

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTÀ DI AGRARIA

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

**Morfologia e struttura microscopica della superficie di
cioccolato sottoposto a diverse procedure di tempra**

Tutori Universitari:
Prof. Luigi Cristofolini
Prof. Franco Antoniazzi

Tirocinante:
Damiano Puggia

Dipartimenti di FISICA ed
INGEGNERIA INDUSTRIALE

Anno Accademico 2010-2011

Alla mia famiglia

INDICE

Introduzione 1

Stato dell'arte 3

La composizione del cioccolato 3

Composizione del burro di cacao 4

Cristallizzazione e polimorfismo del burro di cacao 5

I difetti del cioccolato 6

Affioramento del grasso 6

Affioramento dello zucchero 8

Modelli che descrivono l'affioramento del grasso 9

Materiali e Metodi 12

Costruzione della Camera Termostata 12

Il Cioccolato 13

Preparazione campioni 14

Trattamenti di tempra 15

Piano Sperimentale 18

Analisi Morfologica Superficiale 18

Microscopio a Forza Atomica 19

Microscopio ottico 23

Analisi Strutturale 28

Calorimetria a Scansione Differenziale 29

Analisi colorimetrica 34

Analisi statistica 35

Risultati 36

Rugosità 36

Polimorfismo del burro di cacao 38

Whiteness Index 42

Conclusioni 44

Possibili sviluppi 46

Bibliografia 47

Introduzione

Il cioccolato e la sua produzione hanno sviluppato in Italia, nel 2009, un giro d'affari di 3,76 miliardi di euro (fonte: A.I.D.I., 2009). Il valore del mercato comporta un marcato interesse, da parte dell'industria dolciaria, nel diminuire i volumi di prodotto considerato difettoso.

Il cioccolato viene comunemente dichiarato di scarsa qualità se sono presenti difetti, come ad esempio l'affioramento in superficie del burro di cacao - fenomeno conosciuto come *fat blooming*. La dinamica con cui tale fenomeno avviene è stata molto studiata (Couzens and Wille, 1997; Ghosh, Ziegler and Anantheswaran, 2002; Hodge and Rousseau, 2002; Aguilera, Michel and Mayor, 2004; Smith and Dahlman, 2005).

Nonostante i vari metodi d'analisi che possono essere utilizzati al fine di monitorare le trasformazioni superficiali del cioccolato, non si è ancora in grado di comprendere a fondo i meccanismi che regolano tali mutazioni, né di poterne definire a priori i tempi e le modalità con cui queste avverranno. Questo lavoro si inserisce quindi nell'ottica generale di ampliare le conoscenze sia sulle tecniche d'indagine che sui fenomeni sopracitati.

Attraverso diversi trattamenti di tempra si sono prodotti - dalla stessa matrice di cioccolato fondente - campioni con caratteristiche morfologiche e superficiali differenti. E' possibile attribuire tale eterogeneità ai soli trattamenti di tempra grazie alla conservazione del cioccolato nelle medesime condizioni di temperatura ed umidità, prive di sostanziali oscillazioni ed esposizioni a temperature critiche.

Obiettivo specifico del lavoro è stato quello di comprovare le diverse caratteristiche dei campioni ipotizzate, quindi trarne le possibili conclusioni. Tutto ciò tramite un approccio a

più livelli d'analisi del cioccolato e della sua frazione grassa. Ai valori di *rugosità* (microstruttura) infatti sono stati associate analisi calorimetriche sulla matrice del cioccolato (polimorfismo) in modo da correlare la crescita cristallina in superficie con l'evoluzione delle fasi morfologiche presenti nel burro di cacao. A tali analisi si è associata quella colorimetrica con il fine di monitorare la percezione visiva - macroscopica - del fenomeno.

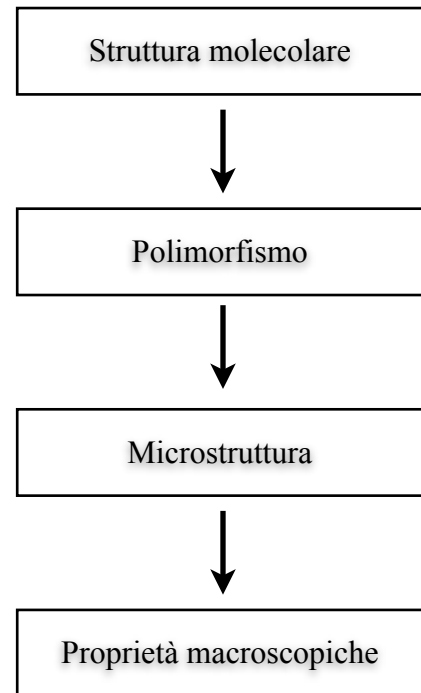


Figura 1. I vari livelli di analisi della frazione grassa che determinano le proprietà macroscopiche

Stato dell'arte

LA COMPOSIZIONE DEL CIOCCOLATO

L'Unione Europea definisce il cioccolato come il prodotto ottenuto da prodotti di cacao e zuccheri che presenta un tenore minimo di sostanza secca totale di cacao del 35%, di cui non meno del 18% di burro di cacao e non meno del 14% di cacao secco sgrassato (DLgs 12 /06/ 2003, n. 17, (allegato 1); attuazione Dir. 2000/36/CE).

Dal punto di vista chimico-fisico, il cioccolato è una sospensione di particelle di zucchero e cacao in una fase continua di grasso (Arlorio, 2004).

La struttura del cioccolato fondente è il risultato di numerose operazioni unitarie che partono dalla preparazione degli ingredienti fino alla fusione degli stessi in un uno stampo (Figura 2).

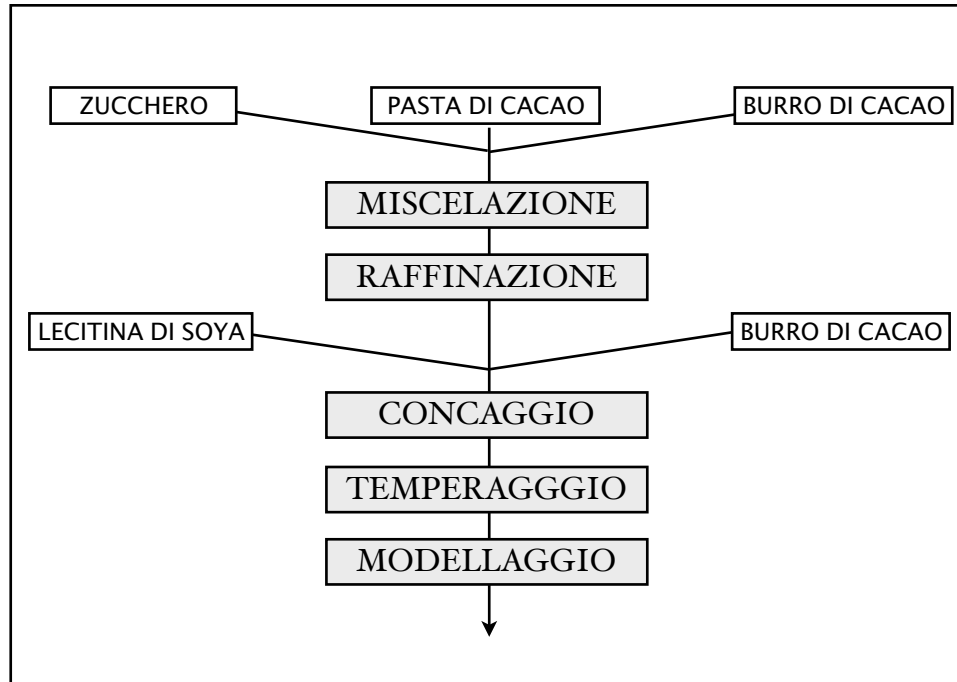


Figura 2. Schema di produzione del cioccolato fondente

COMPOSIZIONE DEL BURRO DI CACAO

I triacilgliceroli rappresentanti circa il 97-98% del burro di cacao (BC) sono costituiti principalmente da acido palmitico (C16:0), stearico (C18:0) ed oleico (C18:1). L'acido oleico è esterificato in preponderanza nella posizione centrale del glicerolo; i trigliceridi rappresentativi del burro di cacao sono infatti POP (palmitico-oleico-palmitico), POS (palmitico-oleico-stearico) e SOS (stearico-oleico-stearico). Il restante 2-3% è composto da una frazione sterolica (Arlorio, 2004). Di seguito nelle tabelle 1 e 2 sono riportate le percentuali dei principali componenti del burro di cacao:

	C 1 4 : 0	C 1 6 : 0	C 1 8 : 0	C 1 8 : 1	C 1 8 : 2	C 2 0 : 0
Min	0,00	24,78	32,86	32,70	1,09	0,82
Media	0,00	26,23	35,76	33,60	2,68	0,93
Max	0,09	26,91	37,68	37,08	3,36	1,10

TABELLA 1. Percentuali degli acidi grassi nei trigliceridi del burro di cacao (Lipp et. al 2000)

	POP	PLP	POS	POO + PLS	SOS	SOO + SLS	OOO
Min	16,80	0,78	38,03	3,09	22,83	3,27	1,02
Media	18,27	1,82	42,08	5,58	26,39	4,64	1,23
Max	19,03	2,08	43,76	9,45	30,02	9,79	1,52

TABELLA 2. Percentuali delle frazioni dei trigliceridi nel burro di cacao (Lipp et. al 2000)

CRISTALLIZZAZIONE E POLIMORFISMO DEL BURRO DI CACAO

Le proprietà di fusione dei triacilgliceroli (TAG) sono influenzate dalla loro composizione e dalla loro distribuzione nel trigliceride. I TAG sono polimorfi: possono cristallizzare nelle forme conosciute come α , β' e β , che si differenziano per punto di fusione e proprietà cristallografiche (Figura 3). Durante il raffreddamento degli acilgliceroli, si assiste alla formazione preponderante di una delle forme cristalline, in rapporto alla velocità del processo. La forma α (sistema esagonale, con terminali metilici sistemati in schema libero) presenta il punto di fusione minore; per riscaldamento essa passa prima alla forma β' (sistema orto-romboidale), poi alla β (sistema triclinico), che è la forma più stabile caratterizzata dal punto di fusione maggiore. Gli acidi grassi insaturi interferiscono con l'impaccamento delle molecole, portando ad una diminuzione del punto di fusione (Arlorio, 2004).

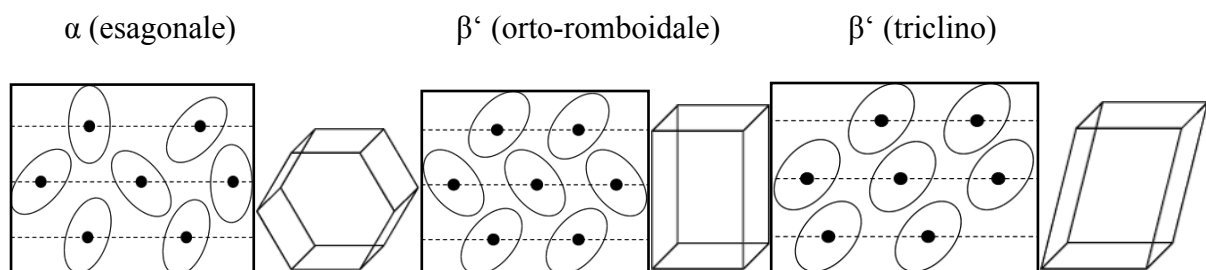


Figura 3. Strutture principali di cristallizzazione del cioccolato fondete (Wille and Lutton 1966)

Il burro di cacao può cristallizzare in sei tipologie di forme cristalline (Forme I-VI), conosciuti appunto come *polimorfi* (Tabella 3).

Polymorphic forms of cocoa butter		Melting point (°C)	Chain packing
Form I	β'_2	16–18	Double
Form II	α	21–22	Double
Form III	Mixed	25.5	Double
Form IV	β_1	27–29	Double
Form V	β_2	32–34	Triple
Form VI	β'_1	34–36	Triple

Sources: Talbot (1999) and Afoakwa et al. (2007a).

TABELLA 3: Punti di fusione e modalità di impaccamento delle catene dei diversi polimorfi

I DIFETTI DEL CIOCCOLATO

Durante le “operazioni” post processo come ad esempio: l’immagazzinamento, la conservazione domestica e la distribuzione, due importanti fenomeni che influenzano negativamente la qualità del cioccolato possono avere luogo: l’affioramento del grasso e dello zucchero (Afoakwa, 2010).

AFFIORAMENTO DEL GRASSO

La migrazione del grasso in superficie, nei prodotti di cioccolata stoccati, è il maggior problema qualitativo che colpisce l’industria del cioccolato mondiale con una perdita annuale di circa 50 milioni €. Il fenomeno si manifesta negativamente nei prodotti sia come diminuzione della durezza superficiale (rammollimento del cioccolato di copertura), sia come affioramento del grasso (Ghosh et. al, 2002).

L’affioramento del burro di cacao dall’interno o del cioccolato di copertura (in prodotti a più fasi) si osserva con la presenza di cristalli sporgenti sulla superficie della cioccolata, i quali disturbano la riflessione della luce e appaiono come uno strato sottile bianco, che di solito occupa tutta la superficie, rendendo il prodotto inaccettabile per il marketing. Sebbene la cioccolata che ha subito affioramento non costituisca pericolo igienico sanitario per il consumatore, il processo rende il prodotto poco attraente. L’affioramento del grasso può essere causato da:

1. insufficiente cristallizzazione della frazione grassa durante il trattamento di tempra;
2. ricristallizzazione della frazione grassa senza appropriata tempra;
3. non omogeneità della cioccolata o della cioccolata di copertura;
4. gradiente di temperatura tra la cioccolata ed il centro del prodotto;

5. inadeguate condizioni di raffreddamento;
6. migrazione del grasso;
7. tatto, conosciuto anche come affioramento da tatto;
8. condizioni di conservazione di umidità e temperatura non appropriate.

Quando il cioccolato è sotto temperato, vi è la formazione di cristalli di tipo IV (β'), che vede i trigliceridi disposti in una struttura interna poco impaccata - conferendo una sensazione di minor durezza al cioccolato. Tale forma tende a trasformarsi nel tempo nei cristalli più impaccati - e desiderabili - di tipo V (β) come sarà possibile notare in Figura 12. Questo processo è influenzato dalla temperatura (Afoakwa, et al., 2008, 2009) .

