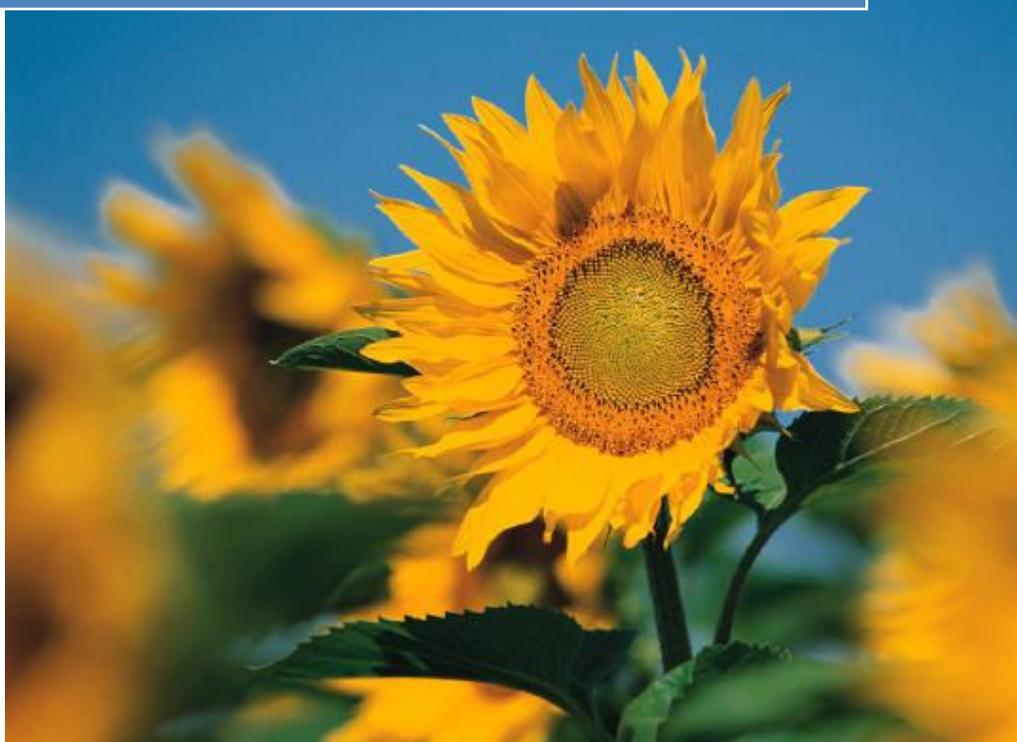


Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

Tesis Doctoral
Proteínas de Girasol: aislamiento, caracterización
y aplicación en la industria alimentaria



Tesista: Ing. Qco. Pablo Salgado

Directores: Dra. Adriana Mauri
Dra. Silvana Petruccelli

Año 2009

El presente trabajo de tesis, para optar por el título 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).



Quisiera agradecer a:

Las Dras. Adriana Mauri, Silvana Petruccelli y Sara Molina Ortiz, por haber confiado en mí para llevar a cabo este trabajo de tesis.

Los integrantes de *Proteínas*, por estar siempre presentes y dispuestos para compartir técnicas de laboratorio y análisis de resultados entre mates, alegrías y tristezas.

Rolando, Silvina D., Oscar, Adriana y Silvina L., por haberme hecho sentir uno más del ITA y por hacer realidad el sueño de la planta piloto.

Vivian, João y Carmen, por haberme recibido en Brasil y hacer de mi estadía allí un grato recuerdo.

Gabriela Diosma y Aceitera Santa Clara (Molinos Río de La Plata), por proveer el *pellet* de girasol.

Edgardo Donati y Marisa Viera (CINDEFI), por poner a disposición el espectrofluorómetro.

Aldo, Daniel, Javier, Claudio y Arturo, por el apoyo técnico.

Todos y cada uno de los integrantes del CIDCA, por nuestro tiempo de trabajo compartido.

ASAGIR, ANPCYT y CONICET por haber financiado el trabajo.

La UNLP, por haberme brindado formación de excelencia en forma gratuita.

Mis padres, mis hermanos y mi abuela, por sus esfuerzos de cada día, por apoyarme, por haberme dado siempre lo mejor y por enseñarme como ser una buena persona.

Jor, por su apoyo y por su amor incondicional, por elegir cada día compartir su vida conmigo y hacerme feliz.

Agustín, por su dulzura y su capacidad de hacerme sonreír en los peores momentos, por hacerme feliz.

Mi familia y mis amigos, por estar siempre presentes.

Dios, por mi vida.... *“La paciencia todo lo alcanza. Quien a Dios tiene, nada le falta. Sólo Dios basta”... (Santa Teresa de Jesús).*

... *“Lo importante no es llegar, lo importante es el camino”... (Fito Páez).*

Resumen

En el presente trabajo de tesis se estudió la obtención de concentrados y aislados proteicos de girasol a partir del *pellet* residual de la industria aceitera local, y se caracterizó la funcionalidad de estos productos en relación a sus potenciales aplicaciones en la industria alimentaria y de *packaging*.

En particular se desarrollaron métodos para la obtención de productos proteicos de girasol con distinto contenido de compuestos fenólicos con el fin de analizar la necesidad de extraer este tipo de compuestos de la formulación. Las metodologías que resultaron más promisorias se escalaron satisfactoriamente a nivel de planta piloto. Los procesos ensayados permitieron obtener productos proteicos con diferente composición, características y propiedades fisicoquímicas. Los compuestos fenólicos no pudieron extraerse totalmente, debido a que existe una proporción de los mismos que se encuentra interaccionando fuertemente con las proteínas. Independientemente de la concentración de estos compuestos, todos los productos presentaron solubilidades en agua superiores al 60%. Se observó, que la coloración de los productos no dependía de la concentración de fenoles, sino de la etapa en donde éstos eran removidos, pero sí que al aumentar su contenido aumentaba significativamente el poder antioxidante de los productos. En cuanto al escalado en la producción, si bien no se observaron diferencias significativas en los rendimientos ni en la solubilidad, sí se manifestaron en la composición y en el estado de agregación polipeptídica, en parte atribuible al cambio de la metodología de secado (lío-filización por spray).

Se analizó si las características diferenciales observadas en las propiedades estructurales repercutían en el comportamiento funcional de los productos proteicos estudiados. Se encontró que los aislados de girasol presentaron baja capacidad de imbibición de agua y moderada capacidad de retención de agua. Los cambios conformacionales que sufrieron las proteínas al realizar los lavados para eliminar compuestos fenólicos, evidenciados en mayores H_0 , favorecieron las interacciones proteína-agua. Los productos proteicos obtenidos en planta piloto fueron capaces de formar espumas y emulsiones a distintos pHs y fuerzas iónicas. Dichos factores

afectaron mayoritariamente la estabilidad de estos sistemas, debido a que las proteínas presentaron diferentes estados de agregación. Los aislados producidos en planta piloto formaron geles autosoportables por inducción térmica, con distintas características y propiedades. La presencia de compuestos fenólicos afectó el aspecto visual de los geles obtenidos y disminuyó su dureza.

Los productos proteicos, especialmente los aislados, mostraron capacidad de formar películas flexibles biodegradables y/o comestibles por *casting*, aplicables en *packaging*. Los materiales desarrollados presentaron propiedades similares a las de otras películas proteicas, con el adicional que la presencia de compuestos fenólicos, además de producir diferencias en la coloración, activó naturalmente a las películas otorgándoles características antioxidantes. Estos compuestos no interfirieron en la formación de la matriz proteica que constituye la película, estabilizada principalmente por puentes de hidrógeno y disulfuro, lo que también se evidenció en la ausencia de diferencias en las propiedades barrera y mecánicas entre los materiales obtenidos a partir de los distintos aislados. A través de cambios sencillos en la formulación (tipo y concentración de plastificante, pH de la dispersión, agregado de una capa de cera de abejas, o de celulosa microcristalina), se modificó el comportamiento funcional de las películas proteicas de girasol, logrando materiales útiles para distintas aplicaciones.

Además se estudió la obtención de materiales rígidos compuestos por almidón de mandioca, aislado proteico de girasol y fibras de celulosa, por *foam baking*, aplicables como posibles sustitutos de las bandejas formadas por poliestireno. Se observó que el agregado de proteínas de girasol a las bandejas de almidón y fibras de celulosa produjo una importante reducción en el contenido de agua post-prensado y la capacidad de absorción de agua, sin afectar significativamente sus propiedades mecánicas.

