



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Tesis presentada para optar al grado de
doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

**PELÍCULAS COMPUESTAS Y
NANOCOMPUESTAS,
BIODEGRADABLES Y/O
COMESTIBLES, EN BASE A
PROTEÍNAS DE AMARANTO
Y ALMIDONES DE DISTINTO
ORIGEN BOTÁNICO**

Tesista: Lic. María Cecilia Condés
Director: Dra. Adriana Mauri

Año 2012

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP, La Plata, Argentina).



Agradecimientos

Me gustaría agradecer enormemente a:

- A la Dra. Adriana Mauri por haberme permitido realizar este trabajo y haberme ayudado a concretar este proyecto profesional sin olvidar lo personal.

- A la Dra. María Cristina Añón por haberme ayudado desde muy temprano en mi formación profesional y haber participado de este proyecto desde el primer día.

- A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme realizar el doctorado en forma gratuita.

- A la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y técnicas (CONICET) por haber garantizado la financiación de este trabajo durante tres años.

- Al profesor Alain Dufresne, por haberme recibido en su laboratorio permitiéndome una nueva experiencia muy gratificante.

- A la Dra. Ana Pilosof y a la Dra. María Julia Martínez por permitirme realizar las determinaciones de tamaño de partícula en su laboratorio.

- A mis compañeros de laboratorio, Agus B., Agus N., Adri S., Ale, Ana, Bruno, Cami, Ceci, Charly, Coqui, Cristian, Ele, Gabi, Fabri, Fran, Jorge, Juli, María, Nacho, Noe, Nora, Pablo, Pau, Sil P., Sil M., Vir y Vale, por las risas, los buenos (o no tanto) momentos juntos, por las salidas, y los ricos mates.

- A todos mis compañeros del CIDCA por su colaboración y por haber compartido lindos momentos de trabajo.

- A mi familia, por el apoyo incondicional, como siempre.

- A JB por apoyarme en este proyecto difícil de sobrellevar, y sacarme una sonrisa cada día, aun a la distancia.

- A mis amigos, por estar siempre.

Resumen

En el presente trabajo de tesis se estudió la formación de películas biodegradables por *casting* en base a proteínas de amaranto nativas -plastificadas con glicerol- y distintas estrategias para modificar la funcionalidad de las mismas: i) la modificación estructural de sus proteínas por distintos tratamientos físicos, y, ii) por formación de materiales compuestos y nanocompuestos, usando almidones semicristalinos, hidrolizados y gelatinizados -de distinto origen botánico- como refuerzos o copolímeros.

En primer lugar se evaluó la formación de películas a partir de dos aislados proteicos de amaranto solubilizados a diferentes pHs (9 y 11), y enriquecidos en distintas fracciones proteicas (globulinas y glutelinas) nativas o parcialmente desnaturalizadas. Las películas resultantes fueron homogéneas, con buenas propiedades barrera al vapor de agua, pero pobres propiedades mecánicas y alta solubilidad en agua.

La primera estrategia para mejorar la funcionalidad de las películas, fue modificar la estructura inicial de las proteínas por tratamientos térmicos y con alta presión.

Las películas formadas con aislados tratados térmicamente (A11-70 y A11-90) presentaron mejor funcionalidad que las películas control. Estas películas formadas por proteínas parcial o totalmente desnaturalizadas, mostraron diferente apariencia, mayor resistencia a la ruptura, menor solubilidad en agua, posiblemente debido al mayor entrecruzamiento a través de puentes disulfuro; pero mayor permeabilidad al vapor de agua, debido a la menor importancia de las interacciones hidrofóbicas. Las películas formadas con proteínas de amaranto tratadas con alta presión -estabilizadas por puentes hidrógeno y uniones disulfuro- mostraron una mejor funcionalidad que las películas sin tratar o tratadas térmicamente, evidenciada por la mejora de sus propiedades mecánicas, su solubilidad y su permeabilidad al vapor de agua.

La segunda estrategia fue obtener distintos tipos de materiales a partir de aislado proteico de amaranto nativo y de almidones de distinto origen botánico:

i) Se formaron películas mezcla a partir de proteínas de amaranto y almidones gelatinizados en distintas proporciones. Fue posible mejorar la funcionalidad y apariencia de películas proteicas a partir de la incorporación a la formulación de almidones gelatinizados de trigo (mejores propiedades relacionadas a la sensibilidad al agua) y maíz (mejores propiedades mecánicas), no así con los almidones de papa, maíz

waxy y amaranto. Las propiedades observadas en estas películas mezcla pueden haber sido influenciadas por la relación amilosa:amilopectina o por la presencia de lípidos o fósforo de los respectivos almidones, sin afectar directamente el tamaño o morfología de sus gránulos, ni el tipo y grado de cristalinidad. En particular, los almidones de trigo y maíz aun gelatinizados podrían conservar cierta estructura remanente de sus gránulos, debido al efecto protector de la amilosa y los lípidos, que podría ejercer un efecto auto refuerzo sobre las películas logrando mejorar la funcionalidad.

ii) Se lograron formar matrices proteicas con cantidades variables de gránulos de almidón dispersos en la matriz, cuya distribución resulto ser dependiente del origen botánico del almidón y de las concentraciones de gránulos agregadas. El agregado de los gránulos de almidón no influyó de manera muy notoria en las propiedades de la matriz proteica, como tampoco se observaron indicios de interacciones importantes entre los gránulos y las proteínas. Solo los gránulos de almidón de papa fueron los que presentaron mayor afinidad por la matriz proteica, mostrando una mayor tendencia con la concentración.

iii) Se obtuvieron nanocristales de almidón de maíz, maíz waxy, papa, trigo y amaranto por hidrólisis controlada de los gránulos de almidón, los cuales presentaron tamaño nanométrico, naturaleza semicristalina, diferente morfología, cristalinidad y tendencia a agregarse dependiendo del origen botánico. El agregado de nanocristales a las formulaciones proteicas de amaranto permitió obtener películas nanocompuestas que pudieron ser desmoldadas sin dificultad, con mejores propiedades que las películas control, dependientes del origen botánico del almidón así como de la concentración agregada, y sin modificar su apariencia. Las mejores propiedades mecánicas se alcanzaron al agregar nanocristales de almidón de maíz y trigo, y la mayor resistencia al agua la presentaron las películas con agregado de nanocristales de almidón de trigo, amaranto y papa. No fue posible relacionar el comportamiento de las películas nanocompuestas con las características de los nanocristales estudiados, lo que evidenciaría que hay varias variables ejerciendo su efecto en forma simultánea y/o que hay que mejorar la obtención y caracterización de los nanorefuerzos.

La modificación de la estructura proteica por tratamientos físicos, así como la mezcla de las proteínas con almidones gelatinizados o nanocristales de almidón se presentan como alternativas muy interesantes para mejorar la funcionalidad de las películas.

Abreviaturas

% p/p	Porcentaje peso en peso
% p/v	Porcentaje peso en volumen
2-ME	2-mercaptoetanol
A	Area de permeación
α	Ordenada al origen en ensayo de hidrofobicidad superficial
AA	Absorción de agua
a_{muestra}	Parámetro de color Hunter-Lab del verde al rojo
θ	Angulo de difracción
ANOVA	Análisis de varianza
ANS	8-anilino-1-naftalensulfonato de amonio
a_{placa}	Parámetro de color Hunter-Lab del verde al rojo del patrón
ASTM	American Society for Testing and Materials
b_{muestra}	Parámetro de color Hunter-Lab del azul al amarillo
b_{placa}	Parámetro de color Hunter-Lab del azul al amarillo del patrón
b.s.	Base seca
c	Concentración de proteínas
C/N	Relación carbono/nitrógeno
DLS	Dispersión de luz dinámica
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DTNB	Acido 5-5' ditiobis 2-nitrobenzoico
ΔE	Diferencia de color Hunter-Lab
ΔH_d	Entalpía de desnaturalización
ΔH_f	Entalpía de fusión de nanocristales de almidón
ΔH_{gel}	Entalpia de gelatinización
ΔIF	Diferencia en intensidad de fluorescencia en ensayo de hidrofobicidad superficial
$\Delta m/\Delta t$	Velocidad de permeación del vapor de agua
E	Módulo elástico
e	Espesor de la película
ϵ	Coeficiente de extinción molar
ϵ	Porcentaje de elongación respecto de la separación de mordazas inicial
ϵ_{max}	Porcentaje máximo de deformación al momento de la ruptura
FEG-SEM	Microscopia electrónica de barrido con cañón de emisión de campo
GC	Grado de cristalinidad
Gp	Globulina-P
H_0	Hidrofobicidad superficial
HR _c	Humedad relativa en la celda de permeación
HR _d	Humedad relativa en el desecador
K_{AV}	Coeficiente de distribución en cromatografía de exclusión molecular
kDa	Kilo Dalton
L_{muestra}	Parámetro de luminosidad Hunter-Lab
L_{placa}	Parámetro de luminosidad Hunter-Lab del patrón
λ	Longitud de onda

m_0	Masa inicial de película
m_∞	Masa de película en el valor de equilibrio
m_f	Masa de la película luego de la solubilización
NTB	Acido 2-nitro-5-tiobenzoico
P	Concentración de proteínas en ensayo de hidrofobicidad superficial
pH	Potencial de hidrogeno
PHB-HV	Polihidroxibutirato-hidrovalerato
pI	Punto isoeléctrico
$P_v^{H_2O}$	Presión de vapor de agua a 20 °C
S	Solubilidad de la película
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SH _L	Concentración de sulfhidrilos libres
σ	Fuerza/área transversal de la película
σ_r	Tensión a la ruptura
T_d	Temperatura de desnaturalización
T_f	Temperatura de fusión de nanocristales de almidón
T_{fin}	Temperatura de finalización de gelatinización
T_g	Temperatura de transición vítrea
T_{gel}	Temperatura de gelatinización
T_o	Temperatura de <i>onset</i> de gelatinización
V_0	Volumen muerto en cromatografía de exclusión molecular
V_e	Volumen de elución del pico en cromatografía de exclusión molecular
V_T	Volumen geométrico de la columna en cromatografía de exclusión molecular
WVP	Permeabilidad al vapor de agua

Indice

I. Introducción general	1
I.1 Problemas ambientales ocasionados por los plásticos sintéticos	2
I.2 Materiales biodegradables y de fuentes renovables	3
I.3 Proteínas y funcionalidad como biopolímeros	5
I.4 Películas proteicas	6
I.4.1 Métodos de obtención	8
I.4.2 Características de los materiales proteicos	9
<i>I.4.2.1 Propiedades de barrera</i>	9
<i>I.4.2.2 Propiedades mecánicas</i>	11
<i>I.4.2.3 Solubilidad</i>	11
I.5 Modificación de la funcionalidad de las películas proteicas	12
I.5.1 Modificación de la estructura inicial de las proteínas mediante métodos químicos, físicos o enzimáticos	12
I.5.2 Adición de aditivos	13
I.5.3 Modificación de las condiciones de procesamiento	14
I.5.4 Aplicación de tratamientos físicos y químicos luego de la obtención de las películas	15
I.6 Materiales compuestos	15
I.7 Materiales nanocompuestos	18
Objetivos	21
II. Películas comestibles preparadas a partir de proteínas de amaranto nativas y desnaturalizadas	22
II.1 El amaranto	23
II.1.1 Historia y resurgimiento del amaranto	23
II.1.2 La planta de amaranto	23
II.1.3 Las semillas de amaranto	25
II.1.4 Las proteínas de reserva del amaranto	27
II.2 Películas proteicas de amaranto	32
II.2.1 Materiales y métodos	34

II.2.1.1 Materiales	34
II.2.1.2 Obtención y caracterización de la harina de amaranto	34
II.2.1.3 Obtención de los aislados proteicos de amaranto	34
II.2.1.4 Caracterización de los aislados proteicos	35
II.2.1.4.1 Determinación de la composición química	35
II.2.1.4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida	35
II.2.1.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	36
II.2.1.4.4 Solubilidad de proteínas	37
II.2.1.5 Obtención de películas proteicas de amaranto	37
II.2.1.6 Caracterización de las películas proteicas	38
II.2.1.6.1 Contenido de agua	38
II.2.1.6.2 Espesor	38
II.2.1.6.3 Opacidad	38
II.2.1.6.4 Color	38
II.2.1.6.5 Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	39
II.2.1.6.6 Solubilidad de las películas en agua	40
II.2.1.6.7 Propiedades mecánicas	40
II.2.1.6.8 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas	41
II.2.1.7 Análisis estadístico	42
II.2.2 Resultados y discusión	43
II.2.2.1 Obtención de aislados proteicos	43
II.2.2.2 Caracterización de las proteínas presentes en los aislados A9 y A11	44
II.2.2.3 Caracterización de las dispersiones iniciales formadoras de películas	47
II.2.2.4 Caracterización de películas proteicas obtenidas a partir de aislados A9 y A11	49
II.2.2.4.1 Apariencia	49
II.2.2.4.2 Propiedades mecánicas	50
II.2.2.4.3 Susceptibilidad al agua	51
II.2.2.4.4 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas	52
II.2.3 Conclusión	54
II.3 Películas proteicas de amaranto formadas a partir de aislados tratados térmicamente	55
II.3.1 Materiales y métodos	57
II.3.1.1 Materiales	57
II.3.1.2 Tratamientos térmicos realizados sobre el aislado A11	57

II.3.1.3	Caracterización de los aislados proteicos nativos y tratados con temperatura	57
II.3.1.4	Obtención de películas proteicas de amaranto	57
II.3.1.5	Caracterización de las películas proteicas	58
II.3.1.5.1	<i>Determinación del ángulo de contacto</i>	58
II.3.1.6	Análisis estadístico	58
II.3.2	Resultados y discusión	59
II.3.2.1	Modificación estructural de las proteínas de amaranto por tratamiento térmico	59
II.3.2.2	Caracterización de los aislados nativos y modificados por temperatura	59
II.3.2.3	Caracterización de películas proteicas de amaranto obtenidas a partir de aislados modificados por temperatura	63
II.3.2.3.1	<i>Apariencia</i>	63
II.3.2.3.2	<i>Propiedades mecánicas</i>	64
II.3.2.3.3	<i>Susceptibilidad al agua</i>	66
II.3.2.3.4	<i>Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas</i>	68
II.3.3	Conclusión	71
II.4	Películas proteicas de amaranto formadas a partir de aislados tratados con alta presión hidrostática	72
II.4.1	Materiales y métodos	74
II.4.1.1	Materiales	74
II.4.1.2	Tratamientos con alta presión hidrostática realizados sobre el aislado A11	74
II.4.1.3	Caracterización de los aislados proteicos nativos y tratados con alta presión	74
II.4.1.3.1	<i>Electroforesis en geles de tricina-poliacrilamida</i>	75
II.4.1.3.2	<i>Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC): Cromatografía de exclusión molecular</i>	76
II.4.1.3.3	<i>Determinación de sulfhidrilos libres</i>	77
II.4.1.3.4	<i>Hidrofobicidad superficial</i>	77
II.4.1.4	Obtención de películas proteicas de amaranto	78
II.4.1.5	Caracterización de las películas proteicas	79
II.4.1.6	Análisis estadístico	79
II.4.2	Resultados y discusión	80
II.4.2.1	Modificación estructural de las proteínas de amaranto por tratamiento con alta presión hidrostática	80
II.4.2.1.1	<i>Estabilidad térmica</i>	80
II.4.2.1.2	<i>Composición polipeptídica</i>	82
II.4.2.1.3	<i>Solubilidad</i>	85

II.4.2.1.4 Sulfhidrilos libres	86
II.4.2.1.5 Hidrofobicidad superficial	87
II.4.2.2 Obtención y caracterización de películas proteicas de amaranto obtenidas a partir de aislados modificados por alta presión hidrostática	88
II.4.2.2.1 Apariencia	88
II.4.2.2.2 Propiedades mecánicas	89
II.4.2.2.3 Susceptibilidad al agua	90
II.4.2.2.4 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas	91
II.4.2.3 Comparación de películas obtenidas a partir de aislados nativos y desnaturalizados por temperatura o alta presión	93
II.4.3 Conclusión	96

III. Materiales compuestos y nanocompuestos en base a proteína de amaranto y almidones de distinto origen 97

III.1 El almidón	98
III.1.1 Consideraciones generales	98
III.1.2 Gelatinización del almidón	101
III.1.3 Hidrólisis del almidón	102
III.2 Caracterización de almidones de distinto origen botánico utilizados 105	
III.2.1 Materiales y métodos 106	
III.2.1.1 Materiales 106	
III.2.1.2 Obtención del almidón de amaranto 106	
III.2.1.3 Caracterización de almidones 107	
III.2.1.3.1 Microscopía óptica 107	
III.2.1.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) 107	
III.2.1.3.3 Determinación del contenido de amilosa 107	
III.2.1.3.4 Difractometría de rayos X 108	
III.2.1.3.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) 109	
III.2.1.4 Análisis estadístico 109	
III.2.2 Resultados y discusión 110	
III.2.2.1 Morfología 110	
III.2.2.2 Contenido de amilosa 112	

III.2.2.3 <i>Cristalinidad</i>	112
III.2.2.4 <i>Gelatinización</i>	114
III.2.3 Conclusión	116
III.3 Películas mezcla ('blends') en base a proteínas de amaranto y almidones gelatinizados	117
III.3.1 Materiales y métodos	118
III.3.1.1 Materiales	118
III.3.1.2 Gelatinización del almidón	118
III.3.1.3 Obtención de películas mezcla a partir de proteínas de amaranto y almidones gelatinizados	118
III.3.1.4 Caracterización de las películas	119
III.3.1.4.1 <i>Absorción de agua (AA)</i>	119
III.3.1.4.2 <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	119
III.3.1.5 Análisis estadístico	120
III.3.2 Resultados y discusión	121
III.3.2.1 Gelatinización de los almidones	121
III.3.2.2 Caracterización de películas obtenidas a partir de dispersiones mezcla de aislado proteico de amaranto y almidones gelatinizados	122
III.3.2.2.1 <i>Apariencia</i>	123
III.3.2.2.2 <i>Susceptibilidad al agua</i>	126
III.3.2.2.3 <i>Propiedades mecánicas</i>	130
III.3.2.2.4 <i>Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas</i>	132
III.3.2.2.5 <i>Microestructura</i>	135
III.3.3 Conclusión	139
III.4 Películas en base a proteínas de amaranto y gránulos de almidón utilizados como refuerzo	141
III.4.1 Materiales y métodos	143
III.4.1.1 Materiales	143
III.4.1.2 Obtención de películas a partir de aislado proteico de amaranto y gránulos de almidón	143
III.4.1.3 Caracterización de las películas	143
III.4.1.3.1 <i>Microscopía óptica</i>	144
III.4.1.4 Análisis estadístico	144
III.4.2 Resultados y discusión	145
III.4.2.1 Determinación de la temperatura de secado de las películas	145
III.4.2.2 Obtención y caracterización de películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y gránulos de almidón	145

III.4.2.2.1 <i>Microestructura</i>	148
III.4.2.2.2 <i>Susceptibilidad al agua</i>	150
III.4.2.2.3 <i>Propiedades mecánicas</i>	153
III.4.2.2.4 <i>Color y opacidad</i>	155
III.4.2.2.5 <i>Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas</i>	156
III.4.3 Conclusión	158
III.5 Películas en base a proteínas de amaranto y nanocristales de almidón utilizados como nanorefuerzos	159
III.5.1 Materiales y métodos	161
III.5.1.1 Materiales	161
III.5.1.2 Obtención de nanocristales de almidón	161
III.5.1.3 Caracterización de los nanocristales de almidón	162
III.5.1.3.1 <i>Determinación del tamaño de partícula</i>	162
III.5.1.3.2 <i>Microscopía electrónica de barrido con cañón de emisión de campo</i>	162
III.5.1.3.3 <i>Difractometría de rayos X</i>	162
III.5.1.3.4 <i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	163
III.5.1.4 Obtención de películas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocristales de almidón	163
III.5.1.5 Caracterización de las películas de aislado proteico de amaranto y nanocristales de almidón	164
III.5.1.5.1 <i>Determinación de temperatura de transición vítrea (Tg)</i>	164
III.5.1.5.2 <i>Biodesintegración en suelo</i>	164
III.5.1.6 Análisis estadístico	165
III.5.2 Resultados y discusión	166
III.5.2.1 Obtención de los nanocristales de almidón	166
III.5.2.2 Caracterización de los nanocristales de almidón	167
III.5.2.2.1 <i>Morfología y tamaño de los nanocristales</i>	167
III.5.2.2.2 <i>Cristalinidad</i>	171
III.5.2.3 Películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocristales de almidón	176
III.5.2.3.1 <i>Apariencia</i>	176
III.5.2.3.2 <i>Susceptibilidad al agua</i>	178
III.5.2.3.3 <i>Propiedades mecánicas</i>	183
III.5.2.3.4 <i>Microestructura</i>	185
III.5.2.3.5 <i>Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas</i>	187
III.5.2.3.6 <i>Cristalinidad</i>	190
III.5.2.3.7 <i>Determinación de la temperatura de</i>	191

<i>transición vítrea (T_g)</i>	
<i>III.5.2.3.8 Biorresistencia en suelo</i>	192
III.5.3 Conclusión	195
IV. Conclusiones generales	196
Referencias bibliográficas	201



I. INTRODUCCIÓN GENERAL



I.1 Problemas ambientales ocasionados por los plásticos sintéticos

Los plásticos son productos de origen orgánico y alto peso molecular, que son sólidos en su estado definitivo, y en alguna etapa de su fabricación, son lo suficientemente fluidos como para moldearlos por calor y presión. En general, se habla de plásticos para referirse a los materiales sintéticos obtenidos por polimerización a partir de compuestos orgánicos derivados del petróleo. En general, son materiales muy fuertes pero flexibles; resistentes a la corrosión, al agua y a la degradación por químicos, bacterias y luz solar; y aislantes térmicos y eléctricos. Además por ser de bajo costo, prácticamente indestructibles y ampliamente versátiles, pueden utilizarse en un variado número de aplicaciones, ya sean de tipo industrial, comercial o domésticas.

A pesar de ello, estos materiales presentan problemas ambientales ligados a su producción y acumulación (debido a su alta resistencia a la degradación), y son obtenidos a partir de derivados del petróleo, que es un recurso no renovable.

El hecho de utilizar el petróleo como materia prima para la obtención de estos materiales, además del problema del aumento del precio del petróleo, genera también la emisión de gases invernadero provocando contaminación ambiental (Zhang y Mittal, 2010). El descarte de estos materiales luego de ser usados es el otro problema significativo de los plásticos ya que al acumularse representan la mayor fuente de contaminación del aire y las fuentes de agua. Las posibles soluciones a este problema son el reciclado, la acumulación en lugares adecuados o la incineración. El reciclado, a pesar de ser la opción más adecuada ambientalmente, tiene como contraparte la gran cantidad de trabajo y energía requerida, haciendo que ésta no sea la opción más rentable (Sinha Ray y Bousmina, 2005). La acumulación en lugares determinados es una solución poco promisoría debido al gran crecimiento de las poblaciones y al gran consumo de plásticos alrededor de estas; y la incineración genera al igual que la producción de plásticos, gran cantidad de gases invernadero, además de ser más cara que el reciclado (Song y col., 2011).

Por todas estas causas, la necesidad de desarrollar nuevos materiales biodegradables y de fuentes renovables, para sustituir a los polímeros sintéticos, al menos, en algunas de sus aplicaciones, se ha incrementado en las dos últimas décadas, ya que contribuiría a resolver la contaminación ambiental y el problema del petróleo como fuente finita.

I.2 Materiales biodegradables y de fuentes renovables

La “American Society of Testing and Materials” (ASTM) define un material **biodegradable** como “aquel capaz de descomponerse en dióxido de carbono, metano, componentes inorgánicos o biomasa, mediante la acción enzimática de microorganismos que pueda ser medidas por ensayos estandarizados en un período de tiempo determinado” (ASTM Standard D6813, 2002).

Los materiales poliméricos obtenidos a partir de **fuentes renovables** incluyen a los polímeros provenientes de la naturaleza, así como a los polimerizados a partir de sustancias naturales mediante métodos biológicos o químicos (Sudesh y Iwata, 2008).

Dentro de los bioplásticos se encuentran los materiales que poseen, al menos, algunas de estas dos características, ya sean biodegradables, u obtenidos a partir de fuentes renovables, o ambas. El hecho de que un material se obtenga a partir de recursos renovables, no significa que sea biodegradable, y viceversa. Es por esto, que la combinación de ambas características es lo que provoca el gran interés en esta área.

Generalmente, los polímeros biodegradables y de fuentes renovables pueden ser clasificados en tres categorías según su origen y producción (van Tuil y col., 2000):

- *Polímeros producidos por síntesis química clásica usando monómeros naturales:* a partir de monómeros derivados de materias primas naturales se pueden obtener una amplia variedad de polímeros mediante el uso de rutas químicas. Entre estos polímeros, los más estudiados son el ácido poliláctico (PLA), un biopolíéster polimerizado a partir de monómeros de ácido láctico producidos por fermentación de hidratos de carbono, y el ácido poliglicólico (PGA) sintetizado a partir del ácido glicólico. El PLA es comercialmente interesante ya que posee buenas propiedades mecánicas, es transparente y biodegradable, pero a pesar de esto, su producción -iniciada en la década del 90 a nivel industrial- aún tiene un alto costo comparado con los materiales termoplásticos mas utilizados (van Tuil y col., 2000; Bohlmann, 2005).

- *Polímeros producidos por microorganismos o bacterias genéticamente modificadas:* este grupo está constituido por poliésteres producidos por una amplia variedad de microorganismos como fuente de almacenamiento de energía y carbono (Suriyamongkol y col., 2007). Dentro de ellos los polihidroxialcanoatos son los más conocidos y el polihidroxibutirato (PHB) el más estudiado. Existen otros polímeros producidos por microorganismos que han comenzando a estudiarse, como la celulosa

bacteriana, entre otros, pero sus costos de producción aún son altos, al igual que ocurre con el PHB (van Tuil y col., 2000).

- *Polímeros directamente extraídos de la naturaleza*: son los obtenidos a partir de fuentes animales o vegetales, como los polisacáridos (almidón, celulosa, quitina, pectinas y gomas, entre otros) y las proteínas (caseína, gluten, suero, colágeno, queratina y soja, entre otras). Todos ellos contienen uniones hidrolizables, que los hace muy susceptibles a la biodegradación por las enzimas hidrolíticas de los microorganismos. Esto tiene un gran impacto sobre la *performance* y la durabilidad de estos materiales en condiciones de alta humedad. Dentro de los polímeros naturales, el almidón ha sido el más estudiado, a partir del cual se han desarrollado numerosos materiales por distintas técnicas de procesamiento.

El mercado de bioplásticos a nivel industrial para utilizar como envases de alimentos ha comenzado alrededor del año 2002, inicialmente para envasar productos orgánicos, y luego para muchos otros productos. La **figura I.1** muestra que la capacidad global de producción de bioplásticos en el año 2010, fue de 724000 toneladas, perteneciendo 428000 toneladas a los plásticos biodegradables, la cual se estima aumentará casi al doble para el año 2015, mostrando la importancia y el interés del mercado por estos materiales.

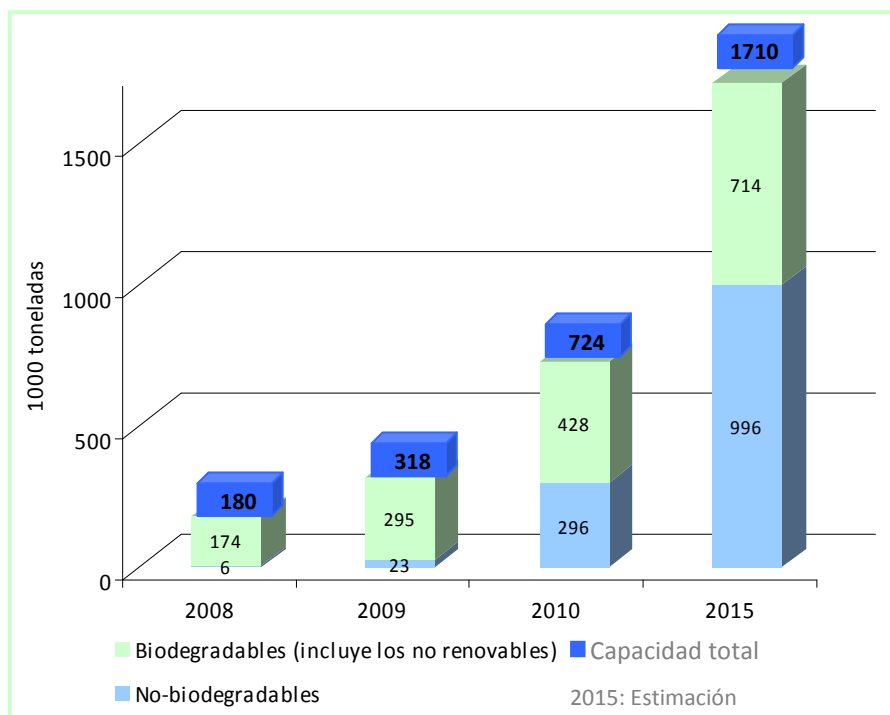


Figura I.1 Capacidad de producción global de bioplásticos (adaptado de *European Bioplastics, University of Applied Sciences Arts Hannover, Mayo 2011*)

Este mercado además de estar caracterizado por un rápido crecimiento, posee una fuerte diversificación en cuanto a su aplicación y el tipo de biopolímero utilizado, ya sea biodegradable o no. Por ejemplo, el 27 % de los biopolímeros producidos en 2010 fueron biopolietilenos, seguidos por mezclas de almidones biodegradables (16 %), ácido poliláctico (PLA) (15 %) y polihidroxialcanoatos (PHA) (12 %) (**figura I.2**), entre otros. Así y todo, la mayor restricción de este mercado es el precio, que aún es mucho mayor que el de los plásticos tradicionales, ya que en general, rondan entre 2-5 euros por kilo, contra 1,2 euros por kilo para los polímeros derivados del petróleo (Bioplastics, 07/08).

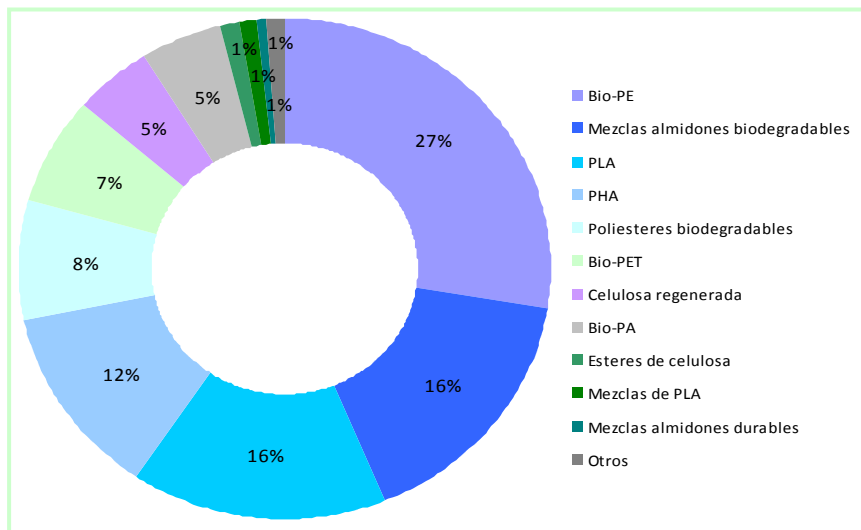


Figura I.2 Capacidad de producción de biopolímeros por tipo en el año 2010 (adaptado de European Bioplastics/University of Applied Sciences Arts Hannover, Mayo 2011)

I.3 Proteínas y funcionalidad como biopolímeros

Las proteínas, a diferencia de otros polímeros compuestos por uno o dos monómeros como el almidón, son heteropolímeros compuestos por más de veinte aminoácidos diferentes, con secuencias y estructuras específicas.

La funcionalidad de las proteínas es de gran importancia tecnológica y existe un gran interés por conocer los mecanismos implicados en ella. Es sabido que las propiedades funcionales de las proteínas están relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, tales como masa molecular, estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, distribución de cargas, carga neta, relación hidrofobicidad/hidrofilicidad y flexibilidad molecular (Damodaran, 1989). Todas estas propiedades son

particularmente sensibles a factores del medio, como temperatura, pH, fuerza iónica, cambios de la constante dieléctrica del medio y presencia de agentes caotrópicos, entre los más significativos. Los factores antes mencionados, pueden en determinados rangos, ocasionar el desplegamiento de las proteínas y modificar su estructura a nivel secundario, terciario y cuaternario, produciendo su desnaturalización (Kauzmann, 1951; Arntfield y Murray, 1981).

Las propiedades funcionales de las proteínas pueden clasificarse según el tipo de interacción molecular principal que se establece (Cheftel, 1989):

- *Propiedades dependientes de la interacción proteína-agua o de hidratación*, como adsorción de agua, absorción de agua, retención de agua, hinchamiento, mojabilidad, solubilidad, dispersabilidad, viscosidad (Pilosof, 2000).
- *Propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína*, como floculación, coagulación, gelificación y formación de estructuras, por ejemplo, fibras, masas, películas, etc.
- *Propiedades de superficie*, como las propiedades espumantes y emulsificantes (Wagner, 2000), que dependen de las características superficiales de la molécula de proteína y su capacidad de difundir hasta una interfase, agua-aire o agua-aceite, y formar una película estable.

Existen numerosos ejemplos que relacionan la estructura de las proteínas con su funcionalidad, como la hidrofobicidad superficial, hidrofobicidad total, hidrofobicidad promedio, carga superficial, tamaño y flexibilidad molecular, contenido de grupos sulfhidrilos (-SH) y puentes disulfuro (S-S) con su habilidad para desempeñar una determinada propiedad funcional (Kato y Nakai, 1980; Nakai, 1983; Utsumi y Kinsella, 1985; Damodaran, 1990; Petruccelli y Añón, 1995; Maruyama y Sato, 1999; Molina Ortiz y Wagner, 2002; Maruyama y Prak, 2004).

La estructura de las proteínas puede ser modificada mediante tratamientos químicos, físicos y enzimáticos, lo que puede influir directamente o indirectamente sobre la funcionalidad de las mismas.

I.4 Películas proteicas

Dentro de los polímeros naturales, las proteínas se muestran como una alternativa con potencial para suplantar a los materiales sintéticos no degradables en algunas

aplicaciones, especialmente aquellas en las que su funcionalidad se lo permita. Por ende, las aplicaciones que más interés suscitan, son las aplicaciones de vida corta, como *packaging* de alimentos o plásticos para la agricultura.

A pesar de ser recursos renovables y estar ampliamente disponibles, solo algunas proteínas resultan económicas frente a otros polímeros biodegradables, como el ácido poliláctico, polihidroxialcanoatos, etc., especialmente aquellas que provienen de residuos o subproductos industriales (Cruz-Romero y Kerry, 2008).

La alta variabilidad química dada por los grupos laterales de los aminoácidos que componen las proteínas de distinto origen, les permite interactuar vía enlaces hidrógeno, interacciones iónicas, interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes, dando origen a diferentes estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, lo que podría llevar a la formación de materiales con características diferenciales (Krochta, 2002).

Un gran número de proteínas de distinto origen han sido estudiadas por su capacidad de formar películas comestibles y/o biodegradables (Gennadios, 2002; Cuq y col., 1998; Guilbert y Cuq, 2005). Las proteínas de origen animal más estudiadas son las caseínas, las proteínas de suero de leche, las albúminas de huevo, el colágeno, la gelatina, la queratina y las proteínas miofibrilares (Chen, 1995; Arvanitoyannis y col., 1996; Pérez-Gago y Krochta, 2001; Gennadios y col., 1996b; Hood, 1987; Fraga y Williams, 1985; Gontard y col., 1996); y las de origen vegetal son el gluten de trigo, las zeínas de maíz y las proteínas de soja y girasol (Micard y col., 2000; Gontard y col., 1994; Herald y col., 1996; Gennadios y Weller, 1990; Rhim y col., 2000; Mauri y Añón, 2006; Denavi y col., 2009b; Ayhllon-Meixueiro y col., 2000; Rouilly y col., 2006a y b; Salgado y col., 2010).

Existen otras proteínas de fuentes no tradicionales que podrían permitir la formación de materiales con características distintivas, con estructuras y funcionalidades diferenciales (Park y col., 2002). Por ejemplo, se ha evidenciado el uso de proteínas de arroz, de sorgo, de maní y de arveja, entre otras, en la obtención de películas (Park y col., 2002; Adebisi y col., 2008; Emmambux y col., 2004; Jangchud y Chinnan, 1999; Gueguen y col., 1998). A pesar de que los desafíos para el desarrollo exitoso y la comercialización de películas biodegradables a partir de estas proteínas no serán inmediatos, la importancia de comprender la relación entre la química de las

proteínas, antes, durante y después de la formación de la película y la funcionalidad de la misma, son de particular interés debido a la posibilidad de adaptar las propiedades resultantes a aplicaciones específicas (Park y col., 2002).

I.4.1 Métodos de obtención

Las proteínas pueden formar -mediante el entrecruzamiento de sus moléculas- una red macromolecular relativamente organizada, estabilizada por interacciones de tipo covalente o no covalente uniformemente distribuidas, con lo cual es posible obtener películas y/o recubrimientos. Las **películas** son materiales que son formados previamente a ser utilizados, y que pueden ser usadas como cubiertas, capas de separación, cápsulas, envases o bolsas. Los **recubrimientos** son formados directamente sobre la superficie del objeto a proteger o mejorar, por lo que pasan a ser parte del producto y permanecen en el mismo durante el consumo (en el caso de recubrimientos de alimentos), y en general, son de menor espesor (Krochta, 2002).

Las proteínas de alto peso molecular, como las glutelinas, o las proteínas fibrosas, como el colágeno, son las más promisorias para la formación de películas (Guilbert y Graille, 1994). Por el contrario, las proteínas globulares y pseudo globulares, como las gliadinas, glicininas o caseínas, en general, deben ser desplegadas previamente a la formación de la red. Se requieren varias etapas para formar esta red:

- ruptura de los enlaces intermoleculares de baja energía que estabilizan las proteínas en estado nativo,
- reordenamiento de las proteínas, y
- formación de una red tridimensional mediante nuevas interacciones o enlaces (inter o intramoleculares) de tipo covalentes y/o no covalentes, luego de la remoción del solvente (Mauri y Añón, 2011).

Actualmente las películas formadas por proteínas -al igual que las de otros polímeros- pueden obtenerse por dos procesos tecnológicos: uno "húmedo" basado en la dispersión o solubilización de las proteínas, y otro "seco" basado en las propiedades termoplásticas de las proteínas a bajas concentraciones de agua (Cuq y col., 1997).

- *Proceso húmedo o proceso con solvente*: debido a su efectividad y simplicidad, es el método más utilizado a escala de laboratorio, mediante el cual una dispersión de proteína, en general con adición de un plastificante, es colocada en un soporte para

luego proceder a la evaporación del solvente. A pesar de tener varias limitaciones, debido a que no es un proceso continuo y demanda mucho tiempo de producción, esta tecnología sigue siendo usada actualmente. Por ejemplo, se conoce el uso de esta metodología en procesos de modo semicontinuo, como es el “spread coating” (Larotonda, 2007; Dangaran y col., 2009).

- *Proceso termoplástico*: son procesos con bajos contenidos de humedad (o plastificantes), realizados en intervalos cortos de tiempo, donde se combinan altas temperaturas y presiones, y esfuerzos de corte. La energía mecánica dada al material permite formar una mezcla homogénea, darle forma al producto y estabilizar por enfriamiento y/o eliminando plastificantes volátiles (Hernández-Izquierdo y Krochta, 2008; Mauri y Añón, 2011). Utilizando esta metodología, los materiales basados en proteínas, pueden ser obtenidos por extrusión, moldeo por soplado, inyección o termoformado.

A pesar de que la mayoría de los trabajos publicados en la temática utilizan la primera tecnología (Dangaran y col., 2009), en los últimos años surgió la idea de obtener películas comestibles adaptando las tecnologías de procesamiento de los polímeros sintéticos. De este modo se ha logrado contar con la alternativa tecnológica para que estos materiales puedan ser obtenidos a escala industrial. Por ejemplo, algunos grupos han obtenido materiales con técnicas como moldeo por compresión, inyección y extrusión, con proteínas de girasol, soja, gluten y miofibrilares, entre otras (Orliac y col., 2002 y 2003; Rouilly y col., 2006a y b; Micard y col., 2001; Cuq y col., 1998; Foulk y Bunn, 2001; Mungara y col., 2002).

I.4.2 Características de los materiales proteicos

I.4.2.1 Propiedades de barrera

Las propiedades de barrera a diferentes moléculas son particularmente interesantes en *packaging*, en particular en envases de alimentos, ya que el potencial de un material para generar barrera a la humedad, gases, *flavor*, aroma, radiaciones y lípidos es de gran utilidad para proteger los alimentos, aumentando la calidad y la vida útil de los mismos.

La permeabilidad es una propiedad del estado estacionario que describe la capacidad de una sustancia, permeato, de disolverse en la matriz, y la velocidad a la cual ese

permeato difunde a través de la película, impulsado por una fuerza conductora relativa a la diferencia de concentración entre los dos lados de la película. La permeabilidad es definida como:

$$\text{Permeabilidad} = (\text{velocidad de permeación} \times \text{espesor}) / (\text{área} \times \text{diferencia de presión})$$

En particular, las propiedades de barrera de los materiales proteicos dependen de la naturaleza y densidad de la red macromolecular, y más particularmente de la proporción y distribución de los aminoácidos no polares con respecto a los polares (Cuq y col., 1995; Guilbert y Graille, 1994). Además, en general, la permeabilidad de los materiales proteicos a las sustancias polares y no polares, aumenta con la temperatura y el contenido de humedad relativa del ambiente, por lo que estas propiedades pueden ser comparadas, siempre y cuando, las condiciones de medida sean idénticas (Gennadios, 2002).

Permeabilidad al vapor de agua (WVP): Las películas de proteínas, por su carácter polar y su inherente hidrofiliidad, tienen, en su mayoría, alta permeabilidad a las sustancias polares, como el vapor de agua. En general, es similar a la de las películas de polisacáridos, y mayor que la de los materiales sintéticos y los obtenidos a partir de lípidos. Aunque no todos los plastificantes tienen este comportamiento, la permeación a través de las películas proteicas es, muchas veces, facilitada por la presencia sistemática de plastificantes. En general, los plastificantes son moléculas de baja masa molecular que pueden ser agregados a un material para mejorar la flexibilidad (Gennadios y col., 1994), y pueden llevar al aumento de la permeabilidad al agua de las películas (McHugh y Krochta, 1994a). La efectividad de un plastificante depende del tipo, tamaño y compatibilidad con la matriz proteica (Sothornvit y Krochta, 2001), lo cual, junto a la cantidad agregada, influirá sobre las interacciones entre las moléculas de proteína, permitiendo el control de la fragilidad de los materiales y la disminución de la temperatura para su procesamiento termoplástico.

Permeabilidad al oxígeno, dióxido de carbono y etileno: En general, a humedad relativa baja e intermedia, la permeabilidad a los gases de los materiales proteicos y de polisacáridos es mucho menor que la del polietileno, lo que los convierte en materiales interesantes para ciertas aplicaciones. Pero mientras que estas propiedades en los materiales sintéticos permanecen estables a la alta humedad relativa, en los materiales proteicos y de polisacáridos son muy dependientes de la temperatura y la

humedad relativa. Por ejemplo, la permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono, es aproximadamente mil veces mayor en los materiales con altas humedades relativas que en las películas almacenadas a 0 % de humedad relativa. En los materiales proteicos, este efecto es mucho mayor para los gases “hidrofílicos” (CO₂) que para los gases “hidrofóbicos” (O₂) (Guilbert y Cuq, 2005).

Permeabilidad a aromas y lípidos: Varios estudios muestran resultados cuantitativos respecto de la permeabilidad a aromas y lípidos de los materiales proteicos. Algunos resultados han mostrado, mediante una celda de permeación adosada a un cromatógrafo gaseoso, que las películas de gluten de trigo son mejor barrera al aroma 1-octen-3-ol (el aroma de los hongos) que el LDPE o la metilcelulosa (aproximadamente 10 veces mayor) (Debeaufort y Voilley, 1994). Otro ejemplo muestra que películas de zeínas de maíz presentaron excelente resistencia a la grasa cuando se utilizó como película o como recubrimiento sobre papel (Trezza y Vergano, 1994), lo que le otorga una característica muy útil para el envasado de alimentos listos para consumir.

1.4.2.2 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los materiales basados en proteínas dependen parcialmente de la distribución y de la intensidad de las interacciones inter e intramoleculares generadas en la formación de la red tridimensional (Guilbert y Cuq, 2005). Además, estas propiedades son ampliamente dependientes de la temperatura y de la humedad relativa del ambiente donde se realiza la medida.

En particular, las películas proteicas muestran generalmente valores de tensión a la ruptura menores pero cercanos a los de la mayoría de las películas de polisacáridos y mucho menores que los de los polímeros sintéticos, y menor elongación que las películas sintéticas. Sin embargo, las propiedades mecánicas de estas películas son, en general, suficientes para permitir el uso de estas en muchos productos, ya sea como recubrimientos o como envases (Krochta, 2002).

1.4.2.3 Solubilidad

Los materiales son solubles en agua cuando la energía de los enlaces interproteínas es menor que la energía de interacción que puede establecerse entre el agua y los grupos

polares no involucrados en la red. La presencia de “nodos físicos”, enlaces covalentes intermoleculares y/o una alta densidad de interacción, es suficiente para producir películas que sean parcial o completamente insolubles en agua (Guilbert y Cuq, 2005). Esta propiedad depende, por lo tanto, de las condiciones de formación de la película y de la estructura de las proteínas que la forman (Gennadios, 2002). Por ejemplo, se ha mostrado que un aislado proteico de suero nativo forma películas totalmente solubles en agua, pero cuando se desnaturalizan las proteínas por tratamiento térmico, las películas formadas son insolubles (Pérez-Gago y col., 1999).

Esta propiedad es muy importante, ya que dependiendo del valor obtenido para este parámetro, el material podrá ser usado para determinada aplicación. Por ejemplo, si se utilizará el material como un envase que contenga sustancias que es necesario liberar, como aditivos, antioxidantes, etc., se espera que la película sea parcialmente soluble; en cambio si se desea integridad de la película para proteger un alimento, se buscará que ese material sea insoluble en agua (Krochta, 2002).

Resumiendo, se podría generalizar a los **materiales proteicos** como biodegradables, de fuentes renovables, comestibles (dependiendo de los aditivos y el procesamiento utilizado), levemente resistentes a la tracción, sensibles a la humedad (alta permeabilidad al vapor de agua), con baja permeabilidad a aromas y lípidos y alta solubilidad en agua (Guilbert y Cuq, 2005).

I.5 Modificación de la funcionalidad de las películas proteicas

Existen diversas estrategias de modificación de la funcionalidad de las películas proteicas, dependiendo de la etapa de formación de la película en la que intervengan, lo cual permitirá luego determinar la aplicación más adecuada para dichos materiales.

I.5.1 Modificación de la estructura inicial de las proteínas mediante métodos químicos, físicos o enzimáticos

La estructura proteica inicial influirá en el tipo de interacciones y el grado de entrecruzamiento que pueda lograrse en los materiales formados. Es decir, que las moléculas tendrán mayor o menor capacidad de interactuar entre ellas ya sean por interacciones covalentes (puentes disulfuro) y/o no covalentes (electrostáticas, puente

hidrógeno e hidrofóbicas) dependiendo de su conformación (Darby y Creighton, 1995). En general, un aumento del grado de entrecruzamiento, conduce a matrices proteicas más densas, con menor solubilidad y mayor resistencia mecánica, y el tipo de interacciones involucradas en la estabilización de la matriz influyen en la magnitud del cambio de cada propiedad (Mauri y Añón, 2006 y 2008; Salgado y col., 2010). La dispersión formadora de películas puede ser sometida a diferentes tratamientos (térmicos, con alta presión, irradiación, hidrólisis, tratamiento con ácidos o álcalis, etc.) de modo de modificar la estructura proteica inicial. Proteínas de soja, gluten, suero de leche, entre otras, sometidas a estos tratamientos, fueron utilizadas para la formación de películas (Fouk y Bunn, 2001; Koehler y col., 2010; Mauri y Añón, 2006 y 2008, Ghorpade y col., 1995; Rangavajhyala y col., 1997; Krochta, 1997; Rhim y col., 2000, Banerjee y col., 1996). A modo de ejemplo, al cambiar el pH de la dispersión formadora de películas de proteínas de soja, se redujo a la mitad la permeabilidad al vapor de agua, y cuando el mismo tratamiento se realizó sobre dispersiones de caseinato de sodio, se modificó la solubilidad en agua, convirtiendo la película en insoluble (Brandenburg y col., 1993; Avena-Bustillos y Krochta, 1993).

I.5.2 Adición de aditivos

Hay diversos tipos de aditivos que pueden agregarse a la matriz proteica para modificar su funcionalidad. Los compuestos más usados son los **plastificantes**, dentro de los cuales los polioles (como el glicerol, propilenglicol y el sorbitol), la sacarosa y los ácidos grasos, son los más utilizados.

Como se mencionó anteriormente, la adición de plastificantes a las matrices proteicas disminuye la fragilidad de los materiales facilitando el procesamiento. El agregado de estos compuestos provoca una disminución de la interacción entre las cadenas polipeptídicas, llevando a la disminución de la Tg de las películas. Esto genera un aumento en la elongación, en detrimento de la resistencia y el módulo elástico, y, en general, una disminución en las propiedades barrera al agua, gases y aromas (Gennadios, 2002). Por ejemplo, varios autores han mostrado la disminución de la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno en películas de proteína de clara de huevo y de suero de leche, y el aumento de la resistencia a la tracción en películas de

caseinato de sodio, por agregado de diferentes tipos o cantidad de plastificantes (McHugh y Krochta, 1994b; Gennadios y col., 1996b; Siew y col., 1999).

Otros aditivos utilizados en la formulación de estos materiales son los **emulsificantes** y otros compuestos anfifílicos, que además de poder ser usados como plastificantes, pueden reducir las diferencias entre las energías superficiales de la formulación que se usará como recubrimiento y la superficie del producto a recubrir, de manera de mejorar la adhesión y por ende la *performance* del recubrimiento (Maldonado-Valderrama y Rodríguez Patino, 2010).

Los **entrecruzantes químicos** -aldehídos de bajo peso molecular (como formaldehído, glioxal, y glutaraldehído)- reaccionan con los aminos y sulfhidrilos de las proteínas formando interacciones covalentes intra e intermoleculares. Los **entrecruzantes enzimáticos**, en general, favorecen, por medio de enzimas, el entrecruzamiento entre las cadenas polipeptídicas, mejorando las propiedades físico-mecánicas y de barrera cuando son adicionados a los materiales proteicos (Audic y Chaufer, 2005; Vaz y col., 2003; Galiotta y col., 1998; Song y col., 2011). Esto conduce principalmente a matrices más resistentes y menos solubles, y algunas veces se logran mejorar también la permeabilidad al vapor de agua.

Los materiales proteicos presentan la ventaja de que pueden ser aditivados con otro tipo de compuestos, dando origen a los materiales activos, de especial interés cuando se piensa en *packaging* de alimentos, ya que se busca aumentar la vida útil de alimentos. Estos materiales son capaces de modificar sus propiedades frente a cambios del medio ambiente externo o interno al envase, protegiendo al alimento principalmente del deterioro, y asegurando la calidad microbiológica, el valor nutricional y la apariencia del producto. Los aditivos que se usan más comúnmente en los materiales activos son los antioxidantes, antimicrobianos, absorbentes de agua, dióxido de carbono, etileno y aromas, entre otros (Brody y col., 2001), haciendo énfasis en que todos ellos sean de uso alimentario y de origen natural.

Otros aditivos que pueden agregarse a las películas proteicas pueden ser nutrientes, *flavors* y pigmentos que pueden servir para mejorar el valor nutricional, la calidad y la apariencia del producto que protegen (Mauri y Añón, 2011).

I.5.3 Modificación de las condiciones de procesamiento

Es posible obtener materiales con diferente funcionalidad a partir de las mismas materias primas, utilizando distintas tecnologías de procesamiento. Denavi y col. (2009b) mostraron que es posible obtener películas de soja por *casting* con distintas propiedades mecánicas y solubilidad variando la temperatura y humedad relativa durante el secado, y que incluso estas variaciones difieren al trabajar con aislados proteicos de soja con distintas propiedades estructurales iniciales. También se logró mejorar las propiedades de barrera y mecánicas de películas proteicas de soja o de albúmina, por aumento de la temperatura de secado, o de películas proteicas de soja acetiladas obtenidas por termocompresión (Gennadios y col., 1996b; Jiang y col., 2007; Foulk y Bunn, 2001; Mauri y Añón, 2011).

I.5.4 Aplicación de tratamientos físicos y químicos luego de la obtención de las películas

Algunos estudios se han focalizado en realizar tratamientos sobre las películas luego de su obtención, con el objetivo de modificar la matriz formada y mejorar su funcionalidad. Hay varios trabajos que muestran un aumento en la resistencia mecánica y una disminución drástica en la solubilidad en películas de gluten luego de aplicar tratamientos térmicos cortos a temperaturas mayores a 100 °C, o en presencia de vapores de formaldehído; en películas de proteínas de poroto en soluciones alcohólicas de formaldehído; o en películas de soja o de suero de leche tratadas térmicamente (Micard y col., 2000; Gueguen y col., 1998; Gennadios y col., 1996a; Miller y col., 1997).

I.6 Materiales compuestos

La combinación de dos o más materiales a fin de obtener un nuevo material que comparta las ventajas de cada componente y minimice las desventajas que presentan cada uno de ellos por separado, se presenta como una de las mejores alternativas para mejorar la funcionalidad de las películas proteicas. En particular, los materiales compuestos están constituidos por dos o más fases y poseen nuevas propiedades respecto de las de sus componentes (ASTM D 3878-95c).

En general, están compuestos por dos componentes: la matriz, que cumple la función de soportar y proteger el material de relleno y distribuir la carga aplicada entre ellos, y el relleno, que es el material que refuerza y rigidiza la matriz (LeCorre y col., 2010).

La combinación de distintos materiales da origen a distintos tipos de materiales compuestos (Vinson y Sierakowski, 2008), como se muestra en la **figura I.3**:

- materiales compuestos formados por una matriz continua y una fase de relleno discontinuo formado por partículas discretas,
- materiales compuestos formados por una matriz continua y una fase de relleno discontinuo formado por fibras,
- materiales compuestos formados por una matriz continua y una fase de relleno discontinuo formado por láminas,
- materiales compuestos formados por dos o más capas llamados materiales bicapa o multicapa, y
- materiales compuestos formados por un esqueleto o una red interpenetrada formado por dos fases continuas.

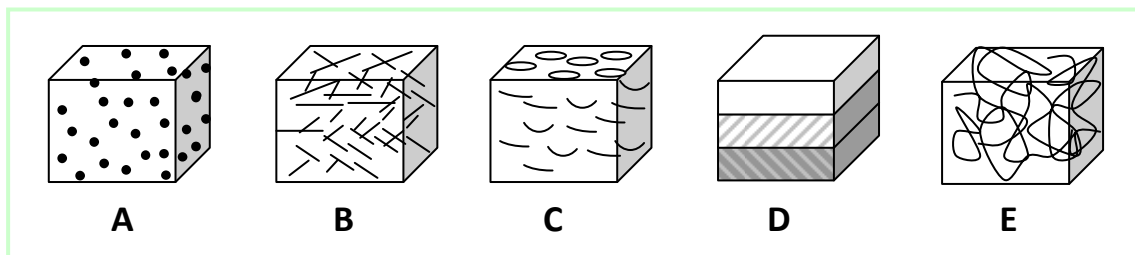


Figura I.3 Materiales compuestos: rellenos de partículas (A), rellenos de fibras (B) y de láminas (C), multicapa (D) o interpenetrados (E)

A partir de esto, otra estrategia para mejorar la funcionalidad de las películas proteicas, puede ser estudiar la combinación de las mismas con otros compuestos para formar:

- **materiales compuestos en base a proteínas y lípidos.** Pensando en la naturaleza hidrofóbica de los lípidos, estos materiales son formulados con el objetivo de mejorar las propiedades barrera al vapor de agua de las películas proteicas. A partir de lípidos y proteínas se pueden obtener:

- *películas bicapa*: en donde la capa de lípido se deposita sobre la película de proteína -previamente formada- a partir del fundido o a partir de una dispersión del lípido en un

solvente adecuado; o por desestabilización de una emulsión (Pérez-Gago y Krochta, 2005),

- *películas emulsionadas*: los lípidos se dispersan en la solución de proteínas formando una emulsión estable que se mantiene luego del secado (Pérez-Gago y Krochta, 2005).

El efecto que tienen los lípidos al incorporarse en los materiales proteicos compuestos depende del tipo de lípidos utilizado y de las interacciones que se establezcan entre ellos (Krochta, 2002). En general, son usados para disminuir la susceptibilidad al vapor de agua, siendo las películas bicapa más eficientes en reducir la WVP que las emulsionadas, debido a la existencia de una fase hidrofóbica continua. Esto se presenta como una ventaja de las películas bicapa, a pesar de que involucran más etapas en su procesamiento -lo que condiciona su aplicación en la industria alimentaria- (Pérez-Gago y Krochta, 2005; Debeaufort y col., 2000; Quezada-Gallo y col., 2000).

- **materiales compuestos en base a proteínas y otros biopolímeros**: con el fin de combinar la buena selectividad a gases de las películas en base a proteína con mejores propiedades mecánicas o resistencia a la humedad características de otros polímeros, se han obtenido películas (laminadas o a partir de mezclas) de proteínas y otros biopolímeros. Por ejemplo, en películas laminadas de aislado proteico de soja con ácido poliláctico se ha logrado mejorar las propiedades mecánicas y de barrera al agua. En mezclas de proteína de suero y alginatos, se mejoraron las propiedades barrera al agua; y en mezclas de gelatina y proteína de soja, o de gluten y metilcelulosa se mejoraron las propiedades mecánicas (Zuo y col., 2009; Denavi y col., 2009a; Coughlan y col., 2004; Rhim y col., 2007). Otros ejemplos, muestran la obtención de películas más transparentes y con mejoras mecánicas a partir de mezclas de albúminas con almidón de maíz o papa (González-Gutiérrez y col., 2010); o la mejora de la resistencia a la ruptura y la solubilidad en agua en películas mezcla de proteína de soja con almidón dialdehído (Rhim y col., 1998).

- **materiales compuestos en base a proteínas y refuerzos de distinto tipo**: otra opción para obtener materiales con propiedades mecánicas y funcionales diferentes a

las del polímero solo, es la de introducir refuerzos -fibras o partículas discretas- a una matriz.

Las propiedades de estos materiales dependen de la estructura química y las propiedades de la matriz, las características físicas y químicas de las cargas y refuerzos, los porcentajes de la matriz y la carga, la naturaleza de la interfase y la morfología del sistema. Las razones para el empleo de materiales reforzados están dadas por las características técnicas que podrían aportar, como mayor rigidez, resistencia y estabilidad dimensional, mayor resistencia al impacto, modificación de las propiedades de permeabilidad a los gases y líquidos, y cambio de las propiedades eléctricas (Bledski y col., 1996; Joseph y col., 1996).

Varios trabajos muestran como al formar materiales compuestos combinando proteínas con distintas cargas se lograron mejorar las propiedades mecánicas, por ejemplo usando gluten de maíz con fibra de vidrio (Beg y col., 2005). Dentro de las fibras naturales, las más estudiadas han sido las derivadas de la celulosa como las de lino, yute, ramio, cáñamo, sisal y piña ya que han generado un amplio interés para ser utilizadas como refuerzos debido a sus ventajas: renovabilidad, sustentabilidad, bajo costo, bajo peso, biodegradabilidad y biocompatibilidad (Bledzki y Gassan, 1999; Mohanty y col., 2000; Wambua y col., 2003). Varios ejemplos muestran la formación de materiales a partir de aislado proteico de soja con distintas cargas: con fibras de hoja de piña, cuya mejora fue atribuida al aumento de los grupos hidroxilos presentes en las fibras que mejoraron la interacción con la matriz proteica (Liu y col., 2004 y 2005), con fibras largas, cortas y microcristalinas de celulosa, o con lignina alcalina, siendo estas dos últimas también responsables del aumento de la resistencia al agua, dado por su hidrofobicidad y rigidez (Paetau y col., 1994; Huang y col., 2004).

I.7 Materiales nanocompuestos

Los nanomateriales, cuyo desarrollo ha crecido a velocidad exponencial en la última década, se presentan como una alternativa novedosa dentro de los materiales para mejorar su funcionalidad. Estos materiales son sistemas que consisten en una matriz de polímeros reforzada con rellenos que tienen al menos una de sus dimensiones en el rango de los nanómetros (1–100 nm). Debido a su tamaño, las nanopartículas poseen una mayor superficie que las micropartículas, lo que hace que se genere una fuerte

interacción con la matriz polimérica. Como consecuencia de esto, se espera que los nanomateriales exhiban mejores propiedades mecánicas y de barrera, estabilidad térmica, resistencia química y apariencia superficial. Lo interesante es que estas mejoras pueden lograrse con niveles de carga bajos ($\leq 5-10\%$), mientras que los compuestos tradicionales necesitan mayor cantidad de carga (40-50%) para lograr el mismo refuerzo, lo cual los hace muy interesantes para su utilización en *packaging* (Rhim y col., 2007; Zhao y col., 2008).

Los nanorefuerzos pueden clasificarse de acuerdo a cuantas dimensiones en escala nanométrica tengan: A) nanopartículas isodimensionales, como las nanopartículas esféricas de sílica o los *nanoclusters*, con las tres dimensiones nanométricas, B) los nanotubos o *whiskers*, con dos dimensiones nanométricas y una dimensión mayor, y, C) las nanopartículas en capas o cristales de polímero, en la cual solo una dimensión está en la escala nano, como las nanoarcillas o los nanocristales de almidón (Alexandre y Dubois, 2000), ejemplificadas en la **figura I.4**.

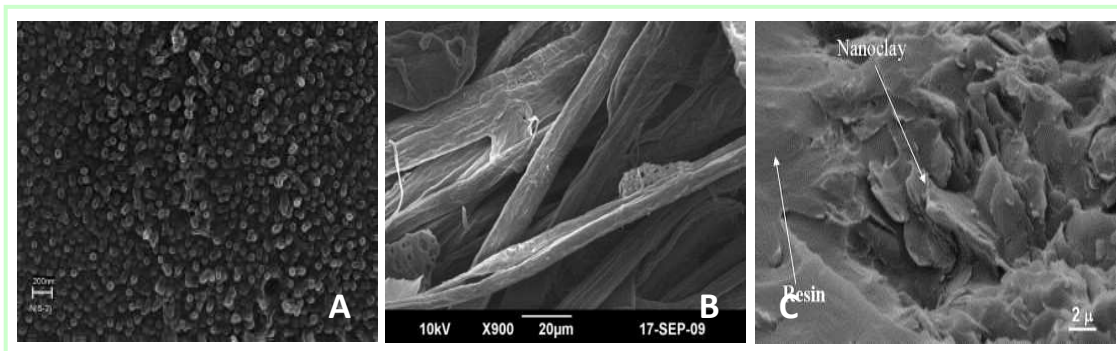


Figura I.4 Nanopartículas en tres (A), dos (B) y una (C) dimensión nanométrica: nanopartículas de sílica (Dikshit, 2012), nanofibras de celulosa de bambú (Visakh y col., 2012), y nanopartículas de arcilla (Subramaniyan y Sun, 2006)

Uno de los nanorefuerzos más estudiados es la montmorillonita, un silicato en capas, abundante, económico y amigable con el medio ambiente. El agregado de esta nanoarcilla ha logrado mejorar el desempeño de materiales de matriz de proteína de soja, gluten, proteína de suero de leche y gelatina (Kumar y col., 2010; Tunc y col., 2007; Cho y col., 2010; Guilherme y col., 2010; Hedenqvist y col., 2006; Rao, 2007), obtenidos por distintas técnicas de procesamiento. Esta mejora se vio en el módulo elástico, en la tensión a la ruptura y en las propiedades de flexibilidad, como también

en la disminución en la permeabilidad al agua y a gases (Giannelis, 1998; Ray y Okamoto, 2003).

Los polisacáridos se presentan como una buena opción para ser utilizados como materia prima para la obtención de rellenos nanométricos renovables, ya que al ser parcialmente cristalinos podrían otorgar propiedades interesantes. La celulosa el polisacárido más estudiado para ser usado en la obtención de nanopartículas, seguido por el almidón (Azizi Samir y col., 2005; Dubief y col., 1999, LeCorre y col., 2010).

Varios materiales nanocompuestos obtenidos a partir de recursos renovables y biodegradables, como nanocristales de almidón, fibras de celulosa, entre otras, en matrices de proteína, almidón, PLA, etc., han sido estudiados (Arora y Padua, 2010). Por ejemplo, se ha logrado mejorar las propiedades mecánicas en películas de caseína con nanofibras de celulosa obtenidas a partir de celulosa microcristalina y en películas de soja con nanocristales de almidón (Pereda y col., 2011; Zheng y col., 2009), entre otros.

Se continúa estudiando la obtención de nuevos materiales nanocompuestos por combinación de otras matrices poliméricas y refuerzos compatibles, junto a la búsqueda de nuevas y mejores tecnologías de procesamiento, de modo de poder mejorar aún más su funcionalidad (Arora y Padua, 2010).

A pesar de los grandes beneficios que los nanomateriales pueden aportar a la tecnología, no se debe perder de vista la falta de información sobre la posible toxicidad de las nanopartículas sobre la salud humana. Esto se debe a que al ser tan pequeños -menores que una célula eucariótica y que varias organelas- pueden interferir en los procesos celulares ocupando el lugar de estas estructuras. Además, al tener la posibilidad de atravesar membranas celulares y tejidos que les permiten entrar en el sistema circulatorio y linfático, hace que deban ser utilizadas con mucha precaución para evitar consecuencias a largo plazo (Lafdi, 2010).


OBJETIVO GENERAL

Estudiar la formación de películas proteicas de amaranto, e intentar mejorar su funcionalidad a través de:

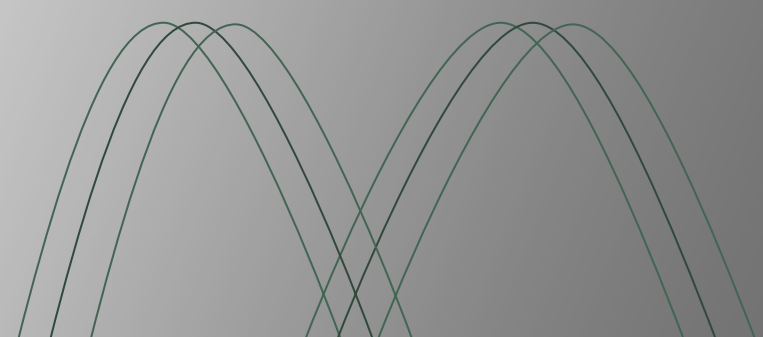
- i) la modificación estructural de sus proteínas por tratamientos físicos, y
- ii) por formación de materiales compuestos y nanocompuestos, usando almidones semicristalinos, hidrolizados y gelatinizados -de distinto origen botánico- como refuerzos o copolímeros.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar la capacidad de aislados proteicos de amaranto, enriquecidos en distintas fracciones proteicas, de formar películas biodegradables y/o comestibles.
2. Estudiar el efecto que causa la modificación estructural de las proteínas por tratamientos térmicos y con alta presión sobre la funcionalidad de las películas resultantes.
3. Estudiar la formación de distintos tipos de películas biodegradables y/o comestibles a partir de proteínas de amaranto y almidones de diferente origen botánico -maíz (común y waxy), trigo, papa y amaranto-:
 - i) películas mezcla formadas por distintas proporciones de aislados proteicos de amaranto y almidones gelatinizados,
 - ii) películas proteicas con el agregado de gránulos de almidón utilizados como microrefuerzos, y,
 - iii) películas proteicas con el agregado de nanocristales de almidón utilizados como nanorefuerzos.



**II. PELÍCULAS
COMESTIBLES
PREPARADAS A PARTIR
DE PROTEÍNAS DE
AMARANTO NATIVAS Y
DESNATURALIZADAS**



II.1 El amaranto

II.1.1 Historia y resurgimiento del amaranto

El amaranto ha sido cultivado en América Latina desde hace más de 7.000 años. En investigaciones antropológicas se ha demostrado el uso de esta planta como alimento por las civilizaciones Maya, Azteca e Inca. Cuando los españoles llegaron a América, el amaranto era uno de los granos más apreciados por los aztecas, ya que formaba parte de los tributos y ceremonias religiosas, y se producían entre 15000 y 20000 toneladas por año. Debido a la asociación de esta planta y sus granos con los rituales paganos, durante la conquista de América los españoles prohibieron su producción y uso. Esta es una de las razones de la menor expansión y producción actual del amaranto respecto a otros como, por ejemplo, el maíz y el poroto (Bressani, 1989). Pero gracias al esfuerzo de pequeños productores, la producción del amaranto continuó, y de ese modo se ha logrado preservar la existencia de la especie.