Durante questa trasformazione fisica, una frazione del burro di cacao rimane allo stato liquido mentre una frazione involge nella forma V solidificando e contraendosi.

Questa trasformazione, in concomitanza al rilascio di energia termica della più stabile delle forme (V), forza il grasso liquido a confluire tra le particelle solide sulla superficie. I cristalli che di conseguenza si allargano impartiscono un'apparenza alla superficie che è conosciuta come affioramento del grasso (Becket, 2008). Naturalmente la forma V si trasforma nella più stabile forma VI, lentamente e durante un periodo di tempo esteso, nuovamente influenzata dalla temperatura. Anche questo processo porta all'affioramento del burro di cacao. (Afoakwa, et al., 2009).

Quando un prodotto ottimamente temperato è conservato ad alte temperature, oppure esposto alla luce del sole, i cristalli di grasso fondono. Durante la ricristallizzazione, in assenza di in-

seminazione che assicura la formazione diretta della forma stabile V, una graduale transizione tra la forma instabile e quella stabile comporta l'affioramento del grasso.

L'affioramento da tatto è causato dallo stesso meccanismo sopracitato ma la causa della fusione di una zona superficiale è l'essere stato a contatto con le mani degli addetti o dell'utente finale.

Infine la temperatura di conservazione può accelerare la velocità con cui le trasformazioni termodinamiche avvengono soprattutto quando vi sono importanti oscillazioni di temperatura (Lia M. Nightingale, Soo-Yeun Lee, and Nicki J. Engeseth, 2010). Viceversa l'eccessiva umidità ha effetto sull'affioramento dello zucchero, come esplicitato di seguito.

A F F I O R A M E N T O D E L L O Z U C C H E R O

L'affioramento dello zucchero viene promosso da condizioni di conservazione non idonee (alta umidità) o a causa di una rapida transizione del prodotto da un'area da bassa ad alta temperatura. Entrambe le condizioni comportano la formazione di condensa sulla superficie del cioccolato con la conseguenza di dissolvere lo zucchero. Quando alla superficie l'acqua evapora, i cristalli di zucchero rimangono sulla superficie, producendo una parvenza bianca.

Questo fenomeno viene confuso a volte con l'affioramento del grasso ma è completamente differente. I due fenomeni possono essere distinti analizzando il campione al microscopio o comunque, più semplicemente, riscaldando la cioccolata a 38°C. I cristalli di zucchero affiorati rimangono visibili. (Afoakwa, 2010)

MODELLI CHE DESCRIVONO L'AFFIORAMENTO DEL GRASSO

Il fenomeno della migrazione in superficie del grasso nel cioccolato può essere modellizzato secondo due modelli distinti, l'uno fa riferimento alla diffusione descritta dalle leggi di Fick, l'altro alla forza capillare, descritta dall'equazione di Lucas•Wahsburn Entrambi i modelli sono ora utilizzati - il secondo solo da pochi anni - e sembrano descrivere il fenomeno, pur basandosi su principi fisici estremamente differenti tra loro, secondo cinetiche che mostrano gli stessi andamenti. Restano tuttavia complementari (Aguilera, Michel and Mayor, 2004).

L'equazione di diffusione di Fick attribuisce il fenomeno dell'affioramento considerando come forza motrice della migrazione lipidica la differenza di concentrazione - della stessa - all'interno di alcuni settori del prodotto (Ghosh et al. 2002). Questa situazione si verifica quando la frazione oleosa, proveniente da un ripieno, avendo una diversa composizione di triacilgliceroli rispetto al burro di cacao, migra attraverso uno strato di cioccolato. Tuttavia, la presenza di gradienti di concentrazione nel cioccolato fondente all'interno di una fase, omogenea e liquida, del burro di cacao non si verificano frequentemente. Nella migliore delle ipotesi, si può affermare che l'esatto meccanismo di migrazione del grasso o dell'olio nei prodotti di cioccolato non sia ancora stato ben compreso (Aguilera, Michel and Mayor, 2004).

Inoltre, non è stato chiarito perché il burro di cacao migra verso la superficie del cioccolato fondente, come nel caso del *fat blooming*. La diffusione come meccanismo di migrazione dei grassi nel cioccolato è stata messa in discussione sulla base di prove sperimentali. Utilizzando la risonanza magnetica nucleare, Couzens e Wille (1997) hanno osservato che a 28 °C l'olio di nocciola in contatto con un sottile strato di cioccolato migrava in modo frontale ed uniforme. Alla fine dell'esperimento (42 giorni) la concentrazione di olio all'interfaccia olio/ciocco-

lato era inferiore a quella sulla superficie libera del cioccolato, che è opposto al gradiente richiesto se la migrazione dell'olio fosse avvenuta per diffusione Fickeana.

Contrariamente a quanto affermato oggi, la diffusione non dovrebbe essere un meccanismo dominante per il flusso di massa di grasso nella matrice cioccolato. Tuttavia, può giocare un ruolo nella migrazione delle frazioni specifiche di TAG o lipidi minori all'interno della fase liquida grassa (Aguilera, Michel and Mayor, 2004).

Come alternativa all'equazione di diffusione è stata proposta l'equazione di Lucas • Washburn che descrive la forza capillare. In questo modello, il cioccolato viene considerato come un materiale particolato (insieme di particelle solide disperse in un mezzo omogeneo liquido e/o solido) all'interno del quale la frazione liquida si muove tra i pori grazie alla forza capillare. In sostanza non ci sono dubbi, da parte della comunità scientifica, riguardo la struttura del cioccolato: è una matrice densa di particelle solide (volume occupato > 60%) con gli spazi intercellulari occupati dal burro di cacao. Le dimensioni rilevate di questo sistema particolato sono nell'ordine di 1-10 μm . Per quanto riguarda il burro di cacao, possiamo affermare che, nel cioccolato ben temperato e conservato a temperatura ambiente (approssimativamente a 20°C), è presente circa il 75% di burro di cacao in forma solida e la restante parte in forma liquida. Qui la fase solida è composta di un largo numero di piccoli cristalli di grasso e la possibilità che vi sia un reticolo cristallino con una struttura precisa deve ancora essere determinata.

Acquisito che il cioccolato, a livello micro-strutturale, è un materiale particolato risulta inesplicabile come gli ingegneri alimentari non abbiano considerato la capillarità quale forza motrice rispetto il flusso di massa del grasso (Aguilera, Michel and Mayor, 2004). La più comu-

ne equazione utilizzata a proposito - Lucas • Washburn - assume che la pressione all'interno di un cilindro capillare in contatto con una infinita riserva di liquido è compensata dalla viscosità e dalla forza di gravità (Krotov and Russanov, 1999). Le maggiori evidenze per questa ipotesi sono:

1. i dati disponibili sulla migrazione del grasso (e sull'affioramento) sono conformi alla forma generale della curva di risalita capillare predetta dall'equazione di Lucas • Washburn. Infatti la dipendenza dalla radice quadrata del tempo (\sqrt{t}), predetta da questa equazione, è sovente usata come prova per il meccanismo di flusso capillare;
2. una accelerazione della velocità di migrazione è osservata precisamente nell'intervallo di temperatura dove la proporzione di grasso liquido, rispetto a quello solido, aumenta drasticamente con la temperatura;
3. gli attuali (ma ancora scarsi) dati sulla microstruttura dimostrano che i pori tra le particelle o le fessure nella cioccolata sono di dimensioni che permettono alle forze capillari di giocare un ruolo determinante (forze di coesione e di adesione).

In sostanza, il movimento della frazione liquida del burro di cacao - la quale incrementa all'aumentare della temperatura - viene guidato preferibilmente dalla forza capillare attraverso i passaggi nel particolato e i pori connessi. Tale ipotesi rimane tuttavia da confermare con ulteriori studi (Aguilera, Michel and Mayor, 2004).

Materiali e Metodi

COSTRUZIONE DELLA CAMERA TERMOSTATA

La prima fase del tirocinio ha avuto l'obiettivo di allestire una camera che potesse mantenere costante la temperatura dei campioni, utilizzati poi nei trattamenti e nelle misure previste dal piano sperimentale. Il principio che è stato deciso di sfruttare, per ottenere una temperatura stabile attorno ai 15°C, è stato quello di riscaldare un corpo mantenuto a bassa temperatura. Ovvero si è pensato ad una camera tenuta in frigorifero nella quale un blocco metallico, contenente i campioni, venisse riscaldato da basse potenze. La prima operazione è stata quindi quella di progettare un blocco di materiale metallico che contenesse i campioni (cellette in alluminio con diametro di 7mm e altezza 1mm contenenti cioccolato). Successivamente, il blocco è stato costruito dall'officina del Dipartimento di Fisica presso l'Ateneo. Durante questo periodo, si è parallelamente proceduto con la costruzione della camera. Un contenitore di legno è stato così rivestito, all'interno, di materiale isolante e predisposto, tramite fori per i cavi - necessari all'alimentazione delle resistenze e per far uscire le termocoppie - all'alloggiamento del blocco porta campioni. Una volta pronto, il blocco di alluminio è stato scheggiato, tramite punta diamantata, per identificare - con codice alfanumerico - ogni locazione dei futuri campioni. La camera è stata fisicamente completata con l'alloggiamento delle resistenze nel blocco in alluminio, quindi l'inglobamento del blocco metallico nel contenitore isolato.



Figura 4, In ordine da sinistra a destra: progettazione blocco porta celle; costruzione camera; camera isolata; alloggiamento blocco - con resistenze - nella camera; Euroterm, alimentatore e frigorifero contenente la camera finita

Al fine di ottenere una temperatura controllata sono state collegate le resistenze ad un generatore di potenza. Tale potenza in uscita dal generatore era costantemente calcolata dall'*Euroterm*, componente elettronico in grado di rilevare la temperatura del blocco, tramite una termocoppia, e quindi di regolare la potenza al fine di raggiungere la temperatura impostata. Successivamente è stata posta la camera termostata in frigorifero (temperatura di circa 6 °C), collegate le resistenze all'uscita di potenza, le quali amplificando il segnale dell'*Euroterm* garantivano un costante temperatura di 15,0°C con oscillazioni inferiori al decimo di grado.

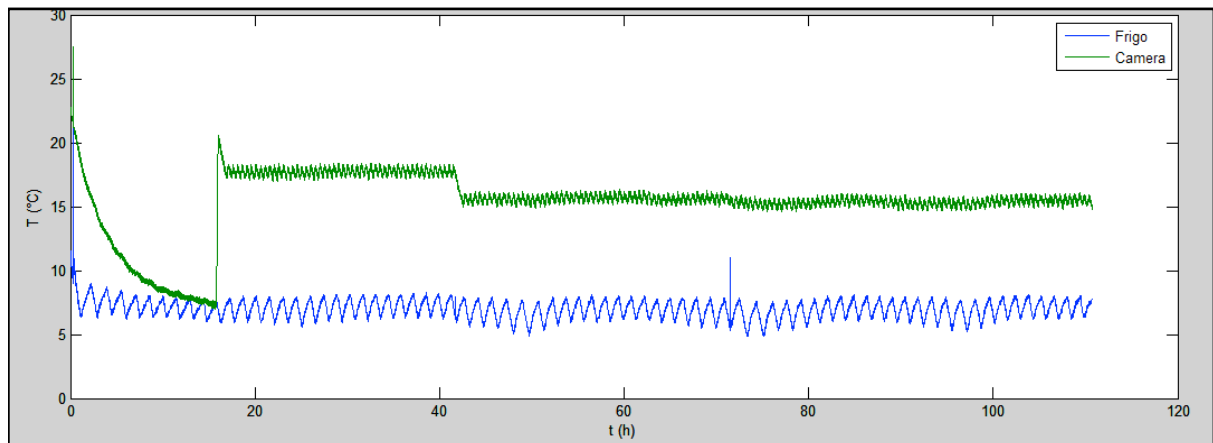


Grafico 1. Andamento della temperatura nel frigorifero e nella camera termostata. Si nota l'accensione del dispositivo riscaldante a circa 18 ore; la temperatura della camera passa da una prima T set di 17,0°C a quella definitiva a 15,0°C.

IL CIOCCOLATO

Il cioccolato utilizzato durante l'attività di tirocinio è stato "Puro Cioccolato Fondente Extra" (NOVI, prodotto da ELAH•DUFOUR S.p.a.). Gli ingredienti che lo compongono sono: zucchero, pasta di cacao, burro di cacao, emulsionante: lecitina di soia, aromi. Cacao minimo 50% (Tabella 4). La menzione "puro" sta ad indicare la sola presenza di burro di cacao come fonte lipidica.

100 g di prodotto apportano mediamente:		
Valore energetico	538 Kcal	2243 kJ
Proteine	6,4 g	
Carboidrati	50,3 g	
Grassi	34,6 g	

Tabella 4. Apporto di nutrienti per 100g di cioccolato utilizzato

Si è scelto di utilizzare un cioccolato prodotto da un'azienda di grandi dimensioni per poter collegare le caratteristiche del cioccolato a valori ben definiti ed omogenei nel tempo (qual ora vi fosse la necessità di ripetere analisi). Si è scelto il cioccolato “puro” a conseguenza del suo contenuto in grassi a base di solo burro di cacao. L'assenza di grassi di origine vaccina o vegetale ha semplificato la modellizzazione del sistema permettendo deduzioni lineari tra composizione lipidica e comportamento della stessa.

PREPARAZIONE CAMPIONI



I campioni sono stati preparati a monte di tutto il piano sperimentale. Il cioccolato appena temperato è stato infatti posato in cellette di alluminio (Perkin Elmer, USA - volume 50 μ l) grazie alla manualità del pasticciere che ci ha aiutato (Alessandro Bertuzzi, Tecnologo alimentare). Il cioccolato è stato posato nelle varie cellette grazie all'uso di un *sacco a poche*. La su-

perficie è stata resa il più possibile piatta grazie ad un movimento di scuotimento orizzontale della celletta stessa. Subito dopo le celle sono stata raffreddate, per un minuto, su un blocco metallico alla temperatura di 10°C. In seguito i campioni sono stati conservati nella camera termostata a 15,0°C in attesa di subire i trattamenti di tempra specifici, quindi essere analizzati. I campioni sono risultati avere un peso variabile dai 60 agli 80µg.