Indice

Resumen

Indice

Introducción General

1.- Historia del cultivo de girasol	1
2.- Importancia económica del girasol en Argentina	2
3.- Composición química de las semillas de girasol y sus harinas proteicas	4
3.1.- Proteínas de girasol	7
3.2.- Compuestos fenólicos presentes en las semillas de girasol	8
3.3.- Calidad nutricional del pellet proteico de girasol	11
4.- Obtención de productos proteicos de girasol	12
5.- Propiedades funcionales de las proteínas	16
5.1.- Relación estructura-funcionalidad	18
5.2.- Propiedades funcionales de las proteínas de girasol	19
6.- Ejes de trabajo	26

OBJETIVOS	28
------------------	-----------

Capítulo I: "OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS PROTEICOS DE GIRASOL"

I.1.- Introducción	29
I.2.- Materiales y Métodos	31
I.2.1.- Materiales	31
I.2.2.- Obtención de productos proteicos de girasol en escala laboratorio	31
I.2.3.- Determinación de la composición química	33
I.2.4.- Determinación de componentes antinutricionales	34
I.2.5.- Solubilidad de proteínas y fenoles en función del pH	35
I.2.6.- Hidrofobicidad superficial	36
I.2.7.- Calorimetría diferencial de barrido	38
I.2.8.- Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida	38
I.2.9.- Determinación de Color	39
I.2.10.- Análisis estadístico	40
I.3.- Resultados y Discusión	41
I.3.1.- Caracterización del pellet molido de girasol	41
I.3.1.1.- Componentes antinutricionales	42
I.3.1.2.- Proteínas de girasol	43
I.3.2.- Selección de las condiciones de procesamiento para la obtención de productos proteicos de girasol	45
I.3.2.1.- Solubilidad de proteínas y fenoles presentes en el pellet	45

molido de girasol en función del pH	
I.3.2.2.- Condiciones operativas para la obtención de productos proteicos de girasol	46
I.3.3.- Caracterización de los concentrados y aislados proteicos obtenidos	49
I.3.4.- Propiedades Físicoquímicas de Concentrados Proteicos de Girasol	56
I.3.5.- Propiedades Físicoquímicas de Aislados Proteicos de Girasol	60
I.4.- Conclusiones	64

Capítulo II: “PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS PROTEICOS DE GIRASOL EN PLANTA PILOTO”

II.1.- Introducción	66
II.2.- Materiales y Métodos	68
II.2.1.- Materiales	68
II.2.2.- Procesos de obtención de productos proteicos de girasol en planta piloto	68
II.2.3.- Caracterización de concentrados y aislados proteicos de girasol	70
II.2.4.- Microscopía electrónica de barrido (SEM)	70
II.2.5.- Almacenamiento de los aislados proteicos obtenidos	70
II.2.6.- Análisis estadístico	70
II.3.- Resultados y Discusión	71
II.3.1.- Escalado de las metodologías para la obtención de productos proteicos de girasol	71
II.3.2.- Caracterización de Concentrados y Aislados Proteicos de Girasol	73
II.3.3.- Propiedades físicoquímicas de concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto.	76
II.3.4.- Comparación Laboratorio vs. Planta Piloto	80
II.3.5.- Almacenamiento de aislados proteicos de girasol	81
II.4.- Conclusiones	84

Capítulo III: “PROPIEDADES FUNCIONALES y ANTIOXIDANTES DE PRODUCTOS PROTEICOS DE GIRASOL”

III.1.- Introducción	86
III.2.- Materiales y Métodos	89
III.2.1.- Materiales	89
III.2.2.- Propiedades funcionales dependientes de la interacción proteína-agua.	89
III.2.3.- Propiedades de Superficie: Emulsiones y Espumas	92

III.2.4.- Propiedades funcionales dependientes de la interacción proteína-proteína.	96
III.2.5.- Capacidad Antioxidante	96
III.2.6.- Análisis estadístico	98
III.3.- Resultados y Discusión	99
III.3.1.- Propiedades funcionales dependientes de la interacción proteína-agua.	99
III.3.2.- Propiedades de Superficie	104
III.3.3.- Propiedades dependientes de la interacción proteína-proteína.	115
III.3.4.- Capacidad antioxidante	118
III.4.- Conclusiones	121

Capítulo IV: “PELÍCULAS FLEXIBLES, BIODEGRADABLES Y COMESTIBLES OBTENIDAS A PARTIR DE AISLADOS PROTEICOS DE GIRASOL”

IV.1.- Introducción	123
IV.2.- Materiales y Métodos	126
IV.2.1.- Materiales	126
IV.2.2.- Formación de las películas	126
IV.2.3.- Caracterización de las películas proteicas	127
IV.2.4.- Análisis estadístico	133
IV.3.- Resultados y Discusión	134
IV.3.1.- Caracterización de películas biodegradables formadas a partir de aislados proteicos de girasol	134
IV.3.2.- Optimización de la funcionalidad de las películas de Ai-P a través de variaciones simples en la formulación utilizada.	147
IV.4.- Conclusiones	156

Capítulo V: “MATERIALES COMPUESTOS, RÍGIDOS Y BIODEGRADABLES OBTENIDOS A PARTIR DE AISLADOS PROTEICOS DE GIRASOL, ALMIDÓN DE MANDIOCA Y FIBRAS DE CELULOSA”

V.1.- Introducción	157
V.2.- Materiales y Métodos	160
V.2.1.- Materiales empleados en la obtención de bandejas	160
V.2.2.- Diseño experimental	160
V.2.3.- Obtención de bandejas por foam baking	160
V.2.4. Caracterización de las bandejas obtenidas	161
V.2.5.- Análisis estadístico	164

V.3.- Resultados y Discusión	165
V.3.1.- Formulaciones empleadas y variables del proceso de foam baking	165
V.3.2.- Estudio de las propiedades físicas y mecánicas de las bandejas biodegradables	166
V.3.3.- Morfología de las bandejas biodegradables obtenidas	174
V.3.4.- Efecto del contenido de fenoles sobre las propiedades de las bandejas biodegradables	176
 V.4.- Conclusiones	 177
 CONCLUSIONES GENERALES	 178
 Referencias bibliográficas	 182
 Anexo I: Cuantificación de compuestos fenólicos en productos proteicos de girasol	 199
 Anexo II: Balances de materia del proceso de obtención de concentrados y aislados proteicos de girasol en planta piloto	 208
 Anexo III: Materiales compuestos, rígidos y biodegradables obtenidos a partir de almidón de mandioca, fibras de celulosa y aislados proteicos de girasol con menor contenido de fenoles	 213

Introducción General

1.- Historia del cultivo de girasol

El girasol, pertenece a la familia *Asteraceae* (*Compositae*), género *Helianthus* (del griego “*helios*” (“sol”) y “*anthos*” (“flor”)) (Burger y col., 2008). Su nombre se debe a la capacidad que posee la planta de orientarse a lo largo del día siguiendo la dirección del sol.

El inicio de la domesticación de este cultivo data de 2800 años antes de Cristo. Sin embargo, aún existe controversia en torno a su origen geográfico. Algunos autores afirman que el proceso de domesticación del girasol se inició en la zona este de Estados Unidos (Arkansas, Missouri, Illinois y Tennessee), respaldando esta aseveración con restos arqueológicos hallados en el sitio de Hayes (Tennessee) (Harter y col., 2004; Burke y col., 2006; Heiser y col., 2007). Por otra parte, Lentz y col. (2008) encontraron recientemente restos arqueológicos de semillas de girasol en los sitios mexicanos de San Andrés (Tabasco) y Cueva del Gallo (Morelos). Ellos también demostraron que las culturas pre-colombinas denominaban a este cultivo con vocablos propios (“*chimalacatl*” y “*dä nukhä*”, entre otros), y que empleaban las plantas de girasol con fines ornamentales y religiosos (en templos y cementerios), mientras que sus semillas les servían como alimento (semillas frescas o tostadas, “*atole*”: bebida obtenida con semillas molidas de girasol y agua o leche) y medicina (contra dolores estomacales o reumáticos). Estos autores, apoyándose en las evidencias arqueológicas, lingüísticas y etnográficas presentadas, postularon la existencia de dos orígenes de domesticación independientes, Estados Unidos y México.

Durante la conquista de América, el girasol fue llevado a Europa, en donde también lo emplearon con fines ornamentales, medicinales y alimenticios. La primera patente sobre extracción de aceite a partir de semillas de girasol es otorgada en 1716, a Arthu Bunyan, para usos industriales en pinturas y barnices. En Francia, en 1787, aparecen cultivos de girasol como planta oleaginosa, y se comienza a tratar de mejorar esta característica. En el siglo XVIII, fue introducido en Rusia, en donde el cultivo se expande, empleándose para el consumo de la semilla y la producción de aceite. En este país, en 1820, se extrae por primera vez aceite de girasol para uso alimenticio, y en 1833 se instala la primera fábrica de aceite (Melgarejo, 2003). Actualmente, el girasol domesticado es una de las fuentes más importantes en la producción de aceite vegetal comestible (Wills y col., 2006).

2.- Importancia económica del girasol en Argentina

El girasol es introducido en Argentina a mediados del siglo XIX por inmigrantes rusos, siendo empleado principalmente como alimento para aves de corral. A partir de 1920, se empieza a extraer su aceite y se exporta en pequeñas cantidades. En la década del '30 el cultivo se afianza y comienza a crecer la industria oleaginosa como consecuencia de la guerra civil española (1936-1939) y la segunda guerra mundial (1939-1945) que provocan el desabastecimiento de aceite de oliva en los países exportadores (España, Italia y Grecia), y debido también al crecimiento del consumo interno (Melgarejo, 2003). Esta tendencia en crecimiento no fue constante a lo largo de los años, y las oscilaciones en los volúmenes producidos se debieron principalmente a las variaciones del precio de su aceite. A partir de 1972 aparecen girasoles híbridos que resultan fundamentales para la expansión del cultivo y la obtención de mayores rendimientos en cantidad de semillas y de aceite.