La palabra amaranto proviene de la conjunción de dos palabras griegas que significan "inmortal" y "no marchitado". A este cultivo se lo conoce también con otros nombres, tales como huauhtli (México), kiwicha, (Perú), coime (Bolivia), trigo-inca, icapachaqui o quinoa de valle (Argentina), o cola de zorra (Alemania).

II.1.2 La planta de amaranto

El amaranto pertenece a la división Angiospermae, familia Centrospermae, clase Dicotyledonae, género *Amaranthus*. Es considerado un pseudocereal, porque a diferencia de los verdaderos cereales, no pertenece a las familias de las gramíneas, pero al igual que ellos produce semillas harinosas (Kigel, 1994).

El amaranto, al ser una planta de tipo C4 puede realizar la fotosíntesis con bajas cantidades de agua, y presenta alta capacidad de biosíntesis y baja velocidad de fotorespiración que son las causas de su rápido crecimiento y alto rendimiento (Kigel, 1994). Además, es muy resistente a la sequía y se adapta a condiciones adversas de cultivo como suelos salinos y temperaturas extremas (Bressani, 1994; Saunders y Becker, 1984). Por estas razones fue considerado uno de los 36 cultivos potenciales más promisorios del siglo XX, en estudios realizados por la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos en 1975. Además fue calificado por la NASA como cultivo

CELSS (Controlled Ecological Life Support System) en 1985, dado que remueve el dióxido de carbono de la atmósfera y, al mismo tiempo, genera alimentos, oxígeno y agua para los astronautas (National Academy of Sciences, 1975).

Su tallo central puede alcanzar de 2 a 2,5 metros de altura en la madurez, aunque algunas variedades son más pequeñas. Las ramas de forma cilíndrica pueden empezar desde la base de la planta. Posee flores vistosas de color púrpura que brotan del tallo principal, motivo por el cual algunas especies son utilizadas con fines ornamentales (**figura II.1.1**). Cada panoja tiene flores masculinas y femeninas que se autopolinizan (Bressani, 1994).

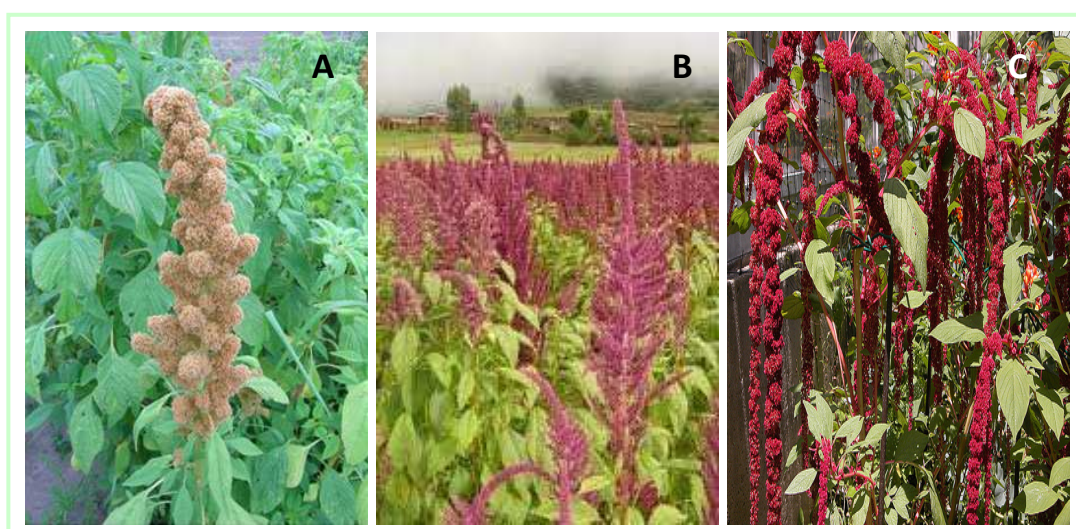


Figura II.1.1 Cultivo de A) *Amaranthus cruentus*, B) *Amaranthus hypochondriacus* y C) *Amaranthus caudatus*

Las tres especies más utilizadas para la producción de granos, mostradas en la **figura II.1.1**, se cultivan en diferentes regiones del continente americano: *A. cruentus*, se desarrolla especialmente en el sur de México y América Central, *A. hypochondriacus* en el norte y centro de México y *A. caudatus* en los Andes. Existen otras especies que se cultivan para el consumo de sus hojas: *A. tricolor* L., *A. viridis* L y *A. bitum* L. ya que poseen un follaje particularmente rico en carotenoides, proteínas, hierro, calcio, magnesio y vitaminas (Prakash y Pal, 1991; Prakash y col., 1995; Shukla y col., 2003 y 2006).

II.1.3 Las semillas de amaranto

Las semillas de amaranto son muy pequeñas (**figura II.1.2**), miden entre 1 y 2 mm de diámetro, y son lisas, brillantes, ligeramente aplanadas y de color blanco amarillento, dorado, rojo, rosado, púrpura y/o negro.



Figura II.1.2 Semillas de amaranto

Los granos son consumidos en formas variadas, tales como semillas infladas solas o con miel, semillas tostadas y en productos de panadería. Además su harina, al igual que la de la quinoa, es apta para el consumo por enfermos celíacos, por lo que también ha recibido un interés especial desde este sector de la población (Petr y col., 2003).

El hecho de que el amaranto sea uno de los cultivos con mejores perspectivas a futuro también se debe a que sus semillas presentan una atractiva composición química y un valor nutricional elevado, si se lo compara con otros granos de cereales o leguminosas (Bressani, 1994; Saunders y Becker, 1984). En la **Tabla II.1.1** se muestra la composición química de las semillas para varias especies (Bressani, 1994).

Tabla II.1.1 Composición química de las semillas de diferentes especies de amaranto (g/100 g de semilla)

	Hidratos de carbono ^a	Proteínas ^a	Lípidos ^a	Humedad	Cenizas ^a	Fibras ^a
A. cruentus	67,9	17,0	8,1	9,7	3,5	3,4
A. hypochondriacus	70,0	15,6	7,8	10,4	3,5	3,1
A. caudatus	70,3	14,9	9,1	10,7	2,9	2,8

^a porcentaje en base seca

El componente más abundante de las semillas de amaranto son los **hidratos de carbono**, representados mayormente por el almidón, que está constituido principalmente por amilopectina, ya que solo contiene entre 3 y 8 % de amilosa, dependiendo de los diferentes genotipos (Choi y col., 2004). Los gránulos de almidón son muy pequeños con diámetros que varían entre 0,5 y 2 μm (Hoover y col., 1998) y presenta un diagrama de rayos X de tipo A. Debido a su pequeño tamaño, este almidón posee una digestibilidad entre 2,4 y 5 veces mayor que la del almidón de maíz. Además tiene propiedades aglutinantes y espesantes inusuales, pudiéndose utilizar en alimentos variados, como sustituto de las grasas y también en la industria cosmética (Choi y col., 2004). Los polisacáridos que no son almidón, constituyen entre un 6 y 7 %, siendo la glucosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y ácido urónico los principales azúcares encontrados en su composición. Otros carbohidratos como sacarosa, estaquiosa y maltosa se encuentran en cantidades pequeñas variables (Saunders y Becker, 1984).

La fracción **lipídica** correspondiente a las semillas de amaranto es baja, aproximadamente del 8 % (Becker, 1994). Sin embargo, la composición de la misma es interesante ya que predominan los ácidos grasos insaturados, principalmente oleico (entre 20 y 29 %) y linoleico (entre 45 y 58 %) (Prakash y col., 1995; Prakash y Pal, 1991; Bressani y col., 1987). La fracción insaponificable del aceite de amaranto está constituida principalmente por escualeno, precursor de todos los esteroides, el cual se presenta en niveles relativamente elevados (2,4-8 %) en comparación con aceites de otros granos de cereales como maíz (0,03 %), arroz (0,3 %) y oliva (0,4 %) (Lyon y Becker, 1987).

El fósforo, calcio, potasio y magnesio son los principales elementos que constituyen las **cenizas**.

Por último, las **proteínas**, que son el segundo componente más abundante de los granos de amaranto, rondan entre el 12 y 17 %, según las diferentes especies (Bressani, 1994; Singhal y Kulkarni, 1988). Estas proteínas, junto a las de soja y quinoa, presentan un patrón de aminoácidos esenciales aproximado al requerido por el hombre, por lo que podrían reemplazar eficientemente a las proteínas de origen animal (Bressani, 1994). Son una excelente fuente de lisina, triptofano y aminoácidos azufrados, especialmente metionina, lo cual es una ventaja frente a los cereales, que contienen escasa cantidad de lisina (Andrásófszky y col., 1998). La leucina es el primer aminoácido limitante, mientras que valina, isoleucina y treonina se encuentran en valores cercanos a los requeridos para la dieta humana (FAO-OMS, 1973). El valor biológico de las proteínas de amaranto es de 75, superior al presentado por el maíz (44), trigo (57) y cebada (62), y cercano al de la leche de vaca (72) (National Research Council, 1984), indicando que el 75 % de las proteínas serían absorbidas luego de la ingesta. Desde el punto de vista nutricional, estas proteínas también son de interés para el consumo humano por la ausencia de gluten (Petr y col., 2003).

Tanto el mayor contenido proteico como la mejor calidad de las proteínas de amaranto con respecto a las de los cereales, se han relacionado con la diferente distribución de las proteínas de reserva dentro de la semilla. Mientras que en el amaranto el 65 % de las proteínas se encuentra en el embrión, en los cereales el 82 % está presente en el endosperma (Betschart y col., 1981).

II.1.4 Las proteínas de reserva del amaranto

Las proteínas de reserva de las semillas constituyen, en general, el 80 % de las proteínas totales y son las responsables de la calidad nutricional proteica. Se sintetizan con gran velocidad y se almacenan en cuerpos proteicos durante el desarrollo de la semilla, para luego degradarse durante la germinación, con el fin de proveer principalmente nitrógeno y carbono (Bewley y Black, 1994).

Existe una clasificación propuesta por Osborne, ampliamente utilizada, que se basa en la solubilidad mostrada por las proteínas en diferentes medios a lo largo de una extracción secuencial (Osborne, 1924). Los grupos proteicos extraídos en cada etapa

son: **albúminas**, solubles en agua; **globulinas**, solubles en soluciones salinas diluidas y neutras; **prolaminas**, solubles en alcohol o en mezclas de alcohol-agua; y **glutelinas**, solubles en soluciones alcalinas o ácidas. Según esta clasificación, las fracciones más importantes presentes en las proteínas de reserva del amaranto, son las albúminas, las globulinas y las glutelinas, siendo las prolaminas las proteínas minoritarias. En la **Tabla II.1.2** se muestra la composición proteica reportada por distintos autores. Se ha observado que cuando se extrae una gran cantidad de albúminas, el porcentaje obtenido para glutelinas es menor y viceversa. Konishi y col. (1992) asignaron la variabilidad en la relación albúminas: glutelinas a la presencia de una fracción con características de extracción particulares -extraídas con agua, luego de extraer las globulinas con solución salina- que denominaron como albúmina-2 (Konishi y col., 1991). En nuestro laboratorio, teniendo en cuenta sus aspectos moleculares y su presencia en cuerpos proteicos se sugirió la denominación de globulina polimerizada (globulina-P o Gp) (Castellani y col., 2000).

Tabla II.1.2 Cantidad relativa de las fracciones proteicas presentes en las proteínas de reserva del amaranto

	Fracción proteica (g/100 g proteína total)	Referencia
Albúminas	50 - 65	(Abdi y Sahib, 1976; Duarte-Correa y col., 1986)
	10 - 20	(Bressani y García-Vela, 1990; Marcone, 2000)
	26	(datos de nuestro laboratorio)
Globulinas	13 - 20	(Abdi y Sahib, 1976; Duarte-Correa y col., 1986; Bressani y García-Vela, 1990; Marcone, 2000)
	56	(datos de nuestro laboratorio)
Glutelinas	7 - 8,5	(Abdi y Sahib, 1976; Duarte-Correa y col., 1986)
	42 - 56	(Bressani y García-Vela, 1990; Marcone, 2000)
	18	(datos de nuestro laboratorio)
Prolaminas	7,2 - 11	(Abdi y Sahib, 1976; Duarte-Correa y col., 1986)
	1,5 - 2,1	(Bressani y García-Vela, 1990; Marcone, 2000)

Las **albúminas** de las semillas de amaranto están constituidas por polipéptidos de masa molecular entre 10 y 43 kDa (Martínez y Añón, 1996; Marcone, 2000; Segura-Nieto y col., 1992; Barba de la Rosa y col., 1992b, Konishi y col., 1991), aunque también han sido detectados otros polipéptidos de mayor masa molecular, hasta 94 kDa, que se

encuentran en menor proporción (Martínez y Añón, 1996; Barba de la Rosa y col., 1992a; Konishi y col., 1991). Todos los autores coinciden en que en su mayoría se trata de polipéptidos monoméricos y no dissociables frente a 2-mercaptoetanol (2-ME). La estabilidad térmica de esta fracción proteica es baja, siendo su temperatura de desnaturalización de aproximadamente 64 °C (Martínez y Añón, 1996; Gorinstein y col., 2001). Estas proteínas presentan excelentes propiedades funcionales, tales como solubilidad, capacidad de absorción de agua, de formar y estabilizar emulsiones y espumas, y capacidad de formar masas (Silva-Sánchez y col., 2004, Oszvald y col., 2009).

Las **globulinas** presentes en las semillas de amaranto, al igual que en las leguminosas, son dos, 11S y 7S. La *globulina 11S*, que es la fracción mayoritaria, representa entre el 78 y el 81 % del total de las globulinas de amaranto (Konishi y col., 1985; Marccone y Yada, 1991). Al igual que otras globulinas 11S, están constituidas por subunidades polipeptídicas con masas moleculares entre 38 y 75,5 kDa, formadas por polipéptidos más pequeños de tipo ácidos y básicos (32 y 19 kDa) unidos por puentes disulfuro (Segura-Nieto y col., 1994). La estabilidad térmica de esta fracción, evaluada mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), es alta, informándose valores de T_d superiores a 95 °C (Castellani y col., 2000; Marccone y col., 1998; Gorinstein y col., 1996a; Martínez y Añón, 1996) y entalpías de desnaturalización, ΔH_d , entre 4,25 y 8 J/g (Gorinstein y col., 1996b; Martínez y Añón, 1996). Su estructura, le confiere una alta hidrofobicidad superficial, mayor que la correspondiente a las proteínas de soja, gluten de trigo y caseína, aunque menor que la de seroalbúmina bovina (Konishi y Yoshimoto, 1989). A su vez, esta fracción, al igual que la glicinina de soja y fracciones equivalentes de otras semillas, posee buena solubilidad, capacidad viscosante y de formación de geles, espumas y emulsiones, así como buenas propiedades de hidratación.

La *globulina 7S* es un heterooligómero cuya masa molecular, determinada por cromatografía de exclusión molecular, es 186 kDa. Esta fracción está constituida por un gran número de polipéptidos de diferentes masas moleculares entre 90 y 15 kDa (90; 70,9; 40; 37,4; 35,2; 31,2; 23,6 y 15,2 kDa) (Marccone, 1999; Barba de la Rosa y col., 1992b; Martínez y col., 1997) y presenta una T_d de 80,2 °C, valor similar al reportado para la globulina 7S de soja (Marccone, 1999; Martínez y Añón, 1996). Esta globulina

posee mejores propiedades funcionales que la globulina 11S, por ser más pequeña y menos estructurada.

La *globulina-P* es soluble en agua y soluciones salinas de baja fuerza iónica, pero insoluble en concentraciones de NaCl mayores a 0,1 M. Esta proteína posee básicamente cinco polipéptidos de masas moleculares 56, 36, 31, 26 y 22 kDa, semejantes a la composición de globulinas 11S, lo que hace que, a pesar de su condición de extracción similar a las albúminas, sea incluida dentro de las globulinas (Konishi y col., 1991). Una característica particular de esta proteína es su alto grado de polimerización con aproximadamente sólo un tercio de sus moléculas no agregadas, y una masa molecular cercana a 300 kDa (Martínez y col., 1997; Castellani y col., 2000) siendo ésta otra característica semejante a la de la globulina 11S. Según estudios de fluorescencia y dicroísmo circular, la globulina-P (parcialmente purificada) presenta, frente a otras globulinas, mayor número de triptofano en su superficie y una mayor hidrofobicidad superficial. Además posee elevada estabilidad térmica, con una T_d de 94 °C (Martínez y col., 1997), y baja solubilidad debido a su alta capacidad de polimerización, por lo que sus propiedades funcionales son más limitadas.

Las **glutelinas** constituyen la fracción proteica más insoluble obtenida de la harina de amaranto. Sólo son extraídas en condiciones drásticas de pH (en general, se utiliza buffer borato pH 10, con el agregado opcional de detergentes y/o agentes reductores para aumentar el rendimiento de extracción) (Segura Nieto y col., 1994; Paredes-López y col., 1993). El perfil electroforético de glutelinas es similar al descrito para globulina-P de amaranto (Martínez y col., 1997; Abugoch y col., 2003). En condiciones no reductoras, las principales bandas detectadas para esta fracción se encuentran entre 50-67, 30-38 y 20-28 kDa, además de algunas de mayor masa molecular que no entran en el gel de separación. Pero en presencia de un agente reductor como 2-ME, se encontraron polipéptidos de masa molecular similar a los de globulinas, detectándose una banda entre 54-60 kDa, y dos o tres bandas en las regiones de 35-38 kDa y 24-26 kDa, junto con una baja proporción de polipéptidos agregados (Gorinstein y col., 1998 y 1991; Barba de la Rosa y col., 1992a; Martínez y col., 1997).

Las **prolaminas** de las semillas de amaranto son extraídas utilizando en general isopropanol al 70 %. Existen algunas discrepancias en cuanto a las masas de los polipéptidos principales que forman a las prolaminas de amaranto. Gorinstein y col.

(1991) informaron que las bandas mayoritarias tienen una masa entre 10 y 14 kDa y en menor proporción una de 20 kDa. Segura-Nieto y col. (1992) encontraron tres bandas principales a 16, 18 y 22 kDa y dos bandas menores debajo de 12 kDa. Por otra parte Barba de la Rosa y col. (1992a) informaron que en ausencia de un agente reductor, se observan bandas de alto peso molecular, que en presencia del agente reductor, se transforman en 67, 34 y 22 kDa. Estas diferencias podrían explicarse en parte por los cambios que sufren las prolaminas de acuerdo al solvente empleado para el desgrasado de la harina (Segura-Nieto y col., 1994) y a las condiciones que se utilizan para su extracción.

II.2 Películas proteicas de amaranto

Como se mencionó en la introducción general, la funcionalidad de las películas proteicas esta determinada por su microestructura, la cual varía significativamente dependiendo de la conformación inicial de las proteínas y del método de preparación (Denavi y col., 2009b). La estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas determina la habilidad de las cadenas polipeptídicas de interactuar con otras proteínas, como también con otros componentes de la formulación. Las interacciones proteína-proteína generadas en la formación de la película (enlaces disulfuro, uniones puente hidrógeno, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas) determinan el grado de entrecruzamiento y el carácter hidrofílico-hidrofóbico de las mismas, y se relacionan con las propiedades ópticas, mecánicas, de barrera y térmicas, con la susceptibilidad al agua y con la apariencia de los materiales resultantes (Mauri y Añón, 2006 y 2008).

Teniendo en cuenta que la mayor limitación de las películas proteicas es su alta susceptibilidad al agua, que las proteínas de amaranto poseen una hidrofobicidad superficial significativamente superior a las de otras proteínas de origen vegetal, y que su cultivo tiene propiedades agronómicas muy ventajosas (Konishi y Yoshimoto, 1989, Segura-Nieto y col., 1994), la evaluación de estas proteínas como materia prima para la formación de materiales resulta particularmente interesante.

Existe poca información en cuanto a la utilización de proteínas de amaranto en la obtención y caracterización de películas comestibles y/o biodegradables. Tapia-Blácido y col. (2005) mostraron que las películas obtenidas a partir de harina de amaranto tenían menores permeabilidades al vapor de agua y al oxígeno y buena flexibilidad, aunque menor resistencia mecánica que las encontradas para otros biomateriales. Con el objetivo de dilucidar el rol de cada biopolímero presente en la harina en la funcionalidad de las películas, Tapia-Blácido (2006) y Tapia-Blácido y col. (2007) evaluaron la formación de películas a partir de diferentes fracciones extraídas de la harina. En particular analizaron la funcionalidad de las películas formadas a partir de almidón de amaranto; de la fracción proteína-lípido, obtenida por precipitación

isoeléctrica del residuo luego de la extracción del almidón; y de la fracción proteína, obtenida mediante el desgrasado de la fracción proteína-lípido (Tapia-Blácido y col., 2007). Los autores observaron que las películas obtenidas a partir de estas tres fracciones tenían propiedades barrera similares a las de las películas de otros biopolímeros, pero inferiores a las de la harina, a pesar de que, en particular, en la película formada por proteínas y lípidos, estos últimos se encontraban en mayor proporción. Las películas obtenidas a partir de la fracción almidón o la fracción proteína fueron más resistentes y quebradizas que las películas de harina, en cambio las obtenidas a partir de la fracción proteína-lípido fueron menos elongables que las otras películas (Tapia-Blácido y col., 2005 y 2007; Tapia-Blácido, 2006). Finalmente, los autores concluyeron que la mejor funcionalidad de las películas de harina podría atribuirse a la estructura capaz de formarse por interacción entre los biopolímeros (almidón y proteína) y los lípidos en su estado nativo, y a la concentración de estos en la harina. En cuanto a películas proteicas de amaranto, solo existen algunos estudios preliminares sobre su formación a partir de aislados proteicos (Tapia-Blácido y col., 2007; Tapia-Blácido, 2006; Álvarez Hayes y col., 2005).

Teniendo en cuenta los trabajos antes mencionados, y la trayectoria de nuestro laboratorio en el estudio de las propiedades estructurales, funcionales y biológicas de este cultivo, surgieron dos interrogantes:

1. ¿Son las proteínas de amaranto adecuadas para la formación de materiales biodegradables?
2. La diferente composición proteica del aislado dada por el pH de solubilización durante la obtención del aislado ¿generará cambios en la funcionalidad de las películas proteicas obtenidas a partir de estos aislados?

Como consecuencia de esto, se planteó como objetivo de este capítulo estudiar la formación de películas comestibles a partir de dos aislados proteicos de amaranto nativos, constituidos por distintas fracciones proteicas, y se seleccionó el material proteico mas adecuado para la continuación de este trabajo de tesis.

II.2.1 Materiales y métodos

II.2.1.1 Materiales

Se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (cultivar 9122) pertenecientes a la cosecha del año 2008, cedidas amablemente por la Estación experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Anguil, La Pampa, Argentina) para preparar los aislados proteicos de amaranto.

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de pureza analítica.

II.2.1.2 Obtención y caracterización de la harina de amaranto

Las semillas de amaranto se molieron utilizando un molino (Udy Cyclone Sample Mill, Colorado, Estados Unidos), tamizando la harina resultante con una malla de diámetro de partícula de 92 μm . Luego se desgrasó con hexano (10 % p/v) con agitación continua durante 5 horas a temperatura ambiente en un erlenmeyer tapado, y posteriormente se filtró y aireó durante 24 horas para terminar de evaporar el solvente remanente. Finalmente la harina desgrasada se almacenó a 4 °C hasta su uso. Se determinó la composición porcentual de la harina. El contenido de agua y cenizas fueron determinados gravimétricamente, utilizando los métodos AOAC 935.29 y AOAC 923.03 (AOAC, 1995), respectivamente. El contenido de proteínas se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC 920.53) utilizando 5,85 como factor de conversión de nitrógeno en proteínas (Segura-Nieto y col., 1994). El contenido de lípidos se determinó por Soxhlet (AOAC 920.39) empleando n-hexano como solvente de extracción; y el contenido de hidratos de carbono totales se determinó según el método de Felhing-Causse-Bonnans (AOAC 14023/24), previa hidrólisis de dos horas, empleando una solución de glucosa 0,5 % p/v como patrón. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

II.2.1.3 Obtención de los aislados proteicos de amaranto

Se obtuvieron dos aislados proteicos de amaranto según el protocolo de Martínez y Añón (1996), con algunas modificaciones que se diferencian en el pH de extracción proteica. Dispersiones acuosas de la harina desgrasada (10 % p/v) se llevaron a pH 9,0

u 11,0 con NaOH 2N y se mantuvieron en agitación continua durante 1 hora a temperatura ambiente. Las dispersiones se centrifugaron a 9000 xg durante 20 minutos a 10 °C en una centrífuga Avanti J-25 (Beckman Coulter, California, Estados Unidos) y los sobrenadantes obtenidos se llevaron a pH 5,0 con HCl 2N para precipitar isoeléctricamente las proteínas presentes. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y los precipitados obtenidos se resuspendieron en agua (1:3 p/v) ajustando su pH a la neutralidad con NaOH 1N. Las suspensiones se acondicionaron a -80 °C y se liofilizaron en un equipo Heto FD4 (Lab Equipment, Dinamarca), conectado a una bomba de vacío (Vacuubrand RZ 5). Los aislados proteicos así obtenidos, identificados como **A9** y **A11**, según los pHs utilizados inicialmente para extraer las proteínas -9,0 y 11,0, respectivamente- se almacenaron en recipientes herméticamente cerrados a 4 °C hasta su utilización.

El rendimiento de los aislados (expresado en % p/p) se calculó como el cociente entre el peso del aislado liofilizado y el peso de la harina desgrasada a partir del cual se obtuvo el aislado.

II.2.1.4 Caracterización de los aislados proteicos

II.2.1.4.1 Determinación de la composición química

El contenido de agua, cenizas y proteínas se determinó tal como se describió en la sección II.2.1.2 para la harina.

Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

II.2.1.4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La composición polipeptídica de los aislados se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), siguiendo el método de Laemmli (1970).

Se prepararon geles separadores de poliacrilamida al 12 % p/v con geles apiladores al 4 % p/v en un sistema de mini-placas (Bio-Rad Mini-Protean II Model). Se emplearon los siguientes sistemas buffer: i) buffer de separación: tris-HCl 0,375M, SDS 0,1 % p/v a pH 8,8; ii) buffer de corrida: tris-HCl 0,025M, glicina 0,192M, SDS 0,1 % p/v a pH 8,3; y iii) buffer de muestra: tris-HCl 0,125M, glicerol 20 % v/v, SDS 1 % p/v, azul de bromofenol 0,05 % p/v a pH 6,8.

Para analizar las muestras en condiciones reductoras, se agregó 2-mercaptoetanol (2-ME) al 5 % v/v al buffer de muestra, y las muestras se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y se centrifugaron 15 minutos a 9200 xg y temperatura ambiente antes de ser sembradas (centrífuga Labnet, Digital Spectrafuge 24D, Estados Unidos). En cada calle se sembró un volumen de sobrenadante correspondiente a 20-30 µg de proteínas total.

Para estimar la masa molecular de las proteínas, se utilizó una mezcla de patrones de bajo peso molecular (Pharmacia, Amersham, Inglaterra), conteniendo fosforilasa b (94,0 kDa), seroalbúmina bovina (67,0 kDa), ovoalbúmina (43,0 kDa), anhidrasa carbónica (30,0 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa), y α -lactoalbúmina (14,4 kDa).

Los geles obtenidos se fijaron y colorearon simultáneamente (12 horas) con una solución de agua, metanol y ácido acético (5:5:2) conteniendo 0,2 % p/v de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Anedra, Argentina); y posteriormente se decoloraron con una mezcla de agua, etanol y ácido acético (65:25:10). Las imágenes de los geles fueron adquiridas con un scanner HP Scanjet G2710 (Hewlett-Packard).

II.2.1.4.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La temperatura y el grado de desnaturalización de los aislados proteicos se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC), empleando un calorímetro Q100 V9.8 Build 296 (TA Instrument, New Castle, Del., Estados Unidos). El equipo fue calibrado usando indio, ácido láurico y ácido esteárico como patrones de calor y temperatura. Se prepararon dispersiones de los aislados al 20 % p/v en agua, o agua alcalinizada a pH 10,5 y alrededor de 15 µl de dispersión fueron colocadas en cápsulas de aluminio que se sellaron herméticamente. Las muestras fueron sometidas al siguiente tratamiento térmico: 5 minutos a 20 °C (para equilibrar las muestras) y calentamiento a 10 °C/min entre 20 y 120 °C. Luego del ensayo, las cápsulas fueron punzadas y se secaron a 105 °C durante 24 horas en una estufa de convección forzada para determinar la materia seca. El software utilizado para el análisis de los termogramas fue Universal Analysis V4.2E (TA Instruments, New Castle, Del., Estados Unidos). De los mismos se determinaron la temperatura de pico y el área bajo la curva de las endotermas registradas, que corresponden a la temperatura y la entalpía de desnaturalización térmica de las proteínas (T_d en °C y ΔH_d en J/g de proteína en base

seca, respectivamente). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

II.2.1.4.4 Solubilidad de proteínas

Se determinó la solubilidad de los aislados proteicos en agua y en agua alcalinizada a pH 10,5. Se preparó una dispersión de los aislados proteicos al 5 % p/v en agua o agua alcalinizada a pH 10,5 NaOH 1N, se midió el pH de la suspensión obtenida y se mantuvo con agitación constante por un período de 1 hora. La dispersión se centrifugó a 9200 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente (centrífuga Labnet, Digital Spectrafuge 24D, Estados Unidos). En el sobrenadante se cuantificaron proteínas solubles por el método de Bradford (Bradford, 1976), usando como patrón seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos).

Los resultados se expresaron como porcentaje de proteína soluble respecto a la cantidad de proteínas presentes originalmente en el material de partida (determinado por Kjeldahl). Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

II.2.1.5 Obtención de películas proteicas de amaranto

Las películas proteicas se obtuvieron por *casting* a partir de los aislados proteicos A9 y A11 según protocolos usados en el laboratorio para la formación de películas en base a proteínas de soja y girasol (Salgado y col., 2011). Se trabajó con dispersiones formadoras de películas que contenían 5 % p/v de los respectivos aislados proteicos y 25 % p/p de glicerol respecto del aislado (usado como plastificante). Las dispersiones se formaron agitando magnéticamente los componentes durante 1 hora a temperatura ambiente, ajustando el pH a 10,5 y volviendo a agitar por otros 30 minutos. Posteriormente, 10 ml de las dispersiones formadoras de películas fueron colocados en placas de Petri de poliestireno (64 cm²) y secadas en una estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60 °C durante 3 horas. Las películas así formadas se acondicionaron 48 horas a 20 °C y 58 % de humedad relativa (en un recipiente hermético con solución saturada de NaBr) previo a su caracterización. Todos los estudios se realizaron al menos con dos tandas de películas formadas independientemente.

II.2.1.6 Caracterización de las películas proteicas

II.2.1.6.1 Contenido de agua

Las películas fueron cortadas en pequeños trozos, se colocaron en placas de Petri, y se pesaron antes y después de secarlas en una estufa a 105 °C durante 24 horas. El contenido de agua se calculó como el porcentaje de pérdida de peso, respecto del peso original (ASTM D644-94; 1994). Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada ensayo realizado.

II.2.1.6.2 Espesor

Se utilizó un medidor de espesor digital (Check Line DCN-900, Estados Unidos) para materiales no conductores ni ferrosos. Sobre cada muestra que se empleó para determinar propiedades mecánicas y de barrera, se realizaron 9 determinaciones, una en el centro y ocho sobre el perímetro, informando el valor promedio.

II.2.1.6.3 Opacidad

Se cortaron porciones de películas con las dimensiones internas de la cubeta y se colocaron cuidadosamente dentro de la misma. La lectura de absorbancia se efectuó en un espectrofotómetro Beckman DU650 (Beckman, Alemania) utilizando una cubeta vacía como referencia. La opacidad de las películas ($\mu\text{A mm}^{-1}$) se determinó dividiendo el valor de absorbancia a 500 nm por el espesor de la muestra (expresado en mm) (Cao y col., 2007). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para cada ensayo.

II.2.1.6.4 Color

El color de las películas fue determinado utilizando un colorímetro CR 300 (Minolta Chroma Co., Osaka, Japón). Se empleó la escala Hunter-Lab para medir luminosidad (L : 0 = negro, 100 = blanco) y cromaticidad (a : $+a$ = rojo, $-a$ = verde; b : $+b$ = amarillo, $-b$ = azul), que se esquematiza en la **figura II.2.1**. El equipo fue calibrado usando un set de tres placas provistas por el fabricante. Las coordenadas de la placa blanca ($L_{placa} = 97,3$; $a_{placa} = 0,14$; $b_{placa} = 1,71$) fueron utilizadas para calcular la diferencia total de color (ΔE) mediante la **ecuación II.2.1**.

$$\Delta E = \sqrt{(L_{muestra} - L_{placa})^2 + (a_{muestra} - a_{placa})^2 + (b_{muestra} - b_{placa})^2} \quad \text{Ecuación II.2.1}$$

donde ΔE : diferencia total de color entre la muestra y la placa blanca, L , a y b : los parámetros de Hunter-Lab, luminosidad y cromaticidad de la muestra y de la placa blanca. Se realizaron nueve determinaciones sobre cada una de las muestras analizadas.

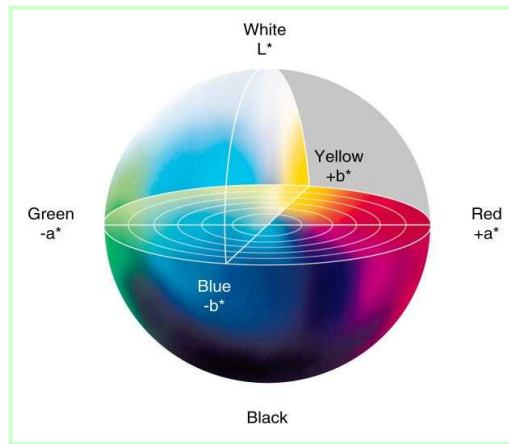


Figura II.2.1 Escala de Hunter-Lab para determinar luminosidad y cromaticidad

II.2.1.6.5 Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

Las determinaciones se realizaron siguiendo el método ASTM E96-80 (1989) con las modificaciones propuestas por Gennadios y col. (1994). Las películas se colocaron en una celda de permeación con una abertura circular de $0,00185 \text{ m}^2$. La determinación se efectuó a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, colocando las celdas en un desecador. La fuerza impulsora a través de la película, expresada como el gradiente de presión parcial de vapor, fue de $1753,35 \text{ Pa}$. Para mantener dicha fuerza impulsora se utilizó sílica anhidra ($\text{HR}_c=0$) en la celda de permeación, y solución saturada de NaCl ($\text{HR}_d=0,75$ a 20°C) en el desecador. La permeación de vapor de agua a través de la película fue determinada por la ganancia de peso en la celda de permeación. Luego de alcanzar el estado estacionario (aproximadamente 1 hora), se realizaron 9 determinaciones del peso de la celda de permeación, al cabo de al menos 6 horas. Los cambios en el peso de la celda fueron registrados y graficados en función del tiempo. Se determinó la pendiente del gráfico obtenido por medio de regresión lineal (Microsoft Office Excel 2007), siendo ésta la

velocidad de permeación del vapor de agua ($\Delta m/\Delta t$). La permeabilidad al vapor de agua se calculó según la **ecuación II.2.2**.

$$WVP = [(\Delta m / \Delta t) \times e] / [P_v^{H_2O} \times (HR_d - HR_c) \times A] \quad \text{Ecuación II.2.2}$$

donde WVP : permeabilidad al vapor de agua ($g_{H_2O} Pa^{-1} s^{-1} m^{-1}$); $\Delta m/\Delta t$: velocidad de permeación del vapor de agua ($g_{H_2O} s^{-1}$); e : espesor de la película (m); $P_v^{H_2O}$: presión de vapor de agua (Pa) a 20 °C; HR_c : Humedad relativa en la celda de permeación; HR_d : Humedad relativa en el desecador; A : área de permeación (m^2). Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

II.2.1.6.6 Solubilidad de las películas en agua

La solubilidad de las películas se determinó mediante la técnica propuesta por Gontard y col. (1992). Se colocaron 3 círculos de película de 2 cm de diámetro previamente pesados (aproximadamente 0,15 g totales) en un erlenmeyer con 50 ml de agua destilada y se agitaron a 20 °C durante 24 horas. Posteriormente se filtró a través de papel de filtro Whatman 1 (retiene partículas mayores a 11 μm), secado y pesado previamente. La fracción insoluble se secó en una estufa a 105 °C durante 24 horas y luego se pesó. La solubilidad de la película en agua (S , en %) se calculó según la **ecuación II.2.3**.

$$S\% = (m_0 - m_f) \times 100 / m_0 \quad \text{Ecuación II.2.3}$$

donde m_0 y m_f son los pesos antes y luego de la solubilización, respectivamente.

Los resultados presentados son el promedio de tres determinaciones.

II.2.1.6.7 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se determinaron mediante ensayos en tracción, de acuerdo al método ASTM D882-91 (1991), empleando un texturómetro (TA.XT2i, Stable Micro Systems, Inglaterra), equipado con un sistema de mordazas para tensión A/TG. Se ensayaron probetas rectangulares de 80 mm de largo por 6 mm de ancho, utilizando una separación inicial de mordazas de 50 mm y una velocidad de separación de las mismas de 0,5 mm/s. Se registró la curva fuerza vs. distancia, que se transformó

en tensión (σ =fuerza/área transversal de la película) vs. deformación (ϵ =porcentaje de elongación respecto de la separación de mordazas inicial). En la **figura II.2.2** se muestra una de estas curvas a modo de ejemplo. De las mismas se obtuvieron la tensión a la ruptura (σ_r), el porcentaje máximo de deformación al momento de la ruptura (ϵ_{\max}) y el módulo elástico (E) como la pendiente de la recta tangente a la curva tensión-deformación en su sección lineal inicial (a bajas deformaciones). Se realizaron al menos seis determinaciones por cada película evaluada, empleando al menos dos películas por formulación.

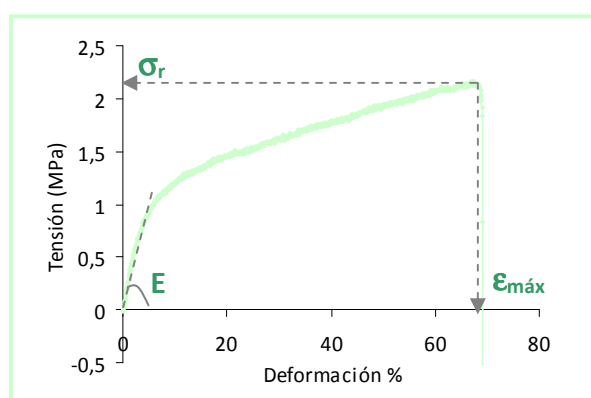


Figura II.2.2 Curva tensión vs deformación para una película proteica de amaranto, donde se observan los parámetros evaluados: la tensión a la ruptura (σ_r), el porcentaje máximo de elongación (ϵ_{\max}) y el módulo elástico (E)

II.2.1.6.8 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas

Se determinó la solubilidad diferencial de las proteínas presentes en las películas según el método descrito por Mauri y Añón (2006), con algunas modificaciones. Se estudió la solubilidad en agua (**A**) y cinco sistemas buffer diferentes: i) **BF**: buffer fosfato diácido de sodio 0,1M (NaH_2PO_4), ii) **BFD**: BF con dodecil sulfato de sodio 0,1 % p/v (SDS, Anedra, Argentina), iii) **BFU**: BF con urea 6M (Riedel-deHaën, Alemania), iv) **BFDU**: BF con dodecil sulfato de sodio 0,1 % p/v y urea 6M, y v) **BFDUM**: BFDU con 2-ME al 2,5 % v/v (Sigma-Aldrich, Alemania), todos a pH 7,5.

Trozos pequeños de películas (\cong 50 mg), se pesaron y colocaron en eppendorfs conteniendo 1 ml de solvente, que se agitaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente las suspensiones se centrifugaron a 9000 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente y se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes por el método de Bradford (Bradford, 1976), realizando curvas de

calibración con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) en agua y en cada uno de los sistemas buffer utilizados. La solubilidad se expresó como porcentaje de proteína soluble (% p/p) respecto a la cantidad total de proteína teórica presente en cada película, la cual fue determinada mediante la masa de aislado usada para preparar la película, el porcentaje de proteínas del aislado y el contenido de agua de la película. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

II.2.1.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el Test de Fisher de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0.05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

II.2.2 Resultados y discusión

II.2.2.1 Obtención de aislados proteicos

Es sabido que la solubilidad de las proteínas depende del pH, y que en el proceso de formación de aislados proteicos al variar el pH de extracción es factible cambiar la composición polipeptídica del producto y modificar el rendimiento de la extracción. Es por esto que se decidió trabajar con dos aislados con proteínas extraídas de la harina de amaranto a pHs 9,0 y 11,0. Algunos autores encontraron diferencias en algunas de las propiedades funcionales de estos aislados, como en las espumantes, y la capacidad de retención y de absorción de agua, mostrando la dependencia de las propiedades con el pH de solubilización de las proteínas (Abugoch James, 2006; Abugoch y col., 2010).

En la **figura II.2.3** se muestra la composición porcentual de la harina utilizada, que además de presentar un alto contenido de hidratos de carbono (~ 54 %), presentó un porcentaje interesante de proteínas (~ 19 %) y lípidos (~ 10 %), con buenas propiedades nutricionales (Segura-Nieto y col., 1994). Estos resultados coinciden con la composición habitual de una harina de amaranto (Barba de la Rosa y col., 2009), que se caracteriza por poseer un mayor contenido proteico que la proveniente de los cereales (National Research Council, 1984).

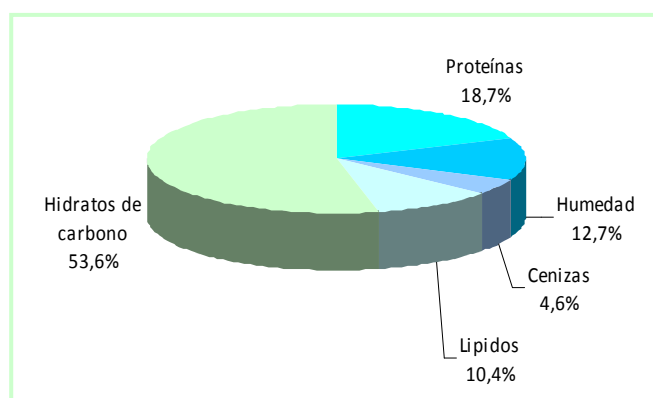


Figura II.2.3 Composición porcentual de la harina de amaranto obtenida a partir de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*

Los aislados obtenidos fueron caracterizados mediante el porcentaje de proteínas, contenido de agua y cenizas, determinándose además el rendimiento obtenido a partir

de la harina (**Tabla II.2.1**). Ambos aislados mostraron un contenido de humedad y cenizas similar, pero el A11 presentó un mayor contenido proteico que el A9 (91,1 frente a 83,7 % p/p en base seca), y también un mejor rendimiento (aproximadamente del doble), en concordancia con resultados previos de nuestro laboratorio (Martínez y Añón, 1996; Avanza y Añón, 2007).

Tabla II.2.1 Contenido de proteínas, agua y cenizas de los aislados proteicos A9 y A11, y rendimiento de su proceso de obtención

	A9	A11
Proteínas¹ (% p/p)	83,7 ± 0,2 ^a	91,1 ± 0,2 ^b
Agua (% p/p)	8,1 ± 0,2 ^a	8,8 ± 0,8 ^a
Cenizas¹ (% p/p)	3,76 ± 0,02 ^a	4,04 ± 0,28 ^a
Rendimiento² (% p/p)	7,3 ± 1,7 ^a	14,1 ± 2,0 ^b

En filas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

¹ porcentajes expresados en base seca

² porcentaje expresado como g de aislado cada 100 g de harina desgrasada

II.2.2.2 Caracterización de las proteínas presentes en los aislados A9 y A11

En la **figura II.2.4** se muestran las electroforesis desnaturalizantes (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras de los aislados A9 y A11, en las cuales se observaron algunas diferencias significativas en la composición polipeptídica.

En condiciones desnaturalizantes no reductoras (calle 1 y 2), se encontraron los perfiles típicos para estos aislados, en concordancia con lo informado por otros autores (Martínez y Añón, 1996; Abugoch y col., 2010). Se observaron 2 bandas de masa molecular similar (56-54 kDa) correspondientes a las subunidades AB, al polipéptido P-54 de las globulinas 11S y globulina-P, o a las glutelinas, las cuales fueron más marcadas en el aislado A11; bandas de 67 kDa, probablemente constituyentes de la globulina 7S (Marcone, 1999); bandas entre 32 y 38 kDa, correspondientes a los polipéptidos A de globulinas, o a glutelinas, que se evidenciaron más claramente en el aislado A9; otras bandas cercanas a 21 kDa que corresponden a los polipéptidos B de globulinas, o a glutelinas, y bandas de masa molecular menor a 20 kDa, que pueden corresponder a la fracción albúminas. También se detectaron especies de alta masa molecular que no pudieron entrar al gel, con mayor intensidad en el A11, que podrían

pertenecer a la fracción glutelinas. Estos resultados coinciden con los mostrados por Martínez y Añón (1996), que mostraron que la extracción de globulinas y glutelinas aumenta con el pH de solubilización.

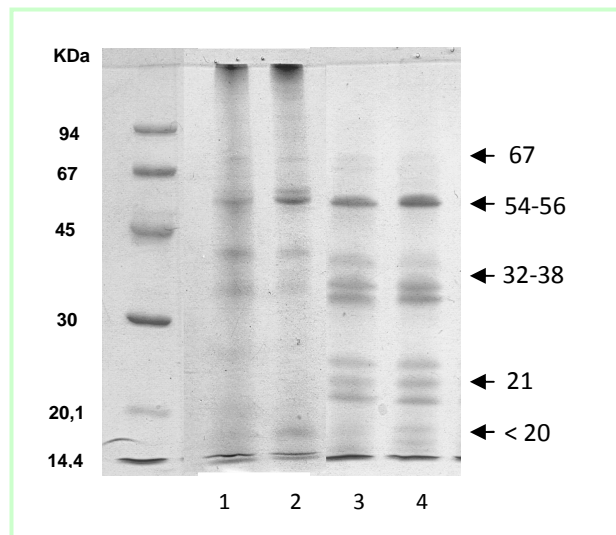


Figura II.2.4 Perfiles electroforéticos de los aislados A9 y A11 en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) no reductoras (calle 1 y 2) y reductoras (calle 3 y 4)

En los perfiles desnaturizantes en condiciones reductoras -debido al agregado de 2-ME en el buffer de muestra- (calle 3 y 4) se observaron pocas diferencias entre las bandas correspondientes a ambos aislados y sus intensidades. Es posible observar, que por el efecto reductor, desaparecieron las bandas de alta masa molecular que antes no entraban al gel, y las bandas de 67 kDa, y aumentó la intensidad de las bandas de 32-38 kDa y 21 kDa, las cuales estaban unidas por enlaces disulfuro. A su vez, en el A11 se observó una mayor intensidad de la banda de 54-56 kDa y de las bandas de masas moleculares menores a 20 kDa.

En la **figura II.2.5** se muestran los termogramas de los aislados A9 y A11 obtenidos por DSC, con el fin de evaluar el estado conformacional de las proteínas que los componen. Se observa que los aislados A9 y A11 presentaron dos endotermas, no encontrándose diferencias significativas en las temperaturas de desnaturalización para ambos aislados (**Tabla II.2.2**). La endoterma de menor estabilidad térmica (~ 70 °C) podría atribuirse a la desnaturalización de una fracción de glutelinas y a una fracción de globulinas (7S), y la de mayor estabilidad térmica (~ 98 °C) correspondería a la desnaturalización de las

fracciones de globulinas 11S, globulina-P y otra fracción de glutelinas (Avanza y Añón, 2007).

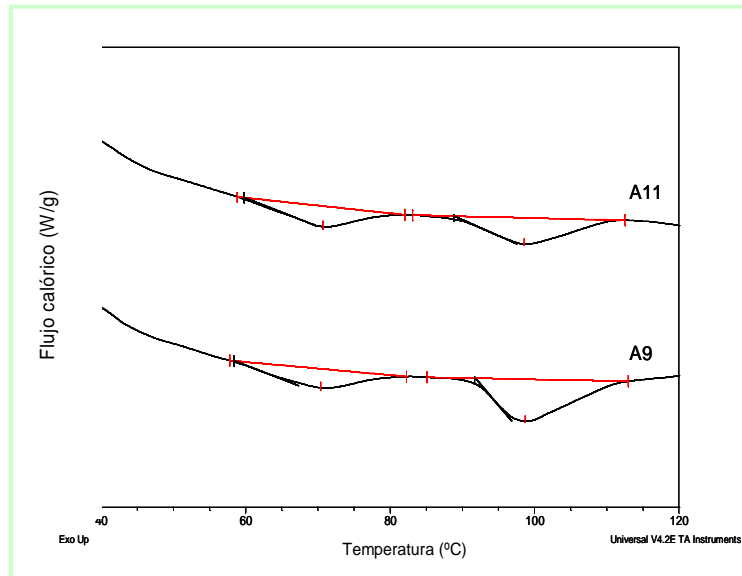


Figura II.2.5 Termogramas de los aislados proteicos A9 y A11 obtenidos por DSC

La entalpía de desnaturalización total del aislado A9 fue mayor que la del aislado A11 (11,5 y 9,8 J/g de aislado) observándose las diferencias especialmente en los calores correspondientes a las endotermas de mayor estabilidad térmica (**Tabla II.2.2**). Estas evidencias sugerirían que las proteínas presentes en el aislado A11 se encontrarían algo más desplegadas que las correspondientes al aislado A9, posiblemente por efecto del pH de extracción, tal como lo señalaron Martínez y Añón (1996). Pero es difícil aseverar esta observación dado que los aislados están constituidos por distintas proporciones de cada fracción proteica, y cada fracción presenta un calor de desnaturalización diferente, en función de la hidrofobicidad y/o hidrofiliidad de la molécula, número y tipos de uniones que estabilizan a la misma, así como del grado de agregación (Arntfield y Murray, 1981).

Las diferencias en la intensidad de las bandas de la composición polipeptídica, señaladas anteriormente, así como el diferente grado de desplegamiento de las proteínas, justifican las diferencias entre los cocientes de los ΔH_d de cada pico para ambos aislados.

Tabla II.2.2 Temperatura (T_d) y calor de desnaturalización (ΔH_d), y relación $\Delta H_{d1}/\Delta H_{d2}$ para las dos endotermas registradas en los termogramas de los aislados A9 y A11 (dispersos en agua) obtenidos por DSC

		A9	A11
Endoterma 1	T_d ($^{\circ}\text{C}$)	$70,2 \pm 0,3^a$	$70,7 \pm 0,1^a$
	ΔH_{d1} (J/g proteína)	$5,0 \pm 0,5^a$	$4,5 \pm 0,3^a$
Endoterma 2	T_d ($^{\circ}\text{C}$)	$98,7 \pm 0,^a$	$98,6 \pm 0,1^a$
	ΔH_{d2} (J/g proteína)	$8,7 \pm 0,4^a$	$6,2 \pm 0,6^b$
$\Delta H_{d1}/\Delta H_{d2}$		0,57	0,73

En filas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.
Los ΔH_d están expresados en J/g de proteína

Se estudió también la solubilidad en agua de ambos aislados, A9 y A11, los cuales mostraron un valor de $44,2 \pm 0,2$ y $50,7 \pm 0,5$ % p/p, respectivamente. El hecho de que la solubilidad del aislado A11 fue algo mayor que la del aislado A9, estaría relacionado con el pH de extracción durante la preparación de los aislados. Esto podría deberse a que al aumentar el pH de extracción, las proteínas fueron desplegadas en mayor proporción como se evidenció en el DSC, exhibiendo un diferente número de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, permitiendo una mayor solubilización del A11, lo que también podría relacionarse con la diferente composición polipeptídica de las proteínas.

II.2.2.3 Caracterización de las dispersiones iniciales formadoras de películas

En base a estudios previos (Denavi y col., 2009b), las películas se formaron por *casting* a partir de dispersiones acuosas al 5 % p/v de los respectivos aislados proteicos y 25 % p/p de glicerol respecto del aislado (agregado como plastificante) a pH 10,5. Se utilizó este pH para favorecer la dispersión proteica, y considerando que películas formadas a partir de aislados proteicos de soja nativos a este pH, presentaron una mejor funcionalidad que las obtenidas a pH ácido o neutro (Mauri y Añón, 2006 y 2008).

Las dispersiones de los aislados a pH 10,5, analizadas por DSC, también presentaron dos endotermas con temperaturas de desnaturalización similares a las de las

dispersiones acuosas, no observándose tampoco diferencias entre A9 y A11 (**Tabla II.2.3**).

Tabla II.2.3 Temperatura (T_d) y calor de desnaturalización (ΔH_d), y relación $\Delta H_{d1}/\Delta H_{d2}$ para las dos endotermas registradas en los termogramas de los aislados A9 y A11 (dispersos en agua a pH 10,5) obtenidos por DSC

		A9	A11
Endoterma 1	T_d (°C)	$69,7 \pm 0,3^a$	$69,8 \pm 1,2^a$
	ΔH_{d1} (J/g proteína)	$7,3 \pm 1,0^a$	$9,0 \pm 0,1^b$
Endoterma 2	T_d (°C)	$99,5 \pm 1,3^a$	$100,9 \pm 0,5^a$
	ΔH_{d2} (J/g proteína)	$4,8 \pm 0,7^a$	$1,7 \pm 0,1^b$
	$\Delta H_{d1}/\Delta H_{d2}$	1,5	5,5

En filas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.
Los ΔH_d están expresados en J/g de proteína

Solo la dispersión de A9 a pH 10,5 presentó una entalpía de desnaturalización total levemente inferior que la correspondiente a la de su dispersión acuosa (**Tabla II.2.2**), no observándose este efecto en la dispersión de A11. Pero si bien no se observaron diferencias significativas en los valores de entalpía total del aislado A9 y A11 dispersos a pH 10,5, las dos endotermas en cada termograma contribuyeron de manera muy diferente a la entalpia total, tal como se observa en los $\Delta H_{d1}/\Delta H_{d2}$. Estas diferencias, también resultaron ser muy significativas respecto de las dispersiones acuosas, observándose dos efectos marcados para ambos aislados al alcalinizar a pH 10,5: 1) un aumento de entalpia para la endoterma de menor estabilidad térmica que podría estar asociado a un efecto disociante del pH alcalino, el cual alteraría el balance de carga de las diferentes proteínas, y 2) una disminución significativa en la entalpia de la endoterma de mayor estabilidad térmica (Avanza y Añón, 2007) evidenciando que ocurre desnaturalización para ambos aislados proteicos independientemente del valor de entalpia total. Ambos efectos se potenciaron en el caso de A11 dispersado a pH 10,5. Las diferencias cuantitativas en los ΔH_d observadas entre A9 y A11, seguramente se deberán a la composición diferencial de fracciones proteicas presentes en cada aislado.

Al evaluar la solubilidad de las dispersiones iniciales a pH 10,5, se vio que A9 mostró un valor de $103,2 \pm 3,9$ % p/p y A11 de $93,8 \pm 0,1$ % p/p, sin diferencias significativas entre ambos, pero con valores mucho mayores que en agua. Al aumentar el pH de la dispersión y alejarse del pI (4,5-5), aumenta la carga neta de las proteínas y por ende su solubilidad en agua. La posibilidad de solubilizar prácticamente la totalidad de las proteínas en la dispersión inicial a pH 10,5 resulta interesante, ya que facilitará la formación de películas homogéneas durante el secado.

II.2.2.4 Caracterización de películas proteicas obtenidas a partir de aislados A9 y A11

II.2.2.4.1 Apariencia

Las dispersiones proteicas de A9 y A11 a pH 10,5, conteniendo glicerol como plastificante, lograron formar películas homogéneas, transparentes y flexibles con una coloración suavemente amarronada, tal como se muestra en la **figura II.2.6**, debida a la coloración propia de los aislados.



Figura II.2.6 Película obtenida a partir del aislado A11

En la **Tabla II.2.4** se observa que las películas de A9 y A11 no mostraron diferencias significativas en el contenido de agua y en el espesor. Tampoco presentaron diferencias en ninguno de los parámetros de color, ni en la opacidad. El color amarronado de ambas películas se vio reflejado en los valores de **a** negativos y **b** positivos.

Tabla II.2.4 Espesor, contenido de agua, parámetros de color de Hunter Lab y opacidad de las películas obtenidas a partir de aislados proteicos A9 y A11

		Películas A9	Películas A11
Espesor (μm)		60,1 \pm 9,8 ^a	52,3 \pm 13,6 ^a
Contenido de agua (% p/p)		17,5 \pm 0,5 ^a	18,9 \pm 0,3 ^a
Parámetros de color Hunter Lab	a	-0,9 \pm 0,1 ^a	-0,8 \pm 0,1 ^a
	b	24,7 \pm 1,2 ^a	23,4 \pm 1,3 ^a
	L	82,8 \pm 0,6 ^a	82,6 \pm 0,7 ^a
	ΔE	27,2 \pm 1,3 ^a	26,2 \pm 1,5 ^a
Opacidad (uA/mm)		1,4 \pm 0,2 ^a	1,1 \pm 0,2 ^a

En filas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

II.2.2.4.2 Propiedades mecánicas

En la **Tabla II.2.5** se muestran las propiedades mecánicas de las películas obtenidas con A9 y A11, medidas con ensayos en tracción. Los valores de tensión a la ruptura (σ_r), deformación máxima a la ruptura (ϵ_{max}) y módulo elástico (E) no mostraron diferencias significativas entre ambas películas, y resultaron ser muy pobres, posiblemente debido a que las proteínas en la película conserven en gran medida el estado nativo de sus proteínas, como lo mostraron Mauri y Añón (2006) en películas formadas por proteínas de soja.

Tabla II.2.5 Tensión a la ruptura (σ_r), deformación máxima a la ruptura (ϵ_{max}) y módulo elástico (E) de las películas obtenidas a partir de aislado A9 y A11, medidas en tracción

	σ_r (MPa)	ϵ_{max} %	E (MPa)
Películas A9	1,34 \pm 0,39 ^a	50,9 \pm 16,5 ^a	0,45 \pm 0,15 ^a
Películas A11	1,25 \pm 0,14 ^a	73,2 \pm 14,5 ^a	0,43 \pm 0,06 ^a

En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

Las propiedades encontradas son similares a las reportadas por Denavi y col. (2009a) para películas formadas con aislados proteicos de soja nativos, pero muy inferiores (menor resistencia a la ruptura y modulo elástico) a las encontradas en películas de

soja y girasol formadas con aislados proteicos total o parcialmente desnaturalizados con igual procedimiento (Denavi y col., 2009a; Salgado y col., 2010). Es evidente la importancia de la configuración inicial de las proteínas en la funcionalidad resultante. Y por otra parte, en general, las cadenas proteicas al estar más desplegadas tienen mayor capacidad para interactuar entre sí llevando a la formación de matrices más entrecruzadas que en general son más resistentes.

II.2.2.4.3 Susceptibilidad al agua

Las películas preparadas con A9 y A11 tampoco mostraron diferencias significativas en la permeabilidad al vapor de agua ni en su solubilidad en agua (Tabla II.2.6).

Tabla II.2.6 Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y solubilidad en agua de películas obtenidas a partir de aislados proteicos A9 y A11

	Películas A9	Películas A11
WVP*10 ⁻¹¹ (g H ₂ O/Pa m s)	6,8 ± 0,8 ^a	5,6 ± 0,5 ^a
Solubilidad en agua %	75,6 ± 2,2 ^a	79,9 ± 2,1 ^a

En filas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

Independientemente de esto, las WVP de estas películas son muy interesantes y alentadoras, ya que resultaron ser un orden de magnitud menor que las correspondientes a películas de soja y girasol obtenidas y caracterizadas de igual manera, las cuales mostraron valores alrededor de $1,5 \cdot 10^{-10}$ g H₂O/Pa m s (Denavi y col., 2009b; Salgado y col., 2010). Esto podría atribuirse a la naturaleza más hidrofóbica de las proteínas de amaranto, por ejemplo de las globulinas 11S y P, como se señaló en la sección II.1.4.

Considerando que, en general, la alta permeabilidad al vapor de agua es una de las propiedades que limita las aplicaciones de los materiales proteicos (al igual que ocurre con los formados por polisacáridos), y que la mejora de esta propiedad es materia de estudio a través de diferentes estrategias (sección I.5), la WVP de las películas estudiadas en este capítulo -a pesar de estar alejadas de las correspondientes a los polímeros sintéticos derivados del petróleo- posicionan al amaranto como una fuente

proteica interesante para la obtención de películas comestibles y/o biodegradables con mejores propiedades barrera.

La solubilidad encontrada en las películas obtenidas con A9 y A11 fue similar a la correspondiente a películas obtenidas con aislado proteico de soja nativo (~ 84 %) (Denavi y col., 2009a), y mayor a la correspondiente a películas obtenidas a partir de aislado proteico de soja comercial desnaturalizado (~ 23 %) (datos aún no publicados). Esto podría deberse a que las películas obtenidas con aislados nativos, por el hecho de estar menos desplegados, alcanzan menor entrecruzamiento, logrando mayor solubilización.

II.2.2.4.4 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas

Para poder comprender cuales son las interacciones que estabilizan a las películas formadas con A9 y A11, en la **figura II.2.7** se muestran los resultados de los ensayos de la solubilidad diferencial de las proteínas que conforman la matriz en buffers con distinta actividad química. Los buffers utilizados fueron: agua, capaz de disolver los polipéptidos libres que no están unidos fuertemente a la matriz; buffer fosfato (**BF**), que permite evidenciar la importancia de las interacciones electrostáticas; buffer fosfato con agregado de SDS (**BFD**) que ocasiona principalmente la ruptura de interacciones hidrofóbicas y también interactúa con las proteínas aumentando su relación carga/masa; buffer fosfato con urea (**BFU**), que modifica la capacidad de formar puentes de hidrógeno; buffer fosfato con urea y SDS (**BFDU**); y buffer fosfato con urea, SDS y 2-ME (**BFDUM**), que pone en evidencia la presencia de enlaces disulfuro.

Cuando las películas fueron solubilizadas en agua, se observó un porcentaje entre 25-40 % de proteínas solubles, lo cual muestra el entrecruzamiento de las proteínas durante la formación de la matriz proteica. Estas películas mostraron mayor entrecruzamiento que el correspondiente a películas de aislado proteico de girasol y de aislado de soja nativo, que tenían solubilidades mayores (~ 40 % y 65 %, respectivamente), aunque menor entrecruzamiento que el correspondiente a películas de aislado proteico de soja desnaturalizado, que alcanzaron menor solubilidad (~ 13 %) (Salgado y col., 2010; Mauri y Añón, 2006). Este porcentaje descendió cuando se utilizó el buffer fosfato, posiblemente debido a que este buffer pudo haber favorecido las

uniones iónicas entre las cadenas polipeptídicas produciendo un efecto de *salting out*. Esta baja solubilidad en BF muestra que las fuerzas electrostáticas no jugaban un rol importante en la estabilización de la matriz proteica. Cuando se agregó el detergente SDS al buffer fosfato, la solubilidad aumentó, mostrando que las uniones hidrofóbicas estaban involucradas en la estabilización de la matriz, como también cuando se agregó urea al buffer fosfato, lo cual indica que también las uniones puente hidrógeno estabilizaban dicha matriz, siendo estas interacciones mas significativas en las películas formadas por el aislado A11. Al disolver las películas en el buffer con SDS y urea, se ve que existían ciertas uniones a las que se logró acceder debido al agregado de ambas sustancias, con lo que se alcanzó la solubilización total de las películas, lo que rectifica la importancia de las uniones hidrofóbicas y puente hidrógeno en la estabilización de la matriz. Con el agregado de 2-ME al buffer, la solubilidad no varió respecto del buffer anterior, lo que demuestra que las uniones disulfuro no jugaban un rol importante en la estabilización de estas matrices proteicas.

Es decir que las películas proteicas de amaranto formadas a partir de los aislados A9 y A11, estaban estabilizadas principalmente por uniones de tipo no covalentes, principalmente uniones hidrofóbicas y puente hidrógeno.

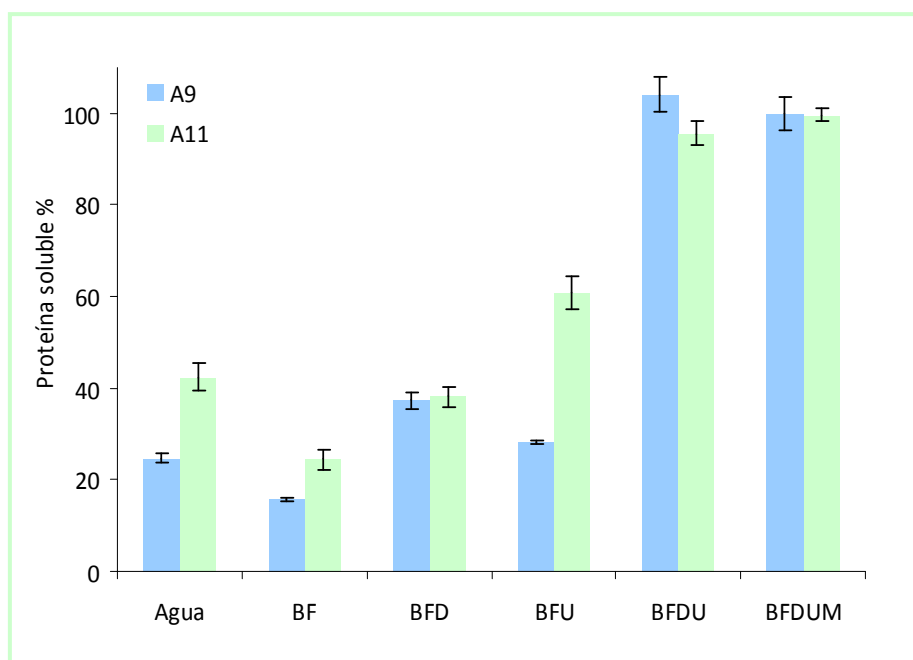


Figura II.2.7 Solubilidad diferencial de películas proteicas A9 y A11. Porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BFD), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BFDU), BFDU con 2-mercaptoetanol 2,5 % v/v (BFDUM), todos a pH 7,5.

II.2.3 Conclusión

Con ambos aislados (A9 y A11) fue posible obtener películas proteicas homogéneas y transparentes, con muy buenas propiedades barrera al vapor de agua pero con pobres propiedades mecánicas y alta solubilidad en agua. Estas películas estaban estabilizadas principalmente por interacciones de tipo hidrofóbicas y puente hidrógeno, lo que explica las propiedades antes descriptas.

Teniendo en cuenta que: i) a pesar de las diferencias en la composición polipeptídica de los aislados A9 y A11, no se observaron diferencias en la funcionalidad de sus respectivas películas proteicas, ii) que el rendimiento de extracción proteica del aislado A11 fue muy superior al del aislado A9, y iii) que el A11 presenta un mayor contenido de proteínas, se decidió seleccionar al aislado A11 para seguir trabajando en la formación de películas proteicas con mejores propiedades.

En las próximas secciones se evaluarán distintas estrategias para mejorar la funcionalidad de los materiales obtenidos con el aislado A11, a partir de la modificación estructural de sus proteínas mediante tratamiento térmico o con alta presión hidrostática.

II.3 Películas proteicas de amaranto formadas a partir de aislados tratados térmicamente

La modificación de la estructura de las proteínas por tratamientos químicos, físicos y/o enzimáticos afecta en consecuencia sus propiedades fisicoquímicas y funcionales (Damodaran, 1989). El proceso de desnaturalización de proteínas, el cual puede ser total o parcial, ocurre cuando el ordenamiento espacial original de las cadenas polipeptídicas de una proteína, denominado estado nativo, cambia hacia estructuras donde predomina un mayor desorden. En dicho proceso ocurre la pérdida de las estructuras de orden superior originales: secundaria, terciaria y cuaternaria, sin modificarse la estructura primaria (**figura II.3.1**). En consecuencia la desnaturalización provoca diversos efectos en la proteína, como cambios en las propiedades hidrodinámicas, que puede llevar al aumento de la viscosidad, disminución de la solubilidad y pérdida de las propiedades biológicas, entre otras (Kauzmann, 1959).

