5\pm 0.7\%$  a  $23.2\pm 0.9\%$  con relación a la margarina control ( $P<0.05$ ). Haciendo una comparativa con los resultados de SC obtenidos de las emulsiones W/O, mostrados en la Sección 7.2.3, puede observarse que el cambio en las condiciones de proceso, como el aumento en la velocidad de agitación de los cristalizadores, no originó ningún cambio significativo en el SC de las margarinas de panificación adicionadas de hidrocoloides en su fase acuosa (Figura 7.6 versus Tabla 7.5).

Ahora bien, el valor de 23.2% de SC a 18°C para la emulsión W/O 35/65 adicionada con 0.3% p/p de HBS en la fase oleosa y 0.2% p/p de goma xantana en la fase acuosa es muy cercano al reportado por Miskandar y Nor Aini en 2007 (25%) para una margarina industrial de panificación con 80% de grasa a 20°C; valor que aseguraría un trabajo eficiente en la masa y evitaría una separación de aceite a esta temperatura (Stauffer, 1996).

#### **7.3.2. Dureza**

La Figura 7.7 muestra la dureza a 18 °C de las margarinas de panificación elaboradas con pectina de alto metoxilo y goma xantana en su fase acuosa. Para ambos casos, fue observado un aumento significativo en la dureza con relación al control, pasando de  $2492\pm 269$  N a  $3707\pm 357$  N y  $4554\pm 285$  N para la pectina y la

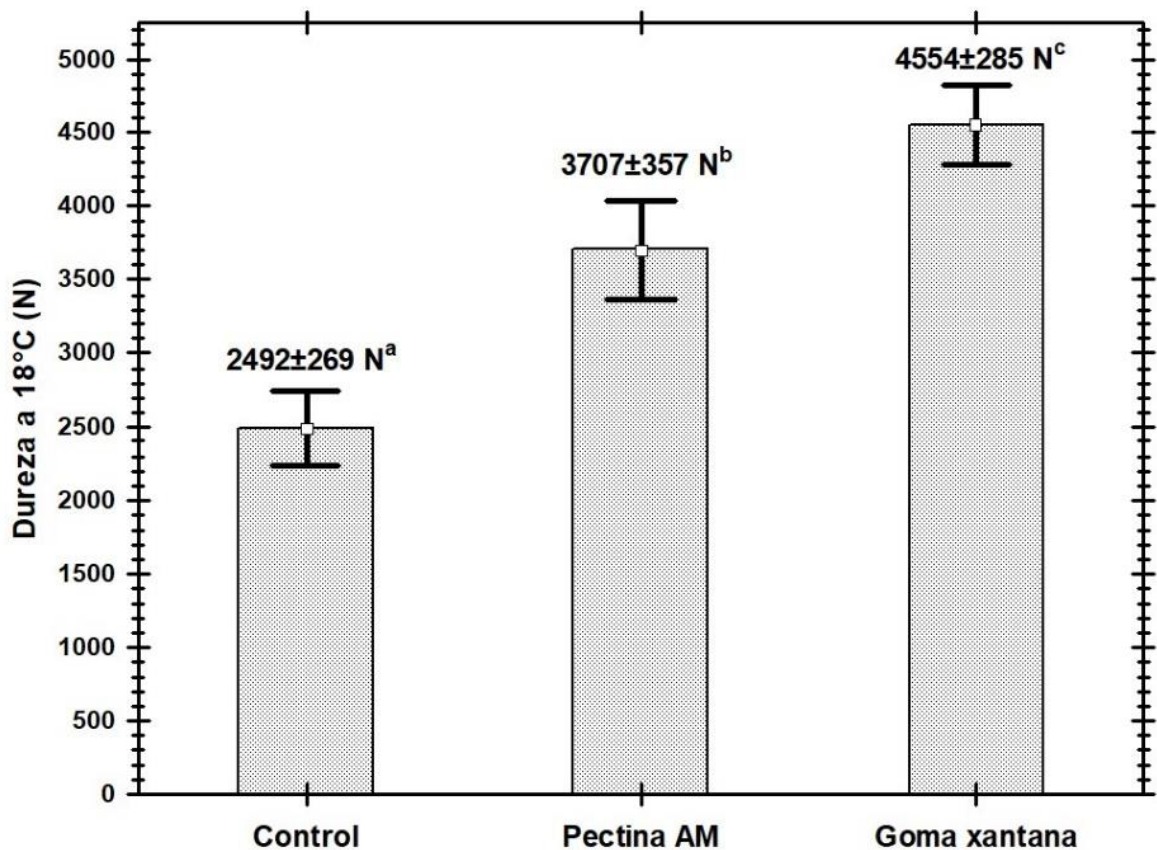
goma xantana, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Este incremento coincide con aquél observado en las emulsiones W/O adicionadas con los hidrocoloides trabajados; sin embargo, la diferencia entre los valores de dureza entre las margarinas y las emulsiones se debe a que fueron utilizados distintos métodos de medición.



**Figura 7.6.** Contenido de sólidos (SC) a 18 °C de las margarinas adicionadas con 0.2% de pectina de alto metoxilo (AM) o goma xantana en la fase acuosa (letras diferentes indican diferencia significativa;  $P < 0.05$ ).

En un estudio realizado por Liu y col. (2010), fue evaluada la dureza de margarinas comerciales a base de aceite de palma a diferentes temperaturas. A 20°C, los investigadores reportaron valores de dureza de entre ~200 g y ~400 g; es decir, entre 1960 N y 3920 N. Tales valores son cercanos a los obtenidos en las margarinas control y adicionada con pectina de alto metoxilo mostrados en la Figura 7.7. Sin embargo, la margarina de panificación adicionada con goma xantana en su

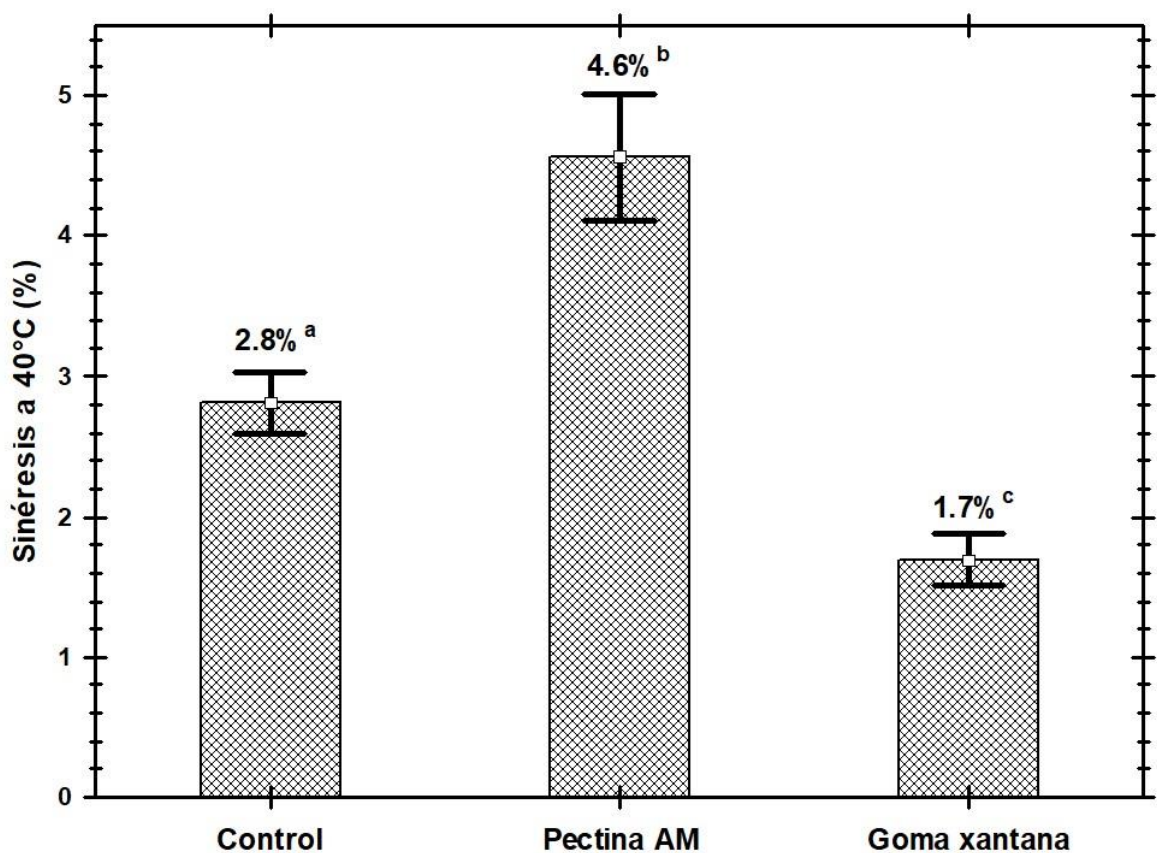
fase acuosa presentó una dureza superior, indicando que el sistema se estructuró de una mejor manera con la adición de tan sólo 0.2% p/p de este hidrocoloide. Si bien, diversas investigaciones como las de Narine y Marangoni (1999) y Haighton (1965) han establecido una relación directa de las redes tridimensionales de cristales de grasa con las propiedades macroscópicas de sistemas grasos, contribuyendo hasta en 60-80% de la dureza total de un sistema, la presente investigación establece que estabilizar la fase acuosa de una emulsión W/O con un agente espesante como la goma xantana, también contribuye significativamente a la macroestructura del sistema.



**Figura 7.7.** Dureza a 18 °C de las margarinas adicionadas con 0.2% de pectina de alto metoxilo (AM) o goma xantana en la fase acuosa (letras diferentes indican diferencia significativa; P<0.05).

### 7.3.3. Estabilidad térmica

Los resultados de estabilidad térmica a 40 °C, expresada como sinéresis, de las margarinas de panificación control y añadidas con 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo y goma xantana se muestran en la Figura 7.8. Una mayor sinéresis indica una mayor pérdida de aceite y/o agua en la margarina de panificación a 40 °C. Al respecto, puede observarse que, si bien la pectina de alto metoxilo mostró una sinéresis 1.8% mayor al control ( $P<0.05$ ), la goma xantana redujo significativamente tal pérdida en 1.1 % ( $P<0.05$ ), mostrando entonces una mayor estabilidad térmica. Con los resultados obtenidos, la margarina de panificación adicionada 0.2% p/p de goma xantana en su fase acuosa fue la mejor evaluada al obtener un incremento en el SFC y en la dureza, así como una mejor estabilidad térmica.



**Figura 7.8.** Estabilidad térmica, expresada como sinéresis, a 40 °C de las margarinas adicionadas con 0.2% de pectina de alto metoxilo (AM) o goma xantana en la fase acuosa (letras diferentes indican diferencia significativa;  $P<0.05$ ).

### 8. CONCLUSIONES

Fue posible elaborar una emulsión W/O reducida en grasa (35/65) que puede ser utilizada como margarina de panificación utilizando una base grasa a base de aceite de palma. La fase oleosa compuesta por dicha base grasa, emulsificantes y concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.9% p/p del estabilizante alto en ácido behénico (HBS), permitió una reducción del 15% en la cantidad total de grasa añadida. Fue demostrado que la adición de cantidades de entre 0.3 y 0.9% p/p de HBS a la fase oleosa de la emulsión W/O reducida en grasa origina una mayor cantidad de cristales de menor tamaño y promueve la cristalización a temperaturas más altas que la emulsión control sin HBS adicionado. Los resultados de tensión interfacial permitieron corroborar que el HBS actúa solamente en la fase oleosa de la emulsión. Un mayor contenido de sólidos grasos (SFC) y el hecho de que el HBS co-cristalizó con los TAGs de alto punto de fusión de la base grasa, como POP y PPP, es indicativo de que el sistema se encuentra mejor estructurado en comparación con el control. Lo anterior fue demostrado al comparar los resultados de microestructura y SFC de la emulsión W/O reducida en grasa versus una emulsión W/O tradicional con 80% de grasa, en donde la cantidad y el diámetro equivalente de los cristales de grasa, así como el SFC, fueron equiparados o incluso superados con la adición de tan sólo 0.3% p/p de HBS. De esta manera, la adición de HBS en concentraciones desde 0.3 hasta 0.9% p/p a la fase oleosa de la emulsión W/O estaría compensando la pérdida de estructura atribuida a la reducción del 15% de grasa total del sistema.