T R A T T A M E N T I D I T E M P R A

Il cioccolato, comprato ad un supermercato locale, è stato tritato a scaglie - inferiori al cm³ - per un peso complessivo di 1,8 kg. Successivamente 1,5 kg di cioccolato sono stati sciolti tramite forno a microonde. La potenza erogata sulla matrice era di 700W per intervalli brevi - 10 secondi - separati da mescolamento della massa al fine di rendere omogenea la temperatura. Raggiunta la temperatura di circa 50°C, indi la fusione totale delle fasi cristalline del burro di cacao, si è passati a raffreddare il prodotto tramite mescolamento ripetuto.

Una volta raggiunta la temperatura di 38°C il cioccolato è stato inseminato con la massa tritata non fusa di 0,3 kg. Tale insemminazione si prefiggeva lo scopo di:

- abbassare ulteriormente la temperatura della massa di cioccolato;
- fornire nuclei di accrescimento per i cristalli che i trigliceridi del burro di cacao vanno a formare durante il raffreddamento.

Raggiunta la temperatura di 32,45°C la viscosità è stata ritenuta adeguata per il campionamento quindi il colaggio nelle cellette.

Con tale tecnica si è potuto temperare una massa di cioccolato piccola, in modo manuale, e con la sicurezza dell'accrescimento dei cristalli sulle forma V - si è assunto infatti che il cioc-

colato industriale comperato, presentandosi di ottimo aspetto e non avendo subito un invecchiamento particolare, fosse principalmente formato da cristalli di questa forma - presenti nella dose insemiante.

Settantotto cellette sono quindi state preparate secondo le modalità esplicitate di seguito. Un certo numero di campioni ha subito poi ulteriori trattamenti di tempra. Questo ulteriore trattamento è stato messo in atto tramite apparecchiatura costruita ad hoc (come è possibile vedere in Figura 6). Nella pratica, un vaso di vetro con chiusura ermetica il quale potesse contenere più celle nello stesso istante, è stato appesantito permettendogli di affondare in un bagno termico impostato alla temperatura prestabilita. In meno di un minuto la termocoppia inserita nel vaso indicava il raggiungimento della temperatura di *set point*. Terminato il tempo di trattamento a caldo, il campione veniva posto in un bagno di acqua fredda (8,20°C) e lasciato in immersione finché la temperatura interna non fosse vicina ai 15°C (raggiunta in circa 3 minuti). Vedi figura 5.

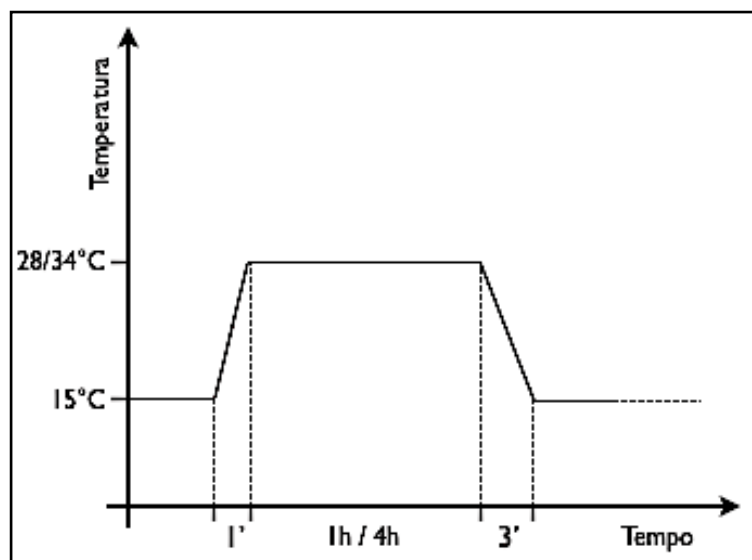


Figura 5. Diagramma generico Tempo/Temperatura dei trattamenti di tempra subiti dalle cellette

Nello specifico:

- 15 cellette sono state trattate a 28°C per 4 ore;
- 12 cellette sono state trattate a 28°C per 1 ora;
- 12 cellette sono state trattate a 34°C per 4 ore;
- 12 cellette sono state trattate a 34°C per 1 ora;
- 12 cellette sono state conservate senza alcun trattamento per fare il confronto.

Oltre che dalla termocoppia di controllo del bagno termico, le temperature sono state monitorate tramite termocoppie K annesse ad un *datalogger*. Successivamente i campioni sono stati riposti nella loro posizione, definita e registrata, all'interno della camera termostata. Le restanti 15 cellette sono state utilizzate per trattamenti preliminari fatti al fine di mettere a punto le metodiche di analisi relative alla microscopia Atomic Force Microscopy (AFM) e con la Differential Scanning Calorimetry (DSC). Sui campioni che hanno subito il trattamento di tempra a 34°C per quattro ore è stato fatto un raffreddamento differente: invece di usare un liquido refrigerato, si è usata aria - mettendo il vaso in frigorifero - ciò ha portato ad raffreddamento più lento. Il risultato è stato un fallimento del trattamento con evidente affioramento di burro di cacao già il giorno successivo. Per questo motivo la serie di campioni trattati a 34°C per quattro ore non è stata analizzata secondo quanto prevedeva il piano sperimentale.



Figura 6. In ordine da sinistra a destra: vaso in vetro appesantito; campioni e termocoppia nel vaso; T di controllo e di set del bagno termico; vaso nel bagno termico e termocoppia di controllo, vaso in acqua fredda post-trattamento

Tentativi di acquisizione immagine sono stati eseguiti dal tutore prof. Cristofolini tramite Scanning Electron Microscope (SEM). Questa strada non è poi stata percorsa per una scelta orientata a metodiche di analisi più abbordabili - che permettessero anche una misura diretta della *rugosità* - e facili da mettere in pratica nell'ottica aziendale.

PIANO SPERIMENTALE

Tutte le analisi sono state effettuate in doppio. I campioni, conservati a 15,0°C, si sono quindi analizzati in diversi tempi con le diverse tecniche riportate in Tabella 5.

TEMPO (SETTIMANE)	ANALISI
0	AFM, DSC, Colorimetro
1	AFM, DSC, Colorimetro
2	AFM, DSC, Colorimetro
4	AFM, DSC, Colorimetro
8	Microscopio ottico, DSC, Colorimetro
12	Microscopio ottico, DSC, Colorimetro

Tabella 5. Tempi e tecniche di analisi

ANALISI MORFOLOGICA SUPERFICIALE

L'analisi morfologica della superficie di cioccolato è stata intrapresa con la finalità di seguire l'evoluzione della superficie impiegando una tecnica affidabile. Il fine di tali analisi è la possibile valutazione dello stato di tempra - nel campione fresco e nel tempo - del cioccolato proveniente da diverse storie termiche. Oltre a tale valutazione, questo tipo di analisi, si è prefissato lo scopo di poter dare indicazioni sui tempi con cui l'affioramento del grasso si manifesta nella zona di interfaccia.

La superficie della cioccolata è stata valutata secondo misure di *rugosità* o di dimensione media dei grani (raggio medio). Per poter fare ciò sono stati utilizzati due microscopi (Università degli studi di Parma, Dipartimento di Fisica): il microscopio a forza atomica (AFM) e il microscopio ottico.

MICROSCOPIO A FORZA ATOMICA

Il microscopio a forza atomica sonda la superficie di un campione con una punta affilata, lunga circa 2μ e con un diametro poco inferiore a 100\AA . La punta è localizzata nella fine libera del *cantilever* che è lungo tra i 100 e i 200 μm . La forza tra la puntina e la superficie del campione causa una piega, o deflessione. Un detector misura la deflessione del *cantilever* che si ha quando la puntina passa sul campione o, viceversa, quando il campione è analizzato muovendolo sotto la puntina. La misura della deflessione del *cantilever* permette al computer di generare una mappa della superficie. Tipicamente molte forze contribuiscono alla deflessione del *cantilever*. La forza maggiormente associata alla microscopia a forza atomica è di tipo inter-atomico ed è nota come forza di van der Waals.

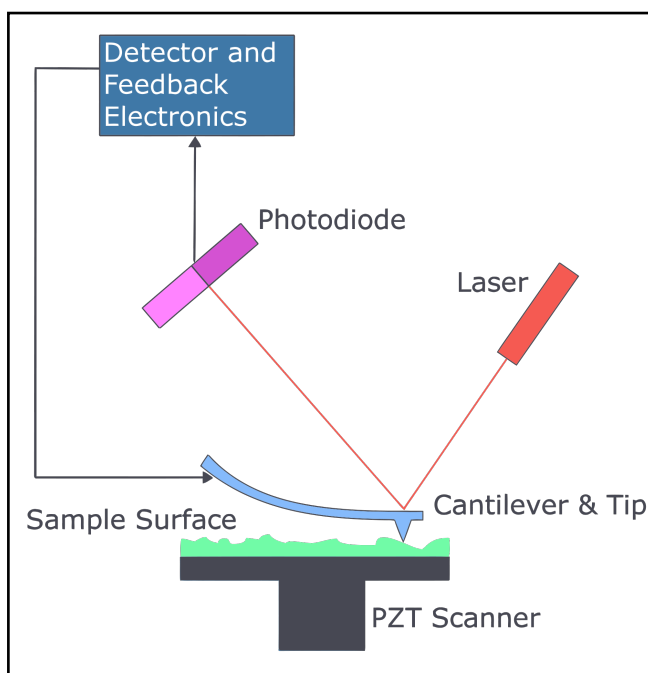
Nella modalità con cui abbiamo utilizzato lo strumento - *in contatto* - la punta dell'AFM imprime un leggero "contatto fisico" con il campione. Quando lo scanner esegue la traccia - delicatamente - attraverso il campione in esame, la forza di contatto causa il piegarsi del *cantilever* per adeguarsi ai cambiamenti di topografia.

In aggiunta alle forze di van der Waals trattate precedentemente, altre due forze sono presenti durante le operazioni di contatto dell'AFM: la forza capillare esercitata dallo strato sottile di acqua presente nell'ambiente e la forza esercitata dallo stesso *cantilever*. La forza di capillarità cresce quando l'acqua si trova attorno alla puntina applicando una forte forza attrattiva (cir-

ca 10^{-8} N) che quindi mantiene la punta in contatto con la superficie. La vastità della forza capillare è in funzione dello spazio che separa la punta dal campione. La forza esercitata dal *cantilever* è paragonabile alla forza esercitata da una molla complessa. La vastità e il verso (repulsivo o attrattivo) della forza del *cantilever* dipende quindi dalla deflessione dello stesso e dalla sua costante elastica.

Fino a quando la punta è in contatto con il campione, la forza capillare dovrebbe essere costante perché la distanza tra la punta e il campione è virtualmente incompressibile. Viene quindi assunto che lo strato d'acqua è ragionevolmente omogeneo. La forza variabile nell'AFM *in contatto* è la forza esercitata dal *cantilever*. La forza totale che la punta esercita sul campione è la somma della forza capillare più quella del *cantilever* e deve essere bilanciata dalle forze di van der Waals. La vastità della forza totale esercitata sul campione va da 10^{-8} N, al più tipico intervallo operativo tra 10^{-7} e 10^{-6} N.

Figura 7. Schema funzionamento AFM



La maggior parte dei microscopi a forza atomica monitora la posizione del *cantilever* con tecniche ottiche. Nello schema più comune, mostrato in Figura 7, un raggio laser che punta sul *cantilever*, rimbalza indietro - segnalando i suoi spostamenti ad un sensore di posizione *photodetector* (PSPD). Quando il *cantilever* si muove, la posizione del fascio

laser nel detector subisce uno spostamento. Il sensore di posizione stesso può misurare slittamenti di luce inferiori ai 10\AA . Il rapporto tra la lunghezza del cammino *cantilever*-detector con la lunghezza del *cantilever* stesso produce una amplificazione meccanica. Come risultato il sistema può percepire movimenti sub-angstrom della punta del *cantilever*.

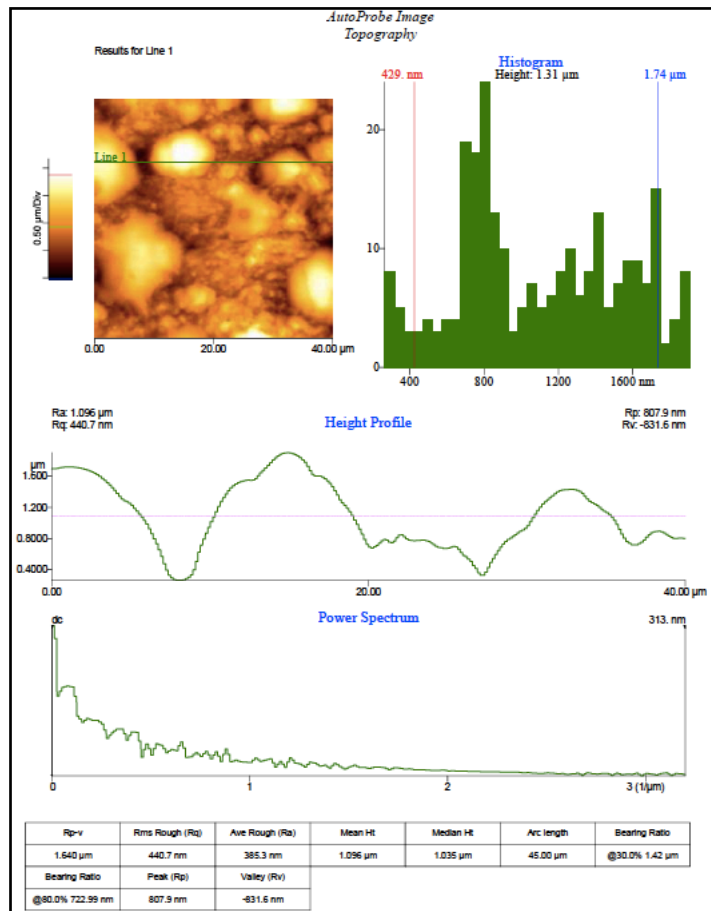
Una volta che l'AFM ha rilevato la deflessione del *cantilever*, esso può generare dei dati topografici operando in uno dei due modi in cui può essere impostato: altezza costante o forza costante. Nel caso della modalità ad altezza costante, la variazione della deflessione del *cantilever* può essere usata direttamente per generare i dati topografici perché l'altezza dello scanner è fissa quando esso opera (Howland and Benatar, 1993), come nel nostro caso.