El aceite de girasol es el producto principal de la industrialización de estas semillas, sin embargo, luego de su obtención se origina como subproducto una harina proteica. Esta harina se *pelletiza* para facilitar su transporte (*pellet* de girasol) y, en la actualidad se emplea principalmente para alimentación animal (Azcona y col., 2003). En la **Figura 1.** se muestran los volúmenes de producción, exportación y consumo en el mercado interno de estos dos productos correspondientes a las últimas décadas. Al analizar los datos de producción del aceite y del *pellet* de girasol se pueden observar dos etapas, una inicial con tendencia en crecimiento (hasta la campaña 1999/00), seguida por una caída en los volúmenes de producción y posteriormente un leve crecimiento (desde 2000/01 hasta la actualidad). También se puede apreciar que, en promedio, el 75% del aceite producido se destina a exportación, fijando el consumo interno en el 25% restante. Por su parte, el consumo interno de *pellet* de girasol también presenta dos etapas, una inicial en donde sólo se destinaba a tal fin, en promedio, el 10% de lo producido; y otra, a partir de 2000/01, en donde el consumo interno se va incrementando paulatinamente hasta llegar a 20-25%. Inicialmente, el *pellet* de girasol se empleaba como suplemento proteico para dietas de rumiantes (con forrajes frescos y silaje de maíz) en sistemas de producción de leche, mientras que en la producción de carne predominaban los sistemas extensivos. Sin embargo, esta situación se revirtió en 2001, debido a que los cambios estructurales y económicos ocurridos en el país

impactaron fuertemente en los sistemas de producción pecuaria, surgiendo la necesidad de intensificar la producción como vía para mejorar la rentabilidad del sector, situación que se mantiene actualmente (García y col., 2003).

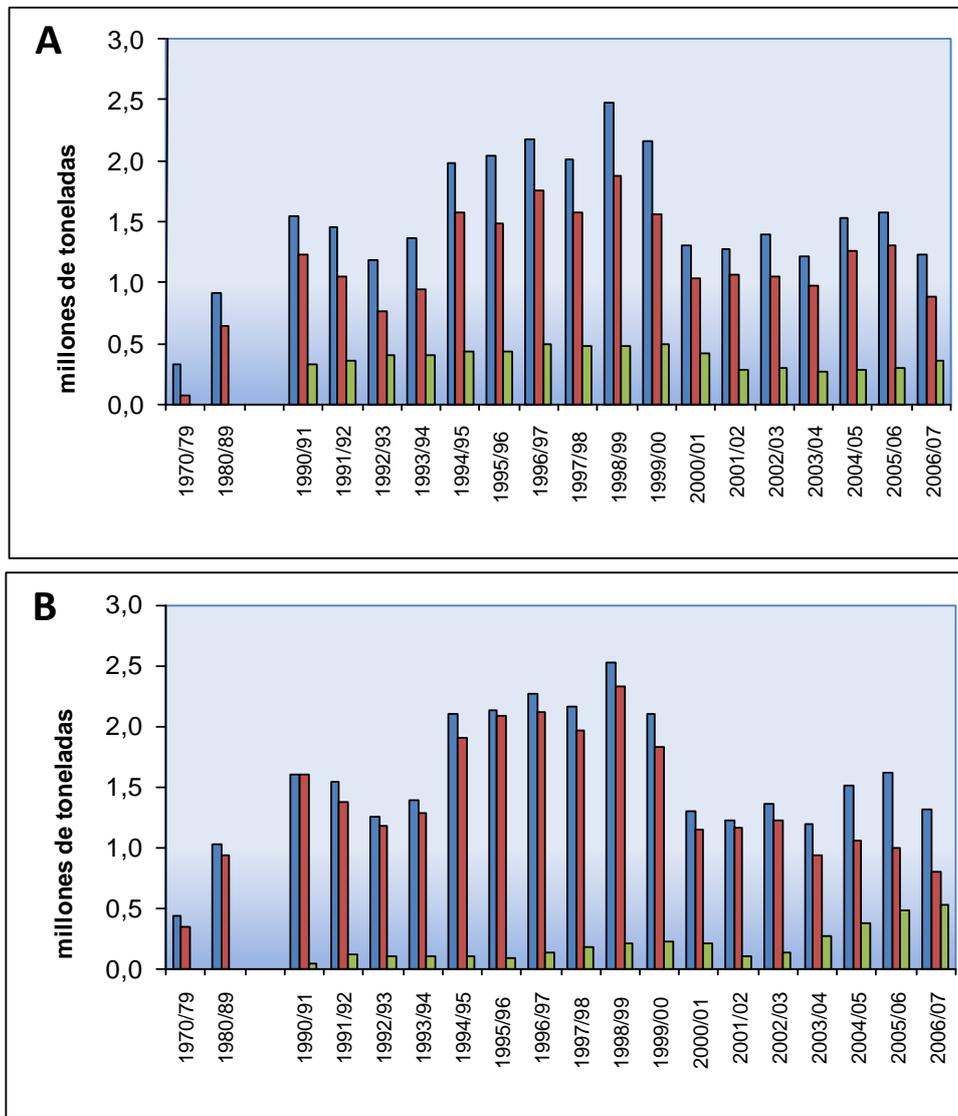


Figura 1.: Producción nacional (■), exportación (■) y consumo interno (■) de **A)** aceite de girasol y **B)** *pellet* de girasol.

Fuente: Cámara de la Industria Aceitera de la República Argentina (CIARA).

Durante la campaña 2007/2008, Argentina se posicionó como el segundo productor mundial de semillas y de aceite de girasol, siendo el primer exportador mundial de aceite y harinas proteicas *pelletizadas*. En esta campaña se procesaron 3,0 millones de toneladas de semillas de girasol, lo que permitió obtener 1,2 millones de toneladas de

aceite de girasol y 1,3 millones de toneladas de *pellet*. El aceite de girasol exportado representó el 4% de la balanza comercial del sector agroalimentario (**Figura 2.**). A diferencia de lo que sucede con la soja, en que tanto su aceite como otros subproductos tienen un peso importante, los subproductos de girasol se encuentran sub-aprovechados. En la actualidad, el *pellet* de girasol se comercializa a 103 U\$D por tonelada y se emplea casi exclusivamente para alimentación animal (<http://www.alimentosargentinos.gov.ar>). Por lo tanto, resulta interesante la posibilidad de conferirle mayor valor agregado a este subproducto industrial.

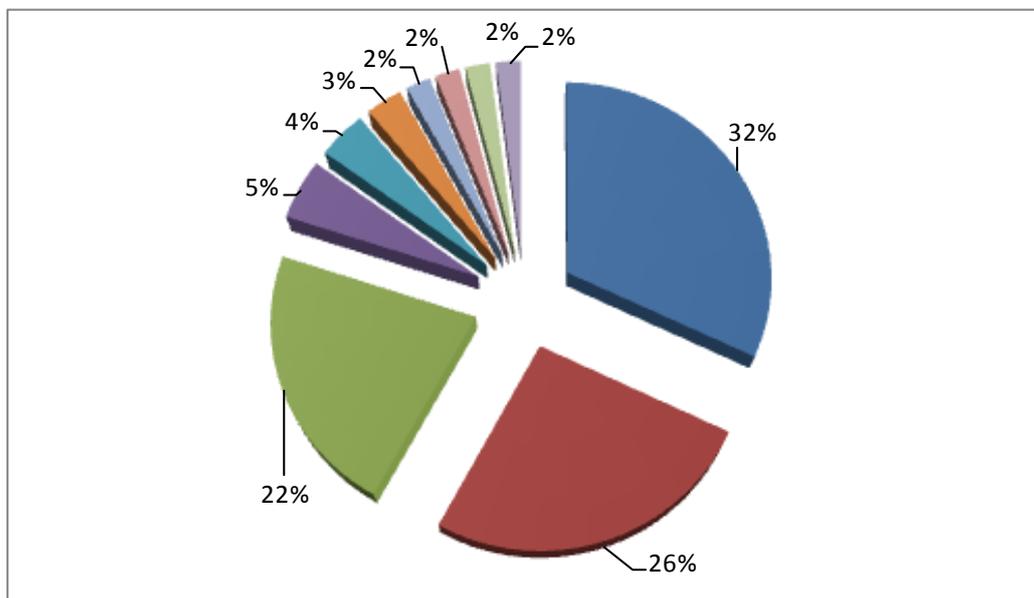


Figura 2.: Exportaciones de productos del sector agroalimentario durante el año 2007. Residuos del aceite de soja (■), Aceite de soja (■), Carne bovina fresca y refrigerada (■), Aceite de girasol (■), Vinos de uvas (■), Carne bovina congelada (■), Leche y crema (■), Crustáceos (■), Frutos y jugos de frutas (■), Otros (■).

Fuente: Dirección Nacional de Alimentos (SAGPyA), Argentina.

3.- Composición química de las semillas de girasol y sus harinas proteicas

La semilla de girasol, está formada por un embrión (o semilla propiamente dicho) cubierto por su tegumento seminal y por el pericarpio (o cáscara) (**Figura 3**). El embrión representa el 75-80% del peso seco de la semilla, y en él se encuentran dos cotiledones en donde se almacenan las reservas de lípidos y proteína (que son utilizadas durante la germinación de la semilla). Mientras que el pericarpio representa

el 20-25% del peso seco de la semilla, y es principalmente de naturaleza lignocelulósica (González-Pérez y col., 2003).