El aumento en el contenido de sólidos y en la dureza tanto de las emulsiones W/O como de las margarinas de panificación adicionadas con 0.2% p/p de pectina de alto metoxilo y de goma xantana, fue atribuido al aumento de viscosidad de la fase acuosa proporcionado por la adición de dichos hidrocoloides. Derivado de estos resultados, se recomienda, en futuras investigaciones, estudiar el efecto de la viscosidad y del tamaño de gota con diferentes concentraciones de pectina de alto metoxilo y goma xantana en la fase acuosa de la emulsión W/O, para aunar más sobre el comportamiento observado.



## CONCLUSIONES

La emulsión W/O 35/65 adicionada de 0.3% p/p de HBS en su fase oleosa y de 0.2% p/p de goma xantana en su fase acuosa, incrementó de tal manera el SFC y la dureza que igualó o incluso superó los valores reportados para la emulsión W/O tradicional con 80% de grasa; resultado benéfico que brinda una mejor macroestructura a la emulsión, aún con un contenido de grasa total 15% menor. Adicionalmente, la margarina elaborada con goma xantana mostró una mayor resistencia térmica a 40 °C, al presentar una menor sinéresis en relación con la margarina control, siendo el uso de este hidrocoloide el recomendado en esta investigación para la elaboración de margarinas de panificación. Finalmente, y a pesar de existir una fuerte relación entre las redes tridimensionales de cristales de grasa con las propiedades macroscópicas de sistemas grasos, como el SFC y la dureza, pudimos constatar que el uso de agentes espesantes, como la goma xantana, en la fase acuosa de emulsiones W/O, puede contribuir significativamente a la macroestructura del sistema.

La presente investigación fortaleció la información referente al empleo de estabilizantes o promotores de cristalización en grasas y proveyó información novel sobre el efecto de éstos en emulsiones W/O. Adicionalmente, generó información sobre el uso de agentes estabilizantes tanto en la fase oleosa (HBS) como en la fase acuosa (hidrocoloides) de emulsiones como margarinas de panificación, con el fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas; información anteriormente no reportada.

### 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmadi-Dastgerdi, A.; Nasirpour, A.; Rahimi, E. (2015). Physical and rheological properties of oil and water heat emulsions made from different stabilizers. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 5:45-62.
- AOCS. American Oil Chemists' Society. (2009). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*. Fifth edition. USA: AOCS.
- Arishima, T.; McBrayer, T. (2002). Applications of specialty fats and oils. *The Manufacturing Confectioner*, 82:65-76.
- Aronson, M. (1991). Flocculation of emulsions by free surfactant in purified systems. *Colloids and Surfaces*, 58:195-202.
- Ayuningtias, A.; Nurhasanah, S.; Nurhadi, B.; Subroto, E. (2013). Textural characteristic of margarine enriched with pectin fiber by using blending method. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*, 3:5-9.
- Bailey, A. (1951). *Industrial oil and fat products*. Second edition. USA: Interscience publishers.
- Basso, R. C.; Ribeiro, A. P.; Masuchi, M. H.; Gioielli, L.A.; Gonçalves, L. A.; dos Santos, A., Cardoso, L.; Grimaldi, R. (2010). Tripalmitin and monoacylglycerols as modifiers in the crystallisation of palm oil. *Food Chemistry*, 122:1185-1192.
- Bayarri, S.; Taylor, J.; Joanne, H. (2006). The role of fat in flavor perception: Effect of partition and viscosity in model emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:8862-8868.
- Berton-Carabin, C.; Schroën, K. (2019). Towards new food emulsions: designing the interface and beyond. *Current Opinion in Food Science*, 27:74-81.
- Bruker BioSpin, 2014. [https://www.bruker.com/fileadmin/user\\_upload/8-PDF-Docs/MagneticResonance/TD-NMR/SFC\\_AppNote\\_T151922.pdf](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/MagneticResonance/TD-NMR/SFC_AppNote_T151922.pdf)
- Chanamai, R.; Mc Clements, D. J. (2000). Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172:79-86.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chung, C.; Degner, B.; McClements, D. (2013). Designing reduced-fat food emulsions: Locust bean gum-fat droplet interactions. *Food Hydrocolloids*, 32:263-270.
- Chung, C.; McClements, D. (2014). Structure-function relationships in food emulsions: Improving food quality and sensory perception. *Food Structure*, 1:106-126.
- Claesson, P.; Blomberg, E.; Poptoshev, E. (2004). Surface forces and emulsion stability. *In* Friberg, S.; Larsson, K.; Sioblom, J. (Eds). *Food emulsions*. Fourth edition. USA: Marcel Dekker.
- Clegg, S.; Moore, A.; Jones, S. (1996). Low-fat margarine spreads as affected by aqueous phase hydrocolloids. *Journal of Food Science*, 61:1073-1079.
- Clemens, R.; Wallace-Hayes, A.; Sundram, K.; Pressman, P. (2017). Palm oil and threats to a critically important food source: The chloropropanols-Caution, controversy, and correction. *Toxicology Research and Application*, 1:1-9.
- Codex Alimentarius Commission. (1981). *Codex Stan 32-1981*.
- Cui, S.; Chang, Y. (2014). Emulsifying and structural properties of pectin enzymatically extracted from pumpkin. *Food Science and Technology*, 58:396-403.
- Dalgleish, D. (2006). Food emulsions. Their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids*, 20:415-422.
- de Oliveira, G.; Ribeiro, A.; dos Santos, A.; Cardoso, L.; Kieckbusch, T. (2015). Hard fats as additives in palm oil and its relationships to crystallization process and polymorphism. *Food Science and Technology*, 63:1163-1170.
- de Oliveira, G.; Ribeiro, A. P.; Kieckbusch, T. G. (2015). Hard fats improve technological properties of palm oil for applications in fat-based products. *Food Science and Technology*, 63:1155-1162.
- Desplanques, S.; Renou, F.; Grisel, M.; Malhiac, C. (2012). Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 27:401-410.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dibildox-Alvarado, E.; Neves-Rodrigues, J.; Gioielli, L. A.; Toro-Vazquez, J. F.; Marangoni, A. G. (2004). Effects of crystalline microstructure on oil migration in a semisolid fat matrix. *Crystal Growth Design*, 4:731-736.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23:1473-1482.
- Dickinson, E.; Goldin, M. (1998). Influence of calcium ions on creaming and rheology of emulsions containing sodium caseinate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 144:167-177.
- FAO. (1993). Grasas y aceites en la nutrición humana. Estudio FAO. Alimentación y Nutrición. 57. Italia.
- FDA. (2013). FDA takes step to further reduce *trans* fats in processed foods. FDA News Release.
- Fissore, E.; Rojas, A.; Gerschenson, L.; Williams, P. (2013). Butternut and beetroot pectins: Characterization and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 31:172-182.
- Friberg, S. (1997). Emulsion stability. *In* Friberg, S.; Larsson, K. (Eds.). *Food emulsions*. Third edition. USA: Marcel Dekker.
- Garbolino, C.; Bartoccini, M.; Flöter, E. (2005). The influence of emulsifiers on the crystallisation behaviour of a palm oil-based blend. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107:616-626.
- Ghosh, S.; Rosseau, D. (2011). Fat crystals and water-in-oil emulsion stability. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16:421-431.
- Ghotra, B. S.; Dyal, S. D.; Narine, S. S. (2002). Lipid shortenings: a review. *Food Research International*, 35:1015-1048.
- Gülseren, I.; Corredig, M. (2014). Interactions between polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and pectins at the oil-water interface and their influence on the stability of water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 34:154-160.
- Gunstone, F. (1997). Major sources of lipids. *In* Gunstone, F.; Padley, F. (Eds.). *Lipid technologies and applications*. USA: Marcel Dekker.
- Gurkin, S. (2002). Hydrocolloids ingredients that add flexibility to tortilla processing. *Cereal Foods World*, 57:41-43.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Haighton, A. J. (1965). Work softening of margarine and shortening. *Journal of American Oil Chemists Society*, 42:27-30.
- Haighton, A. J. (1976). Blending, chilling and tempering of margarine and shortening. *Journal of American Oil Chemists Society*, 53:397-399.
- Hennock, M.; Rahalkar, R. R.; Richmond, P. (1984). Effect of xanthan gum upon the rheology and stability of oil-water emulsions. *Journal of Food Science*, 49:1271-1274.
- Henson, I. E. (2012) A brief story of the oil palm. In O. M. Lai, C. P. Tan, & C. Akoh (Eds.), *Palm oil, production, processing, characterization and uses*. Urbana, IL: AOCS Press.
- Hishamuddin, E.; Stapley, A. G. F.; Nagy Z. K. (2011). Application of laser backscattering for monitoring palm oil crystallisation from melt. *Journal of Crystal Growth*, 335:172-180.
- Huang, X.; Kakuda, Y.; Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15:533-542.
- IMASA (2020, 08 de noviembre). Industrializadora de Mantecas. Obtenido de: <https://www.imasa.com.mx>
- Journey to forever. (2020, 13 de julio). Oil yields and characteristics. Obtenido de: [http://journeytoforever.org/biodiesel\\_yield.html](http://journeytoforever.org/biodiesel_yield.html).
- Katzbauer, B. (1998). Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, 59:81-84.
- Kim, G. Y.; Marangoni, A. G. (2017). Engineering the nucleation of edible fats using a high behenic stabilizer. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119:1-13.
- Kowalska, M.; Wozniak, M.; Zbikowska, A.; Kozłowska, M. (2020). Physicochemical characterization and evaluation emulsions containing chemically modified fats and different hydrocolloids. *Biomolecules*, 10:115-131.
- Krstonošić, V.; Dokić, L.; Dokić, P.; Dapčević, T. (2009). Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oil-in-water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. *Food Hydrocolloids*, 23:2212-2218.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lee, I.; Lee, S.; Lee, N.; Ko, S. (2013). Reduced fat mayonnaise formulated with gelatinized rice starch and xanthan gum. *Cereal Chemistry*, 90:29-34.
- Liu, Y.; Meng, Z.; Zhang, F.; Shan, L.; Wang, X. (2010). Influence of lipid composition, crystallization behavior and microstructure on hardness of palm oil-based margarines. *European Food Research and Technology*, 230:759-767.
- Masalova, I.; Tshilumbu, N. N.; Mamedov, E.; Sanatkaran, N. (2018). Effect of oil type on stability of high internal phase water-in-oil emulsions with super-cooled internal phase. *Chemical Engineering Communications*, 205:1-11.
- Massel, V.; Alexander, M.; Corredig, M. (2015). The colloidal behavior of pectin containing water in oil emulsions as a function of emulsifier concentration. *Food Biophysics*, 10:57-65.
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: Principles, practices and techniques*. Third edition. USA: CRC Press.
- Milani, J.; Maleki, G. (2012). Hydrocolloids in food industry. *In* Valdez, B. (Ed.). *Food industrial processes—Methods and equipment*. Croatia: In Tech.
- Miskandar, M. S.; Nor Aini, I. (2007). Trans-free palm-based shelf-stable margarine formulation. *Malasyan Palm Oil Board Information Series, MPOB TT No. 371*.
- Narine, S. S.; Marangoni, A. G. (1999). Relation structure of fat crystals networks to mechanical properties: a review. *Food Research International*, 32:227-248.
- Nehir El, S.; Simsek, S. (2012). Food technology applications for optical nutrition: an overview of opportunities for the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11:2-12.
- NMX-165-S-1978. *Margarina y oleomargarina para uso industrial comestible*.
- Nor Aini, I.; Miskandar, M. S. (2007). Utilization of palm oil and palm products in shortenings and margarines. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109:422-432.
- Nor Hayati, I.; Che Man, Y.; Tan, C; Nor Aini, I. (2009). Thermal behavior of concentrated oil-in-water emulsions based on soybean oil and palm kernel olein blends. *Food Research International*, 42:1223-1232.
- O'Brien, R. (2009). *Fats and oils*. Third Edition. USA: CRC Press.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ozturk, B.; McClements, D. J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 7:1-6.
- Peyronel, F.; Campos, R.; Marangoni, A. G. (2016). Prevention of oil migration in palm mid fraction and palm olein using a stabilizer rich in behenic acid. *Food Research International*, 88:52-60.
- Philips, G.; Williams, P. (2009). *Handbook of hydrocolloids*. Second edition. UK: Woodhead Publishing Ltd.
- Prud'homme, R. K.; Long, R. E. (1983). Surface tensions of concentrated xanthan and polyacrylamide solutions with added surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 93:274-276.
- Ribeiro, A.; Basso, R.; Kieckbusch, T. (2013a). Effect of the addition of hard fats on the physical properties of cocoa butter. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115:301-312.
- Ribeiro, A.; Basso, R.; Santos, A.; Andrade G.; Cardoso, L.; Kieckbusch, T. (2013b). Hardfats as crystallization modifiers of cocoa butter. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115:1462-1473.
- Ribeiro, A. P.; Masuchi, M. H.; Miyasaki, E. K.; Domingues, M. A.; Stroppa, V. L.; de Oliveira, G.; Kieckbusch, T. G. (2014). Crystallization modifiers in lipid systems. *Journal of Food Science*, 52:3925-3946.
- Riego, M.; Gómez, C. (1988a). Química-física interfacial de emulsificantes alimentarios. Parte I. Solubilidad e interacción con medios acuosos. *Instituto de la Grasa y sus Derivados*, 39:44-51.
- Riego, M.; Gómez, C. (1988b). Química-física interfacial de emulsificantes alimentarios. Parte II. Mecanismos de estabilización de emulsiones. Emulsiones en alimentos elaborados. *Instituto de la Grasa y sus Derivados*, 39:111-118.
- Rosseau, D. (2000). Fat crystals and emulsion stability – A review. *Food Research International*, 33:3-14.
- Rousseau, D.; Hodge, S. (2005). Stabilization of water-in-oil emulsions with continuous phase crystals. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 260:229-237.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Saha, D.; Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in foods: a critical review. *Journal of Food Science and Technology*, 47:587-597.
- Santana, R.; Perrechil, F.; Cunha, R. (2013). High and low energy emulsifications for food applications: A focus on process parameters. *Food Engineering Reviews*, 5:107-122.
- Sato, K.; García, L.; Calvet, T.; Diarte, M; Ueno, S. (2013). External factors affecting polymorphic crystallization of lipids. *European Journal Lipid Science and Technology*, 116:1224-1238.
- Schmidt, U. S.; Schmidt, K.; Kurz, T.; Endreß, H. U.; Schuchmann, H. P. Pectins of different origin and their performance in forming and stabilizing oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 46:59-66.
- Schramm, L. (2005). *Emulsions, foams and suspensions. Fundamentals and applications*. Canada: Wiley–VCH.
- Shahbandeh, M. (2020, Julio 13). Consumption of vegetable oils worldwide from 2013/2014 to 2019/2020, by oil type. Obtenido de <https://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption>.
- Silverson, 2020. <https://www.silverson.com/us/resource-library/application-reports/hydration-of-xanthan-gum>
- Stauffer, C. E. (1996). Bakery products and applications. *In* Stauffer, C. E. (Ed.). *Fats and Oils*. USA: Eagan Press.
- Sundram, K.; Sambanthamurthi, R.; Tan, Y. (2003). Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 12:355-362.
- Tan, C. P.; Nehdi, I. A. (2012). The physicochemical properties of palm oil and its components. *In* Lai, O. M.; Tan, C. P.; Akoh, C. (Eds.). *Palm oil, production, processing, characterization and uses*. USA: AOCS Press.
- Tanaka, L.; Miura, S.; Yoshioka, T. (2007). Formation of granular crystals in margarine with excess amount of palm oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, 84:421-426.
- Tang, D.; Marangoni, A. G. (2006). Microstructure and fractal analysis of fat crystals networks. *Journal of American Oil Chemists Society*, 83:377-388.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Timms, R. E. (1984). Phase behaviour of fats and their mixtures. *Progress in Lipid Research*, 23:1-38.
- Ushikubo, F.; Cunha, R. (2014). Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 34:145-156.
- Vaisey-Genser, M. (2003). Margarine. Types and Properties. *In* Caballero, B. (Ed.). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. USA: Academic Press.
- Vander Wal, R. J. (1963). The determination of glyceride structure. *Journal of American Oil Chemists Society*, 40:242-247.
- van Kleef, E.; van Trijp, J.; van den Borne, J.; Zondervan, C. (2012). Successful development of satiety enhancing food products. Towards a multidisciplinary agenda of research challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:611-628.
- Viebke, C.; Williams, P. A. (2000). Determination of molecular mass distribution of  $\kappa$ -carrageenan and xanthan gum using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Food Hydrocolloids*, 14:265-270.
- Windhab, E.; Dressler, M.; Feigl, K.; Fischer, P.; Megias-Alguacil, D. (2005). Emulsion processing – From single-drop deformation to design of complex processes and products. *Chemical Engineering Science*, 60:2101-2113.
- Zaliha, O.; Chong, C. L., Cheow, C. S.; Norizzah, A. R.; Kellens, M. J. (2004). Crystallisation properties of palm by dry fractionation. *Food Chemistry*, 86:245-250.
- Zaliha, O.; Chong, C. L., Cheow, C. S., Norizzah, A. R. (2005). Crystallisation and rheological properties of hydrogenated palm oil and palm oil blends in relation to crystal networking. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107:634.640.
- Zhuang, H.; Chu, S.; Wang, P.; Zhou, B.; Han, L.; Yu, X.; Fu, Q.; Li, S. (2019). Study on the emulsifying properties of pomegranate peel pectin from different cultivation areas. *Molecules*, 24:1819-1832.
- Zykwinska, A.; Gaillard, C.; Boiffard, M. H.; Thibault J. F.; Bonnin, E. (2009). “Green labelled” pectins with gelling and emulsifying properties can be extracted by enzymatic way from unexploited sources. *Food Hydrocolloids*, 23:2468-2477.