Il microscopio a forza atomica è già stato usato come strumento per l'acquisizione delle immagini dalla superficie del cioccolato come testimoniano i lavori svolti da numerosi scienziati quali: Hodge, Rousseau, Sonwai and Khan (2002); Smith and Dahlman (2005); Nightingale, Lee and Engeseth (2011).

Le condizioni operative con cui lo strumento è stato utilizzato si possono sintetizzare nei seguenti punti:

- temperatura del campione mantenuta a $15,0^{\circ}\text{C}$ grazie ad un sistema Peltier montato sul *piezo scanner* dell'AFM;
- flusso di azoto costante nella zona di misura al fine di evitare condensa di vapore sul campione;
- area analizzata per immagine $40 \times 40 \mu\text{m}$;
- frequenza di scansione del *cantilever*: tra 1 e $0,2\text{ Hz}$;

L'approccio della puntina fissa sul *cantilever* sulla superficie del campione avveniva in modalità semi automatica, ovvero con aggiustamenti sulla forza di contatto del *cantilever*. L'analisi



microscopica veniva eseguita sempre prima della analisi colorimetrica e strutturale (descritte avanti). Nel caso ciò non fosse possibile, a causa di strumentazioni temporaneamente occupate, si provvedeva ad analizzare con AFM campioni equivalenti (per trattamento ed invecchiamento) a quelli già processati tramite colorimetro e DSC.

Figura 8. Esempio di schermata con i dati estrapolati dal software di post-analisi

Dalla topografia acquisita dal campione, tramite un software di processamento immagini, è stato possibile applicare delle correzioni alle immagini e, se necessario, sono state tolte dall'analisi alcune zone rilevate non correttamente. Tra i vari risultati che è possibile estrapolare (come mostra la Figura 8) quello che è stato sistematicamente estratto, è la *rugosità* RMS (*Root Mean Square*), ovvero la deviazione standard della distribuzione delle altezze che si calcola come:

$$\text{RMS} = \sqrt{\frac{\sum (Z_i - Z_m)^2}{N}}$$

Dove Z_i sono le variazioni individuali dalla media delle altezze (Z_m) ed N sono il numero di misurazioni.

Dall'elaborazione al computer della topografia rilevata sono state ottenute proiezioni tridimensionali della superficie analizzata, rendendo più intuitivi gli stessi dati; un esempio nella Figura 9.

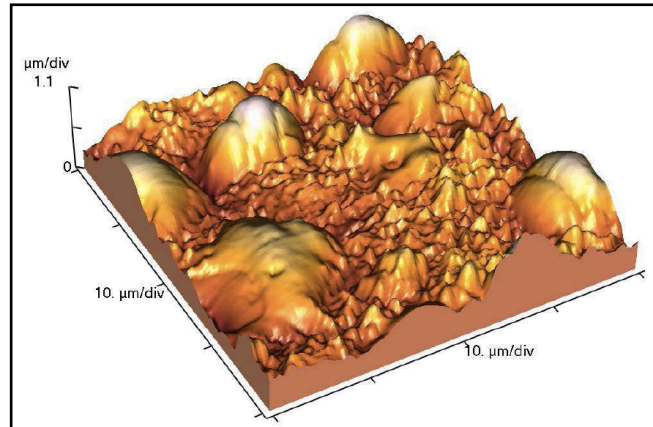


Figura 9. Esempio di rappresentazione tridimensionale della superficie di cioccolato "neutro" dopo un mese.

MICROSCOPIO OTTICO

Un microscopio è uno strumento progettato per rendere visibili i dettagli. Il microscopio ottico deve compiere tre operazioni: produrre un'immagine ingrandita del campione (ingrandimento), separare i dettagli dall'immagine (risoluzione) e rendere i dettagli visibili all'occhio, alla videocamera o ad altri dispositivi.

Il microscopio ottico, nella sua forma base, è costituito da due lenti convesse allineate in serie: un obiettivo di vetro, più vicino all'oggetto o al campione, ed un oculare - più vicino all'occhio dell'osservatore - le quali possono essere regolate in funzione della posizione del campione. Il microscopio permette quindi un doppio stadio di ingrandimento.

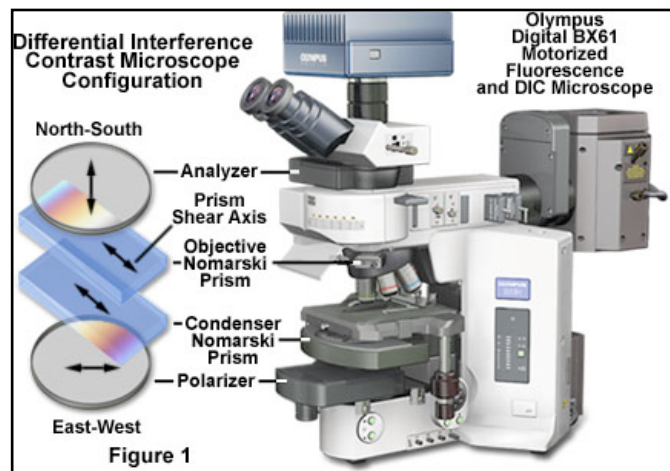
L'obiettivo proietta un'immagine ingrandita nel tubo all'interno del microscopio e l'oculare ingrandisce ulteriormente l'immagine proiettata dall'obiettivo. Nel nostro caso, le immagini sono state acquisite tramite un microscopio a contrasto di fase (DIC Microscopy, come quello

in Figura 10), nel quale la luce raggiunge il campione per riflessione, e l'ingrandimento totale visivo utilizzando un obiettivo 50x e un oculare 40x è stato di 2000x.

Quando si guarda nel microscopio, non si sta guardando il campione, bensì l'immagine del campione. L'immagine è "fluttuante" nello spazio a circa 10 millimetri sotto la parte superiore del tubo di osservazione, a livello del diaframma in cui viene inserito l'oculare. L'immagine che si osserva non è tangibile, non può essere afferrata. Si tratta di una rappresentazione del campione in vari colori e/o tonalità di grigio dal nero al bianco (Abramowitz, M. 2003).

Una telecamera ad alta definizione posta sull'oculare del microscopio ha permesso di catturare le immagini. Le impostazioni dello strumento sono sempre rimaste fisse - con un tempo di esposizione di 600 milli secondi - escluso per la l'intensità luminosa che invece veniva modificata con la finalità di evidenziare le diverse strutture cristalline. Ciò ha portato ad avere le immagini macroscopicamente definite, ed ha reso facile l'intuizione della morfologia superficiale.

Figura 10. Immagine rappresentativa del microscopio a contrasto di fase utilizzato.



Nel nostro caso è ritenuto opportuno passare al microscopio ottico alla settimana 8 di analisi perché l'acquisizione delle immagini all'AFM risultava estremamente complessa e incapace di ritrarre una topografia rappresentativa del campione. La dimensione dei grani è risultata maggiore della scala dello strumento. In definitiva: le immagini ottiche sono state fatte in sostituzione all'analisi microscopica con microscopio a forza atomica. A seguire, l'elaborazione matematica delle immagini al microscopio ottico.

MatLab (The MathWorks, Inc) è un linguaggio ad alto livello unito a un ambiente interattivo che consente di risolvere problemi di calcolo tecnico intensivo più rapidamente rispetto ai linguaggi di programmazione tradizionali (<http://www.mathworks.it/products/matlab/>). Durante il periodo di tirocinio questo software è stato utilizzato come strumento per l'analisi delle immagini ottenute dal microscopio ottico. Infatti, alle misure di *rugosità*, trovate nel primo mese di indagini grazie all'AFM, si dovevano correlare dati paragonabili alle altezze medie *RMS*, viste in precedenza.

Assumendo i cristalli di forma sferica e sporgenti per metà (semisfera) dalla superficie, è possibile pensare l'altezza media dei grani corrispondente al raggio medio dei cristalli (come esplicitato in Figura 11 dove: $h1=r1$; $h2=r2$; $h3=r3$; $h4=r4$). Ovviamente si tratta di una approssimazione che non pretende di dare indicazioni esatte in assoluto ma di definire l'ordine di grandezza dei cristalli in evoluzione.

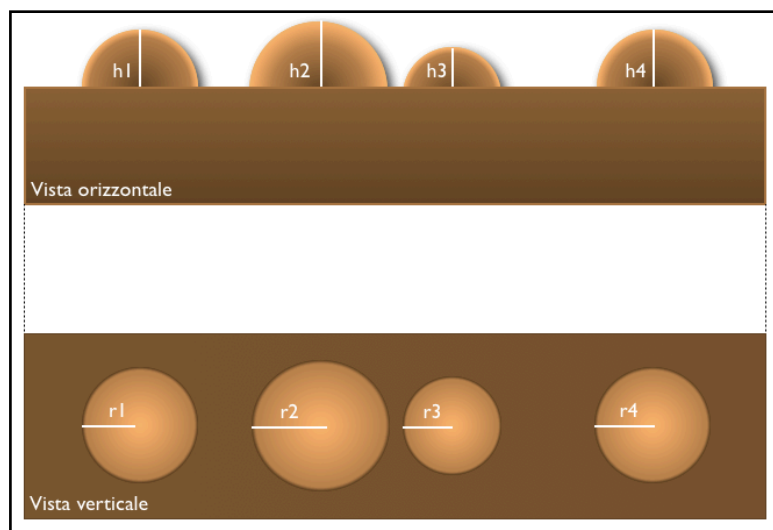


Figura 11. Schema rappresentativo delle assunzioni fatte tra raggio dei cristalli ed altezza correlata

Si è passato quindi dall'immagine a colori in 2D, ad una misura paragonabile alla rugosità media con la seguente modalità:

- l'immagine del campione viene mutata in bianco e nero (riquadro in alto a sinistra della Figura 12);
- viene applicata una soglia ai pixel che formano l'immagine, ovvero: si rendono neri i pixel sotto una certa intensità di bianco e bianchi quelli sopra tale valore (riquadro in basso a sinistra della Figura 12). La soglia è il risultato della media dell'intensità dei pixel moltiplicata per un fattore, che nel nostro caso varia da 2,75 a 1,8. Tale variazione è dovuta alla diversa intensità luminosa usata durante l'acquisizione delle immagini con il microscopio ottico. Tale fattore potrebbe essere rimasto fisso (aumentando così l' "armonia" dei dati) se non fosse stata variata l'intensità luminosa dello strumento;
- dopo aver applicato la soglia è necessaria un'ulteriore operazione di "pulizia" dell'immagine: vengono tolti i singoli pixel - non significativi - e vengono riempite le figure che risultano essere circonferenze (a causa della messa a fuoco, sulla superficie, del microscopio ottico, risulta invisibile nell'immagine originale la parte superiore dei cristalli). Si ottiene così una rappresentazione misurabile della superficie (riquadro in basso a sinistra della Figura 12)
- facendo quindi procedere il programma si ottiene la distribuzione delle aree superficiali dei cristalli e la distribuzione dei relativi raggi (in pixel), Figura 13. L'andamento osservato sembra ben descritto da un esponenziale decrescente $P(x)=P_0*e^{-x/L}$ dove L, lunghezza caratteristica, si ricava dal grafico come quel raggio per cui P è decaduto ad $1/e$ del suo valore iniziale P_0 .
- a questo punto si ricava dal grafico il valore in x (lunghezza raggio - L) corrispondente a y/e , questo perché nei modelli più semplici si ha una distribuzione esponenziale decrescente di probabilità P(x) ed equivale a dire:

$$P(x) = P_0 * e^{-x/L}$$

dove L è una lunghezza caratteristica, cioè una dimensione tipica del sistema. L si trova quando $P(x)$ cade ad $1/e$ del suo valore iniziale ($e = 2.7183$). Il valore del raggio così trovato viene quindi paragonato alla rugosità RMS secondo le assunzioni fatte precedentemente.

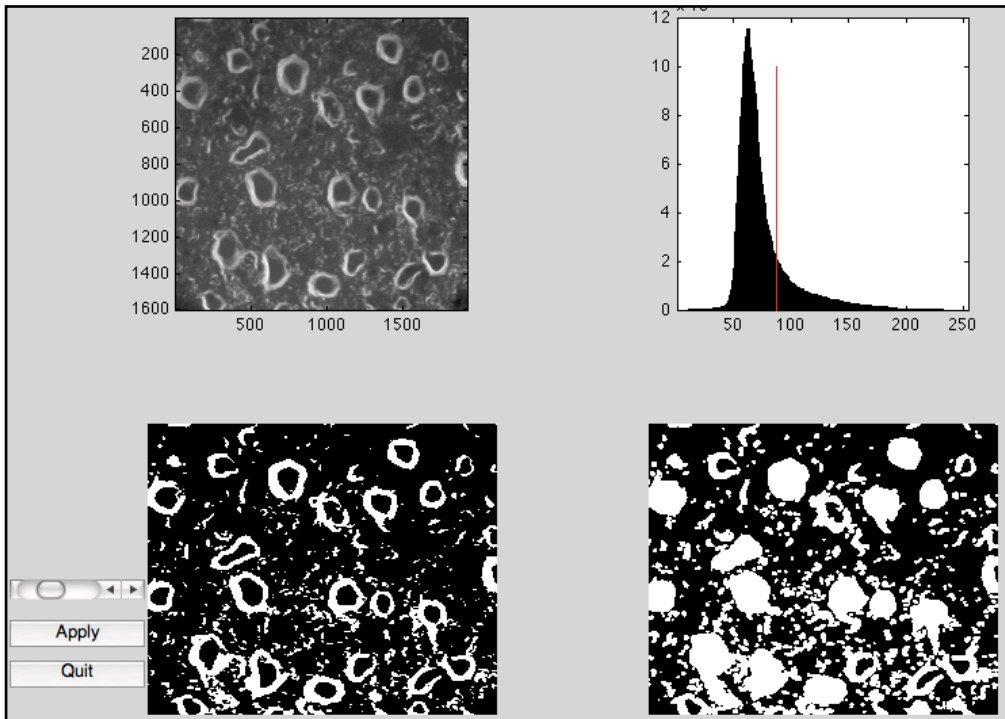


Figura 12. Schermate di Matlab: elaborazione immagine e applicazione della soglia.