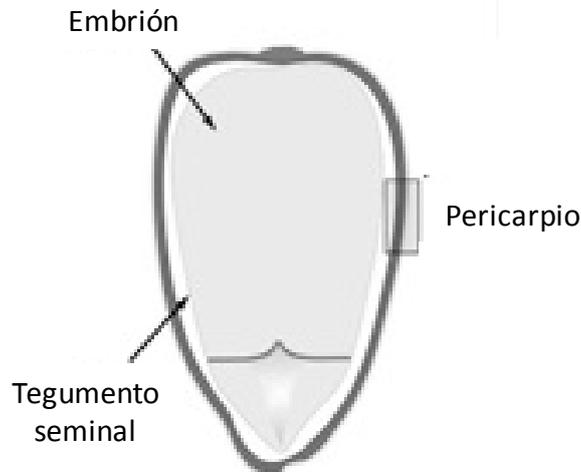


Figura 3.: Esquema de un corte transversal de una semilla de girasol en donde es posible identificar sus constituyentes.

La composición de las semillas varía de acuerdo a la variedad de girasol analizada (Earle y col., 1968). En la **Tabla 1.** se muestra la composición química porcentual promedio de semillas de girasol, completas y descascaradas, y del *pellet* resultante de la extracción de aceite. Allí se puede apreciar que, como era de esperar, tanto las semillas enteras de girasol como las descascaradas, son ricas en componentes lipídicos (mayoritariamente triglicéridos neutros, fosfolípidos, glicolípidos y ceras). Estas también poseen importantes contenidos de proteínas e hidratos de carbono (González-Pérez y col., 2008; Azcona y col. 2003; <http://www.asagir.org.ar>; <http://www.sunflowerlsa.com>). La cáscara aporta principalmente fibras y compuestos fenólicos (Pomenta y col., 1971). En la **Figura 4.** se muestra un esquema simplificado del proceso industrial de extracción de aceite de semillas de girasol. Se puede observar allí que, el descascarado mecánico de las semillas es parcial, justificando así la presencia de alto niveles de fibras y de componentes fenólicos en el subproducto resultante. Este *pellet* residual posee además elevados porcentajes de proteínas e hidratos de carbono (**Tabla 1.**). En él, las proteínas son los componentes que poseen mayor valor agregado, siendo interesante su recuperación y su posterior empleo en diversas aplicaciones. Sin embargo, las propiedades que presentan estas macromoléculas, por ejemplo su solubilidad, podrían verse afectadas por las

condiciones del proceso (temperatura, presión, solventes orgánicos, etc.; **Figura 4.**) y por la presencia de compuestos fenólicos (González-Pérez y col., 2005; Moure y col., 2006). Por lo tanto, resulta necesario conocer previamente algunas características de las proteínas de girasol y de los compuestos fenólicos presentes.

Tabla 1.: Composición química porcentual promedio de semillas completas de girasol, de semillas descascaradas y del *pellet* resultante de la extracción de aceite.

Componente	Semilla Completa	Semilla Descascarada	<i>Pellet</i>
Lípidos	34 – 55	47 – 65	0,8 – 1,9
Proteínas	10 – 27	20 – 40	25 – 35
Hidratos de Carbono	18 – 26	4 – 10	8 – 12
Fibra	22 – 24	8 – 12	15 – 29
Fenoles	1 – 4,5	0,3 – 3	1,5 – 5,8
Minerales	2 – 4	3 – 4	5 – 7

Fuentes: González-Pérez y col., 2008; Azcona y col., 2003; <http://www.asagir.org.ar> y <http://www.sunflowerusa.com>

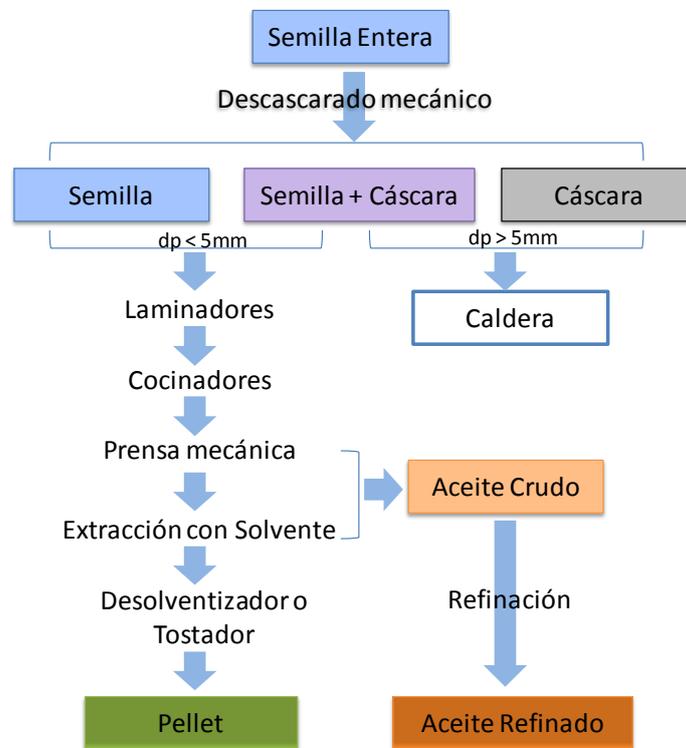


Figura 4.: Esquema simplificado de la industrialización de las semillas de girasol.

Fuente: Aceitera Santa Clara, Molinos Río de La Plata S.A.

3.1.- Proteínas de girasol

Las proteínas de reserva de semillas normalmente se clasifican en base a su solubilidad, según lo propuso Osborne (1924), en: albúminas (solubles en agua), globulinas (insolubles en agua, pero solubles en soluciones salinas diluídas), prolaminas (solubles en alcoholes) y glutelinas (solubles en soluciones alcalinas). Siguiendo esta clasificación, las proteínas mayoritarias en las semillas de girasol son globulinas y albúminas, representando el 40-90% y 10-30% del total de las proteínas, respectivamente (Gheyasuddin y col., 1970; Schwenke y col., 1973; Prasad, 1987; Raymond y col., 1995). Algunos autores también han descrito la presencia de pequeñas cantidades de glutelinas y prolaminas (Sabir y col., 1973; Sripad y Rao, 1987; González-Pérez y col., 2008).

Desde un punto de vista estructural, las globulinas y glutelinas pertenecen a la misma familia de proteínas que es conocida como cupinas (del latín “*cupas*”, que significa “barril pequeño”) por estar formada por barriles de hojas beta conectados por lazos muy cortos, lo que determina que tengan una estructura muy compacta (Dunwell, 1998). En la **Figura 5.A.** se presenta un diagrama de cintas mostrando la estructura típica de estos dominios. En particular pueden apreciarse dos dominios cupinas indicados como α y β , que se encuentran codificados por un único gen, que es transcrito y traducido en una proglobulina en el retículo endoplásmico (RE) rugoso de la semilla en desarrollo. Esta proglobulina durante su transporte hacia la vacuola de reserva de la semilla sufre un clivaje proteolítico específico generando la proteína madura o globulina, que queda integrada por dos polipéptidos llamados α y β que permanecen unidos por una unión disulfuro (Jung y col. 1998). Este procesamiento proteolítico va acompañado por un cambio de la estructura trimérica, que es la forma en que la proteína sale del RE (**Figura 5.B.**) a la hexamérica (**Figura 5.C.**), que es la forma en que se encuentra en la semilla madura (Adachi y col., 2003). Estas formas hexaméricas (de 300-350 kDa) poseen una constante de sedimentación de 11S y este es el nombre que se da habitualmente a las globulinas que sufren este tipo de procesamiento; existiendo en algunas otras semillas (por ejemplo en porotos, arvejas, etc.) globulinas 7S que no sufren este procesamiento y que mantienen formas triméricas (Muntz, 1998).