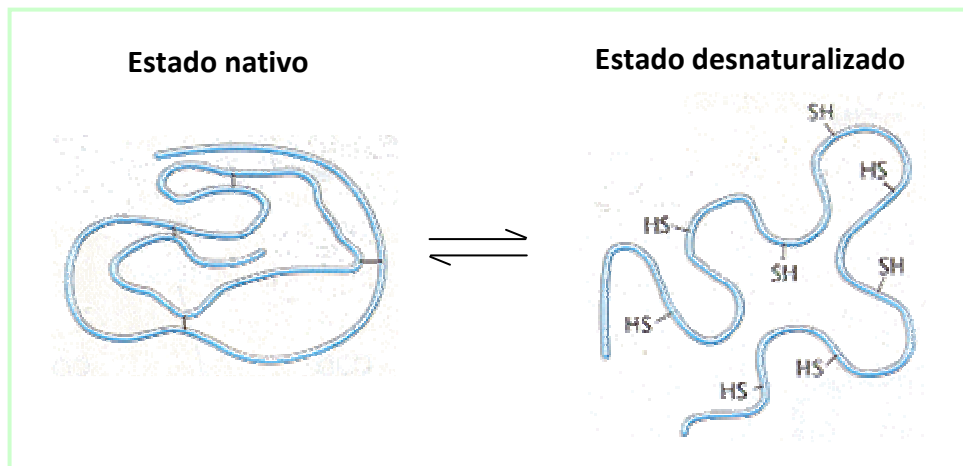


Figura II.3.1 Desnaturalización de proteínas

La desnaturalización térmica ocurre por efecto del aumento de la temperatura, lo que provoca el aumento de la energía cinética de las moléculas y la desorganización de la envoltura acuosa de las proteínas debido a la destrucción de las interacciones débiles (Kauzmann, 1959). En consecuencia, el interior hidrofóbico se expone e interacciona con el medio acuoso, produciendo generalmente agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada.

Avanza y col. (2005) estudiaron el efecto del tratamiento térmico sobre las proteínas de amaranto y su posterior utilización para la formación de geles, observando una correlación entre el aumento de la temperatura y la disminución del tiempo de gelación. Además observaron que cuando se sometía a las proteínas a temperaturas mayores a 70 °C, se formaban geles más fuertes y elásticos, y menos adhesivos que los formados por las proteínas nativas, y lo atribuyeron a la desnaturalización de la globulina-P y 11S, seguida de reacciones de intercambio de sulfhidrilos/disulfuros entre las moléculas de proteína.

Se ha reportado que películas formadas por proteínas de soja, de suero de leche, de poroto, o gelatina de calamar, tratadas térmicamente, mostraron mejoras en las propiedades mecánicas, y en algunos casos también disminuciones en la solubilidad y en WVP (Stuchell y Krochta, 1994; Pérez-Gago y Krochta, 2001; Choi y Han, 2002; Hoque y col., 2010), adjudicándose estas modificaciones a la formación de matrices proteicas más estabilizadas por enlaces covalentes, especialmente puentes disulfuro. Es de esperar que una estructura proteica inicial más desplegada, favorezca las interacciones entre las cadenas aumentando el entrecruzamiento, y que esto tenga implicancias en las propiedades de las películas resultantes, especialmente en las mecánicas y de barrera. Los tratamientos térmicos óptimos informados fueron de diferente intensidad (temperatura y tiempo) dependiendo de la naturaleza y origen de la proteína en cuestión.

El objetivo de este capítulo fue intentar mejorar la funcionalidad de las películas proteicas de amaranto (especialmente sus propiedades mecánicas) a través de su obtención a partir de aislados proteicos tratados térmicamente.

II.3.1 Materiales y métodos

II.3.1.1 Materiales

Se utilizó el aislado proteico de amaranto, A11, cuya preparación se describió en la sección II.2.1.3.

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de pureza analítica.

II.3.1.2 Tratamientos térmicos realizados sobre el aislado A11

Se preparó una dispersión acuosa del aislado A11 al 1 % p/v agitando continuamente durante 1 hora a temperatura ambiente. Dicha dispersión proteica se sometió a dos tratamientos térmicos, que se diferenciaban entre si por la temperatura aplicada: a) 70 ± 2 °C y b) 90 ± 2 °C, ambos durante 20 minutos en un baño termostático, enfriando rápidamente luego de transcurrido este tiempo. Las dispersiones se almacenaron a -80 °C y se liofilizaron. Los aislados resultantes fueron identificados como, **A11-70** y **A11-90**, haciendo referencia a las temperaturas de los tratamientos, 70 °C y 90 °C respectivamente.

II.3.1.3 Caracterización de los aislados proteicos nativos y tratados con temperatura

Los aislados nativos y modificados por temperatura fueron caracterizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con o sin 2-ME, calorimetría diferencial de barrido y solubilidad de proteínas, como se describió en la sección II.2.1.4.

II.3.1.4 Obtención de películas proteicas de amaranto

Las películas proteicas se obtuvieron por *casting* a partir de los aislados proteicos nativos y modificados por temperatura, usando el mismo protocolo descrito en la sección II.2.1.5. Se trabajó con dispersiones que contenían 5 % p/v de los aislados proteicos y 25 % p/p de glicerol respecto del aislado (usado como plastificante) a pH 10,5. Posteriormente, 10 ml de las dispersiones formadoras de películas fueron colocados en placas de Petri de poliestireno (64 cm²) y se secaron a 60 °C durante 3 horas. Las películas resultantes se acondicionaron 48 horas a 20 °C y 58 % de humedad relativa previo a su caracterización.

II.3.1.5 Caracterización de las películas proteicas

Las películas proteicas obtenidas a partir de los aislados A11 nativo y modificados por temperatura fueron caracterizadas mediante la determinación del contenido de agua, espesor, opacidad, color, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, propiedades mecánicas y solubilidad diferencial de proteínas, como se describió en la sección II.2.1.6. Además se realizó la determinación del ángulo de contacto para analizar su hidrofobicidad superficial, como se describe a continuación.

II.3.1.5.1 Determinación del ángulo de contacto

La hidrofobicidad superficial de las películas se evaluó mediante la medición del ángulo de contacto dinámico a temperatura ambiente con un goniómetro ramé-hart Model 500 (ramé-hart instrument co., Estados Unidos). Una gota de 5 μ l de agua desmineralizada se colocó sobre la superficie de la película con una jeringa de pistón automático y se fotografió. Un analizador de imágenes se utilizó para medir el ángulo de contacto, formado entre la base, compuesta por la superficie de la película en contacto con la gota de agua, y la tangente a la gota de agua. El valor de dicho ángulo variará según sea la relación existente entre las distintas fuerzas de adhesión y cohesión entre los dos estados, es decir, entre la sustancia líquida y la sustancia sólida. Para cada película, la hidrofobicidad se obtuvo de los valores de ángulo de contacto inicial (valor medio de ángulos de contacto medidos en ambos lados de la gota). Los resultados experimentales fueron los valores promedio de seis mediciones realizadas en las diferentes áreas de la superficie de la película.

II.3.1.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el Test de Fisher de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0.05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

II.3.2 Resultados y discusión

II.3.2.1 Modificación estructural de las proteínas de amaranto por tratamiento térmico

Se realizaron dos tratamientos térmicos sobre las proteínas de amaranto, que variaron en la temperatura aplicada. Se seleccionaron 70 y 90 °C como temperaturas para realizar el tratamiento, ya que son cercanas a las temperaturas de desnaturalización correspondientes a las fracciones proteicas presentes en el aislado A11, según lo analizado por DSC en la sección II.2.2.2. Se intentó realizar el tratamiento directamente sobre las dispersiones proteicas formadoras de películas (al 5 % p/v), de manera de simplificar el proceso y evitar la etapa de liofilización, pero las dispersiones gelificaron por efecto de la temperatura. Por esto, fue necesario realizar los tratamientos térmicos sobre dispersiones al 1 % p/v, luego secarlas por liofilización y utilizar las muestras resultantes como material de partida para la formación de las películas.

II.3.2.2 Caracterización de los aislados nativos y modificados por temperatura

En la **figura II.3.2**, se presentan los termogramas correspondientes a los aislados A11, A11-70 y A11-90, y en la **Tabla II.3.1**, las temperaturas y entalpías de desnaturalización que se obtienen del análisis de los mismos.

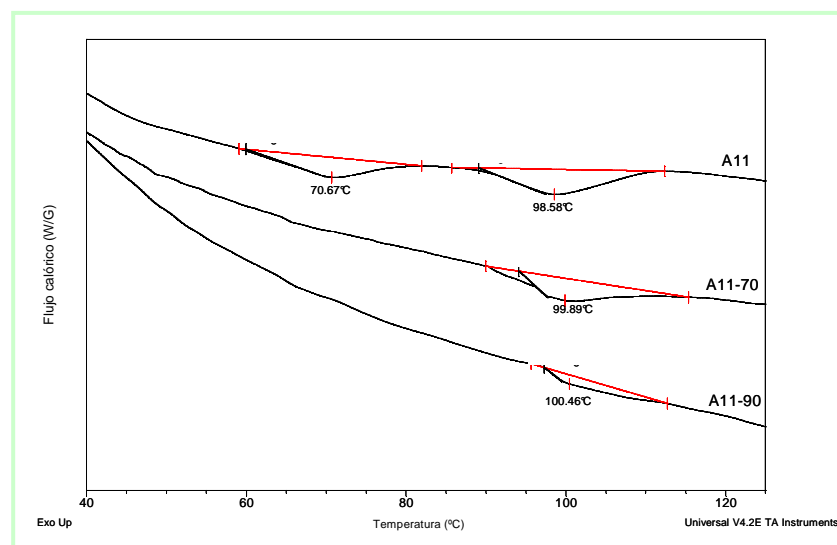


Figura II.3.2 Termogramas de A11, A11-70 y A11-90

El tratamiento a 70 °C provocó la desnaturalización total de las fracciones proteicas de menor estabilidad térmica (glutelinas y globulinas 7S), con la desaparición de la primera endoterma característica de A11. Asimismo, el aislado A11-70 retuvo en un 87 % la naturaleza nativa de las fracciones de mayor estabilidad térmica (globulinas 11S, globulina-P y otra fracción de glutelinas), observándose una leve disminución de la entalpía de desnaturalización y el corrimiento de la T_d de la segunda endoterma. Mientras que, el tratamiento a 90 °C, produjo la desnaturalización casi total de todas las fracciones proteicas, solo conservando en un 5 % la estructura nativa de las fracciones de mayor estabilidad térmica.

Tabla II.3.1 Entalpía de desnaturalización (ΔH_d) en base seca y temperatura de desnaturalización (T_d) de A11, A11-70 y A11-90.

	ΔH_d (J/g proteína b.s.)		T_d (°C)	
	Endoterma 1	Endoterma 2	Endoterma 1	Endoterma 2
A11	4,5 ± 0,3	6,2 ± 0,6 ^a	70,7 ± 0,1	98,6 ± 0,1 ^a
A11-70	-	5,4 ± 0,2 ^b	-	99,8 ± 0,2 ^b
A11-90	-	0,28 ± 0,05 ^c	-	100,5 ± 0,2 ^b

En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

Avanza y Añón (2007) mostraron también una disminución del valor de ΔH_d en aislados proteicos de amaranto tratados térmicamente, que lo atribuyeron a la desnaturalización de las proteínas, y/o la formación de agregados de mayor estabilidad térmica, como también a una mayor participación de interacciones hidrofóbicas en la estabilización de dichos agregados.

Los aislados tratados a 70 °C y 90 °C mostraron un ligero incremento de la temperatura de desnaturalización respecto de la del aislado control A11 (**Tabla II.3.1**). Este incremento podría estar indicando el enriquecimiento de la endoterma en proteínas más termoestables por efecto de la desnaturalización o de la agregación generada por el tratamiento térmico.

La composición polipeptídica de las proteínas presentes en los aislados tratados térmicamente a 70 °C y 90 °C, se analizó mediante electroforesis desnaturalizante en

condiciones reductoras y no reductoras (**figura II.3.3**). En el perfil desnaturalizante, SDS-PAGE, se observan los aislados A11, A11-70 y A11-90 en las calles 1, 2 y 3, respectivamente. Para el A11 se muestran las bandas típicas del aislado de amaranto en condiciones desnaturalizantes, como se describieron en la sección II.2.2.2. En ambos aislados tratados térmicamente se observó la desaparición de la banda correspondiente a los polipéptidos de 67 KDa, correspondientes a la globulina 7S. Además, en el A11-70 se observó la atenuación de la banda de 54-56 KDa, la cual pertenece a las subunidades AB, al polipéptido P-54 de las globulinas 11S y globulina P y a las glutelinas, la cual desaparece totalmente en el A11-90. Esto podría deberse a la posible formación de agregados que no entren en el gel, que se correlaciona con la menor solubilidad del aislado A11-90 (mostrada posteriormente), y coincide con resultados anteriores de Avanza y Añón (2007). En A11-90 también disminuyó la intensidad de las otras bandas presentes en el aislado control. La intensidad de las bandas entre 32 y 38 kDa se intensificó en el aislado tratado a 70 °C, las cuales corresponden a los polipéptidos A de las globulinas. También se observó la desaparición de las bandas de alta masa molecular que no entraban al gel, especialmente en A11-90. Los polipéptidos menores a 20 kDa parecieran no haber sido afectados por el tratamiento térmico.

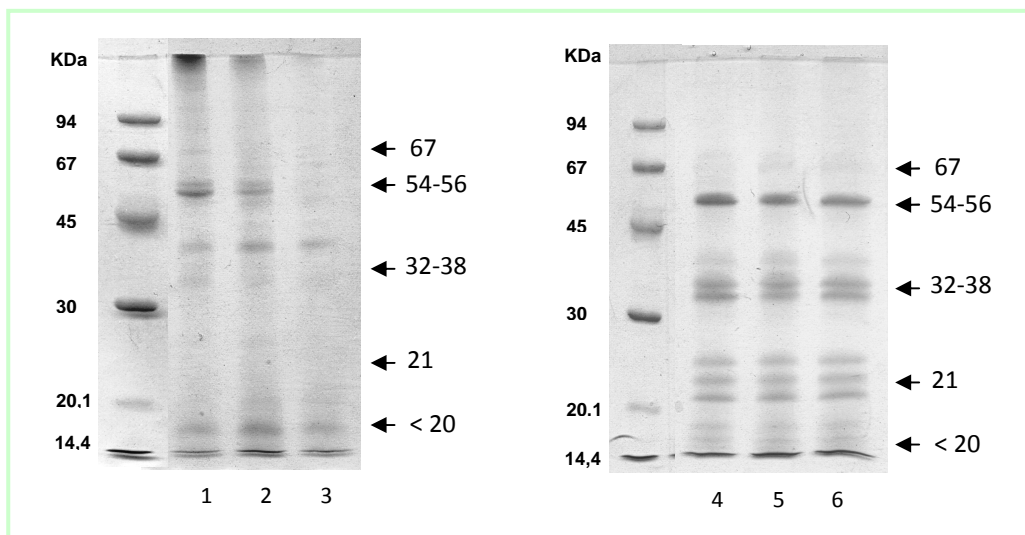


Figura II.3.3 Perfil de electroforesis desnaturalizante en condiciones no reductoras de A11, A11-70 y A11-90 (calle 1, 2 y 3, respectivamente) y en condiciones reductoras de A11, A11-70 y A11-90 (calle 4, 5 y 6, respectivamente).

En condiciones reductoras, el perfil electroforético de las muestras tratadas térmicamente no presentó modificaciones respecto al perfil correspondiente al aislado control, ni en tipo, ni en cantidad de especies encontradas. Se observó el aumento de intensidad respecto de la electroforesis desnaturalizante, de las bandas de 32-38 kDa (polipéptidos A) y 21 kDa (polipéptidos B), las cuales estaban unidas por enlaces disulfuro; de la banda de 54-56 kDa, producto de la disociación de los polipéptidos de mayor masa molecular; y de las bandas de menos de 20 kDa. Esto podría ser debido a que los agregados formados como consecuencia del tratamiento térmico, estarían especialmente estabilizados por uniones disulfuro.

Con estos resultados se podría sugerir que si bien la disminución de la intensidad de las bandas puede ser resultado de la menor solubilidad, también parece observarse agregación de las fracciones y disminución de la concentración de los agregados solubles que no llegaban a resolverse. También al comparar ambas electroforesis, se puede concluir que los agregados estarían estabilizados por interacciones disulfuro.

En la **figura II.3.4** se observa la solubilidad en agua y en agua alcalinizada a pH 10,5 de los aislados nativos y tratados térmicamente. La solubilidad en agua disminuyó con el aumento de la temperatura de tratamiento, lo que podría deberse al posible desplegamiento de las proteínas y/o a la agregación entre cadenas.

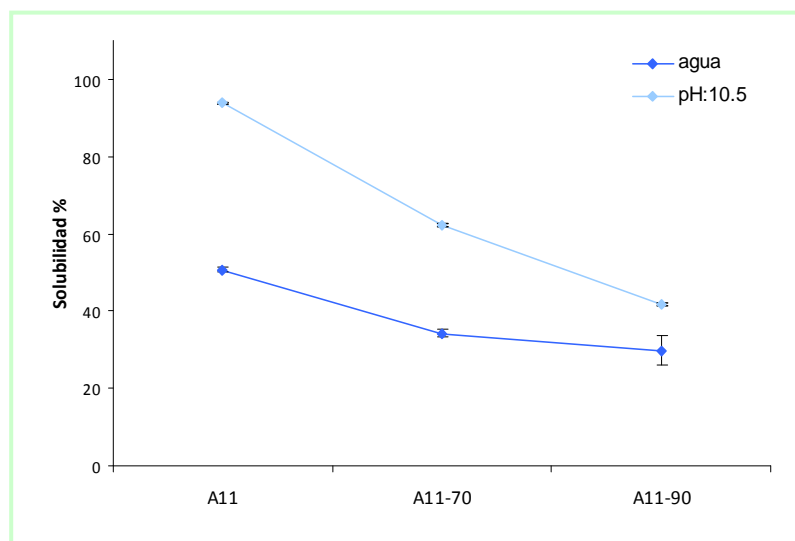


Figura II.3.4 Solubilidad de proteínas del aislado A11, A11-70 y A11-90 en agua y agua alcalinizada a pH 10,5

También se observó una disminución de la solubilidad en agua alcalinizada al intensificar el tratamiento térmico, aunque para todos los aislados la solubilidad fue mayor que en agua. Esto es lo esperado ya que el pH del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas de amaranto es 4,5-5, por lo que al aumentar el pH y alejarse del pI, se espera que se solubilice una mayor proporción de proteínas, lo que favorecería la formación de las películas por *casting*.

II.3.2.3 Caracterización de películas proteicas de amaranto obtenidas a partir de aislados modificados por temperatura

II.3.2.3.1 Apariencia

Si bien la solubilidad de las proteínas tratadas térmicamente fue inferior, fue posible preparar dispersiones formadoras de películas adecuadas que resultaron en películas de A11-70 homogéneas, y de A11-90 con mayor rugosidad al tacto.

Las películas formadas por aislados proteicos tratados térmicamente presentaron igual contenido de agua que la película control (**Tabla II.3.2**). El espesor de dichas películas aumentó significativamente con la severidad del tratamiento (**Tabla II.3.2**), a pesar de estar formadas por dispersiones con igual contenido de sólidos y de agua. Es evidente, que como las proteínas están más desplegadas y en algunos casos formando parte de agregados, al interactuar podrían generar redes menos compactas.

Tabla II.3.2 Propiedades físicas y apariencia de las películas obtenidas a partir de aislados proteicos A11, A11-70 y A11-90

		Películas A11	Películas A11-70	Películas A11-90
Espesor (μm)		52,3 \pm 13,6 ^a	85,1 \pm 12,4 ^b	98,2 \pm 18,7 ^b
Contenido de agua (% p/p)		18,9 \pm 0,3 ^a	18,0 \pm 0,7 ^a	18,1 \pm 0,2 ^a
Parámetros de color	a	-0,8 \pm 0,1 ^a	1,1 \pm 0,2 ^a	2,6 \pm 0,8 ^b
Hunter Lab	b	23,4 \pm 1,3 ^a	24,4 \pm 4,4 ^a	29,0 \pm 0,8 ^b
	L	82,6 \pm 0,7 ^a	77,3 \pm 2,7 ^b	70,4 \pm 2,3 ^c
	ΔE	26,2 \pm 1,5 ^a	30,3 \pm 5,1 ^a	38,4 \pm 2,3 ^b
Opacidad (uA/mm)		1,1 \pm 0,2 ^a	4,5 \pm 0,4 ^b	4,6 \pm 1,2 ^b

En filas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

A pesar de haber encontrado diferencias en los parámetros de color y opacidad entre las películas evaluadas (**Tabla II.3.2**), esto no fue detectado a simple vista. Los valores de L, a, b, y ΔE de las películas obtenidas con A11-90 fueron significativamente diferentes a los obtenidos con A11-70 y a las películas control. Estas películas fueron menos luminosas (menor L), mas amarronadas (mayores a y b) y con mayor coloración general (ΔE). En cambio, las películas obtenidas con A11-70 solo mostraron diferencias en el valor de L respecto del control, indicando menor luminosidad. Hoque y col. (2010) mostraron el aumento del color amarillento (mayor b) y la disminución de la luminosidad (menor L) en películas obtenidas a partir de gelatina tratada térmicamente, quienes explicaron que el aumento del pigmento amarillo en gelatina podría deberse a la reacción de Maillard. En cambio, Choi y Han (2002) no observaron diferencias entre las películas control y las películas obtenidas a partir de aislado proteico de poroto tratado con temperatura. En películas de proteínas de soja tratadas térmicamente luego de la formación de películas también se observó un aumento de la coloración general al intensificarse la severidad del tratamiento (Kim y col., 2002). La opacidad de las películas obtenidas con los aislados tratados térmicamente aumentó respecto de las formadas con proteínas nativas, no observándose diferencias dependientes de la temperatura del tratamiento.

II.3.2.3.2 Propiedades mecánicas

En la **figura II.3.5** se muestran las propiedades mecánicas en tracción de las películas obtenidas a partir de aislados desnaturalizados por temperatura, las cuales se compararon con las películas obtenidas a partir del aislado nativo (sección II.2.2.4.2). Las películas obtenidas con los aislados tratados térmicamente presentaron una mayor resistencia a la ruptura (σ_r) y menor deformación a la ruptura (ϵ_{max}) que la película control, sin modificar su modulo elástico (E). La única diferencia entre los dos tratamientos térmicos se observó en la elongación de las películas, que fue menor para las preparadas con A11-90. Las proteínas tratadas térmicamente, al estar más desplegadas podrían favorecer la interacción entre las cadenas polipeptídicas, y el mayor grado de entrecruzamiento podría ser la causa del aumento de la resistencia a la ruptura.

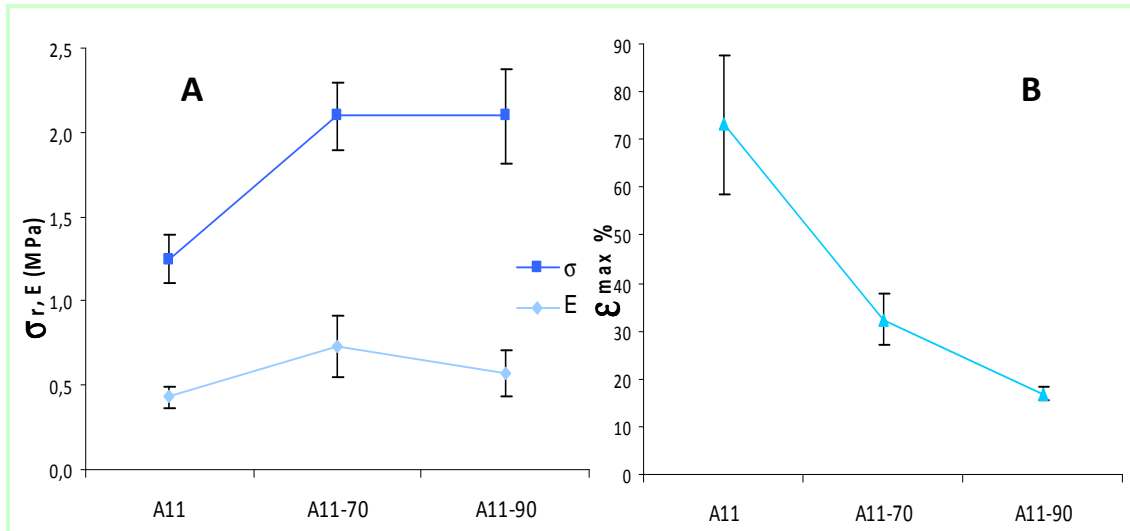


Figura II.3.5 A) Tensión a la ruptura (σ ,) y módulo elástico (E) y B) deformación a la ruptura (ϵ_{max}) de las películas formadas a partir de A11, A11-70 y A11-90, medidas en tracción

Pérez-Gago y Krochta (2001) observaron un aumento de la tensión, la elongación y el módulo elástico en películas formadas a partir de aislado proteico de suero de leche tratado térmicamente, que lo atribuyeron a los enlaces disulfuro formados luego del desplegamiento de las proteínas. Choi y Han (2002) también observaron que al tratar térmicamente dispersiones formadoras de películas de aislado proteico de poroto, las películas resultantes presentaron mayor tensión a la ruptura y elongación, pero menor módulo elástico, y lo adjudicaron a un posible reordenamiento de las proteínas luego del tratamiento. Otros autores mostraron que en películas hechas a partir de gelatina de calamar, la tensión a la ruptura aumentó y la elongación disminuyó cuando la gelatina fue tratada hasta 70 °C, y a mayores temperaturas esa tendencia se invirtió. Esto lo adjudicaron a la posible degradación de la gelatina a temperaturas mayores a 70 °C, que llevaría a la formación de cadenas cortas de proteína, generando menor interconexión entre las moléculas y dando origen a películas menos fuertes y más elongables (Hoque y col., 2010).

Es evidente que el efecto del tratamiento térmico realizado sobre las proteínas previo al proceso de obtención de películas, afectará la funcionalidad de manera diferente, dependiendo enormemente de la naturaleza de las proteínas -origen-, su conformación inicial -grado de desnaturalización-, así como del entrecruzamiento alcanzado durante el procesamiento de las películas.

II.3.2.3.3 Susceptibilidad al agua

En la **Tabla II.3.3** se presenta la solubilidad en agua, la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y el ángulo de contacto de las películas obtenidas a partir de los aislados A11, A11-70 y A11-90, con el fin de analizar la susceptibilidad al agua de estos materiales.

La solubilidad en agua disminuyó 23 % y 28 % para las películas de A11-70 y A11-90, respectivamente respecto de la película control. Pero además cabe resaltar que las películas formadas a partir de los aislados tratados mantuvieron su integridad, mientras que las películas de A11 se desintegraron luego de las 24 horas de solubilización. El mayor entrecruzamiento alcanzado en las películas formadas con las proteínas desnaturalizadas podría ser también responsable de la menor solubilidad.

Pérez-Gago y Krochta (2001) observaron también una disminución significativa de la solubilidad de las películas formadas a partir de aislado proteico de suero de leche tratado térmicamente, que lo atribuyeron a la posible formación de enlaces intermoleculares de mayor energía en las proteínas desplegadas.

Tabla II.3.3 Solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua (WVP) y ángulo de contacto de películas obtenidas a partir de A11, A11-70 y A11-90

	Solubilidad en agua (%)	WVP * 10 ⁻¹¹ (g H ₂ O/Pa m s)	Ángulo de contacto (°)
Películas A11	79,9 ± 2,1 ^a	5,6 ± 0,5 ^a	69,5 ± 2,5 ^a
Películas A11-70	61,4 ± 1,7 ^b	8,5 ± 0,2 ^b	77,6 ± 5,8 ^a
Películas A11-90	57,2 ± 3,3 ^b	19,9 ± 5,2 ^c	67,0 ± 8,4 ^a

En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con p<0,05.

La WVP aumentó para ambas películas obtenidas a partir de los aislados tratados térmicamente respecto de la película control, siendo mayor el aumento con la severidad del tratamiento. Este comportamiento podría relacionarse con el aumento del espesor encontrado en las películas de A11-70 y A11-90, teniendo en cuenta que en general, en películas hidrofílicas, como las formadas por pectinas, amilosa, ésteres de celulosa, caseinato de sodio y proteínas de soja, la WVP aumenta con el espesor (McHugh y col., 1993; Ghorpade y col., 1995). Estos resultados evidenciarían que si existiera un aumento en el entrecruzamiento en las películas obtenidas a partir de los

aislados modificados, esto no estaría retardando el paso de las moléculas de agua a través de las películas.

Los resultados de WVP en películas proteicas obtenidas a partir de aislados tratados térmicamente encontrados en bibliografía muestran tendencias muy variables. Por ejemplo, Hoque y col. (2010) observaron un aumento de la WVP de películas obtenidas con gelatina de calamar tratadas con temperaturas hasta 70 °C. En cambio, en películas hechas a partir de proteínas de suero de leche tratadas térmicamente, no se vieron diferencias significativas en la WVP, lo que explican que podría ser debido a las diferencias en la composición aminoacídica de la fuente proteica, o a la red formada por la modificación sufrida por el tratamiento térmico (Pérez-Gago y col., 1999).

Se evidencia que pueden existir distintos factores influyendo en la variación de esta propiedad, por ejemplo, el espesor, la composición aminoacídica de las proteínas, el aumento de la hidrofobicidad por efecto de la agregación proteica, etc.

Con el objetivo de evaluar la hidrofobicidad superficial de las películas, se realizó la medida del ángulo de contacto de las películas obtenidas a partir de los aislados nativo y tratados térmicamente. Los ángulos de contacto no mostraron diferencias significativas entre las tres películas estudiadas. Como los ángulos de contacto de todas las películas fueron menores a 90°, se puede decir que las fuerzas adhesivas predominaron sobre las fuerzas cohesivas, con lo cual, el agua mojó la superficie de las películas. Por lo tanto, estas películas son hidrofílicas, ya que de acuerdo al balance hidrofóbico-hidrofílico de los componentes del material, el agua se verá más o menos atraída por la película (Woodward, 1999).

Choi y Han (2002) mostraron tener la misma mojabilidad, evaluada por la energía superficial crítica, en películas realizadas a partir de proteínas de arveja tratadas térmicamente, aunque su ángulo de contacto fue levemente diferente.

Si bien las proteínas inicialmente podían presentar hidrofobicidades superficiales diferentes, ya que como se mencionó anteriormente se encontraban mas agregadas, éstas proteínas formaron matrices con mayores permeabilidades al vapor de agua, pero con igual contenido de agua e hidrofobicidad superficial y menor solubilidad que las de las películas formadas a partir de proteínas nativas.

II.3.2.3.4 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas

Es evidente que las películas estudiadas en este capítulo presentan propiedades estructurales diferentes, ya que muestran variaciones en su funcionalidad. Con la intención de poder ahondar en esta relación estructura-función, se analizó el tipo de interacciones involucradas en la estabilización de las películas y la proporción de las mismas. Para esto se evaluó la solubilidad diferencial de las proteínas presentes en las películas obtenidas a partir de aislados nativo y tratados térmicamente, en distintos buffers con diferente actividad química (**figura II.3.6**).

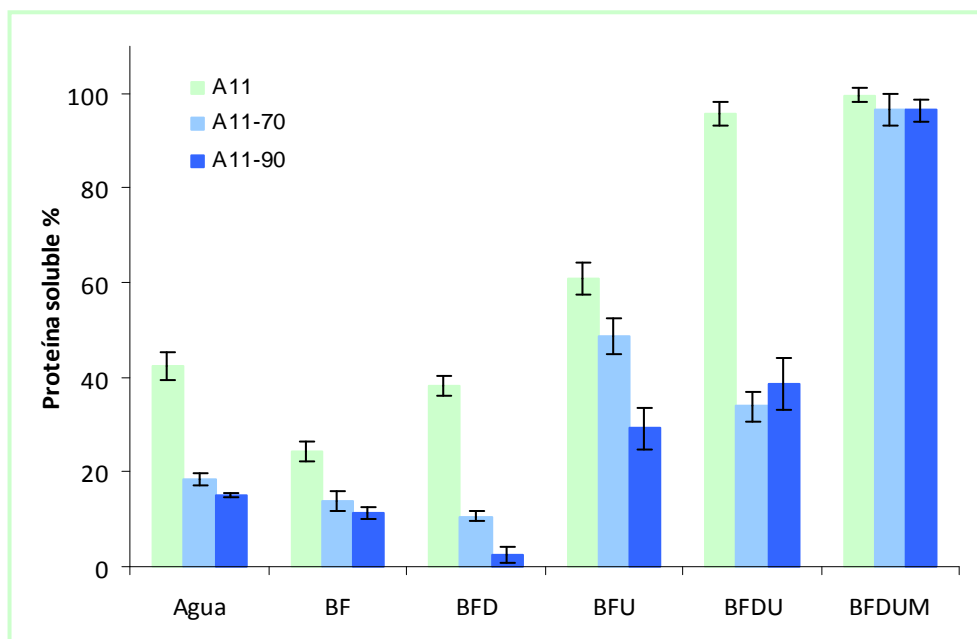


Figura II.3.6 Solubilidad diferencial de películas proteicas obtenidas a partir de A11, A11-70 y A11-90. Porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BFD), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BFDU), BFDU con 2-mercaptoetanol 2,5 % v/v (BFDUM), todos a pH 7,5.

Se observó que la solubilidad de las proteínas de la película formada por A11 en agua fue mayor que la de las proteínas de las películas obtenidas con aislados tratados térmicamente, indicando que en estas últimas hay menor cantidad de polipéptidos libres no asociados a la matriz. Las mismas diferencias fueron observadas al solubilizar a las películas en buffer fosfato, aunque para la película control la solubilidad fue inferior a la obtenida en agua, mostrando que las fuerzas electrostáticas cumplían un rol de menor importancia en la estabilización de esta película. Al usar el buffer fosfato con el detergente SDS, la solubilidad de las proteínas de la película de A11 fue 4 y 10

veces mayor que la de las películas formadas por A11-70 y A11-90, respectivamente, evidenciando una menor importancia de las interacciones hidrofóbicas en la estabilización de la matriz formada por proteínas tratadas térmicamente. Esto podría relacionarse con los resultados de WVP, o con la ruptura de interacciones hidrofóbicas que no fue suficiente para liberar proteínas y péptidos, que a la vez estarían estabilizadas por otro tipo de interacciones. El agregado de urea al buffer fosfato provocó un aumento significativo en la solubilidad de las proteínas para todas las películas obtenidas, en particular para las obtenidas con los aislados tratados, evidenciando la importancia de las uniones puente hidrógeno en la formación de las películas. Si bien al agregar simultáneamente SDS y urea al buffer fosfato, se logró solubilizar totalmente a las proteínas de la película formada con A11, las películas formadas por proteínas tratadas térmicamente mostraron solubilidades similares a las alcanzadas con el buffer que contenía solo urea. Finalmente, con el agregado de 2-ME, se logró solubilizar la totalidad de las proteínas que formaban las películas de A11-70 y A11-90, lo que evidencia la importancia de las uniones disulfuro en la estabilización de estas matrices proteicas. Cabe resaltar, como se mencionó anteriormente, que los puentes disulfuro podrían evitar la liberación de proteínas que estaban estabilizadas por otras interacciones que serían escindidas por los buffers antes utilizados, llevando en esos casos a un dosaje en defecto.

Este estudio logra demostrar el mayor entrecruzamiento existente en las matrices proteicas formadas a partir de los aislados tratados térmicamente, que fueron sugeridos anteriormente para explicar las propiedades funcionales encontradas. Esto se evidencia principalmente en la menor cantidad de péptidos libres, asociados débilmente a la matriz (solubles en agua), y al aporte de los puentes disulfuro y puente hidrógeno en la estabilización de las películas de A11-70 y A11-90.

Pérez-Gago y Krochta (2001) sugirieron que la pérdida de la estructura nativa tridimensional de las proteínas por el tratamiento térmico, expone los grupos sulfhidrilos, inicialmente en el interior de la molécula, permitiendo luego la formación de enlaces disulfuro intermoleculares, los cuales son responsables de la insolubilidad de la película en agua. La formación de enlaces disulfuro es favorecida en las proteínas desnaturalizadas, dado que la formación de estos enlaces requiere de dos grupos tioles que se unirán cuando se encuentren en la orientación adecuada, observándose mayor

velocidad de formación cuando las proteínas están desplegadas que cuando están en su estado nativo (Darby y Creighton, 1995). A su vez, se sabe que los enlaces disulfuro son los enlaces proteína-proteína mas fuertes, y que no son afectados por los cambios de temperatura (Bryant y McClements, 1998).

Las diferencias estructurales observadas explican las mejores propiedades mecánicas, mayor WVP y menor solubilidad en agua de las películas obtenidas con los aislados tratados térmicamente. Los enlaces disulfuro formados luego del desplegamiento ocasionado por el tratamiento térmico podrían ser los responsables de la mejora en las propiedades mecánicas y de la menor solubilidad en agua, como han mostrado otros autores (Choi y Han, 2002; Pérez-Gago y Krochta, 2001). Por su parte, la mayor cantidad de uniones hidrofóbicas estabilizando las películas nativas podrían contribuir a las mejores propiedades de barrera al vapor de agua de estas películas.

II.3.3 Conclusión

La utilización de proteínas de amaranto tratadas térmicamente como material de partida para la obtención de películas comestibles y/o biodegradables es una alternativa para modificar la funcionalidad de las películas formadas por proteínas nativas.

Las películas formadas con A11-70 y A11-90, cuyas proteínas se encontraban parcial o totalmente desnaturalizadas, mostraron mayor espesor y opacidad, y menor luminosidad que las películas control, como también mejor resistencia a la ruptura y menor solubilidad en agua, posiblemente debido al mayor entrecruzamiento de la red proteica, especialmente a través de puentes disulfuro. Estas películas también mostraron mayores WVP, debido en parte a su mayor espesor y a la menor importancia de las interacciones hidrofóbicas estabilizando la matriz proteica. Estas diferencias en el carácter hidrofílico-hidrofóbico de la matriz, no se reflejaron en la hidrofobicidad superficial de las películas, ya que todas las películas mostraron ángulos de contacto similares.

En síntesis, es posible mejorar las propiedades mecánicas y disminuir la solubilidad de las películas proteicas de amaranto a través de la utilización de proteínas tratadas térmicamente, en detrimento de sus propiedades barrera al vapor de agua. La importancia de esto será mayor o menor dependiendo de la aplicación buscada para estas películas.

II.4 Películas proteicas de amaranto formadas a partir de aislados tratados con alta presión hidrostática

La alta presión hidrostática es uno de los tratamientos no convencionales incorporados recientemente a la tecnología de alimentos, que constituye una opción adecuada para satisfacer la demanda de los consumidores de adquirir productos de alta calidad, mínimamente procesados, libres de aditivos y microbiológicamente seguros (Gould, 1995). Con esta tecnología, a diferencia de lo que ocurre con el procesamiento térmico, no se ven modificadas las pequeñas moléculas como aminoácidos, vitaminas, y componentes del *flavor*, pero si se modifican los enlaces no covalentes de las proteínas y otras macromoléculas (O'Reilly y col., 2001).

Al ser sometidas a presiones superiores a 200 MPa, la mayoría de las proteínas tienden a desplegarse, ocurriendo la agregación y/o disociación de las subunidades oligoméricas. Se ha reportado que la alta presión genera la ruptura de la estructura terciaria y cuaternaria de la mayoría de las proteínas globulares. Bajo ciertas condiciones, la disociación y/o desnaturalización inducida por alta presión puede ser reversible, a diferencia de la desnaturalización por temperatura que es irreversible debido a la ruptura de enlaces covalentes y/o a la agregación de las proteínas desplegadas (Silva y Weber, 1993; Balny y Masson, 1993; Tedford y col., 1999). Poco a poco se ha ido dilucidando el mecanismo por el cual las proteínas se desnaturalizan por alta presión, mostrando que ésta, causa cambios en la estructura de las proteínas mediante la ruptura de enlaces no covalentes (Tedford y col., 1999; Hayakawa y col., 1996) e induce la agregación debido a la formación de puentes disulfuro intermoleculares vía intercambio de uniones sulfhidrilo/disulfuro (Hayakawa y col., 1996; Galazka y col., 1999a y b).

Numerosos estudios han analizado el efecto que causan los tratamientos con alta presión sobre las propiedades estructurales de proteínas de distinto origen, por ejemplo sobre proteínas de soja, lupin, trigo, leche y albúmina de huevo (Bouaouina y col., 2006; Chapleau y de Lamballerie-Anton, 2003; Puppo y col., 2005; Van der Plancken y col., 2007; Zhang y col., 2005). Por otra parte se ha reportado que algunas de estas proteínas modificadas, presentaron una mejora notable en su funcionalidad,

por ejemplo, en su capacidad de formar y estabilizar espumas, emulsiones y en algunos casos geles (Bouaouina y col., 2006; Speroni y col., 2009; Puppo y col., 2005). Condés y col. (2011) reportaron que las proteínas de amaranto fueron muy sensibles al tratamiento con alta presión, observada por la desnaturalización encontrada a partir de 200 MPa. Esta desnaturalización fue acompañada por disociación y agregación proteica y una importante disminución en la solubilidad. Además se observó una sensibilidad mayor a la alta presión a menores concentraciones proteicas (1 %).

No hay en bibliografía información sobre la formación de películas a partir de proteínas de amaranto tratadas con alta presión ni sobre otra propiedad funcional de estas proteínas modificadas.

Teniendo en cuenta que las proteínas de amaranto no gelan a las concentraciones de las soluciones filmogénicas (5 % p/v), y que con la alta presión es posible manejar volúmenes considerables, esta modificación podría ser planteada como un tratamiento sobre la dispersión inicial formadora de película -sin necesidad de liofilizar luego del tratamiento- lo que sería una ventaja importante en el procesamiento.

El objetivo de este capítulo fue estudiar la formación de películas proteicas de amaranto a partir de aislados modificados por alta presión hidrostática.

II.4.1 Materiales y métodos

II.4.1.1 Materiales

Se utilizó el aislado proteico de amaranto A11, cuya preparación se describió en la sección II.2.1.3.

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de pureza analítica.

II.4.1.2 Tratamientos con alta presión hidrostática realizados sobre el aislado A11

Se preparó una dispersión de A11 al 5 % p/v en agua, agitando continuamente durante 1 hora a temperatura ambiente, la cual fue sometida a tres tratamientos que se diferenciaron en la intensidad de la presión empleada. Las dispersiones de los aislados fueron acondicionadas en bolsas de polietileno cerradas al vacío y los tratamientos se realizaron en un reactor de 2,0 L (modelo FPG 9400:922, Stansted Fluid Power Ltd, Reino Unido) equipado con un regulador de presión y temperatura. Se utilizó como medio de transmisión de la presión una mezcla de propilenglicol y agua (30:70). Las condiciones de alta presión utilizadas fueron 200, 400 y 600 \pm 7 MPa durante 5 minutos. La presión deseada se alcanzó a 6,5 MPa/s y se liberó a 20 MPa/s, y a 600 MPa se evidenció el máximo calentamiento adiabático, que alcanzó la temperatura de 33,5 °C. Los aislados resultantes se identificaron como **A11-200**, **A11-400** y **A11-600**, en referencia a las presiones de cada tratamiento, 200, 400 y 600 MPa, respectivamente.

II.4.1.3 Caracterización de los aislados proteicos nativos y tratados con alta presión

Los aislados nativos y modificados por alta presión fueron caracterizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante con o sin 2-mercaptoetanol, calorimetría diferencial de barrido y solubilidad de proteínas, como se describió en la sección II.2.1.4. Para la calorimetría diferencial de barrido, se liofilizaron previamente las dispersiones tratadas, para poder preparar dispersiones mas concentradas, de acuerdo a lo requerido por la técnica. Además se realizó la caracterización descrita a continuación.

II.4.1.3.1 Electroforesis en geles de tricina-poliacrilamida

La composición polipeptídica de los aislados nativos y modificados se analizó también por electroforesis en geles de tricina y poliácridamida con dodecilsulfato de sodio (Tricina-SDS-PAGE), siguiendo el método de Schagger y von Jagow (1987) con algunas modificaciones. Esta técnica se utilizó para evidenciar la presencia de polipéptidos de bajo peso molecular. Se prepararon geles de poliácridamida al 16 % p/v, 12 % p/v y 4 % p/v (separador, spacer y apilador, respectivamente) utilizando un sistema de mini-placas (Bio-Rad Mini-Protean II Model). Se emplearon los siguientes sistemas buffer: i) buffer gel de separación: tris-HCl 1M, SDS 0,1 % p/v a pH 8,45; ii) buffer de corrida anódico: tris-HCl 0,1M, a pH 8,9, y buffer de corrida catódico: tris-HCl 0,1M, tricina 0,1M, SDS 0,1 % p/v, a pH 8,25; y iii) buffer de muestra: tris-HCl 0,15M, SDS 12 % p/v, glicerol 30 % p/v, Coomassie blue G-250 (Serva) 0,05 % p/v a pH 7,0.

Para analizar las muestras en condiciones reductoras, se le agregó 2-mercaptoetanol al 5 % v/v al buffer de muestra. Todas las muestras, con o sin mercaptoetanol, se calentaron a 37 °C durante 15 minutos y luego se centrifugaron 15 minutos a 9200 xg a temperatura ambiente (centrífuga Labnet, Digital Spectrafuge 24D, Estados Unidos). En cada calle se sembró un volumen de sobrenadante correspondiente a 20-30 µg de proteínas totales.

Para estimar la masa molecular de las proteínas, se utilizó una mezcla de patrones de bajo peso molecular (Pharmacia, Amersham, Inglaterra), conteniendo isomerasa triosafosfato (26,6 kDa), mioglobina (16,9 kDa), α -lactoalbúmina (14,4 kDa), aprotinina (6,5 kDa), β -insulina oxidada (3,5 kDa) y bacitracina (1,4 kDa).

Los geles obtenidos se fijaron con una solución de agua, metanol, ácido acético (40:50:10) durante 1 hora y luego se colorearon (12 horas) con una solución de agua, metanol y ácido acético (5:5:2) conteniendo 0,2 % p/v de Coomasie Brilliant Blue R-250 (Anedra, Argentina). Posteriormente se decoloraron con una mezcla de agua, etanol y ácido acético (65:25:10). Las imágenes de los geles fueron adquiridas con un scanner HP Scanjet G2710 (Hewlett-Packard).

II.4.1.3.2 Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC): Cromatografía de exclusión molecular

Los aislados nativos y modificados fueron caracterizados por cromatografía de exclusión molecular. Las muestras previamente liofilizadas fueron resuspendidas en un buffer NaH_2PO_4 0,05M, NaCl 0,15M a pH 8,0, en una concentración de 5 mg/mL durante 1 hora a 25 °C, y luego centrifugadas a 9200 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente (centrífuga Labnet, Digital Spectrafuge 24D, Estados Unidos). El sobrenadante se filtró (0,22 μm de poro) y se inyectó en el equipo de FPLC (Farmacia LKB, Suecia) utilizando el reservorio correspondiente al volumen sembrado. Las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente utilizando una columna Sephacryl S-300 (Amersham Biosciences, Reino Unido). Las corridas se desarrollaron en el mismo buffer en que se solubilizó la muestra, el cual se filtró previamente a través de un filtro de celulosa de 0,22 μm de poro. Para equilibrar la columna se pasó una cantidad del buffer correspondiente equivalente a 2 volúmenes de la misma (50 mL). La velocidad de flujo se mantuvo en 0,5 mL/minuto mediante una bomba Pharmacia LKB P-500 y la presión promedio de las cromatografías fue de 0,15 MPa.

La columna se calibró con azul dextrano (para el volumen muerto, V_0) y las siguientes proteínas de masa molecular conocida: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), quimotripsinógeno A (25 kDa) y ribonucleasa A (13,7 kDa) (Amersham Biosciences, Reino Unido). El buffer de dilución y las condiciones de corrida para los patrones fueron idénticas a las muestras, preparando diluciones al 4 mg/mL. Luego se obtuvo una curva de calibración relacionando el logaritmo de la masa molecular (en kDa) con el coeficiente de distribución (K_{AV}) (**Ecuación II.4.1**), siendo K_{AV} :

$$K_{AV} = (V_e - V_0) / (V_T - V_0) \quad \text{Ecuación II.4.1}$$

donde V_e corresponde al volumen de elución del pico de interés (mL), V_T es el volumen geométrico de la columna (126 mL) y V_0 es el volumen muerto (determinado con azul dextrano).

La detección se realizó en modo continuo mediante la medida de los valores de absorbancia a 280 nm a la salida de la columna utilizando un monitor UV-1 (Pharmacia LKB, Suecia). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

II.4.1.3.3 Determinación de sulfhidrilos libres

Los sulfhidrilos libres presentes en el aislado nativo y en los aislados modificados con alta presión se cuantificaron por el método de Petruccelli y Añón (1994), disolviendo 10 mg/mL del aislado proteico nativo o modificado por alta presión en el siguiente buffer: tris 0,086M, glicina 0,09M, EDTA 0,004M y urea 8M a pH 8,0. Se tomaron alícuotas de 0,5 mL a las que se les adicionó 20 µl de reactivo de Ellman (4 mg de ácido 5-5' ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB) en 1 mL de metanol). La absorbancia a 412 nm del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (NTB) producido en la reacción, se determinó a los 30 minutos ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) utilizando un espectrofotómetro Beckman DU650 (Alemania).

La cantidad de sulfhidrilos libres se calculó según la **ecuación II.4.2**:

$$SH_L = 75,53 \times (DO_1 - DO_2 - DO_3) / c \quad \text{Ecuación II.4.2}$$

donde: SH_L es la concentración de sulfhidrilos libres en la muestra ($\mu\text{moles SH/g}$ proteína soluble); DO_1 es la absorbancia a 412 nm de la muestra a los 30 minutos de agregado el reactivo de Ellman; DO_2 es la absorbancia a 412 nm de la muestra sin el reactivo de Ellman; DO_3 es la absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos (sin agregado de muestra) a los 30 minutos de agregado el reactivo de Ellman; y c es la concentración de proteínas en la muestra (mg/mL), determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

II.4.1.3.4 Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial de los aislados nativos y modificados se determinó según el método de Kato y Nakai (1980), utilizando como sonda fluorescente 8-anilino-1-naftalensulfonato de amonio (ANS, Aldrich Chemical Co.) disuelto en agua (8 mM), cuya fluorescencia se modifica al encontrarse en un ambiente hidrofóbico.

Se prepararon dispersiones 3,0 mg/mL de los aislados en agua, se agitaron una hora a temperatura ambiente, se centrifugaron a 11000 xg durante 15 minutos a 20 °C (centrífuga Labnet, Digital Spectrafuge 24D, Estados Unidos) y se realizaron diluciones para lograr concentraciones de proteína de 0,1 mg/mL en agua.

Se determinó la cantidad de sonda necesaria para producir la saturación de la muestra. Para ello, a la muestra inicial se le adicionaron distintas cantidades de ANS hasta que no se produjeran cambios en la intensidad de fluorescencia. La cantidad de sonda necesaria para la saturación fue 25 µl de ANS 8 mM para 3 mL de muestra. Se determinó la longitud de onda de máxima emisión de un aislado haciendo un barrido entre 395-600 nm utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Aminco-Bowman SPF 100 (Sylver Spring, Maryland, Estados Unidos). La longitud de onda determinada fue 475 nm.

A cada dilución se le midió la intensidad de fluorescencia sin y con agregado de 25 µl ANS (8 mM en agua). Se calcularon las diferencias en la intensidad de fluorescencia y se graficaron versus la concentración de proteínas en cada dilución. El valor de la pendiente en la zona inicial del gráfico intensidad de fluorescencia versus concentración de proteínas, calculado por regresión lineal con el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos), fue usado como índice de hidrofobicidad superficial (H_0) (**ecuación II.4.3**).

$$\Delta IF = H_0 \times P + a \quad \text{Ecuación II.4.3}$$

donde: ΔIF es la diferencia en intensidad de fluorescencia entre la dilución de la muestra sin y con agregado de ANS (UA); P es la concentración de proteínas en cada dilución (mg/mL, determinada por Bradford); H_0 es la hidrofobicidad superficial (UA mL/mg) y a es la ordenada al origen resultante del ajuste matemático. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

II.4.1.4 Obtención de películas proteicas de amaranto

Las películas proteicas se obtuvieron por *casting* a partir de los aislados proteicos nativos y modificados por alta presión, usando el mismo protocolo descrito en la sección II.2.1.5. Se trabajó con dispersiones al 5 % p/v de aislados nativo y tratados con alta presión (sección II.4.1.2), a las que se les agregó 25 % p/p de glicerol respecto de la

cantidad de aislado (usado como plastificante) y se ajustó el pH a 10,5. Posteriormente, 10 ml de las dispersiones formadoras de películas fueron colocados en placas de Petri de poliestireno (64 cm²) y se secaron a 60 °C durante 3 horas. Las películas resultantes se acondicionaron 48 horas a 20 °C y 58 % de humedad relativa previo a su caracterización.

II.4.1.5 Caracterización de las películas proteicas

Las películas proteicas obtenidas a partir del aislado nativo y los aislados modificados por alta presión fueron caracterizadas mediante la determinación del contenido de agua, espesor, opacidad, color, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, propiedades mecánicas y solubilidad diferencial de proteínas, como se describió en la sección II.2.1.6, y el ángulo de contacto, como se describió en la sección II.3.1.5.1.

II.4.1.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el Test de Fisher de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0.05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

II.4.2 Resultados y discusión

II.4.2.1 Modificación estructural de las proteínas de amaranto por tratamiento con alta presión hidrostática

II.4.2.1.1 Estabilidad térmica

Los termogramas obtenidos por DSC correspondientes a los aislados tratados con distinta intensidad de alta presión -A11-200, A11-400 y A11-600- se muestran en la **figura II.4.1**, junto con el correspondiente al A11. En la **Tabla II.4.1** se presentan los calores y temperaturas de desnaturalización de las endotermas presentes en esos termogramas.

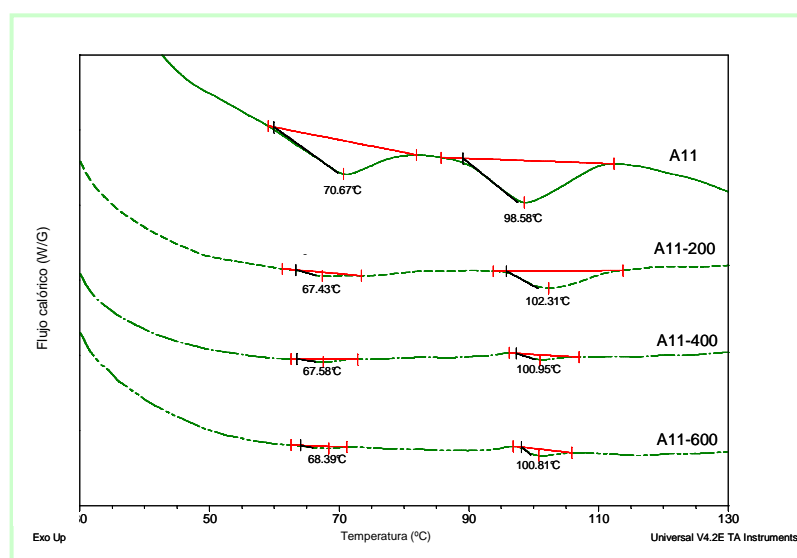


Figura II.4.1 Calorimetría diferencial de barrido del aislado A11, y los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600

La fracción de proteínas de menor estabilidad térmica (perteneciente a una fracción de glutelinas y a una fracción de globulinas 7S) mostró una gran sensibilidad al tratamiento con alta presión, dado que fue desnaturalizada casi completamente a partir del tratamiento a 200 MPa, conservándose solo el 5 % de la estructura nativa de A11 (**Tabla II.4.1**). En cambio, la fracción de mayor estabilidad térmica (globulinas 11S y P y glutelinas) mantuvo un 42 % de estructura nativa después del tratamiento a 200 MPa. A presiones por encima de 200 MPa ambas fracciones se desnaturalizaron casi totalmente, solo conservando un 6 % de su estructura nativa. Speroni y col. (2010) observaron el efecto opuesto al tratar proteínas de soja con alta presión, ya que

observaron que la β -conglucina (la fracción menos termoestable), conservó alrededor del 30 % de su estructura nativa luego del tratamiento a 600 MPa, mientras que la glicina, de mayor estabilidad térmica, fue completamente desnaturada a 400 MPa. Este comportamiento diferente entre las proteínas de soja y de amaranto puede atribuirse a sus diferencias estructurales en términos de flexibilidad molecular y compresibilidad. Estos resultados sugerirían que las proteínas de amaranto serían más sensibles al tratamiento con alta presión que otras proteínas de almacenamiento, ya que se desnaturan casi completamente a 400 MPa.

Tabla II.4.1 Calor de desnaturalización (ΔH_d) y temperatura de desnaturalización (T_d) del aislado A11, y los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600

	ΔH_d (J/g proteína)		T_d (°C)	
	Endoterma 1	Endoterma 2	Endoterma 1	Endoterma 2
A11	4,5 ± 0,3 ^a	6,2 ± 0,6 ^a	70,7 ± 0,1 ^a	98,6 ± 0,1 ^a
A11-200	0,23 ± 0,06 ^b	2,6 ± 0,6 ^b	67,1 ± 0,5 ^b	102,2 ± 0,2 ^b
A11-400	0,14 ± 0,02 ^b	0,4 ± 0,1 ^c	67,5 ± 0,1 ^b	100,9 ± 0,1 ^b
A11-600	0,13 ± 0,01 ^b	0,35 ± 0,01 ^c	68,2 ± 0,2 ^b	100,8 ± 0,1 ^b

En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

A su vez, se observó una disminución de las temperaturas de desnaturalización de las fracciones de menor estabilidad térmica y un aumento de la misma para las especies de mayor estabilidad térmica luego de ser sometidas a los tratamientos con alta presión (**Tabla II.4.1**).

Arntfield y col. (1986) propusieron que la T_d aumenta si se logra una estructura más compacta estabilizada por un gran número de uniones hidrofóbicas, y disminuye si el tratamiento provoca disociación proteica. Teniendo en cuenta esto, los resultados observados sugieren que luego del tratamiento con alta presión, las estructuras resistentes de glutelinas y globulinas 7S podrían haber sido disociadas, y las estructuras remanentes de las globulinas 11S y globulina-P habrían sido compactadas o estabilizadas por uniones hidrofóbicas. Esto concuerda con lo mostrado por Wang y col. (2008) y Speroni y col. (2010) con proteínas de soja, ya que la β -conglucina (7S)

disminuyó su estabilidad térmica y la glicinina (11S) la aumentó luego del tratamiento con alta presión. Los distintos comportamientos observados dependen de la tendencia propia de cada fracción a agregarse o disociarse luego del desplegamiento.

II.4.2.1.2 Composición polipeptídica

La composición polipeptídica de las proteínas presentes en los aislados tratados con alta presión, se analizó mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras (**figura II.4.2, panel A**); y electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida-tricina, con el fin de evidenciar los polipéptidos de masa molecular menor a 20 KDa (**figura II.4.2, panel B**). También se evaluó la composición polipeptídica y la modificación por alta presión mediante cromatografía de exclusión molecular (**figura II.4.3**).

En el perfil desnaturizante en poliacrilamida, se presentan los aislados A11, A11-200, A11-400 y A11-600 en las calles 1, 2, 3 y 4 del panel A de la **figura II.4.2**, respectivamente. Para el aislado A11 se observan las bandas típicas detectadas en condiciones desnaturizantes, como se describieron en la sección II.2.2.2. El tratamiento a 200 MPa provocó la desaparición de las bandas correspondientes a los polipéptidos de 45 KDa de la fracción 7S, las subunidades AB y el polipéptido P-54 de globulinas, además de la disminución de la intensidad de las bandas correspondientes al polipéptido de 67 KDa de 7S y a los polipéptidos A y B. Éstas últimas especies junto con los agregados de alta masa molecular prácticamente no se visualizaron o sufrieron un marcado descenso en la intensidad de sus bandas en las muestras tratadas con presiones de mayor intensidad (400 o 600 MPa).

Al observar la electroforesis en condiciones desnaturizantes reductoras, no se vieron diferencias significativas en los perfiles polipeptídicos de las muestras tratadas con alta presión (**figura II.4.2, panel A**, calle 5, 6, 7 y 8). Tampoco se observaron diferencias en la electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida-tricina (**figura II.4.2, panel B**, calle 1, 2, 3 y 4), con lo cual puede decirse que por debajo de 20 KDa, los perfiles polipeptídicos no se vieron modificados por el tratamiento con alta presión.

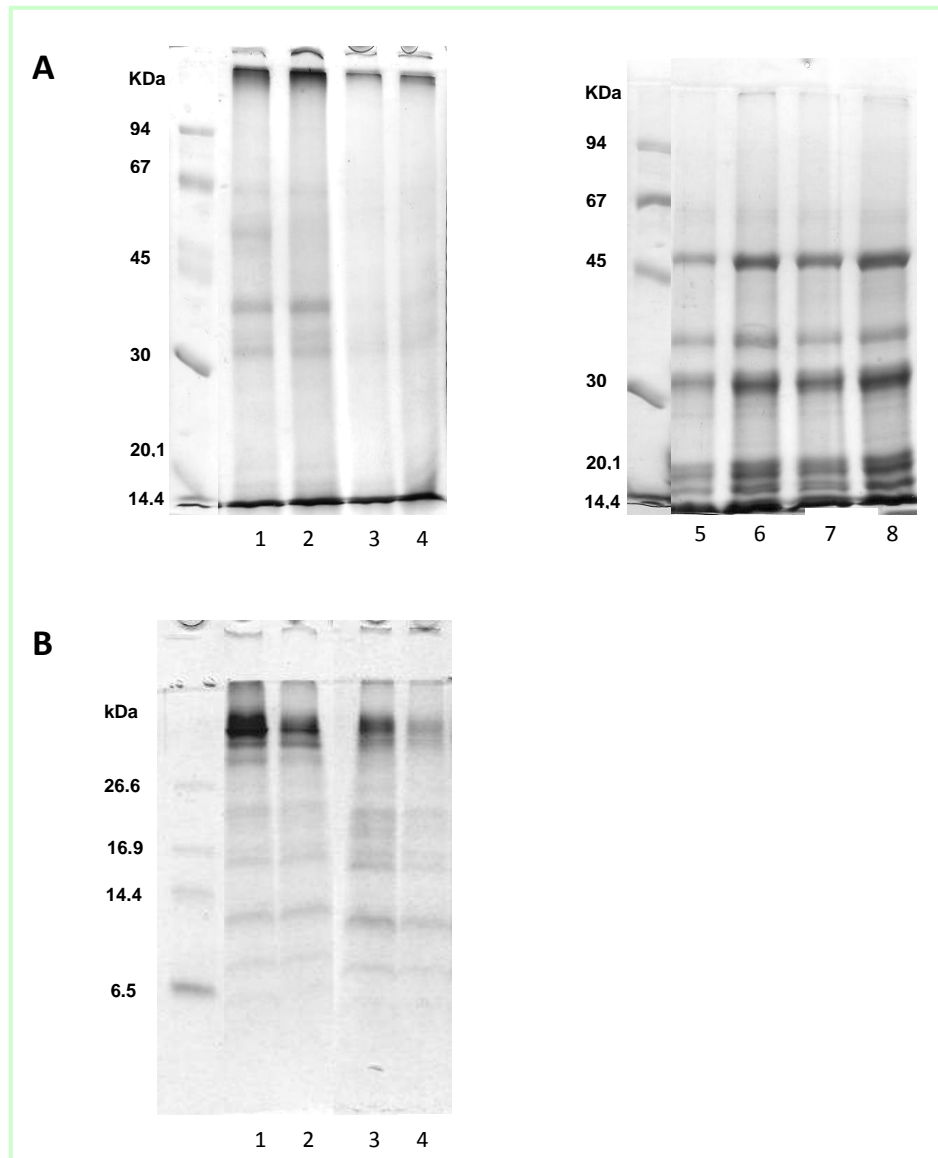


Figura II.4.2 Perfil de electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida de A11, A11-200, A11-400 y A11-600 (panel A, calle 1, 2, 3 y 4), desnaturalizante reductora de A11, A11-200, A11-400 y A11-600 (panel A, calle 5, 6, 7 y 8) y desnaturalizante (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida-tricina de A11, A11-200, A11-400 y A11-600 (panel B, calle 1, 2, 3 y 4)

Estos resultados sugieren que el tratamiento con alta presión además de favorecer la disociación, también favorece la formación de agregados que no son solubles en el buffer de electroforesis, y que estos agregados tienen diferente composición de acuerdo a la intensidad del tratamiento. Pensando que la desnaturalización por alta presión es inducida por el llenado de las cavidades internas de la proteína con agua, se puede sugerir que los polipéptidos de baja masa molecular no pudieron sufrir la compresión o no poseen estas cavidades donde el agua pueda entrar.

Los cromatogramas de exclusión molecular del aislado control y tratados con alta presión se muestran en la **figura II.4.3**. El cromatograma del aislado A11, mostró un pico de alta masa molecular (669 kDa, $V_e = 50$ mL), otro pico de mayor absorbancia con un máximo correspondiente aproximadamente a 250 kDa ($V_e = 68,7$ mL), y un tercer pico de 12 kDa ($V_e = 97$ mL), el cual comprendería las especies observadas en la electroforesis ya descrita. A su vez, se observaron picos más definidos con volúmenes de elución mayores a 100 mL, a los cuales no se les pudo asignar una masa molecular debido a que el volumen de elución está por fuera del rango de calibración, solo se puede decir que corresponden a especies de masa molecular menor a 9 kDa. Es importante recalcar que la mayor absorbancia de estos picos puede ser debida al hecho de que estas especies de baja masa molecular podrían estar enriquecidas en compuestos aromáticos, responsables de la absorbancia a 280 nm, por lo que la absorbancia observada podría no ser directamente proporcional a la concentración de las especies proteicas.

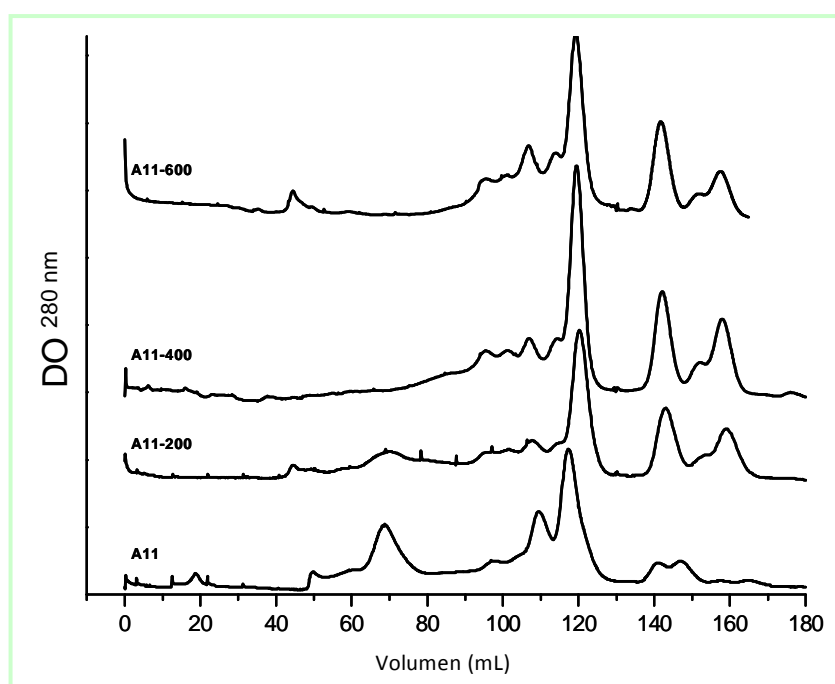


Figura II.4.3 Cromatografía de exclusión molecular del aislado A11, y los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600

Los cromatogramas correspondientes a las muestras tratadas con alta presión mostraron una distribución diferente de las especies polipeptídicas, respecto del control. Para A11-400 y A11-600 se observó la desaparición casi total de los picos entre

50 y 85 mL, junto a la aparición de nuevos picos y el cambio hacia mayores volúmenes de elución de los picos ya descritos. Estos resultados podrían deberse a que la desnaturalización por alta presión provocó disociación y posible formación de agregados más grandes que no pudieron pasar por el filtro de 0,22 μm , por lo que no se detectan en el cromatograma. Las diferencias observadas en las especies de baja masa molecular que se muestran con ésta técnica, pero que no se evidenciaron con la electroforesis, sugieren que en el aislado A11 existirían agregados formados por polipéptidos de baja masa molecular. Se observó también un aumento del área de los picos de mayor volumen de elución, lo cual puede deberse a que los agregados disociados en presencia de SDS, estaban estabilizados por interacciones no covalentes, como también parcialmente disociados por el tratamiento con alta presión. Además, se conoce que este tratamiento comprime las moléculas, cambiándole su radio hidrodinámico, lo cual explicaría el cambio del volumen de elución de alguno de los picos. Cuando observamos la muestra tratada a 200 MPa, se detecta la conservación parcial de los agregados de volumen de elución menor a 85 mL y el aumento de la cantidad de polipéptidos de menor masa molecular, lo cual indica que éste tratamiento no fue tan drástico como a presiones mayores a 400 MPa.