**10. ANEXO 1. CURSOS, EXPOSICIONES Y CONGRESOS DERIVADOS DE LOS ESTUDIOS DE DOCTORADO.**

Ponente en el “109th AOCS Annual Meeting & Expo” con el tema “Effect of emulsifiers on the interfacial tension of fat-reduced W/O emulsions added with a high behenic stabilizer”. Minneapolis, Minnesota, EUA. 2018.

Participación como autora en la presentación oral en el “XVII Congreso Latinoamericano y Exposición sobre Grasas, Aceites y Lípidos de AOCS” con el tema “Effect of a stabilizer high in behenic acid in fat crystallization”. Cancún, Quintana Roo, México. 2017.

Presentación en el “XVII Congreso Latinoamericano y Exposición sobre Grasas, Aceites y Lípidos de AOCS” con el póster titulado “Fat reduced W/O emulsion added with a high behenic acid stabilizer”. Cancún, Quintana Roo, México. 2017.

Curso teórico-práctico “Methods used in the study of physical properties of edible fats: Scattering and low resolution pulsed nuclear magnetic resonance” impartido por Dra. Fernanda Peyronel (Universidad de Guelph). 2016.

Ponente en el “107th AOCS Annual Meeting & Expo” con el tema “Effect of hydrocolloids and a crystal promoter on the SFC of a palm oil-based fat reduced W/O solid emulsion”. Salt Lake City, Utah. EUA. 2016.

Curso teórico-práctico “Nanoestructura y mesoestructura de grasas y su aplicación en emulsiones aceite/agua” impartido por Dr. Alejandro Marangoni (Universidad de Guelph). 2015.

Mención honorífica por el trabajo “Hybrid palm oil as a new component in multipurpose margarines: Effect of composition, processing conditions and storage time”, expuesto en el “6° Congreso de Ciencia, Biotecnología e Inocuidad de los Alimentos”. Monterrey, Nuevo León, México. 2014.

Ponente en el “6° Congreso de Ciencia, Biotecnología e Inocuidad de los Alimentos” con el tema “Hybrid palm oil as a new component in multipurpose margarines: Effect of composition, processing conditions, and storage time”. Monterrey, Nuevo León, México. 2014.

Ponente en el “105th AOCS Annual Meeting & Expo” con el tema “Effect of composition and processing conditions of a palm oil based multipurpose margarine”. San Antonio, Texas, EUA. 2014.

## 11. ANEXO 2. CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULO CIENTÍFICO

### Journal of the American Oil Chemists' Society – Decision on Manuscript ID JAOCS-20-0248

---

Silvana Martini <onbehalf@manuscriptcentral.com>  
Jue 10/12/2020 01:21 PM

Para: ELENA DIBILDOX ALVARADO  
10-Dec-2020

Dear Dr. Dibildox-Alvarado:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Crystallization enhancement by a high behenic acid stabilizer in a palm oil-based model fat blend and its corresponding fat-reduced water-in-oil emulsion" in its current form for publication in the Journal of the American Oil Chemists' Society.

Your manuscript will next be forwarded to our production partners for copy editing and typesetting. **IMPORTANT:** To avoid delays in the publication process, please respond to each of the items supplied in the query form that accompanies your proofs, including confirming your funding information.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of the American Oil Chemists' Society, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
Dr. Silvana Martini  
Senior Associate Editor, Journal of the American Oil Chemists' Society  
silvana.martini@usu.edu

**12. ANEXO 3. ARTÍCULO CIENTÍFICO ACEPTADO**



## Crystallization Enhancement by a High Behenic Acid Stabilizer in a Palm Oil-Based Model Fat Blend and its Corresponding Fat-Reduced Water-in-Oil Emulsion

Marisol Cordova-Barragan<sup>1</sup> · Alejandro G. Marangoni<sup>2</sup> · Fernanda Peyronel<sup>2</sup> · Elena Dibildox-Alvarado<sup>1</sup>

Received: 26 July 2020 / Revised: 3 November 2020 / Accepted: 10 December 2020  
© 2021 AOCS

**Abstract** A high behenic stabilizer (HBS) at concentrations of 0.3%, 0.6%, and 0.9% w/w was added to the oil phase of a fat-reduced water-in-oil (W/O) emulsion intended for margarine manufacture. The crystallization kinetics, thermal behavior, and microstructure of an oil phase and its 35/65 w/w fat-reduced W/O emulsion were studied. The oil phase was composed of a palm oil-based model fat blend, three emulsifiers, and the HBS. Differential scanning calorimetry results showed that, when 0.9% of stabilizer was added, the crystallization started 2.5 °C higher than when no HBS was added, hence reducing the time needed for crystallization. Polarized light microscopy results showed that the cocrystallization of the high-melting triacylglycerols of the oil phase with the HBS significantly decreased the fat crystal size and increased the number of crystals. The solid fat content also was increased by 2.4%. Interfacial tension experiments corroborated that HBS was located in the oil phase and not at the emulsion interface. This work shows that margarine can be successfully manufactured by adding 0.9% HBS to a 35/65 w/w fat-reduced W/O emulsion without losing functionality, as shown by the presence of the  $\beta'$  polymorph. This work also suggests that 15% fat could be removed from the system without changing functionality by merely adding up to 0.9% of HBS.