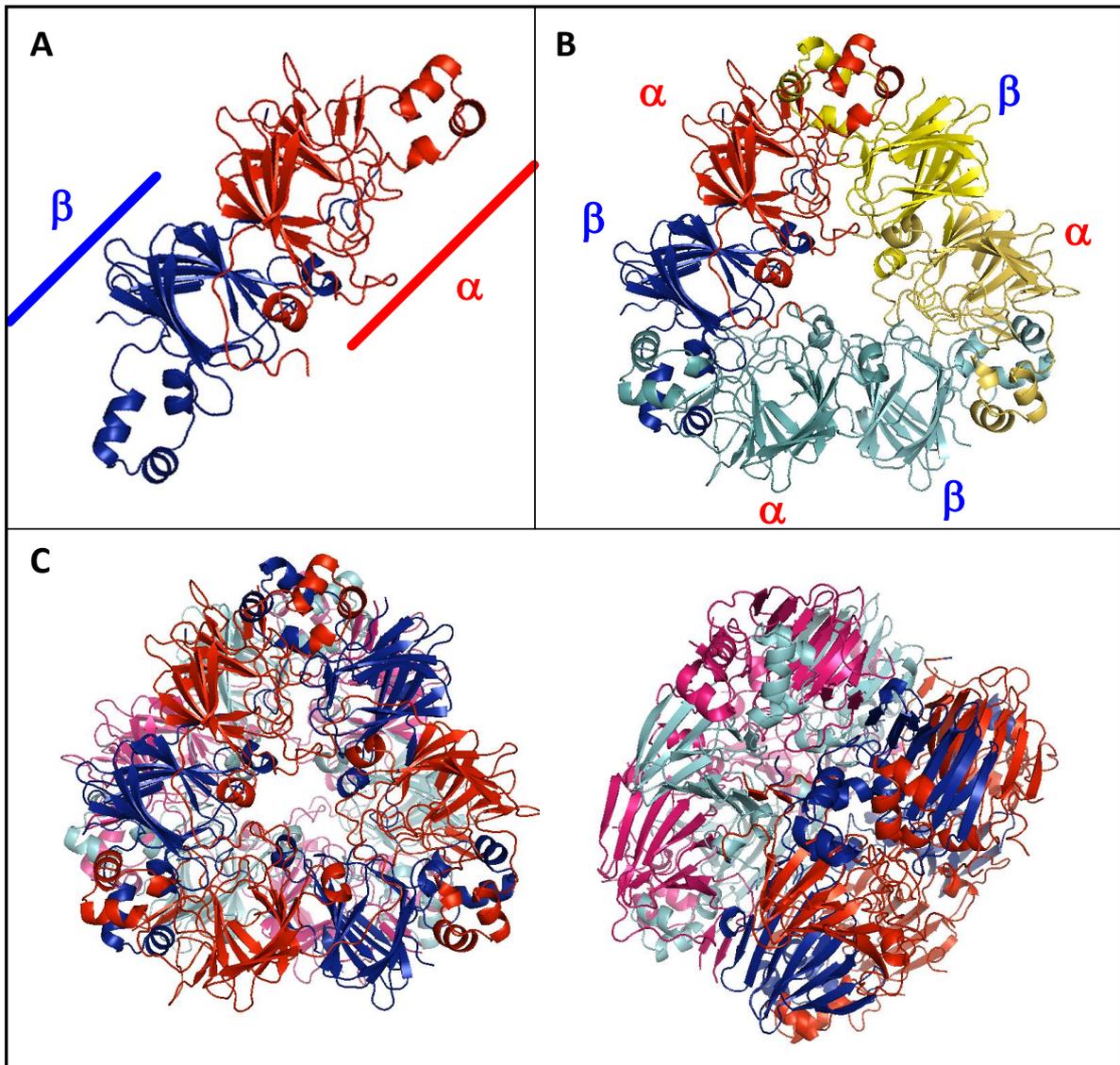


Figura 5.: Diagrama de cintas correspondiente a la estructura de una globulina de tipo 11S procesada. **A)** Estructura de una subunidad constituida por los polipéptidos α y β que se encuentran covalente unidos por una unión disulfuro. **B)** Estructura del trímero en los que se observa una interacción cola-cabeza (α - β) entre las distintas subunidades monoméricas. **C)** Estructura del hexámero de frente y perfil. El diagrama fue generado con PyMol utilizando la estructura de la glicinina A3B4 1OD5.pdb como base.

Una de las características de las proteínas de reserva de semillas es su polimorfismo. En el caso de los genes codificando para globulinas 11S de soja se han descrito 5 genes que dan origen a subunidades $\alpha\beta$ de distintos tamaños (Beilinson y col., 2002).

En el caso de girasol, el grado de polimorfismo ha sido poco estudiado pero se sabe que al menos existirían dos familias génicas (Vonder Haar y col., 1988), habiéndose descrito tres familias en algunos genotipos (Duca y col., 2008). Este grado de polimorfismo se manifiesta al analizar las proteínas extraídas de las semillas por electroforesis desnaturizantes en presencia de SDS y de un agente reductor, observándose los polipéptidos α en tamaños comprendidos entre 30-40 kDa y los polipéptidos β entre 21-27 kDa (Dalgalarrodo y col., 1984; Molina y col., 2004; González-Pérez y col., 2005).

Por otra parte, las albúminas son la segunda fracción proteica mayoritaria presente en las semillas de girasol. Estas se caracterizan por ser un grupo heterogéneo de proteínas de coeficiente de sedimentación 2S, formado por subunidades simples cuyos tamaños moleculares oscilan entre 10 y 19 kDa y que son ricas en metionina y cisteína (Guéguen y col., 1996, Anisimova y col., 2003). Una característica distintiva respecto a albúminas de otras semillas, es que éstas son cadenas polipeptídicas simples, sin uniones disulfuro. (Burnett y col., 2002; Pantoja-Uceda y col., 2004).

3.2.- Compuestos fenólicos presentes en las semillas de girasol

Una particularidad de estas semillas es que presentan elevados contenidos de fenoles (entre 15 y 52 mg de ácido clorogénico/g de harina desgrasada de girasol, en base seca) (Sripad y col., 1987; Prasad, 1990). Estos compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, por ejemplo en café, yerba mate, te, papas, cerezas, peras, manzanas, pomelos, etc. (Clifford y col., 1985; Marques y col., 2009). Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas. También actúan como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa, confiriéndole al cultivo ciertos beneficios agronómicos (Martínez-Valverde y col., 2000).

En el caso particular del girasol, el ácido clorogénico (CGA: ácido 5-cafeil-quínico) es el más abundante, representando entre el 50% y el 70% de los fenoles totales (Lawhon y

col., 1982; Sastry y col., 1984). También se reportaron importantes cantidades de sus productos de hidrólisis: ácido cafeico (CA) y ácido quínico (QA) (Leung y col., 1981), así como también cantidades minoritarias de los ácidos p-cumárico, isoferúlico, ferúlico, sinápico y trans-cinámico (Sabir y col., 1974). Las estructuras químicas de CGA, CA y QA, los componentes mayoritarios, se muestran en la **Figura 6**.

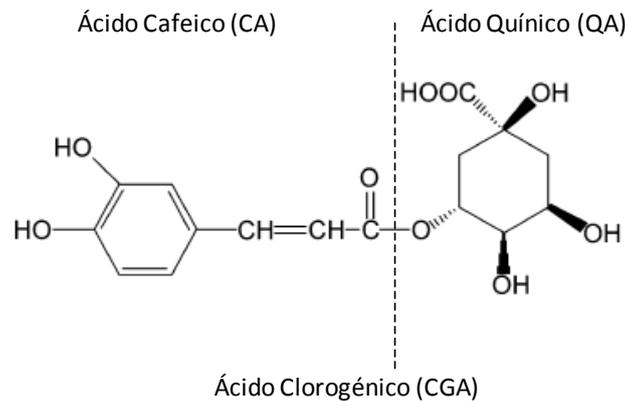


Figura 6.: Estructura química de los ácidos clorogénico (CGA), cafeico (CA) y quínico (QA).

Una característica importante de estos compuestos es su capacidad de interactuar con las proteínas. Durante más de tres décadas, varios autores han estudiado esta propiedad encontrando resultados contradictorios. La mayoría informa que el CGA interactúa preferencialmente con las proteínas de bajo peso molecular (Sabir y col., 1973; Kabirullah y col., 1983; Prasad, 1990; Venktesh y col., 1993); pero también es posible que interactúe con las de alto peso molecular (Sastry y col., 1990); o de manera indistinta (Rahma y col., 1981). Dichas interacciones entre compuestos fenólicos y proteínas pueden ser por medio de puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilos y el enlace peptídico (Loomis y col., 1966); o mediante interacciones iónicas y/o hidrofóbicas (Pierpoint, 1969). Además, es posible que se lleven a cabo uniones irreversibles, cuando en medio alcalino o en presencia de la enzima polifenoloxidasas, los compuestos fenólicos (o-dihidroxifenoles) son oxidados a o-quinonas, las que pueden polimerizar, reducirse o unirse covalentemente a grupos funcionales de las proteínas (aminas, tioles, índoles, imidazoles, y disulfuros) (Venktesh y col., 1993;

Rawel y col., 2001). Estas interacciones pueden afectar de diversas maneras a las proteínas de girasol. Por ejemplo, disminuyendo su digestibilidad (Kroll y col., 2001), su disponibilidad de lisina, metionina, cisteína y/o triptófano (Sosulski, 1978; Rawel y col., 2001) y su solubilidad (Pringent y col., 2002). También es posible que modifiquen la vida útil de los productos y alteren sus propiedades organolépticas (Cater y col., 1970; Sastry y col., 1990).

Por otra parte, en los últimos años ha crecido el interés en estos compuestos debido a que varias investigaciones han probado que presentan capacidad antioxidante (Rice-Evans y col., 1995; Brand-Williams y col., 1995; Velioglu y col., 1998; Gülçin, 2005; Turkmen y col., 2006; Bastos y col., 2007). Diferentes estudios han mostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; y tienen que ver en la iniciación de algunas enfermedades degenerativas (García-Alonso y col., 2004). Estos compuestos fenólicos tienen la capacidad de capturar radicales libres, por lo que podrían presentar beneficios en la prevención de ciertas enfermedades, por ejemplo cáncer, enfermedades cardiovasculares y patologías de carácter inflamatorio, así como también retardar procesos de envejecimiento (Oomah y col., 1999; Olthof y col., 2000; Raskin y col., 2002; Gotteland y col., 2007; Marques y col., 2009).

3.3.- Calidad nutricional del *pellet* proteico de girasol

Como se mencionó anteriormente, este subproducto es ampliamente utilizado como alimento para aves de corral, ovejas y ganado vacuno (<http://www.asagir.com.ar>), debido principalmente a sus elevados contenidos de proteínas y fibras. Sin embargo, es posible pensar en extraer estas proteínas y emplearlas en la industria alimentaria humana, ya que poseen buena calidad nutricional. Su composición aminoacídica cumple con los requerimientos proteicos para humanos que detalla la FAO (Food and Agriculture Organization, 1985), excepto para lisina, que es su aminoácido limitante (Miller y col., 1985), por lo que es recomendable su complementación con proteínas de leguminosas, cárnicas o lácteas (Sosulski, 1979). Además, las proteínas de girasol presentan moderado valor biológico (60%) e índice químico (0,74) y alta digestibilidad

(88%) (Rahma y col., 1979; Kabirullah y col., 1983; Azcona y col., 2003). No obstante, estas características pueden verse disminuidas por la presencia de compuestos fenólicos interaccionando con las proteínas (Kroll y col., 2001; Rawell y col., 2001).