II.4.2.1.3 Solubilidad

En la **figura II.4.4**, se muestra la solubilidad en agua del aislado A11 y los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600.

La solubilidad de las proteínas disminuyó sensiblemente con los tratamientos aplicados, siendo esta disminución progresiva al aumentar la intensidad de la presión aplicada. Mientras que para el tratamiento a 200 MPa, la solubilidad disminuyó aproximadamente 38 %, para el realizado a 600 MPa, la disminución fue del 75 %. Este comportamiento podría deberse a la formación de agregados insolubles, sugerido en el análisis realizado por FPLC, en el que se hipotetizó la posibilidad de que estos agregados insolubles no hubiesen pasado por el filtro utilizado.

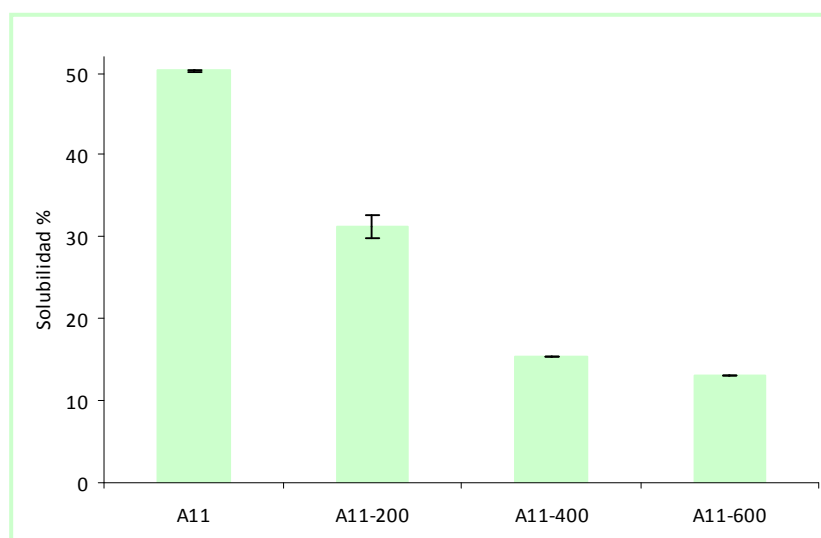


Figura II.4.4 Solubilidad de proteínas del aislado A11, y los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600 en agua

II.4.2.1.4 Sulfhidrilos libres

En la **figura II.4.5** se muestra el contenido de sulfhidrilos libres detectados en el aislado A11, y los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600.

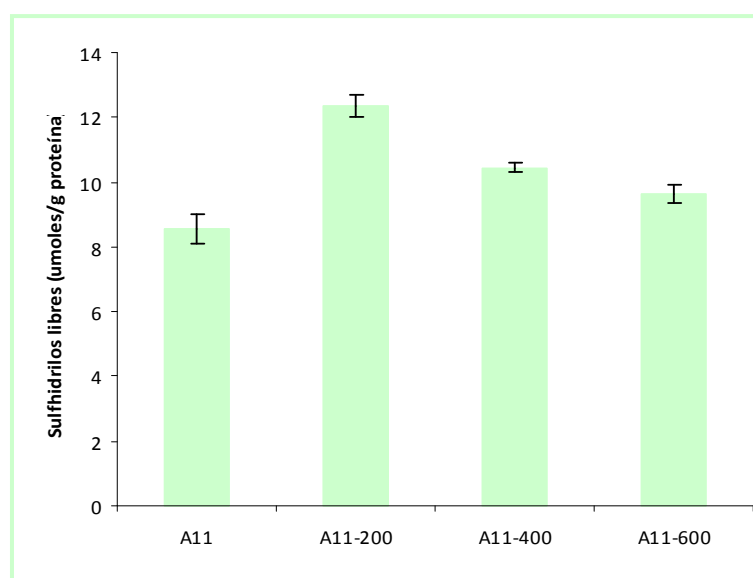


Figura II.4.5 Sulfhidrilos libres en el aislado A11, y en los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600

Se observa un incremento significativo del contenido de sulfhidrilos libres con el aumento de la intensidad del tratamiento (44 %, 22 % y 13 % para A11-200, A11-400 y A11-600, respectivamente). Esto podría deberse a la exposición de grupos sulfhidrilos localizados en el interior de la molécula, y/o la ruptura de enlaces disulfuro en las

especies solubles, como resultado del tratamiento con alta presión. El mayor contenido de sulfhidrilos libres fue detectado en A11-200, lo que sugiere que el tratamiento a 200 MPa podría haber generado la exposición de grupos sulfhidrilos y/o la ruptura de enlaces disulfuro, pero no en la extensión necesaria para que esos grupos interaccionen formando nuevos enlaces disulfuro. En cambio, cuando el tratamiento fue más drástico, posiblemente además de lo ocurrido con el tratamiento a 200 MPa, puede haber ocurrido la formación de nuevos enlaces disulfuro. Este intercambio sería el responsable de la disminución del contenido de sulfhidrilos libres observada para las muestras tratadas a 400 y 600 MPa respecto de las tratadas a 200 MPa, pero manteniéndose siempre superior al valor del control sin modificar.

Es probable que parte de los puentes disulfuro formados estén involucrados en la estabilización de los agregados insolubles, evidenciados por cromatografía y responsables de la disminución de la solubilidad en agua observada.

II.4.2.1.5 Hidrofobicidad superficial

Se determinó la hidrofobicidad superficial del aislado A11, y los aislados tratados con alta presión -A11-200, A11-400 y A11-600- (figura II.4.6).

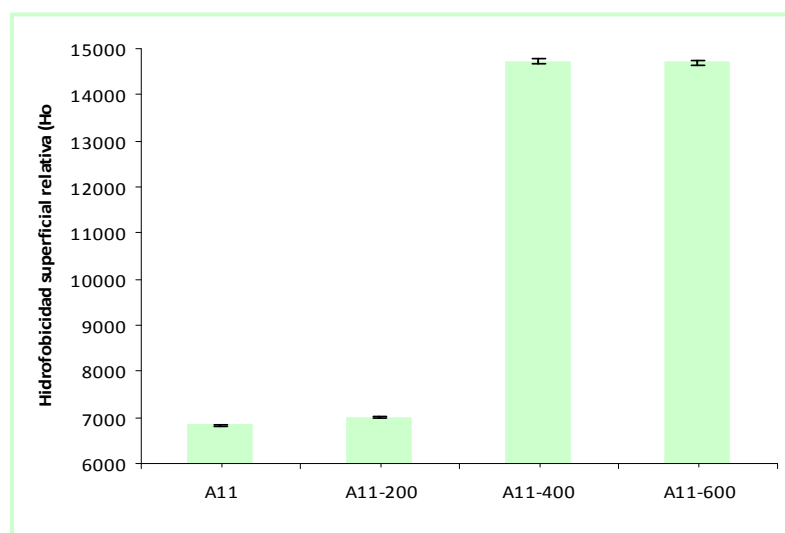


Figura II.4.6 Hidrofobicidad superficial relativa del aislado A11, y los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600

Se pudo observar que recién a partir del tratamiento a 400 MPa, la hidrofobicidad superficial aumentó significativamente respecto del aislado sin tratar. Es evidente que

estas proteínas al desnaturalizarse casi completamente, según se observó por DSC, sufren un desplegamiento tal de sus cadenas exponiendo sus grupos hidrofóbicos. Si bien a 600 MPa pueden haber estado más favorecidos los fenómenos simultáneos de disociación y agregación, la hidrofobicidad superficial se mantuvo prácticamente constante. Esto coincide con que las proteínas más termoestables, estarían estabilizadas por un mayor número de interacciones hidrofóbicas, como propuso Arntfield y col. (1986).

II.4.2.2 Obtención y caracterización de películas proteicas de amaranto obtenidas a partir de aislados modificados por alta presión hidrostática

II.4.2.2.1 Apariencia

Todas las películas obtenidas a partir de los aislados tratados con alta presión fueron homogéneas y se desmoldaron con facilidad.

El contenido de agua y el espesor de las películas no sufrieron modificaciones por el tratamiento con alta presión efectuado sobre los aislados (**Tabla II.4.2**), a diferencia de lo observado con los aislados tratados térmicamente (sección II.3.2.3). Si bien las proteínas al tratarlas con alta presión sufrieron desnaturalización con disociación y/o agregación, también podría haber ocurrido la compresión de las moléculas con la correspondiente disminución del volumen libre, lo que podría influir en el espesor de las películas resultantes.

Tabla II.4.2 Propiedades físicas y apariencia de las películas obtenidas a partir del aislado A11, y los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600

Películas		A11	A11-200	A11-400	A11-600
Espesor (μm)		$52,3 \pm 13,6^a$	$53,2 \pm 9,8^a$	$58,4 \pm 9,0^a$	$54,7 \pm 9,2^a$
Contenido de agua (% p/p)		$18,9 \pm 0,3^a$	$18,5 \pm 0,3^a$	$19,2 \pm 0,4^a$	$20,9 \pm 1,9^a$
Parámetros de color Hunter Lab	a	$-0,8 \pm 0,1^a$	$-1,3 \pm 0,1^a$	$-1,1 \pm 0,2^a$	$-1,2 \pm 0,1^a$
	b	$23,4 \pm 1,3^a$	$25,7 \pm 1,3^a$	$24,5 \pm 1,7^a$	$23,5 \pm 0,8^a$
	L	$82,6 \pm 0,7^a$	$82,6 \pm 1,1^a$	$82,7 \pm 1,2^a$	$83,7 \pm 0,7^a$
	ΔE	$26,2 \pm 1,5^a$	$28,2 \pm 1,7^a$	$27,1 \pm 2,1^a$	$25,7 \pm 1,0^a$
Opacidad (uA/mm)		$1,1 \pm 0,2^a$	$1,4 \pm 0,1^{a,b}$	$1,7 \pm 0,1^b$	$2,2 \pm 0,2^b$

En filas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

Se observó además que ninguno de los parámetros de color fue modificado (**Tabla II.4.2**) pero la opacidad de las películas aumentó significativamente con la intensidad del tratamiento.

La evaluación de estos parámetros, sugieren la diferente funcionalidad y/o aplicación que tendrán las películas formadas por proteínas de amaranto desnaturalizadas térmicamente o con alta presión, ya que las correspondientes a proteínas tratadas térmicamente, como se observó en el capítulo anterior, presentaron cambios en el espesor, la opacidad, y los parámetros de color.

II.4.2.2.2 Propiedades mecánicas

En la **figura II.4.7** se muestran las propiedades mecánicas en tracción de las películas obtenidas a partir de los aislados A11, A11-200, A11-400 y A11-600.

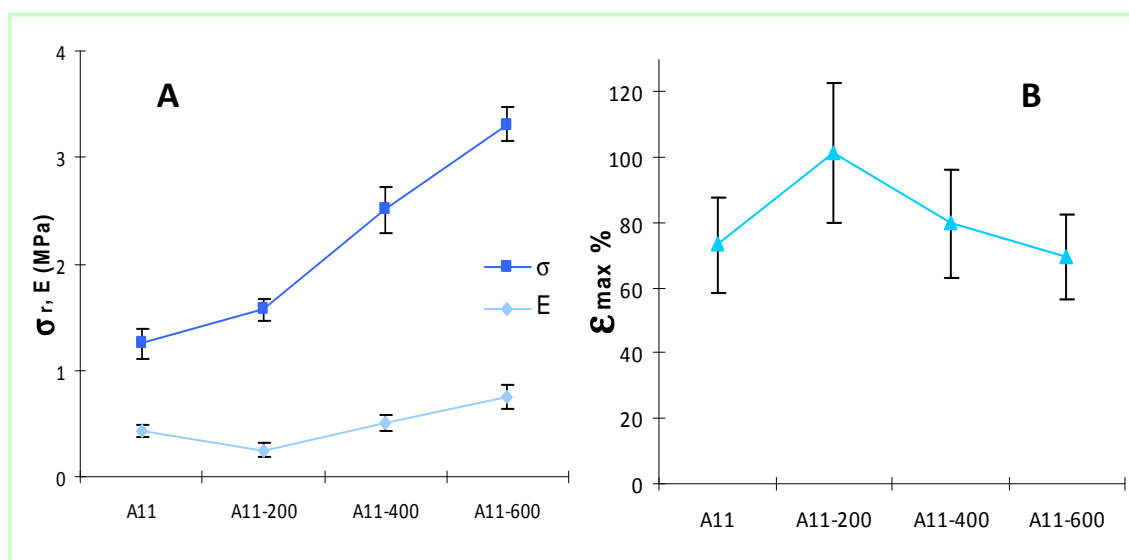


Figura II.4.7 A) Tensión a la ruptura (σ_r) y módulo elástico (E) y B) deformación a la ruptura (ϵ_{max}) de las películas formadas a partir del aislado A11, y los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600, medidas en tracción

Las películas formadas con aislados tratados con alta presión mostraron mejores propiedades mecánicas que las de los aislados sin tratar. La resistencia a la ruptura se incrementó progresivamente con el aumento de la intensidad de la presión empleada, mejorando en un 26, 101 y 165 % respecto del control para las películas de A11-200, A11-400 y A11-600, respectivamente. El módulo elástico también aumentó, pero recién a partir del tratamiento a 400 MPa, llegando a mejorar en un 74 % para las

películas formadas con proteínas tratadas a 600 MPa. Lo que resulta muy interesante es que las mejoras observadas en estas propiedades, ocurrieron sin provocar descensos en la elongación de las películas ya que no se observaron diferencias significativas en la deformación a la ruptura entre las películas tratadas con alta presión y el control. Al aumentar el grado de desnaturalización de las proteínas, especialmente con presiones superiores a los 400 MPa, se favorece la interacción entre las cadenas durante la formación de las películas, lo que podría generar un mayor entrecruzamiento que conduce a matrices proteicas más resistentes sin ser menos deformables.

Un comportamiento similar se ha evidenciado en la formación de geles de tofu obtenidos a partir de leche de soja tratada con alta presión, donde se observó un aumento de la fuerza del gel cuanto mas severo había sido el tratamiento, que lo atribuyeron a la formación de un red más entrecruzada (Zhang y col., 2005).

II.4.2.2.3 Susceptibilidad al agua

En la **Tabla II.4.3** se muestran los resultados de la solubilidad en agua, la permeabilidad al vapor de agua (WVP) y el ángulo de contacto de las películas obtenidas a partir de los aislados A11, A11-200, A11-400 y A11-600.

Tabla II.4.3 Solubilidad en agua, permeabilidad al vapor de agua (WVP) y ángulo de contacto de películas obtenidas a partir del aislado A11, y los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600

	Solubilidad en agua (%)	WVP * 10 ⁻¹¹ (g H ₂ O/Pa m s)	Ángulo de contacto (°)
Películas A11	79,9 ± 2,1 ^a	5,6 ± 0,5 ^a	69,4 ± 2,5 ^a
Películas A11-200	56,4 ± 5,5 ^b	4,8 ± 0,4 ^{a,b}	70,2 ± 6,7 ^a
Películas A11-400	46,1 ± 0,5 ^c	4,6 ± 0,1 ^b	58,8 ± 3,3 ^b
Películas A11-600	46,1 ± 2,5 ^c	3,2 ± 0,6 ^c	54,9 ± 4,9 ^b

En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con p<0,05.

La solubilidad en agua de las películas disminuyó al aumentar la intensidad de la presión a la que fueron sometidos inicialmente los aislados proteicos, no observándose diferencias significativas en las películas de A11-400 y A11-600. Para las películas

formadas con el aislado A11-200, el descenso de la solubilidad fue aproximadamente del 29 %, mientras que para las correspondientes a los otros aislados modificados fue del 42 %. Esta disminución de la solubilidad, podría deberse a que posiblemente haya habido mayor entrecruzamiento, por efecto de la alta presión, responsable también de las mejoras en las propiedades mecánicas. También en parte, estas películas resultaron de la interacción de proteínas que eran más hidrofóbicas, lo que podría influir en el comportamiento observado.

La permeabilidad al vapor de agua se modificó recién con el tratamiento con alta presión a partir de 400 MPa, siendo mayor el descenso con la severidad del tratamiento. Esto podría deberse a la mayor hidrofobicidad de las proteínas tratadas con mayor presión, que llevarían a una disminución más notoria de la WVP. A su vez, podría sugerirse que como estas proteínas estaban más desplegadas, podrían haber formado una red proteica mas entrecruzada, que retardarían el paso de las moléculas de vapor de agua (a diferencia de lo observado con el tratamiento térmico).

El ángulo de contacto medido al depositar una gota de agua sobre las películas preparadas a partir del aislado A11-200 no mostró diferencias significativas con la película control. En cambio, las películas formadas a partir de A11-400 y A11-600 mostraron un menor ángulo de contacto, que indicaría una superficie más hidrofílica, a pesar del comportamiento antes reportado para las otras propiedades. Una posibilidad de la disminución de la hidrofobicidad superficial de las películas podría ser que la mayor cantidad de sitios hidrofóbicos observados en los aislados tratados, estén interaccionando entre si, dejando expuestos a la superficie aquellos mas hidrofílicos.

II.4.2.2.4 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas

Es evidente que existe un entrecruzamiento diferente entre las cadenas proteicas de las distintas películas estudiadas en este capítulo. En la **figura II.4.8** se muestra la solubilidad diferencial de las proteínas presentes en las películas en diferentes buffers, con el objetivo de comprender cuales son las interacciones que las estabilizan.

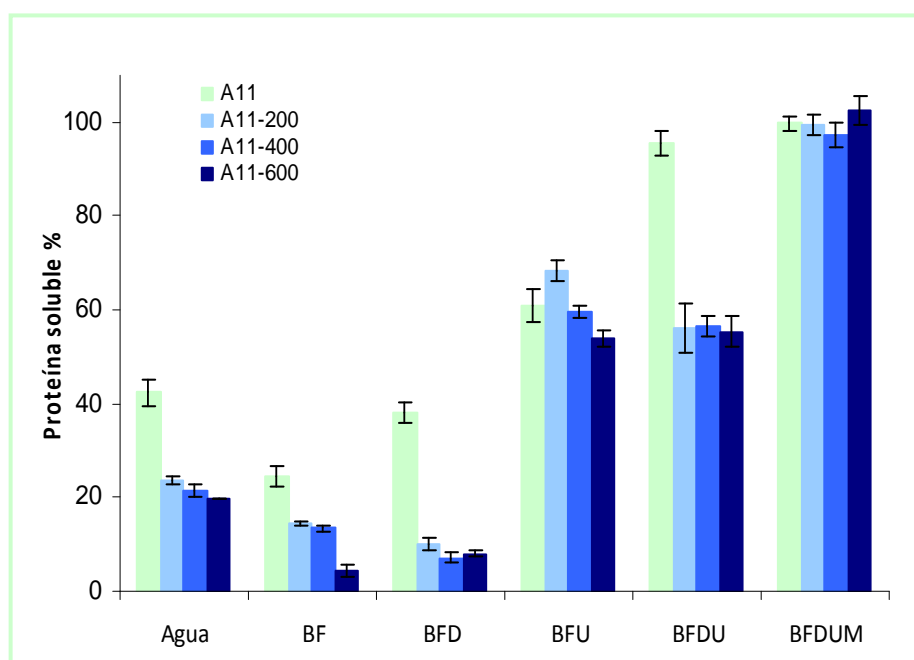


Figura II.4.8 Solubilidad diferencial de proteínas de películas obtenidas a partir del aislado A11, y de los aislados tratados con alta presión, A11-200, A11-400 y A11-600. Porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BFD), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BFDU), BFDU con 2-mercaptoetanol 2,5 % v/v (BFDUM), todos a pH 7,5

La solubilidad en agua de las proteínas de todas las películas obtenidas con aislados tratados con alta presión fue aproximadamente de 20 %, evidenciando un entrecruzamiento de proteínas mayor que el encontrado en la película control. Al solubilizar en buffer fosfato, la mayor solubilidad la mostró la película obtenida a partir del control, y el mínimo fue para la película obtenida a partir de A11-600, sugiriendo que las interacciones electrostáticas fueron más importantes en la película control. En cambio, el buffer fosfato con detergente SDS, logro solubilizar en mayor medida a las películas formadas con A11, lo que indicaría una muy baja contribución de uniones hidrofóbicas en la estabilización de las películas obtenidas con los aislados modificados o que la ruptura de estas interacciones en estas películas no es suficiente para poder solubilizar las especies que estén interaccionando mediante este tipo de uniones. En cambio con el buffer fosfato con urea, aumentó significativamente la solubilidad de las proteínas de todas las películas, pero en mayor grado para las tratadas con alta presión, alcanzando un valor similar al de la película control. Este resultado indicaría la importante estabilización mediante uniones puente hidrógeno en todas estas matrices, y/o que la acción de la urea, que desestructura el agua, logre solubilizar una

mayor concentración de proteína. Al agregar SDS y urea en simultáneo al buffer fosfato, se vio que las películas control fueron totalmente solubilizadas, sin cambios en las películas obtenidas con aislados tratados, respecto de las del buffer conteniendo solo urea. Mientras que con el buffer conteniendo SDS, urea y 2-ME, se alcanzó a solubilizar totalmente las proteínas de las películas formadas con A11-200, A11-400 y A11-600, lo que muestra el aporte de puentes disulfuro a la estabilización de éstas películas.

Estos resultados sugieren la importancia de las uniones no covalentes y covalentes (puente hidrógeno y disulfuro) en la estabilización de las películas obtenidas con aislados tratados con alta presión, a diferencia de las películas nativas estabilizadas principalmente por uniones hidrofóbicas y puente hidrógeno. El mayor desplegamiento de las proteínas tratadas favorece la formación de enlaces disulfuro, y también de puentes hidrógeno que hacen a estas matrices mas resistentes e incluso posiblemente mas hidrofóbicas ya que las películas resultantes fueron menos solubles y presentaron menores WVP. Es factible que existan interacciones hidrofóbicas entre las cadenas que no se logran visualizar por este ensayo, ya que la distribución de puentes disulfuro haría que, si bien el SDS pueda romper esas uniones, no se logre ver un aumento en la solubilidad en el buffer correspondiente.

II.4.2.3 Comparación de películas obtenidas a partir de aislados nativos y desnaturalizados por temperatura o alta presión

La **figura II.4.9** muestra las curvas tensión-deformación para las películas obtenidas a partir de los aislados A11, A11-70 (tratado a 70 °C) y A11-600 (tratado a 600 MPa), de modo de poder comparar el efecto de los tratamientos térmicos y de alta presión sobre las propiedades de las películas resultantes.

Las películas obtenidas con aislados tratados con alta presión mostraron mejor desempeño mecánico que las películas obtenidas con aislados tratados térmicamente o con aislados nativos. El tratamiento con alta presión permitió la formación de películas significativamente más resistentes a la ruptura y con mayor módulo de Young que las otras películas, y con igual elongación que las nativas.

II.4 Películas proteicas de amaranto formadas a partir de aislados tratados con alta presión hidrostática

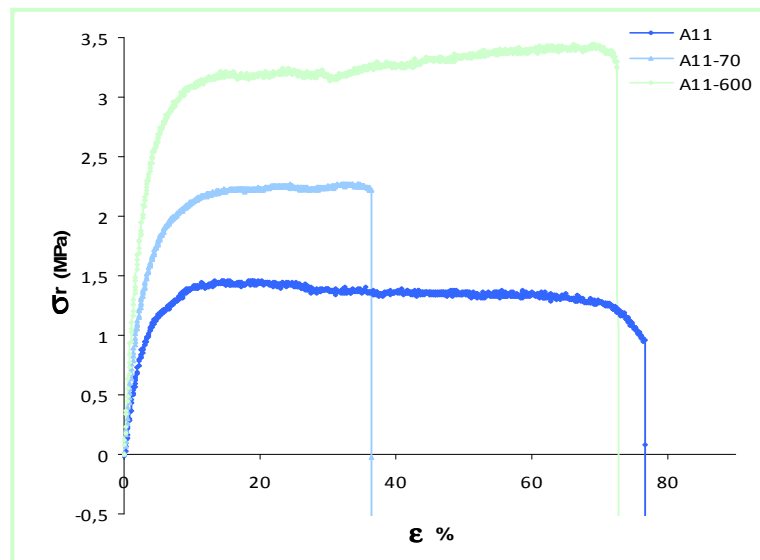


Figura II.4.9 Curvas tensión-deformación de los aislados A11, A11-70 y A11-600

En la **figura II.4.10** se muestran los valores de WVP y solubilidad en agua para las películas obtenidas a partir de aislados nativos, tratados con temperatura (70 °C) y tratados con alta presión (600 MPa). El tratamiento térmico provocó un aumento de la WVP y una disminución de la solubilidad en agua de las películas obtenidas. En cambio, con el tratamiento con alta presión, ambas propiedades mejoraron, siendo la disminución de la solubilidad más importante que en las películas obtenidas con aislados tratados térmicamente.

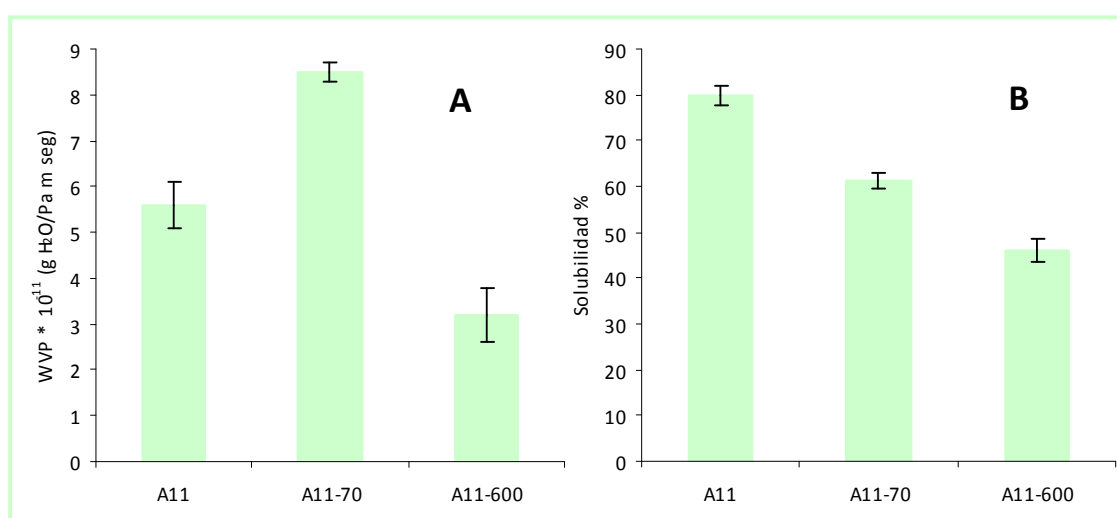


Figura II.4.10 A) Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y B) solubilidad en agua de películas obtenidas a partir del aislado A11, A11-70 y A11-600

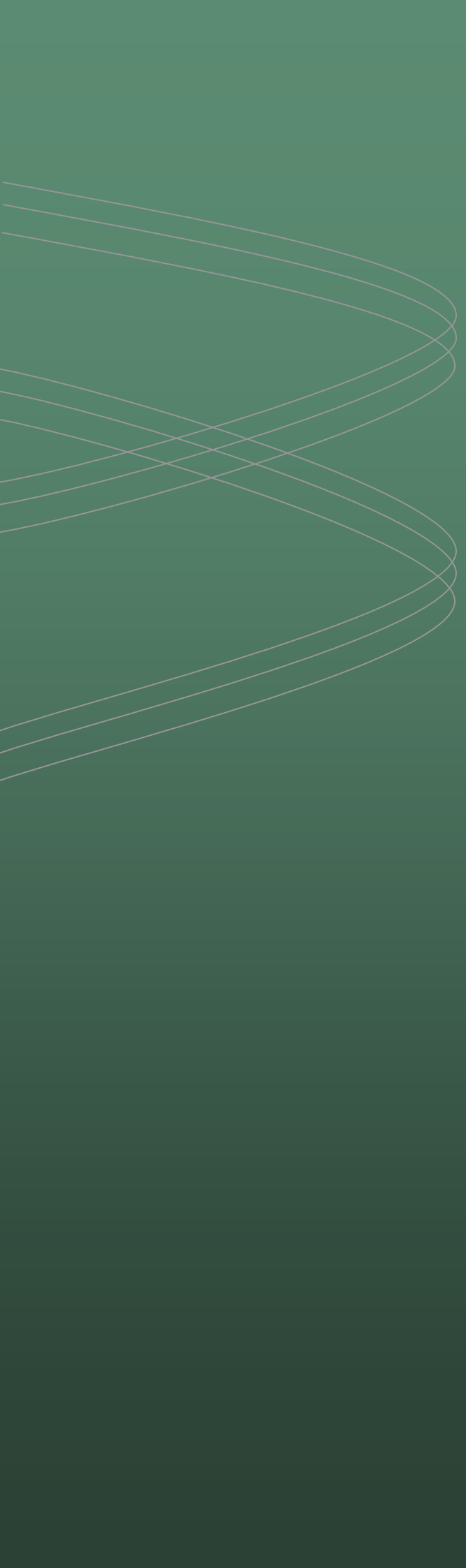
Es evidente que el tratamiento con alta presión es más efectivo para mejorar la funcionalidad de las películas proteicas de amaranto de manera integral, ya que logra mejorar las propiedades mecánicas y la solubilidad en mayor magnitud, y también disminuir la permeabilidad al vapor de agua de las matrices proteicas.

II.4.3 Conclusión

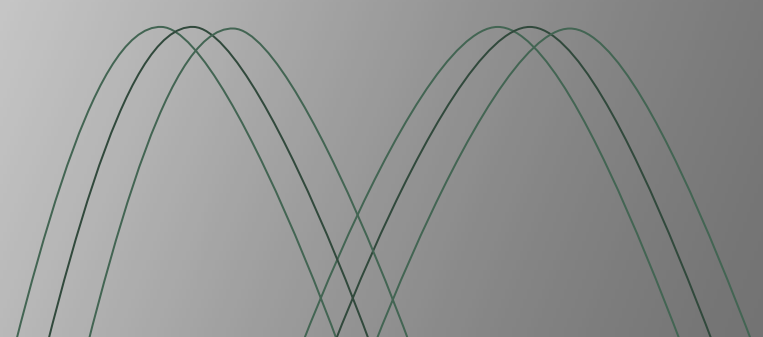
Todos los aislados tratados con alta presión fueron capaces de formar películas homogéneas por *casting* con mejores propiedades mecánicas, menos solubles en agua y menos permeables al vapor de agua que las películas control, sin modificar su espesor, color y contenido de agua, aunque algo más opacas.

El cambio estructural alcanzado en las proteínas con los tratamientos de alta presión, favoreció el desplegamiento, aumentando la hidrofobicidad superficial y la cantidad de SH libres, que al volver a asociarse en el proceso de formación de la película, produjo matrices con mejor funcionalidad.

Las películas obtenidas también presentaron mejores propiedades que aquellas formadas con aislados tratados térmicamente. Esto, junto a las ventajas adicionales que representa que el tratamiento puede realizarse directamente sobre la dispersión formadora de películas y sobre volúmenes más grandes, posicionan a este tipo de modificación estructural de las proteínas como más interesante para ser considerada como estrategia para mejorar la funcionalidad de películas de amaranto nativas.



**III. MATERIALES
COMPUESTOS Y
NANOCOMPUESTOS
EN BASE A PROTEÍNA
DE AMARANTO Y
ALMIDONES DE
DISTINTO ORIGEN**



III.1 El almidón

III.1.1 Consideraciones generales

El almidón es un polisacárido de origen natural, renovable, biodegradable, que ocupa el segundo lugar en abundancia en biomasa en la naturaleza después de la celulosa. Es producido por la mayoría de las plantas como fuente de almacenamiento de energía. Los almidones más importantes en términos de abundancia son los de maíz (82 %), trigo (8 %), papa (5 %) y mandioca (5 %) (Buléon y col., 1998; Angellier y col., 2004).

Es un polisacárido semicristalino compuesto por amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos α -D (1-4) y ligeramente ramificada por uniones α -D (1-6); y la amilopectina es un polímero altamente ramificado formado por cadenas relativamente cortas de α -D (1-4) glucopiranosas, ramificadas por uniones glicosídicas α -D (1-6), cada 22 unidades de glucosa aproximadamente (Zobel, 1988b).

La estructura del almidón ha sido ampliamente estudiada, y debido a su complejidad aún no existe un modelo universalmente aceptado (Buléon y col., 1998), aunque el que se ilustra en la **figura III.1.1** es el más aceptado.

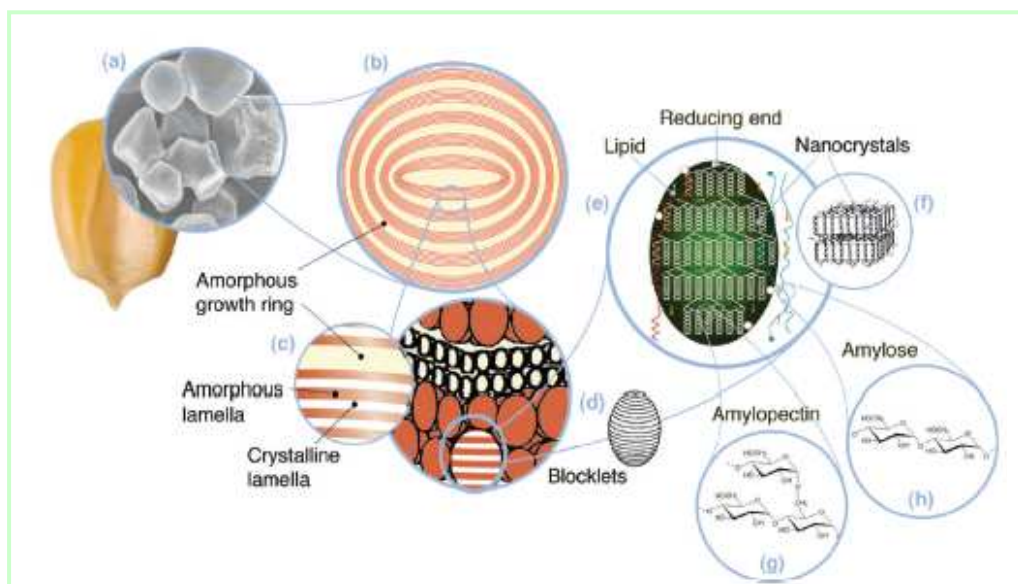


Figura III.1.1 Estructura multiescala del almidón: (a) gránulo de almidón de maíz (30 μ m), (b) anillos de crecimiento semicristalino y amorfo (120-500 nm), (c) láminas amorfas y cristalinas (9 nm) con detalles magnificados del anillo de crecimiento semicristalino, (d) bloques (20-50 nm), (e) hélices dobles de amilopectina formando la láminas cristalinas de los bloques, (f) otra representación de las láminas cristalinas llamadas nanocristales de almidón, (g) estructura molecular de amilopectina, y (h) estructura molecular de amilosa (0.1-1 nm). *Extraído de Gallant y col. (1997) y Tang y col. (2006)*

Este modelo considera una estructura multiescala, que consiste de un gránulo de 2-100 μm (**figura III.1.1a**) dentro del cual se encuentran anillos de crecimiento de 120-500 nm (**b**), compuestos de bloques de 20-50 nm (**d**), hechos de láminas amorfas y cristalinas de 9 nm (**c**), que contienen cadenas de amilopectina (**g**) y de amilosa (**h**) de 0,1-1 nm (Gallant y col., 1997).

A través de ensayos de difracción de rayos X, se puede evidenciar la naturaleza semicristalina del almidón, ya que el gránulo está formado por anillos de crecimiento semicristalinos y amorfos alternados en forma concéntrica, que crecen desde el *hilium* hacia la periferia del gránulo. El número y espesor de estas capas concéntricas depende del origen botánico del almidón, y rondan los 120-140 nm (French, 1984). Los anillos semicristalinos consisten de un apilamiento repetitivo de láminas cristalinas y amorfas. En realidad, se cree que la región cristalina está formada por el entrecruzamiento de las cadenas, con una longitud lineal de más de 10 unidades de glucosa que forman dobles hélices (Oates, 1997), que se empaquetan y forman los cristales; y la región amorfa corresponde a los puntos de ramificación. La cristalización o formación de dobles hélices puede ocurrir entre ramificaciones de una misma molécula de amilopectina o entre moléculas adyacentes, en tres dimensiones, y es llamada estructura de superhélice. Tang y col. (2006) mostraron que la columna vertebral de esta estructura la forma la amilopectina, y que las moléculas de amilosa están dispuestas al azar en forma individual, dispersas entre la amilopectina, cercanas unas con otras, en ambas regiones, cristalinas y amorfas (Oates, 1997). Dependiendo del origen botánico, la amilosa es preferentemente encontrada en la región amorfa (almidón de trigo), dispersa entre la amilopectina en ambas regiones (almidón de maíz), empaquetada con la amilopectina, o cocrystalizada con la amilopectina (almidón de papa) (Blanshard, 1987). Los almidones nativos contienen entre 15 y 45 % de material cristalino, y pueden ser caracterizados en tres tipos de cristal, A, B o C -utilizando la técnica de difracción de rayos X- que se diferencian en el empaquetamiento de las dobles hélices de amilopectina. La estructura de tipo A se asigna a empaquetamientos cerrados, con moléculas de agua entre cada doble estructura de la hélice, mientras que la tipo B se corresponden con estructuras más abiertas donde las moléculas de agua están localizadas en una cavidad central formada por seis dobles hélices, como se muestran en la **figura III.1.2**. La estructura tipo C ha

sido considerada como una mezcla de los tipos A y B, debido a que su modelo de difracción de rayos X es una combinación de los difractogramas correspondientes a las estructuras A y B. En general, el modelo cristalino de los almidones de cereales es de tipo A, de los almidones de tubérculos es de tipo B, y los almidones de legumbres, presentan el modelo de tipo C (Zobel, 1988a).

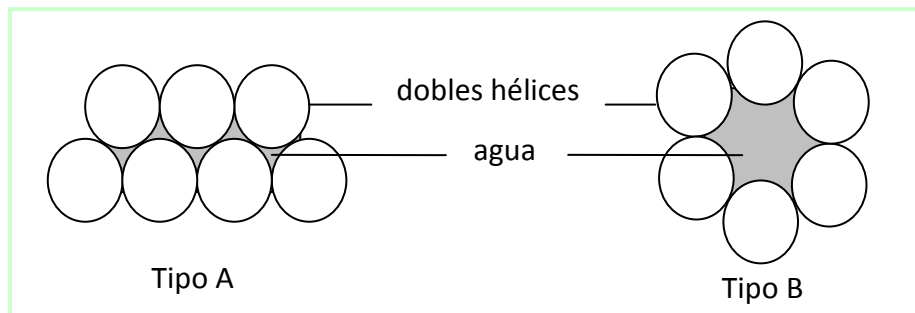


Figura III.1.2 Empaquetamiento de las dobles hélices de amilopectina según el modelo de cristalinidad de tipo A o B

El orden cristalino en los gránulos de almidón es un factor que influye enormemente en las propiedades funcionales del almidón. Otras características, como el tamaño, la forma, y el contenido de amilosa del gránulo, varían además con el genotipo, las prácticas de cultivo, las condiciones climáticas y el tipo de suelo durante el crecimiento de la planta (Svegmark y Hermansson, 1993; Asaoka y col., 1985; Inatsu y col., 1974; Juliano y col., 1964; Morrison y col., 1984).

La relación amilosa:amilopectina presente en el gránulo, es una característica que también influye ampliamente en las características fisicoquímicas del almidón, ya que un mayor contenido de amilopectina, como ocurre en los almidones de tipo waxy -que no poseen prácticamente amilosa-, está relacionado con una alta cristalinidad, y esto, con una mayor estabilidad estructural, lo que genera diferencias en el proceso de gelatinización (Singh y col., 2003; Barichello y col., 1990).

Existen además tres tipos de componentes minoritarios asociados a los gránulos de almidón que dependen también del origen botánico:

- los fragmentos de pared celular,
- los componentes de superficie: principalmente proteínas, enzimas, aminoácidos y ácidos nucleicos, y,
- los componentes internos: principalmente lípidos.

III.1.2 Gelatinización del almidón

La gelatinización es un proceso en el cual ocurre la ruptura, en presencia de agua y temperatura, de los enlaces intermoleculares presentes en el gránulo de almidón, permitiendo la incorporación de agua y el hinchamiento del gránulo. La gelatinización comienza en el *hilium*, hinchándose rápidamente hacia la periferia del gránulo. Ocurre inicialmente en la región amorfa del gránulo, debido a que las uniones puente hidrógeno son más débiles. Cuando la gelatinización comienza, el gránulo se hincha aumentando la viscosidad de la dispersión, ya que el agua está migrando dentro del gránulo, hasta que ocurre la ruptura del mismo, la viscosidad descende, y se logra por completo la gelatinización del gránulo (**figura III.1.3**).

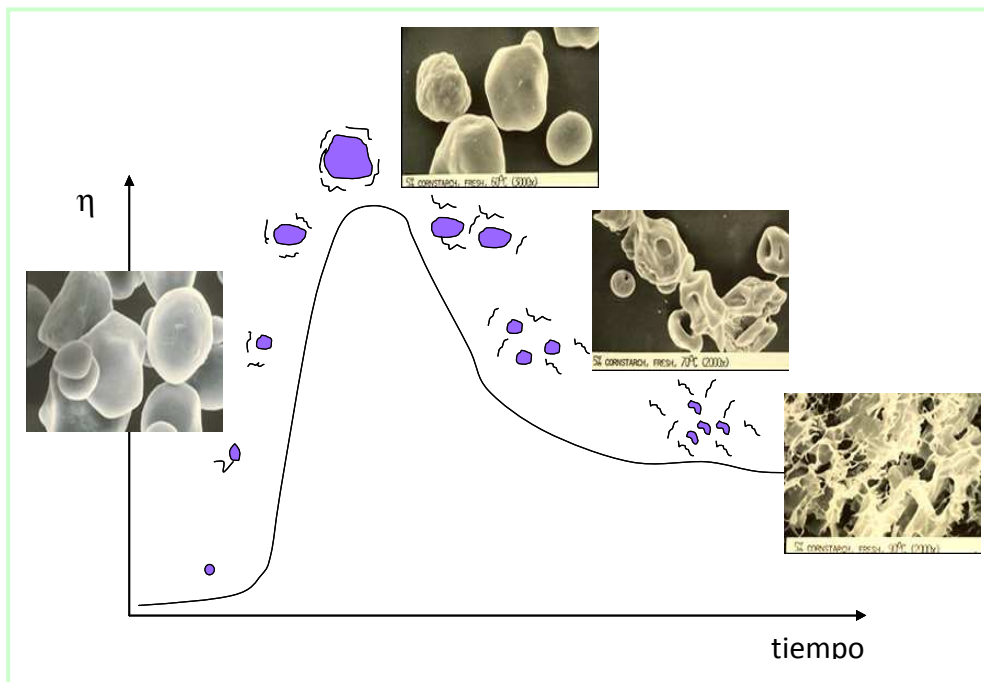


Figura III.1.3 Proceso de gelatinización del almidón mostrado mediante la curva viscosidad (η) vs. tiempo. Fotos extraídas de *Food Resource, Public Health and Human Sciences, Oregon State University*

La gelatinización y las propiedades de hinchamiento de los gránulos son controlados en gran parte por la estructura molecular de la amilopectina (largo de las cadenas, grado de ramificación, peso molecular y polidispersidad), por la composición (relación amilosa:amilopectina y contenido de fósforo) y por la arquitectura del gránulo (relación entre región amorfa y cristalina) (Tester, 1997).

El colapso del orden cristalino dentro de los gránulos, por la gelatinización, muestra por sí solo, un cambio irreversible en las propiedades de hinchamiento, de *pasting*, la

pérdida de birrefringencia, la disociación y desplegamiento de las dobles hélices y la solubilidad (Atwell y col., 1988; Hoover, 2001; Stevens y Elton, 1971).

La temperatura y la entalpía de gelatinización varían con el origen del almidón. Las diferencias en las temperaturas de transición se relacionan con la cantidad de cristal, es decir con el largo de la doble hélice. Por ejemplo, altas temperaturas de gelatinización han sido asociadas a altos grados de cristalinidad, ya que le da estabilidad estructural, otorgándole al gránulo mayor resistencia frente al proceso de gelatinización. La entalpía de gelatinización da una idea de la cantidad y calidad de cristalinidad presente en el gránulo, así como también es un indicador de la pérdida de orden molecular dentro del gránulo (Barichello y col., 1990, Cooke y Gidley, 1992; Hoover y Vasanthan, 1994; Tester y Morrison, 1990).

III.1.3 Hidrólisis del almidón

El almidón es el segundo material orgánico más estudiado para producir nanocristales, luego de la celulosa. Los nanocristales de almidón son plaquetas cristalinas obtenidas de la ruptura de los gránulos de almidón por hidrólisis ácida (LeCorre y col., 2010). Hay varios términos para referirse al almidón obtenido por hidrólisis ácida, como cristales de almidón, nanocristales de almidón, almidón microcristalino, y almidón hidrolizado. Todos poseen una parte cristalina y una parte amorfa, los cuales difieren de las nanopartículas de almidón, que pueden ser totalmente amorfas.

En los primeros trabajos publicados en esta temática, estos nanocristales se preparaban por hidrólisis con ácido clorhídrico durante seis semanas. En la **figura III.1.4** se observan los nanocristales obtenidos mediante microscopía electrónica de transmisión: la vista longitudinal muestra los fragmentos laminares, constituidos por elementos alargados apilados, con un ancho de 5-7 nm, y la vista planar muestra las plaquetas individualizadas (Putaux y col., 2003).

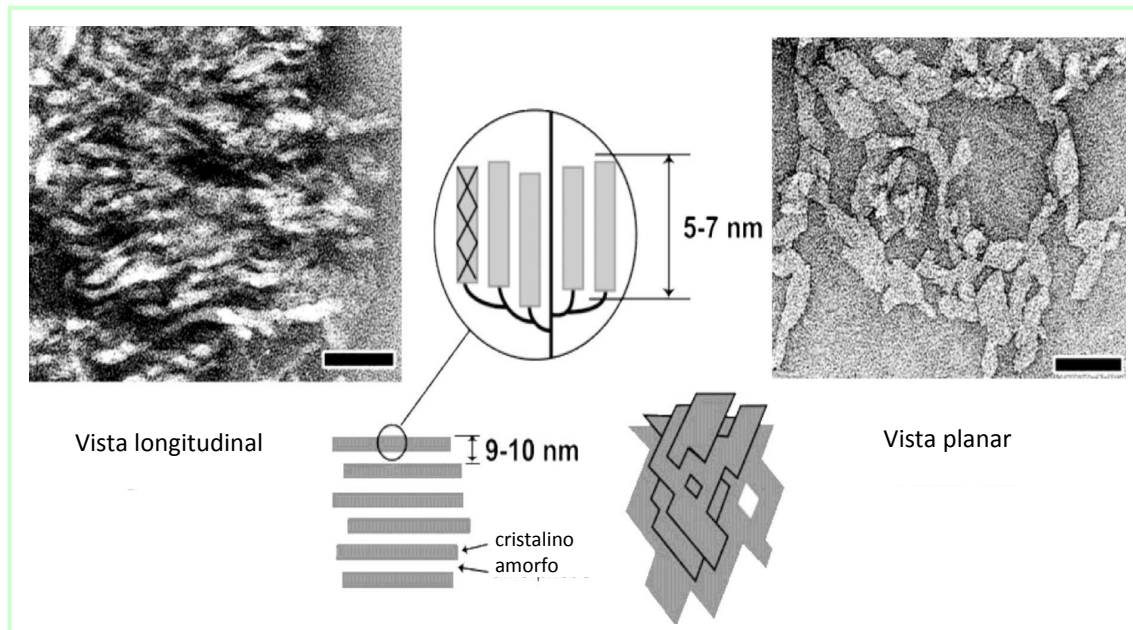


Figura III.1.4 Nanocristales de almidón observados por TEM: vista longitudinal y vista planar. Extraído de Putaux y col. (2003)

Publicaciones más recientes han reportado la obtención de nanocristales de almidón más grandes, 40-70 nm para almidón de papa (Chen y col., 2008a), 30-80 (Chen y col., 2008b) y 60-150 nm (Yu y col., 2008; Zheng y col., 2009) para almidón de poroto; y 50 nm (García y col., 2009b) y 70-100 nm (Namazi y Dadkhah, 2008) para almidón de maíz waxy, con bordes redondeados y agregados en forma de racimos de uva de 1-5 μm (Wang y Zhang, 2008). La heterogeneidad en el tamaño de partícula se puede explicar por el origen botánico del almidón y por la dificultad de obtener imágenes de nanocristales no agregados (LeCorre y col., 2010).

Varios autores han intentado optimizar las condiciones de hidrólisis a través de la variación del ácido utilizado y su concentración, el tiempo, la temperatura, el origen botánico del almidón, etc. Singh y Ali (1987, 1993, 2000 y 2008) luego de estudiar la influencia del ácido y el tipo de almidón demostraron que usando ácido clorhídrico o nítrico en la misma concentración se evitaba que los nanocristales se agreguen entre sí. Angellier y col. (2004) mostraron que al reemplazar el ácido clorhídrico por ácido sulfúrico se obtenía una suspensión más estable de nanocristales por la presencia de grupos sulfatos en la superficie, aunque un menor rendimiento. En la actualidad, los procesos se han mejorado utilizando principalmente ácidos sulfúrico y clorhídrico,

lográndose minimizar el tiempo de hidrólisis a cinco y quince días, respectivamente (Angellier y col., 2004; Putaux y col., 2003).

El estudio de la cinética de hidrólisis para obtener los nanocristales de almidón, permitió en parte comprender la evolución de la reacción y su dependencia con ciertos parámetros (Jayakody y Hoover, 2002):

- la primer etapa de hidrólisis, que involucra principalmente la región amorfa del gránulo, está influenciada por el tamaño y los poros en la superficie del gránulo, por el contenido de amilosa, y por la cantidad de cadenas de amilosa que se encuentran formando complejos con lípidos; mientras que,
- la segunda etapa de hidrólisis, que involucra la región cristalina, está influenciada por el contenido de amilopectina, el modo de distribución de las uniones $\alpha(1-6)$ entre la región amorfa y la región cristalina, y el grado de empaquetamiento de las dobles hélices dentro de los cristales de almidón.

Ejes de trabajo

La estructura compleja del gránulo de almidón y los cambios estructurales que éste sufre al someterlo a hidrólisis o gelatinización, hacen posible diseñar la formación de distintos tipos de materiales a partir de proteínas de amaranto y almidón:

- i) películas mezcla (*'blends'*) de proteínas y almidones gelatinizados
- ii) películas formadas por proteínas y gránulos de almidón, y
- iii) películas formadas por proteínas y nanocristales de almidón.

Estas tres posibilidades se estudiaron en este trabajo de tesis, y se describen en esta parte, utilizando almidones de distinto origen botánico que fueron inicialmente caracterizados.

III.2 Caracterización de los almidones de distinto origen botánico utilizados

Como las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los gránulos de almidón presentan relación con su origen botánico, es de esperar que la funcionalidad de los materiales que ellos formen cuando se los use como copolímero, o como micro o nanorefuerzo de materiales proteicos también dependa del tipo de almidón usado.

Se seleccionaron cinco almidones de diferente origen botánico para trabajar: papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto, debido a las características diferenciales de cada uno de ellos, como la morfología (forma y tamaño), contenido de amilosa:amilopectina, tipo y grado de cristalinidad, condiciones de gelatinización, contenido de lípidos y de fósforo, entre otras. Por ejemplo, el almidón de papa presenta un tamaño mucho mayor que los otros almidones, y el de amaranto es muy pequeño; el almidón de trigo y maíz presentan lípidos endógenos que forman un complejo con la amilosa (Zobel, 1988a; Singh y col., 2006); y el almidón de papa se encuentra fosforilado, con mayor contenido de fósforo que los almidones de maíz y maíz waxy (Li y col., 2006), además de presentar diferencias en la cristalinidad y estabilidad térmica.

Por ende, previo a la formación de los materiales en base a proteínas de amaranto y almidón, se planteó como objetivo caracterizar los cinco almidones seleccionados para agregar a las formulaciones con el fin de mejorar la funcionalidad de las películas proteicas de amaranto.

III.2.1 Materiales y métodos

III.2.1.1 Materiales

Se utilizaron almidones comerciales de distinto origen: papa (Anedra, Argentina), maíz, maíz waxy y trigo (Sigma-Aldrich, Alemania).

Se utilizaron las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* descritas en la sección II.2.1.1 para la obtención del almidón de amaranto.

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de pureza analítica.

III.2.1.2 Obtención del almidón de amaranto

El almidón de amaranto se obtuvo según la metodología de Pérez y col. (1993). Las semillas de amaranto se colocaron en una solución de NaOH 0,0625N, en una relación 50 % p/v durante 24 horas a 5 °C. Posteriormente se agregó NaOH 0,0625N para permitir la molienda, que se realizó con una procesadora (Minipimer, Braun) durante dos minutos a máxima potencia. El material molido se filtró a través de un tamiz de acero inoxidable de abertura 80 mesh (177 µm de diámetro). El residuo retenido en el tamiz se reprocesó 4 veces con adición de NaOH 0,0625N, en cantidades suficientes para asegurar la molienda sin que ocurra aumento de la temperatura, se volvió a tamizar utilizando tamices con aberturas de 200 y 270 mesh (74 y 53 µm de diámetro respectivamente), y se centrifugó a 4500 xg durante 20 minutos a 10 °C (centrífuga Avanti J-25, Beckman Coulter, California, Estados Unidos). Del precipitado obtenido, se descartó la capa superior de color marrón, correspondiente a las proteínas, lípidos y pigmentos, se disolvió nuevamente en agua, se neutralizó con HCl 2N a pH 7, y se secó en estufa de convección forzada a 37 °C durante 24 horas. El material seco fue molido, pasado por tamiz de 80 mesh de abertura y almacenado a 4 °C hasta su uso.

El contenido de proteínas remanentes junto con el almidón se determinó a través de la técnica de microKjeldahl (etapa de digestión) (Allen, 1931) seguida del método colorimétrico de Berthelot modificado (determinación del contenido de nitrógeno en el digerido) (Tabbaco y col., 1979). El contenido de proteínas encontrado en el almidón fue $0,56 \pm 0,05$ % p/p.

III.2.1.3 Caracterización de almidones

III.2.1.3.1 Microscopía óptica

Los gránulos de almidones se caracterizaron mediante microscopía óptica, tomando 10 μ l de una dispersión de almidón al 1 % p/v en agua que se colocaron entre cubre y portaobjetos. Luego las distintas preparaciones se observaron en un microscopio Leica DMLB (Leica Microsystems, Alemania) asociado a una cámara fotográfica digital DC100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Suiza) con un aumento total de 1000X.

III.2.1.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los almidones se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), colocando las muestras sobre una cinta adhesiva doble faz, metalizadas con oro en un Sputter coater (Edwards S150B) y observadas con un microscopio electrónico de barrido SEM 505 (Philips, Holanda), con un voltaje de aceleración de 10 kV. Todas las fotos fueron tomadas con un aumento total de 1000X, excepto las del almidón de amaranto con las que también se utilizó un aumento de 10000X. Para el procesamiento y análisis de las imágenes se utilizó el software AnalySis Pro 3.0, con el cual se evaluó el diámetro medio.

III.2.1.3.3 Determinación del contenido de amilosa

El contenido de amilosa se determinó mediante la técnica descrita por Juliano (1971) y adaptada por Martínez y Cuevas (1989). Aproximadamente 100 mg de almidón, previamente molido y pasado por un tamiz de 250 μ m, se colocó en un matraz de 100 mL, al que se le agregó 1 mL de etanol 96 % v/v y 9 mL de NaOH 1N. Las muestras fueron tratadas durante 9 minutos a 100 °C en un baño termostático, luego se enfriaron durante 30 minutos en baño de hielo, se llevó a volumen en el matraz. Se tomaron 1,25 mL de la solución que se colocaron en un matraz de 25 mL, se agregó luego 0,25 mL de ácido acético 1N y 0,5 mL de solución de iodo al 2 % p/v y se llevó a volumen.

Se realizó una curva patrón con 40,0 mg de amilosa pura (Sigma-Aldrich, Alemania), la cual fue sometida al mismo tratamiento que las muestras, llevando a volumen en el matraz de 100 mL. Se tomaron alícuotas de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 y 1,25 mL, se

adicionaron 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 y 0,25 mL de ácido acético 1N y 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mL de solución de yodo al 2 % p/v, y se llevó a un volumen final de 25 mL.

Transcurridos 30 minutos, se determinó el valor de absorbancia a 610 nm de las muestras y de los patrones, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU650 (Beckman, Alemania), y usando como blanco una mezcla de todos los reactivos, sin muestra. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

III.2.1.3.4 Difractometría de rayos X

Los almidones fueron caracterizados mediante difracción de rayos X, utilizando un difractómetro X'Pert Pro (PANalytical, EE.UU.) equipado con una fuente de radiación Cu K α ($\lambda = 0,154$ nm). La tensión y la corriente utilizada fueron de 40 kV y 40 mA, respectivamente y los datos de difracción se obtuvieron desde $2\theta = 4^\circ$ hasta $2\theta = 40^\circ$ en un modo de tiempo fijo con un intervalo de paso de $0,01^\circ$.

El grado de cristalinidad (GC) se cuantificó mediante el método propuesto por Hermans y Weidinger (1948) en el que se calcula la relación entre el área de absorción que se atribuye a la región cristalina (A) y el área total de la muestra (A+B) (**figura III.2.1**), por integración mediante el procesamiento de los difractogramas con el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos). El grado de cristalinidad se calculó según la **ecuación III.2.1**:

$$GC = A/(A + B) \times 100 \quad \text{Ecuación III.2.1}$$

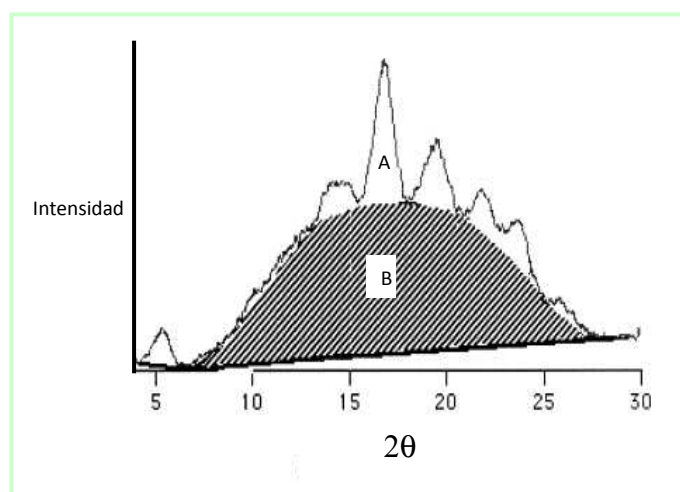


Figura III.2.1 Difractograma de rayos X típico de un material semicristalino (A: región cristalina, B: región amorfa)

III.2.1.3.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La temperatura y la entalpía de gelatinización de los almidones nativos se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Tanto el equipo utilizado como la calibración realizada fueron idénticos a los descritos al caracterizar los aislados proteicos en la sección II.2.1.4.3.

Se prepararon dispersiones de los almidones al 30 % p/v en agua. Aproximadamente 15 μ l de dispersión se colocaron en cápsulas de aluminio que se sellaron herméticamente. Las muestras se sometieron al siguiente tratamiento térmico: isoterma durante 5 minutos a 20 °C y posterior calentamiento a 10 °C/min entre 20 y 135 °C. En los termogramas la gelatinización se observa como una endoterma, de la cual se determinaron la temperatura de *onset*, la temperatura de pico, la temperatura de finalización y el área bajo la curva, que corresponden a la temperatura donde comienza la gelatinización, a la temperatura de gelatinización y a la temperatura donde finaliza la gelatinización, y a la entalpía de gelatinización de los almidones (T_o , T_{gel} y T_{fin} en °C, y ΔH_{gel} en J/g de almidón en base seca, respectivamente) utilizando el software Universal Analysis V4.2E (TA Instruments, New Castle, Del., Estados Unidos). Las determinaciones se realizaron como mínimo por duplicado.

III.2.1.4 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el Test de Fisher de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0.05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

III.2.2 Resultados y discusión

III.2.2.1 Morfología

Se evaluó la morfología de los gránulos de almidón mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM). En la **Tabla III.2.1** se muestra el diámetro medio de los gránulos, entre otros parámetros que serán discutidos a continuación, y en la **figura III.2.2** se muestran las imágenes obtenidas por ambas técnicas.

Tabla III.2.1 Diámetro medio, contenido de amilosa, patrón de difracción de rayos X y grado de cristalinidad de los almidones de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto

	Diámetro medio (μm)	Amilosa %	Patrón de rayos X	Grado de cristalinidad %
Papa	60,6 \pm 5,9	32,8 \pm 0,8	B	21,8 \pm 1,8
Trigo	19,1 \pm 3,2 - 6,5 \pm 2,0	34,7 \pm 0,3	A/V	14,3 \pm 1,0
Maíz	15,9 \pm 6,0	38,1 \pm 1,9	A/V	20,8 \pm 1,5
Maíz waxy	16,1 \pm 5,5	1,6 \pm 0,3	A	38,6 \pm 0,9
Amaranto	1,9 \pm 0,3	3,9 \pm 0,2	A	34,6 \pm 1,5

El almidón de papa fue, de todos los almidones estudiados, el almidón de mayor tamaño, con forma ovalada y diámetros entre 55 y 68 μm . Estos resultados concuerdan con los obtenidos para almidones de papa de diferentes cultivares (Liu y col., 2007).

Los gránulos de almidón de trigo mostraron una distribución de tamaño bimodal, los más grandes con forma lenticular, con diámetros entre 15 y 23 μm , y los más pequeños en forma esférica, con diámetros entre 3 y 10 μm . Esto coincide con los resultados de Baum y Bailey (1987) que mostraron que en la madurez del grano, el endosperma contiene dos tipos de gránulos de almidón: de tipo A, más grandes con forma de discos o lenticulares, con diámetros entre 10 y 35 μm ; y de tipo B, más pequeños, con forma esférica o poligonal, con diámetros entre 1 y 10 μm .

Los gránulos de almidón de maíz y maíz waxy presentaron la misma morfología, de tipo poliédrica o angular y su tamaño varió entre 10 y 20 μm , que coincide con lo observado por Sandhu y col. (2004).

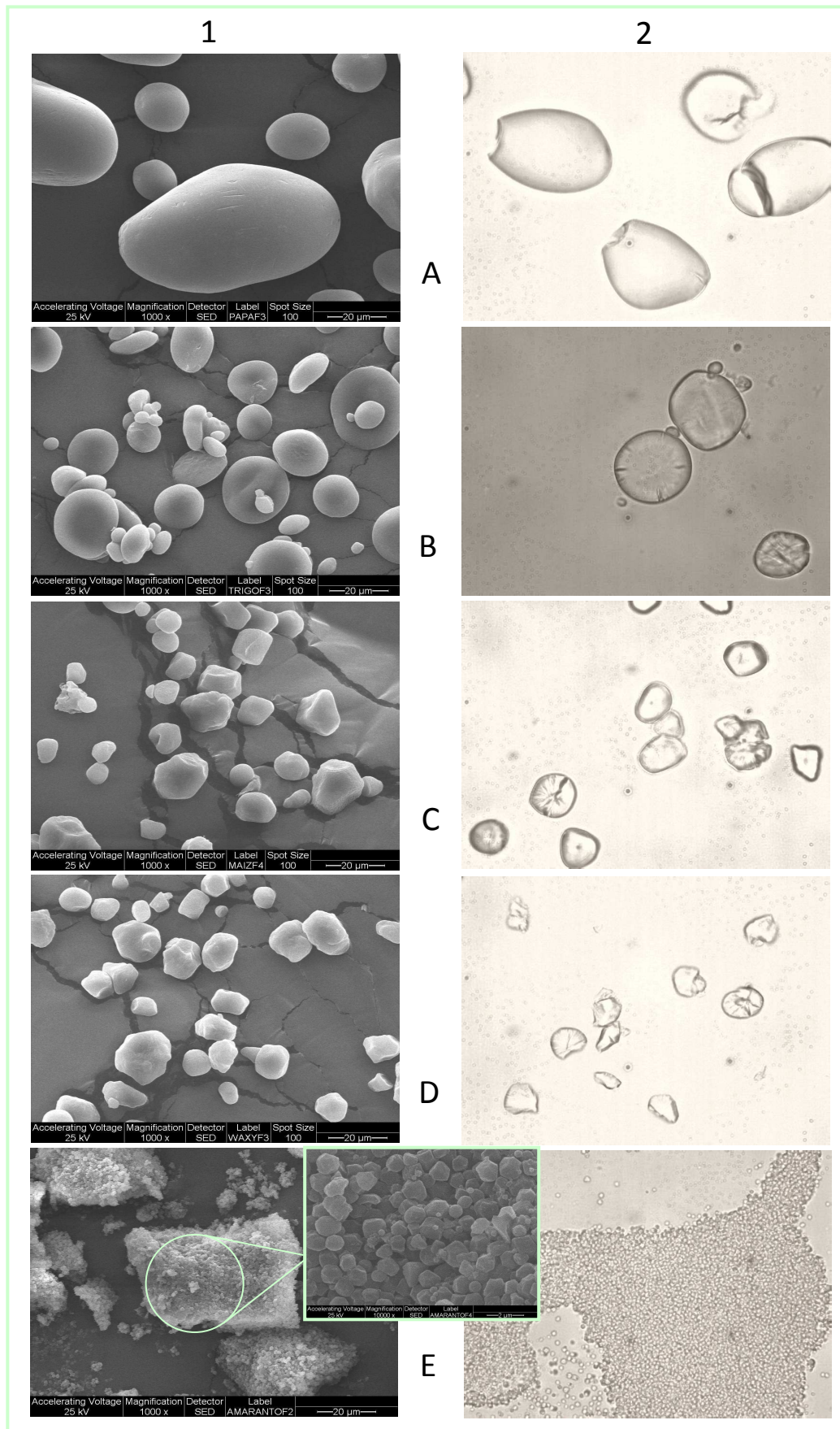


Figura III.2.2 Microscopía electrónica de barrido (1) y microscopía óptica (2) de gránulos de almidón de papa (A), trigo (B), maíz (C), maíz waxy (D) y amaranto (E)

Los gránulos de almidón de amaranto fueron los más pequeños de todos los estudiados, con forma poligonal, variando su diámetro entre 1 y 2,5 μm , como ya lo describieron Kong y col. (2009) y Marcone (2001). Con el objetivo de poder evidenciar su pequeño tamaño, se muestran dos fotos de SEM de este almidón. Una con el mismo aumento que las fotos de los otros almidones (1000X) de modo de poder comparar su tamaño, y otra con un aumento mayor (10000X), donde se puede evidenciar la morfología del gránulo. Además en la foto de menor aumento, se puede observar que ocurre una aglomeración de los gránulos, lo que podría deberse al secado utilizado durante la obtención del almidón, ya que este fue el único obtenido en el laboratorio. La diferencia en la morfología del gránulo puede ser atribuida al origen biológico, a la bioquímica del amiloplasto y a la fisiología de la planta (Badenhuizen, 1969; Svegmark y Hermansson, 1993).

III.2.2.2 Contenido de amilosa

En la **Tabla III.2.1**, donde se muestra el contenido de amilosa de los diferentes almidones estudiados, se observa que el almidón de papa, trigo y maíz fueron los almidones con mayor contenido de amilosa. En cambio, los almidones de maíz waxy y amaranto mostraron contenidos de amilosa significativamente menores que los otros almidones, por lo que al de amaranto también se lo podría considerar como almidón de tipo “waxy”. Todos estos resultados concuerdan con los mostrados por diferentes autores que evaluaron el contenido de amilosa de estos almidones (Singh y col., 2003; Varatharajan y col., 2010; Kong y col., 2009).

III.2.2.3 Cristalinidad

En la **figura III.2.3** se observan los perfiles de rayos X de todos los almidones. Los almidones de trigo, maíz, maíz waxy y amaranto mostraron un perfil de tipo A, con picos a 23°, 15° y un pico doble a 17-18,1°, que es el modelo típico de los almidones de cereales.