**Keywords** Crystallization enhancement · High behenic acid stabilizer · Palm oil · Structuration · Water-in-oil emulsion

J Am Oil Chem Soc (2021).

### Introduction

Despite heavy criticism of palm oil production due to habitat destruction and low-sustainability practices, the yearly demand of palm oil keeps increasing worldwide and remains an important source of food for most of the world, particularly for developing countries.

Palm oil is a source of inexpensive, widely available plant-based nonhydrogenated saturated fat, used in many food applications (Henson, 2012). Palm oil and its derivatives (i.e., palm stearin, palm olein, and palm kernel oil) are important and functional components in the manufacture of margarines, spreads, and shortenings (Henson, 2012). With almost 71 million metric tons of oil being produced through 2019 and 2020, palm oil is the most abundant edible oil in the world, followed only by soybean oil, with ~55 million metric tons in the same period (Shahbandeh, 2020). One very positive characteristic of palm oil is that the crop produced per unit of land gives the highest yield of oil. At 6 tons of oil produced per hectare, palm oil yields exceed those of other oilseed crops such as coconut oil (2.7 t ha<sup>-1</sup>), avocado oil (2.6 t ha<sup>-1</sup>), olive oil (1.2 t ha<sup>-1</sup>), rapeseed oil (1.2 t ha<sup>-1</sup>), sunflower oil (1.0 t ha<sup>-1</sup>), or soybean oil (0.4 t ha<sup>-1</sup>) (Journey to forever, 2020). One could argue that, from a sustainability perspective, palm oil has a smaller footprint than other oilseeds or oil fruits.

Even though they are used extensively in the food industry, palm oil and its derivatives have some technological

✉ Elena Dibildox-Alvarado  
dibildox@uaq.mx

<sup>1</sup> Food Biopolymers Laboratory, Chemistry Sciences Faculty, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, SLP 78210, Mexico

<sup>2</sup> Department of Food Science, Ontario Agricultural College, University of Guelph, Guelph, ON, Canada

shortcomings. The main problem with palm oil is its slow crystallization kinetics and the tendency to harden during storage, forming large granular crystals (i.e., 20–50  $\mu\text{m}$ ), which can cause sandy mouthfeel, fractionation, and oil syneresis in finished products (Garbolino et al., 2005; Nor Aini and Mistandar, 2007). Some strategies used in the past to accelerate crystallization of palm oil include the addition of crystallization enhancers such as mono- and diacylglycerols (MAG and DAG, respectively), fully hydrogenated vegetable oils, or fractionated homogeneous long-chain saturated triacylglycerols (TAG) with high melting points ( $>40$  °C) (Basso et al., 2010; de Oliveira et al., 2015; Ribeiro et al., 2014).

Some research has shown that the addition of MAG improves the crystallization behavior of palm oil. Basso et al. (2010) found that adding 1.0% of MAG to fully hydrogenated palm oil accelerated the crystallization process and increased both the onset ( $T_{\text{onset}}$ ) and the peak ( $T_p$ ) temperatures of crystallization in palm oil. Furthermore, the crystals generated were more numerous and smaller than those found in native palm oil. In another study, de Oliveira et al. (2015) added hard fats to palm oil (i.e., fully hydrogenated palm kernel, palm, cottonseed, and soybean oils). This addition increased the  $T_{\text{onset}}$  of crystallization and favored a  $\beta'$  crystallization. These hard fats not only enhance nucleation and crystal growth but also affect crystal habit and polymorphism (de Oliveira et al., 2015).

An advanced crystallization enhancer includes a mixture of fully hydrogenated soybean and rapeseed oils, yielding a fat predominantly composed of stearic and behenic acids. This high behenic stabilizer (HBS) has recently been shown to cocrystallize with the high-melting TAG naturally present in fats, either by forming a mixed crystal or by nucleating on their surface (Kim and Managani, 2017; Peyronnet et al., 2016). Even the effects of HBS on the crystallization of bulk palm oil have been studied as previously mentioned, but the effects of HBS on the crystallization of fats in water-in-oil (W/O) emulsions, such as margarines and spreads, have not.

In this study, we show the effects of HBS addition on the crystallization kinetics and microstructure of a palm oil-based model fat blend and its corresponding W/O emulsion containing 3% water. We hypothesize that the addition of 0.9% or less of HBS will enhance crystallization kinetics of a palm oil-structured W/O emulsion that requires non-refrigerated storage below 25 °C.

## Materials and Methods

### Materials

W/O emulsions at 35/65% w/w were manufactured. The oil phase consisted of: (1) a palm oil-based model fat blend

(60% palm oil, 25% palm stearin, and 15% palm kernel oil, with a final balance of 39/41% of saturated fatty acids/unsaturated fatty acids, respectively), (2) a blend of three emulsifiers [0.5% soybean lecithin, 0.5% rapeseed oil unsaturated fatty acids MAG (RO-MAG; Palgaard DMG0291), and 0.3% palm oil saturated fatty acids MAG (PO-MAG; Palgaard DMG009B)], and (3) a HBS (0.3, 0.6, or 0.9% HBS; Palgaard 6111). The aqueous phase was formed with water added to 1% of sodium chloride and 0.05% of each of the following components: citric acid, sodium benzoate, and potassium sorbate.

It is noted that the palm oil-based model fat blend formulation was used for its application in industrial bakery margarines with a minimum of 64% total fat (NMX-F-165-SCFI, 2007, Official Mexican Standard) and also that, as a fat-reduced W/O emulsion containing a higher proportion of water, it was necessary to use a blend of emulsifiers to increase the ease of formation, promote the stability, retain the plasticity range of the emulsion, and improve the ability of taking up a higher percentage of moisture.

All the ingredients used for the W/O emulsions were kindly provided by *Palgaard Industri de México, S. de R.L. de C.V.*

### Preparation of the Palm Oil-Based Model Fat Blend, Oil Phases, and W/O Emulsions

The palm oil-based model fat blend, the control oil phase (no HBS added), and the oil phases with different concentrations of HBS (0.3, 0.6, and 0.9% w/w) were melted on a hot plate at 75 °C with agitation at 400 rpm for 10 min. This temperature allows us to remove the thermal memory of all fats including HBS. The fat blend and the four oil phases were then subjected to a controlled cooling following the sample sequence used in industrial margarines manufacture (Greenwell, 1981; *Palgaard Industri de México* recommendation) by immersion in two sequential water baths set to 2 and 6 °C. The samples were removed from the first water bath when their temperature reached 22 °C and were quickly transferred to the second water bath and kept there until their internal temperature reached 12 °C. RO-MAG and PO-MAG were subjected to the same cooling process.

For the manufacture of the W/O 35/65 emulsion, the preheated aqueous phase at 75 °C was added to the oil phase previously prepared at the same temperature (already removed its thermal memory), applying an agitation of 700 rpm for 10 min to favor the integration of the phases and the formation of a homogeneous emulsion. Subsequently, the same cooling process indicated in the preparation of the palm oil-based model fat blend and oil phases was followed. At the end of the controlled cooling, all

samples were stored at 18 °C for stabilization. All experiments were carried out after 72 hours of storage.

## Methods

### *TAG Profile*

Gas chromatography was used to elucidate the TAG profile of the control oil phase and the HBS. The gas chromatograph was equipped with a flame ionization detector (7890A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and a DB-17HT capillary column. A modified version of the AOCS Official Method Ce 5–86 (AOCS, 2009) was followed. The initial temperature of the column was set at 200 °C; then, two heating ramps were applied: the first at 300 °C at a rate of 25 °C min<sup>-1</sup> and the second one at 350 °C at 30 °C min<sup>-1</sup>. The injector and detector temperatures were set at 360 and 370 °C, respectively, while the samples were dissolved in chloroform (20 mg mL<sup>-1</sup>) with the injection in split mode in a 50:1 ratio. TAG standards (Supelco) were run to identify the retention time, and the ChemStation software (Rev. B.04.02, Agilent Technologies) was used for analysis. Identification was carried out using the total number of carbons for those TAG with fewer than 50 carbons. For TAG with total carbon number equal or greater than 50, a random distribution of the fatty acids in the glycerol molecule was assumed following the direct calculation from the positional composition data method reported by Vander Wal (1963). The melting temperatures ( $T_m$ ) of the TAG were estimated using the Triglyceride Properties Calculator: A shiny R application (Mannogi Research Lab, Guelph, ON, Canada; <http://www.oc.foodandhealth.com/services.php>). Samples from two replicas were analyzed.

### *X-Ray Diffraction*

The MAG RO-MAG and PO-MAG, the HBS, the palm oil-based model fat blend, the control oil phase, and the oil phase with 0.9% HBS were placed in special aluminum containers (14 × 10 × 1 mm). To obtain their X-ray diffraction pattern, an XpertPro PANalytical diffractometer (Philips Analytical, Egham, Surrey, GB) was used equipped with a copper anode (K $\alpha$ 1,  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ) and an X'Celerator detector. The X-ray diffraction patterns were carried out in a range of incidence angles between 3 and 35° at a scan speed of 0.064274 °/s. The data obtained from two replicas were processed and analyzed with the X'pert V.2 data collector. To establish the polymorphic state of the crystalline structure, the interplanar distance  $d$  of the diffraction angles  $2\theta$  was computed (STATISTICA 12.0, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) from the Bragg peaks' position detected. All the samples received the thermal

treatment showed in Preparation of the Palm Oil-Based Model Fat Blend, Oil Phases, and W/O Emulsions section before the X-ray analyses.

### *Thermal Behavior*

The crystallization and melting profiles of the palm oil-based model fat blend, the HBS, the four oil phases, and the W/O emulsions formed with them were determined with a differential scanning calorimeter (DSC 2920, TA Instruments, New Castle, DE, USA) following the AOCS Official Method Cj 1–94 (AOCS, 2009). The method included cooling the sample from 80 to –40 °C at 10 °C min<sup>-1</sup> (after removing the thermal memory at 80 °C per 10 min), maintaining it at –40 °C for 30 min, and then heating it up to 80 °C at a rate of 5 °C min<sup>-1</sup>. Between 6 and 9 mg of sample were weighted into an aluminum cell (TA Instruments) consisting of a bottom and a lid that was hermetically sealed. A similar empty cell was used as a reference. The TA Universal Analysis software was used for analysis. In this way, the following parameters were obtained: the onset temperature of crystallization ( $T_{c, onset}$ ), the temperature of the peak of crystallization ( $T_{c, i}$ ; a number in the subscript indicates the exotherm number on the thermogram) and melting ( $T_m$ ), and the phase transition enthalpies corresponding to crystallization and melting ( $\Delta H_c$  or  $\Delta H_m$ ). The onset slope of crystallization was also calculated as an expression of the exothermic heat flow per mass and temperature units (W g<sup>-1</sup>°C). The degree of undercooling ( $\Delta T = T_{c, onset} - T_{c, i}$ ) was manually calculated. The samples were analyzed in duplicate for each of the two replicas.

### *Interfacial Tension*

A Du Nuoy interfacial tensionometer (Model 70545, CSC Scientific Company Inc., Fairfax, VA, USA) was used to determine the static interfacial tension  $\gamma$  between the palm oil-based fat blend or the oil phase and the aqueous phase. The palm oil-based model fat blend and the oil and aqueous phases were maintained at 75 °C (W/O emulsion formation temperature) prior to the analysis in an oven with automatic temperature control. To maintain the 35/65 ratio, 28 mL of the aqueous phase were placed in a glass vessel (70 × 50 mm), which was placed in the lever arm of the equipment, and the Du Nuoy ring was placed in such a way that it was completely covered by the aqueous phase. Subsequently, 32 mL of the palm oil-based model fat blend or the oil phase were placed, maintaining the temperature at 75 °C. The measurement consisted of registering the necessary force, in dynes/cm, to remove the Du Nuoy ring upward from the interface of both liquids.



The values reported represent the average of four measurements, with each replica analyzed by duplicate.