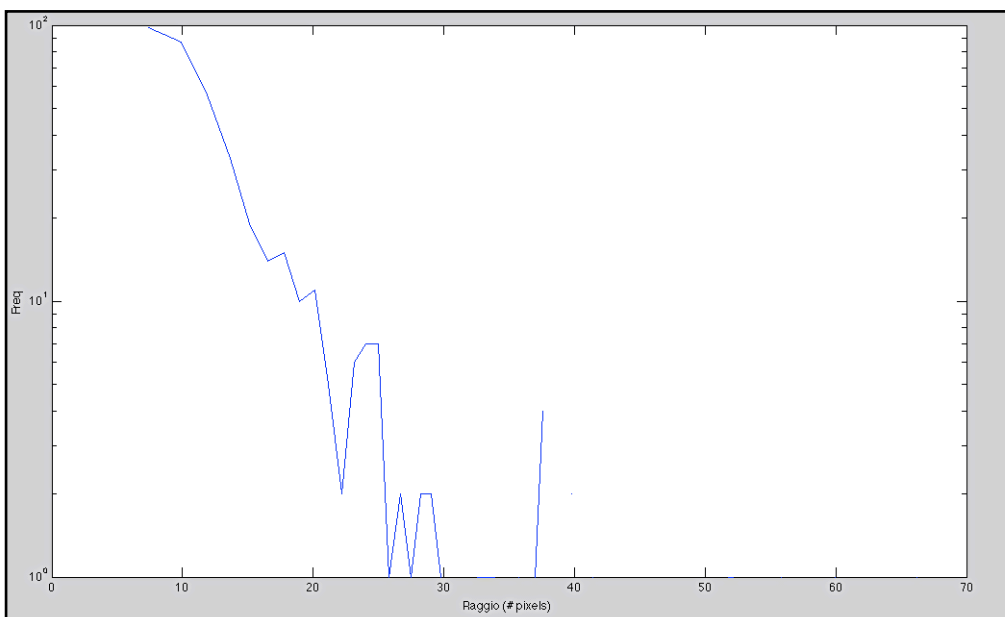


Figura 13. Schermate di Matlab: distribuzione delle ampiezze dei raggi (in pixel).

ANALISI STRUTTURALE

L'analisi strutturale è una componente fondamentale del lavoro di tirocinio. Essa consiste nel determinare la morfologia dei cristalli di burro di cacao soggetti a polimorfismo (Figura 14).

Con tale informazione è possibile capire il grado di stabilità termodinamico del sistema e quindi fare deduzioni sulla possibile metamorfosi del cioccolato e della sua superficie.

Per ottenere questo tipo di informazione si è proceduto con l'analisi calorimetrica differenziale (DSC) al fine di ottenere un termogramma, ovvero un tracciato in cui viene registrato il flusso di calore in funzione della temperatura. Tale curva è poi stata utilizzata per ricavare le percentuali delle varie forme cristalline formate dal burro di cacao, tramite l'uso di funzioni matematiche con un'applicazione di Matlab (The MathWorks Inc., CA, USA)

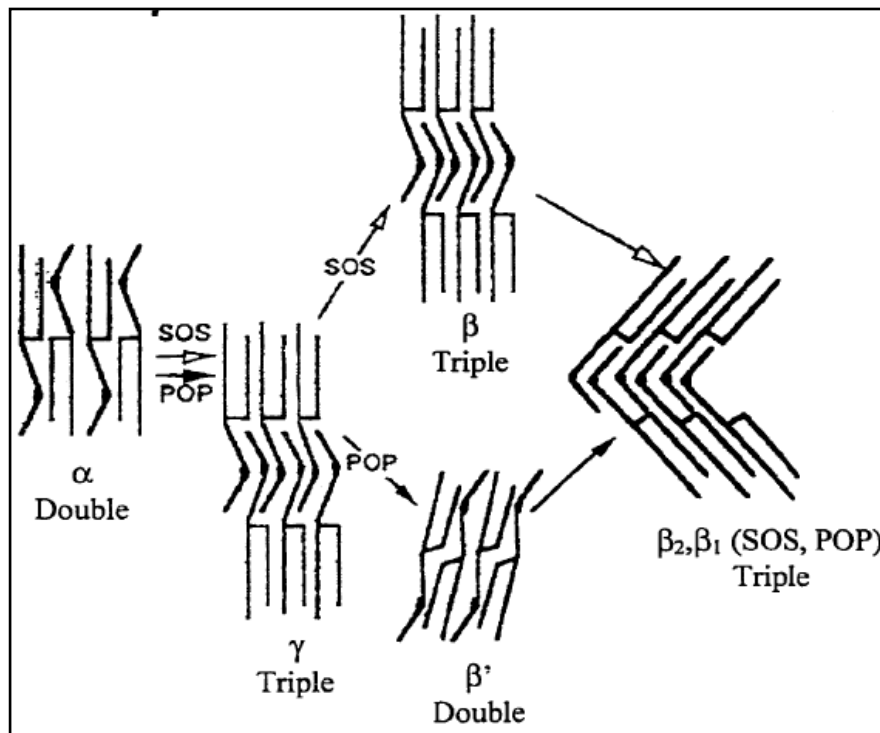


Figura 14. Varie forme cristalline rappresentate in funzione della disposizione spaziale dei trigliceridi

CALORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE

La Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) è una tecnica di analisi delle proprietà termiche di un prodotto in grado di rilevare la capacità termica (derivata dell'entalpia rispetto alla temperatura), grandezza che descrive tutte le variazioni dello stato del sistema in funzione della temperatura.

Con questa tecnica è possibile studiare le transizioni chimiche e fisiche che avvengono con rilascio o assorbimento di calore:

- transizioni di primo ordine che scambiano calore latente (fusione, denaturazione proteica, gelatinizzazione dell'amido, fusione del grasso);
- transizioni di secondo ordine che comportano soltanto una variazione della capacità termica (transizioni vetrose).

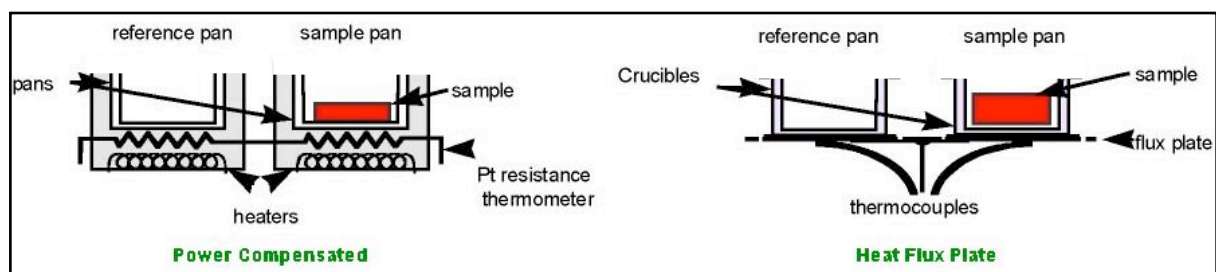


Figura 15. Schema di deposizione del campione e del riferimento all'interno del calorimetro DSC Q100 (TA Instruments, Newcastle – DE, USA) utilizzato per l'analisi.

Il singolo campione viene posizionato in una fornace insieme ad una celletta di riferimento (Figura 15). Entrambi i campioni vengono mantenuti sotto un flusso di un gas inerte (azoto) per favorire gli scambi termici e mantenere omogenea la temperatura della camera e sono posizionati sopra a due supporti - con resistenza nota - collegati ad una termocoppia.

L' apporto di calore sul campione e sulla celletta di riferimento, viene permesso solo quando il sistema si è portato ad una temperatura stabile e sufficientemente bassa per comprendere tutto l'intervallo in cui potrebbero avvenire transizioni. Per fare ciò, si utilizza un sistema di raffreddamento *Refrigerated Cooling Sistem* (RCS), - estremamente rapido e preciso. Anche nel nostro caso l'inizio della scansione avviene dopo il raggiungimento della temperatura di 15,00°C grazie all'utilizzo dell'RCS.

A questo punto, il computer - sempre connesso allo strumento - comunica all'unità di riscaldamento di incrementare la temperatura dei due supporti in modo uniforme e con un flusso di calore specifico. Tra le due si instaura una differenza di temperatura se nel campione avvengono delle transizioni. Tramite la correzione della potenza (Watt) delle unità di riscaldamento, le temperature delle cellette vengono mantenute uguali e la differenza tra le energie fornite viene misurata e registrata come funzione del tempo e della temperatura.

Lo strumento viene periodicamente calibrato con Indio e Dodecano - alle stessa velocità di riscaldamento dell'esperimento scelto per i campioni da analizzare - per assicurare l'accuratezza dei dati calorimetrici.

Le condizioni operative applicate per i campioni di cioccolato sono le seguenti:

- Equilibramento fino a $T = 15^{\circ}\text{C}$
- Programmata di temperatura in riscaldamento: da 15 a 50°C ;
- Velocità di riscaldamento: $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$
- Flusso di azoto: 50ml/min

I termogrammi ottenuti sono stati elaborati con il software TA Universal Analysis (TA Instruments, USA). Come evidenziato in Figura 16, ogni picco osservato è stato caratterizzato dalle temperature di onset (temperatura di inizio transizione) ed endset (temperatura di fine transizione), oltre che per l'area sottesa, e sono state calcolate le entalpie dei picchi relativi alla fusione della fase cristallina principale - forma V.

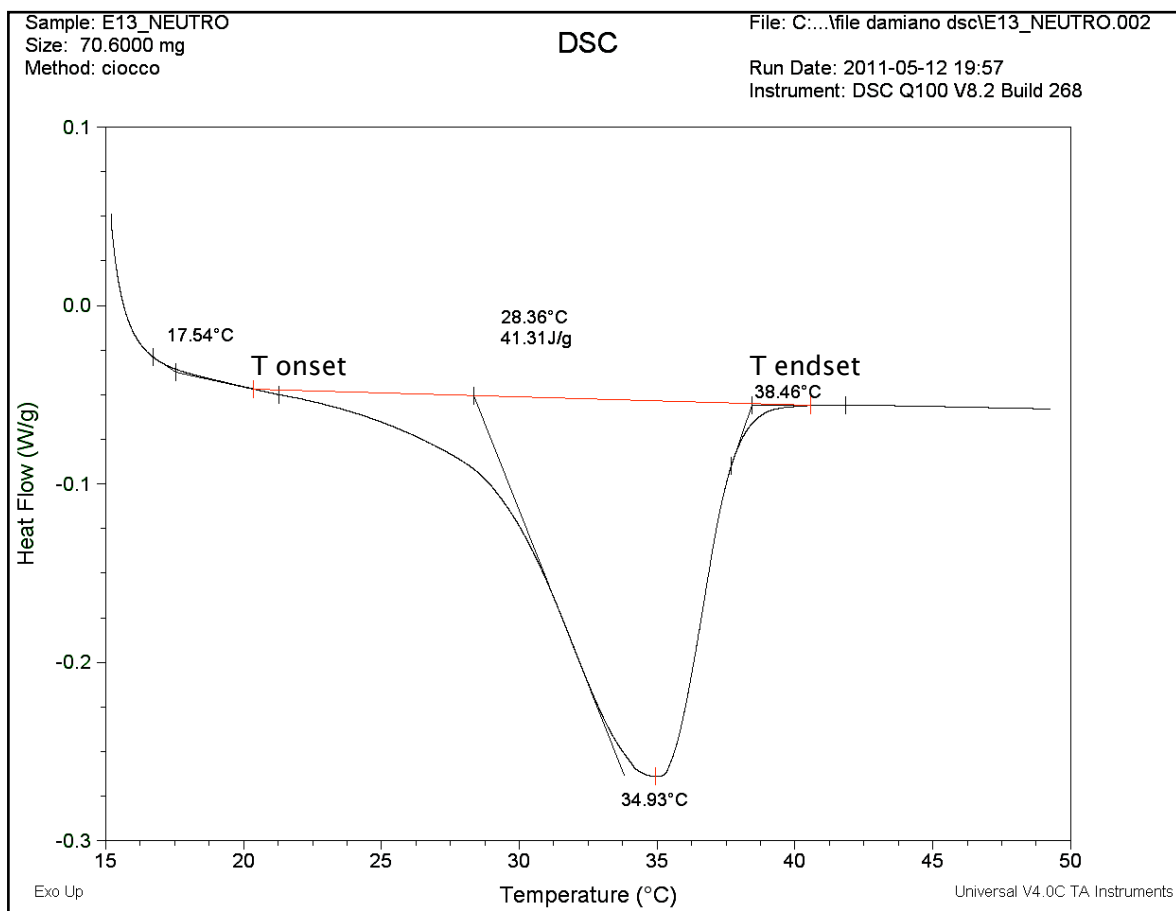


Figura 16: esempio di termogramma

Una volta ottenuto il termogramma si passa all'elaborazione matematica della curva con il fine di ricavarne le percentuali delle singole forme cristalline (dalla I alla VI). Per fare ciò si utilizza il linguaggio di alto livello all'interno dell'ambiente Matlab.

In questo senso è stato scritto un codice con l'obiettivo di deconvolvere il picco dato dalla DSC in sei gaussiane corrispondenti alle forme cristalline formate dal burro di cacao. Ogni gaussiana è stata quindi tarata sull'intervallo di temperatura in cui fonde il corrispondente cristallo. Il risultato è una somma di sei curve (come riportato in Figura 17) che vanno a formare una nuova curva sottile (nera) che teoricamente riproduce il termogramma originario. Da questa elaborazione discende la conoscenza dell'evoluzione strutturale dei vari campioni analizzati nel tempo.