El almidón de trigo y el de maíz presentaron un pico a 20°, que podría deberse al complejo amilosa-lípido, típico del almidón de trigo y de algunos genotipos de almidón de maíz, como lo mostraron Zobel (1988a) y Singh y col. (2006), que se denomina estructura de tipo V. Esta estructura se atribuye a la formación del complejo entre

ácidos grasos y amilosa, que generalmente se encuentra en la fase amorfa del gránulo de almidón (French, 1984). En general, la presencia de esta estructura en los almidones de maíz normal, no puede ser determinada con exactitud debido a un solapamiento del perfil de difracción, a diferencia de lo que ocurre con los almidones de maíz de alta amilosa donde se puede evidenciar este complejo con mayor claridad (Zobel, 1988a; Zobel y col., 1998).

En cambio, el almidón de papa presentó el típico modelo B, con picos a $5,5^\circ$, $17,1^\circ$ y un pico doble a $22-24^\circ$. Este es el perfil típico para los almidones provenientes de tubérculos, como el de papa, ñame, ayote o achira (Varatharajan y col., 2010; Hoover, 2001).

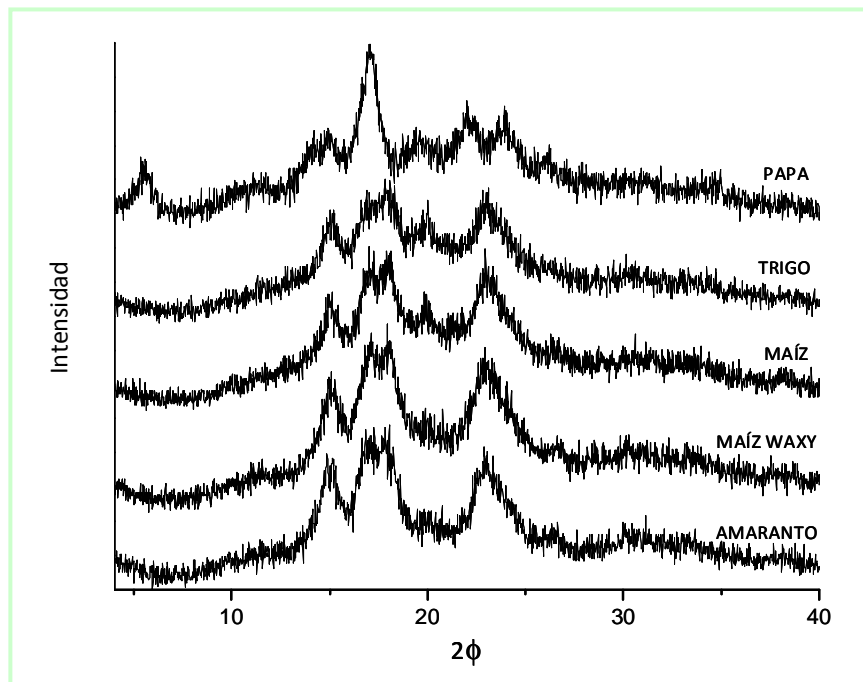


Figura III.2.3 Perfil de difracción de rayos X de almidones de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto

Los almidones de maíz waxy y amaranto presentaron mayor grado de cristalinidad (GC) que los almidones de papa, trigo y maíz (**Tabla III.2.1**), valores que se asemejan a los mostrados por otros autores (Cheetham y Tao, 1998; González y col., 2007; Nara y col., 1978; Yoo y Jane, 2002). La cristalinidad de los almidones está directamente relacionada con la cantidad de cadenas largas y cortas de amilopectina presentes en el gránulo (Singh y col., 2003), lo que explica porque estos dos almidones de tipo “waxy” -con mayor contenido de amilopectina- muestran mayor porcentaje de cristalinidad.

III.2.2.4 Gelatinización

En la **figura III.2.4**, se muestran los termogramas de cada uno de los almidones, con su endoterma de gelatinización característica. La temperatura y entalpía de gelatinización varió dependiendo del origen botánico del almidón.

En la **Tabla III.2.2** se resumen los valores promedio de la temperatura onset (T_o), la temperatura de gelatinización (T_{gel}), la temperatura de finalización (T_{fin}) y la entalpía de gelatinización (ΔH_{gel}) de todos los almidones estudiados. Los valores obtenidos se corresponden con los encontrados en la bibliografía para cada tipo de almidón (Liu y col., 2007; Yoo y Jane, 2002; Barichello y col., 1990; Kong y col., 2009).

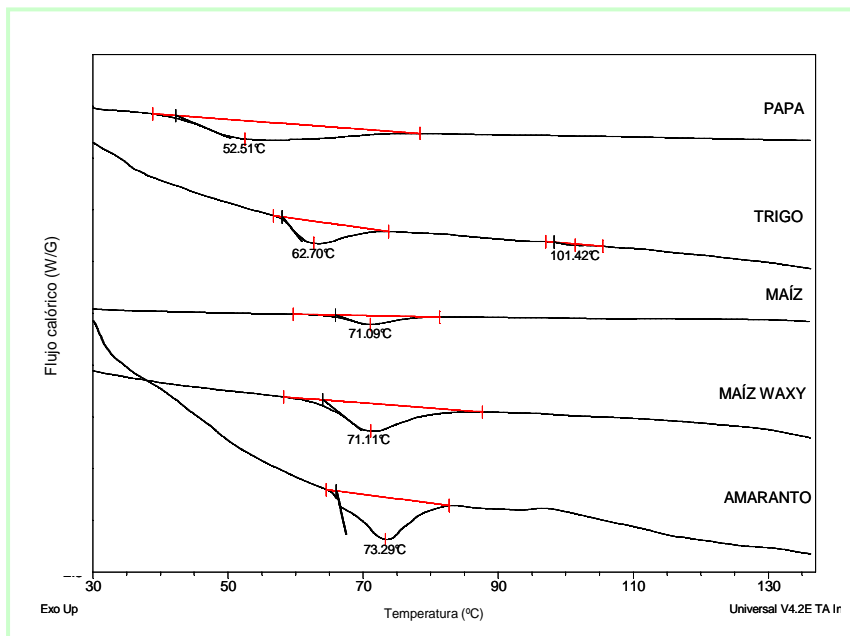


Figura III.2.4 Calorimetría diferencial de barrido de almidones de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto

Se determinó la temperatura de onset para poder controlar los procesos. La menor temperatura de gelatinización se observó para el almidón de papa, seguido por el almidón de trigo, maíz (común y waxy) y amaranto, sin diferencias significativas entre los tres últimos. Los almidones de papa, maíz y trigo presentaron el menor valor de entalpía de gelatinización, sin diferencias significativas entre ellos; y el almidón de maíz waxy y amaranto presentaron los mayores valores de entalpía.

Además, en el caso de trigo aparece una endoterma que puede atribuirse a la fusión del complejo amilosa-lípido cuya presencia había sido visualizada en el espectro de

rayos X. Dicha endoterma aparece a temperaturas mayores ($103,7 \pm 1,9$ °C) y tiene involucrado una pequeña cantidad de calor ($2,5 \pm 0,1$ J/g almidón b.s.), coincidiendo con lo mostrado por Yoo y Jane (2002). En el almidón de maíz, esta endoterma no fue detectada, lo que podría deberse a que en almidón de maíz, este complejo V es más estable hasta temperaturas cercanas a 130 °C, como mostró Zobel y col. (1988), o que la cantidad de complejo es muy baja, lo que impide detectarlo con este método.

Tabla III.2.2 Temperatura de onset (T_o), temperatura de gelatinización (T_{gel}), temperatura de finalización (T_{fin}) y entalpía de gelatinización (ΔH_{gel}) de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto

Almidón	T_o (°C)	T_{gel} (°C)	T_{fin} (°C)	ΔH_{gel} (J/g almidón b.s.)
Papa	$42,1 \pm 0,8^a$	$53,4 \pm 1,2^a$	$78,4 \pm 1,0^a$	$14,5 \pm 1,6^a$
Trigo	$58,0 \pm 0,1^b$	$62,7 \pm 0,7^b$	$73,2 \pm 1,0^b$	$12,7 \pm 1,9^a$
Maíz	$66,2 \pm 1,0^c$	$71,0 \pm 0,1^c$	$85,0 \pm 0,5^c$	$13,8 \pm 1,6^a$
Maíz waxy	$64,2 \pm 0,5^c$	$71,9 \pm 0,2^c$	$87,4 \pm 0,7^c$	$17,3 \pm 0,5^b$
Amaranto	$65,4 \pm 0,5^c$	$73,5 \pm 0,3^c$	$82,9 \pm 0,8^d$	$18,4 \pm 3,7^b$

En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

Los almidones con mayor contenido de amilopectina (maíz waxy y amaranto) presentaron mayores valores de entalpía y temperatura de gelatinización que los almidones con menor cantidad (papa, maíz y trigo), como se muestra en la **Tabla III.2.2**. Esto puede deberse a que los almidones que poseen mayor cantidad de cadenas de amilopectina, presentan un alto grado de cristalinidad, por lo tanto, mayor estabilidad estructural, lo que los hace más resistentes a la gelatinización (Barichello y col., 1990).

III.2.3 Conclusión

Los gránulos de almidón estudiados presentaron:

- diferente morfología y tamaño, desde los gránulos pequeños y poligonales de amaranto, a los más grandes y ovalados de papa, con una o más distribuciones de tamaño;
- distinta relación amilosa: amilopectina: los de maíz, papa y trigo con un contenido de amilosa superior al 32 %, y los de maíz waxy y amaranto, menor al 4 %, por lo que a estos últimos se los puede clasificar como tipo “waxy”;
- distinto tipo de cristalinidad: todos presentaron perfiles de cristalinidad de tipo A, con excepción del de papa que presento un perfil tipo B;
- distinto grado de cristalinidad: mayor para los almidones de tipo “waxy” (maíz waxy y amaranto) que para los almidones con menor contenido de amilopectina;
- distintas condiciones de gelatinización: la tendencia observada fue la misma que la cristalinidad, ya que ambos parámetros están relacionados; y,
- distinto contenido de lípidos: el almidón de trigo y de maíz mostraron la presencia de lípidos, formando un complejo amilosa-lípido con estructura cristalina de tipo V.

Estas diferencias dan indicio que el origen botánico del almidón podría influir en la funcionalidad de los distintos materiales que se obtengan a partir de los mismos y las proteínas de amaranto.

III.3 Películas mezcla ('blends') en base a proteínas de amaranto y almidones gelatinizados de distinto origen botánico

Los materiales obtenidos a partir de mezclas de proteínas con otros biopolímeros biodegradables o no biodegradables, resultan ser una opción muy interesante para poder mejorar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los materiales formulados solo a partir de proteínas.

Teniendo en cuenta que tanto las proteínas como el almidón, en las condiciones adecuadas, son hidrofílicos y en general presentan una alta solubilidad en agua, es factible que mezclas de estos biopolímeros fueran capaces de formar matrices más o menos interpenetradas. Pero si bien estos polímeros, entre los biodegradables, son de los más abundantes e incluso económicos, no hay demasiados estudios en bibliografía realizados a partir de estas mezclas. Así, Al-Hassan y Norziah (2012) estudiaron la formación de materiales a partir de gelatina de pescado y almidón de sagú, en donde mostraron que la adición de gelatina a las mezclas produjo películas más débiles y con mayor permeabilidad al vapor de agua. Algunos estudios reportaron la formación de películas a partir de mezclas de caseinato de sodio y almidón de maíz o trigo, pero en ninguno de los casos los materiales resultantes presentaron importantes mejoras (Arvanitoyannis y col., 1996). En cambio en películas compuestas a partir de gluten de trigo o albúmina de huevo y almidón de papa o maíz, se obtuvo menor elongación y tensión que las películas obtenidas a partir solo de la fuente proteica (González-Gutiérrez y col., 2010). Es evidente que pueden existir problemas de incompatibilidad entre las proteínas y los almidones, y probablemente estos dependan del origen y naturaleza de ambos biopolímeros (Rodríguez Patino y Pilosof, 2011).

El objetivo de este capítulo fue estudiar la obtención de películas a partir de dispersiones mezcla de aislados proteicos de amaranto y almidones gelatinizados de distinto origen botánico.

III.3.1 Materiales y métodos

III.3.1.1 Materiales

Como materias primas se utilizaron: aislado proteico de amaranto A11, que fue obtenido a partir de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (cultivar 9122) de la cosecha perteneciente al año 2007, y caracterizado como se describió en el capítulo II.2; almidones comerciales de papa (Anedra, Argentina), maíz, maíz waxy y trigo (Sigma-Aldrich, Alemania), y almidón de amaranto obtenido en el laboratorio, caracterizados en el capítulo anterior.

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de pureza analítica.

III.3.1.2 Gelatinización del almidón

Se prepararon dispersiones acuosas al 5 % p/v de los almidones de papa, trigo y maíz, y al 3,75 % p/v de los almidones de maíz waxy y amaranto, que fueron sometidas a un tratamiento térmico a 80 °C durante 20 minutos en un baño termostático con el fin de gelatinizar el almidón. La diferencia en las concentraciones empleadas se debió a que, al realizar el tratamiento térmico al 5 % p/v, los almidones de amaranto y maíz waxy aumentaron su viscosidad de manera tal de hacer imposible su utilización posterior en la formación de películas.

Se analizó el grado de gelatinización de los almidones presentes en las dispersiones, antes y después del tratamiento térmico por DSC, según la técnica descrita en la sección III.2.1.3.5.

III.3.1.3 Obtención de películas mezcla a partir de proteínas de amaranto y almidones gelatinizados

Las películas mezclas se obtuvieron a partir de dispersiones formadas por distintas proporciones de A11: almidón (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 y 0:100) al 5 % p/v de biopolímeros para las mezclas formadas con almidones de papa, trigo y maíz, y al 3,75 % p/v para maíz waxy y amaranto, agregando 25 % p/p de glicerol respecto del total de sólidos (usado como plastificante). Las dispersiones se prepararon tomando alícuotas de los almidones previamente gelatinizados, agregando el aislado proteico, el glicerol y el volumen de agua necesaria para lograr las concentraciones antes mencionadas. En

todos los casos, las dispersiones se prepararon agitando magnéticamente todos los componentes durante 1 hora a temperatura ambiente, ajustando el pH a 10,5 y volviendo a agitar por otros 30 minutos. Posteriormente, 15 ml de las dispersiones formadoras de películas fueron colocados en placas de Petri de poliestireno (64 cm²) y secadas en una estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 60 °C durante 4 horas. Las películas así formadas se acondicionaron a 20 °C y 58 % de humedad relativa (solución saturada de NaBr) durante 48 horas previo a su caracterización. Todos los estudios se realizaron al menos con dos tandas de películas formadas independientemente.

III.3.1.4 Caracterización de las películas

Las películas mezclas obtenidas a partir de las mezclas de aislado A11 y almidones gelatinizados fueron caracterizadas mediante la determinación del contenido de agua, espesor, opacidad, color, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, propiedades mecánicas en tracción, ángulo de contacto y solubilidad diferencial de proteínas, según las metodologías descritas en la sección II.3.1.5. También se estudiaron las siguientes propiedades:

III.3.1.4.1 Absorción de agua (AA)

La absorción de agua (AA) se determinó utilizando muestras de película cuadradas de 1 cm², que se pesaron inicialmente (m_0) y luego se acondicionaron en un desecador conteniendo una solución acuosa saturada de CuSO₄ (98% HR) a temperatura ambiente. A distintos intervalos de tiempo, se pesaron nuevamente las muestras, hasta alcanzar el valor de equilibrio (m_∞).

El valor de AA% fue calculado según la **ecuación II.2.1**. Los resultados presentados corresponden al promedio de tres determinaciones.

$$AA\% = (m_\infty - m_0) \times 100 / m_0 \quad \text{Ecuación II.2.1}$$

III.3.1.4.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las películas fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para poder visualizar su área transversal, las muestras se fracturaron en nitrógeno

líquido. Las probetas fueron colocadas sobre una cinta adhesiva doble faz metalizadas con oro en un Sputter coater (Edwards S150B) y observadas con un microscopio electrónico de barrido SEM 505 (Philips, Holanda).

III.3.1.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el Test de Fisher de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0.05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

III.3.2 Resultados y discusión

III.3.2.1 Gelatinización de los almidones

En esta sección se gelatinizaron los almidones en dispersiones acuosas que luego serían utilizadas para la formación de las películas, para asegurarse que todos los almidones tuvieran el mismo grado de gelatinización, y para evitar etapas de secado adicionales, que en un procesamiento resultan costosas. Pero con esta premisa no fue posible trabajar con las mezclas de almidones de distinto origen de la misma manera por su diferente comportamiento durante la gelatinización.

Bajo iguales condiciones de tratamiento (concentración de almidón, y tiempo y temperatura de calentamiento), las muestras de almidón de maíz waxy y amaranto aumentaron su viscosidad en mayor medida que las de almidón de papa, maíz y trigo. Es por esto que se decidió disminuir la concentración de la dispersión de estos dos almidones a 3,75 % p/v para poder manipular las muestras sin dificultad luego de su gelatinización. En general, los almidones tipo waxy tienen menor temperatura de *pasting* y mayor viscosidad que el resto de los almidones (Yoo y Jane, 2002; Swinkels, 1985). El hinchamiento de los gránulos de almidón de cereales es dificultado por el complejo amilosa-lípido, por lo que el menor contenido de amilosa en los almidones waxy favorece este hinchamiento y disminuye la temperatura de *pasting* (Jane y col., 1999), lo que podría ser la causa de la mayor viscosidad observada en los almidones de maíz waxy y amaranto luego de la gelatinización. Algunos autores reportaron que este mismo comportamiento característico de los almidones de tipo waxy, es encontrado también en el almidón de papa, debido a su tamaño, a la presencia de monoésteres de fosfato y a la ausencia de lípidos (Jane y col., 1999; Swinkels, 1985). Pero como este efecto no fue observado al gelatinizar la dispersión de almidón de papa, con esta muestra se continuó trabajando al 5 % p/v.

Todas las películas se formaron a partir de 15 mL de la dispersión mezcla de las proteínas de amaranto y los respectivos almidones, bajo las mismas condiciones de secado (tiempo y temperatura) independientemente de la concentración inicial de la mezcla, aprovechando la posibilidad de formar películas homogéneas con menor contenido de sólidos, lo que podría identificarse como una ventaja económica. Pero como es de esperar que el contenido de sólidos influya en las propiedades funcionales

de los materiales resultantes, en este capítulo se discutirán por separado los sistemas formados con almidones de amaranto y maíz waxy de los formulados con almidones de papa, trigo y maíz.

En la **figura III.3.1** se muestran a modo de ejemplo los termogramas obtenidos por DSC del almidón de papa y de trigo, antes y después del tratamiento térmico. En estos, al igual que en los termogramas no mostrados, no se observaron las endotermas de gelatinización, lo que confirma que los almidones fueron totalmente gelatinizados al tratarlos a 80 °C durante 20 minutos. En el caso del almidón de trigo tampoco se observó el pico correspondiente a la transición del complejo amilosa-lípido (**figura III.3.1 B**) que si aparecía en el termograma correspondiente al mismo almidón nativo, y tampoco se observó para el almidón de maíz, ya que no había sido detectado en el almidón de maíz nativo.

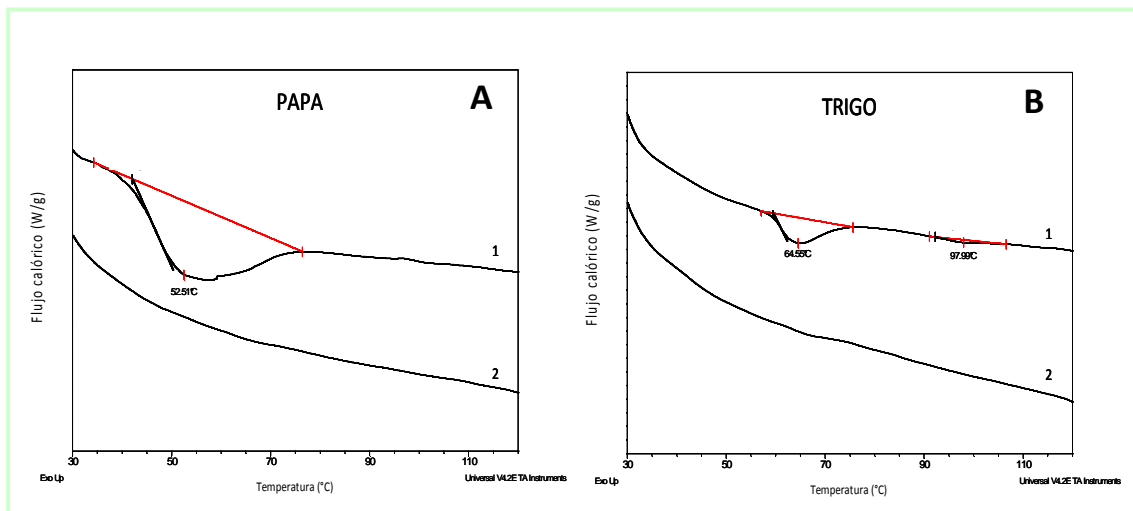


Figura III.3.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de almidones de A) papa y B) trigo, 1) antes y 2) después de ser sometidos al tratamiento térmico de 20 minutos a 80 °C

III.3.2.2 Caracterización de películas obtenidas a partir de dispersiones mezcla de aislado proteico de amaranto y almidones gelatinizados

Todas las dispersiones filmogénicas formadas con distinta proporciones de aislado proteico de amaranto y almidones de distinto origen resultaron estables y homogéneas, no observándose separación de fases. Esto sugiere que existe una buena compatibilidad entre ambos biopolímeros (Rodríguez Patino y Pilosof, 2011).

III.3.2.2.1 Apariencia

Al formar las películas a partir de dispersiones mezcla, se observó que no todas las formulaciones pudieron ser desmoldadas debido a su pegajosidad, aun después de alargar los tiempos de secado. En la **Tabla III.3.1** se señalan las formulaciones que formaron películas homogéneas y desmoldables con un (+) y cuales no (-).

Tabla III.3.1 Películas compuestas formadas a partir de dispersiones mezcla de aislado proteico y almidones gelatinizados en distintas relaciones aislado:almidón: + películas homogéneas que pudieron obtenerse sin dificultad, - películas que no pudieron desmoldarse

Almidón	Aislado proteico: Almidón				
	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100
Papa	+	+	+	-	-
Trigo		+	+	+	+
Maíz		+	+	+	+
Maíz waxy	+	+	+	-	-
Amaranto		+	+	+	-

El contenido de agua (**figura III.3.2 A y B**) de todas las películas mezcla se mantuvo constante, alrededor del 20 % p/p, sin diferencias significativas con la película control y con las diferentes proporciones aislado proteico: almidón gelatinizado.

En todos los casos, no se observaron diferencias significativas en el espesor de las películas mezclas con sus respectivos controles (**figura III.3.2 C y D**). Mientras que películas formadas por proteínas y almidones de maíz, papa o trigo (a partir de dispersiones al 5 % p/v) mostraron espesores entre 80 y 100 µm, las preparadas con almidón de amaranto y maíz waxy (a partir de dispersiones al 3,75 % p/v) presentaron espesores menores, entre 50 y 80 µm.

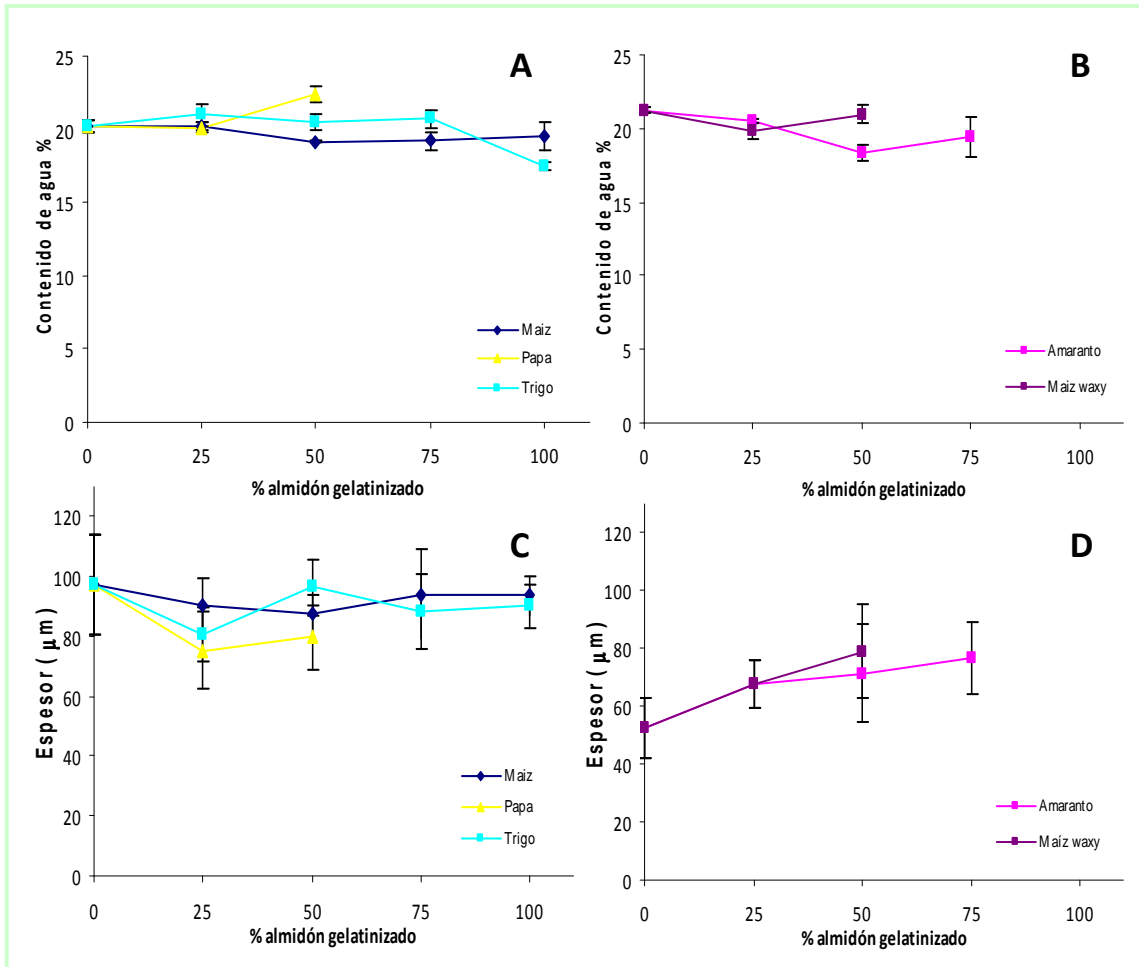


Figura III.3.2 A) y B) contenido de agua y C) y D) espesor de películas obtenidas a partir del aislado proteico y los almidones gelatinizados

En la **figura III.3.3** se muestran los parámetros de color (ΔE , a , b y L) de las películas obtenidas a partir del aislado proteico y los almidones gelatinizados. Se puede observar que al aumentar la proporción de almidón gelatinizado en la mezcla, disminuye la coloración general (menor ΔE), en forma proporcional al agregado de almidón. Esto era lo esperable, ya que las dispersiones de almidón son incoloras y las dispersiones proteicas son amarillentas. A su vez, no se observaron diferencias significativas entre los distintos almidones estudiados. El aporte a la diferencia de color fue dado principalmente por el cambio en el valor de a y b para las películas formuladas con almidón de maíz, papa y trigo, y solo en el valor de b , que disminuyó, para las películas obtenidas con almidón de maíz waxy y amaranto. En cambio la luminosidad no se modificó para ninguna de las formulaciones.

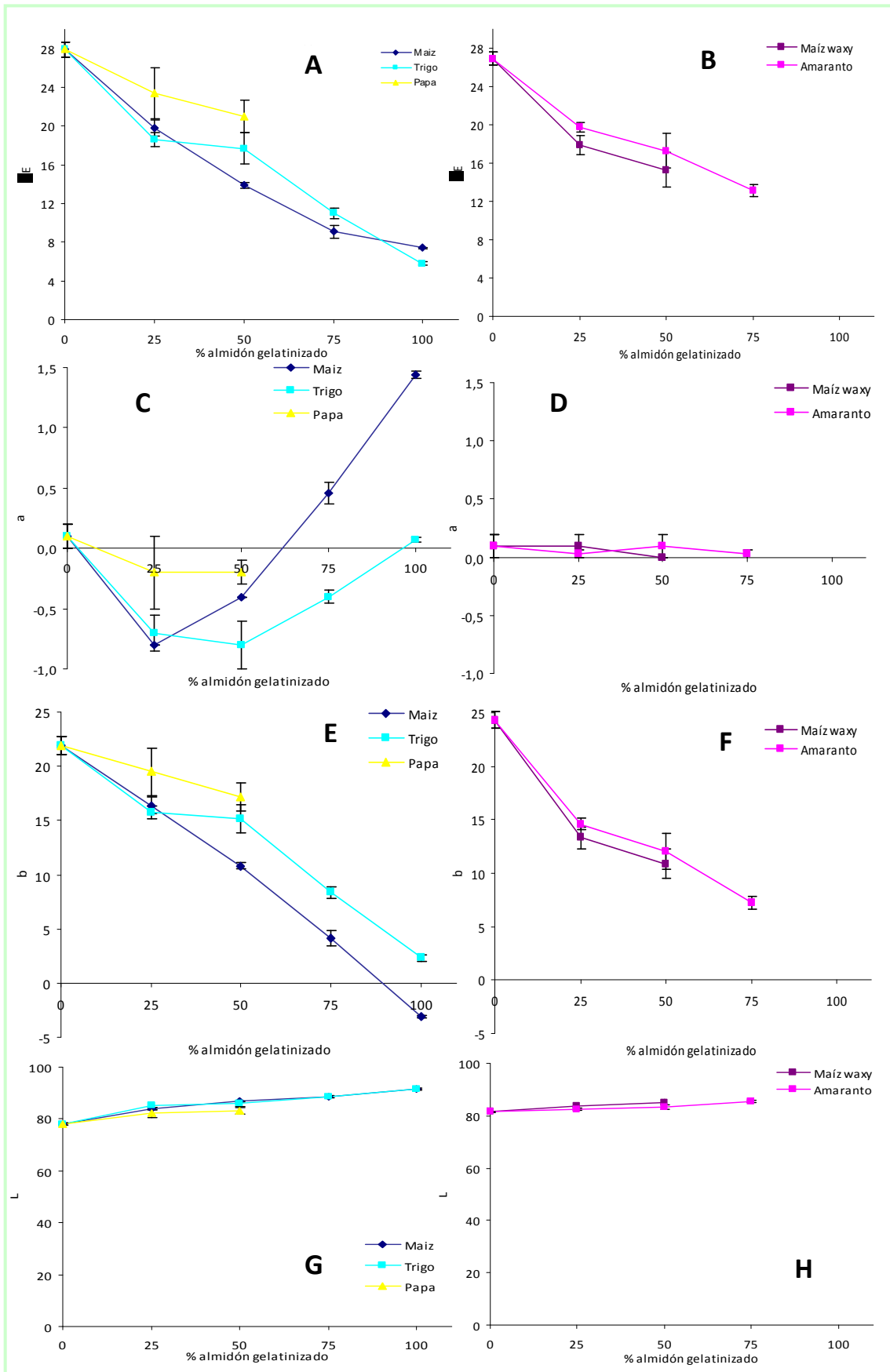


Figura III.3.3 Parámetros de color: A) y B) ΔE , C) y D) a, E) y F) b, y G) y H) L de películas obtenidas a partir del aislado proteico y los almidones gelatinizados

El aumento de la proporción de almidón de maíz o trigo gelatinizado produjo una disminución de la opacidad (**figura III.3.4**) con respecto a la película control, efecto más marcado a partir de la mezcla 50:50 para el almidón de trigo y 75:25 para el almidón de maíz. En cambio, para los almidones gelatinizados de maíz waxy, papa o amaranto, el efecto fue inverso, al aumentar la proporción de almidón en las mezclas, las películas resultaron más opacas. Esto podría estar reflejando una posible inmiscibilidad de las proteínas de amaranto con los almidones de papa, maíz waxy y amaranto, que coincide también con la imposibilidad de desmoldar la serie completa de películas formadas por estos componentes, como se mostró anteriormente.

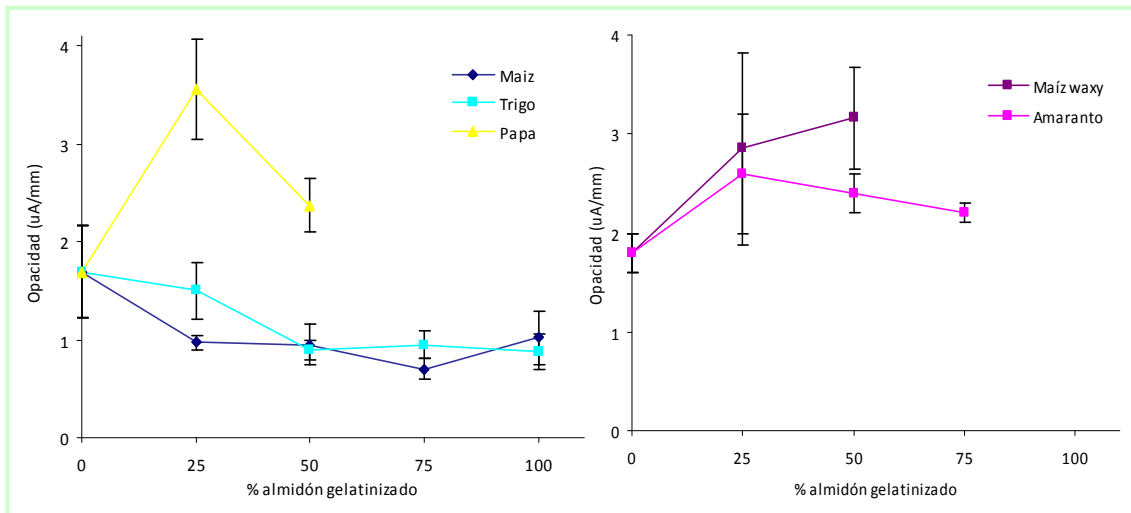


Figura III.3.4 Opacidad de películas obtenidas a partir del aislado proteico y los almidones gelatinizados

III.3.2.2.2 Susceptibilidad al agua

En la **figura III.3.5** se muestran los resultados de la permeabilidad al vapor de agua (WVP), la solubilidad en agua y la absorción de agua (AA) de las películas obtenidas a partir del aislado proteico y los almidones gelatinizados.

La permeabilidad al vapor de agua (**figura III.3.5 A y B**) disminuyó con el aumento de la proporción de almidón para algunos de los sistemas estudiados, en diferente magnitud según el origen botánico y el porcentaje de almidón agregado. La mayor disminución en la WVP, respecto de la película proteica control fue generada por el aumento de la proporción de almidón de trigo para todas las mezclas estudiadas. Todas las películas obtenidas con almidón de papa gelatinizado también disminuyeron su WVP, respecto

del control, pero en menor medida que las películas con agregado de almidón de trigo. En cambio, las películas formuladas con almidón de maíz waxy, amaranto y maíz no modificaron significativamente la permeabilidad al vapor de agua respecto de las películas control.

Días Alves y col. (2007) y García y col. (2009a) reportaron un aumento de la WVP en películas obtenidas a partir de almidón de mandioca al adicionar contenidos crecientes de amilosa, o al comparar películas de almidón de maíz waxy con películas de almidón de mandioca. García y col. (2009a) sugieren que dichas diferencias podrían ser atribuidas a la formación de regiones esféricas características de la amilopectina, como también a las regiones de alta cristalinidad remanente luego de la gelatinización en las películas de almidón de maíz waxy, lo que podría reducir la velocidad de difusión del vapor de agua. En cambio, Rindlav-Westling y col. (1998) mostraron que películas formuladas solo a partir de amilopectina mostraban mayor WVP que películas obtenidas solo a partir de amilosa, indicando que la amilopectina formaba poros de mayor tamaño que permitían el paso del vapor de agua. Este último resultado coincide con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ya que las películas formuladas con aislado proteico y almidones de papa o trigo (mayor amilosa) fueron las que presentaron menor WVP, aunque este comportamiento no se observó en las formulaciones con almidón de maíz, que era lo esperado ya que también posee alto contenido de amilosa, con lo cual podría suponerse que hay otras variables que podrían influenciar en el valor de este parámetro.

La solubilidad en agua de las películas mezcla (**figura III.3.5 C y D**) disminuyó al incrementar la proporción de almidón de maíz y trigo, respecto del control. Con el aumento de la proporción de almidón de papa, no se modificó el valor de solubilidad; y con el de almidón de maíz waxy y amaranto hasta la relación 50:50, la solubilidad aumentó. Estos resultados sugieren que las proteínas de amaranto interaccionan con los distintos almidones de manera diferente. Con trigo y maíz esas interacciones provocan una disminución de la solubilidad, con papa pareciera no afectar el entrecruzamiento frente a la solubilidad, mientras que la presencia de los almidones de tipo "waxy" parecieran interferir en el entrecruzamiento proteico favoreciendo la solubilización de los componentes.

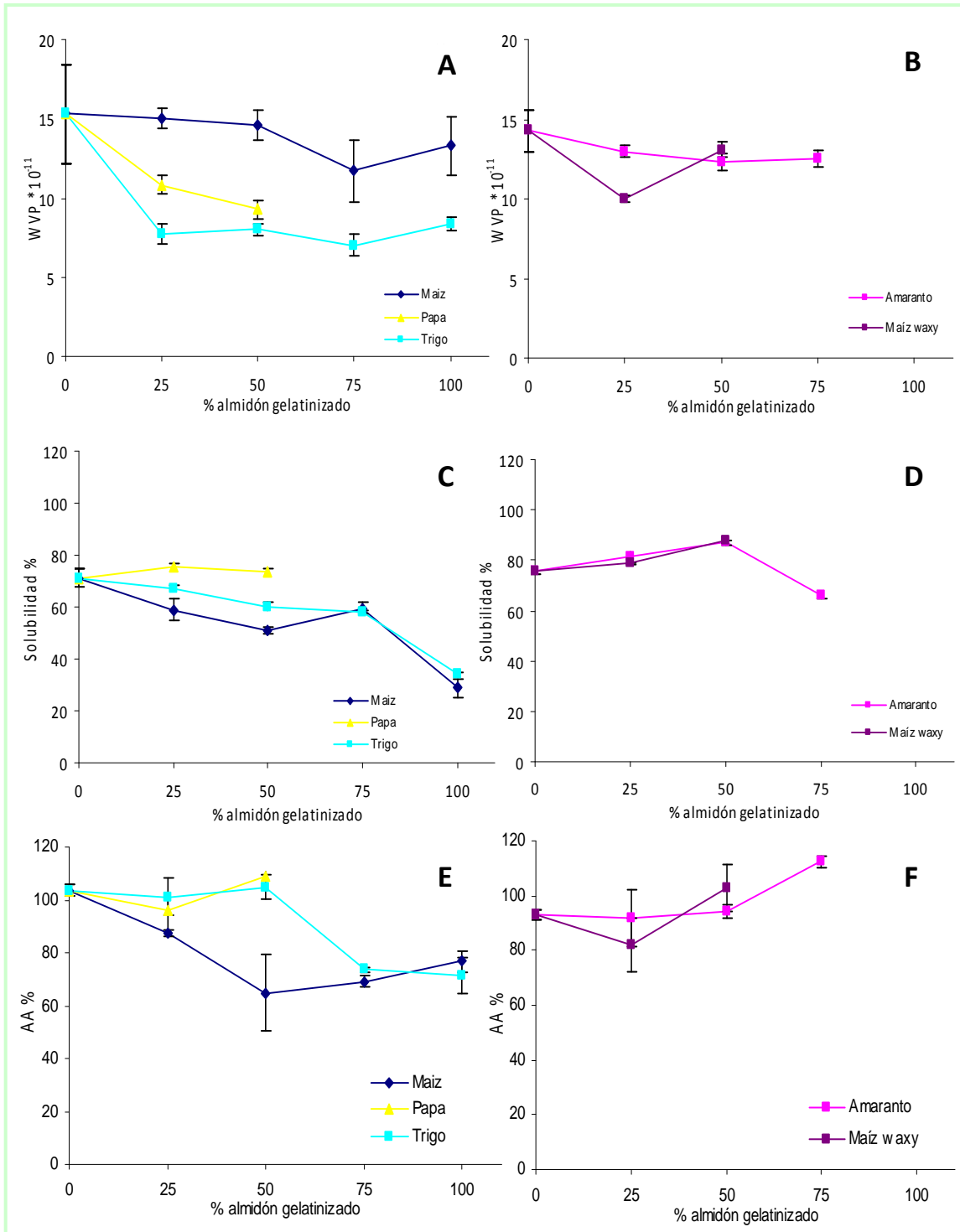


Figura III.3.5 A) y B) permeabilidad al vapor de agua (WVP), C) y D) solubilidad en agua, y E) y F) absorción de agua (AA) de películas obtenidas a partir del aislado proteico y los almidones gelatinizados

La absorción de agua (**figura III.3.5 E y F**) de las películas obtenidas a partir de aislado y almidón de maíz gelatinizado disminuyó para todas las formulaciones. También se observó una disminución de la absorción de agua a partir de la formulación aislado

proteico: almidón de trigo de 25:75. Para las películas obtenidas con los almidones de maíz waxy, amaranto o papa, no se observaron cambios significativos en el valor de la absorción de agua, excepto para el agregado de 75 % de almidón de amaranto gelatinizado donde la absorción de agua aumentó. Cabe resaltar que no fue posible obtener las películas formadas en su totalidad por estos últimos almidones, justamente por no poder desmoldarlas debido a su gran absorción de agua.

Se determinó el ángulo de contacto de las películas obtenidas a partir de mezclas de aislado proteico y almidón de trigo gelatinizado (**Tabla III.3.2**). Las películas mezclas y las formadas solo por almidón presentaron ángulos de contacto significativamente superiores a los de las películas proteicas control, sin observarse diferencias entre las distintas proporciones de almidón presentes en la formulación, lo que manifiesta una mayor hidrofobicidad superficial. Si bien los lípidos presentes en el almidón de trigo podrían contribuir a aumentar estas propiedades, sería de esperar un aumento del ángulo al incrementarse la proporción de almidón en las mezclas. Es evidente que existen otras razones que explican este comportamiento. El cambio conformacional de las proteínas al interactuar con las cadenas de glucosa, podría llevar a exponer a las cadenas más hidrofóbicas de las proteínas hacia la superficie, y esto en parte contribuir al aumento de la hidrofobicidad superficial.

En particular, la formación de películas mezcla entre proteínas de amaranto y almidón de trigo gelatinizado, mejora la susceptibilidad al agua de las películas proteicas, ya que estas películas mezcla presentan menor solubilidad, WVP, absorción de agua y mayor hidrofobicidad superficial que las películas proteicas de amaranto.

Tabla III.3.2 Ángulo de contacto de películas obtenidas a partir de aislado proteico y almidón de trigo gelatinizado

Aislado proteico: almidón de trigo gelatinizado	Ángulo de contacto (°)
100:0	47,6 ± 10,9 ^a
75:25	80,5 ± 3,3 ^b
50:50	86,7 ± 3,7 ^b
25:75	87,1 ± 5,2 ^b
0:100	83,9 ± 6,3 ^b

Los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

III.3.2.2.3 Propiedades mecánicas

En la **figura III.3.6** se muestran las propiedades mecánicas en tracción de las películas obtenidas a partir de mezclas de aislado proteico de amaranto y los almidones gelatinizados.

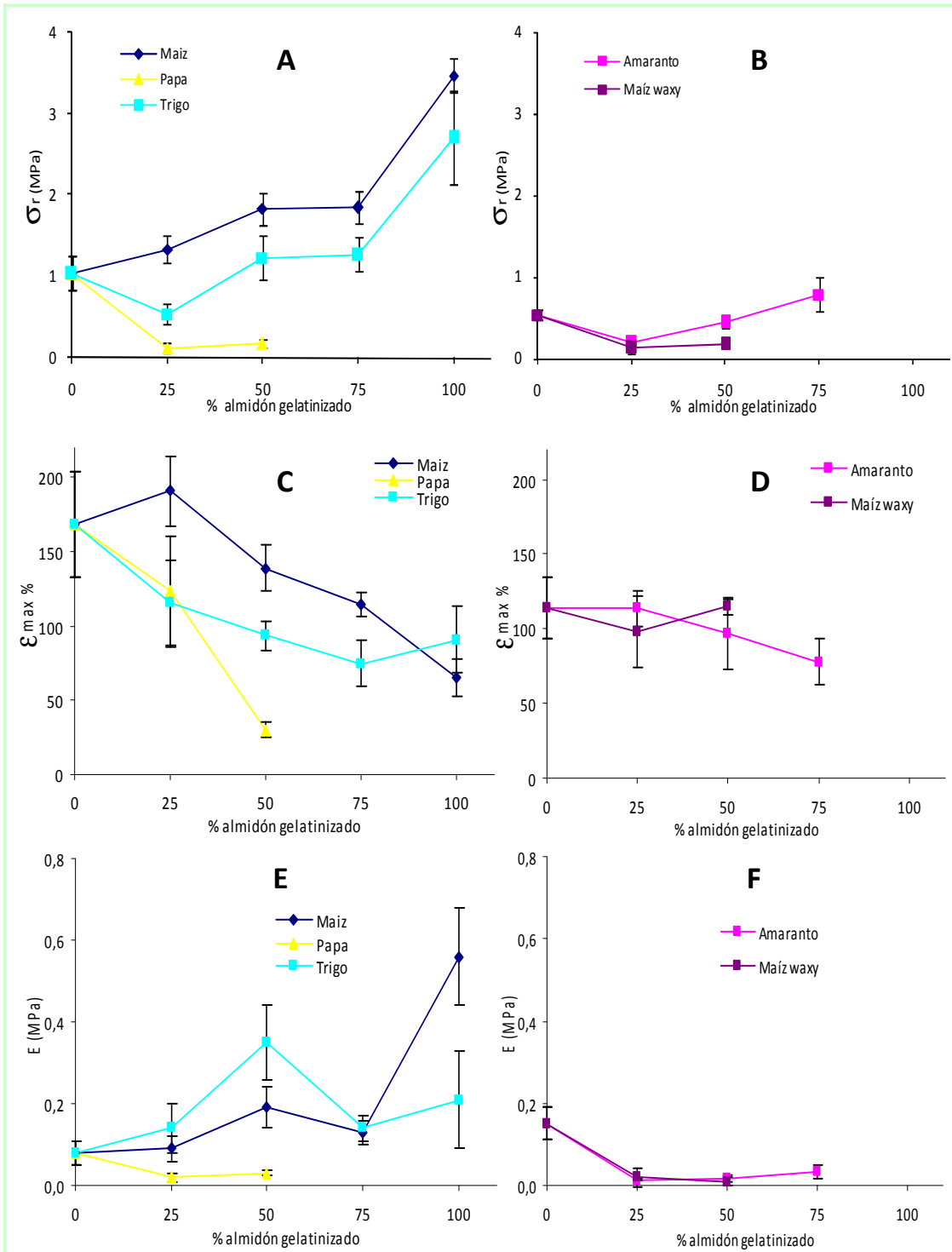


Figura III.3.6 A) y B) tensión a la ruptura (σ_r), C) y D) deformación a la ruptura (ϵ_{max}) y E) y F) módulo elástico (E) de películas formadas a partir del aislado proteico y los almidones gelatinizados, medidas en tracción

La tensión a la ruptura (σ_r) para las películas de aislado proteico aumentó con el incremento de la proporción de almidón de maíz agregado a la mezcla. El módulo elástico (E) mostró un aumento solo para la formulación con 100 % de almidón de maíz y la deformación máxima (ϵ_{max}) disminuyó cuando la proporción de almidón de maíz fue de 75 %. Con esto, se puede ver que el agregado de almidón gelatinizado de maíz produjo una mejora en las propiedades mecánicas, respecto de las películas control formuladas solo con aislado proteico de amaranto, y este efecto fue proporcional al aumento de la proporción de almidón gelatinizado en la mezcla. Con el almidón de trigo se observó una tendencia similar al almidón de maíz, pero no se observaron diferencias significativas en la resistencia de las películas obtenidas. Cabe señalar que para estos dos almidones y en las condiciones empleadas, las películas formuladas solo a partir de almidón presentan mejores propiedades mecánicas, con lo cual pareciera que el reemplazo de almidón por proteínas empeora las propiedades mecánicas, o desde otro punto de vista, las proteínas interferirían en la formación de la matriz de almidón.

En cambio, al aumentar la proporción de almidón de papa, amaranto o maíz waxy a las mezclas, no se observó el mismo efecto, ya que todos los parámetros estudiados disminuyeron o no mostraron cambios significativos. Y a diferencia del almidón de trigo y maíz, las películas formadas solo por almidón con las condiciones de procesamiento utilizadas, ni siquiera pudieron ser desmoldadas.

La mayor resistencia encontrada en las películas obtenidas a partir de proteínas y almidón de maíz o trigo coincide con la opacidad encontrada, ya que se espera menor opacidad cuanto más entrecruzada es la matriz formada.

Al estudiar la formación de películas de almidón por tecnologías diversas, usando almidones de distinto origen botánico -papa, maíz, poroto, mandioca, entre otros- varios autores han reportado que los almidones con mayor contenido de amilosa forman películas con mayor tensión a la ruptura y módulo elástico, y menor deformación (Lourdin y col., 1995; Muscat y col., 2012, Dias Alves y col., 2007); y lo atribuyeron a que la amilosa es capaz de formar una red muy estable, debido a la posibilidad de orientación molecular por su linealidad, lo que les permite formar películas más resistentes y densas (Rindlav-Westling y col., 1998).

Las películas mezcla aquí estudiadas están formuladas con almidones con distinto contenido de amilosa. De acuerdo con lo antes mencionado, las películas en base a proteínas y almidón de trigo o maíz gelatinizado, parecieran presentar mayor resistencia y menor elongación que las formuladas con almidón de amaranto o maíz waxy, con menor contenido de amilosa, aunque esta comparación queda supeditada a la diferente concentración de sólidos empleada.

Las películas mezcla formadas a partir de aislado proteico de amaranto y almidón de papa -que presenta un contenido de amilosa similar al del almidón de trigo y maíz- mostraron una funcionalidad mas parecida a las películas formuladas con los almidones "waxy" de amaranto y maíz (a pesar de estar formadas con distinto contenido de sólidos). Varios autores han reportado que la amilosa y los lípidos actúan protegiendo la estructura de los gránulos de almidón (Morrison y col., 1993). En particular el gránulo de papa, a pesar de su alto contenido de amilosa, presenta una alta fragilidad, ya que se rompe y solubiliza con facilidad (Hermansson y Svegmark, 1996; Swinkels, 1985). Por su parte, los de amaranto y maíz waxy, con menor contenido de amilosa y sin lípidos asociados también podrían presentar una alta fragilidad. Li y col. (2011) han reportado que en películas de almidón de maíz con mayor contenido de amilosa, además de ocurrir un mejor entrecruzamiento entre las largas cadenas de amilosa, la estructura remanente que queda luego de la gelatinización del almidón, ejerce un efecto de auto refuerzo, que mejora las propiedades mecánicas. Es decir, que los almidones con bajo contenido de amilosa o los que son muy frágiles frente a la gelatinización, no presentarían este comportamiento, lo que podría ser una razón que explique el comportamiento similar de los almidones de tipo "waxy" y del almidón de papa frente a las propiedades mecánicas.

III.3.2.2.4 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas

En la **figura III.3.7** se muestra la solubilidad diferencial en diferentes buffers de las proteínas presentes en las películas formuladas a partir de mezclas de aislado proteico y almidón de trigo, de modo de evaluar el efecto de las diferentes proporciones de almidón en las mezclas.

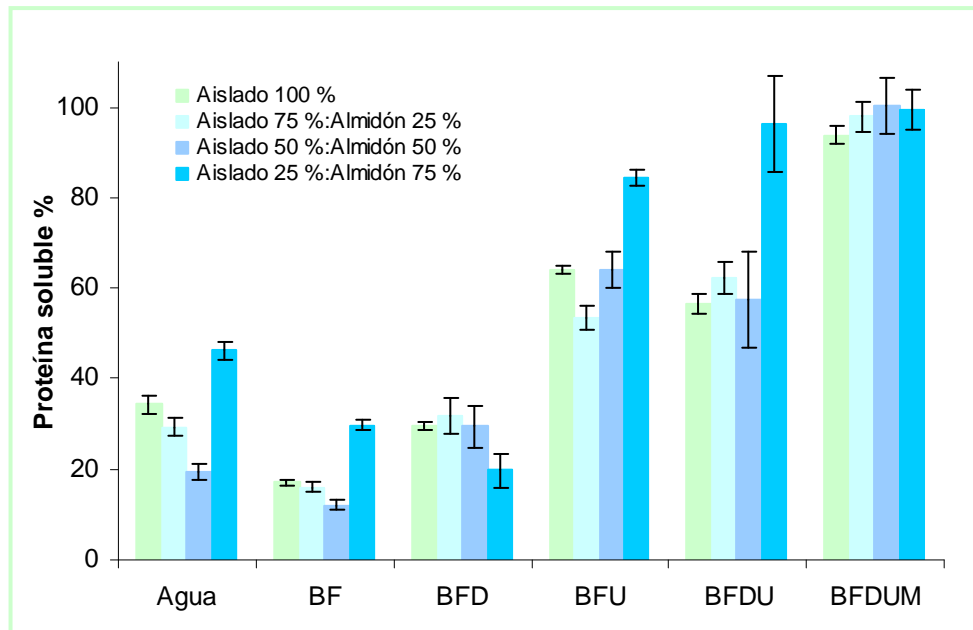


Figura III.3.7 Solubilidad diferencial de proteínas de películas obtenidas a partir del aislado proteico y almidón de trigo gelatinizado. Porcentajes de proteína soluble respecto a proteína total en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BFD), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BFDU), BFDU con 2-mercaptoetanol 2,5 % v/v (BFDUM), todos a pH 7,5

Las películas mezcla aislado proteico:almidón de trigo 75:25 y 50:50 mostraron un perfil de solubilidad diferencial similar entre ellas y diferente al de la película mezcla 25:75. Las dos primeras mezclas mostraron una baja liberación de las proteínas débilmente asociadas a la matriz, evidenciando posibles interacciones entre el almidón y la matriz proteica. En el resto de los buffers estudiados las películas de aislado proteico:almidón 75:25 y 50:50 no mostraron diferencias con la película control. Esto demuestra que tanto estas películas como la película control fueron estabilizadas principalmente por interacciones hidrofóbicas, puente hidrógeno y disulfuro (evidenciadas en el buffer con SDS, con urea y con 2-ME).

En cambio para la formulación aislado proteico:almidón de 25:75 el comportamiento de solubilidad fue muy diferente al control y a las otras formulaciones. Se evidenciaron mayor cantidad de polipéptidos libres no asociados a la matriz mediante la solubilidad en agua; mayor cantidad de uniones hidrofóbicas y se alcanzó la solubilidad total en el buffer con SDS y urea, lo que indica alta contribución de uniones puente hidrógeno, sin estabilización mediante uniones disulfuro (observado mediante el buffer con 2-ME). Evidentemente, esta película con 75 % de almidón está formada por una matriz principalmente compuesta por almidón que tiene las proteínas dispersas, y ambos

polisacáridos interactúan entre sí, más que las proteínas, evidenciado por la ausencia de uniones disulfuro.

Cabe aclarar que las diferencias encontradas en las uniones que estabilizan esta película control y la película control de la parte anterior de esta tesis, pueden deberse a que éstas películas control fueron formuladas a partir de un aislado proteico obtenido a partir de semillas de una cosecha diferente, y que las películas se obtuvieron colocando 15 mL de dispersión en el molde, en lugar de 10 mL.

Con el objetivo de ver como la naturaleza o el origen del almidón afecta las interacciones que puede formar con la matriz proteica, se analizó la solubilidad diferencial de todas las películas formadas por aislado proteico: almidón 50:50 (**figura III.3.8**).

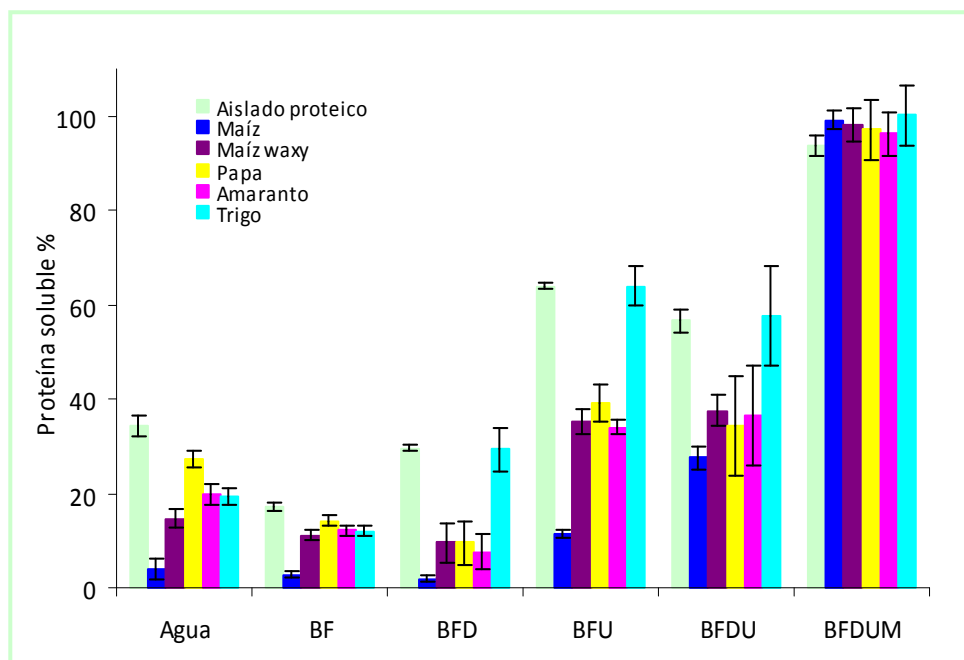


Figura III.3.8 Solubilidad diferencial de proteínas de películas obtenidas a partir del aislado proteico y almidones gelatinizados en relación 50:50. Porcentajes de proteína soluble respecto a proteína total en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BFD), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BFDU), BFDU con 2-mercaptoetanol 2,5 % v/v (BFDUM), todos a pH 7,5

Cabe señalar que todas las películas mezcla presentaron solubilidades en agua inferiores a las del control, indicando una menor existencia de péptidos libres débilmente ligados a la matriz lo que indicaría que la presencia de esta proporción de almidón estaría entrecruzando a estos materiales. En particular, las películas formadas

con almidón de maíz presentaron la menor solubilidad en agua y en todos los buffers analizados con excepción al que contenía 2-ME. Es evidente que en esta película el entrecruzamiento fue mayor, inclusive los puentes disulfuro tuvieron un papel preponderante en la estabilización de estas películas. Esto se corresponde con el incremento de la resistencia mecánica, la disminución de la solubilidad y la absorción de agua y una menor opacidad de estas películas. Las películas mezcla con almidón de trigo también presentaron un perfil de solubilidad diferencial distintivo. Las proteínas de estas películas presentaron solubilidades en buffer fosfato con SDS y con urea significativamente más altas que las correspondientes a las otras películas mezcla, pero similares al control, evidenciando una mayor importancia de las interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrogeno, además de los enlaces disulfuro en la estabilización de la película. Estas características se correlacionan con la mayor sensibilidad al agua que mostraron estas películas respecto del resto.

Por último, y en concordancia al comportamiento funcional observado anteriormente, las películas mezcla con almidones de papa, amaranto y maíz waxy, presentaron un perfil de solubilidades similar, con un comportamiento intermedio al presentado por trigo y maíz, del que se desprende que estas películas están estabilizadas por interacciones no covalentes (especialmente puentes de hidrogeno e hidrofóbicas), y covalentes (puentes disulfuro), con la única diferencia que las películas formuladas con almidón de papa fueron las que presentaron la mayor solubilidad en agua respecto de todas las otras películas mezcla.

No pareciera haber una relación directa entre el perfil de interacciones que estabilizan la matriz con el contenido de amilosa.

III.3.2.2.5 Microestructura

En la **figura III.3.9** se muestra la microestructura del corte transversal de las películas de aislado proteico, de almidón de trigo gelatinizado, y de las distintas mezclas de estos biopolímeros, obtenida mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).

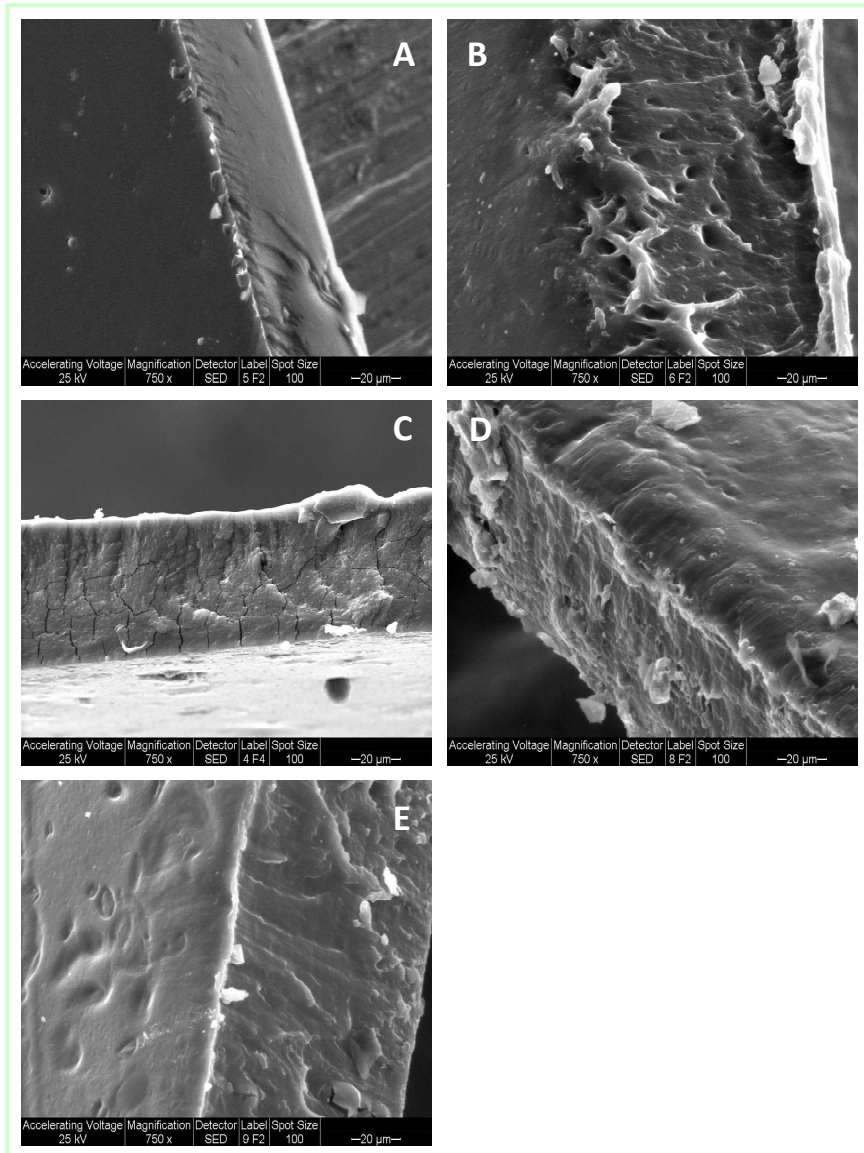


Figura III.3.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM) (amplificación 750) de la sección transversal crio-fracturada de películas obtenidas a partir del aislado proteico y almidón de trigo gelatinizado en distintas formulaciones aislado: almidón: A) 0:100, B) 75:25, C) 50:50, D) 25:75 y E) 0:100

Las películas proteicas y las de de trigo gelatinizado (**figura III.3.9 A y F**) se presentan como matrices densas sin poros, con características diferenciales, como la estructura más lisa o uniforme típica de los materiales proteicos. En cambio, las películas mezclas (**figura III.3.9 B, C y D**) presentaron estructuras intermedias entre las dos matrices obtenidas a partir de los componentes por separado. En particular en la formada con 25 % de almidón de trigo gelatinizado (**figura III.3.9 B**) se observó una estructura más inhomogénea, con la aparición de poros, lo cual podría explicar la disminución de la tensión a la ruptura observada en la película preparada con esta formulación. Si esto representara una generalidad podría estar indicando que, a bajas proporciones de

almidón, éste, si bien interacciona con la proteína (disminuyendo su solubilidad), todavía no es posible formar una matriz interpenetrada de ambos biopolímeros, como se observa con mayores proporciones de almidón agregados a la formulación, lo que incorpora a la matriz proteica algunas imperfecciones. Pero cabe señalar que esta situación no pareciera ocurrir cuando la proteína es el componente minoritario, posiblemente debido a la naturaleza globular nativa y flexible de estas proteínas, que podrían ubicarse o reacomodarse mejor en la matriz de almidón.

También se analizó la microestructura del corte transversal de todas las películas mezcla obtenidas a partir de dispersiones aislado proteico:almidones gelatinizados 50:50 (figura III.3.10).

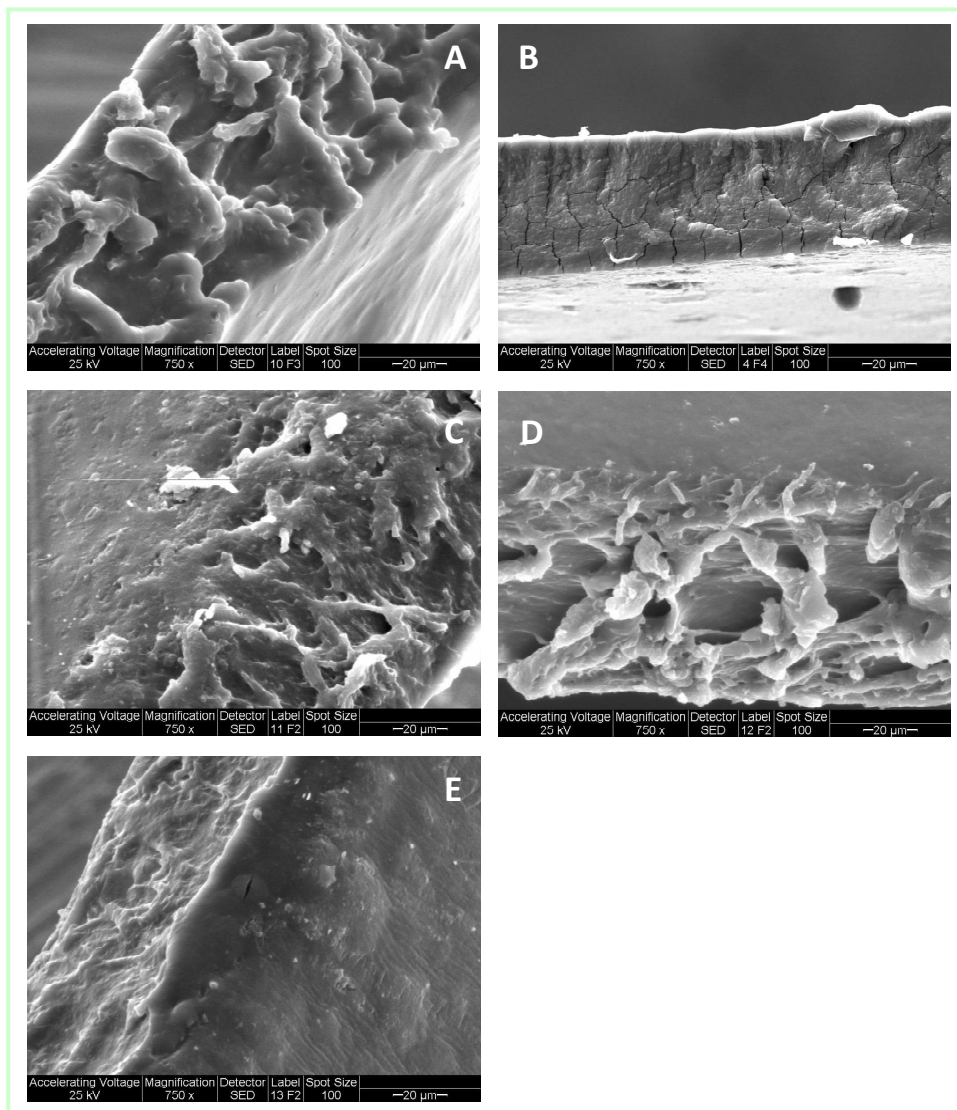


Figura III.3.10 Microscopía electrónica de barrido (SEM) (amplificación 750) de la sección transversal crio-fracturada de películas obtenidas a partir del aislado proteico y almidones gelatinizados de A) papa, B) trigo, C) maíz, D) maíz waxy y E) amaranto, en relación 50:50

Las imágenes mostradas en la **figura III.3.10** sugieren que las matrices formadas con almidones de distinto origen botánico son diferentes, lo que coincide con la funcionalidad antes analizada. La película preparada con almidón de trigo (**figura III.3.10 B**), parece ser la más homogénea y densa, la que contiene almidón de maíz (**figura III.3.10 C**) presenta una estructura menos uniforme y más fibrosa, con la existencia de poros. Esta estructura da idea de una matriz más resistente y menos soluble, pero no tan interesante como barrera al vapor de agua.