### Microscopy

Smears of the W/O emulsions were made on a glass slide. These slides were placed in a polarized light microscope (PLM) Eclipse LV100 NPOL, Nikon Instruments, Melville, NY, USA) to image (MicroPublisher 3.3 RTV, QImaging) the developed crystals in the emulsions previously stabilized at 18 °C for 72 hours. The images were used to obtain the number and equivalent diameter of crystals, as well as the percentage of solid material (white vs. black), using the NIS Elements AR 4.30 software (Nikon Instruments). The images were thresholded (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and analyzed with the Benoit 1.3 software (TriSoft International Inc.) to obtain their two-dimension fractal dimension  $D_f$  by the box count method. Samples from two replicas were analyzed.

### Solid Fat Content

A Minispec mq20 20 Hz spectrometer (Brüker Optics, Billerica, MA, USA) was used to measure the solid fat content (SFC) of the emulsions by nuclear magnetic resonance. For all measurements, a daily check was performed every 24 hours with three calibration standards supplied by Brüker. Emulsions stored at 18 °C, which were placed in 10 mm-diameter glass tubes until they were 4 cm high and then quickly analyzed. The values of three measurements per replica were captured with the spectrometer software (Minispec V1.13, Brüker Biospin).

### Statistical Analyses

The samples were randomly selected, and the results were processed with the STATISTICA V.12 software (Statsoft Inc.). A one-way ANOVA with orthogonal contrasts and a significance level of 0.05 was performed. The samples were prepared with two replicas and analyzed by duplicate or triplicate depending on the analysis performed. In all cases, the mean and SD were reported.

## Results and Discussion

### TAG Composition

The TAG profile of the control oil phase (no HBS added) and the HBS, as determined by gas chromatography, is shown in Table 1. Also shown is the predicted melting temperature  $T_m$  associated with each TAG reported, and values

**Table 1** Triacylglycerols (TAG) composition of the oil phase and the high-boiling stabilizer (HBS)

Number of carbons <sup>a</sup>	TAG <sup>b</sup>	Melting temperature (°C) <sup>c</sup>	Composition (% w/w) <sup>d</sup>	
			Control oil phase	HBS
32	CLaLa	23.9 <sup>2</sup>	1.9 ± 0.1	–
36	LaLaLa	33.1 <sup>1</sup>	4.6 ± 0.3	–
40	LaMM	42.0 <sup>2</sup>	3.6 ± 0.3	–
42	MMM	45.9 <sup>2</sup>	0.7 ± 0.1	–
42	LaLaO	18.0 <sup>2</sup>	0.6 ± 0.1	–
44	LaOM	22.1 <sup>2</sup>	0.7 ± 0.1	–
46	MMO	25.6 <sup>2</sup>	0.7 ± 0.1	–
48	PPP	53.7 <sup>2</sup>	7.9 ± 0.4	–
48	MPL	19.1 <sup>2</sup>	1.5 ± 0.1	–
50	PPS	58.7 <sup>2</sup>	1.9 ± 0.1	–
50	POOP	33.2 <sup>2</sup>	25.7 ± 0.1	–
	PSO			
50	PSL	26.5 <sup>2</sup>	6.5 ± 0.3	–
52	PSO	50.1 <sup>2</sup>	–	4.8 ± 0.7
52	POOP	37.9 <sup>2</sup>	5.0 ± 0.3	–
	PSO			
52	POO	14.3 <sup>2</sup>	18.0 ± 0.9	–
52	PLO	–6.8 <sup>2</sup>	6.5 ± 0.3	–
52	PLL	–4.2 <sup>2</sup>	1.2 ± 0.0	–
54	SSS	54.7 (aq) <sup>3</sup> 64.3 (g) <sup>3</sup>	0.5 ± 0.1	19.4 ± 1.6
54	SOO	37.0 <sup>2</sup>	1.9 ± 0.2	–
54	SOO	19.2 <sup>2</sup>	2.8 ± 0.3	–
54	OOO	–10.0 <sup>2</sup>	1.2 ± 0.1	–
56	OSP	52.6 <sup>2</sup>	–	16.3 ± 0.5
58	SOO	56.7 <sup>2</sup>	–	16.5 ± 0.3
60	SSA	58.6 <sup>2</sup>	–	18.0 ± 1.1
62	HBS	61.3 <sup>2</sup>	–	25.0 ± 1.4
SSS	–	–	21.1 ± 0.4	100.0 ± 1.6
SSS-SSU	–	–	42.6 ± 0.3	–
SSU	–	–	28.5 ± 0.9	–
UUU	–	–	1.2 ± 0.1	–

The bold values represent the sum of the triacylglycerides in their composition of S (Saturated Fatty Acids) or U (Unsaturated Fatty Acids).

The estimated melting temperature for each TAG is also shown.

A, arachidic; B, behenic; C, caprylic; L, linoleic; La, Lauric; M, Myristic; O, oleic; P, palmitic; S, Stearic.

<sup>a</sup>Experimentally determined by gas chromatography.

<sup>b</sup>Most probable triacylglycerol assuming random distribution of the fatty acids in the glycerol molecule.

<sup>c</sup>Estimated using the Triglyceride Properties Calculator (Marangoni Research Lab, Guelph, ON, Canada; <http://www.crcfoodandhealth.com/services.php>), considering the crystallization in  $\beta'$  form of the oil phase and in  $\alpha$  form of the HBS (low, medium, and high melting point TAG: LMT, MMT, HMT).

<sup>d</sup>Mean ± SD, n = 2.

were used to group the TAG into molecules with high (HMT > 30 °C), medium (18 °C < MMT < 30 °C), and low melting points (LMT < 18 °C).

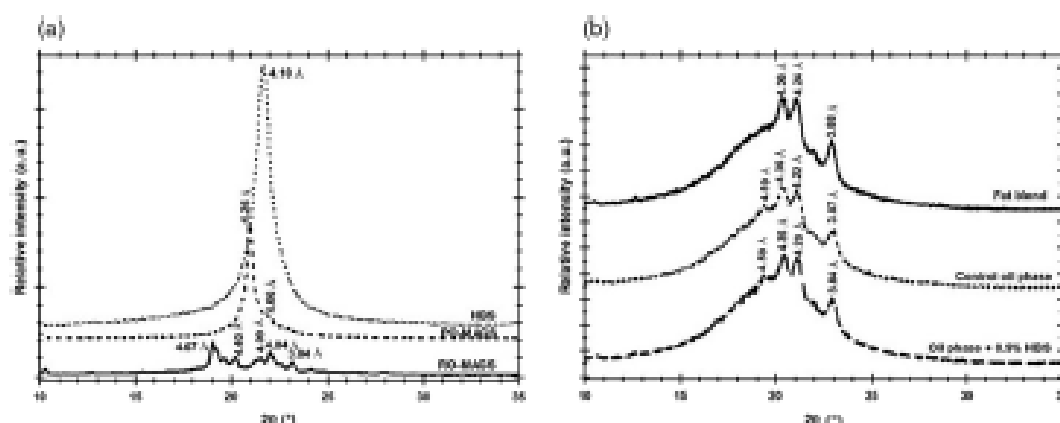


Fig 1 X-ray diffraction patterns of (a) the HBS, the palm oil MAG (PO-MAG), and the rapeseed oil MAG (RO-MAG) and of (b) the palm oil based-model fat blend, the control oil phase, and the oil phase with 0.9% HBS

The predominant HMT in the control oil phase were the di- and trisaturated POB/PO, PPP, and POC/PSO, making up 51.8% w/w of the total TAG. Mono-, di-, and trisaturated MMT such as PPL and SOO made up 14.7% w/w of the total TAG of the oil phase. Finally, 26.9% w/w of the oil phase was composed of LMT, mainly POO and PLO. It is well known that these TAG are the predominant ones in palm oil and its derivatives (Nor Aini and Miskandar, 2007).

The TAG present in HBS were trisaturated, showing molecules with 52 or more carbons, like BBS, SSS, BSA, SSB, BSP, and PSS. We think that these long molecules in HBS with melting points above 50 °C could be the ones responsible for any crystallization enhancement when interacting with the di- and trisaturated TAG of the palm oil-based model fat blend.

### X-Ray Diffraction

X-ray diffraction of our samples in the wide-angle X-ray scattering region,  $10^\circ < 2\theta < 24^\circ$ , are shown in Fig. 1. Fig. 1a shows the patterns of the HBS and the MAG RO-MAG and PO-MAG, while Fig. 1b shows the patterns of the palm oil based-model fat blend, the control oil phase, and the oil phase with 0.9% HBS.

Native HBS displayed a single reflection at 4.10 Å in the wide-angle region (Fig. 1a), which corresponds to the  $\alpha$  polymorphic form according to Almadil et al. (2008). These same authors reported that it is not uncommon for very high-melting TAG to form a crystal. The wide-angle reflections at 4.26 and 4.06 Å for PO-MAG corresponded to the  $\beta'$  polymorphic form (Yap et al., 1989). RO-MAG, on the other hand, displayed reflections at 4.57, 4.40, 4.09, 4.04, and

3.38 Å, which could be characteristic of mixtures of polymorphs (Fig. 1a). However, the intensity of the reflections in this last sample was much lower than the intensity of the reflections in HBS and PO-MAG. This is most probably due to the higher unsaturated fatty acid content of RO-MAG and corresponding higher amounts of liquid oil under the analysis conditions (Preparation of the Palm Oil-Based Model Fat Blend, Oil Phases, and W/O Emulsions section).

For the palm oil-based model fat blend, the control oil phase, and the oil phase with 0.9% HBS (Fig. 1b), wide-angle reflections were observed at 4.35, 4.21–4.24, and 3.38 Å, respectively, which correspond to the  $\beta'$  polymorphic form in agreement with previous observations in palm oil (Yap et al., 1989). The control oil phase and the oil phase with 0.9% HBS also showed a reflection corresponding to 4.59 Å, characteristic of the  $\beta$  polymorph (Yap et al., 1989). This indicates that, once the emulsifiers were added, a mixture of  $\beta'$  and  $\beta$  polymorphs is obtained. However, it can be observed that  $\beta'$  polymorph peak intensities are higher than the  $\beta$  polymorph one, with  $\beta'$  then being the predominant polymorph in the oil phases, which is the desired polymorph in margarines (Nor Aini and Miskandar, 2007).