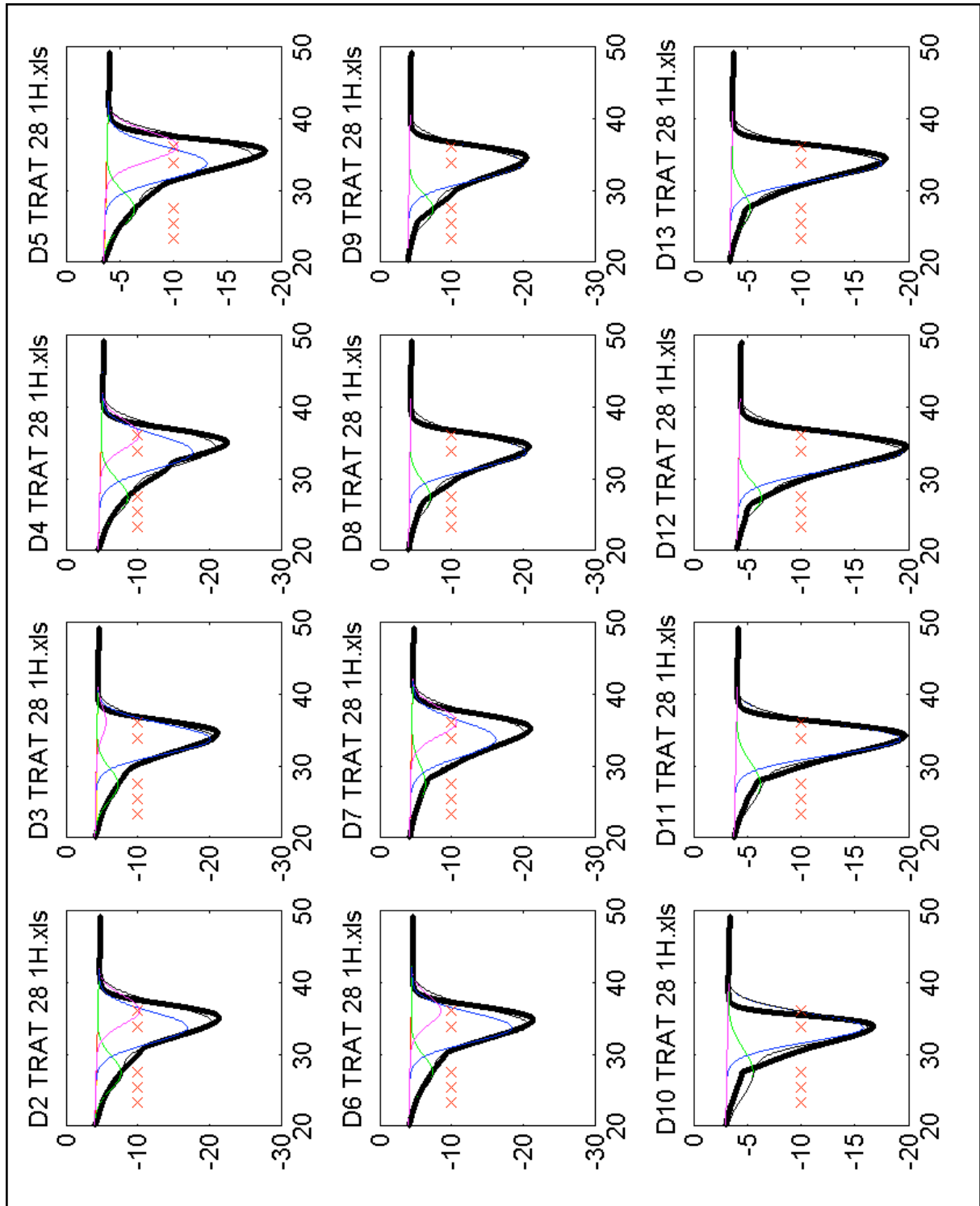


Figura 17. Picchi di fusione scomposti tramite Matlab. In ordinata vi è il flusso di calore in W/g ed in ordinata la temperatura espressa in °C

ANALISI COLORIMETRICA

Il colore è stato misurato sulla base del sistema di Hunter che si fonda sul concetto di uno spazio del colore definito da tre coordinate: L, a, b.

Come si può notare in figura 5, la coordinata L*, che è acromatica ed esprime la luminosità, può assumere valori che variano da 0 (nero) a 100 (bianco), la coordinata a* esprime il rosso quando è positiva e il verde quando è negativa, la coordinata b* che identifica il giallo quando è positiva e il blu se negativa (Figura 18). Le coordinate a* e b* possono assumere valori che variano da meno infinito a più infinito ma, per L* = 0 e L* = 100, assumono solo valore 0. Il colore in questo lavoro di tesi è stato misurato tramite Colorimetro Minolta® CM-2600d (Minolta Co., Ltd - Osaka, Japan), impostato con illuminante D65. Il colorimetro produce valori di L*, a* e b* per ogni spot, i quali possono essere con-

vertiti nell'indice di bianco (WI) il cui valore accorda con l'espressione:

$$WI = 100 - [(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{0.5}$$

I valori di L*, a* e b* si sono ottenuti acquisendo più spot per ogni campione il quale veniva conservato a temperatura refrigerata anche durante l'analisi. Tramite software dedicato allo strumento, i dati si potevano visualizzare direttamente sul computer.

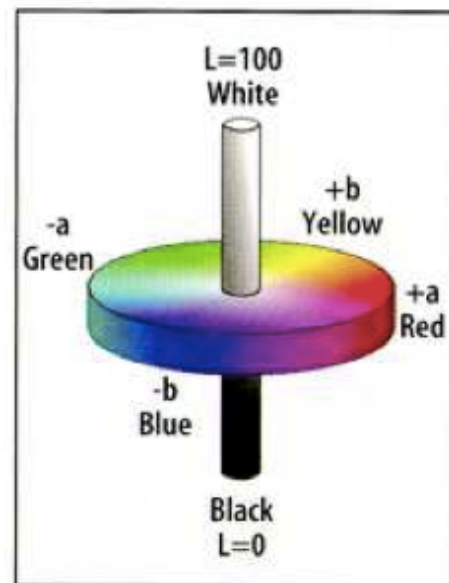


Figura 18. Diagramma tridimensionale L*a*b*

ANALISI STATISTICA

Le differenze significative delle proprietà misurate a parità di tempo di conservazione e a parità di trattamento sono state analizzate tramite test ANOVA *univariata* con confronto delle medie mediante test HSD di Tukey e LSD ($p < 0,05$) (software SPSS, versione 17, SPSS Inc., IL, USA).

Risultati

RUGOSITÀ

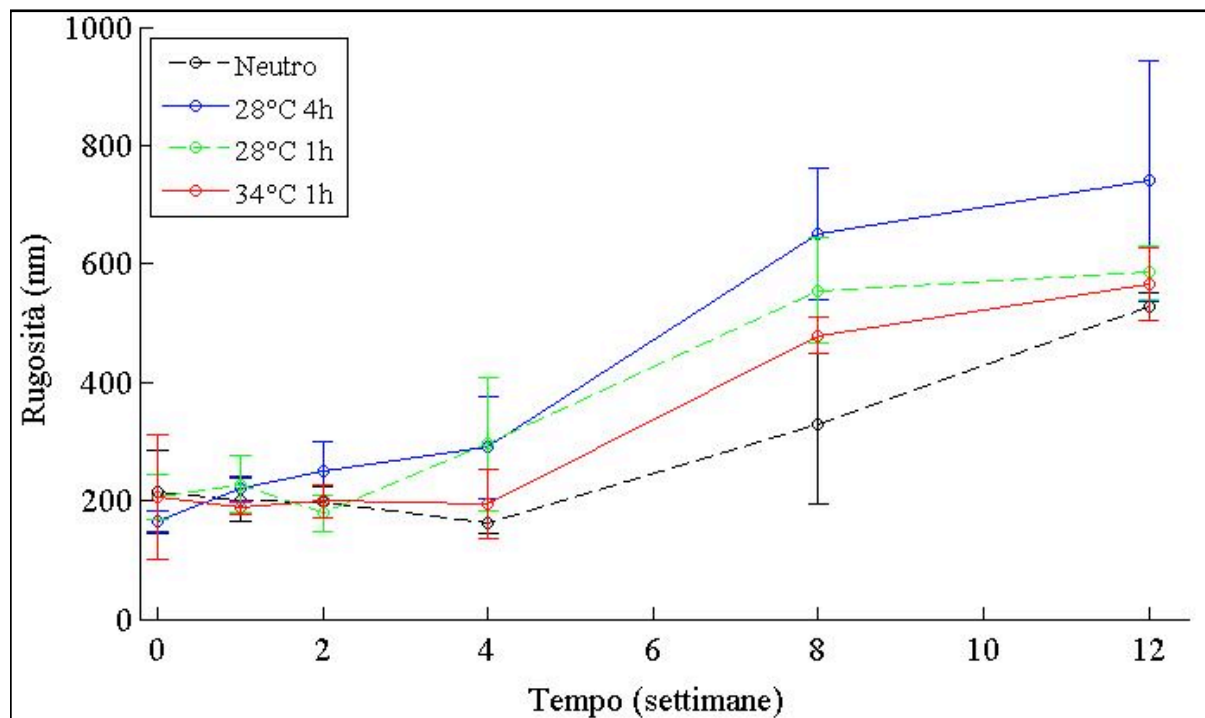


Grafico 2. Andamento della rugosità durante il periodo di analisi. Dalla settimana 0 alla 4 le misure sono state tratte da microscopio AFM; nelle settimane 8 e 12 da microscopio ottico.

I dati in Grafico 2 sono stati valutati tramite analisi statistica, e riportati in Tabella 6, al fine di mettere in evidenza eventuali differenze significative, tra le medie ottenute, in funzione della variabile tempo e alla variabile trattamento.

Trattamento	0 settimane		1 settimana		2 settimane		4 settimane	
28°C 4 h	a	C	ab	B	a	AB	a	A
28°C 1 h	a	B	a	B	b	B	a	A
34°C 1 h	a	A	b	A	b	A	b	A
Neutro	a	A	ab	AB	b	AB	b	B

Tabella 6. Risultati analisi statistica. Le lettere sono riferite alle medie dei valori di rugosità. Le medie a cui sono assegnate lettere uguali non sono significativamente differenti ($p < 0.05$). Le lettere minuscole si riferiscono all'effetto della variabile "trattamento" nel tempo e le lettere maiuscole all'effetto della variabile "tempo" sul trattamento.

I dati di rugosità mostrano un andamento crescente nel tempo. I dati sono stati ottenuti associando due tecniche sperimentali diverse: la microscopia a forza atomica e la microscopia ottica. La prima tecnica ha permesso di misurare i campioni fino alla settimana 4 di analisi compresa. Per tempi successivi la rugosità risulta così accentuata da suggerire l'uso di una tecnica più facile e meno sensibile, la microscopia ottica in modalità di contrasto di fase. Si è passati quindi all'uso del microscopio ottico e dell'elaborazione delle immagini in Matlab per ricavare la dimensione dei raggi ad 8 e 12 settimane.

Dal grafico si può dedurre:

- una crescita significativamente maggiore dei cristalli per i campioni che hanno subito un trattamento di tempra a 28°C per quattro ore;
- una crescita significativamente minore per i cristalli che non hanno subito trattamento;
- i campioni ottenuti dai trattamenti a 28°C e 34°C di un ora hanno mostrato valori intermedi di rugosità;

la diminuzione di rugosità evidenziata per il trattamento a 28°C di un'ora - tempo 2 settimane - e dei campioni di controllo (neutro) a 4 settimane potrebbe essere legata alla contrazione delle strutture cristalline; ovvero il passaggio dalla forma β' alla β prima che questa cominci ad accrescere causa un flusso di massa del Burro Di Cacao verso la superficie.

POLIMORFISMO DEL BURRO DI CACAO

Come sopra citato, risulta fondamentale, per capire il comportamento della rugosità superficiale, una approfondita conoscenza della struttura cristallina del burro di cacao.

Di seguito sono riportati i risultati dell'analisi strutturale dei diversi campioni:

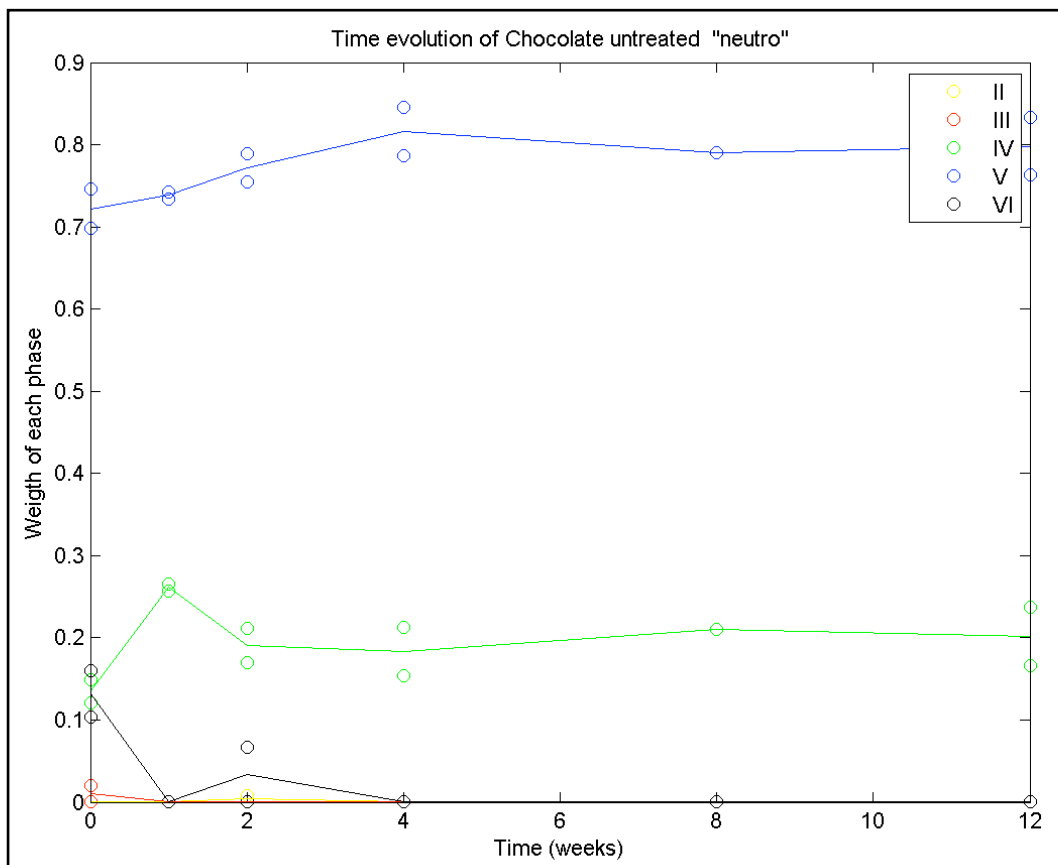


Grafico 3. Evoluzione temporale delle strutture cristalline nel campione "neutro".