Las películas constituidas por aislado proteico y almidones de papa y maíz waxy (**figura III.3.10 A y D**) presentaron estructuras redondeadas en el corte transversal, que dan idea de matrices menos densas. Es difícil analizar la imagen de la película formada con almidón de amaranto (**figura III.3.10 E**), ya que la imagen está sacada desde otro ángulo, y pareciera observarse más alejada, sin lograrse diferenciar si algunas de las irregularidades blancas podrían llegar a ser similares a las que se observan con almidones de papa y maíz waxy o si se trata de una superficie más uniforme.

III.3.3 Conclusión

Los sistemas proteína de amaranto y almidón gelatinizado son compatibles, ya que logran formar dispersiones y películas mezcla ('blends') homogéneas a pesar que algunas no pudieron desmoldarse.

Las proteínas de amaranto interaccionan de forma diferencial con los almidones gelatinizados de distinto origen botánico, ya que fue posible mejorar la funcionalidad de películas proteicas de amaranto a partir de la incorporación a la formulación de almidones gelatinizados de trigo y maíz, pero no se observó el mismo efecto con los almidones de papa, maíz waxy y amaranto.

Si bien las mezclas de las proteínas con los almidones de trigo y maíz permitieron obtener películas con mejores propiedades, las que tenían almidón de trigo mejoraron en mayor magnitud las propiedades relacionadas con la sensibilidad al agua (solubilidad, WVP y absorción de agua), y las que contenían almidón de maíz mejoraron especialmente las propiedades mecánicas. Asimismo, ambas disminuyeron la opacidad y la coloración de las películas mezcla respecto de las proteicas. Este comportamiento diferencial pudo atribuirse al tipo de interacciones que mantienen a las proteínas unidas en las distintas matrices y a su microestructura. En el caso del almidón de trigo las interacciones hidrofóbicas, puente hidrógeno y enlaces disulfuro fueron las mas importantes, formando una matriz densa, mientras que en las películas con almidón de maíz, los puentes disulfuro tuvieron un papel preponderante junto con los puente hidrógeno, formando matrices mas resistentes.

Las diferencias observadas entre el comportamiento de los almidones de maíz y trigo con papa, maíz waxy y amaranto podría atribuirse a la mayor resistencia de estos gránulos debido al efecto protector de la amilosa y los lípidos, ya que aun gelatinizados podrían conservar parte de su estructura (estructura remanente) que ejercería un efecto auto refuerzo sobre las películas logrando mejorar la funcionalidad.

De las características que diferencian a los distintos almidones, las propiedades observadas en las películas estudiadas en este capítulo pueden haber sido

influenciadas por la relación amilosa:amilopectina o por la presencia de lípidos o fósforo de los respectivos almidones, sin afectar directamente el tamaño o morfología de sus gránulos, ni el tipo y grado de cristalinidad.

Teniendo también en cuenta los resultados de los capítulos II.3 y II.4, es de esperar que la formación de películas mezcla a partir de proteínas de amaranto desnaturalizadas y almidones gelatinizados sea una alternativa interesante para lograr obtener materiales con mejores propiedades.

III.4 Películas en base a proteínas de amaranto y gránulos de almidón utilizados como refuerzo

Las características de los gránulos de almidón, su naturaleza semicristalina, forma esférica-poligonal y composición diferencial en amilosa-amilopectina -dependiente de su origen botánico- sugieren la posibilidad de utilizarlos como micropartículas de refuerzo. De manera que sería posible formar películas mezcla a partir de proteínas de amaranto y gránulos de almidón, distintas a las estudiadas en el capítulo anterior. Entre los refuerzos agregados a matrices proteicas con el fin de mejorar especialmente sus propiedades mecánicas pueden citarse principalmente las fibras de vidrio, las fibras vegetales o las de celulosa (Beg y col., 2005, Liu y col., 2004 y 2005, Salgado y col., 2008). También pueden mencionarse las películas emulsionadas proteína-lípidos (Krochta, 2002), como sistemas particulados, formados con la finalidad de mejorar la sensibilidad al agua de las películas proteicas.

Generalmente, el agregado de un refuerzo a un material polimérico es más efectivo cuanto menor tamaño tienen las partículas, más homogéneamente distribuidas están en la matriz y mayor es la interacción entre la partícula y la matriz (Callister y Rethwisch, 2009).

El uso de gránulos de almidón como refuerzo no ha sido muy estudiado. Por ejemplo, Chen y col. (2008) mostraron la formación de películas a partir de polivinilalcohol y gránulos nativos de almidón, pero por el proceso que utilizaron es difícil suponer que el almidón se haya mantenido sin gelatinizar. Reis y col. (2008) estudiaron el agregado de gránulos de almidón de maíz a matrices de polihidroxibutirato-hidrovalerato (PHB-HV) preparadas por *casting* como alternativa para disminuir el costo de los materiales formados por polihidroxialcanoatos. En estas películas observaron una disminución del 50 % de la elongación y del 90 % de la tensión a la ruptura y del módulo elástico con el agregado de 50 % de gránulos de almidón, que lo atribuyeron a la inmiscibilidad del PHB hidrofóbico y del almidón hidrofílico, ya que comprobaron la ausencia de interacciones entre ambos componentes por FTIR (Reis y col., 2008).

Teniendo en cuenta que las proteínas utilizadas en este trabajo también son de naturaleza hidrofílica, es de esperar que estas sí sean compatibles con los gránulos de almidón, como lo fueron con los distintos almidones gelatinizados estudiados en el capítulo anterior. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue estudiar el posible refuerzo de películas proteicas de amaranto mediante el agregado de gránulos de almidón, y analizar como las variables diferenciales de los almidones de distinto origen botánico (tamaño, forma, cristalinidad) podrían afectar el efecto refuerzo alcanzado.

III.4.1 Materiales y métodos

III.4.1.1 Materiales

Como materias primas se utilizaron: aislado proteico de amaranto denominado A11, cuya obtención se describió en la sección III.3.1.1; almidones comerciales de papa (Anedra, Argentina), maíz, maíz waxy y trigo (Sigma-Aldrich, Alemania); y almidón de amaranto obtenido a partir de las semillas, como se describió en la sección III.2.1.2 y caracterizados como se describió en la sección III.2.1.3.

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de pureza analítica.

III.4.1.2 Obtención de películas a partir de aislado proteico de amaranto y gránulos de almidón

Las películas se obtuvieron por *casting* a partir de dispersiones de aislado proteico A11 y gránulos de almidón de distinto origen. Se trabajó con dispersiones de aislado A11 al 5 % p/v y glicerol al 25 % p/p respecto del aislado (usado como plastificante), a las cuales se les adicionó distintas cantidades de almidón nativo: 0, 2,5, 5, 10, 20 o 30 g de almidón por cada 100 g de aislado. Las dispersiones se formaron agitando en forma magnética los componentes durante 1 hora a temperatura ambiente, ajustando el pH a 10,5 y volviendo a agitar por otros 30 minutos. Posteriormente, 10 mL de las dispersiones formadoras de películas fueron colocados en placas de Petri de poliestireno (64 cm²) y secadas en una estufa con convección forzada (Yamato, DKN600, Estados Unidos) a 40 °C durante 4,5 horas intentando evitar la gelatinización del almidón durante el procesamiento de las películas. Las películas resultantes se acondicionaron a 20 °C y 58 % de humedad relativa (solución saturada de NaBr) durante 48 horas previamente a su caracterización. Todos los estudios se realizaron al menos con dos tandas de películas formadas independientemente.

III.4.1.3 Caracterización de las películas

Las películas obtenidas a partir del aislado A11 y los gránulos de almidón fueron caracterizadas mediante la determinación del contenido de agua, espesor, opacidad, color, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, absorción de agua, propiedades mecánicas, ángulo de contacto y solubilidad diferencial de proteínas,

como se describió en la sección II.3.1.5. Además se realizó la microscopía óptica de las películas, como se describe a continuación.

III.4.1.3.1 Microscopía óptica

Las películas se caracterizaron mediante microscopía óptica con luz polarizada, tomando una porción de la película y colocándola entre cubre y portaobjetos. Se observaron en un microscopio Leica DMLB (Leica Microsystems, Alemania) asociado a una cámara fotográfica digital DC100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Suiza), con un aumento total de 63X.

III.4.1.4 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el Test de Fisher de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0,05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

III.4.2 Resultados y discusión

III.4.2.1 Determinación de la temperatura de secado de las películas

Teniendo en cuenta que en este trabajo, las películas de amaranto se prepararon a partir de dispersiones de estas proteínas a pH 10,5, se analizó el efecto de esta condición de pH sobre la temperatura de gelatinización de los almidones con el fin de seleccionar condiciones de procesamiento apropiadas para el objetivo de este capítulo. En la **Tabla III.4.1**, se muestran las temperaturas de gelatinización (T_{gel}) de los almidones de distinto origen botánico a pH 10,5, y se los compara con los valores correspondientes a pH neutro previamente mostrados en la **Tabla III.2.2** de la sección III.2.2.4.

Tabla III.4.1 Temperatura de gelatinización (T_{gel}) de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto a pH 7 y 10,5

	Papa	Trigo	Maíz	Maíz waxy	Amaranto
T_{gel} (°C) pH 7,0	53,4 ± 1,2 ^a	62,7 ± 0,7 ^a	71,0 ± 0,1 ^a	71,9 ± 0,2 ^a	73,5 ± 0,3 ^a
T_{gel} (°C) pH 10,5	54,8 ± 0,1 ^a	69,4 ± 0,7 ^b	71,2 ± 0,4 ^a	74,2 ± 0,3 ^b	78,8 ± 0,6 ^b

En columnas, los valores de T_{gel} con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

A pH 10,5 la temperatura de gelatinización de los almidones de trigo, amaranto y maíz waxy aumentó significativamente respecto de las temperaturas a pH neutro, indicando una mayor estabilidad de estos almidones frente al tratamiento térmico en medio alcalino, no observándose estas modificaciones para los almidones de papa y maíz. A partir de estos resultados se estipuló la temperatura de secado de las películas analizadas en este capítulo en 40 °C, con el fin de mantener la integridad de los gránulos dispersos en la matriz proteica, durante la formación de las películas.

III.4.2.2 Obtención y caracterización de películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y gránulos de almidón

Si bien todas las dispersiones filmogénicas resultaron homogéneas y estables, solo fue posible obtener películas homogéneas a partir de formulaciones en base a aislado

proteico y contenidos variables de almidones de amaranto y papa (0-30 % p/p), y con el agregado de almidones de trigo, maíz y maíz waxy menores al 5 % p/p (Tabla III.4.2). Para concentraciones superiores de estos almidones (10, 20 o 30 % p/p) fue posible formar matrices cohesivas que se partían antes de finalizar el secado y poder desmoldar las películas debido a un secado inhomogéneo de distintas porciones de las películas (figura III.4.1). Para estas formulaciones se intentó modificar las condiciones de secado sin lograr resultados favorables.

Tabla III.4.2 Películas compuestas formadas a partir de aislado proteico y gránulos de almidón: + películas homogéneas que pudieron obtenerse sin dificultad, - películas que se rompieron antes de finalizar el periodo de secado

Almidón (% p/p de aislado)	0	2,5	5	10	20	30
Papa	+	+	+	+	+	+
Trigo	+	+	-	-	-	-
Maíz	+	+	-	-	-	-
Maíz waxy	+	+	-	-	-	-
Amaranto	+	+	+	+	+	+

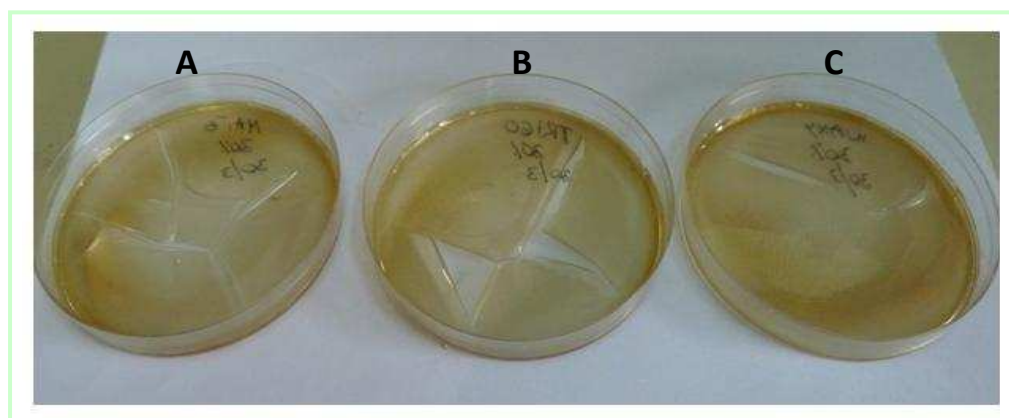


Figura III.4.1 Películas de aislado proteico y almidón de A) maíz, B) trigo y C) maíz waxy al 30 % p/p

En la figura III.4.2 se muestra una película de aislado proteico de amaranto y 30 % p/p de gránulos de almidón de maíz a modo de ejemplo. La película presenta zonas de apariencia visual diferente: algunas porciones homogéneas (A), otras en las que se logra ver separación de fases (B), y otras con comportamiento intermedio (C). La observación de estas zonas mediante microscopía óptica sugiere la distribución

inhomogénea de los gránulos de almidón en la matriz proteica. La microestructura de la película en la zona B pareciera evidenciar cierta aglomeración de los gránulos.

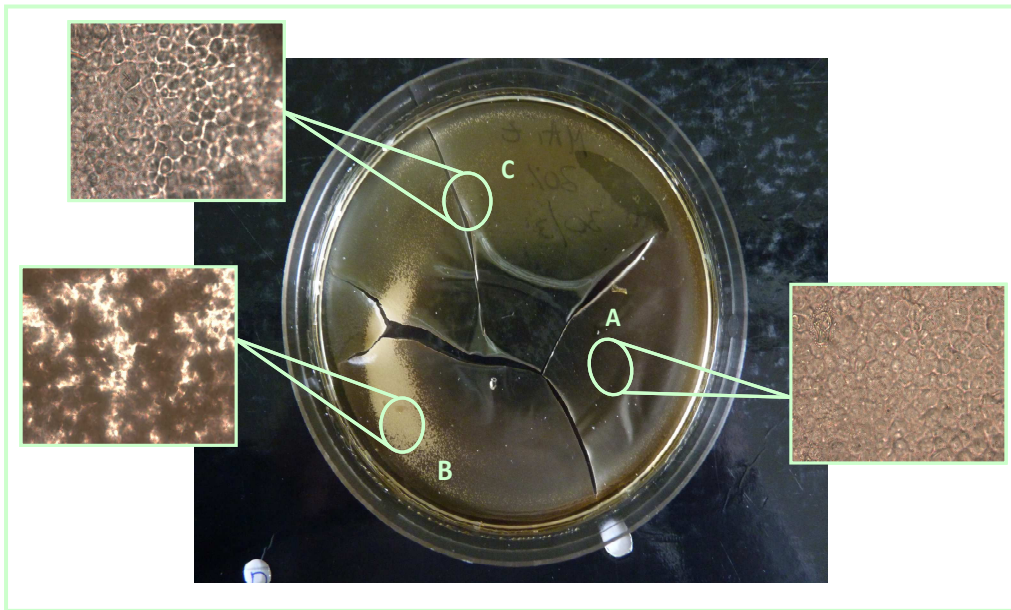


Figura III.4.2 Película de aislado proteico y almidón de maíz al 30 % p/p y microscopía óptica de diferentes zonas de la película

En la **figura III.4.3** se muestra el espesor de todas las películas formuladas a partir de aislado proteico y gránulos de almidón. Las películas mostraron espesores entre 50 y 70 μm , sin diferencias significativas entre los almidones de distinto origen y del porcentaje de gránulos de almidón agregado.

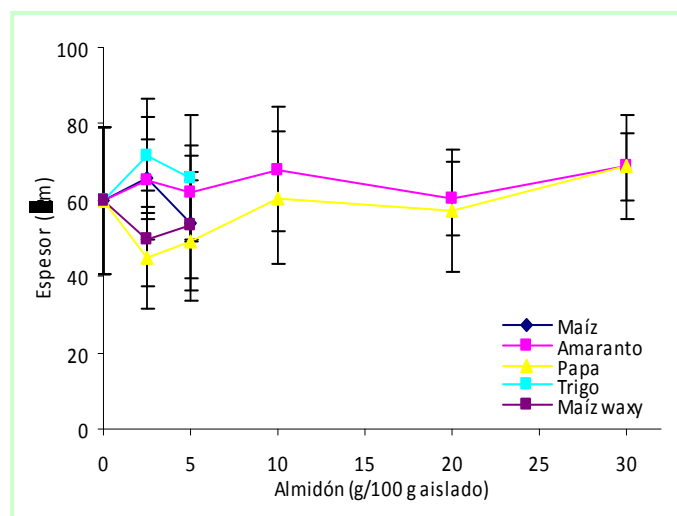


Figura III.4.3 Espesor de películas proteicas de amaranto y gránulos de almidón

III.4.2.2.1 Microestructura

En la **figura III.4.4** se observa la superficie de las películas de aislado proteico de amaranto con el agregado de 5 % p/p de almidones de distinto origen botánico, obtenidas mediante microscopía óptica con y sin luz polarizada.

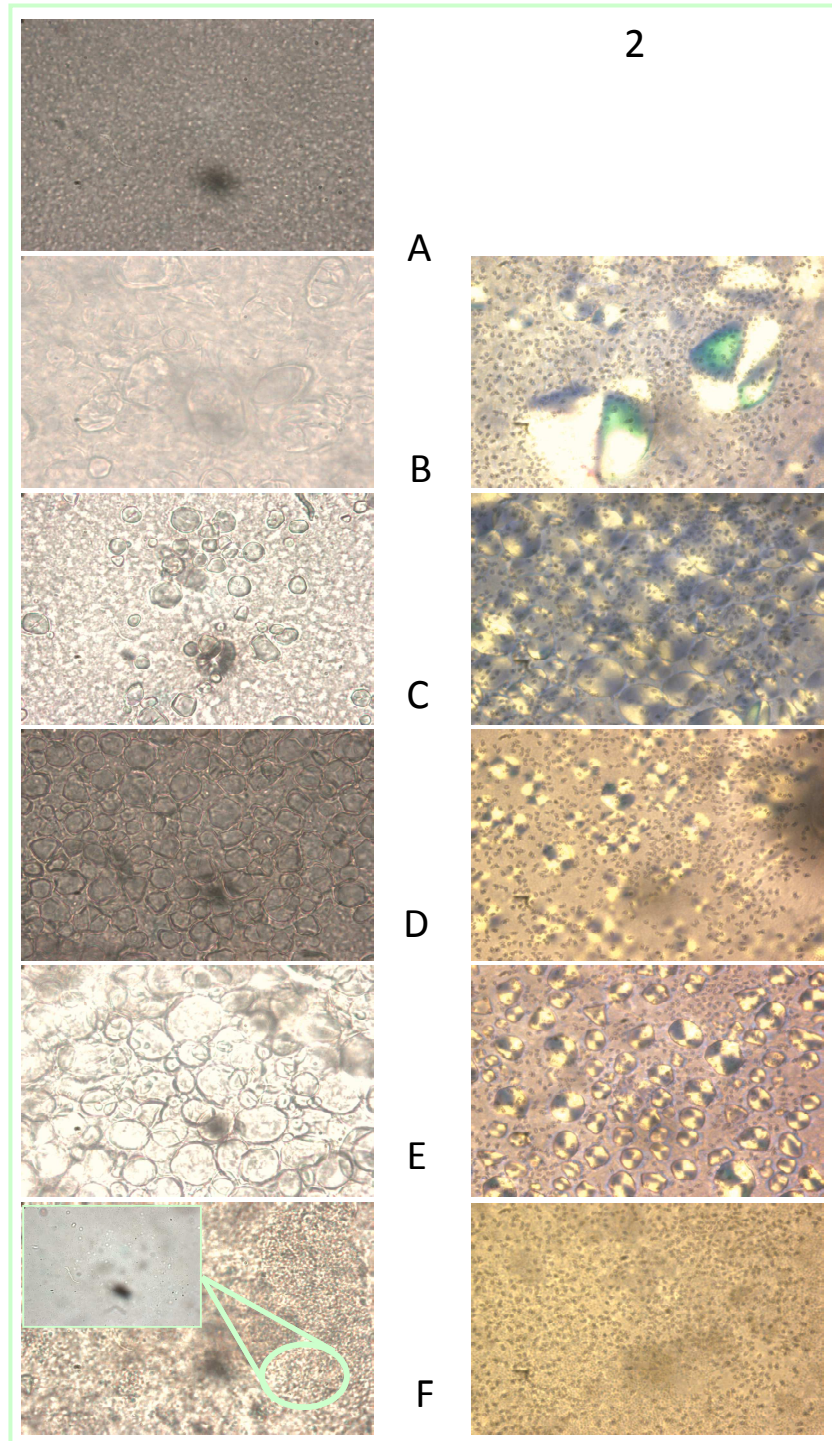


Figura III.4.4 Microscopía óptica (63 X y 100 X) 1) sin y 2) con luz polarizada de la superficie de películas obtenidas a partir de A) aislado proteico, y con el agregado de 5 % p/p de gránulos de almidón de B) papa, C) trigo, D) maíz, E) maíz waxy y F) amaranto

Las microscopías ópticas demuestran que el proceso empleado fue el adecuado para obtener películas que consisten en una matriz proteica con gránulos de almidón dispersos en esa matriz. El hecho de observar la cruz de malta en los gránulos de almidón es indicativo de que la gelatinización no ocurrió, demostrando la conservación de su estado semicristalino. En las películas obtenidas a partir de aislado proteico y almidón de amaranto (**figura III.4.4 F**) se muestra una foto con mayor aumento para evidenciar la presencia de los gránulos, aunque no se observa la cruz de malta debido a la baja resolución del microscopio.

En la **figura III.4.5** se observan las microscopías ópticas de las películas de aislado proteico y almidón de papa en distintas concentraciones. Se puede evidenciar la distribución de los gránulos de almidón en la matriz proteica y cierta compatibilidad de ambos polímeros.

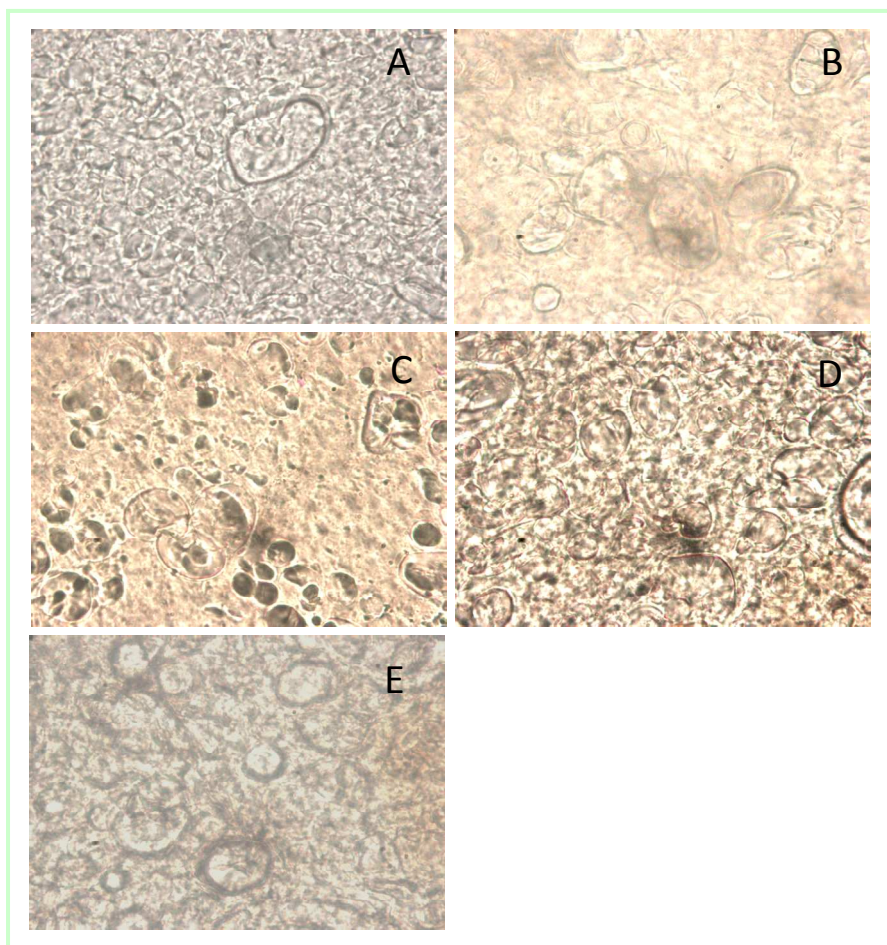


Figura III.4.5 Microscopía óptica (63X) de la superficie de películas obtenidas a partir de aislado proteico y gránulos de almidón de papa al A) 2,5, B) 5, C) 10, D) 20 y E) 30 % p/p

III.4.2.2.2 Susceptibilidad al agua

En la **figura III.4.6** se muestra el contenido de agua de las películas, el cual se mantuvo constante, alrededor de 19-20 % p/p, para todos los porcentajes agregados de gránulos de almidón de amaranto, maíz, maíz waxy y trigo. En cambio a partir del agregado de 10 % p/p de gránulos de almidón de papa, el contenido de humedad disminuyó progresivamente con el aumento de la concentración de gránulos respecto de la película proteica control.

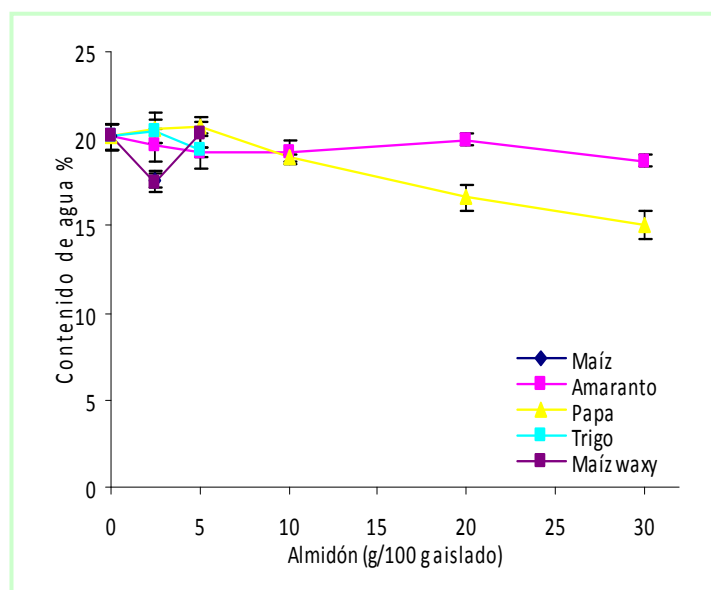


Figura III.4.6 Contenido de agua de películas proteicas de amaranto reforzadas con gránulos de almidón

En la **figura III.4.7** se muestran los resultados de la permeabilidad al vapor de agua (WVP), la solubilidad en agua y la absorción de agua (AA) de las películas formadas por la matriz proteica y los gránulos de almidón.

La permeabilidad al vapor de agua de las películas compuestas no mostró variaciones importantes respecto de la película proteica, con el agregado de cantidades crecientes de gránulos de almidón.

Todas las películas estudiadas presentaron alta solubilidad en agua. Solo con la adición de gránulos de papa, se observó una disminución progresiva de la solubilidad respecto del control, que se hizo significativamente diferente a partir del agregado de 10 % p/p de almidón. Para los agregados de almidón de maíz, maíz waxy, trigo y amaranto se observó una leve tendencia en aumento de la solubilidad.

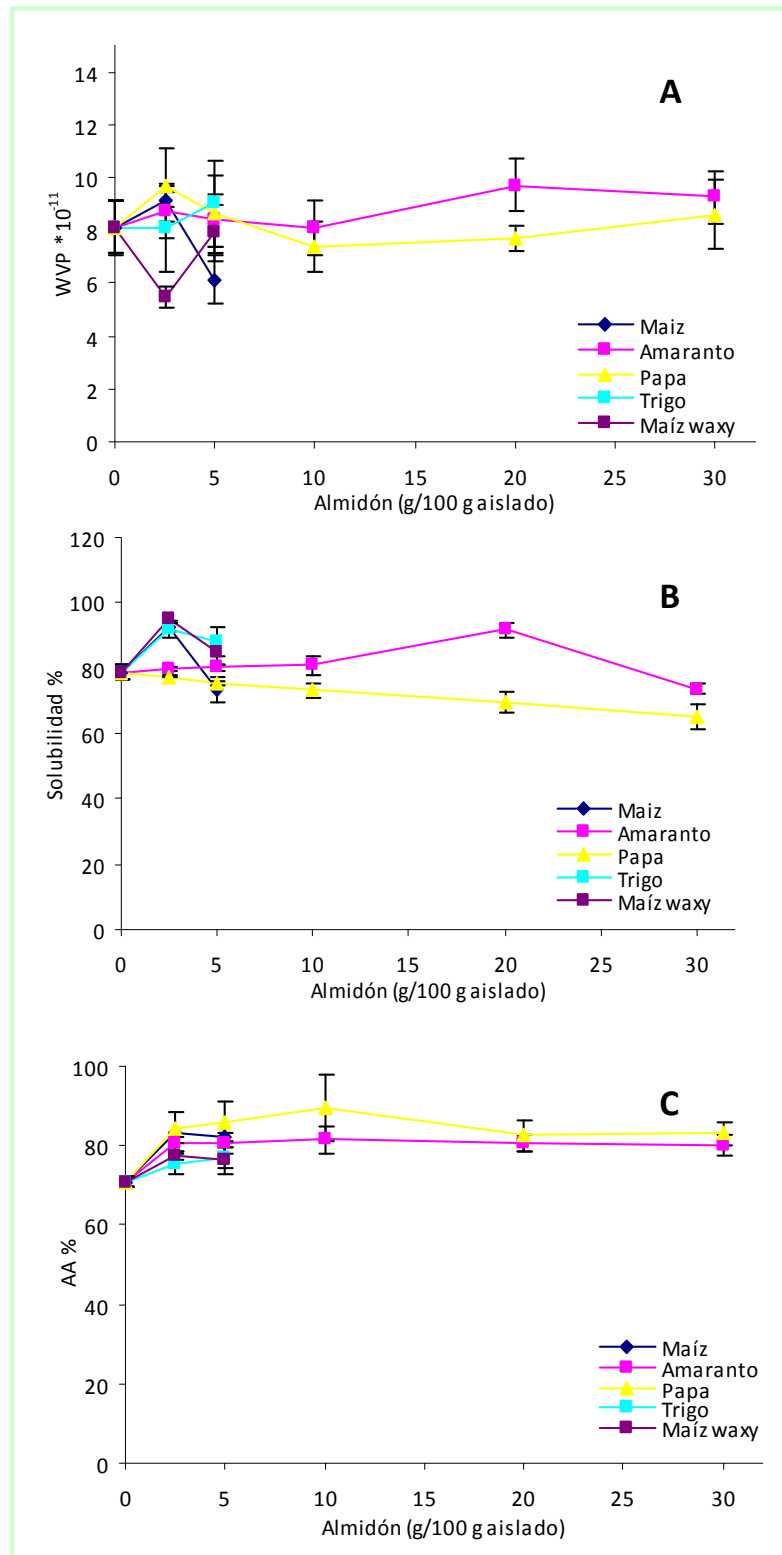


Figura III.4.7 A) Permeabilidad al vapor de agua (WVP), B) solubilidad en agua y C) absorción de agua (AA) de películas obtenidas a partir del aislado proteico y gránulos de almidón

La absorción de agua de las películas mostró un aumento para todas las formulaciones evaluadas respecto de la película control, con el agregado de los gránulos de almidón

independientemente de la concentración y origen del almidón. El aumento podría atribuirse a la capacidad de los gránulos de absorber agua, pero es evidente que existe algún otro factor afectando esta propiedad ya que el aumento no es progresivo con la concentración.

Se realizó la medida del ángulo de contacto de las películas obtenidas a partir del aislado y los gránulos de almidón de papa, como se muestra en la **Tabla III.4.3**.

Tabla III.4.3 Ángulo de contacto de películas obtenidas a partir de aislado proteico y almidón de papa.

Almidón de papa (% p/p)	Ángulo de contacto (°)
0	89,5 ± 7,0 ^a
10	79,9 ± 5,5 ^a
20	84,2 ± 4,4 ^a
30	77,6 ± 4,6 ^a

Los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

El agregado de almidón de papa a la matriz proteica no provocó diferencias significativas en el ángulo de contacto de las películas, aunque pareciera haber cierta tendencia a la disminución, es decir a bajar la hidrofobicidad superficial de las películas.

Cabe resaltar que al formular la dispersión formadora de películas, la masa de glicerol fue agregada respecto de la masa de proteína, por lo que debido al aumento del contenido de gránulos de almidón en la formulación, el contenido de plastificante respecto de la masa total fue disminuyendo. En general, una disminución de la concentración de plastificante va acompañada de disminuciones en la WVP y en la solubilidad.

El hecho que el agregado de gránulos de almidón de maíz, maíz waxy, trigo y amaranto no mostraron modificaciones importantes en el contenido de agua, ni en la permeabilidad, aunque si un leve aumento en la solubilidad y en la absorción de agua independiente de la concentración de los gránulos, daría indicio de que la presencia de los gránulos no está cambiando la naturaleza de la matriz proteica, y probablemente tampoco la interacción entre la proteína y el glicerol. En síntesis, se podría pensar que

no hay un efecto marcado en la mejora de las propiedades de susceptibilidad al agua por el agregado de estos gránulos. Los gránulos de papa podrían tener una afinidad mayor por las proteínas, que lo llevarían a generar un efecto algo diferente, aunque no demasiado marcado.

III.4.2.2.3 Propiedades mecánicas

En la **figura III.4.8** se observan las propiedades mecánicas en tracción de las películas obtenidas a partir del aislado proteico de amaranto y los gránulos de almidón.

Con el aumento de la concentración de almidón de papa pareciera existir una tendencia en aumento de la resistencia a la rotura y el módulo elástico acompañado de una disminución en la elongación a la rotura de las películas, aunque esta mejora solo fue significativa para el agregado de 30 % p/p de gránulos de almidón de papa. Si bien los resultados podrían sugerir que el agregado de gránulos de almidón de papa a las formulaciones podría provocar un leve efecto refuerzo a las películas proteicas resultantes, las mejoras no son significativamente importantes. Como se describió anteriormente, debe considerarse en esta observación la disminución del contenido de glicerol respecto de la masa total de la película.

El agregado de gránulos de almidón de amaranto a las películas, no mostró una tendencia a mejorar la tensión a la rotura ni el módulo elástico, aunque si disminuciones muy marcadas en la elongación a la rotura al aumentar el contenido de almidón. Estos resultados podrían sugerir la existencia de discontinuidades a nivel microscópico -ya que no se observaron a simple vista- debidas a la distribución no homogénea de los gránulos, o a las pobres interacciones entre estos y las proteínas que actuarían como concentradores de tensiones y anticiparían la rotura. Debido al menor tamaño de estos gránulos se había esperado que los mismos hubiesen podido generar un mayor refuerzo. Debe recordarse que al observar la microscopia de los gránulos de almidón de amaranto (**figura III.2.2 E, sección III.2.2.1**) parecía observarse un efecto de aglomeración de los mismos, lo que podría contribuir en parte a la distribución no homogénea de los mismos en la matriz proteica y a no observar el efecto del tamaño.

Con el agregado de pequeñas concentraciones (≤ 5 %) de gránulos de almidón de trigo, maíz y maíz waxy, la mayoría de las películas mostraron una tendencia a aumentar el

módulo de Young y la tensión a la rotura y a disminuir la elongación (a pesar que no siempre las diferencias resultaron estadísticamente diferentes), siendo para los almidones de trigo y maíz waxy el efecto más marcado al agregar 2,5 % de almidón. Así por ejemplo la película reforzada con 2,5 % de gránulos de trigo, presentó una tensión a la rotura aproximadamente del doble que la correspondiente a las películas control, un aumento en el módulo mayor al triple y una disminución de la elongación del 60 %.

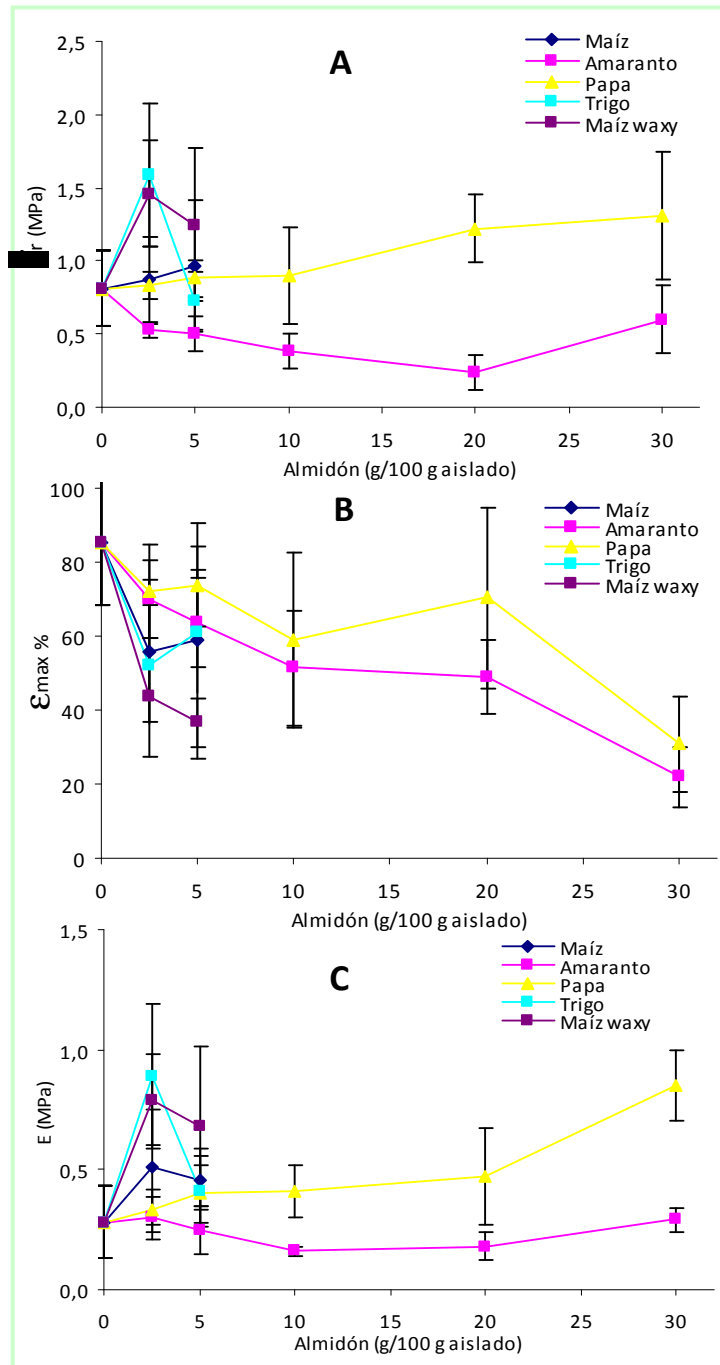


Figura III.4.8 A) Tensión a la ruptura (σ_r), B) deformación a la ruptura (ϵ_{max}) y C) módulo elástico (E) de las películas formadas a partir del aislado proteico y gránulos de almidón, medidas en tracción

III.4.2.2.4 Color y opacidad

En la **figura III.4.9** se observan los parámetros de color (a, b, L y ΔE) y la opacidad de las películas obtenidas a partir del aislado proteico y gránulos de almidón.

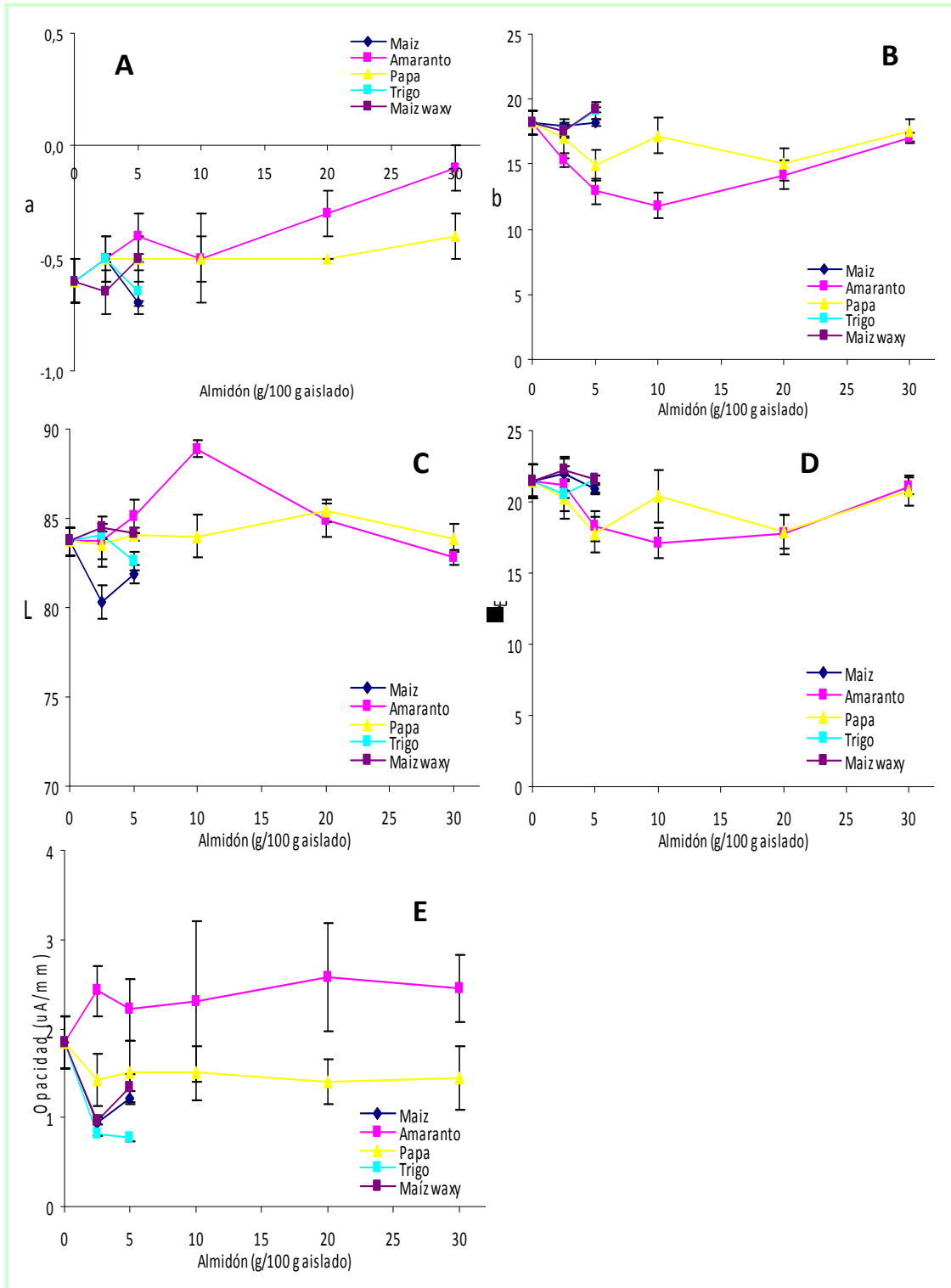


Figura III.4.9 Parámetros de color: A) a, B) b, C) L, D) ΔE y E) opacidad de las películas obtenidas a partir del aislado proteico y gránulos de almidón

El agregado de gránulos de almidón de maíz, maíz waxy y trigo no modificaron la coloración general de las películas proteicas. En cambio con el agregado de 5, 10 y 20 % p/p de almidón de amaranto disminuyó la coloración general, hecho que se repitió solo con el agregado de 5 y 20 % p/p de almidón de papa. El aporte a la diferencia de color (menor ΔE) en las películas formuladas con almidón de amaranto, fue dado principalmente por el cambio en la coloración amarillenta (menor b y mayor a) y mayor luminosidad (mayor L). En cambio, en las películas con almidón de papa el aporte a la disminución del ΔE fue dado solo por la disminución de la coloración amarilla (menor b), sin cambios significativos en los valores de a y L.

La opacidad de las películas resultó ser significativamente diferente al agregar almidones de diferente origen botánico, aunque no mostró ser dependiente de la concentración de los mismos. Al agregar almidones de maíz, maíz waxy y trigo, la opacidad disminuyó significativamente respecto de la de las películas proteicas. Las películas con gránulos de almidón de papa y amaranto no mostraron opacidades significativamente diferentes del control, aunque ciertas tendencias a disminuirla o a aumentarla, respectivamente. La mayor opacidad encontrada con el agregado de almidón de amaranto se podría deber a la distribución no homogénea de estos gránulos en la matriz proteica.

III.4.2.2.5 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas

Las películas obtenidas a partir de aislado proteico y gránulos de almidón de papa fueron las películas que mostraron mejores propiedades de tracción y de susceptibilidad al agua, y una de las cuales con las que se pudo obtener la serie completa. Por esto se decidió seleccionar las formulaciones con mayor cantidad de almidón, ya que eran las que mostraban mayores diferencias, para realizar la medida de la solubilidad diferencial (**figura III.4.10**).

En correspondencia a los resultados analizados hasta ahora, el agregado creciente de gránulos a la matriz proteica no afectó en forma importante las interacciones que la estabilizan, ya que solo pareciera observarse un leve aumento de la solubilidad en todos los buffers analizados con el aumento en la concentración de gránulos. Esto demuestra que, como se mencionó anteriormente al analizar la presencia de estos gránulos, no estarían afectando la naturaleza de la matriz proteica y tampoco

evidenciarían la existencia de interacciones importantes entre los gránulos y la matriz, por lo que el efecto refuerzo no es marcado. Todas las películas fueron estabilizadas principalmente por interacciones electrostáticas, puente hidrógeno y una menor contribución de puentes disulfuro.

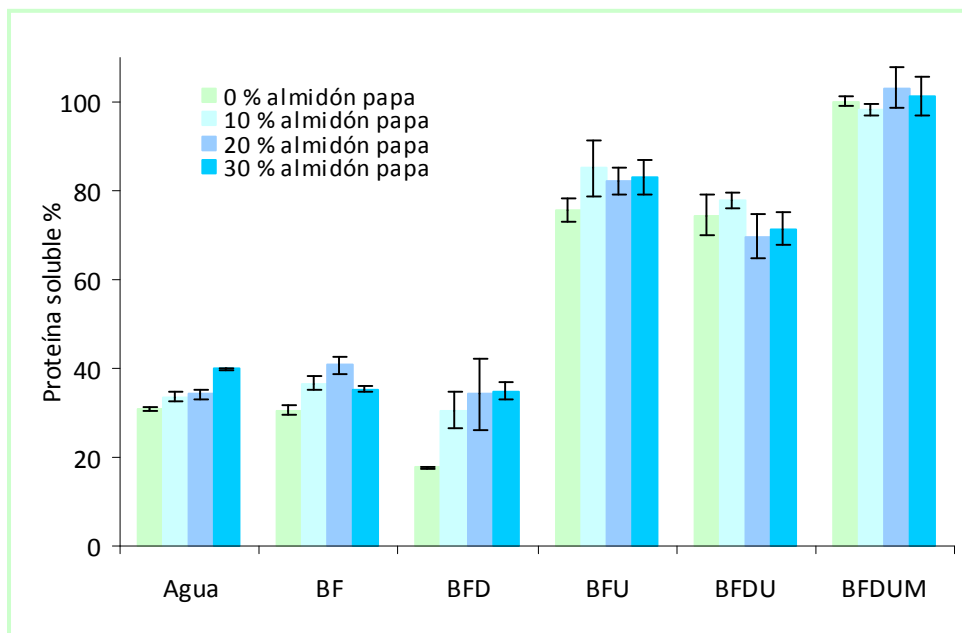


Figura III.4.10 Solubilidad diferencial de proteínas de películas obtenidas a partir del aislado proteico y gránulos de almidón de papa (0, 10, 20 y 30 % p/p). Porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BFD), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BFDU), BFDU con 2-mercaptoetanol 2,5 % v/v (BFDUM), todos a pH 7,5

Es decir que a pesar de la naturaleza hidrofílica de ambos biopolímeros, al agregar al almidón como gránulos disueltos en la matriz proteica no se observó el efecto refuerzo que se esperaba podría haber generado un material semicristalino que presentara una buena interacción con la matriz. Esto posiblemente puede atribuirse a las características propias de la superficie de los gránulos, que lleva al comportamiento diferencial observado al variar el origen botánico del almidón.

III.4.3 Conclusión

Fue posible formar matrices proteicas con cantidades variables de gránulos de almidón dispersos en la matriz. La distribución de los gránulos en esa matriz resulto ser dependiente del origen botánico del almidón y de las concentraciones de gránulos agregadas.

La presencia de los gránulos no influyo de manera muy marcada en la naturaleza de la matriz proteica, lo que se evidenció al analizar la solubilidad diferencial de las proteínas, así como el contenido de agua y la permeabilidad al vapor de agua, como tampoco se observaron indicios de interacciones importantes entre los gránulos y la matriz de manera de provocar el efecto refuerzo que se esperaba. Solo para algunas formulaciones particulares se logro observar mejoras en algunas propiedades mecánicas.

Los gránulos de almidón de papa, podrían ser los que presentaron mayor afinidad a la matriz proteica, ya que mostraron una mayor tendencia con la concentración, y con ellos fue posible formar películas homogéneas y desmoldables con todas las formulaciones analizadas.

III.5 Películas en base a proteínas de amaranto y nanocristales de almidón utilizados como nanorefuerzos

Los nanocristales de almidón constituyen una opción muy interesante para ser utilizados como refuerzo de materiales poliméricos debido a que son biodegradables, de fácil obtención y relativamente bajo costo. Pueden obtenerse por hidrólisis directa de los respectivos gránulos, a diferencia de las nanofibras de celulosa cuya preparación requiere de una serie de etapas previas a la hidrólisis -tratamiento alcalino y blanqueamiento-. Aprovechando su naturaleza biodegradable, estos nanocristales se han utilizado como refuerzo de matrices poliméricas amigables con el medio ambiente, como poliuretano libre de solventes orgánicos (Chen y col., 2008b), ácido poliláctico (Yu y col., 2008), alcohol polivinílico (Chen y col., 2008a), polihidroxicanoatos (Bordes y col., 2010) pululano -obtenido por fermentación- (Kristo y Biliaderis, 2007), almidón de maíz waxy (Angellier y col., 2006; Viguié y col., 2007) o de mandioca (García y col., 2009), y proteínas de soja (Zheng y col., 2009).

Se ha informado que el agregado de los nanocristales mejora significativamente las propiedades mecánicas especialmente en el estado gomoso -a temperaturas superiores a la transición vítrea del material- (Dufresne y col., 1996; Angellier y col., 2005a y b y 2006), observándose aumentos en el módulo elástico y la tensión a la ruptura y disminuciones en la elongación en ensayos en tracción. Por ejemplo, en matrices de caucho, las propiedades mecánicas mejoraron progresivamente con el agregado de nanocristales de almidón de maíz waxy hasta 20 % p/p, empeorando con agregados mayores (Angellier y col., 2005a). En cambio en matrices de pululano, las propiedades mecánicas mejoraron con el aumento del contenido de los mismos nanocristales, inclusive hasta concentraciones tan altas como 40 % p/p (Kristo y Biliaderis, 2007). El agregado de nanocristales de almidón de poroto a una matriz proteica de soja, o de nanocristales de almidón de papa a una matriz de poliuretano mostró un efecto refuerzo leve con el agregado de bajas concentraciones de nanocristales (hasta 2,5 o 5 % p/p, respectivamente), mientras que para concentraciones superiores, las propiedades mecánicas fueron inferiores (Zheng y col., 2009; Chen y col., 2008b). Este efecto fue atribuido a la dispersión uniforme de los

nanocristales en la matriz cuando estaban presentes en bajas concentraciones, y a la autoagregación de los mismos, cuando la cantidad adicionada fue mayor, disminuyendo la superficie de interacción con la matriz y desestabilizando la estructura ordenada. Es decir, que el efecto refuerzo producido por los nanocristales depende de su afinidad con la matriz polimérica, y por ende de la naturaleza del polímero base.

El efecto del agregado de nanocristales de almidón sobre la permeabilidad al vapor de agua de las películas resultantes también parece ser dependiente de la matriz utilizada y de la concentración agregada. Mientras que, García y col. (2011) mostraron un aumento de la WVP por el agregado de 2,5 % p/p de nanocristales de almidón de maíz waxy a una matriz compuesta por el mismo almidón, otros autores mostraron una disminución en esta propiedad cuando se agregaron bajas concentraciones de nanocristales de almidón de maíz waxy a formulaciones en base a caucho o almidón de mandioca (Angellier y col., 2005c; García y col., 2009), o recién a partir del agregado de 20 % p/p de nanocristales de almidón de maíz a una matriz de pululano (Kristo y Biliaderis, 2007).

No hay en bibliografía estudios donde se compare la adición de nanocristales preparados a partir de distintos almidones a la misma matriz polimérica con el fin de analizar esta variable.

Los objetivos de este capítulo fueron:

- i) Estudiar la obtención de nanocristales de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto y analizar el efecto del origen botánico sobre las características de los nanorefuerzos resultantes,
- ii) Estudiar el efecto que causa el agregado de estos nanocristales a las formulaciones proteicas de amaranto nativas sobre las propiedades de las películas nanocompuestas resultantes.

III.5.1 Materiales y métodos

III.5.1.1 Materiales

Como materias primas se utilizaron: aislado proteico de amaranto A11, cuya obtención se describió en la sección III.3.1.1; almidones comerciales de papa (Anedra, Argentina), maíz, maíz waxy y trigo (Sigma-Aldrich, Alemania); y almidón de amaranto extraído de las semillas como se describió en la sección III.2.1.2.

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de pureza analítica.

III.5.1.2 Obtención de nanocristales de almidón

Los nanocristales de almidón de amaranto, trigo, papa, maíz y maíz waxy se obtuvieron por hidrólisis ácida, según la técnica descrita por Angellier y col. (2004). Cada almidón se dispersó en H_2SO_4 3,16 M en una relación de 14,7 % p/v, agitando continuamente a 100 rpm a 40 °C durante 5 días. La suspensión resultante se lavó con agua destilada hasta neutralidad con sucesivas centrifugaciones a 16211 xg durante 10 minutos a 4 °C (centrífuga Sigma 6K15, Inglaterra), homogeneizando entre lavados a 9000 rpm durante 1 minuto (homogeneizador Ultraturrax T25, IKA-WERKE, Alemania). Luego de los lavados, la suspensión se homogeneizó nuevamente durante 2 minutos a 9000 rpm para dispersar los agregados y obtener una suspensión estable, se dializó en agua durante 24-48 horas y se almacenó con azida de sodio a 4 °C, o se acondicionó a -80 °C y se liofilizó, según los requerimientos posteriores.

La concentración de nanocristales en la dispersión se calculó mediante la determinación del peso de una alícuota de la dispersión antes y después de secarla a 40 °C hasta peso constante. La concentración se expresó en % p/p y la determinación se realizó por triplicado.

El rendimiento de los nanocristales se calculó como el cociente entre el peso de los nanocristales de almidón liofilizados y el peso de los gránulos de almidón nativos contenidos en una alícuota de 50 mL, verificando que las alícuotas tomadas representaban el volumen total de la suspensión. El rendimiento se expresó en % p/p y se realizó por triplicado.

III.5.1.3 Caracterización de los nanocristales de almidón

III.5.1.3.1 Determinación del tamaño de partícula

Se realizó la determinación del tamaño de partícula de las dispersiones de nanocristales de almidón mediante la medida de dispersión de luz dinámica (DLS). Se utilizó un equipo Zetasizer Nano-Zs de Malvern Instruments (Malvern, Inglaterra), con un rango de medición de 0,6 – 6000 nm, provisto de un láser He–Ne (633 nm) y un *correlator* digital, modelo ZEN3600. Las mediciones se realizaron a un ángulo de dispersión de 173° a temperatura ambiente utilizando una celda de poliestireno. Las dispersiones de nanocristales fueron diluidas al 0,05 % v/v en agua miliQ, de modo de eliminar la posible turbidez que pudiera existir en la muestra por su alta concentración. En DLS, la muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada producida por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las partículas, por lo tanto, mediante el uso del software provisto por el equipo, se pudo obtener la distribución de tamaño de partícula por intensidad, obteniendo el tamaño promedio y el índice de polidispersidad que es la amplitud de la campana gaussiana y refleja la diversidad de pesos moleculares existentes en la muestra. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

III.5.1.3.2 Microscopía electrónica de barrido con cañón de emisión de campo

Los nanocristales de almidón se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido con cañón de emisión de campo (FEG-SEM). Las dispersiones de nanocristales se diluyeron en agua al 0,0001 % p/v se colocaron sobre una grilla de Cu especial para ésta microscopía y fueron observadas con un microscopio electrónico de barrido SEM Zeiss DSM982 Gemini equipado con un cañón de emisión de campo. Esta microscopía se caracteriza por su mayor resolución, lo que lleva a poder observar los nanocristales de almidón con mayor precisión.

III.5.1.3.3 Difractometría de rayos X

Los nanocristales de almidón liofilizados fueron caracterizados mediante difracción de rayos X, de modo de poder determinar posibles cambios en la cristalinidad. Se utilizó un difractómetro X'Pert Pro (PANalytical, EE.UU.) equipado con una fuente de radiación Cu K α ($\lambda = 0,154$ nm). La tensión y la corriente utilizada fueron de 40 kV y 40

mA, respectivamente y los datos de difracción se obtuvieron desde $2\theta = 4^\circ$ hasta $2\theta = 40^\circ$ en un modo de tiempo fijo con un intervalo de paso de $0,01^\circ$.

III.5.1.3.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La temperatura y la entalpía de fusión de los nanocristales de almidón se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Tanto el equipo utilizado como la calibración realizada fueron idénticos a los descritos en la sección II.2.1.4.3. Los nanocristales liofilizados (aproximadamente 5 mg) fueron colocados en cápsulas de aluminio, las cuales se sellaron herméticamente. Las muestras fueron sometidas al siguiente tratamiento térmico: 5 minutos a 20°C (para equilibrar las muestras), enfriamiento hasta 0°C a $10^\circ\text{C}/\text{min}$, isoterma durante un minuto y por último calentamiento a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ entre 0°C y 300°C , en modo modulado. De los termogramas obtenidos se determinaron la temperatura de pico y el área bajo la curva, que corresponden a la temperatura y la entalpía de fusión de los nanocristales de almidón (T_f en $^\circ\text{C}$ y ΔH_f en J/g nanoalmidón en base seca, respectivamente), utilizando el software Universal Analysis V4.2E (TA Instruments, New Castle, Del., Estados Unidos). Las determinaciones se realizaron como mínimo por duplicado.

III.5.1.4 Obtención de películas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocristales de almidón

Las películas se obtuvieron por *casting* a partir del aislado proteico de amaranto A11 y nanocristales de almidón de distinto origen. Se trabajó con dispersiones de aislado A11 al 5 % p/v y glicerol al 25 % p/p respecto del aislado (usado como plastificante), a las que se les adicionaron distintas cantidades de nanocristales de almidón: 3, 6, 9 o 12 % p/p (g nanocristales/100 g de aislado). Las dispersiones se formaron agitando magnéticamente los componentes durante 1 hora a temperatura ambiente, ajustando el pH a 10,5 y volviendo a agitar por otros 30 minutos. Posteriormente, 10 mL de las dispersiones formadoras de películas fueron colocados en placas de Petri de poliestireno (64 cm^2) y secadas en una estufa con convección forzada a 40°C durante 3:30 horas. Las películas así formadas se acondicionaron a 20°C y 58 % de humedad relativa (solución saturada de NaBr) durante 48 horas previo a su caracterización.

Todos los estudios se realizaron al menos con dos tandas de películas formadas independientemente.

III.5.1.5 Caracterización de las películas de aislado proteico de amaranto y nanocristales de almidón

Las películas proteicas obtenidas a partir de las mezclas de aislado proteico de amaranto y nanocristales de almidón fueron caracterizadas mediante la determinación del contenido de agua, espesor, opacidad, color, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, absorción de agua, propiedades mecánicas, ángulo de contacto, solubilidad diferencial de proteínas y microscopía diferencial de barrido (SEM), como se describió en la sección III.3.1.4; y su cristalinidad por difracción de rayos X según la técnica descrita en la sección III.5.1.3.3. Además se realizó la caracterización descrita a continuación:

III.5.1.5.1 Determinación de temperatura de transición vítrea (T_g)

La temperatura de transición vítrea de las películas se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Tanto el equipo utilizado como la calibración realizada fueron idénticos a los descritos en la sección II.2.1.4.3. Se colocaron pequeños trozos de película (aproximadamente 5 mg) en cápsulas de aluminio que se sellaron herméticamente. Las muestras fueron sometidas al siguiente tratamiento térmico: 1 minuto a 20 °C (para equilibrar las muestras), enfriamiento hasta -100 °C a 10 °C/min, isoterma durante un minuto a la misma temperatura y por último calentamiento entre -100 y 130 °C a 20 °C/min. La temperatura de transición vítrea (en °C) fue definida como el punto de inflexión en la línea de base causado por la discontinuidad en el calor específico de la muestra (Gontard y Ring, 1996). Para su determinación se empleó el software Universal Analysis V4.2E (TA Instruments, New Castle, Del., Estados Unidos). Los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado.

III.5.1.5.2 Biodesintegración en suelo

La biodesintegración de las películas nanocompuestas fue determinada mediante el método descrito por Dalev y col. (2000). Se colocó tierra fértil (Terrafertil, Buenos Aires, Argentina) compuesta de composta orgánico y tierra negra (humedad: 35-40 %,

cenizas: 40-45 %, materia orgánica: 15-20 %, relación C/N: 7,7, pH: 6,2, conductividad eléctrica: 1,1 mmhos/seg) en recipientes plásticos. Muestras de películas de 1 cm² fueron secadas previamente a 50 °C durante 24 horas, pesadas y colocadas sobre mallas de plástico (también previamente secadas y pesadas) en la tierra a 1 cm de profundidad para permitir el acceso de los microorganismos y la humedad, y la fácil remoción de las muestras. Sobre las muestras se colocaron luego 2 cm de la misma tierra antes utilizada. Las muestras se incubaron durante 3 semanas en cámaras a temperatura controlada de 23 °C, y ciclos de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz, de modo de simular las condiciones ambientes, regando la tierra con agua en spray una vez por día. Una vez por semana se tomaron muestras de película de la tierra, las cuales fueron lavadas cuidadosamente con agua destilada, secadas a 50 °C durante 24 horas y pesadas nuevamente. La pérdida de peso relativa fue calculada como la diferencia de peso entre la muestra inicial y final, respecto del peso inicial. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

III.5.1.6 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valor medio \pm desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el Test de Fisher de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significación $\alpha=0,05$. Para ello se empleó el programa OriginPro 8 SR0 v8.0724 (B724) (OriginLab Corporation, Estados Unidos).

III.5.2 Resultados y discusión

III.5.2.1 Obtención de los nanocristales de almidón

Las condiciones de hidrólisis de los almidones utilizadas en este protocolo para la obtención de nanocristales (14,7 % p/v de almidón en H₂SO₄ 3,16 M con agitación a 100 rpm a 40 °C durante 5 días) fueron seleccionadas teniendo en cuenta los numerosos esfuerzos realizados para optimizar este proceso, de modo de obtener nanocristales mas estables, con tamaños más pequeños, mejores rendimientos y menores tiempos de hidrólisis (Angellier y col., 2004; LeCorre y col., 2010).

En la **Tabla III.5.1** se muestra el volumen preparado y la concentración de las dispersiones de nanocristales de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto, así como el rendimiento de los procesos de obtención. Cabe destacar que la diferencia en los volúmenes de dispersión preparados para cada almidón fue debida a la disponibilidad de cada materia prima.

Tabla III.5.1 Volumen y concentración de las dispersiones de nanocristales de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto preparadas y rendimiento del proceso de obtención de los respectivos nanocristales

Nanocristales	Volumen (mL)	Concentración % p/p	Rendimiento % p/p
Papa	100	0,63 ± 0,03	3,5
Trigo	500	3,91 ± 0,02	24,0
Maíz	500	4,04 ± 0,01	24,4
Maíz waxy	1000	2,74 ± 0,02	17,0
Amaranto	100	1,33 ± 0,03	7,3

Los mejores rendimientos y concentraciones fueron alcanzados al trabajar con almidones de trigo y maíz, con los que se prepararon volúmenes de dispersión intermedios. El valor del rendimiento encontrado para los nanocristales de almidón de maíz waxy fue similar al encontrado por otros autores (~ 14 %) para los mismos nanocristales obtenidos con el mismo protocolo (LeCorre y col., 2011a; Angellier y col., 2005a).

Hay varios factores que afectan la velocidad de hidrólisis y el rendimiento de nanocristales luego de la hidrólisis, además del tipo y concentración de ácido usado, de la concentración de almidón y de la temperatura de hidrólisis (LeCorre y col., 2010), condiciones que no se modificaron en este protocolo para los distintos almidones utilizados. Por ejemplo, el rendimiento depende de variables experimentales del procesamiento tales como el volumen preparado -ya que ocurre menor pérdida en la centrifugación cuando el volumen es mayor- y en general a mayores volúmenes, la agitación no es tan efectiva (comunicación personal). Algunos autores han reportado que las diferencias en la velocidad de hidrólisis y el rendimiento podrían atribuirse también a características propias de los gránulos, como tamaño y número de poros en la superficie del gránulo de almidón (Singh y Ali, 2000), y a la relación amilosa:amilopectina, siendo más susceptibles a hidrolizarse los gránulos de almidón con más amilopectina (Jayakody y Hoover, 2002). En nuestro trabajo los almidones con mayor contenido de amilopectina (maíz waxy y amaranto) mostraron rendimientos diferentes entre sí y menores que los de trigo y maíz que contienen mayor contenido de amilosa, lo que no concuerda con lo informado por estos autores. Es evidente que al ser varios los factores que influyen en el proceso de hidrólisis del almidón, los resultados son difíciles de correlacionar.

III.5.2.2 Caracterización de los nanocristales de almidón

III.5.2.2.1 Morfología y tamaño de los nanocristales

En la **figura III.5.1** se muestran fotos de los nanocristales de almidón obtenidas por SEM. Todas las partículas presentaron una morfología de tipo “plaquetas” con una distribución de tamaño dentro de la dimensión nanométrica (≤ 100 nm). Esto indicaría una hidrólisis efectiva de los gránulos, indicando la presencia de nanocristales.

Algunos autores mostraron un mayor tamaño de los nanocristales obtenidos cuanto mayor era el contenido de amilosa, lo cual no es sorprendente, ya que se cree que la amilosa podría interferir en el proceso, dificultando la hidrólisis (LeCorre y col., 2011c). Debido a que con las fotos obtenidas en este trabajo no fue posible calcular el tamaño de los nanocristales, no se pudo llegar a obtener una correlación con el contenido de amilosa.