### Crystallization and Melting Profiles

#### HBS

Crystallization and melting profiles of the HBS are shown in Fig. 2a. A crystallization exotherm was detected at  $T_c = 51.6$  °C with a crystallization enthalpy  $\Delta H_c$  of  $132.4 \text{ J g}^{-1}$  and a melting endotherm at  $T_m = 58.7$  °C with a melting enthalpy  $\Delta H_m$  of  $132.1 \text{ J g}^{-1}$ . These results are in agreement with

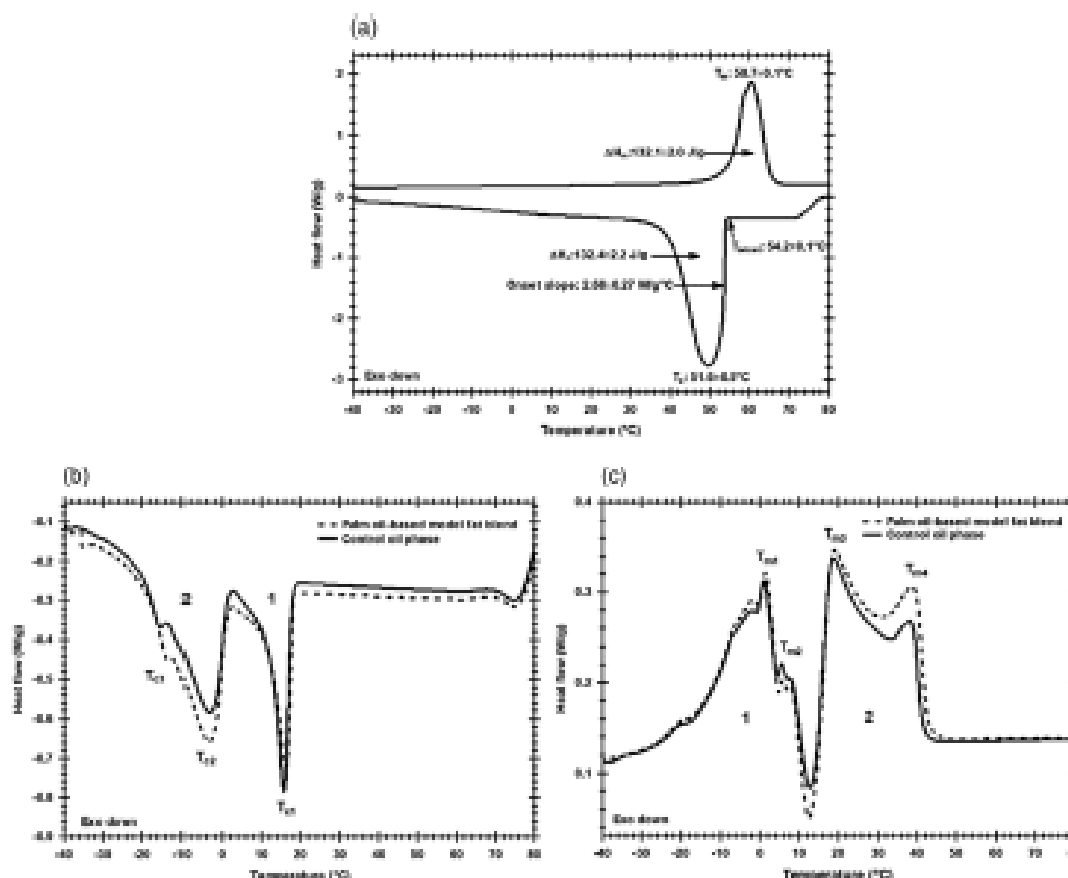


Fig 2 (a) Crystallization and melting profile of the high behenic stabilizer (HBS) and (b) crystallization and (c) melting profile of the palm oil based-model fat blend and the control oil phase

predictions stemming from the TAG composition (Table 1), which shows that HBS is mainly composed of saturated molecules with 52 or more carbons and melting points above 50 °C. In addition, we obtained the onset slope of crystallization, which started at 54.2 °C and had a value of  $2.68 \text{ W g}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}$ .

#### Palm Oil-Based Model Fat Blend and Oil Phases

The crystallization and melting profiles of the palm oil-based model fat blend and the control oil phase are shown in Fig. 2b, c. In all samples, two major exothermic regions, denoted as 1 and 2 (Fig. 2b), were evident. Exothermic region 1 had one distinctive peak  $T_{c1}$ , and exothermic region 2 had two distinctive peaks  $T_{c2}$  and  $T_{c3}$ . Based on the position of the crystallization peaks, we propose that exothermic region 1 is due to the HMT and MMT

(e.g., POH/PO, PPP, PPL, and POS), while exothermic region 2 is due to the LMT (e.g., POO and PLO), as reported previously in palm oil systems (Tan and Nehdi, 2012). The same behavior was evident in the melting profile with two large endothermic regions, each one having two distinctive peaks, denoted as  $T_{m1}$  and  $T_{m2}$  for the first region and  $T_{m3}$  and  $T_{m4}$  for the second region (Fig. 2c). Thermograms of the palm oil-based model fat blend and the control oil phase were very similar, with no significant differences in their thermal parameters (i.e.,  $T_{onset}$ ,  $T_c$ ,  $T_m$ , or crystallization onset slope;  $P > 0.05$ ). This indicates that the amount of emulsifiers incorporated did not affect the thermal behavior of the oil phase.

Fig. 3a, b show the crystallization behavior of the control oil phase and the oil phases containing 0.3, 0.6, and 0.9% HBS. Exothermic region 2 showed no changes in the two

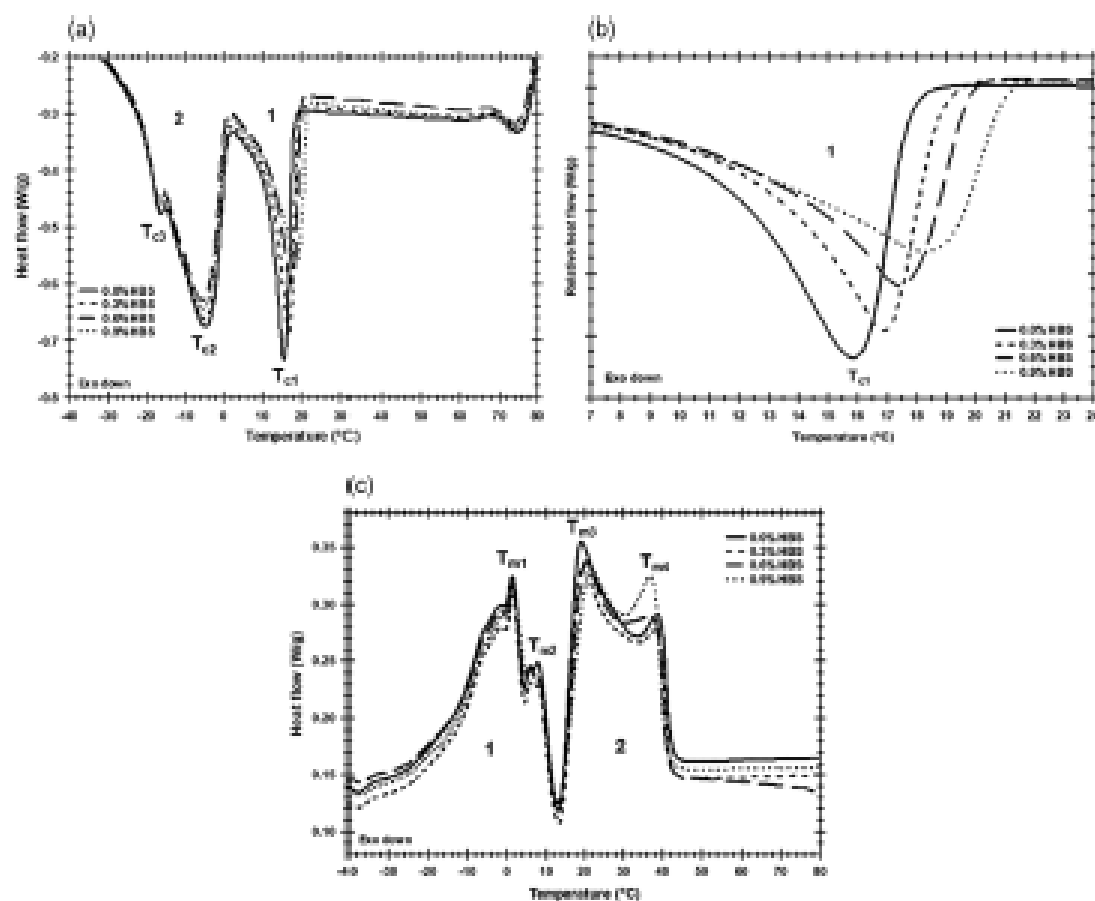


Fig 3 (a) Crystallization profile, (b) zoom of the exotherm 1, and (c) melting profile of the oil phase in function of the high olefinic stabilizer (HOS) concentration

temperature values at which the peaks of crystallization appeared between the control oil phase and the oil phases with added HBS ( $\bar{T}_{c2}$ :  $-4.1 \pm 0.1$  °C and  $\bar{T}_{c1}$ :  $-16.1 \pm 0.2$  °C;  $P > 0.05$ ). The enthalpy in exothermic region 2 was computed as  $\Delta\bar{H}_{c2}$ :  $28.3 \pm 1.2$  J g $^{-1}$  for all four samples ( $P > 0.05$ ). On the other hand, exothermic region 1 did show changes in the crystallization kinetics, even though the crystallization enthalpy remained the same,  $\Delta\bar{H}_{c1}$ :  $13.5$  J g $^{-1}$  ( $P > 0.05$ ). With regard to this, Table 2 displays the changes in the crystallization temperatures  $T_{onset}$  and  $T_{c1}$ , the melting temperatures  $T_{m1}$  and  $T_{m2}$ , the degree of undercooling ( $\Delta T$ ), and the onset slope of crystallization. The onset temperature and the temperature of the first peak went from  $T_{onset}$ :  $17.9 \pm 0.3$  °C and  $T_{c1}$ :  $16.1 \pm 0.3$  °C for the control oil phase to  $T_{onset}$ :  $21.4 \pm 0.2$  °C and  $T_{c1}$ :  $19.0 \pm 0.2$  °C with 0.9% HBS added ( $P < 0.05$ ). These

changes are due to the cocrystallization between the HBS and the HMT of the palm oil-based model fat blend, in line with previous observations of Peyronel et al. (2016) and Kim and Marangoni (2017). In this case, the HBS acted as a heterogeneous seed for unsaturated TAG like PPP (79%), PPS (19%), and SSS (0.5%) present in our fat blend, crystallizing first and then serving as a surface upon which these TAG would crystallize.

The increase in the  $T_{onset}$  and  $T_{c1}$  of the exothermic region 1 in the function of the HBS concentration can be correlated to the degree of undercooling of the oil phase ( $\Delta T$ ), as shown in Table 2. Less undercooling indicates that less energy is required for the development of solids. It is also shown in Table 2 that the onset slope of crystallization decreased with the increase of the amount of HBS. As the units of the slope are W g $^{-1}$ °C, a decrease in this parameter

**Table 2** Crystallization and melting parameters of the oil phase and the 35/65 W/O emulsion that changed in function of the high behavior stabilizer (HBS) concentration.

OIL PHASE*								
HBS (%)	$T_{onset}$ (°C)	$T_{c1}$ (°C)	$T_{c2}$ (°C)	$T_{m1}$ (°C)	$\Delta T$ (°C)	Onset slope (W g <sup>-1</sup> °C)		
0.0	17.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	16.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	19.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	39.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	22.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.03 <sup>a</sup>		
0.3	19.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	17.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	19.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	38.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	21.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>b</sup>		
0.6	19.9 ± 0.3 <sup>c</sup>	17.9 ± 0.3 <sup>c</sup>	20.3 ± 0.2 <sup>c</sup>	37.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	19.3 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>c</sup>		
0.9	21.4 ± 0.2 <sup>d</sup>	19.0 ± 0.2 <sup>d</sup>	21.6 ± 0.2 <sup>d</sup>	37.0 ± 0.2 <sup>d</sup>	18.0 ± 0.1 <sup>d</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>d</sup>		
35/65 W/O emulsion*								
HBS (%)	$T_{onset}$ (°C)	$T_{c1}$ (°C)	$T_{c2}$ (°C)	$T_{m1}$ (°C)	$\Delta T$ (°C)	Onset slope (W g <sup>-1</sup> °C)	$\Delta H_{c1}$ (J g <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{c2}$ (J g <sup>-1</sup> )
0.0	19.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	18.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	19.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	39.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	21.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	21.9 ± 2.5 <sup>a</sup>
0.3	19.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	18.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	19.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	38.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	20.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.03 <sup>b</sup>	9.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	21.6 ± 1.6 <sup>a</sup>
0.6	20.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	18.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	19.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	37.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	19.0 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>c</sup>	9.0 ± 0.3 <sup>b</sup>	16.3 ± 1.9 <sup>b</sup>
0.9	21.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	19.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	20.8 ± 0.2 <sup>c</sup>	37.0 ± 0.2 <sup>c</sup>	17.7 ± 0.2 <sup>d</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>d</sup>	9.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	16.3 ± 1.7 <sup>b</sup>

\* Mean ± standard deviation, n = 4

<sup>a</sup> For the same column, different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup>  $\Delta T$ : Degree of undercooling defined as  $T_{m1} - T_{c1}$ ,  $\Delta H_c$ : Crystallization enthalpy.

indicates that less energy was required per gram and per temperature degree for the crystallization to continue its process. Changes in the onset slope of crystallization due to the addition of nucleating agents (e.g., HBS) have not been previously reported in fat and oil systems. However, there are reports of this effect in polyoxymethylene with polyamide added as the nucleating agent (Hu and Ye, 2005).