Por otra parte, estas proteínas presentarían como ventaja la ausencia de factores antinutricionales, por ejemplo inhibidores de proteasas (factor antitriptico), hemaglutininas y otros componentes biológicamente activos (Prasad y col., 1990). Sin embargo, este tema aún se encuentra en discusión, ya que Mendieta y col. (2004) informaron la presencia de factor antitriptico en variedades de girasol resistente a esclerotinia.

Es importante entonces, conocer cuál es el efecto de los componentes fenólicos sobre las propiedades de las proteínas de girasol y determinar la presencia (o ausencia) de factores antinutricionales en harinas provenientes de variedades de uso local y sus condiciones de inactivación.

4.- Obtención de productos proteicos de girasol

La obtención de productos enriquecidos en proteínas, concentrados o aislados, a partir de harina desgrasada tiene como objetivo principal la eliminación lo más completa y selectiva posible de los compuestos no proteicos presentes en ella (Vioque y col., 2001). Generalmente, estos procesos se basan en las diferencias en solubilidad que presentan las proteínas en función del pH del medio. Un perfil típico de solubilidad proteica en agua en función del pH se muestra en la **Figura 7**. Allí se puede observar que solubilidad es máxima a pHs muy ácidos (pH=2-3) o muy alcalinos (pH=9-11). En dichas zonas, las proteínas poseen carga neta positiva o negativa, respectivamente; y las fuerzas repulsivas son la causa del incremento en su solubilidad. También es posible observar un mínimo de solubilidad en las cercanías del pH isoelectrico (pI) (pH=4-5), en donde la carga neta de la proteína es cero, por lo que disminuye la repulsión electrostática lo que promueve la agregación.

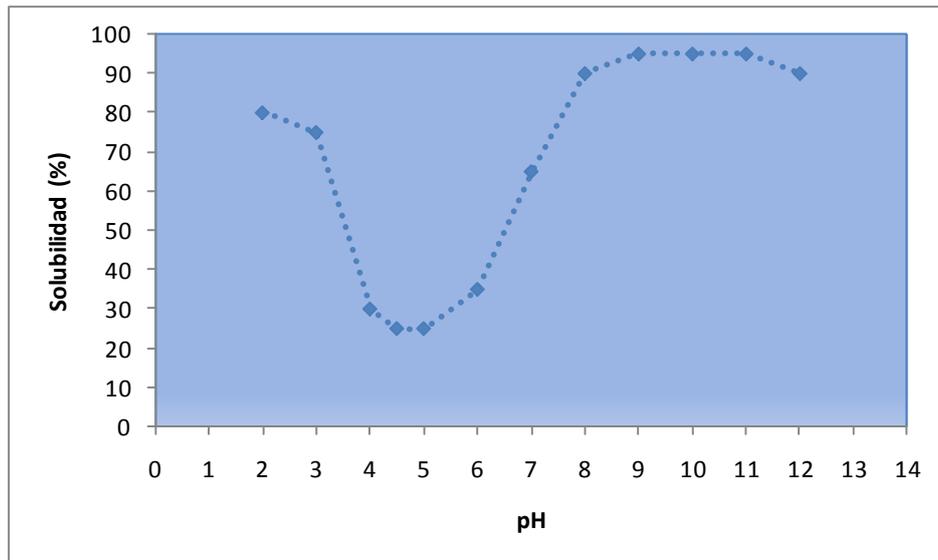


Figura 7.: Perfil típico de solubilidad proteica en agua en función del pH del medio.

Por consiguiente, un proceso de concentración clásico consiste en poner en contacto harina desgrasada con agua y extraer las proteínas en medio alcalino, recuperar el sobrenadante por centrifugación y secarlo; obteniéndose así un producto enriquecido en proteínas, denominado concentrado proteico. Aún así, este producto posee otros componentes no deseados en el producto final (fibra, azúcares reductores, lípidos, fenoles, sales, componentes antinutricionales, etc.). Algunos de estos componentes pueden eliminarse en un paso posterior empleando diversas tecnologías, entre ellas precipitación isoelectrica o ultrafiltración. Así es posible obtener aislados proteicos, por:

- Precipitación isoelectrica de las proteínas y posterior separación por centrifugación: El aislado así obtenido se presenta en forma de crema insoluble concentrada. Tras lavarlo con agua a pH ácido, y después de una nueva centrifugación, el aislado se neutraliza y se seca. En esta etapa se pierden proteínas solubles en el pl y factores antinutricionales.
- Concentración proteica por ultrafiltración: Las moléculas solubles de bajo peso molecular (incluidas algunas proteínas) atraviesan la membrana y constituyen

el permeado, mientras que las proteínas de alto peso molecular son retenidas y posteriormente secadas.

Algunos autores, entre ellos Vioque y col. (2001) clasifican a los productos proteicos en concentrados y aislados, según la metodología empleada en su obtención. Sin embargo, para comercializar estos productos el Código Alimentario Argentino (CAA) exige como mínimo 70% y 90 % de proteínas (N x 6,25) en base seca para concentrados y aislados proteicos respectivamente. Estas dos clasificaciones no siempre se condicen, siendo posible tener concentrados y aislados proteicos con menor contenido de proteínas que lo estipulado por el CAA. En este trabajo de tesis se decidió denominar a los productos proteicos de acuerdo a la metodología empleada para su obtención.

En el caso particular del *pellet* de girasol, la presencia de compuestos fenólicos capaces de interactuar con las proteínas y la pérdida de la solubilidad de estas por desnaturalización proteica durante la extracción de aceite, son los problemas que se deben resolver para la producción de concentrados y/o aislados con adecuadas propiedades fisicoquímicas y funcionales. Como es posible observar en la **Tabla 2.**, existe una gran variedad de métodos que han sido propuestos para concentrar o aislar las proteínas de girasol, diferenciándose principalmente en las etapas destinadas a remover los compuestos fenólicos previo a la extracción proteica en medio alcalino. Estas metodologías se basan en extracción con mezclas acuosas de solventes orgánicos; con soluciones de ácidos, sales y/o agentes reductores; filtración por membrana; precipitación de pigmentos y compuestos no-proteicos; y combinación de ellas (González-Pérez y col., 2002). De todas estas, las más promisorias son las que emplean mezclas acuosas de solventes orgánicos para extraer los compuestos fenólicos (Sodini y col., 1978; Rahma y col., 1981; Sripad y col., 1987; Vermeesch y col., 1987; Saeed y col., 1988; Prasad, 1990; Venkatesh y col., 1993; González-Pérez y col., 2002), debido a que la solubilidad del CGA en estos solventes es mayor que en agua. Por ejemplo, Sabir y col. (1974) reportaron que la solubilidad del CGA (a 20°C) es 15,2% en metanol, 6,2% en etanol y 0,6% en agua.

Tabla 2.: Metodologías propuestas para obtener concentrados y/o aislados proteicos de girasol con bajo contenido de compuestos fenólicos.

Materia Prima ⁽¹⁾	Extracción de Fenoles	Extracción de Proteínas	PI-UF ⁽²⁾	Producto ⁽³⁾	Referencia ⁽⁴⁾
HDG-L	Extracciones sucesivas (2-7) con agua; pH 3,5-6	pH 9-11	PI	A	O'Connor, 1971 (P)
HDG-I	Extracción a pH 11 con sulfito de sodio		-	-	González y col., 1975
HDG-L	Extracciones sucesivas (8) con butanol; pH 2-6; T=4°C	pH 9,5	PI	A	Sodini y col., 1978 (P)
HDG-I	Soluciones salinas (acetato o cloruro de Ca o Mg) y sulfito de sodio; pH 7-8,5 y 10-12,5		PI	A	Petit y col., 1979 (P)
HDG-L	Soluciones con sales de Al (sulfato o cloruro) ; pH 10,5		PI con cítrico	A	Nuzzolo y col., 1980 (P)
HDG-L	Extracciones sucesivas (4) con Agua o soluciones de NaCl; etanol 70%; butanol; pH 5	pH 7	-	C	Rahma y col., 1981
HDG-L	Extracción a contracorriente-precipitación isoeléctrica			A	Taha y col., 1981
HDG-L	Extracciones sucesivas con soluciones hexano/alcohol y alcohol/agua.	-	-	C	Campbell y col., 1981 (P)
HDG-L	Extracción de proteínas con agua a pH 9, en vacío		PI	A	Lawhon y col., 1982
HDG-L	Solución con borohidruro de sodio; pH 8,5-10; T=5-70°C		PI	A	Johnson y col., 1983 (P)
HDG-L	Extracción en solución de ácido cítrico o sulfito de sodio	-	-	C	Bau y col., 1983
HDG-I	Agua; pH 4-7 y pH<4; T=20-50°C		PI o UF	A	Pearce, 1984 (P)
HDG-L	Extracción de proteínas con agua a pH 8,5; con sulfito de sodio; T=50°C		PI o UF	A	Raymond y col., 1984/ Castor-Normandin y col., 1984
HDG-I	Extracción de proteínas con agua a pH 8,5; con sulfito de sodio; T=50°C		PI	C	Sastry y col., 1984
HDG-L	Extracciones sucesivas (3) con solución de NaCl; pH 5	-	-	C	Vermeersch y col., 1987
HDG-L	Extracción con soluciones acuosas de alcoholes (metanol, etanol, propanol, isopropanol, isobutanol)		-	C	Sripad y col., 1987
HDG-L	Extracciones sucesivas (4) con Acetona 40%; Metanol 40% o Etanol 40%	-	-	A	Saeed y col., 1988
HDG-L	Extracciones sucesivas (2) con butanol; pH 5	pH 10	PI	C	Prasad, 1990
HDG-L	Acetona/Acetona-Agua/Acetona-Agua-Ácido (post a Extracc. Prot)		-	A	Lapteva, y col. 2004 (P)
HDG-L	Extracciones sucesivas (3) con agua; pH 5	pH 2	PI	A	González-Pérez y col., 2005

⁽¹⁾ HDG-I: Harina desgrasada industrial/ HDG-L: Harina desgrasada de laboratorio; ⁽²⁾ PI: precipitación isoeléctrica/ UF: Ultrafiltración/ -: no se realiza dicha etapa; ⁽³⁾ C: Concentrado/ A: Aislado; ⁽⁴⁾ P: patente.