Dal grafico è possibile dedurre che:

- la presenza della forma VI non è osservabile con continuità nel primo periodo (fino a 4 settimane): infatti è presente al tempo zero, in entrambi i campioni analizzati, e ricompare poi in un campione analizzato alla settimana 2. Ciò potrebbe essere dovuto a differenze nel processo - manuale - di formazione dei campioni e/o a errori di misura.

- la forma V cresce nelle prime 4 settimane a discapito della forma III e della forma VI
- la forma IV non varia in modo rilevante - in percentuale - durante il periodo di osservazione.

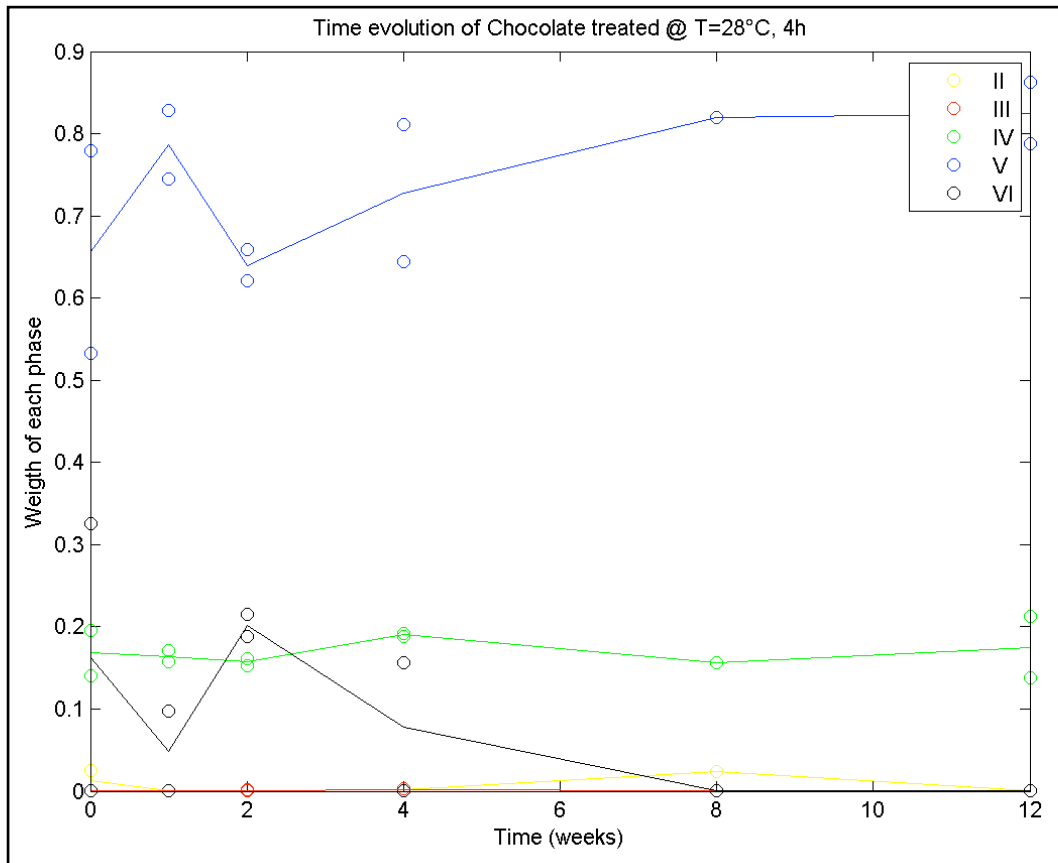


Grafico 4. Evoluzione temporale delle strutture cristalline nel campione trattato a 28°C per 4 ore.

Dal grafico è possibile dedurre che:

- la forma IV rimane costante durante tutto il periodo di analisi;
- la forma V è molto variabile in funzione della presenza della forma VI.

L'instabilità evidenziata nelle prime 4 settimane tende a scomparire a 8 settimane. Si può razionalizzare che l'insieme delle trasformazioni morfologiche, in termini termodinamici, che portano una struttura così varia ad un sistema più semplice, rilascino energia sotto forma di calore.

re. Questo potrebbe favorire l'aumento della frazione di massa grassa liquida che risale, per capillarità, in superficie.

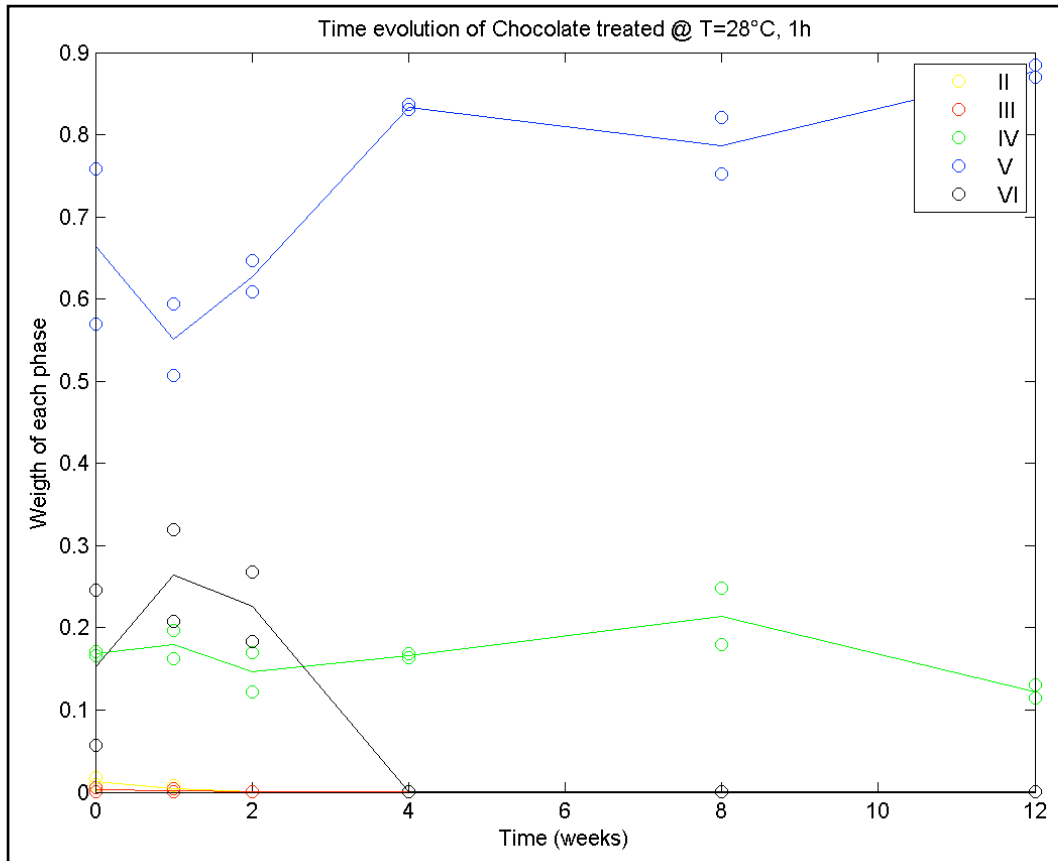


Grafico 5. Evoluzione temporale delle strutture cristalline nel campione trattato a 28°C per 1 ora.

Dal grafico è possibile dedurre che:

- la forma IV varia lievemente nel periodo di analisi e nell'ultimo mese di conservazione la percentuale relativa tende a diminuire;
- la forma V è presente in modesta quantità nelle fasi iniziali ma tende a valori maggiori a discapito della forma VI;
- la forma VI è costantemente presente nelle prime due settimane a differenza degli altri trattamenti dove questa forma non è osservabile in modo costante;

Questo grafico potrebbe spiegare perché la rugosità di questi campioni diminuisce fino a due settimane per poi aumentare; ciò vorrebbe dire che la forma V (β_2) occupa uno spazio minore della forma VI (β_1).

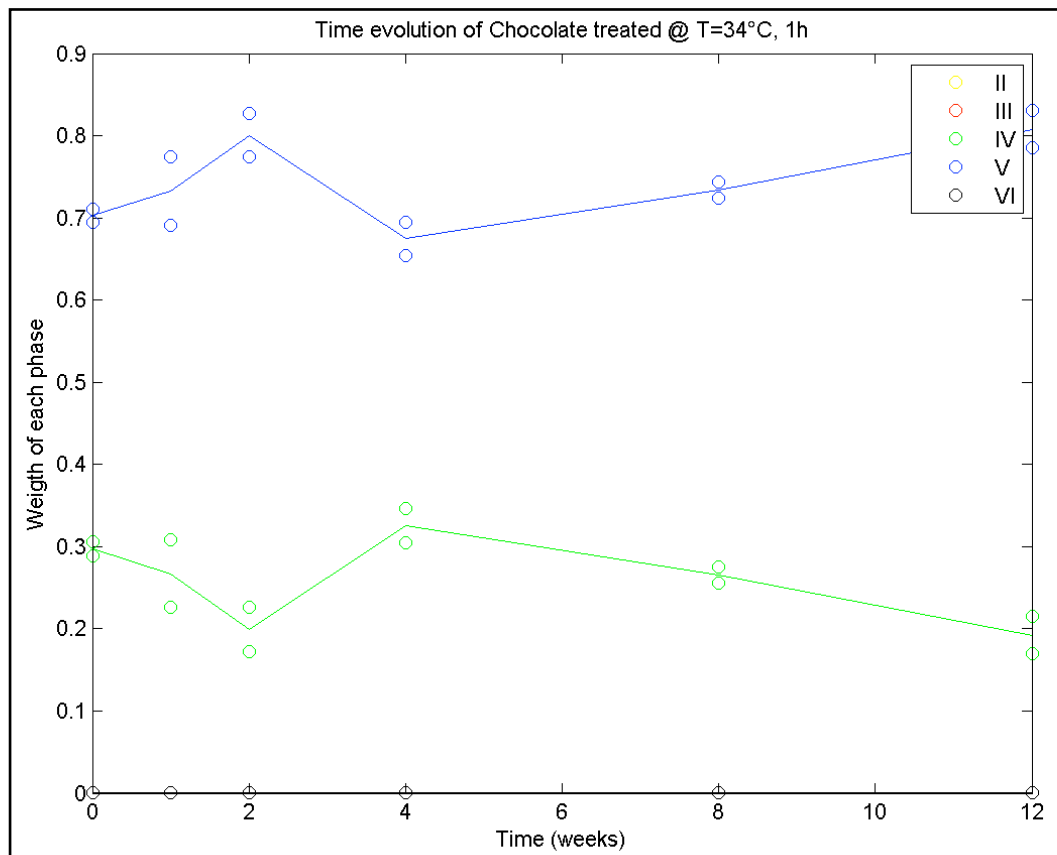


Grafico 6. Evoluzione temporale delle strutture cristalline nel campione trattato a 34°C per 1 ora.

Dal grafico è possibile dedurre che:

- il sistema morfologico si presenta semplice: sono osservabili solo due strutture cristalline;
- vi sono leggere oscillazioni nel primo mese che si attestano comunque intorno a valori simili; dai risultati della rugosità superficiale (Grafico 1) nello stesso periodo di tempo, si può notare l'assenza di variazioni rilevanti;
- da 4 a 12 settimane il sistema tende spontaneamente alla forma termodinamica più stabile.

WHITENESS INDEX

	0 wk	1wk	2wk	4wk	8wk	12wk
28_4h	39,42	44,75	43,08	33,88	42,36	42,19
28_1h	36,65	31,76	38,91	40,84	41,25	44,13
34_1h	36,41	40,77	38,44	35,38	42,53	41,14
Neutro	38,84	41,81	41,88	33,71	40,83	43,05

Tabella 7. Dati ottenuti dall'analisi colorimetrica dei vari campioni durante il periodo di analisi

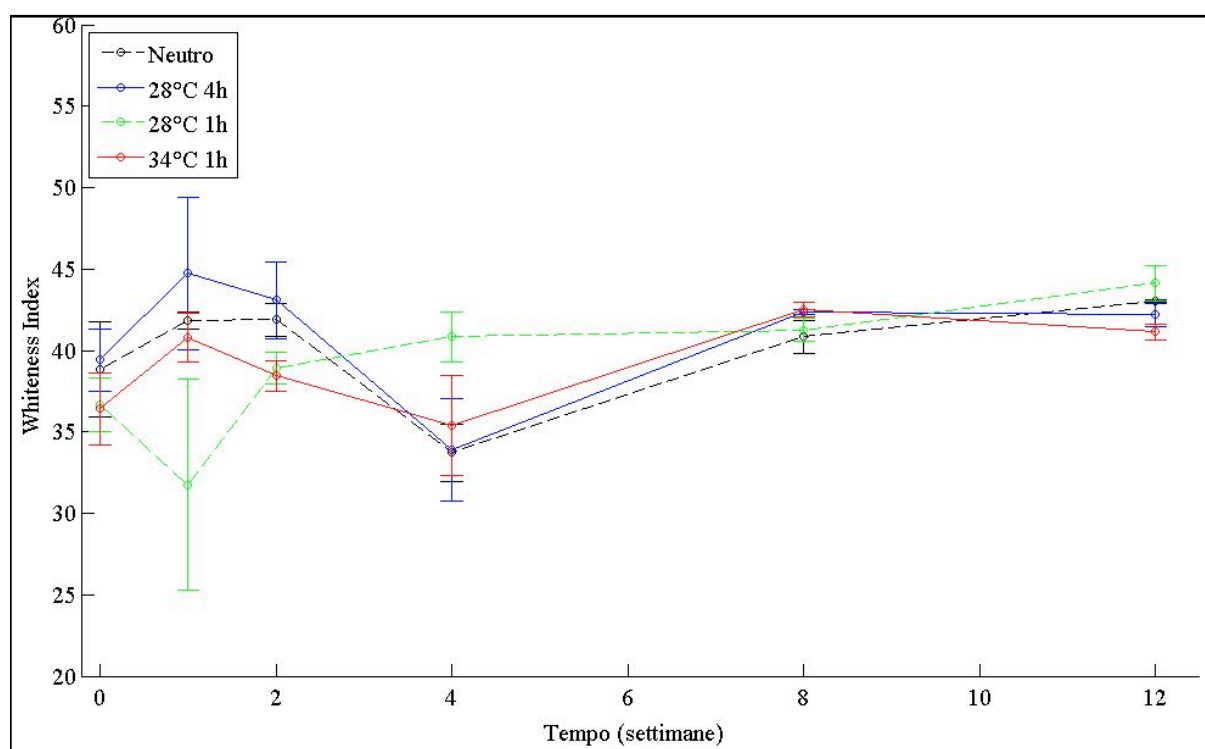


Grafico 7. Andamento del Whiteness Index durante il periodo di analisi.