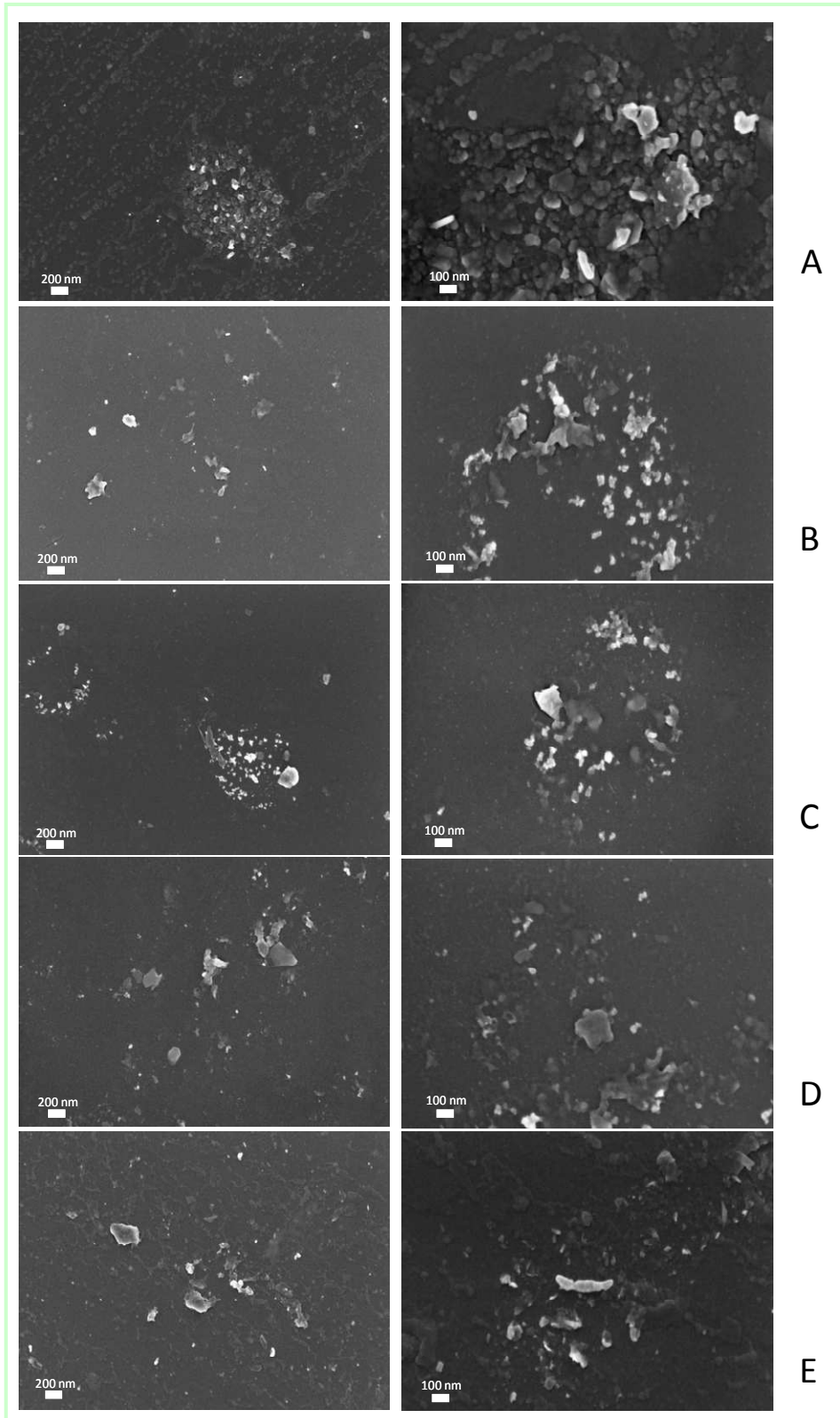


Figura III.5.1 Microscopía electrónica de barrido (50 y 20 KX) de nanocrisales de almidón de A) papa, B) trigo, C) maíz, D) maíz waxy y E) amaranto, correspondiente a dos aumentos diferentes

La morfología de los nanocrisales fue heterogénea, encontrándose desde plaquetas de forma redondeada hasta paralelepípedos. Por ejemplo, en los nanocrisales de

almidón de papa pareciera evidenciarse una mayor proporción de nanocrisales más redondeados que los obtenidos con los otros almidones. Estos resultados concuerdan con los mostrados por LeCorre y col. (2011c). Estos autores sugirieron que la morfología de los nanocrisales tenía relación con el tipo de cristalinidad del gránulo, donde los nanocrisales de almidones de tipo B (papa y maíz de alta amilosa) presentaban forma redondeada, y los de tipo A (maíz, maíz waxy y trigo) presentaban forma cuadrada, relacionadas con el empaquetamiento de las dobles hélices en cada modelo. En la **figura III.5.2** se observa con claridad la forma de plaquetas redondeadas para los nanocrisales de almidón de papa (A), cuadrada para los nanocrisales de almidón de trigo (B) y de paralelepípedo para los otros nanocrisales (C y D) obtenidas e informadas por Le Corre y col (2012), para nanocrisales preparados con la misma técnica que la utilizada en este trabajo. Estos autores también señalaron que la morfología no tenía dependencia ni con el origen botánico, ni con el contenido de amilosa:amilopectina del gránulo.

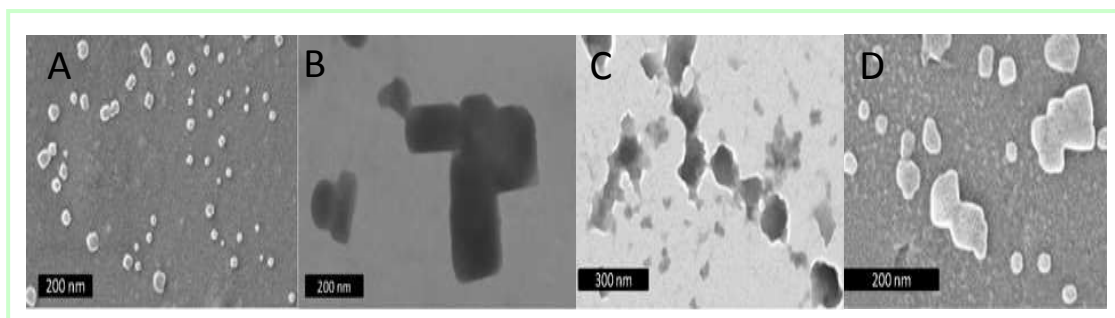


Figura III.5.2 Microscopía electrónica de barrido de nanocrisales de almidón de A) papa, B) trigo, C) maíz y D) maíz waxy. *Extraídas de LeCorre y col. (2012)*

En la **figura III.5.3** se presenta la distribución de tamaño de partícula por intensidad y en la **Tabla III.5.2** se muestra el tamaño medio y el índice de polidispersidad determinados mediante dispersión de luz dinámica sobre las dispersiones de nanocrisales de almidón.

Los tamaños medio obtenidos (> 150 nm, **Tabla III.5.2**) evidencian la tendencia que tienen los nanocrisales a formar agregados, tal como ha sido reportado en bibliografía, ya que en las microscopias se observaron nanocrisales de menor tamaño que los obtenidos por este método. Esta tendencia puede atribuirse al gran área superficial de las plaquetas, y a la asociación a través de la formación de uniones

puente hidrógeno entre los grupos hidroxilos, que se encuentran en un importante numero por área individual de nanocrisales, según se ha señalado en bibliografía (García y col., 2009 y 2011). La misma tendencia de agregación también ha sido informada para nanorefuerzos provenientes de otros polisacáridos, como por ejemplo las nanofibras de celulosa (Ljungberg y col., 2005; Eichhorn y col., 2010).

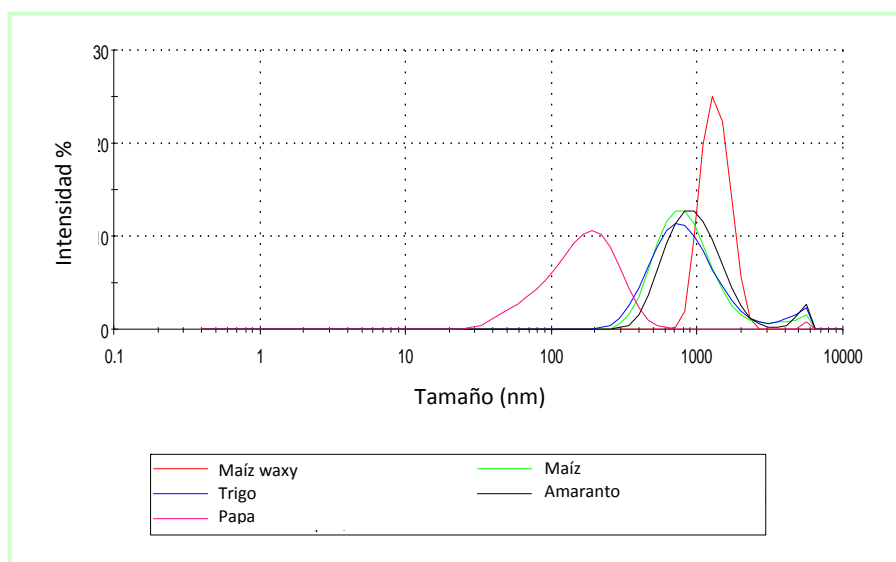


Figura III.5.3 Distribución de tamaño de partícula por intensidad de agregados de nanocrisales de almidón de papa, maíz, maíz waxy, amaranto y trigo

Tabla III.5.2 Tamaño medio e índice de polidispersidad de agregados de nanocrisales de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto

Nanocrisales	Tamaño medio (nm)	Índice de polidispersidad
Papa	182 ± 40 ^a	0,364
Trigo	815 ± 25 ^b	0,318
Maíz	823 ± 9 ^b	0,25
Maíz waxy	1287 ± 105 ^c	0,113
Amaranto	1001 ± 27 ^d	0,292

En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

Los agregados de los nanocrisales formados a partir de almidones de distinto origen presentaron una distribución monomodal (**figura III.5.3**), lo que indica la existencia de una única población de partículas en todas las dispersiones, al menos en el rango de detección empleado. Los agregados de nanocrisales de almidón de papa presentaron

el menor tamaño a pesar de ser los gránulos nativos más grandes; los de trigo y maíz mostraron un tamaño intermedio, seguido por los correspondientes a almidón de amaranto, siendo los agregados de maíz waxy, los de mayor tamaño.

El mayor índice de polidispersidad fue encontrado para los nanocristales de almidón de papa, seguido por los nanocristales de almidón de trigo, amaranto, maíz y maíz waxy, mostrando que los nanocristales de papa poseían la mayor variación en la distribución de pesos moleculares, y los nanocristales de almidón de maíz waxy fueron los que mostraron menor diversidad en su peso molecular. Esto muestra una tendencia inversa entre el tamaño medio de los agregados y el índice de polidispersidad, es decir, los agregados más grandes, fueron los que mostraron menor dispersión en el peso molecular.

La optimización del proceso de obtención de nanocristales sigue siendo motivo de estudio. Así por ejemplo, recientemente LeCorre y col. (2011a) lograron mejorar la heterogeneidad de los nanocristales agregando centrifugaciones sucesivas en diferentes condiciones luego de la hidrólisis, de modo de poder separar las partículas por tamaños y evitar pérdidas de material. Los mismos autores también propusieron la obtención en forma continua, separando los nanocristales obtenidos a través de membranas de cerámica, con el fin de generar un proceso con mayor posibilidad de escalado; y concluyeron que esta práctica permitiría obtener un mayor rendimiento, mejoras en la homogeneidad y calidad de la suspensión, además de ser este un proceso económico que mantendría intacta la estructura cristalina de las partículas sin favorecer la agregación (LeCorre y col., 2011b).

III.5.2.2.2 Cristalinidad

En la **figura III.5.4** se observan los perfiles de rayos X de los nanocristales de almidón de distinto origen botánico y se los compara con los correspondientes a los respectivos gránulos nativos. Debido a los espectros obtenidos para los nanocristales de almidón de distinto origen, se podría concluir que estos, al igual que los gránulos, son parcialmente cristalinos conservando regiones amorfas luego de la hidrólisis.

Los nanocristales de almidón de trigo, maíz, maíz waxy y amaranto conservaron el típico perfil tipo A de sus gránulos, con picos a 23°, 17-18,1° y 15°, característico de los almidones de cereales. Solo los nanocristales de almidón de papa mostraron una

modificación cualitativa del perfil respecto del obtenido con los gránulos de almidón nativo, ya que se observó que el pico a $5,5^\circ$, típico del modelo B de almidones de tubérculo, disminuyó fuertemente su intensidad manteniendo los picos a $17,1^\circ$ y a $22-24^\circ$.

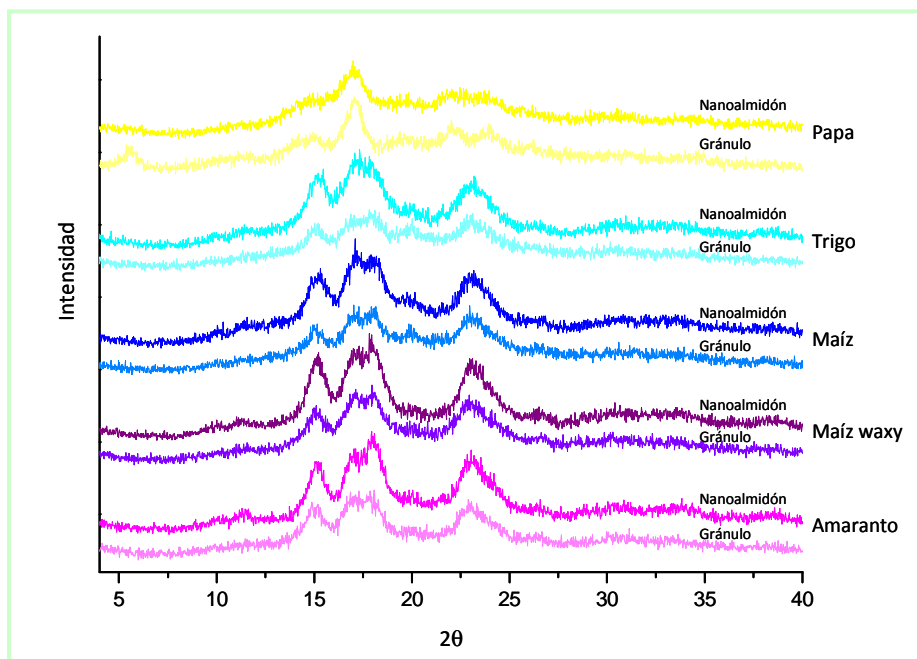


Figura III.5.4 Perfil de difracción de rayos X de nanocristales de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto

En la **Tabla III.5.3** se muestran los porcentajes de cristalinidad de los nanocristales y de los gránulos de almidón, de modo de poder chequear si el tratamiento de hidrólisis llevó efectivamente a la remoción de los dominios amorfos de los gránulos dejando la parte cristalina intacta, como lo plantearon LeCorre y col. (2011c).

Para los nanocristales de maíz y trigo, la cristalinidad aumentó luego de la hidrólisis, y para los almidones de maíz waxy, papa y amaranto, la cristalinidad de los nanocristales no mostró diferencias significativas con la de los gránulos.

El aumento de la cristalinidad de los almidones de maíz y trigo podría atribuirse a que la hidrólisis de las regiones amorfas fue más extensiva, llevando al aumento de la región cristalina, hecho que no fue significativo en los almidones de tipo “waxy” por la menor cantidad de regiones amorfas presentes en ellos. Este mismo comportamiento se esperaba encontrar para los nanocristales de almidón de papa, con alto contenido

de amilosa, pero podría pensarse que la diferencia en el modelo cristalino dificultaría la hidrólisis.

Tabla III.5.3 Cristalinidad de los gránulos y de los nanocristales de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto

Almidón	Cristalinidad %	
	Gránulos	Nanocristales
Papa	21,8 ± 1,8 ^a	18,9 ± 1,0 ^a
Trigo	14,3 ± 1,0 ^a	21,0 ± 1,4 ^b
Maíz	20,8 ± 1,5 ^a	26,3 ± 0,9 ^b
Maíz waxy	38,6 ± 0,9 ^a	41,1 ± 2,3 ^a
Amaranto	34,6 ± 1,5 ^a	35,3 ± 0,5 ^a

En filas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

A diferencia de nuestros resultados, LeCorre y col. (2011c) mostraron un aumento de la cristalinidad luego de la hidrólisis para almidón de maíz, maíz waxy, trigo y papa, sin encontrar relación con el contenido de amilopectina, con el tipo cristalino, ni con el origen botánico de los gránulos. Estos autores resaltaron que esperaban un mayor aumento de la cristalinidad para los almidones con mayor contenido de amilopectina, considerando que en estos había menor cantidad de regiones amorfas susceptibles a la hidrólisis. Sin embargo, atribuyeron este comportamiento a dos posibles causas: a que la optimización del proceso de hidrólisis fue realizado con maíz waxy, pudiendo no ser el proceso adecuado para los otros almidones; y a la hidrólisis de cristallitos defectuosos en la amilopectina por la extensión del proceso, que inducirían a la solubilización de parte de la estructura cristalina. alguna de estas causas, puede ser la responsable de que no se haya modificado, como se esperaba en nuestro trabajo, la cristalinidad en los nanocristales de almidón con mayor contenido de amilopectina. A su vez, LeCorre y col. (2011c) mostraron que, a pesar del aumento observado en la cristalinidad, este parámetro presentó valores bajos para todos los nanocristales, demostrando que una importante cantidad de material no organizado permaneció en la suspensión de los nanocristales, como ocurrió con los valores encontrados en este trabajo.

En la **figura III.5.5** se muestran los resultados obtenidos por calorimetría diferencial de barrido de los nanocristales liofilizados. En todos los termogramas se observan dos endotermas, que podrían ser atribuidas a la fusión de los nanocristales, con temperaturas alrededor de 120-190 °C y 240-260 °C, respectivamente (**Tabla III.5.4**). Se observaron diferencias significativas para los nanocristales de trigo en la temperatura de pico de la primer endoterma, y para los nanocristales de maíz waxy en la segunda endoterma, lo que muestra una estabilidad térmica diferencial de estos nanocristales.

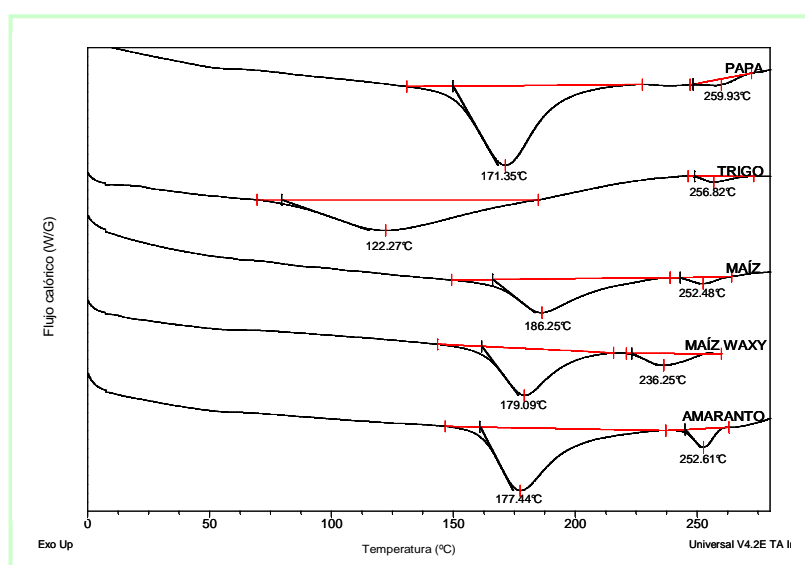


Figura III.5.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de nanocristales de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto

En bibliografía se encuentran algunos trabajos que muestran el comportamiento térmico de los nanocristales liofilizados. Thielemans y col. (2006) y LeCorre y col. (2012) también observaron dos endotermas a aproximadamente 150 y 200 °C al analizar por DSC los nanocristales de maíz waxy liofilizados. Según Evans y Haisman (1982) la presencia de las dos endotermas puede atribuirse a diferencias en la estabilidad térmica de los cristalitas: una población menos resistente que funden primero y otra formada por cristales más estables que funden a mayor temperatura, respectivamente. Pareciera no existir una correlación entre la temperatura de transición térmica de los nanocristales y el contenido de amilosa original de los gránulos o el tipo cristalino, en concordancia a lo señalado por LeCorre y col. (2012). Pero a diferencia de nuestro trabajo, ellos observaron que la separación de dos picos

en los nanocristales de almidones de maíz era mayor que los de papa y trigo, y lo atribuyeron a que los cristalitos de maíz eran menos homogéneos.

Al comparar las entalpías de fusión total de todos los nanocristales (**Tabla III.5.4**), se observó que la correspondiente a los nanocristales de almidón de papa fue significativamente superior que la del resto de los nanocristales, lo que posiblemente pueda correlacionarse con el tipo de cristalinidad que presentan. Los mayores calores de fusión de los cristales de almidón de amaranto y trigo respecto de los de maíz y maíz waxy, no correlacionaron con el grado de cristalinidad obtenido, ni con el contenido de amilopectina en los gránulos. Solo se observó, que los nanocristales de almidón con mayor contenido de amilopectina -maíz waxy y amaranto- mostraron el mayor ΔH_f para la segunda endoterma.

Tabla III.5.4 Entalpía de fusión (ΔH_f) en base seca y temperatura de fusión (T_f) de los nanocristales de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto

	ΔH_f (J/g nanocristales b.s.)		T_f (°C)	
	Endoterma 1	Endoterma 2	Endoterma 1	Endoterma 2
Papa	356 ± 20 ^a	13 ± 1 ^a	173 ± 3 ^a	260 ± 1 ^a
Trigo	227 ± 15 ^b	13 ± 2 ^a	123 ± 1 ^b	257 ± 1 ^a
Maíz	152 ± 20 ^c	10 ± 2 ^a	189 ± 4 ^a	252 ± 2 ^a
Maíz waxy	169 ± 12 ^c	31 ± 3 ^b	175 ± 6 ^a	238 ± 3 ^b
Amaranto	215 ± 14 ^b	19 ± 1 ^c	181 ± 5 ^a	252 ± 1 ^a

En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p < 0,05$.

Pensando que se trata de un polímero semicristalino, la diferencia de temperatura y de entalpía encontradas entre los nanocristales estudiados podría ser debida a otras causas, por ejemplo a la formación de un cristal más perfecto, o a una disminución en el contenido de plastificante, como podría ser el agua presente en las muestras, como lo sugirieron LeCorre y col. (2012). Quedan pendientes otros análisis con el fin de determinar si el grado de agregación podría estar influyendo en los calores puestos en juego.

En síntesis, los nanocristales de almidón de distinto origen presentaron diferente morfología y tendencia a agregarse dando origen a agregados de diferente tamaño. Los nanocristales de almidón de maíz y trigo fueron los únicos que mostraron un aumento de la cristalinidad, siendo bajo este parámetro para todos los nanocristales en general, mostrando que una gran cantidad de material no organizado permaneció presente luego de la hidrólisis. Todos los nanocristales presentaron dos endotermas de fusión que corresponderían a la fusión de cristales de diferente estabilidad térmica.

III.5.2.3 Películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocristales de almidón

III.5.2.3.1 Apariencia

Se formaron películas proteicas de amaranto homogéneas y fácilmente desmoldables con el agregado de concentraciones variables de nanocristales de almidón de papa, amaranto, trigo, maíz y maíz waxy (3-12 % p/p respecto del aislado proteico).

Tabla III.5.5 Espesor de películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocristales de almidón de papa, trigo, maíz, maíz waxy y amaranto

Nanocristales (% p/p)	Papa	Trigo	Maíz	Maíz waxy	Amaranto
0			68,6 ± 14,9 ^a		
3	46,2 ± 15,5 ^a	71,6 ± 11,1 ^a	62,9 ± 11,1 ^a	70,4 ± 15,8 ^a	59,4 ± 6,7 ^a
6	58,9 ± 12,6 ^a	71,7 ± 10,2 ^a	91,1 ± 14,4 ^a	73,2 ± 14,7 ^a	73,3 ± 11,2 ^a
9	72,9 ± 16,2 ^a	82,6 ± 12,4 ^a	58,0 ± 8,8 ^a	74,9 ± 13,4 ^a	79,3 ± 13,1 ^a
12	66,6 ± 16,3 ^a	76,4 ± 12,3 ^a	71,0 ± 12,1 ^a	73,7 ± 7,8 ^a	77,6 ± 15,5 ^a

En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con p<0,05.

El espesor de todas las películas formuladas a partir de aislado proteico y nanocristales de almidón (**Tabla III.5.5**) no mostró diferencias significativas respecto del origen del almidón y de la cantidad de nanocristales agregada, lo que indicaría que la presencia de nanocristales no afectaría el grado de compactación de los materiales.

En la **figura III.5.6** se muestran los parámetros de color (a, b, L y ΔE) y la opacidad de las películas obtenidas a partir del aislado proteico y los nanocristales de almidón.

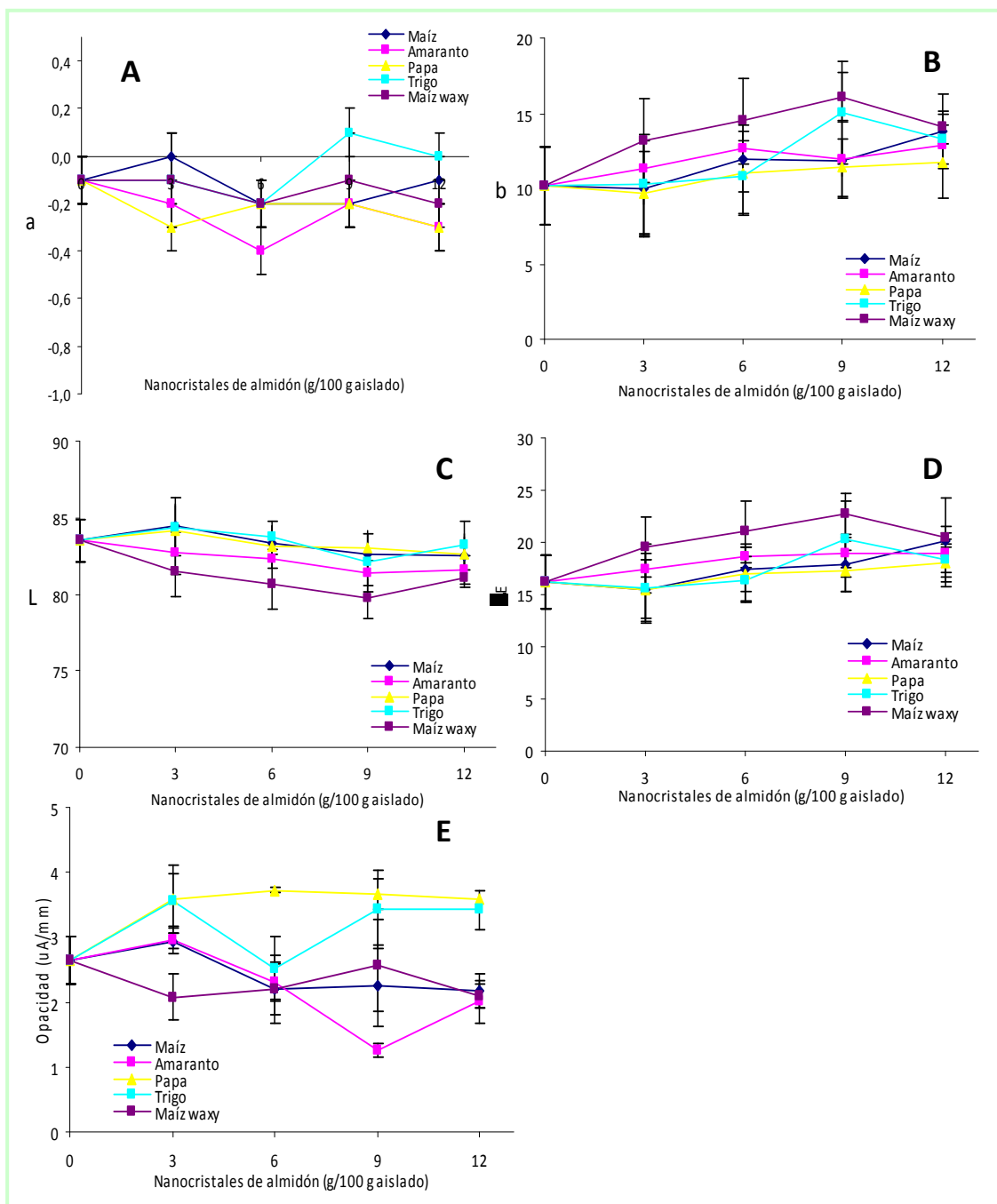


Figura III.5.6 Parámetros de color: A) a, B) b, C) L, D) ΔE y E) opacidad de las películas obtenidas a partir del aislado proteico de amaranto y nanocrisales de almidón de maíz, amaranto, maíz waxy, papa y trigo

No se observaron diferencias significativas en los parámetros de color a, b y L, ni en la coloración general de las películas, ΔE , ni con el agregado de los nanocrisales ni con el origen de los mismos.

La opacidad mostró tendencias diferentes según los nanocrisales agregados, ya que para todos los agregados de nanocrisales de almidón de papa y trigo (excepto con 6 %

p/p de nanocrisales de trigo) la opacidad aumentó; y para los agregados de nanocrisales de almidón de maíz, maíz waxy o amaranto, la opacidad fue variable con la formulación, no siendo los cambios demasiado significativos.

III.5.2.3.2 Susceptibilidad al agua

El contenido de agua de las películas (**figura III.5.7**) disminuyó con el agregado de nanocrisales de almidón de papa y amaranto independientemente de la concentración de los mismos, y recién a partir del agregado de 6 % p/p de nanocrisales de almidón de trigo. Por su parte la presencia de nanocrisales de maíz, no modificó el contenido de agua de sus respectivas películas, mientras que los de maíz waxy mostraron un aumento de esta propiedad a concentraciones intermedias de nanorefuerzos (6 % p/p) con una disminución a concentraciones superiores.

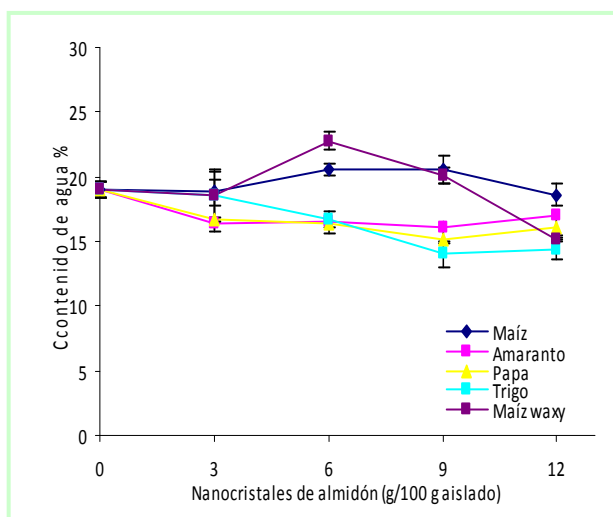


Figura III.5.7 Contenido de agua de películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocrisales de almidón de maíz, amaranto, maíz waxy, papa y trigo

En la **figura III.5.8** se muestran los resultados de la permeabilidad al vapor de agua (WVP), la solubilidad en agua y la absorción de agua (AA) de las películas obtenidas a partir de dispersiones de aislado proteico y distintas proporciones de nanocrisales de almidón de distinto origen botánico.

Las películas proteicas obtenidas en este capítulo presentaron un valor muy interesante de WVP, ya que es el menor valor encontrado entre todos los controles estudiados en los diferentes capítulos. Esto demuestra la gran dependencia de las

propiedades con las condiciones de procesamiento, lo que exige ser cuidadoso al comparar valores de propiedades de distintas películas.

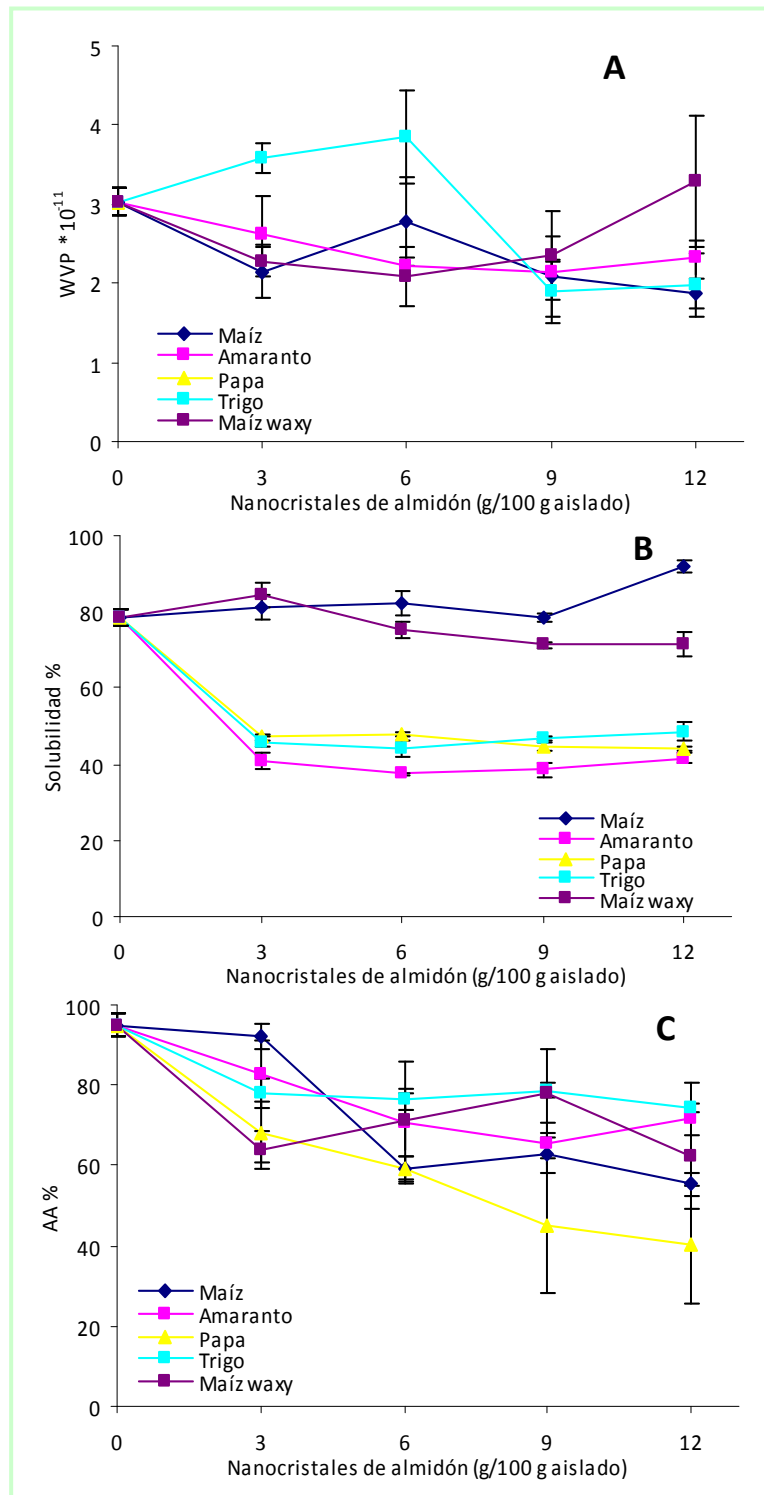


Figura III.5.8 A) permeabilidad al vapor de agua (WVP), B) solubilidad en agua y C) absorción de agua (AA) de películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocrisales de almidón de maíz, amaranto, maíz waxy, papa y trigo

La permeabilidad al vapor de agua no pudo ser determinada en las películas obtenidas con nanocristales de almidón de papa en las condiciones que habitualmente se realiza esta medida, debido a que, al colocarlas en la celda de medida, se rompían impidiendo efectuar la determinación.

Con el resto de los nanocristales agregados, no se evidenció una tendencia única, ya que los valores observados dependieron de la cantidad y el tipo de nanocristales. Por ejemplo, se observó un descenso significativo de la WVP, con todos los porcentajes agregados de nanocristales de almidón de amaranto, con el agregado hasta 6 % p/p de nanocristales de almidón de maíz waxy, y con 9 y 12 % p/p de nanocristales de almidón de trigo o de maíz, sin diferencias significativas para las concentraciones no mencionadas.

El descenso de la WVP observado anteriormente podría deberse a que dada la morfología de plaquetas que presentan los nanocristales de almidón, podrían formar un camino tortuoso para el paso de las moléculas de agua. Sin embargo, también se podría pensar en un aumento de la WVP por la naturaleza hidrofílica de los nanocristales, ya que al tener mayor afinidad por el agua, facilitarían el paso de las moléculas de agua aumentando la WVP, como lo sugirieron LeCorre y col. (2010) y Kristo y Biliaderis (2007). García y col. (2009) mostraron un descenso de la WVP de 40 % con el agregado de 2,5 % p/p de nanocristales de almidón de maíz waxy a una matriz de almidón de mandioca, efecto que atribuyeron al camino tortuoso que genera el agregado de los nanocristales, y que retrasa la difusión de las moléculas de agua. Los mismos autores mostraron más tarde el aumento de la WVP cuando los mismos nanocristales de almidón se agregaron a una matriz de almidón de maíz waxy, hecho que justificaron por la posible interacción de los nanocristales al glicerol, formando zonas con alta concentración de hidroxilos, generando así, un camino preferencial para el paso del agua que provocaba el aumento de WVP (García y col., 2011).

El agregado de nanocristales de almidón de trigo, amaranto y papa sí produjo una disminución de aproximadamente 50 % en la solubilidad en agua de las películas, independientemente de la concentración de estos nanorefuerzos. Mientras que la adición de los nanocristales obtenidos a partir de gránulos de almidón de maíz y maíz waxy, no modificaron la solubilidad de las películas proteicas.

La absorción de agua (AA) de las películas disminuyó al agregar los nanocrisales, en distinta magnitud dependiendo del tipo y la cantidad agregada. La mayor disminución se observó para el agregado de los nanocrisales de almidón de papa, en forma proporcional a la cantidad agregada. La disminución observada cuando se adicionaron los nanocrisales de almidón de amaranto también fue dependiente de la concentración de nanorefuerzos, hasta el agregado de 6 % p/p, manteniéndose luego constante. En cambio, con el agregado de nanocrisales de almidón de maíz a partir de 6 % p/p, y todos los agregados de trigo y maíz waxy, ocurrió una disminución de la AA, sin verse influenciada por la cantidad agregada.

Teniendo en cuenta, que tanto los nanocrisales como la matriz proteica son hidrofílicos, es evidente que en estas películas, la interacción entre ambos componentes, posiblemente a través de la formación de puentes de hidrogeno, dejaría menos sitios disponibles para absorber agua.

La disminución progresiva de la AA también fue reportada al agregar nanocrisales de almidón de maíz waxy a matrices de pululano. Dicho comportamiento fue atribuido a la formación de una red tridimensional de los nanocrisales a través de enlaces hidrógeno, como también a la interacción -a través de los mismos enlaces- entre el relleno y la matriz polimérica debido a su carácter polar, el cual se incrementó con la concentración, contribuyendo a bajar la sensibilidad al agua de compuestos altamente hidrofílicos (Kristo y Biliaderis, 2007). Chen y col. (2008) mostraron también una disminución de la AA debido al agregado de nanocrisales de almidón de poroto a películas de polivinilalcohol, que sugirieron que se debía a la alta cristalinidad de los nanocrisales y a las fuertes interacciones formadas entre los componentes. Otros autores han mostrado resultados diferentes, como el aumento de la AA en matrices de almidón de mandioca con nanocrisales de almidón de maíz waxy, o matrices de aislado proteico de soja con nanocrisales de almidón de poroto, que lo atribuyeron al carácter hidrofílico de los mismos (García y col., 2009; Zheng y col., 2009).

Se analizó el efecto del agregado de nanocrisales de almidón sobre la hidrofobicidad superficial de las películas con 6 y 12 % de nanocrisales de distinto origen, y para la serie completa de nanocrisales de almidón de maíz. En la **figura III.5.9** se muestra la medida del ángulo de contacto de las películas proteicas de amaranto con el agregado de nanocrisales de almidón. Los agregados de nanocrisales de almidón de amaranto

y maíz waxy a la matriz proteica produjeron un aumento en la hidrofobicidad superficial de las películas nanocompuestas resultantes, evidenciado a través del aumento del ángulo de contacto. El mismo efecto fue observado para el agregado de concentraciones inferiores al 12 % p/p de nanocrisales de maíz y papa, ya que para este porcentaje no se observaron diferencias con la película control. Por último, no se observaron modificaciones en el ángulo de contacto de las películas proteicas con el agregado de nanocrisales de almidón de trigo.

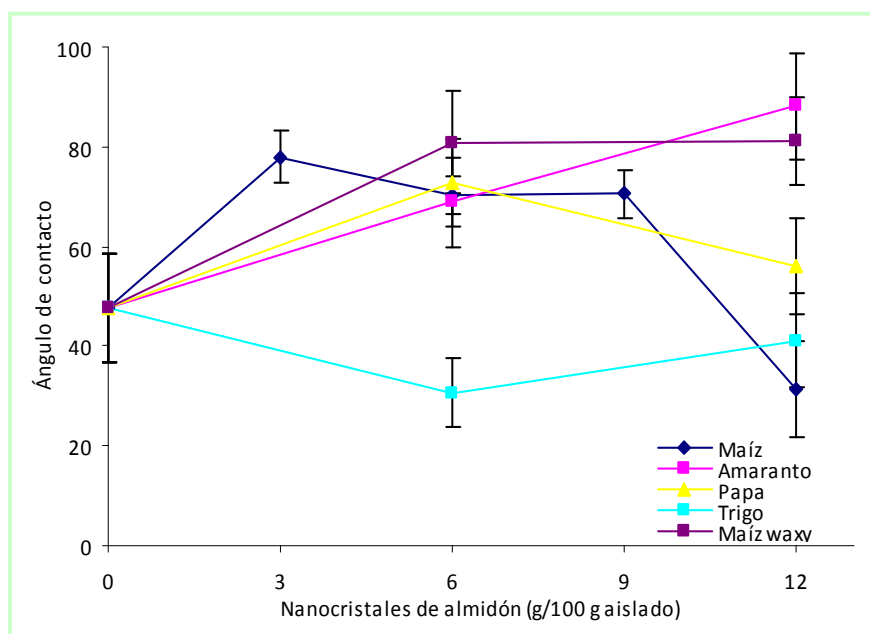


Figura III.5.9 Ángulo de contacto de películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocrisales de almidón de maíz, amaranto, maíz waxy, papa y trigo

Existen algunas tendencias generales en el comportamiento de las películas frente al agua por el agregado de los nanocrisales. Por ejemplo, con los nanocrisales de almidón de papa se vio una disminución del contenido de agua, la solubilidad y la absorción de agua, a pesar de no haber podido determinar la WVP. Con el agregado de los nanocrisales de almidón de amaranto y trigo se observó la misma tendencia que para los de papa, pero menos marcada, aunque para los nanocrisales de almidón de trigo ocurrió solo a concentraciones superiores. En el caso del agregado de nanocrisales de almidón de maíz y maíz waxy, si bien no se observan disminuciones en el contenido de agua y en la solubilidad, el agregado de los nanocrisales mejoró la

WVP y la AA. Es decir que, aunque en distinta magnitud, el agregado de los nanocristales de almidón mejoró la susceptibilidad al agua de las películas proteicas.

III.5.2.3.3 Propiedades mecánicas

En la **figura III.5.10** se muestra el efecto del agregado de los nanocristales sobre las propiedades mecánicas de las películas resultantes. Para todas las formulaciones se observó un efecto refuerzo debido a la presencia de nanocristales, que se evidenció por el aumento de la tensión a la ruptura y el módulo elástico, y la disminución de la deformación. Dicho efecto refuerzo fue proporcional al agregado de nanocristales y dependiente del origen del almidón.

En particular, el mayor aumento de la tensión a la ruptura (σ_r) se observó para las películas con nanocristales de almidón de maíz, el cual alcanzó un 470 % de aumento con el mayor agregado (12 % p/p). La adición de nanocristales de almidón de trigo también mostraron un aumento significativo en esta propiedad (210 % con el agregado de 12 % p/p de nanocristales), aunque inferior al conseguido con los nanorefuerzos de maíz. Los nanocristales de almidón de papa, maíz waxy y amaranto mostraron la misma tendencia pero en menor magnitud. Los nanocristales de maíz también fueron los que provocaron el mayor aumento en el módulo elástico (E) (970 % con el agregado de 12 % p/p) seguido por el agregado de los nanocristales de almidón de papa a concentraciones superiores al 6 % p/p. Por último, la deformación a la rotura (ϵ_{max}) disminuyó drásticamente con el agregado de los nanocristales de almidón de papa, maíz y amaranto, y menos abruptamente para el agregado de los otros dos nanocristales.

Cabe resaltar, que la fragilidad mostrada por las películas reforzadas con nanocristales de almidón de papa, probablemente haya sido la responsable de haber producido la ruptura de las películas en las condiciones en las que se determinó la WVP (con 0 % de RH dentro de la celda de medición).

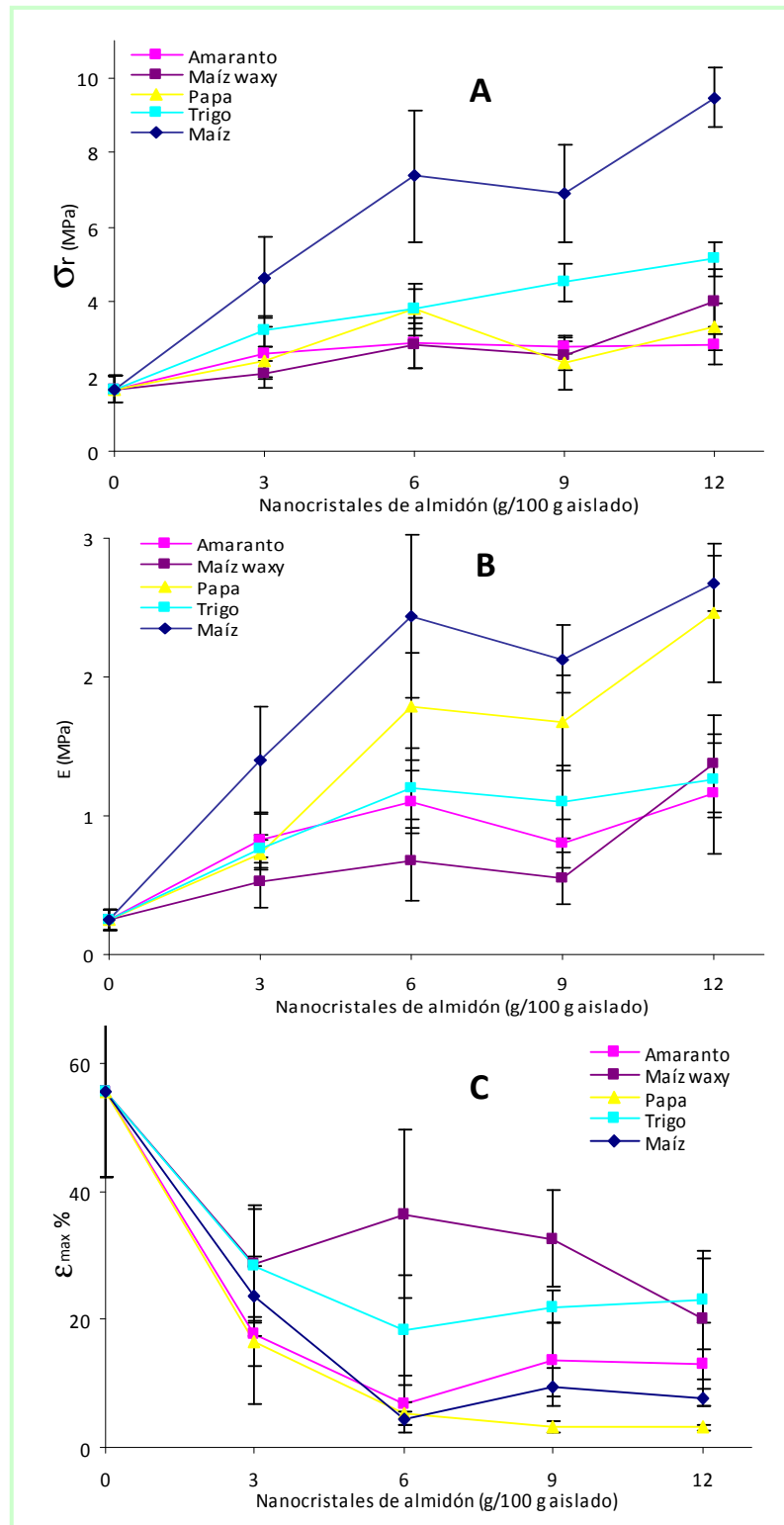


Figura III.5.10 A) tensión a la ruptura (σ_r), B) módulo elástico (E) y C) deformación a la rotura (ϵ_{max}) de las películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocrisales de almidón de maíz, amaranto, maíz waxy, papa y trigo, medidas en tracción

Varios autores han adjudicado el efecto refuerzo observado en las películas con nanocrisales a la distribución uniforme de estos debido a su pequeño tamaño, y a las

fuertes interacciones que pueden formar los nanocristales con las diferentes matrices estudiadas, como aislado proteico de soja, polivinil alcohol o distintos almidones (Zheng y col., 2009; Chen y col., 2008a; Vigiú y col., 2007). Pero el efecto que ejercen los nanocristales sobre las propiedades mecánicas tiene una fuerte dependencia con la concentración (Le Corre y col., 2010). Por ejemplo, en matrices de caucho, el mayor efecto refuerzo se observó al agregar 20 % p/p de nanocristales de almidón de maíz waxy (Angellier y col., 2005a); en matrices de proteína de soja el máximo refuerzo se observó con el agregado de 2 % p/p de nanocristales de almidón (Zheng y col., 2009); y en películas de poliuretano, el máximo efecto se observó con 5 % p/p de nanocristales de almidón de papa (Chen y col., 2008b). En particular, la gran afinidad entre las proteínas y los nanocristales de almidón, daría origen a interacciones fuertes favoreciendo el refuerzo. Debido a que los agregados de nanocristales de maíz, papa y trigo son los que presentaron menor tamaño y provocaron las mejoras más significativas en las propiedades mecánicas, podría sugerirse una cierta correlación entre estas propiedades de los materiales, aunque no está claro si los agregados mantienen su estructura luego de la formación de las películas.

III.5.2.3.4 Microestructura

En la **figura III.5.11** se muestra el corte transversal de las películas proteicas de amaranto reforzadas con 6 y 12 % p/p de nanocristales de almidón de distinto origen, obtenidos por SEM. La película control obtenida a partir de aislado proteico (**figura III.5.11 A**) presentó una microestructura homogénea de morfología lisa. Al agregar 6 o 12 % p/p de nanocristales de almidón de trigo y maíz waxy a la matriz proteica (**figura III.5.11 B y C**) la estructura no sufrió demasiados cambios. En cambio, el agregado de nanocristales de almidón de papa, amaranto y maíz (**figura III.5.11 D, E y F**) produjo la aparición de una estructura parcialmente fibrosa, respecto de la estructura observada en las películas proteicas. Dichas irregularidades fueron más notables en las películas con agregados de 6 % p/p de nanocristales de amaranto, ya que se observó que la estructura era totalmente fibrosa, que no fue tan notable con el agregado mayor.

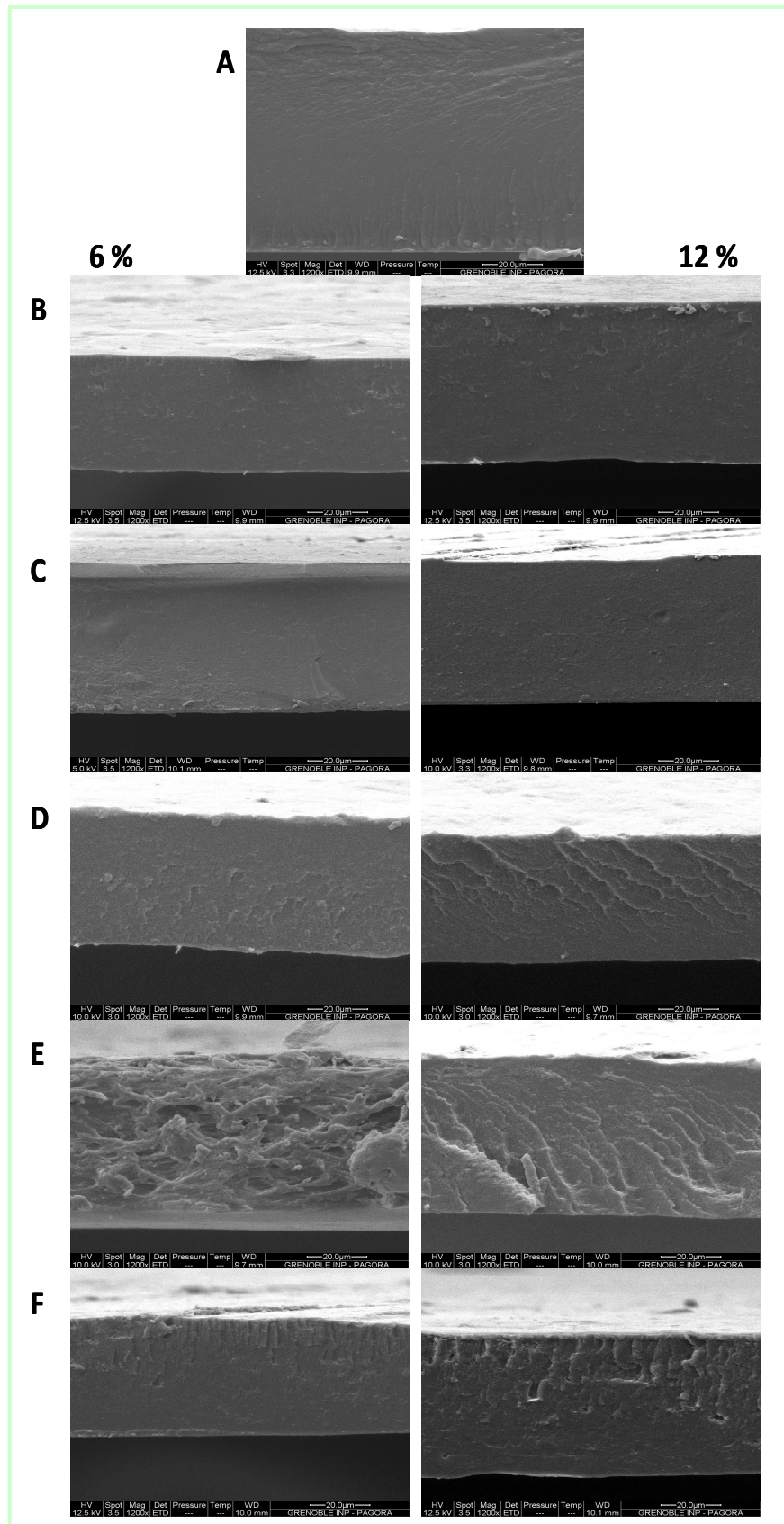


Figura III.5.11 Microscopía electrónica de barrido (SEM) (amplificación 1200) de la sección transversal crio-fracturada de películas obtenidas a partir de A) aislado proteico de amaranto y distintas cantidades (6 y 12 % p/p) de nanocrisales de almidón de: B) trigo, C) maíz waxy, D) papa, E) amaranto y F) maíz

Esto muestra que todos los nanocristales lograron dispersarse en forma homogénea en la matriz proteica, pero los de almidón de maíz waxy y trigo lograron acomodarse sin modificar la estructura, a diferencia de los otros nanocristales que modificaron la matriz haciéndola más fibrosa.

III.5.2.3.5 Solubilidad diferencial de las proteínas que constituyen las películas

En la **figura III.5.12**, se muestra la solubilidad diferencial de las proteínas formadoras de películas en diferentes buffers, con el fin de analizar el tipo de interacciones que estabilizan las películas de matriz proteica de amaranto reforzadas con 6 % p/p (**A**) y 12 % p/p (**B**) de nanocristales de almidón de distinto origen.

Las películas control fueron estabilizadas básicamente por uniones electrostáticas, puente hidrógeno y disulfuro (evidenciadas mediante la solubilización en BF, BFU, y BFDUM).

Las películas nanocompuestas presentaron un perfil de solubilidades muy distinto al de las películas control, no observándose diferencias entre los correspondientes a las películas con agregados de 6 o 12 % p/p de nanocristales.

Las películas obtenidas a partir de aislado proteico y nanocristales de almidón de maíz waxy y trigo mostraron un comportamiento similar frente a los diferentes buffers. La solubilidad en agua fue mucho menor que la correspondiente a la película control, indicando gran cantidad de interacciones entre los nanocristales y las proteínas. Dicha solubilidad aumentó levemente al exponer las películas al buffer fosfato, buffer fosfato con SDS y buffer fosfato con urea, pero al romper los enlaces disulfuro (mediante el agregado de 2-ME) se logró solubilizar la totalidad de las proteínas. Estas matrices fueron las que mostraron una microestructura más densa, y además estos nanocristales parecieran tener una buena afinidad con la matriz proteica, prueba de esto es que fueron los que disminuyeron en menor proporción la elongación a la rotura de las películas. Esto podría deberse a que los sitios de las proteínas que antes interaccionaban por puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, interaccionan ahora con los refuerzos, y que los buffers utilizados no tengan la capacidad de romper esas interacciones. Y estas interacciones podrían causar cambios conformacionales en las proteínas que favorezcan el entrecruzamiento proteico a través de puentes disulfuro. En el caso de las películas reforzadas con nanocristales de trigo, este mayor

entrecruzamiento se reflejó en el aumento importante de su resistencia a la rotura, así como en la disminución de la solubilidad en agua y la absorción de agua de la película y su contenido de agua. En el caso de los nanocrisales de maíz waxy, los cambios estructurales no se reflejaron tanto en la funcionalidad analizada de las películas nanocompuestas resultantes.

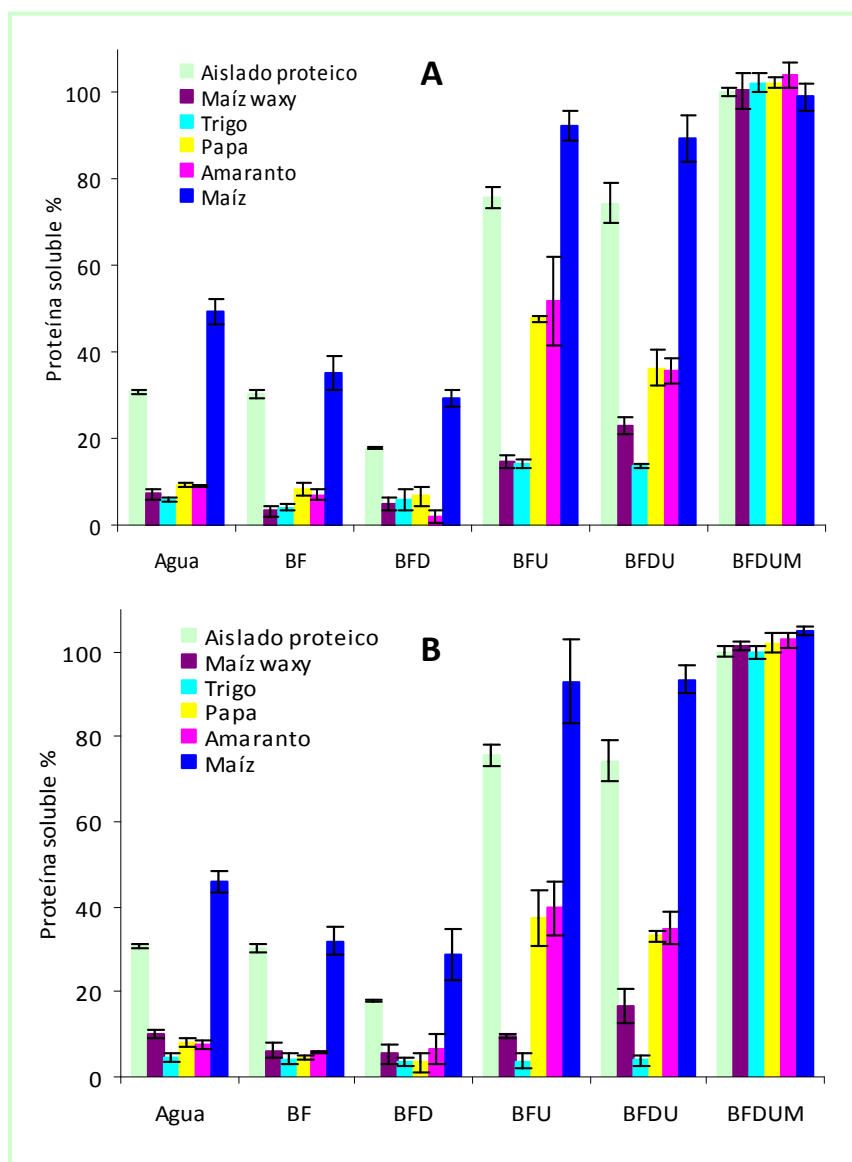


Figura III.5.12 Solubilidad diferencial de proteínas de películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocrisales de almidón de trigo, maíz waxy, papa, amaranto y maíz al A) 6 % p/p y B) 12 % p/p. Porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua, Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1 % p/v (BFD), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1 % p/v y urea 6M (BFDU), BFDU con 2-mercaptoetanol 2,5 % v/v (BFDUM), todos a pH 7,5

Las películas obtenidas a partir de aislado y nanocrisales de almidón de papa o amaranto tuvieron prácticamente el mismo comportamiento que las anteriores,

excepto que alcanzaron una mayor solubilidad en buffer fosfato con urea, pero igualmente esta solubilidad fue significativamente inferior a la de las películas proteicas. Esto indicaría un mayor aporte de uniones puente hidrógeno en la estabilización de estas matrices nanocompuestas. Estas películas fueron las que presentaron estructuras mas rugosas en las microscopias; y posiblemente por esto el efecto refuerzo no fue tan marcado en las propiedades mecánicas pero si en la disminución a la susceptibilidad al agua, ya que fueron las que mostraron menor solubilidad y menor contenido de agua y aumento en la hidrofobicidad superficial.

En cambio, las películas proteicas reforzadas con nanocristales de almidón de maíz, mostraron un perfil de solubilidad totalmente diferente, ya que en todos los buffers la solubilización de las películas nanocompuestas fue mayor o igual que para la película control, alcanzando casi el 100 % de solubilidad en el buffer con urea. La presencia de estos nanocristales pareciera estar disminuyendo el entrecruzamiento proteico, dado que existe una mayor proporción de polipéptidos libres interaccionando débilmente con la matriz (por su mayor solubilidad en agua), y los puentes disulfuro no estarían favoreciendo la integridad de la película frente a los distintos buffers. En este caso, las uniones no covalentes, principalmente del tipo puente hidrógeno y electrostáticas parecieran ser las mas importantes en la estabilización de la matriz nanocompuesta. Esta película también presento una microestructura bastante lisa, pero fue la que mejores propiedades mecánicas presentó. Posiblemente en este caso, la interacción fuerte entre la matriz proteica y los nanocristales sea más susceptible a romperse en las condiciones del ensayo o sea la responsable de la disminución del entrecruzamiento proteico.

En síntesis, las películas nanocompuestas estudiadas presentaron propiedades estructurales distintas, dado que estaban estabilizadas por distinto tipo de interacciones: las formuladas con nanocristales de almidón de trigo y maíz waxy, por uniones disulfuro; las formuladas con nanocristales de almidón de amaranto y papa, por uniones puente hidrógeno y disulfuro; y las formuladas con nanocristales de maíz, por uniones electrostáticas y puente hidrógeno.

Es evidente, que el origen botánico de los nanocristales influye en el efecto refuerzo que pueden ejercer en la matriz de amaranto formado por proteínas nativas, pero es difícil poder correlacionar cual característica de esos cristales está influyendo: la

crystalinidad, la tendencia a formar agregados más o menos homogéneos de distinto tamaño, etc. Posiblemente todos estos factores estén influyendo en forma simultánea y por eso no es posible obtener dependencias claras entre el comportamiento y las variables.

III.5.2.3.6 Cristalinidad

En la **figura III.5.13** se muestran los perfiles de rayos X de las películas obtenidas a partir de aislado proteico y 12 % p/p de nanocristales de almidón. La película control, formulada a partir de aislado proteico, mostró un levantamiento ancho entre 18 y 30°, lo cual muestra que la película proteica de amaranto es de tipo amorfa.

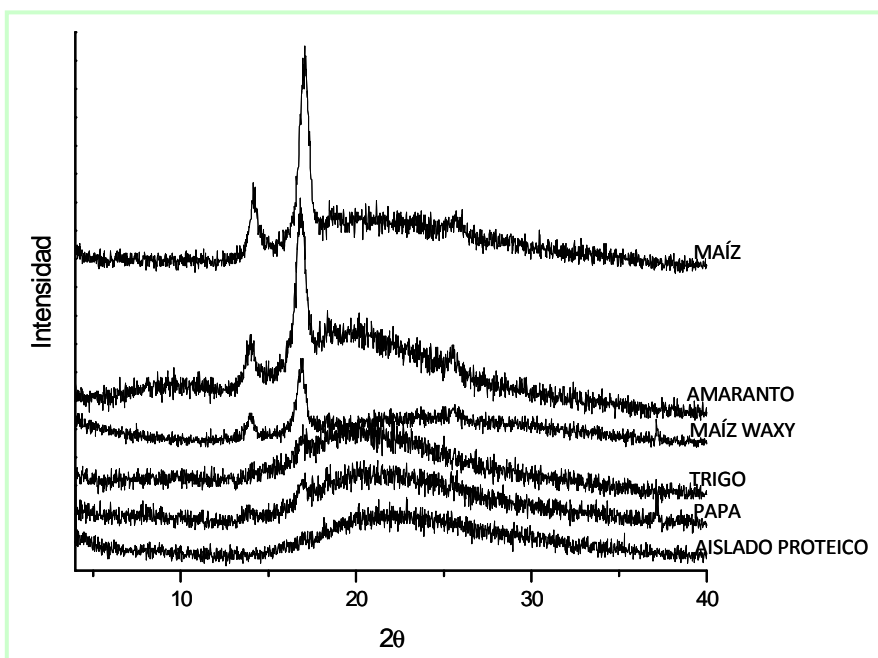


Figura III.5.13 Perfil de difracción de rayos X de películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocristales de almidón de maíz, amaranto, maíz waxy, papa y trigo al 12 % p/p

Cuando se agregaron los nanocristales de almidón de papa o trigo a la matriz proteica, las películas resultantes mostraron el mismo perfil de rayos X que el correspondiente a la película control, con la única diferencia de la aparición de un pequeño pico a 17°, pico que normalmente está presente tanto en el perfil de tipo A (trigo) como en el perfil de tipo B (papa). Esto muestra que parte de la estructura cristalina presente en los nanocristales de papa o trigo no pudo ser observada en las películas nanocompuestas.

En cambio, con el agregado de nanocrisales de almidón de maíz waxy, maíz o amaranto se detectó un perfil con picos de cristalinidad bien definidos, a 15°, observado en los nanocrisales puros, y un único pico a 17°, que en los nanocrisales puros se presentaba como un doble pico a 17-18,1°.

Es decir, que con el agregado de nanocrisales de diferente origen a la matriz proteica ocurrió la aparición parcial de la estructura semicristalina perteneciente a los nanocrisales luego del moldeado y secado de las películas. Estos resultados coinciden con los de otros autores, que han mostrado el mismo comportamiento dado por el agregado de nanocrisales de diferente origen -arveja, maíz waxy, papa- a distintas matrices -polivinilalcohol, poliuretano, pululano, aislado proteico de soja- (Chen y col., 2008 a y b; Kristo y Biliaderis, 2007; Zheng y col., 2009).

III.5.2.3.7 Determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g)

En la **figura III.5.14** se muestra la temperatura de transición vítrea (T_g) de las películas formuladas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocrisales de almidón al 6 o 12 % p/p, determinada mediante calorimetría diferencial de barrido.

La temperatura de transición vítrea aumentó aproximadamente 10 °C cuando se agregó 6 % p/p de nanocrisales de almidón de trigo o maíz; o cuando se agregó 12 % p/p de nanocrisales de almidón de amaranto, papa o maíz waxy.

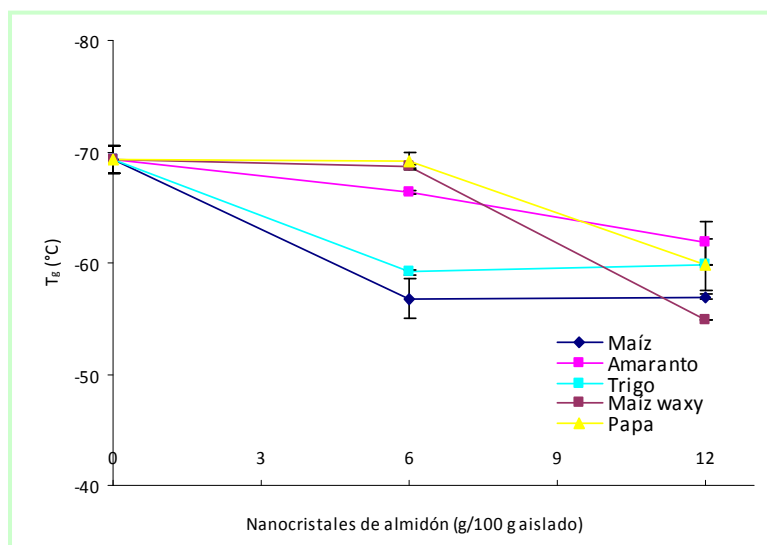


Figura III.5.14 Temperatura de transición vítrea (T_g) de películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto y nanocrisales de almidón de maíz, amaranto, maíz waxy, papa y trigo

El aumento de la temperatura de transición vítrea con el agregado de nanocristales a la matriz proteica podría deberse a que ocurre una restricción de la movilidad de las cadenas de proteína debido al establecimiento de fuertes interacciones entre los nanocristales entre sí, y entre la matriz y las nanopartículas a través de puente hidrógeno (Smith y col., 2003), y a la formación de “enredos” entre los polímeros, también obstruyendo la movilidad, no solo de los polímeros atrapados a la superficie de la partícula, sino también de los polímeros que no tienen contacto directo con las nanopartículas. En concordancia, varios autores han mostrado también un aumento de la T_g en matrices de almidón, con el incremento del agregado de nanocristales de almidón o fibras de celulosa (Angellier y col., 2006; Avérous y col., 2001).