En general estos autores también proponen realizar las extracciones a pH cercano al isoelectrónico, para favorecer las interacciones proteína-proteína y minimizar así la posibilidad de interacciones proteína-fenoles (Saeed y col., 1989). La mayoría de estos protocolos fueron evaluados sobre harinas de girasol descascaradas y desgrasadas en condiciones de laboratorio, y a partir de los mismos se obtuvieron productos proteicos con bajo contenido de fenoles. Pero no se conoce en profundidad cómo afectan estos componentes a las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas obtenidas, y además, son muy pocos los autores que emplearon como materia prima el *pellet* de girasol (González y col., 1975; Petit y col., 1979; Pearce, 1984; Sastry y col., 1984).

5.- Propiedades funcionales de las proteínas

Además de su valor nutricional, las proteínas presentan una amplia gama de propiedades funcionales y juegan un rol importante en la expresión de los atributos sensoriales de los alimentos. Estas propiedades funcionales pueden definirse como “aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo” (Kinsella, 1976; Damodaran, 1989). En particular, las propiedades funcionales de las proteínas pueden clasificarse en tres grupos:

- Propiedades dependientes de la interacción proteína-agua.
- Propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína.
- Propiedades de superficie.

Cabe aclarar que esta clasificación, basada en el tipo de interacción molecular, no implica que se establezca un único tipo de interacción, sino que la misma es predominante para ese grupo de propiedades funcionales (Cheftel y col., 1989).

Dentro del grupo de las propiedades de hidratación (dependientes de la interacción de proteína-agua) podemos citar: adsorción de agua, absorción de agua, retención de agua, hinchamiento, mojabilidad, solubilidad, dispersabilidad, viscosidad (Pilosof, 2000). Estas propiedades cobrarán importancia de acuerdo al sistema alimentario en estudio. Por ejemplo, la capacidad de adsorción de agua puede limitar el tiempo de almacenamiento de los productos proteicos; mientras que la dispersabilidad y la

mojabilidad estarían afectando el proceso de rehidratación del polvo proteico, previo a su empleo como aditivo. El desarrollo de dispersiones viscosas podría beneficiar la textura de un producto, pero también podría dificultar su desplazamiento por bombeo dentro del establecimiento elaborador. Por otra parte, productos con elevada capacidad de absorción y retención de agua podrían ser empleados en embutidos, masas y geles, mientras que productos altamente solubles podrían utilizarse en bebidas y alimentos espumados o emulsionados. En el segundo grupo se incluyen las propiedades en donde las interacciones proteína-proteína son las más importantes, entre ellas: floculación, coagulación, gelificación y formación de estructuras (fibras, masas, películas, etc.) (Petruccelli, 1993). Los procesos de floculación implican la agregación al azar de proteínas sin cambios estructurales, mientras que las proteínas desnaturalizadas pueden agregarse al azar (coagulación) o de manera ordenada (gelificación). La formación de un gel proteico y sus propiedades influyen en la calidad de productos variados, por ejemplo quesos, yogures, salchichas, etc. Dentro de la formación de estructuras tipo masas, es ampliamente estudiada la capacidad de panificación de las proteínas de gluten de trigo. También es posible formar estructuras tipo fibras proteicas por extrusión, las que se podrían emplear como extendedores de carne y productos proteicos de *snack*. En los últimos años ha crecido el interés en la capacidad de las proteínas de formar materiales biodegradables con potenciales aplicaciones en *packaging* de alimentos o para la agricultura.

Finalmente, las propiedades de superficie dependen de la capacidad de la proteína de difundir hasta la interfase (agua-aire o agua-aceite) y formar una película estable. A este grupo pertenecen las propiedades espumantes y emulsificantes (Wagner, 2000). En el mercado existen varios alimentos en los que son fundamentales estas propiedades, por ejemplo merengues, *mousses*, *souffles*, *marshmallow*, postres, salsas, cremas, aderezos, helados, entre otros.

Como se puede apreciar entonces, la funcionalidad de las proteínas es de gran importancia tecnológica y existe un gran interés por conocer los mecanismos implicados en ella (Bartholomai, 2000). Para tal fin, es frecuente emplear sistemas modelos sencillos y determinar parámetros que brindan información sobre su capacidad de contribuir a la propiedad de interés. Estas determinaciones no reflejan su comportamiento final en el alimento, que es una matriz más compleja, pero resultan

una primera aproximación muy importante como paso previo a la formulación de alimentos (Paulson y col., 1984).

5.1.- Relación estructura-funcionalidad

Las propiedades funcionales que presenta una proteína están relacionadas con sus propiedades físicoquímicas y estructurales, tales como masa molecular, estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, composición aminoacídica, distribución de cargas, carga neta, relación hidrofobicidad/hidrofilicidad y flexibilidad molecular (Damodaran, 1998). Por lo tanto, conocer la relación entre estructura proteica y funcionalidad es la base para el diseño racional de ingredientes proteicos con funcionalidad específica para ser aplicados en el desarrollo de alimentos con características determinadas (Bartholomai, 2000). En este sentido, durante los últimos 30 años, varios autores han propuesto correlacionar distintos parámetros físicoquímicos de las proteínas, como 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 col., 1980; Nakai, 1983; Utsumi y col., 1985; Kinsella y col., 1989; Damodaran 1990; Wang y col., 1991; Petruccelli y col., 1994; Petruccelli y col., 1995; Utsumi y col., 1997; Damodaran, 1998; Maruyama y col., 1999; Sorgentini y col., 2001; Molina Ortiz y col., 2002; Maruyama y col., 2004). Por ejemplo, las propiedades emulsificantes que presentan las proteínas están relacionadas con su hidrofobicidad superficial y su solubilidad. Por otra parte, la formación de espumas depende de la hidrofobicidad total y de la solubilidad proteica, mientras que su estabilidad se puede relacionar con la densidad de carga neta. También se describió que la dureza del gel proteico depende de la hidrofobicidad total de las proteínas y de su contenido de grupos sulfhidrilos (Nakai, 1983; Damodaran, 1989; Li-Chan y col., 1989; Damodaran, 1997). Aunque algunos parámetros físicoquímicos pueden medirse de manera relativamente simple y constituyen una primera aproximación a la relación estructura-función, ya que, la estructura de las proteínas es tan compleja que la información obtenida es limitada. El empleo de otros métodos de estudio de la estructura como por ejemplo espectroscopía de absorción UV, de fluorescencia, infrarroja, resonancia magnética nuclear y dicroísmo circular

proporcionan información difícil de interpretar cuando se trabaja con mezclas de proteínas. La incorporación de otras herramientas como el estudio de funcionalidad de proteínas modificadas por ingeniería genética o el uso de variedades que tienen reducido el grado de polimorfismo de las proteínas de reserva, han mostrado que proteínas con 90% de homología en su secuencia se comportan de manera diferencial y también la contribución de algunos residuos de aminoácidos y/o motivos estructurales a la funcionalidad de una determinada proteína (Utsumi y col., 1980, 1993 y 2002). Esta clase de estudios es de importancia para establecer relaciones estructura función y generar las bases para una modificación racional. A pesar de las limitaciones que poseen las medidas de propiedades fisicoquímicas, su determinación complementa la información obtenida a través de las medidas de las distintas propiedades funcionales y constituye una forma de caracterizar los distintos productos proteicos obtenidos.

5.2.- Propiedades funcionales de las proteínas de girasol

Las propiedades funcionales de las proteínas de girasol han sido estudiadas fundamentalmente en productos obtenidos a partir de harinas desgrasadas y descascaradas en el laboratorio, pero no de productos obtenidos a partir del *pellet* residual de la industria aceitera. Por ejemplo, en bibliografía se informa que estas proteínas presentan buena solubilidad en agua, entre 50 y 75% a pH 7 (Sodini y col., 1977; Saeed y col., 1988). González-Pérez y col. (2005) describe que las albúminas de girasol se mantienen solubles en agua (entre 95-100%) independientemente del pH y la fuerza iónica del medio. En contraste, la solubilidad de las globulinas (heliantinina) se ve afectada por estos dos factores. A baja fuerza iónica (30 mM), su perfil de solubilidad en función del pH presenta un mínimo en pH 4-5,5; mientras que a alta fuerza iónica (250 mM) se mantiene con solubilidad mínima a pH<5 (Gheyasuddin y col., 1970; González-Pérez y col., 2008). Además, estas macromoléculas poseen gran capacidad de absorción de agua, variando entre 2,1 y 5,1 g H₂O/g producto, siendo similar a la de las proteínas de soja (Rahma y col., 1981; Vermeersch y col., 1987).