I dati in Grafico 7 sono stati valutati tramite analisi statistica, e riportati in Tabella 7, al fine di mettere in evidenza eventuali differenze significative, tra le medie ottenute, in funzione della variabile tempo e alla variabile trattamento.

Trattamento	0 settimane		1 settimana		2 settimane		4 settimane		8 settimane		12 settimane	
28°C 4 h	a	B	a	A	a	A	b	B	a	A	c	A
28°C 1 h	ab	C	b	D	b	BC	a	ABC	b	AB	a	A
34°C 1 h	b	BC	a	A	b	B	b	C	a	A	d	A
Neutro	ab	C	a	AB	a	AB	b	D	b	B	b	A

Tabella 8. Risultati analisi statistica. Le lettere sono riferite alle medie dei valori di W.I.. Le medie a cui sono assegnate lettere uguali non sono significativamente differenti ($p < 0.05$). Le lettere minuscole si riferiscono all'effetto della variabile "trattamento" nel tempo e le lettere maiuscole all'effetto della variabile "tempo" sul trattamento.

I risultati dell'analisi colorimetrica risultano essere poco significativi a causa dell'elevata variabilità dei valori acquisiti. Tale variabilità potrebbe essere stata causata da difficoltà tecniche-operative. Il foro attraverso il quale del colorimetro acquisisce i valori di luminosità e colore ha dimensioni confrontabili alle cellette usate per contenere il cioccolato (diametro 7mm); questo comporta la necessità di un'assoluta perfezione nella sovrapposizione foro-campione la quale, probabilmente, non è stata sempre ottenuta. Da analisi condotte su campioni di cioccolato con dimensioni maggiori del foro si sono ottenuti dati in linea con la letteratura scientifica.

Confrontando i dati iniziali, con quelli finali, appare plausibile parlare di una crescita dell'indice di bianchezza (Whiteness Index). Anche l'analisi statistica conferma i valori a tempo 0 settimane sono significativamente inferiori rispetto a quelli di 12 settimane. Guardando però i singoli trattamenti non si può considerare significativo l'andamento dei dati.

Conclusioni

Dal lavoro svolto durante l'attività di tirocinio emerge che:

- 1) E' possibile correlare l'andamento della rugosità superficiale del cioccolato fondente monitorato con diverse tecniche di microscopia (AFM e ottica in modalità DIC), con l'evoluzione temporale della composizione cristallina, desumibile con un'analisi attenta delle curve DSC. Tutto può aiutare a comprendere i meccanismi di formazione del *fat blooming* e delle strategie per rallentarlo, anche attraverso lo studio di come le strutture cristalline influiscano sulla metamorfosi della superficie.
- 2) Pare inoltre (ed è interessante per i risvolti pratici) quindi possibile predire il comportamento a tempi lunghi già dall'evoluzione della morfologia misurata in tempi brevi (entro le prime 2 settimane). Tali informazioni risultano poi indicative per capire come si comportano le varie forme cristalline ad una determinata temperatura di conservazione.
- 3) Inoltre, con l'uso combinato di queste tecniche, è possibile confrontare l'efficacia relativa di differenti protocolli di tempra con lo scopo di ottenere un cioccolato più stabile rispetto al fenomeno del *fat blooming*.
- 4) Dai risultati preliminari di questo tirocinio sembra che la maggiore stabilità al *fat blooming* quando la composizione iniziale del cioccolato presenta un numero inferiore di polimorfi del burro di cacao. Il rationale è che in questo caso, nel periodo di stoccaggio, vi sono minori variazioni termodinamiche e strutturali con un rallentamento del fenomeno di *fat blooming*.

- 5) Si è osservato inoltre che nell'analisi DSC le forme basso fondenti dei cristalli non sono osservabili, probabilmente per la loro naturale tendenza a trasformarsi nelle forme più stabili ed alto fondenti.
- 6) Un trattamento di tempra ad alta temperatura (circa 34°C) per un periodo breve potrebbe fornire energia per la formazione di tutti i nuclei di cristallizzazione (α , β' e β) ma sarebbero preferiti - tra i prodotti - i nuclei termodinamicamente più stabili (β). Il risultato atteso è una formazione accentuata sin da principio di forma V. Questa ipotesi dovrebbe essere verificata.
- 7) Problema insoluto: la scomparsa della fase VI. La scomparsa della fase VI dopo le prime 2 settimane di stoccaggio nei campioni "neutro", "28°C 4h" e "28°C 1h" sembra andare contro i principi della termodinamica.

Possibili sviluppi

Alla luce dei dati, delle conoscenze e dell'esperienza ottenute durante questo periodo di tirocinio, si ritiene opportuno indicare le possibili evoluzioni che si potrebbero sviluppare:

- 1) Perfezionare la tecnica di temperaggio (temperatrice automatica) e la successiva tempra con tempistiche e temperature maggiormente definite e controllate al fine di escludere possibili disparità di trattamento nella discussione dei risultati.
- 2) Studiare l'effetto dello stoccaggio a temperature diverse dai 15°C utilizzati nel presente studio. Ad es. variare la temperatura di conservazione a 20°C potrebbe portare ad una più rapida trasformazione strutturale e superficiale dei campioni. Inoltre sarebbe interessante studiare l'effetto di sbalzi di temperatura durante la conservazione di campioni temprati.

BIBLIOGRAFIA

- Abramowitz, M. (2003). *MICROSCOPE, Basics and Beyond*, Revised edition 2003. Olympus America Inc.
- Afoakwa, E. O. (2010). *Chocolate Science and Technology* (p44; 56-57). Wiley-Blackwell.
- Afoakwa, E O., Paterson, A., Fowler, M. & Vieira, J. (2008). Effects of tempering and fat crystallization behaviours on microstructure, mechanical proprieties and appearance in dark chocolate systems. *Journal of Food Engineering*, 89 (2), 128 -136
- Afoakwa, E O., Paterson, A., Fowler, M. & Vieira, J. (2009). Influence of tempering and fat crystallization on micro-structural and melting proprieties in dark chocolates. Submitted to the *Food Research International*, 42 (1), 200-209.
- Beckett, S. T. (2008). *The Science of Chocolate*, 2nd edn. London: Royal Society of Chemistry Paperbacks.
- Aguilera, J.M., Michel, M. and Mayor, G. (2004). Fat Migration in Chocolate: Diffusion or Capillary Flow in a Particulate Solid?—A Hypothesis Paper.— *JFS Vol. 69, Nr. 7, 2004* (pp167, 174)
- A.I.D.I. <http://www.dolceitalia.net>. Associazione industrie dolciarie italiane, dati 2009.
- Arlorio M. (2004). Alimenti nervini: cacao, caffè, tè in *Chimica degli Alimenti* (pp291 -352) Piccin.
- Couzens, P.J., and Wille H.J. (1997). Fat migration in confectionery products. *Manuf Confection* 77(2):45-7.
- DECRETO LEGISLATIVO 12 giugno 2003, n.178. Attuazione della direttiva 2000/36/CE relativa ai prodotti di cacao e di cioccolato destinati all'alimentazione umana. *Gazzetta Ufficiale N. 165 del 18 /07/ 2003*.
- Ghosh V, Ziegler GR, Anantheswaran RC. (2002). Fat, moisture, and ethanol migration through chocolates and confectionary coatings. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42(6):583-626.
- Hodge S.M.(a), and Rousseau D(b) (2002). Fat Bloom Formation and Characterization in Milk Chocolate Observed by Atomic Force Microscopy,*a Department of Chemical Engineering and b School of Nutrition, Ryerson University, Toronto, Ontario, Canada.
- Howland and Benatar (1993). Atomic Force Microscopy. In *A Pratical Guide to scanning probe microscopy* (pp. 5-8). Park Scientific Instruments, CA.
- Krotov VV, Rusanov AI. (1999). *Physicochemical hydrodynamics of capillary systems*. London: Imperial College Press.
- Nightingale Lia M., Lee Soo-Yeun, and Engeseth Nicki J. (2011). Impact of Storage on Dark Chocolate: Texture and Polymorphic Changes. *JFS Vol. 76, Nr. 1*.
- Lipp M., Simoneau C., Ulberth F., Anklam E., Crews C., Brereton P., de Greyt W., Schwack W., and Wiedmaier C. (2000). Composition of Genuine Cocoa Butter and Cocoa Butter Equivalents.
- <http://www.mathworks.it/products/matlab/> (2011). *Matlab Il linguaggio del calcolo tecnico*. (2011).
- Paul R. Smith and Annika Dahlman (2005). The Use of Atomic Force Microscopy to Measure the Formation and Development of Chocolate Bloom in Pralines. YKI, Institute for Surface Chemistry, SE 114 86 Stockholm, Sweden.
- Wille, R. L. and E. S. Lutton, (1966). Polymorphism of Cocoa Butter, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43:49 1-496

RINGRAZIO DI CUORE:

GIULIANO PUGGIA, MARIA GRAZIA ROVAGLIA, SAMUELE PUGGIA, MICHELA PUGGIA, SILVIA BOVO, VALERIA POLATO, MARIO ROVAGLIA, CAMILLO PUGGIA. CHIARA COMENCINI. MARTINA DONISI, REBECCA PRANDO, RACHELE PRANDO, FRANCESCA CAVALLINI, SARA BONIZZATO, LAURA FERRARO, MATTEO ZANON, MICHELE CESTARO, RICCARDO CONIGLIARO, ENRICO BERTO, MATTEO CORDIOLI, MATTEO LONARDI, MATTIA QUIRI LUCA CORNACCHINI, ENRICO MONTRESOR, STEFANO MANGO. YLENIA BRUTTO, NICOLA SEMEGHINI, GIORGIA BELLESINI, ALESSIA MAZZOCCO, ALESSANDRO RINCO, GIORGIA MURA, LINDA BERGAMINI, ELISA MAIA VENTURI, GIANMARIA TINAZZI, CHIARA SILVESTRI, CHIARA COMENCINI, SILVIA NICOLINI, CRISTINA SAVIO, ASIA BIASI, MICHELE ZOCCATELLI, LUCA BORTOLO FALZONI, REMY BONIZZATO, MATTEO POLATO, ANDREA PRANDO, VALENTINA DOARDI, LUCIA SQUILLANTE, GIULIA RONCA, ARIANNA TACCON, DIEGO ZIVELONGHI, CHIARA ARCAMONE, GIAN MARIA BELLIGOLI, EMANUELE MANTOVANI, NICOLA BIASI, MICHAEL TARANTO, ANDREA NEGRETTI, NICOLE MELONI LORENZO FRATTON, DONISI ALESSANDRA, GIANMARCO LONARDI, DON EMMANUELE BORTOLAZZI, SUOR EMMA, SIMONE E VALENTINA, LUCA FRATTON, ALESSANDRO CALDANA, MARCO OLIVO, LORENZO CHERUBINI, CHIARA ZANON, DAVIDE FAZZINI, MARTINA MARIANO, DAVIDE CONIGLIARO, LUCA FRATTON, ALESSANDRO PECORARO, FABIO PARATO, FEDERICA CESTARO, FRANCESCA BIASI, DAVIDE GAMBARETTO, MARCO GUADAGNINI, RICCARDO PRANDO, CLAUDIA CAMPAGNOLA. FAMIGLIA COMENCINI, FAMIGLIA CESTARO, FAMIGLIA BERTO, FAMIGLIA CORDIOLI, FAMIGLIA LONARDI, GIOVANNI FRATTON, PAOLO MASCHRA, ALBERTO PRANDO, HERMANDAD AL COMPLETO, BEPI TONELLO, MARCO E CINZIA CAMMI, ALESSANDRO ZANOLLI. ELENA CURTI, ELEONORA CARINI, DAVIDE ORSI, MARCO SURIANO, FRANCESCO PERROTTA, ROBERTO CAMPISI, TOMMASO MARTINELLI, SERENA COZZI, GIORGIA BONIZZATO, LAURA NOVELLINI, DENISE FERRETTI, ISABELLA VOLGGER, STEVE JOBS, MARCO FERRARI, JACOPO BRAGHIROLI, LUCA MEZZANOTTE, FRANCESCA GRILLENZONI E SAMUELE, LAURA CEFALIELLO, SILVIA FERRARINI, MARTINA BARBIERI, SILVIA RONCA, EVELIN ROSSI, IRENE VINCENZI, FRANCESCA PASQUALINI, ALDO MININNI, FRANCO ANTONIAZZI, LUIGI CRISTOFOLINI. LA BICI. ROSA ROVAGLIA, MARIA GRAZIA ZANETTI, MARIA SABRINA COLATO, MARINA PUGGIA, MARIA STELLA PUGGIA, CLAUDIA MARTIN, TAMARA QUINTO, BARBARA, LORENZO ROVAGLIA, LUCA ROVAGLIA, PAOLO PUGGIA, VALENTINO PUGGIA, GIORGIO PUGGIA, MARCO PUGGIA, CARIO ZUCCHER, IVO MIRANDOLA, RENATO CASTIONI. SILVIA E LUCA, VALENTINA ANITA E FABIO, MARTINA CASTIONI, LUCIA MIRANDOLA, MARTA MIRANDOLA, FRANCESCA PUGGIA, BEATRICE PUGGIA, NADIA PUGGIA, MARIA VITTORIA PUGGIA, CLAUDIA ROVAGLIA, ANNA ROVAGLIA, LAURA PIETRO E MARCO, VERONICA ALESSIA TOMMASO E ALBERTO, VALENTINA E ANDREA, SARA ROVAGLIA, CHIARA ROVAGLIA, ALESSIO CASTIONI, STEFANO CASTIONI, RICCARDO PUGGIA, LEONARDO PUGGIA. I FALLIMENTI.