Estos resultados correlacionarían con el mayor efecto refuerzo observado en las propiedades mecánicas, al agregar nanocristales de maíz y trigo. Además hay que considerar que si bien todas las películas tienen el mismo contenido de glicerol, no todas tienen el mismo contenido de agua, la que sin duda podría estar ejerciendo su poder plastificante. Por ejemplo, las películas con nanocristales de maíz tienen más agua que las que tienen nanocristales de trigo, por lo que si en realidad tienen igual T_g , se podría pensar en un mayor refuerzo por efecto de los nanocristales de maíz.

III.5.2.3.8 Biodesintegración en suelo

Teniendo en cuenta que tanto la matriz como los refuerzos de estas películas son totalmente biodegradables, se analizó la biodesintegración en suelo de películas de amaranto reforzadas con 6 y 12 % de nanocristales de maíz, y se las comparó con el comportamiento de las películas proteicas. En la **figura III.5.15** se muestra la pérdida de peso relativa de las películas ensayadas y su aspecto macroscópico en función del tiempo del ensayo.

Las películas control fueron los materiales que más rápidamente se biodesintegraron, ya que al cabo de una semana se observó una pérdida de peso del 80 %, en cambio para el agregado de 6 % p/p de nanocristales a la matriz, la pérdida de peso fue de 18 %, y para el agregado de 12 % p/p fue de 28 %. De todos modos, luego de 2 semanas de incubación de las películas en el suelo, la pérdida de peso fue prácticamente similar para todas las películas, alcanzando valores entre 80 y 90 %, llegando a la biodesintegración total luego de tres semanas de exposición. Esto se observa

claramente en las fotos en las que se muestra el aspecto macroscópico de las películas luego de la incubación. Esto indicaría que los nanocrisales estarían protegiendo a la matriz proteica de la biodegradación a tiempos cortos.

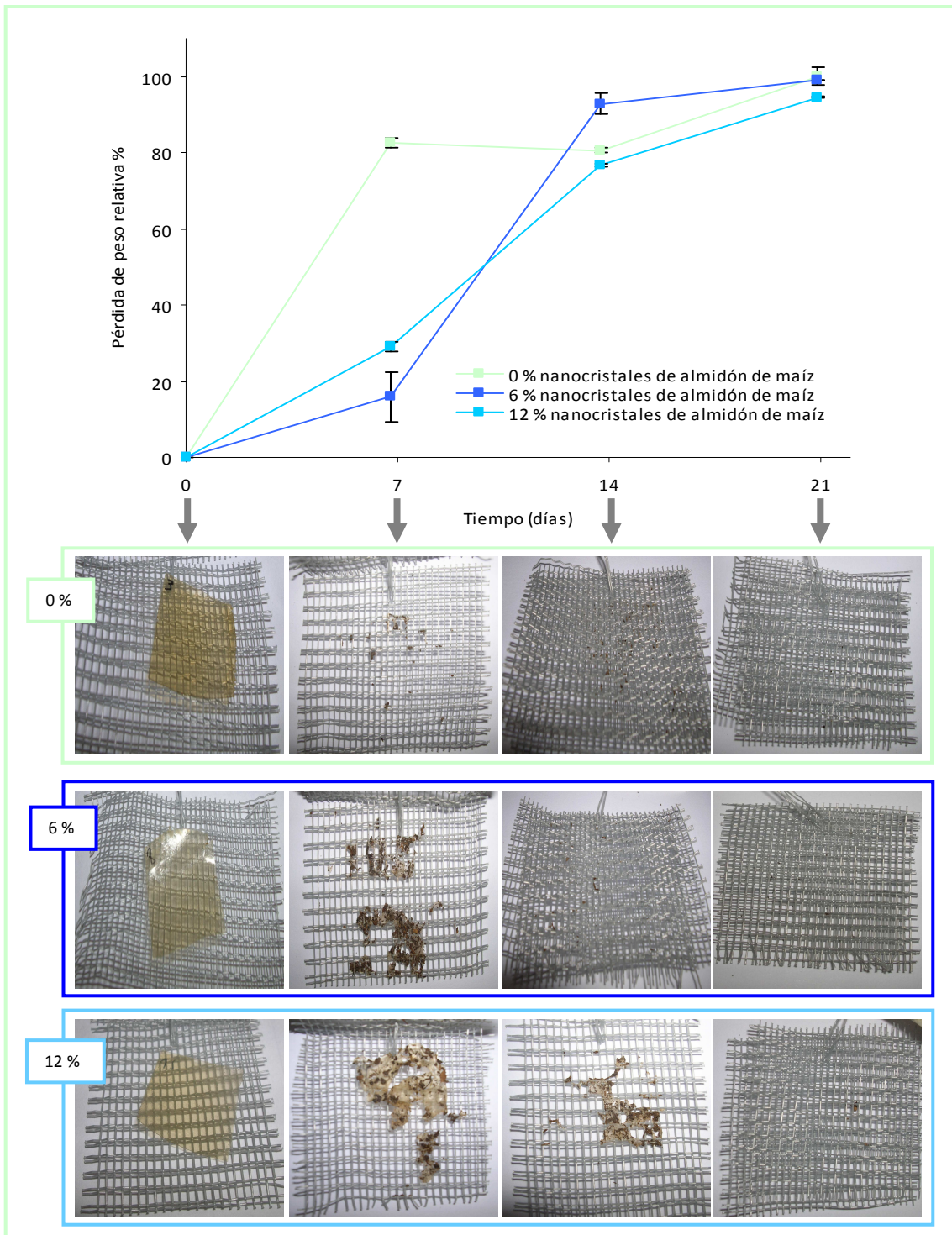


Figura III.5.15 Biodesintegración en suelo de películas obtenidas a partir de aislado proteico de amaranto (0 % p/p) y nanocrisales de almidón de maíz (6 y 12 % p/p) durante 3 semanas y aspecto macroscópico de las películas luego de la biodesintegración

Por lo tanto, las interacciones entre los nanocristales, y la afinidad de estos con la matriz proteica, reflejado en las propiedades antes analizadas, harían más difícil la biodesintegración a tiempos cortos. Cabe resaltar que este sistema es completamente biodesintegrable, ya que a diferencia de otros nanocompuestos el refuerzo también pudo desintegrarse. Estas diferencias hacen que estas películas sean muy interesantes para aplicaciones específicas.

III.5.3 Conclusión

Mediante hidrólisis ácida se obtuvieron nanocristales de almidón a partir de almidones de distinto origen botánico: maíz, maíz waxy, amaranto, trigo y papa. Todos los nanocristales fueron semicristalinos, de tamaño nanométrico, con diferente morfología, cristalinidad y tendencia a agregarse dependiendo del origen botánico del almidón del que derivan.

El agregado de nanocristales a las formulaciones proteicas de amaranto permitió obtener películas nanocompuestas con mejores propiedades que las películas control, sin modificar su apariencia. La buena afinidad entre estos nanorefuerzos y la matriz proteica de amaranto se manifestó en las distintas propiedades analizadas. El refuerzo sobre la matriz proteica resultó ser distinto dependiendo del origen botánico del almidón usado para la obtención de los nanocristales así como de la concentración agregada.

Las mejores propiedades mecánicas se alcanzaron al agregar nanocristales de almidón de maíz y trigo, y la mayor resistencia al agua la presentaron las películas con agregado de nanocristales de almidón de trigo, amaranto y papa.

Las películas nanocompuestas obtenidas con nanocristales de almidón de distinto origen botánico, presentaron propiedades estructurales diferentes que se correspondieron con sus respectivas propiedades fisicoquímicas.

No fue posible relacionar el comportamiento de las películas nanocompuestas con las características de los nanocristales estudiados, lo que evidenciaría que hay varias variables ejerciendo su efecto en forma simultánea y/o que hay que mejorar la caracterización de los nanorefuerzos.

La mejora de las propiedades amplía la posibilidad de aplicación de estos materiales, pero teniendo en cuenta la rápida biodesintegración de estos materiales en el suelo, estos siguen siendo especialmente interesantes cuando esta característica represente una ventaja.



IV. CONCLUSIONES GENERALES



- Los aislados proteicos de amaranto obtenidos mediante solubilización de las proteínas a pH alcalino (9 y 11), formados principalmente por globulinas y glutelinas nativas o parcialmente desnaturalizadas, fueron usados como biopolímeros en la preparación de películas biodegradables y/o comestibles por *casting*. Las películas resultantes plastificadas con glicerol, estabilizadas principalmente por interacciones de tipo hidrofóbicas y puente hidrógeno, resultaron ser homogéneas y transparentes, con muy buenas propiedades barrera al vapor de agua pero con pobres propiedades mecánicas y alta solubilidad en agua.

- Con el fin de mejorar la funcionalidad de estos materiales, en esta tesis se evaluaron distintas estrategias. La primera fue modificar la estructura proteica inicial mediante tratamiento térmico o con alta presión hidrostática.
 - Las proteínas de amaranto tratadas térmicamente a 70 o 90 °C, parcial o totalmente desnaturalizadas, formaron películas homogéneas con mejores propiedades mecánicas y menores solubilidades en agua pero mayores permeabilidades al vapor de agua que los aislados sin modificar. Esto pudo deberse al mayor entrecruzamiento de las matrices proteicas a través de puentes disulfuro, con poca influencia de interacciones hidrofóbicas en la estabilización de dicha matriz.
 - Por otra parte, los tratamientos con distinta intensidad de alta presión favorecieron el desplegamiento de las proteínas de amaranto, aumentando su hidrofobicidad superficial y la cantidad de SH libres. Estas proteínas modificadas formaron películas homogéneas, estabilizadas principalmente por puentes hidrógeno y uniones disulfuro. Estas películas presentaron espesores, color y contenidos de agua similares a las formadas por las proteínas sin modificar, pero mejores propiedades mecánicas, menores solubilidades y permeabilidades al vapor de agua y una opacidad levemente superior.
 - Las películas obtenidas con proteínas tratadas con alta presión presentaron mejores propiedades que aquellas formadas con aislados tratados térmicamente. Esto, junto a las ventajas adicionales que representa que el tratamiento con alta

presión puede realizarse directamente sobre la dispersión formadora de películas y sobre volúmenes más grandes, posicionan a esta metodología como una alternativa interesante para obtener películas con mejores características funcionales.

- La segunda estrategia usada para mejorar la funcionalidad de las películas proteicas de amaranto fue obtener materiales a partir de mezclas de las proteínas de amaranto con almidones de distinto origen botánico nativos, gelatinizados o hidrolizados.

- Los gránulos de almidón de maíz, maíz waxy, papa, trigo y amaranto utilizados presentaron características diferenciales en cuanto a morfología y tamaño, relación amilosa:amilopectina, tipo y grado de cristalinidad, condiciones de gelatinización y contenido de lípidos.

- Las proteínas de amaranto resultaron ser compatibles con los distintos almidones gelatinizados empleados, ya que se lograron formar dispersiones y películas homogéneas a partir de mezclas (*'blends'*) de ambos biopolímeros en distintas proporciones, a pesar que algunos de los materiales desarrollados no pudieron ser desmoldados. Fue posible mejorar la funcionalidad y apariencia de películas proteicas a partir de la incorporación a la formulación de almidones gelatinizados de trigo y maíz, no así con los almidones de papa, maíz waxy y amaranto. Las mezclas de proteínas con almidón de trigo mejoraron en mayor magnitud las propiedades relacionadas con la sensibilidad al agua (solubilidad, WVP y absorción de agua), posiblemente debido a la mayor densidad de estas películas, estabilizadas principalmente mediante interacciones hidrofóbicas, puente hidrógeno y enlaces disulfuro. En cambio, las que contenían almidón de maíz mejoraron especialmente las propiedades mecánicas, posiblemente debido a la mayor importancia de los puentes disulfuro junto a puentes hidrógeno en la estabilización de estas matrices proteicas más resistentes. Las propiedades observadas en estas películas mezcla pueden haber sido influenciadas por la relación amilosa:amilopectina y/o por la presencia de lípidos o fósforo de los respectivos almidones, sin afectar directamente el tamaño o morfología de sus gránulos, ni el tipo y grado de cristalinidad. En particular, los almidones de trigo y

maíz aun gelatinizados podrían conservar cierta estructura remanente de sus gránulos, debido al efecto protector de la amilosa y los lípidos, que podría ejercer un efecto auto refuerzo sobre las películas logrando mejorar la funcionalidad.

- Se lograron formar matrices proteicas con cantidades variables de gránulos de almidón -que conservaban su integridad- dispersos en la matriz. La dispersión de los gránulos en la matriz resultó ser dependiente del origen botánico del almidón y de las concentraciones agregadas. La incorporación de estos gránulos de almidón, con el objetivo de que actuaran como refuerzos de la matriz proteica, no influyó de manera muy notoria en las propiedades de las películas resultantes, posiblemente debido a que no se observaron interacciones importantes entre los gránulos y la matriz. Los gránulos de almidón de papa fueron los que presentaron cierta afinidad con la matriz proteica, mostrando una mayor tendencia con la concentración.

- Por hidrólisis controlada de los gránulos se obtuvieron nanocristales de almidón de maíz, maíz waxy, papa, trigo y amaranto de tamaño nanométrico y naturaleza semicristalina, con diferente morfología, cristalinidad y tendencia a agregarse dependiendo del origen botánico. El agregado de nanocristales a las formulaciones proteicas de amaranto permitió obtener películas nanocompuestas con mejores propiedades que las películas control, sin modificar su apariencia. El refuerzo alcanzado sobre la matriz proteica resulto ser dependiente del origen botánico del almidón así como de la concentración agregada. Las mejores propiedades mecánicas se alcanzaron al agregar nanocristales de almidón de maíz y trigo, y la mayor resistencia al agua la presentaron las películas con agregado de nanocristales de almidón de trigo, amaranto y papa. No fue posible relacionar el comportamiento de las películas nanocompuestas con las características de los nanocristales estudiados, lo que evidenciaría que hay varias variables ejerciendo su efecto en forma simultánea y/o que hay que mejorar la caracterización de los nanorefuerzos.

- La modificación de la estructura proteica inicial por tratamientos físicos, así como la mezcla de las proteínas de amaranto con almidones gelatinizados o el agregado de nanocristales de almidón se presentan como alternativas muy interesantes para mejorar la funcionalidad de las películas proteicas de amaranto. La combinación de

estas posibilidades sería un objetivo interesante a evaluar en futuros estudios. Es de esperar que el uso de proteínas desnaturalizadas en mezclas con almidones gelatinizados o con nanocristales de almidón, permita la formación de materiales con mejores propiedades.

- Los distintos tratamientos y estrategias analizadas, produjeron materiales con propiedades variables, que podrían ser útiles o interesantes para distintas aplicaciones. La evaluación de estas aplicaciones en sistemas reales, también queda como alternativa para futuros estudios.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Abdi, H. & Sahib, M. K. (1976). Distribution of lysine in different legumes and some species of Amaranth seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 13, 237-239.
- Abugoch James, L. E. (2006). Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Abugoch, L. E., Martínez, N. E. & Añón, M. C. (2010). Influence of pH on structure and function of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *Cereal Chemistry*, 87 (5), 448-453.
- Abugoch, L. E, Martínez E. N. & Añón, M. C. (2003). Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4060-4065.
- Adebiyi, A. P., Adebiyi, A. O., Jin, D-H., Ogawa, T. & Muramoto, K. (2008). Rice bran protein-based edible films. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 476-483.
- Alexandre, M. & Dubois, P. (2000). Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. *Material Science Engineering*, 28 (1-2), 1-63.
- Al-Hassan, A. A. & Norziah, M. H. (2012). Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 108-117.
- Allen, W. F. (1931). A micro-Kjeldahl method for nitrogen determination. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 8 (10), 391-397.
- Alvarez Hayes, J., Díaz Remires, L. E., Mauri, A. N. & Añón, M. C. (2005). Obtención de películas biodegradables a partir de proteínas de amaranto. En: Proteínas y coloides de interés industrial. Ed. Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones. ISBN 84-472-0884-2, Sevilla, pp. 215-222.
- Andrásófszky, E., Szöcs, Z., Fekete, S. & Jelenits K. (1998). Evaluation of the nutritional value of the amaranth plant. I. Raw and heat-treated grain tested in experiments on growing rats. *Acta Veterinaria Hungarica*, 46, 47-59.
- Angellier, H., Choisnard, L., Molina-Boisseau, S., Ozil, P. & Dufresne, A. (2004). Optimization of the preparation of aqueous suspensions of waxy maize starch nanocrystals using a response surface methodology. *Biomacromolecules*, 5, 1545-1551.

- Angellier, H., Molina-Boisseau, S., Dole, P. & Dufresne, A. (2006). Thermoplastic starch-waxy maize starch nanocrystals nanocomposites. *Biomacromolecules*, 7 (2), 531–539.
- Angellier, H., Molina-Boisseau, S. & Dufresne, A. (2005a). Mechanical properties of waxy maize starch nanocrystal reinforced natural rubber. *Macromolecules*, 38 (22), 9161-9170.
- Angellier, H., Molina-Boisseau, S., Lebrun L. & Dufresne A. (2005c). Processing and structural properties of waxy maize starch nanocrystals reinforced natural rubber. *Macromolecules*, 38 (9), 3783–3792.
- Angellier, H., Putaux, J.-L., Molina-Boisseau, S., Dupeyre, D. & Dufresne, A. (2005b). Starch nanocrystal fillers in an acrylic polymer matrix. *Macromolecular Symposium*, 221, 95-104.
- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed. (1995). AOAC International: Gaithersburg, MD.
- Arntfield, S. D. & Murray, E. D. (1981). The influence of processing parameters on food protein functionality. I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 14, 289-294.
- Arntfield, S. D., Murray, E. D., & Ismond, M. A. H. (1986). Effect of salt on the thermal stability of storage proteins from fababean (*Vicia faba*). *Journal of Food Science*, 51, 371-377.
- Arora, A. & Padua, G. W. (2010). Review: Nanocomposites in food packaging. *Journal of Food Science*, 75 (1), 43-49.
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E. & Nakayama, A. (1996). Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol. Part 1. *Carbohydrate Polymers*, 31, 179-192.
- Asaoka, M., Okuno, K. & Fuwa, H. (1985). Effect of environmental temperature at the milky state on amylose content and fine structure of waxy and non-waxy endosperm starches of rice (*Oryza sativa* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 373–376.
- ASTM. (2002). Standard specification for compostable plastics (Designation: D 6400-99), ASTM International, 100 Barr Harbour Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-12959, USA.

- ASTM D644-94. (1994). Standard test methods for moisture content of paper and paperboard by oven drying. En: Annual Book of ASTM Standards; ASTM. Philadelphia, PA, USA, 1-2.
- ASTM D882-91. (1991). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. En: Annual Book of ASTM Standards; ASTM. Philadelphia, PA, USA.
- ASTM E96-80. (1989). Standard test methods for water vapor transmission of materials. En: Annual Book of ASTM Standards; ASTM. Philadelphia, PA, USA, 15, 745-754.
- Atwell, W. A., Hood, L., Lineback, D., Varriano-Marston, E. & Zohel, H. (1988). The terminology and methodology associated with basic starch phenomenon. *Cereal Foods World*, 33, 306-311.
- Audic, J. L. & Chaufer, B. (2005). Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate. *European Polymer Journal*, 41 (8), 1934-1942.
- Avanza, M. V. & Añón, M. C. (2007). Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 87, 616–623.
- Avanza, M. V., Puppo, M. C. & Añón, M. C. (2005). Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food Hydrocolloids*, 19, 889-898.
- Avena-Bustillos, R. J. & Krochta, J. M. (1993). Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium cross-linking and lipid content. *Journal of Food Science*, 58 (4), 904-907.
- Avérous, L., Fringant, C. & Moro, L. (2001). Plasticized starch–cellulose interactions in polysaccharide composites. *Polymer*, 42, 6565-6572.
- Ayhllon-Meixueiro, F., Vaca-García, C. & Silvestre, F. (2000). Biodegradable films from isolates of sunflower (*Heliantus annuus*) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3032-3036.
- Azizi Samir, M. A. S., Alloin, F. & Dufresne, A. (2005). Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules*, 6 (2), 612-626.
- Badenhuizen, N. P. (1969). The biogenesis of starch granules in higher plants. New York: Appleton Crofts.

- Balny, C. & Masson, P. (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Review International*, 9, 611-628.
- Banerjee, R., Chen, H. & Wu, J. (1996). Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process. *Journal of Food Science*, 61, 824-828.
- Barba De La Rosa, A. P., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., Mendoza-Herrera, A., González-Castañeda, J. & De León-Rodríguez, A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, 49, 117-121.
- Barba de la Rosa, A. P., Gueguen, J., Paredes-López, O. & Viroben, G. (1992a). Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 931-936.
- Barba de la Rosa, A. P., Paredes-López, O. & Gueguen, J. (1992b). Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 937-940.
- Barichello, V., Yada, R. Y., Coffin, R. H. & Stanley, D. W. (1990). Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: Starch structure and composition. *Journal of Food Science*, 54, 1054-1059.
- Baum, B. R. & Bailey, L. G. (1987). A survey of endosperm starch granules in the genus *Hodeum*: a study using image analytic and numerical taxonomic techniques. *Canadian Journal of Botany*, 65, 1563-1569.
- Becker, R. (1994). Amaranth oil: composition, processing and nutritional qualities. En: *Amaranth: biology, chemistry and technology*. Ed. Paredes-López, O. Boca Ratón, Florida: CRC Press, pp. 133-141.
- Beg, M. D. H., Pickering, K. L. & Weal, S. J. (2005). Corn gluten meal as a biodegradable matrix material in wood fibre reinforced composites. *Materials Science and Engineering*, 412, 7-11.
- Betschart, A. A., Irving, D. W., Shepherd, A. D. & Saunders R. M. (1981). *Amaranthus cruentus*: milling characteristics, distribution of nutrients within seed components and the effects of temperature on nutritional quality. *Journal of Food Science*, 46, 1181-1187.

- Bewley, J. D. & Black, M. (1994). Seeds. Physiology of development and germination, 2nd Ed. Plenum Press, New York, p. 445.
- Bioplastics, 07/08. Processing parameters and technical characteristics—a global overview. Bioplastics24.com, ISSN 1863-7299.
- Blanshard, J. M. V. (1987). Starch granule structure and function: a physicochemical approach. En: Starch: Properties and Potentials; Galliard, T., Ed.; Society of Chemical Industry: London, 13, pp. 16-54.
- Bledzki, A. K. & Gassan, J. (1999). Composites reinforced with cellulose based fibres. *Progress in Polymer Science*, 24, 221–274.
- Bledski, A., Reihmane, S. & Gassanm, J. (1996). Properties and modification methods for vegetable fibers for natural fiber composites. *Journal of Applied Polymer Sciences*, 59, 1329-1336.
- Bohlmann, G. M. (2005). General characteristics, processability, industrial applications and market evolution of biodegradable polymers. En: Handbook of biodegradable polymers. Ed. Bastioli, C. Rapra Technology Limited, Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, Inglaterra: Smithers, pp. 183-217.
- Bordes, P., Pollet, E. & Avérous, L. (2010). Potential use of polyhydroxyalkanoate (PHA) for biocomposite development. En: Nano and biocomposites. Eds. Lau, A. K., Hussain, F. & Lafdi, K. CRC press.
- Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C. & Legrand, J. (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, 16, 275-284.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brandenburg, A. H., Weller, C. L. & Testin, R. F. (1993). Edible films and coatings from soy protein. *Journal of Food Science*, 58 (5), 1086–1089.
- Bressani, R. (1994). Composition and nutritional properties of amaranth. En: Amaranth: biology, chemistry and technology. Ed. Paredes-López, O. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 185-206.
- Bressani, R. (1989). The proteins of grain amaranth. *Food Review International*, 5, 13-38.

- Bressani, R. & García-Vela, L. A. (1990). Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1205-1209.
- Bressani, R., Gonzales, J. M., Zuniga, J., Breuner, M. & Elias, L. G. (1987). Yield, selected chemical composition and nutritive value of 14 selections of amaranth grain representing four species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 38, 347-356.
- Brody, A. L., Strupinsky, E. R. & Kline, L. R. (2001). Active packaging for food applications. Lancaster: Technomic Publishing. Capitulo 1.
- Bryant, C. M. & McClements, D. J. (1998). Molecular bases of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Science and Technology*, 9 (4), 143-151.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V. & Ball, S. (1998). Starch granules: Structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, 85-112.
- Callister, W. D. & Rethwisch, D. G. (2009). Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales. Limusa-Wiley, México.
- Cao, N., Fu, Y. & He, J. (2007). Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids*, 21, 1153-1162.
- Castellani, O. F., Martínez, E. N. & Añón M. C. (2000). Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis. *Journal and Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5624-5629.
- Chapleau, N. & de Lamballerie-Anton, M. (2003). Improvement of emulsifying properties of lupin proteins by high-pressure induced aggregation. *Food Hydrocolloids*, 17, 273-280.
- Cheetham, N. W. H & Tao, L. (1998). Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers*, 36, 277-284.
- Cheftel, J. C. (1989). En: Proteínas Alimentarias, Ed. Acribia, Zaragoza, A. S. A. Ch. 4, pp. 49-100.
- Chen, G., Wei, M., Chen, J., Huang, J., Dufresne, A. & Chang, P. R. (2008a). Simultaneous reinforcing and toughening: New nanocomposites of waterborne polyurethane filled with low loading level of starch nanocrystals. *Polymer*, 49, 1860-1870.
- Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk

- proteins. *Journal of Dairy Science*, 78, 2563-2583.
- Chen, Y., Cao, X., Chang, P. R. & Huneault, M. A. (2008b). Comparative study on the films of poly(vinyl alcohol)/pea starch nanocrystals and poly(vinyl alcohol)/native pea starch. *Carbohydrate Polymers*, 73 (1), 8-17.
- Cho, S.-W., Gällstedt, M., Johansson, E. & Hedenqvist, M. S. (2010). Injection-molded nanocomposites and materials based on wheat gluten. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48 (1), 146-152.
- Choi, H., Kim, W. & Shin, M. (2004). Properties of korean amaranth starch compared to waxy millet and waxy sorghum starches. *Starch*, 56 (10), 469-477.
- Choi, W. S. & Han, J. H. (2002). Film-forming mechanism and heat denaturation effects on the physical and chemical properties of pea-protein-isolate edible films. *Journal of Food Science*, 67 (4), 1399-1406.
- Condés, M. C., Speroni, F., Mauri, A. N. & Añón, M. C. (2012). Physicochemical and structural properties of amaranth protein isolates treated with high pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 11-17.
- Cooke, D. & Gidley, M. J. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization and origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*, 227, 103-112.
- Coughlan, K., Shaw, N. B., Kerry, J. F. & Kerry, J. P. (2004). Combined effects of proteins and polysaccharides on physical properties of whey protein concentrate-based edible films. *Journal of Food Science*, 69 (6), 271-275.
- Cruz-Romero, M. & Kerry, J. P. (2008). Crop-based biodegradable packaging and its environmental implications. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 3, 74, 1-25.
- Cuq, B., Gontard, N. & Guilbert N. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry*, 75 (1), 1-9.
- Cuq, B., Gontard, N. & Guilbert, S. (1997). Thermoplastic properties of fish myofibrillar proteins: application to the biopackaging fabrication. *Polymer*, 38 (16), 4071-4078.
- Cuq, B., Gontard, N. & Guilbert, S. (1995). Edible films and coatings as active layers. En: *Active Food Packagings*, Ed., Rooney, M. L. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK, pp. 111-142.

- Dalev, P. G., Patil, R. D., Mark, J. E., Vassileva, E. & Fakirov, S. (2000). Biodegradation of chemically modified gelatin films in soil. *Journal of Applied Polymer Science*, 78 (7), 1341-1347.
- Damodaran, S. (1990). Interfaces, protein films, and foams. *Advances in Food and Nutrition Research*, 34, 1-79.
- Damodaran, S. (1989). Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. En: *Food Proteins*; Kinsella, J. E., Soucie, W. G., Eds.; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL. Capítulo 3, pp. 21-51.
- Dangaran, K., Tomasula, P. M. & Qi, P. (2009). Structure and function of protein-based edible films and coatings. En: *Edible Films and Coatings for Food Applications*; Embuscado, M. E., Huber, K. C., Eds.; Springer Dordrecht Heidelberg: London New York. Capítulo 2, pp. 25-56.
- Darby, N. & Creighton, T. E. (1995). Disulfide bonds in protein folding and stability. En: *Protein Stability and Folding: Theory and Practice*. Ed. Shirley BA. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp. 219-252.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A., Delporte, B. & Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of Membrane Science*, 180 (1), 47-55.
- Debeaufort, F. & Voilley, A. (1994). Aroma compound and water vapor permeability of edible films and polymeric packagings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2871-2875.
- Denavi, G. A., Pérez-Mateos, M., Añón, M. C., Montero, P., Mauri, A. N. & Gómez-Guillén, M. C. (2009a). Structural and functional properties of soy protein isolate and cod gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 23 (8), 2094-2101.
- Denavi, G., Tapia Blácido, D. R., Añón, M. C., Sobral, P. J. A., Mauri, A. N. & Menegalli, F. C. (2009b). Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein films. *Journal of Food Engineering*, 90 (3), 341-349.
- Dias Alves, V., Mali, S., Beléia, A. & Grossmann, M. V. E. (2007). Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, 78, 941-946.
- Dikshit, A. K. (2012). Development of laser dye-doped silica nanoparticles embedded optical preform for bio-analysis. *Optical Materials*, en prensa.

- Duarte-Correa, A., Jokl, L. & Carlsson, R. (1986). Amino acid composition of some *Amaranthus* sp. grain proteins and of its fractions. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 26, 466-476.
- Dubief, D., Samain, E. & Dufresne, A. (1999). Polysaccharide microcrystals reinforced amorphous poly(β -hydroxyoctanoate) nanocomposite materials. *Macromolecules*, 32 (18), 5765-5771.
- Dufresne, A., Cavallé, J. Y. & Helbert, W. (1996). New nanocomposite materials: microcrystalline starch reinforced thermoplastic. *Macromolecules*, 29, 7624–7626.
- Eichhorn, S. J., Dufresne, A., Aranguren, M., Marcovich, N. E., Capadona, J. R., Rowan S. J., Weder, C., Thielemans, C., Roman, M., Renneckar, S., Gindl, W., Veigel, S., Keckes, J., Yano, H., Abe, K., Nogi, M., Nakagaito, A., Mangalam, A., Simonsen, J., Benight, A., Bismarck, A., Berglund, L. & Peijs, T. (2010). Review: current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Journal of Material Science*, 45, 1–33.
- Emmambux, M. N., Standing, M. & Taylor, J. R. N. (2004). Sorghum kafirin film property modification with hydrolysable and condensed tannins. *Journal Cereal Science*, 40 (2), 127-135.
- Evans, I. D. & Haisman, D. R. (1982). The effect of solutes on gelatinization temperature range of potato starches. *Starch*, 34 (7), 224-231.
- FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee. (1973). Energy and Protein Requirements. Tech. Report Series 522; FAO Nutrition Meetings Report Series No. 52. WHO, Geneva, FAO, Rome.
- Fouk, J. A. & Bunn, J. M. (2001). Properties of compression-molded, acetylated soy protein films. *Industrial Crops and Products*, 14 (1), 11-22.
- Fraga, A. & Williams, R. J. J. (1985). Thermal properties of gelatin films. *Polymer*, 26, 113-118.
- French, D. (1984). Organization of starch granules. *Starch: Chemistry and Technology*; Whistler, R. L., BeMiller, J. N., Paschall, E. F., Eds.; Academic Press: New York, pp. 183-247.
- Galazka, V. B., Dickinson, E. & Ledward, D. A. (1999a). Emulsifying behavior of 11S globulin *Vicia faba* in mixtures with sulphated polysaccharides: comparison of thermal and high-pressure treatments. *Food Hydrocolloids*, 13, 425-435.

- Galazka, V. B., Smith, D., Ledward, D. A. & Dickinson, E. (1999b). Interactions of ovalbumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength, heat and high-pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, 13, 81-88.
- Galiotta, G., Di Gioia, L., Guilbert, S. & Cuq, B. (1998). Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science*, 81 (12), 3123-3130.
- Gallant, D. J., Bouchet, B. & Baldwin, P. M. (1997). Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, 32 (3-4), 177–191.
- García, N. L., Famá, L., Dufresne, A., Aranguren, M. & Goyanes, S. (2009a). A comparison between the physico-chemical properties of tuber and cereal starches. *Food Research International*, 42, 976–982.
- García, N. L., Ribba, L., Dufresne, A., Aranguren, M. & Goyanes, S. (2009b). Physico-mechanical properties of biodegradable starch nanocomposites. *Macromolecular Materials and Engineering*, 294, 169-177.
- García, N. L., Ribba, L., Dufresne, A., Aranguren, M. & Goyanes, S. (2011). Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 84, 203-210.
- Gennadios, A. (2002). Protein-based films and coatings. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Gennadios, A., Ghorpade, V. M., Weller, C. L. & Hanna, M. A. (1996a). Heat curing of soy protein films. *Transactions of the ASABE*, 39 (2), 575-579.
- Gennadios, A., McHugh, T. H., Weller, C. L. & Krochta, J. M. (1994). Edible coatings and film based on proteins. En: J. M. Krochta, E. A. Baldwin & M. O. Nisperos-Carriedo (Eds.), *Edible coatings and films to improve food quality*. Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc., 201-277.
- Gennadios, A. & Weller, C. L. (1990). Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 44 (10), 63-69.
- Gennadios, A., Weller, C. L., Hanna, M. A. & Froning, G. W. (1996b). Mechanical and barrier properties of egg albumen films. *Journal of Food Science*, 61, 585-589.
- Ghorpade, V. M., Li, H., Gennadios, A., & Hanna, M. A. (1995). Chemically modified soy protein films. *Transactions of the ASAE*, 38, 1805-1808.
- Giannelis, E. P. (1998). Polymer-layered silicate nanocomposites: synthesis, properties and applications. *Applied Organometallic Chemistry*, 12, 675-680.

- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J. & Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat gluten and lipids water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 39-50.
- Gontard, N., Guilbert, S. & Cuq, J. L. (1992). Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57, 190-195.
- Gontard, N. & Ring, S. (1996). Edible wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3474-3478.
- Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B. & Guilbert, S. (1996). Influence of relative humidity and film composition of oxygen and carbon dioxide permeabilities of edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1064-1069.
- González, R., Tosi, E., Ré, E., Añón, M. C., Pilosof, A. M. R. & Martínez, K. (2007). Amaranth starch-rich fraction properties modified by high-temperature heating. *Food Chemistry*, 103, 927–934.
- González-Gutiérrez, J., Partal, P., García-Morales, M. & Gallegos, C. (2010). Development of highly-transparent protein/starch-based bioplastics. *Bioresource Technology*, 101 (6), 2007-2013.
- Gorinstein, S., Delgado-Licon, E., Pawelzik, E., Permady, H. H., Weisz, M. & Trakhtenberg, S. (2001). Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, aminoacid analysis, circular dichroism and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5595-5601.
- Gorinstein, S., Moshe, R., Greene L. J. & Arruda P. (1991). Evaluation of four Amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their aminoacid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 851-854.
- Gorinstein, S., Zemser, M., Fliess, A., Shnitman, I, Paredes-López, O., Yamamoto, K., Kobayashi, S. & Taniguchi, H. (1998). Computational analysis of the amino acid residue sequences of amaranth and some other proteins. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62 (10), 1845-1851.

- Gorinstein, S., Zemser, M., Friedman, M., Vasco-Méndez, N. & Paredes-López, O. (1996a). Denaturant induced conformations of globulins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 93-99.
- Gorinstein, S., Zemser, M. & Paredes-López, O. (1996b). Structural stability of globulins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 100-105.
- Gould, G. W. (1995). The microbe as a high-pressure target. En: High-pressure processing of foods. D. A. Ledward, D. E. Johnston, R. G. Earnshaw, & A. P. M. Hasting (Eds.). Loughborough, UK: Nottingham University Press, pp. 27–35.
- Gueguen, J., Viroben, G., Noireaux, P. & Subirade, M. (1998). Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins. *Industrial Crops and Products*, 7 (2-3), 149-157.
- Guilbert, S. & Cuq, B. (2005). Material formed from proteins. En: Handbook of biodegradable polymers. Ed. Bastioli, C. Rapra Technology Limited, Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, Inglaterra: Smithers, pp. 339-384.
- Guilbert, S. & Graille, J. (1994). Valorisations non alimentaires des grandes productions agricoles. Les colloques, ed., Gueguen, J. INRA Editions, Paris, France, 74, pp. 195.
- Guilherme, M. R., Mattoso, L. H. C., Gontard, N., Guilbert, S. & Gastaldi, E. (2010). Synthesis of nanocomposites films from wheat gluten matrix and MMT intercalated with different quaternary ammonium salts by way of hydroalcoholic solvent casting. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 41 (3), 375-382.
- Hayakawa, I., Linko, Y.-Y. & Linko, P. (1996). Mechanism of high- pressure denaturation of proteins. *LWT, Food Science and Technology*, 29, 756-762.
- Hedenqvist, M. S., Backman, A., Gällstedt, M., Boyd, R. H. & Gedde, U. W. (2006). Morphology and diffusion properties of whey/montmorillonite nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 66 (13), 2350-2359.
- Herald, T. J., Hachmeister, K. A., Huang, S. & Bowers, J. R. (1996). Corn zein packaging materials for cooked turkey. *Journal of Food Science*, 61, 415-421.
- Hermans, P. H. & Weidinger, A. (1948). Quantitative X-ray investigations on the crystallinity of cellulose fibres. A background analysis. *Journal of Applied Physics*, 19, 491-506.
- Hermansson, A. M. & Svegmarm, K. (1996). Developments in the understanding of starch functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 345-353.

- Hernández-Izquierdo, V. M. & Krochta, J. M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation - a review. *Journal of Food Science*, 73 (2), 30-39.
- Hood, L. L. (1987). Collagen in sausage casings. En: *Advances in Meat Research*, Vol. 4, eds., A.M. Pearson, T.R. Dutson and A.J. Bailey, New York: Van Nostrand Reinhold, pp. 109-129.
- Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, 45, 253–267.
- Hoover, R., Sinnott, A. W. & Perera, C. (1998). Physicochemical characterization of starches from *Amaranthus cruentus* grains. *Starch*, 50, 456–463.
- Hoover, R. & Vasanthan, T. (1994). The effect of annealing on the physico-chemical properties of wheat, oat, potato and lentil starches. *Journal of Food Biochemistry*, 17, 303-325.
- Hoque, S., Benjakul, S. & Prodpran, T. (2010). Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Journal of Food Engineering*, 96 (1), 66-73.
- Huang, J., Zhang, L., Wei, H. & Cao, X. D. (2004). Soy protein isolate/kraft lignin composites compatibilized with methylene diphenyl diisocyanate. *Journal of Applied Polymer Science*, 93, 624-629.
- Inatsu, O., Watanabe, K., Maida, I., Ito, K. & Osani, S. J. (1974). Studies to improve the quality of rice grown in Hokkaido. I. Amylose contents of different rice starches. *Journal of Japan Society of Starch Science*, 21, 115–117.
- Jane, J., Chen, Y. Y., Lee, L. F., McPherson, A. E., Wong, K. S., Radosavljevic, M. & Kasemsuwan, T. (1999). Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemistry*, 76 (5), 629-637.
- Jangchud, A. & Chinnan, M. S. (1999). Properties of peanut film: sorption isotherm and plasticizer effect. *LWT - Food Science and Technology*, 32, 89-94.
- Jayakody, L. & Hoover, R. (2002). The effect of lintnerization on cereal starch granules. *Food Research International*, 35 (7), 665–680.

- Jiang, Y., Tang, C. H., Wen, Q. B., Li, L. & Yang, X. Q. (2007). Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8 (2), 218–225.
- Joseph, K., Varghese, S., Kalaprasad G., Thomas, S., Prasannakumari, L., Koshym P. & Pavitharan, C. (1996). Influence of interfacial adhesion on the mechanical properties and fracture behaviour of short sisal fibre reinforced polymer composites. *European Polymer Journal*, 32 (10), 1243-1250.
- Juliano, B. O. (1971). A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Science Today*, 16, 334-340.
- Juliano, B. O., Bautista, G. M., Lugay, J. C. & Reyes, A. C. J. (1964). Studies on the physicochemical properties of rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12, 131-134.
- Kato, A. & Nakai, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophysical Acta*, 624, 13-20.
- Kauzmann, W. (1959). Some factors in the interpretation of protein denaturation. En: *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C. B., Jr., Anson, M. L., Bailey, K., & Edsall, J. T., Eds.; Academic Press: New York, vol. 14, pp. 1-35.
- Kauzmann, W. (1951). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, 14, 1-63.
- Kigel, J. (1994). Development and ecophysiology of amaranths. En: *Amaranth: biology, chemistry and technology*. Ed. Paredes-López, O. Boca Ratón, Florida: CRC Press, pp. 39-74.
- Kim, K. M., Weller, C. L., Hanna, M. A. & Gennadios, A. (2002). Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. *LWT - Food Science and Technology*, 35, 140-145.
- Koehler, P., Kieffer, R., & Wieser, H. (2010). Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten III. Studies on gluten films. *Journal of Cereal Science*, 51 (1), 140-145.
- Kong, X., Bao, J. & Corkem, H. (2009). Physical properties of *Amaranthus* starch. *Food Chemistry*, 113 (2), 371-376.
- Konishi, Y., Azumaya, J., Horikawa, K. & Nakatani, N. (1992). A pitfall in determining the

- globulin/albumin ratio in amaranth grain. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 38, 215-220.
- Konishi, Y., Fumita, Y., Ikeda, K., Okuno, K. & Fuwa, H. (1985). Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus*. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 1453-1459.
- Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya, J. & Nakatani, N. (1991). Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 1745-1750.
- Konishi, Y. & Yoshimoto, N. (1989). Amaranth globulin as a heat-stable emulsifying agent. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53 (12), 3327-3328.
- Kristo, E. & Biliaderis, C. G. (2007). Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. *Carbohydrate Polymers*, 68, 146-158.
- Krochta, J. M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current, status, and opportunities. En: Gennadios, A. (ed.), Protein-based films and coatings. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 1-42.
- Krochta, J. M. (1997). Edible protein films and coatings. En: Damodaran, S. and Paraf, A. (ed), Food proteins and their applications. New York, Marcel Dekker, Inc, pp. 529-549.
- Kumar, P., Sandeep, K. P., Alavi, S., Truong, V. D. & Gorga, R. E. (2010). Preparation and characterization of bio-nanocomposite films based on soy protein isolate and montmorillonite using melt extrusion. *Journal of Food Engineering*, 100 (3), 480-489.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 681-685.
- Lafdi, K. (2010). Nanomaterials formulation and toxicity impact. En: Nano and biocomposites, Eds. Lau, A. K., Hussain, F. & Lafdi, K. CRC Press Boca Raton London New York, capítulo 12, pp. 291-359.
- Larotonda, F. D. S. (2007). Biodegradable films and coatings obtained from carrageenan from *Mastocarpus stellatus* and starch from *Quercus suber*. Tesis. Faculty of Engineering of the University of Porto, Portugal.
- LeCorre, D., Bras, J. & Dufresne, A. (2012). Influence of native starch's properties on starch nanocrystals thermal properties. *Carbohydrate Polymers*, 87, 658- 666.

- LeCorre, D., Bras, J. & Dufresne, A. (2011a). Evidence of micro- and nanoscaled particles during starch nanocrystals preparation and their isolation. *Biomacromolecules*, 12 (8), 3039-3046.
- LeCorre, D., Bras, J. & Dufresne, A. (2011b). Ceramic membrane filtration for isolating starch nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 86 (4), 1565-1572.
- LeCorre, D., Bras, J. & Dufresne, A. (2011c). Influence of botanic origin and amylose content on the morphology of starch nanocrystals. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 7193-7208.
- LeCorre, D., Bras, J. & Dufresne, A. (2010). Starch nanoparticles: A review. *Biomacromolecules*, 11, 1139-1153.
- Li, M., Liu, P., Zou, W., Yu, L., Xie, F., Pu, H., Liu, H. & Chen, L. (2011). Extrusion processing and characterization of edible starch films with different amylose contents. *Journal of Food Engineering*, 106 (1), 95-101.
- Li, X., Scanlon, M. G., Liu, Q. & Coleman, W. K. (2006). Processing and value addition. En: J. Gopal & A. M. P. Khurana (Eds.), *Potato production improvement and post-harvest management*. New York: Haworth Press, pp. 523-555.
- Liu, Q., Tarn, R., Lynch, D. & Skjodt, N. M. (2007). Physicochemical properties of dry matter and starch from potatoes grown in Canada. *Food Chemistry*, 105, 897-907.
- Liu, W., Misra, M., Askeland, P., Drzal, L. T. & Mohanty, A. K. (2005). 'Green' composites from soy based plastic and pineapple leaf fiber: fabrication and properties evaluation. *Polymer*, 46 (8), 2710-2721.
- Liu, W., Mohanty, A. K., Askeland, P., Drzal, L. T. & Misra, M. (2004). Influence of fiber surface treatment on properties of Indian grass fiber reinforced soy protein based biocomposites. *Polymer*, 45 (22), 7589-7596.
- Ljungberg, N., Bonini, C., Bortolussi, F., Boisson, C., Heux, L. & Cavaille, J. Y. (2005). New nanocomposite materials reinforced with cellulose whiskers in atactic polypropylene: effect of surface and dispersion characteristics. *Biomacromolecules*, 6, 2732-2739.
- Lourdin, D., Della Valle, G. & Colonna, P. (1995). Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers*, 27, 261-270.
- Lyon, C. K. & Becker, R. (1987). Extraction and refining of oil from amaranth seed. *Journal American Oil Chemistry Society*, 64, 233-236.

- Maldonado-Valderrama, J. & Rodríguez Patino, J. M. (2010). Interfacial rheology of protein-surfactant mixtures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15 (4), 271-282.
- Marcone, M. F. (2001). Starch properties of *Amaranthus pumilus* (seabeach amaranth): a threatened plant species with potential benefits for the breeding/amelioration of present *Amaranthus* cultivars. *Food Chemistry*, 73, 61-66.
- Marcone, M. F. (2000). First report of the characterization of the threatened plant species *Amaranthus pumilus* (Seabeach amaranth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 378-382.
- Marcone, M. F. (1999). Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed. *Food Chemistry*, 65, 533-542.
- Marcone, M. F., Kakuda, Y. & Yada, R. Y. (1998). Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. *Food Chemistry*, 63, 265-274.
- Marcone, M. F. & Yada, R. Y. (1991). Isolation, purification, and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 2281-2289.
- Martínez, C. & Cuevas, F. (1989). Evaluación de la calidad culinaria y molinaria del arroz. *Guía de estudio, CIAT*, 75.
- Martínez, E. N. & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates: an electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44, 2523-2530.
- Martínez, E. N., Castellani, O. F. & Añón, M. C. (1997). Common molecular features among amaranth storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3832-3839.
- Maruyama, N. & Prak, K. (2004). Structure-physicochemical function relationships of soybean glycinin at subunit levels assessed by using mutant lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (26), 8197-8201.
- Maruyama, N. & Sato, R. (1999). Structure-physicochemical function relationships of soybean beta-conglycinin constituent subunits. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 47 (12), 5278-5284.

- Mauri, A. N. & Añón, M. C. (2011). Proteínas como envases alimentarios. En: Películas y recubrimientos comestibles: propiedades y aplicaciones en alimentos, Ed. Olivas, G. I., Soliva-Fortuni, R., Martín-Belloso, O. & González-Aguilar, G. Editorial Trillas, México. En prensa.
- Mauri, A. N. & Añón, M. C. (2008). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH-modified microstructures. *Food Science and Technology International*, 14 (2), 119-125.
- Mauri, A. N. & Añón, M. C. (2006). Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (7), 1064-1072.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R. & Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58, 899–903.
- McHugh, T. H. & Krochta, J. M. (1994a). Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 71 (3), 307-312.
- McHugh, T. H. & Krochta, J. M. (1994b). Sorbitol vs. glycerol-plasticized whey protein edible films: integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 841-845.
- Micard, V., Belamri, R., Morel, M-H. & Guilbert, S. (2000). Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (7), 2948-2953.
- Micard, V., Morel, M-H., Bonicel, J. & Guilbert, S. (2001). Thermal properties of raw and processed wheat glutenin relation with protein aggregation. *Polymer*, 42, 477-485.
- Miller, K. S., Chiang, M. T. & Krochta, J. M. (1997). Heat curing of whey protein films. *Journal of Food Science*, 62 (6), 1189-1193.
- Mohanty, A. K., Misra, M. & Hinrichsen, G. (2000). Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. *Macromolecular Materials and Engineering*, 276/277, 1-24.
- Molina Ortiz, S. E. & Wagner, J. R. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: Structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research Internacional*, 35 (6), 511-518.

- Morrison, W. R., Milligan, T. P. & Azudin, M. N. (1984). A relationship between the amylose and lipids contents of starches from diploid cereals. *Journal of Cereal Science*, 2, 257-260.
- Morrison, W. R., Tester, R. F., Snape, C. E., Law, R. V. & Gidley, M. J. (1993). Swelling and gelatinization of cereal starches. IV. Some effects of lipids complexed amylose and free amylose in waxy and normal barley starches. *Cereal Chemistry*, 70, 385–391.
- Mungara, P., Zhang, J., Zhang, S, & Jane, J. (2002). Soy protein utilization in compression-molded, extruded, and injection-molded degradable plastics. En: Protein based films and coatings, Ed. Gennadios A. CRC Press: Estados Unidos, pp. 621-638.
- Muscat, D., Adhikari, B., Adhikari, R. & Chaudhary, D. S. (2012). Comparative study of film forming behaviour of low and high amylase starches using glycerol and xylitol as plasticizers. *Journal of Food Engineering*, 109, 189-201.
- Nakai, S. (1983). Structure-function relationships of food proteins: with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 31 (4), 676-683.
- Namazi, H. & Dadkhah, A. J. (2008). Surface modification of starch nanocrystals through ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone and investigation of their microstructures. *Journal of Applied Polymer Science*, 110 (4), 2405–2412.
- Nara, S., Mori, A. & Komiya, T. (1978). Study on relative crystallinity of moist potato starch. *Starch*, 30 (4), 111-114.
- National Academy of Sciences. (1975). Underexploited tropical plants with promising economic value. Washington D. C.: Editado por National Academy of Sciences Press.
- National Research Council. (1984). Amaranth: modern prospects for an ancient crop. Washington DC.: National Academy of Sciences Press.
- Oates, C. G. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Science and Technology*, 8 (11), 375-382.
- O'Reilly, C. E., Kelly, A. L., Murphy, P. M. & Beresford, T. P. (2001). High-pressure treatment: applications in cheese manufacture and ripening. *Trends Food Science Technology*, 12, 51–59.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F. & Rigal, L. (2002). Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer*, 43, 5417-5425.

- Orliac, O., Silvestre, F., Rouilly, A. & Rigal, L. (2003). Rheological studies, production, and characterization of injection-molded plastics from sunflower protein isolate. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42, 1674–1680.
- Osborne, T. (1924). En: *The vegetable Proteins*. 2da. edición Ed, Longmans y Green, Nueva York.
- Oszvald, M., Tamás, C., Rakszegi, M., Tömösközi, S., Békés, F. & Tamás, L. (2009). Effects of incorporated amaranth albumins on the functional properties of wheat dough. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89 (5), 882–889.
- Paetau, I., Chen, C. Z. & Jane, J. (1994). Biodegradable plastic made from soybean products. II. Effects of cross-linking and cellulose incorporation on mechanical properties and water absorption. *Journal of Polymers and the Environment*, 2 (3), 211-217.
- Paredes-López, O., Mendoza, V. & Mora, R. (1993). Isolation of amaranth flour proteins by fractionation procedures and sonication. *Plant Foods Human Nutrition*, 43, 37-43.
- Park, H. J., Rhim, J. W., Weller, C. L., Gennadios, A. & Hanna, M. A. (2002). Films and coatings from proteins of limited availability. En: Gennadios, A. (ed.), *Protein-based films and coatings*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 305-327.
- Pereda, M., Amica, G., Rácz, I. & Marcovich, N. E. (2011). Structure and properties of nanocomposite films based on sodium caseinate and nanocellulose fibers. *Journal of Food Engineering*, 103 (1), 76-83.
- Perez, E., Bahnassey, Y. A. & Breene, W. M. (1993). A simple laboratory scale method for isolation of amaranth starch. *Starch*, 45 (6), 211–214.
- Pérez-Gago, M. & Krochta, J. (2005). Emulsion and bilayer edible films. En: *Innovations in food packaging*. Ed. Han, J. Academic press, pp. 384-402.
- Pérez-Gago, M. B. & Krochta, J. M. (2001). Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science*, 66 (5), 705-710.
- Pérez-Gago, M. B., Nadaud, P. & Krochta, J. M. (1999). Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science*, 64, 1034–1037.
- Petr, J., Michalik, I., Tlaskalova, H., Capouchova, I., Famera, O., Urminska, D., Tukova, L. & Knoblochova, H. (2003). Extension of the spectra of plant products for the diet in

- celiac disease. *Journal of Food Science*, 21, 59-70.
- Petrucelli, S. & Añón, M. C. (1995). Thermal aggregation of soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 3035-3041.
- Petrucelli, S. & Añón, M. C. (1994). Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2161-2169.
- Pilosof, A. M. R. (2000). Propiedades de hidratación. En: Pilosof, A. M. R. & Bartholomai, G. B. Caracterización funcional y estructural de proteínas. Eudeba. CYTED. Buenos Aires, Argentina, cap. 1, pp. 17–28.
- Prakash, D., Joshi, B. D. & Pal M. (1995). Vitamin C in leaves and seed oil composition of the amaranthus species. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 46, 47-51.
- Prakash, D. & Pal, M. (1991). Nutritional and antinutritional composition of vegetable and grain amaranth leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57, 573-585.
- Puppo, M. C., Speroni, F., Chapleau, N., de Lamballerie, M., Añón, M. C. & Anton, M. (2005). Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins. *Food Hydrocolloids*, 19, 289-296.
- Putaux, J. L., Molina-Boisseau, S., Momaur, T. & Dufresne, A. (2003). Platelet nanocrystals resulting from the disruption of waxy maize starch granules by acid hydrolysis. *Biomacromolecules*, 4 (5), 1198–1202.
- Quezada Gallo, J.-A., Debeaufort, F., Callegarin, F. & Voilley, A. (2000). Lipid hydrophobicity, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based edible films. *Journal of Membrane Science*, 180 (1), 37-46.
- Rangavajhyala, N., Ghorpade, V. & Hanna M. (1997). Solubility and molecular properties of heat-cured soy protein film. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 4204-4208.
- Rao, Y. Q. (2007). Gelatine-clay nanocomposites of improved properties. *Polymer*, 48 (18), 5369-5375.
- Ray, S. S. & Okamoto, M. (2003). Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science*, 28 (11), 1539-1641.

- Reis, K. C., Pereira, J., Smith, A. C., Carvalho, C. W. P., Wellner, N. & Yakimets, I. (2008). Characterization of polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV)/maize starch blend films. *Journal of Food Engineering*, 89, 361-369.
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C. L. & Hanna, M. A. (2000). Solubility, tensile and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4937-4941.
- Rhim, J., Gennadios, A., Weller, C. L., Cezeirat, C. & Hanna, M. A. (1998). Soy protein isolate – dialdehyde starch films. *Industrial Crops and Products*, 8, 195-203.
- Rhim, J. W., Lee, J. H. & Ng, P. K. W. (2007). Mechanical and barrier properties of biodegradable soy protein isolate-based films coated with polylactic acid. *LWT - Food Science and Technology*, 40 (2), 232-238.
- Rindlav-Westling, A., Stading, M., Hermansson, A. M. & Gatenholm, P. (1998). Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films. *Carbohydrate Polymers*, 36, 217-224.
- Rodríguez Patino, J. M. & Pilosof, A. M. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food hydrocolloids*, 25 (8), 1925-1937.
- Rouilly, A., Mériaux, A., Geneau, C., Silvestre, F. & Rigal, L. (2006a). Film extrusion of sunflower protein isolate. *Polymer Engineering Science*, 46, 1635–1640.
- Rouilly, A., Orliac, O., Silvestre, F. & Rigal, L. (2006b). New natural injection-moldable composite material from sunflower oil cake. *Bioresource Technology*, 97, 553–561.
- Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R. & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1433-1440.
- Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S. & Mauri, A. N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids*, 24 (5), 525-533.
- Salgado, P. R., Schmidt, V. C., Molina Ortiz, S. E., Mauri, A. N., Laurindo, J. B. (2008). Biodegradable foams based on cassava starch, sunflower proteins and cellulose fibers obtained by a baking process. *Journal of Food Engineering*, 85, 435-443.
- Sandhu, K. S., Singh, N. & Kaur, M. (2004). Characteristics of the different corn types and their grain fractions: physicochemical, thermal, morphological, and rheological properties of starches. *Journal of Food Engineering*, 64, 119-127.

- Saunders, R. & Becker R. (1984). Amaranthus: a potential food and feed resource. En: *Advances in Cereal Science and Technology*. Ed. Pomeranz, Y. St. Paul.: American Association of Cereal Chemists, pp. 357-397.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379.
- Segura-Nieto, M., Barba de la Rosa, A. P. & Paredes-López, O. (1994). Biochemistry of amaranth proteins. En: Paredes-López, O. (Ed.), *Amaranth: Biology, Chemistry, and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 75–106.
- Segura-Nieto, M., Vázquez-Sánchez, N., Rubio-Velázquez, H., Olguín-Martínez, L. E., Rodríguez-Néster, C. E. & Herrera-Estrella L. (1992). Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1553-1558.
- Shukla, S., Bhargava, A., Chatterjee, A., Srivastava, A. & Singh, S. P. (2006). Genotypic variability in vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) for foliage yield and its contributing traits over successive cuttings and years. *Euphytica*, 151, 103-110.
- Shukla, S., Pandey, V., Pachauri, G., Dixit, B. S., Banerji, R. & Singh, S. P. (2003). Nutritional contents of different foliage cuttings of vegetable amaranth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58, 1-8.
- Siew, D. C. W., Heilmann, C., Easteal, A. J. & Cooney, R. P. (1999). Solution and film properties of sodium caseinate/glycerol and sodium caseinate/polyethylene glycol edible coating systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3432-3440.
- Silva, J. L. & Weber, G. (1993). Pressure stability of proteins. *Annual Review of Physical Chemistry*, 44, 89-113.
- Silva-Sánchez, C., González-Castañeda, J., De León-Rodríguez, A. & Barba de la Rosa, A. P. (2004). Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two mexican varieties. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 169-174.
- Singh, N., Inouchi, N. & Nishinari, K. (2006). Structural, thermal and viscoelastic characteristics of starches separated from normal, sugary and waxy maize. *Food Hydrocolloids*, 20, 923–935.

- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S. & Gill, B. S. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81, 219-231.
- Singh, V. & Ali, S. Z. (2008). Properties of starches modified by different acids. *International Journal of Food Properties*, 11 (3), 495–507.
- Singh, V. & Ali, S. Z. (2000). Acid degradation of starch. The effect of acid and starch type. *Carbohydrate Polymers*, 41, 191–195.
- Singh, V. & Ali, S. Z. (1993). ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy of native and acid modified starches. *Starch*, 45, 59–62.
- Singh, V. & Ali, S. Z. (1987). Comparative acid modification of various starches. *Starch*, 39, 402–405.
- Singhal, R. S. & Kulkarni P. R. (1988). Composition of the seeds of some Amaranthus species. *Journal of Science and Food Agricultural*, 42, 325-331.
- Sinha Ray, S. & Bousmina, M. (2005). Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites. En: Greening the 21st Century Materials World. *Progress in Materials Science*, 50, 962-1080.
- Smith, J. S., Bedrov, D. & Smith, G. D. (2003). A molecular dynamics simulation study of nanoparticle interactions in a model polymer-nanoparticle composite. *Composite Science and Technology*, 63, 1599-1605.
- Song, F., Tang, D., Wang, X. & Wang, Y. (2011). Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. *Biomacromolecules*, 12, 3369-3380.
- Sothornvit, R. & Krochta, J. M. (2001). Plasticizer effect on mechanical properties of X-lactoglobulin films. *Journal of Food Engineering*, 50 (3), 149-155.
- Speroni, F., Añón, M. C. & de Lamballerie, M. (2010). Effects of calcium and high pressure on soybean proteins: A calorimetric study. *Food Research International*, 43, 1347-1355.
- Speroni, F., Beaumal, V., de Lamballerie, M., Anton, M., Añón, M. C. & Puppo, M. C. (2009). Gelation of soybean proteins induced by sequential high-pressure and thermal treatments. *Food Hydrocolloids*, 23, 1433-1442.
- Stevens, D. J. & Elton, G. A. H. (1971). Thermal properties of starch/ water system. I. Measurement of heat of gelatinization by differential scanning calorimetry. *Starch*, 23, 8-11.

- Stuchell, Y. M. & Krochta, J. M. (1994). Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. *Journal of Food Science*, 59, 1332–1337.
- Subramaniyan, A. K. & Sun, C. T. (2006). Enhancing compressive strength of unidirectional polymeric composites using nanoclay. *Composites: Part A*, 37, 2257-2268.
- Sudesh, K. & Iwata, T. (2008). Sustainability of biobased and biodegradable plastics. *Clean*, 36 (5–6), 433 – 442.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. A review. *Biotechnology Advances*, 25, 148-175.
- Svegmark, K. & Hermansson, A. M. (1993). Microstructure and rheological properties of composites of potato starch granules and amylose: A comparison of observed and predicted structure. *Food Structure*, 12, 181–193.
- Swinkels, J. J. (1985). Composition and properties of commercial native starches. *Starch*, 37 (1), 1-5.
- Tabbaco, A., Meiattini, F., Moda, E. & Tarli, P. (1979). Simplified enzymic colorimetric serum urea nitrogen determination. *Clinical Chemistry*, 25, 336-337.
- Tang, H., Mitsunaga, T. & Kawamura, Y. (2006). Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture. *Carbohydrate Polymer*, 63 (4), 555–560.
- Tapia-Blácido, D. R. (2006). Filmes a base de derivados do amaranto para uso em alimentos. Tesis doctoral, Universidad de Campinas, Sao Paulo, Brasil, pp. 261.
- Tapia-Blácido, D., Mauri, A. N., Menegalli, F. C., Sobral, P. J. A. & Añón, M. C. (2007). Contribution of the starch, protein, and lipid fractions to the physical, thermal, and structural properties of amaranth (*Amaranthus caudatus*) flour films. *Journal of Food Sciences*, 72 (5), 293-300.
- Tapia-Blácido, D. R., Sobral, P. J. & Menegalli, F. C. (2005). Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Food Engineering*, 67, 215-223.
- Tedford, L. A., Smith, D. & Schaschke, C. J. (1999). High-pressure processing effects on the molecular structure of ovalbumin, lysozyme, and β -lactoglobulin. *Food Research International*, 32, 101- 106.
- Tester, R. F. (1997). Starch: the polysaccharide fractions. En: P. J. Frazier, P. Richmond,

- & A. M. Donald (Eds.), Starch, structure and functionality. Royal Society of Chemistry. pp. 163–171.
- Tester, R. F. & Morrison, W. R. (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches. *Cereal Chemistry*, 67, 558–563.
- Thielemans, W., Belgacem, M. N. & Dufresne, A. (2006). Starch nanocrystals with large chain surface modifications. *Langmuir*, 22 (10), 4804-4810.
- Trezza, T. A. & Vergano, P. J. (1994). Grease resistance of corn zein coated paper. *Journal of Food Science*, 59, 912–915.
- Tunc, S., Angellier, H., Cahyana, Y., Chalier, P., Gontard, N. & Gastaldi, E. (2007). Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 289 (1-2), 159-168.
- Utsumi, S. & Kinsella, J. E. (1985). Structure-function relationship in food proteins: subunit interactions in heat induced gelation of 7S, 11S and soy isolate proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 33 (2), 297-303.
- Van der Plancken, I., Van Loey, A. & Hendrickx, M. E. (2007). Foaming properties of egg white proteins affected by heat or high pressure treatment. *Journal of Food Engineering*, 78(4), 1410-1426.
- van Tuil, R., Fowler, P., Lawther, M. & Weber C. J. (2000). Properties of biobased packaging materials. En: Biobased packaging materials for the food industry: status and perspectives. Ed. Weber, C. J. KVL: Frederiksberg, Dinamarca, pp. 13-44.
- Varatharajan, V., Hoover, R., Liu, Q. & Seetharaman, K. (2010). The impact of heat-moisture treatment on the molecular structure and physicochemical properties of normal and waxy potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 81 (2), 466-475.
- Vaz, C. M., de Graaf, L. A., Reis, R. L. & Cunha, A. M. (2003). In vitro degradation behaviour of biodegradable soy plastics: effects of crosslinking with glyoxal and thermal treatment. *Polymer Degradation and Stability*, 81 (1), 65-74.
- Viguié, J., Molina-Boisseau, S. & Dufresne, A. (2007). Processing and characterisation of waxy maize starch films plasticized by sorbitol and reinforced with starch nanocrystals. *Macromolecular Bioscience*, 7 (11), 1206-1216.
- Vinson, J. R. & Sierakowski, R. L. (1986). The behavior of structures composed of composite materials. 2ª edición. Kluwer Academic Publishers, Holanda.

- Visakh, P. M., Thomas, S., Oksman, K. & Mathew, A. P. (2012). Crosslinked natural rubber nanocomposites reinforced with cellulose whiskers isolated from bamboo waste: Processing and mechanical/thermal properties. *Composites: Part A*, 43, 735-741.
- Wagner, J. (2000). Propiedades superficiales. En: Caracterización funcional y estructural de proteínas. Bartholomai, G., Pilosof, A. Editores, Cyted, Editorial Universitaria de Buenos Aires, pp. 55-70.
- Wambua, P., Ivens, J. & Verpoest, I. (2003). Natural fibres: can they replace glass in fibre reinforced plastics?. *Composite Science and Technology*, 63, 1259–1264.
- Wang, X. S., Tang, C. H., Li, B. S., Yang, X. Q., Li, L. & Ma, C. Y. (2008). Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional. Properties of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 22, 560-567.
- Wang, Y. & Zhang, L. (2008). High-strength waterborne polyurethane reinforced with waxy maize starch nanocrystals. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8, 5831-5838.
- Woodward, R. P. (1999). Contact angle measurements using the drop shape method. Portsmouth, VA: First Ten Angstroms Inc., pp. 1-8.
- Yoo, S. & Jane, J. (2002). Structural and physical characteristics of waxy and other wheat starches. *Carbohydrate Polymers*, 49, 297-305.
- Yu, J., Ai, F., Dufresne, A., Gao, S., Huang, J. & Chang, P. R. (2008). Structure and mechanical properties of poly(lactic acid) filled with (starch nanocrystal)-graft-poly(ϵ -caprolactone). *Macromolecular Material Engineering*, 293, 763–770.
- Zhang, H., Li, L., Tatsumi, E. & Isobe, S. (2005). High-pressure treatment effects on proteins in soy milk. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 7-14.
- Zhang, H. & Mittal, G. (2010). Biodegradable protein-based films from plant resources: A review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 23, 203-220.
- Zhao, R., Torley, P. & Halley, P. J. (2008). Emerging biodegradable materials: starch and protein-based bio-nanocomposites. *Journal of Materials Science*, 43 (9), 3058-3071.
- Zheng, H., Ai, F., Chang, P. R., Huang, J. & Dufresne, A. (2009). Structure and properties of starch nanocrystal-reinforced soy protein plastics. *Polymer Composites*, 30 (4), 474-480.

Zobel, H. F. (1988a). Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch*, 40, 1-7.

Zobel, H. F. (1988b). Molecules to granules - a comprehensive starch review. *Starch*, 40, 44-50.

Zobel, H. F., Young, S. N. & Rocca, L. A. (1988). Starch Gelatinization: An X-ray Diffraction Study. *Cereal Chemistry*, 65 (6), 443-446.

Zuo, M., Song, Y. & Zheng, Q. (2009). Preparation and properties of wheat gluten/methylcellulose binary blend film casting from aqueous ammonia: A comparison with compression molded composites. *Journal of Food Engineering*, 91 (3), 415-422.