The melting profiles of the control oil phase and the three oil phases containing 0.3, 0.6, and 0.9% HBS are shown in Fig. 3c. These profiles showed the same trend as the crystallization profiles, where two large endothermic regions appeared, each one having two distinctive peaks denoted as  $T_{m1}$ ,  $T_{m2}$ ,  $T_{m3}$ , and  $T_{m4}$ . The endothermic region for the lowest temperature region (endothermic region 1) was associated with the LMT, while the endothermic region for the highest temperature range (endothermic region 2) was associated with MMT and HMT of the palm oil based-model fat blend. Similar to the observations performed on the crystallization kinetics, the temperature peak values for endothermic region 1 did not change between the control and the oil phases with HBS ( $\bar{T}_{m1}$ : 1.6 ± 0.1 °C and  $\bar{T}_{m2}$ : 8.1 ± 0.1 °C). However, endothermic region 2 shows that the temperature values and the intensity of the two observed peaks,  $T_{m3}$  and  $T_{m4}$ , varied depending on the amount of HBS added (Fig. 3c and Table 2). As the amount of this stabilizer was increased, the temperature of the peak named  $T_{m3}$  shifted to higher temperatures, and its intensity decreased, while the temperature value of the peak named  $T_{m4}$  shifted to a lower temperature and higher intensity. This behavior in the melting

profile of the oil phase agrees with the cocrystallization between the HMT and the HBS previously explained and indicates that this stabilizer not only acted as a diluent for HMT but also for MMT.

#### W/O Emulsion

Fig. 4 show the crystallization and melting profile of the W/O emulsions in the function of the HBS concentration. Fig. 4a, b show the crystallization profile for the control emulsion and the three emulsions with HBS added to the oil phase in 0.3, 0.6, and 0.9% concentration, where the three crystallization exothermic regions were observed and named 1, 2, and 3. Exothermic regions 1 and 2, which included the peaks  $T_{c1}$ ,  $T_{c2}$ , and  $T_{c3}$ , were associated with the crystallization of the TAG present in the palm oil-based model fat blend according to the observations for the oil phase (Fig. 3). Exothermic region 3 was associated with the crystallization of the aqueous phase (Nor Hayati et al., 2009) showing the same temperature for the crystallization peak for all samples,  $\bar{T}_{c3}$ : -19.4 ± 2.3 °C ( $P > 0.05$ ). The addition of HBS caused similar changes to the  $T_{onset}$ ,  $T_{c1}$ , and the crystallization onset slope as in the oil phase for exothermic region 1 of the emulsion, as shown in Table 2. These changes also caused a decrease in the degree of undercooling of the emulsion, going from 21.0 to 17.7 °C without and with 0.9% of HBS ( $P < 0.05$ , Table 2). Even though the trend was similar as in the oil phase, changes in the mentioned crystallization parameters in the W/O emulsion occurred to

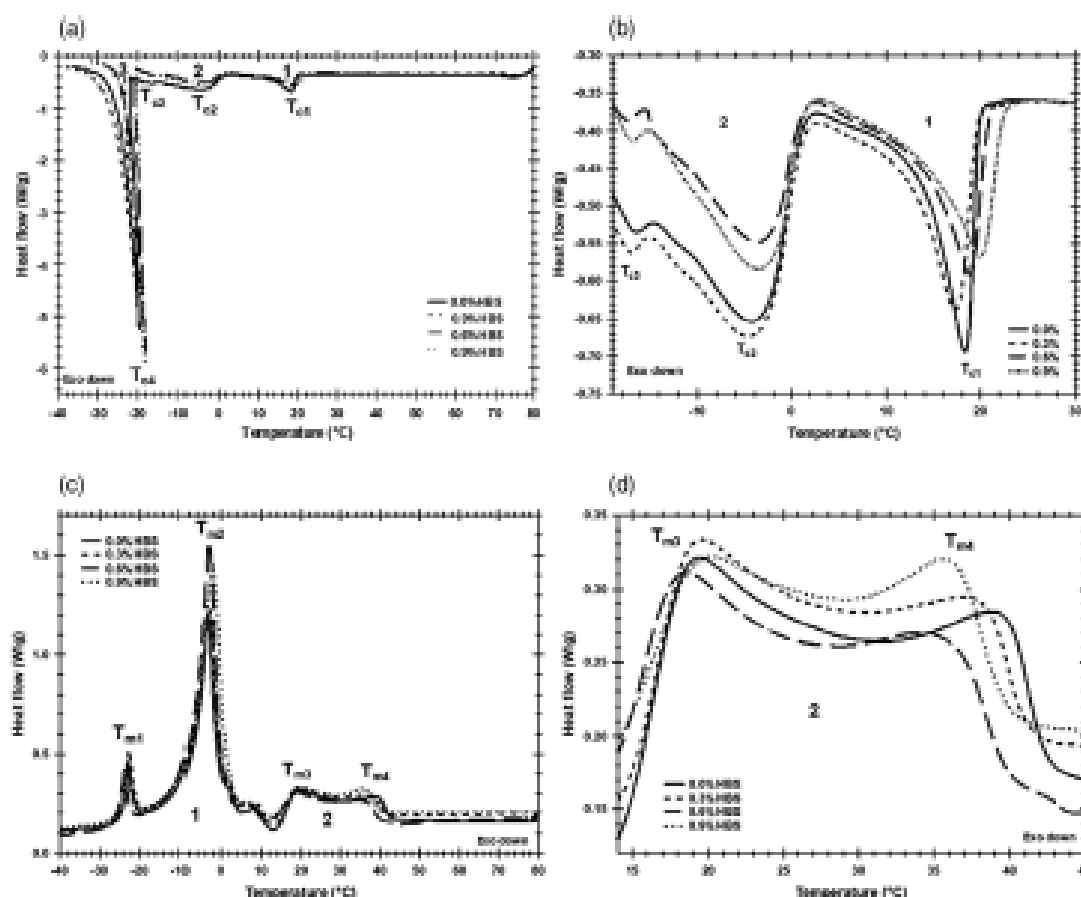


Fig 4 (a) Crystallization profile, (b) zoom of the exotherms 1 and 2, (c) melting profile, and (d) zoom of the endotherm 2 of the 35/65 W/O emulsion in function of the high hebeic stabilizer (HBS) concentration

a lesser extent because of the 35% water content in the emulsion.

In contrast to the observations for the oil phase, the addition of HBS to the W/O emulsion did cause significant changes in the crystallization enthalpy in exothermic regions 1 and 2, going from  $\Delta H_{c1}$ :  $10.0 \pm 0.5 \text{ J g}^{-1}$  to  $9.2 \pm 0.1 \text{ J g}^{-1}$  and from  $\Delta H_{c2}$ :  $21.9 \pm 2.5 \text{ J g}^{-1}$  to  $16.3 \pm 1.3 \text{ J g}^{-1}$  for the emulsions without and with 0.9% HBS added, respectively ( $P < 0.05$ ; Table 2). The results shown suggest that the addition of HBS not only forms crystals at higher temperatures in the W/O emulsion but does so faster with a lower crystallization enthalpy.

The melting profiles of the W/O emulsions are presented in Fig. 4c, d, where two endothermic regions were observed and identified as 1 and 2. Endothermic region 1 included the peaks  $T_{m1}$  and  $T_{m2}$  and was associated with

the melting of the aqueous phase and the LMT, while endothermic region 2 had two peaks denoted as  $T_{m3}$  and  $T_{m4}$  and included the melting of MMT and HMT of the palm oil-based model fat blend. Similar to the observation for the oil phase, the addition of HBS caused slight but significant changes only in endothermic region 2, where a better dissolution of the MMT and HMT of the palm oil-based model fat blend in the emulsion and the interaction of the HMT with the HBS were represented by changes in the intensity and the temperature of the peaks  $T_{m3}$  and  $T_{m4}$  (Table 2), according to what was observed in the melting profile of the oil phase (Fig. 3c).

#### Interfacial Tension of the W/O Emulsions

The results of the interfacial tension for the palm oil-based model fat blend, the control oil phase, and the oil phases

**Table 3** Interfacial tension ( $\gamma$ ) of the palm oil-based model fat blend and the oil phase added with high behenic stabilizer (HBS) with the aqueous phase at 75 °C.

Sample	$\gamma$ at 75 °C ( <i>dynes/cm</i> ) <sup>a</sup>
Model fat blend / Aqueous phase without salts	14.9 ± 0.6 <sup>c</sup>
Model fat blend / Aqueous phase with salts	11.7 ± 0.4 <sup>b</sup>
Oil phase without HBS / Aqueous phase without salts	3.5 ± 0.3 <sup>a</sup>
Oil phase without HBS / Aqueous phase with salts	2.1 ± 0.2 <sup>d</sup>
Oil phase with 0.3% HBS / Aqueous phase with salts	2.1 ± 0.1 <sup>d</sup>
Oil phase with 0.6% HBS / Aqueous phase with salts	2.0 ± 0.3 <sup>d</sup>
Oil phase with 0.9% HBS / Aqueous phase with salts	2.0 ± 0.2 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Mean ± standard deviation, n = 4.

<sup>b</sup>For the same column, different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

with added HBS when studied vs. the aqueous phase made with and without the addition of salts are displayed in Table 3. As shown, the interfacial tension of the palm oil-based model fat blend vs. the aqueous phase was significantly lower when salts were used to prepare the aqueous phase (11.7 vs. 14.9  $\text{dynes cm}^{-1}$ ;  $P < 0.05$ ). The same behavior was also observed when analyzing the control oil phase and the aqueous phase with and without salts (Table 3).

The addition of RO-MAG, PO-MAG, and soybean lecithin to create the oil phase seems to have a drastic impact on the interfacial tension when using salts in the aqueous phase. Notice how much the surface tension decreased, going from 11.7  $\text{dynes cm}^{-1}$  for the palm oil-based model fat blend to 2.1  $\text{dynes cm}^{-1}$  in the control oil phase ( $P < 0.05$ ; Table 3). This 82.1% decrease in the interfacial tension demonstrates that the emulsifiers act at the interface, minimizing the contact area between the hydrophilic and hydrophobic regions (aqueous and oil phases).

In contrast and as expected, the effect of HBS as an apolar molecule was not noticed in the results of the

interfacial tension, which was the same for all three concentrations used and the oil phase without HBS,  $\bar{\gamma}$ : 2.1 ± 0.2  $\text{dynes cm}^{-1}$ , as shown in Table 3. This confirmed that HBS is not forming any complex with the nonpolar part of the emulsifiers in the interface but is merely having an effect on the bulk crystallization of the palm oil-based model fat blend.

### Microstructure

The microstructural parameters of the W/O emulsions at 18 °C containing three different concentrations of HBS are shown in Table 4: percentage of solid material, the number of crystals, and the equivalent diameter of crystals. Results indicated that the addition of HBS caused an increase in the amount of crystallized material and in the number of crystals, as well as a decrease in the equivalent diameter of crystals. The total amount of crystallized material changed from 11.9% for the control W/O emulsion to 23.8% when 0.9% of HBS was added. This indicates an increase of almost 12% of solid material with the addition of 0.9% of HBS. These results agree with results in the literature (Kim and Marangoni, 2017; Peyronel et al., 2016).

Values obtained for the two-dimensional box-counting fractal dimension ( $D_f$ ) are shown in Fig. 5. They increased from 1.4 for the control emulsion to 1.6 for the emulsion containing 0.9% HBS ( $P < 0.05$ ). This slight but significant increment in the  $D_f$  indicates that the crystals fill space in a more homogeneous and dense fashion when increasing the amount of HBS, consistent with greater nucleation, as shown by Tang and Marangoni (2006). In addition, having smaller crystals with the addition of HBS is beneficial as they help prevent oil migration and grittiness in fats, as previously reported by Dibildox-Alvarado et al. (2004).

### Solid Fat Content

Fig. 6 shows the SPC of the W/O emulsions at 18 °C. The SPC increases with added HBS, from 19.4% for the control emulsion to 23.8% for the emulsion with 0.9% HBS ( $P < 0.05$ ). This 4.4% increase in SPC by the addition of only 0.9% HBS is indicative of the cocrystallization of HBS with the palm oil-based model fat blend TAG. This result is in agreement with the observed increase in the number of crystals as shown in the micrographs (Fig. 5), as previously reported (Kim and Marangoni, 2017; Nor Hayati et al., 2009; Peyronel et al., 2016).

The SPC value of 23.8% for the palm oil-based reduced-fat W/O emulsion with only 0.9% HBS added is close to the one reported by Nor Aini and Miskandar (2007) for a palm oil-based margarine with 80% fat (i.e., ~28%), which

**Table 4** Microstructural parameters of the 358S W/O emulsion at 18 °C in function of the high behenic stabilizer (HBS) concentration

HBS concentration (%)	Crystallized material (%)	Number of crystals	Equivalent diameter ( $\mu\text{m}$ )
0.0	11.9 ± 0.3a	1098 ± 42a	3.0 ± 0.1a
0.3	15.6 ± 0.8b	1396 ± 37b	3.0 ± 0.1a
0.6	17.2 ± 0.1c	1835 ± 76c	2.3 ± 0.1b
0.9	23.8 ± 0.2d	2305 ± 43d	2.6 ± 0.1c

Mean ± SD, n = 4.

The letters in subscript indicate the statistical analysis: For the same column, different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

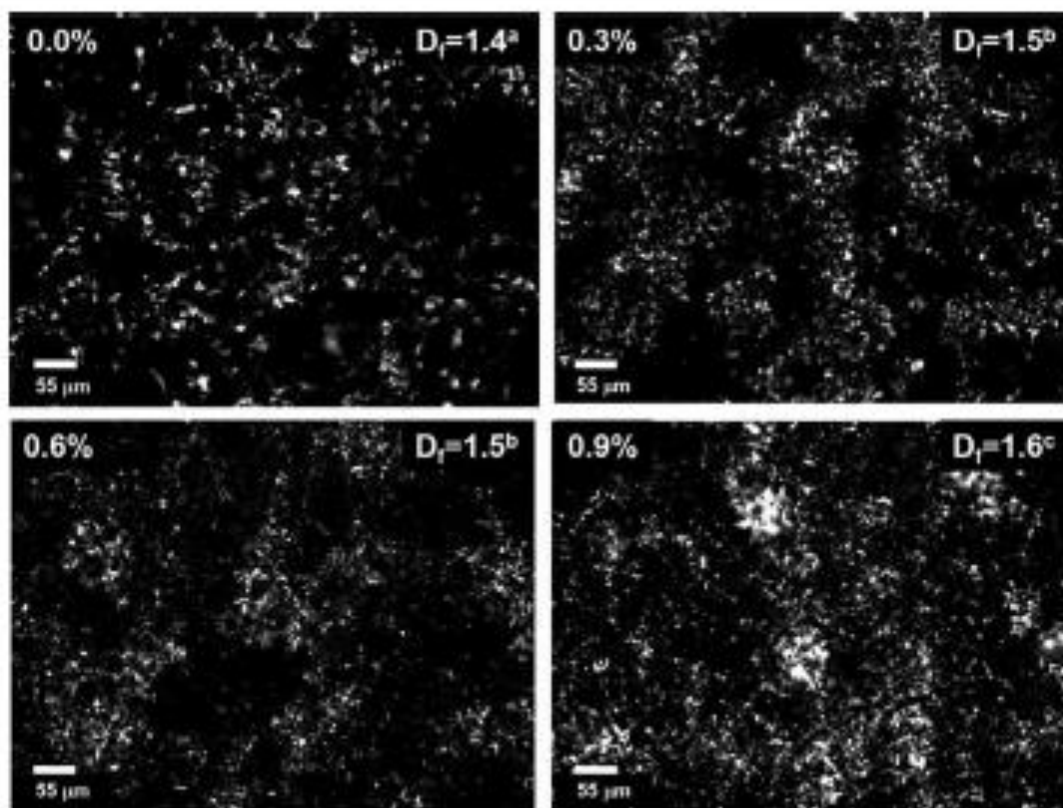


Fig 5 Microstructure of the 35/65 W/O emulsion with its two-dimensional fractal dimension ( $D_f$ ) at 18 °C in function of the high behavior stabilizer (HBS) concentration (different letters indicate significant difference;  $P < 0.05$ )

means that the crystallization and microstructure of our emulsion was enhanced by the addition of low concentrations of HBS (up to 0.9%).

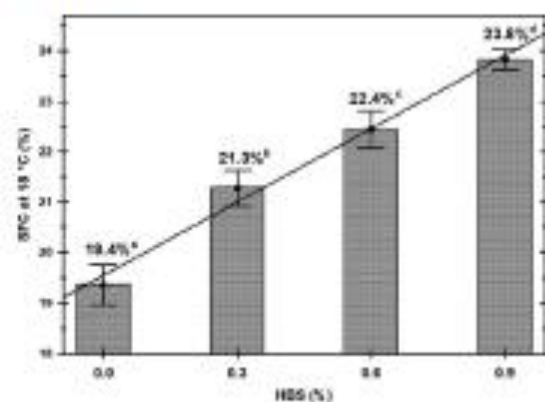


Fig 6 Solid fat content (SFC) of the 35/65 W/O emulsion at 18 °C in function of the high behavior stabilizer (HBS) concentration

Finally, it was possible to fit the data from Fig. 6 with a linear fit with  $r^2 = 0.99$  (Eq. (1)).

$$y = 4.85x + 19.55 \quad (1)$$

Equation (1) can be used to predict the amount of stabilizer needed to be added to industrial margarine in order to achieve a specific functionality at 18 °C.

## Conclusions

We manufactured a W/O emulsion that can be used as a fat-reduced margarine using a palm oil-based model fat blend. The particular blend used in this research allowed a 15% reduction in the total amount of added fat. We have shown that the addition of only 0.9% HBS creates more and smaller crystals and promotes crystallization at higher temperatures than the control emulsion with no HBS added. The W/O emulsion contained crystalline material in the desired  $\beta'$  polymorphic form with a small amount of the  $\beta$



polymorph. This  $\beta$  polymorph was attributed to the MAG blend used as emulsifiers that become part of the interface of the emulsion, as shown by the interfacial experiments. The interface experiments also showed that the HBS is located only in the oil phase. It is believed that a higher SPC and the fact that HBS cocrystallized with the HMT TAG of the palm oil-based model fat blend are an indication that the material is stronger compared with the control.

We propose a simple linear equation to predict how much HBS will be needed to obtain a desired SPC for this particular palm oil-based model fat blend.

**Acknowledgments** The authors thank *Palgaard Industrias de Mexico, S. de R.L. de C.V.*, for providing the samples, as well as support for the elaboration of margarines under the direction of M.C. Andrés Ramírez and Eng. Emma Sandoval. Marisol Cardova-Barragan thanks CONACYT (National Council of Science and Technology) Mexico, for the scholarship #387530 provided for her graduate studies.

**Conflict of Interest** The authors declare that they do not have conflict of interest.

## References

- Ahmed, L., Wright, A., & Marangoni, A. (2008) Chemical and enzymatic interesterification of tristearin/triolein-rich blends: Microstructure and polymorphism. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110:1025–1034.
- AOCS. American Oil Chemists' Society. (2009) *Official methods and recommended practices of the American oil Chemists Society* (5th ed.). Urbana, IL: AOCS Press.
- Basso, R. C., Ribeiro, A. P., Mauchi, M. H., Givellli, L. A., Gonçalves, L. A., Santos, A., ... Grimaldi, R. (2010) Tripalmitin and monoacylglycerols as modifiers in the crystallization of palm oil. *Food Chemistry*, 122:1185–1192.
- de Oliveira, G., Ribeiro, A. P., dos Santos, A., Cardoso, L. P., & Kinoshita, T. O. (2015) Hard fats as additives in palm oil and its relationships to crystallization process and polymorphism. *Food Science and Technology*, 63:1163–1170.
- Díbildez-Alvarado, E., Neves-Rodríguez, J., Givellli, L. A., Toro-Vázquez, J. P., & Marangoni, A. G. (2004) Effects of crystalline microstructure on oil migration in a semisolid fat matrix. *Crytal Growth & Design*, 4:731–736.
- Garbolino, C., Bartocci, M., & Flöter, E. (2005) The influence of emulsifiers on the crystallization behaviour of a palm oil-based blend. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107:616–626.
- Greenwell, B. A. (1981) Chilling and crystallization of shortenings and margarines. *Journal of American Oil Chemists Society*, 58:206–208.
- Henson, I. E. (2012) A brief story of the oil palm. In O. M. Lai, C. P. Tan, & C. Akoh (Eds.), *Palm oil, production, processing, characterization and uses*. Urbana, IL: AOCS Press.
- Hu, Y., & Ye, L. (2005) Nucleation effect of polyamide on poly- $\alpha$ -methylene. *Polymer Engineering & Science*, 45:1174–1179.
- Journey to Forever. (2020, July 13) *Oil yields and characteristics*. Retrieved from [http://journeytoforever.org/indonesi\\_yield.html](http://journeytoforever.org/indonesi_yield.html)
- Kim, G. Y., & Marangoni, A. G. (2017) Engineering the nucleation of edible fats using a high hydroxyl stabilizer. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119:1–13.
- NMX-F-165-SCFI 2007. Alimentos – Margarina para uso industrial – Especificación; Oficial Mexican Standard. Food-Margarines for industrial use- Specifications.
- Nur Aini, I., & Mirkandar, M. S. (2007) Utilization of palm oil and palm products in shortenings and margarines. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109:422–432.
- Nur Hayati, I., Che Man, Y., Tan, C. P., & Nur Aini, I. (2009) Thermal behavior of concentrated oil-in-water emulsions based on soybean oil and palm kernel olefin blends. *Food Research International*, 42:1223–1232.
- Peyronel, F., Campos, R., & Marangoni, A. G. (2016) Prevention of oil migration in palm mid fraction and palm olein using a stabilizer rich in behenic acid. *Food Research International*, 88:52–60.
- Ribeiro, A. P., Mauchi, M. H., Miyazaki, E. K., Dominguez, M. A., Stroppa, V. L., de Oliveira, G., & Kinoshita, T. O. (2014) Crystallization modifiers in lipid systems. *Journal of Food Science*, 52:3925–3946.
- Shahbandeh, M. (2020, July 13) *Consumption of vegetable oils worldwide from 2013/2014 to 2019/2020, by oil type*. Retrieved from <https://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oil-global-consumption>
- Tan, C. P., & Nebel, I. A. (2012) The physicochemical properties of palm oil and its components. In O. M. Lai, C. P. Tan, & C. Akoh (Eds.), *Palm oil, production, processing, characterization and uses*. Urbana, IL: AOCS Press.
- Tang, D., & Marangoni, A. G. (2006) Microstructure and fractal analysis of fat crystal networks. *Journal of American Oil Chemists Society*, 83:377–388.
- Vander Wal, R. I. (1963) The determination of glyceride structure. *Journal of American Oil Chemists Society*, 40:242–247.
- Yap, P., De Man, J., & De Man, L. (1989) Polymorphic stability of hydrogenated canola oil as affected by addition of palm oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, 66:1784–1791.