La bibliografía disponible respecto a las propiedades superficiales de estas proteínas, es muy amplia. En las **Tabla 3.** y **Tabla 4.** se muestran algunos de los estudios realizados

sobre las propiedades emulsificantes y espumantes, respectivamente, de las proteínas de girasol y los resultados obtenidos. En primera instancia, se puede observar que se han estudiado las propiedades de varias materias primas, entre ellas: harinas, concentrados, aislados, aislados hidrolizados y fracciones proteicas (albúminas y globulinas). Resulta importante destacar que los resultados informados dependen, además de las materias primas y de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura y concentración de proteínas, entre otras), del método usado para testear la funcionalidad. De esta manera se dificulta la comparación rápida de los resultados y la extracción de conclusiones más generales. Sin embargo, es posible afirmar que, en términos generales, tanto concentrados como aislados proteicos de girasol poseen buenas propiedades emulsificantes y espumantes; y en algunos casos, comparables con las de las proteínas de soja (Lin y col., 1974; Canella y col., 1977; Schwenke y col., 1981; Raymond y col., 1985; Kabirullah y col., 1985; Brueckner y col., 1986). Por su parte, las fracciones proteicas presentan diferente comportamiento, las albúminas poseen alta capacidad para formar espumas y emulsiones, pero estos sistemas resultan menos estables que los obtenidos con la fracción globulina (heliantinina) (Canella y col., 1985; Booma y col., 1990; Guéguen y col., 1996; Popineau y col., 1998; Burnett y col., 2002; González-Pérez y col., 2005).

Las propiedades dependientes de la interacción proteína-proteína también han sido estudiadas. Algunos autores informan que las proteínas de girasol no son capaces de formar geles por inducción térmica (Fleming y col., 1975; Bilani y col., 1989; Sánchez y col., 1995; Pawar y col., 2001). Por otra parte, hay estudios que demuestran que es posible obtener productos texturizados a partir de las proteínas de girasol, y utilizarlos como extendedores de carne (Vázquez y col., 1979; Rossi, 1988). Además estas proteínas son capaces de formar películas por *casting*, termocompresión y extrusión, con potencial aplicación en *packaging* de alimentos (Ayhllon-Meixueiro y col., 2000; Orliac y col., 2002; Orliac y col., 2003; Rouilly y col., 2006).

Tabla 3: Propiedades emulsificantes de proteínas de girasol.

Material	Condiciones y parámetros evaluados	Resultados y Conclusiones	Referencia
Harina; Concentrado; Aislado	Dispersión (5,5%); capacidad de emulsificación	La capacidad de formación de la emulsión es mayor en la harina que en los concentrados o aislados de girasol, incluso de soja	Lin y col., 1974
Harina	Dispersión (6%); pH 5,2; 7; 10,8; capacidad de emulsificación	Mayor capacidad de emulsificación a pH 7	Huffman y col., 1975
Harina	Dispersión pH 7; capacidad de emulsificación	La re-extracción de la harina con distintos solventes (benceno, cloroformo, eter de petróleo, cloroformo/metanol, etanol/eter/agua) no afecta la capacidad de emulsificación	Wu y col., 1976
Harina; Concentrado; Aislado	Dispersión (5,5%); capacidad de emulsificación	La capacidad de emulsificación del aislado es mayor que la de la harina, pero menor que la del concentrado; la capacidad de emulsificación del aislado es mayor que la del aislado de soja, pero la del concentrado es menor que la del concentrado de soja	Canella y col., 1977
Harina	Dispersión (8%); capacidad de emulsificación	Lavados con etanol acuoso disminuye la capacidad de emulsificación	Rahma y col.; 1981
Aislado	Dispersión (0,5%); pH 5 y 7; capacidad de emulsificación , actividad emulsificante y estabilidad	La actividad y capacidad emulsificante y la estabilidad fueron mayores a pH 7; la desnaturalización proteica (pH 2, 24 hs) no tuvo efectos sobre la actividad emulsificante ni la estabilidad, pero disminuyó la capacidad de emulsificación; mejores propiedades que las de las proteínas de soja	Schwenke y col., 1981
Harina	Dispersión (7%), pH 5,2 ; 7 y 10; actividad emulsionante y estabilidad	La actividad emulsionante y la estabilidad fueron mayores a pH >5; mínima actividad emulsionante a pH cercano a 3,75; mejores propiedades que las harinas de soja	Rossi y col., 1982
Harina; Albúminas; Heliantinina	Dispersión (1%) para capacidad de emulsificación; dispersión (7%) para actividad emulsionante y estabilidad	Baja actividad emulsionante y estabilidad de la heliantinina comparada con las albúminas y con la harina de girasol; la desnaturalización térmica mejora la actividad emulsionante y la estabilidad; la capacidad emulsionante es mayor en la harina	Canella y col., 1985
Aislado	Dispersión (10%); pH 8; capacidad de emulsificación	Menor capacidad de emulsificación que las proteínas de soja; al calentar se mejora la capacidad emulsionante	Khalil y col., 1985
Aislado	Dispersión (0,1%); pH 3-10; capacidad de emulsificación	Máxima capacidad de emulsificación a pH 8; equivalente a aislado de soja	Raymond y col., 1985
Harina; Concentrado	Dispersión (4%); pH 2-9; capacidad de emulsificación y estabilidad	Actividad emulsionante máxima (para harina y concentrado) entre pH 6,5-7,5; y mínima a pH 4,5-5; el concentrado presenta alta estabilidad de la emulsión y es independiente del pH; las propiedades emulsionantes son mejoradas cerca del pI por adición de sal, sin embargo la desnaturalización por calor las empeora	Rossi y col., 1985

Tabla 3: Propiedades emulsificantes de proteínas de girasol (continuación).

Material	Condiciones y parámetros evaluados	Resultados y Conclusiones	Referencia
Concentrado; Aislado	Dispersión en agua; actividad y capacidad emulsionante, estabilidad	La actividad emulsionante y la estabilidad de los concentrados son similares a los concentrados de soja, con mayor capacidad emulsionante; la actividad y capacidad emulsionante y la estabilidad son mejores que las de aislados de soja	Brueckner y col., 1986
Harina; Heliantinina	Dispersión (8,7 y 4%); pH 6; capacidad de emulsificación	La capacidad emulsionante de la heliantinina es dos veces mayor que la de la harina de girasol	Booma y col., 1990
Harina	Dispersión (5%); pH 7; actividad y capacidad emulsionante, estabilidad	La mayor estabilidad fue en agua en presencia de NaCl (1M); luego de tratamiento térmico y en presencia de sal se mejora la capacidad emulsionante y la estabilidad	Venktesh y col., 1993
Concentrado; Aislado	Dispersiones en agua; capacidad emulsionante	Buena capacidad emulsionante	Wastyn y col., 1993
Aislado; Aislado hidrolizado	Dispersión (5 %); pH 7; actividad emulsionante, estabilidad	La actividad emulsificante y la estabilidad de la emulsión se ven incrementadas cuando se realiza el tratamiento enzimático	Pacheco de Delahaye y col., 1994
Aislado; Aislado hidrolizado	Solución (0,3%); pH 7; capacidad emulsificante	La hidrólisis mejora la capacidad emulsionante de las proteínas de girasol; pero la mejora depende de la enzima empleada	Cai y col., 1996
Albúminas	Dispersión (0,05 y 0,1%); pH 8; cremado, floculación y resistencia a la coalescencia	Emulsiones estables; las albúminas ricas en metionina son más activas en la estabilización de la emulsión	Guéguen y col., 1996
Albúminas	Dispersión (0,1%); pH 7; cremado, floculación y resistencia a la coalescencia	Resistencia a la coalescencia es mayor en las albúminas ricas en metionina; la reducción de puentes disulfuro aumenta la estabilidad de la emulsión	Popineau y col., 1998
Harina; Concentrado; Aislado	Dispersión (8%); actividad y capacidad emulsionante, estabilidad	Aumento en la actividad emulsionante, la capacidad y la estabilidad en los productos con pequeñas cantidades de fitatos y compuestos fenólicos	Pawar y col., 2001
Albúminas	Dispersión (0,5%); pH 7; tamaño de gota, tensión superficial y viscosidad superficial	Emulsiones estables con albúminas ricas en metionina; albúminas menos hidrofóbicas dan emulsiones inestables	Burnett y col., 2002
Aislado; Heliantinina; Albúminas	Soluciones de proteínas (0,2-0,5%); pH 3-8; formación de emulsión y estabilidad; efecto de la T y de desnaturalización ácida	Albúminas, Heliantinina y aislado forman emulsiones estables, con la excepción de las albuminas en pH alcalino y neutro; la desnaturalización de la heliantinina mejora las propiedades emulsionantes	González-Pérez y col., 2005
Aislado; Aislado hidrolizado	Dispersión (1%); pH 5,5 y 7; tamaño de gota, reología de la emulsión; efecto de NaCl.	El aislado hidrolizado produjo la emulsión con menor tamaño de gota (a pH 7). El agregado de NaCl, no modificó la estabilidad del aislado hidrolizado.	Karayannidou y col., 2007

Tabla 4: Propiedades espumantes de proteínas de girasol.

Material	Condiciones y parámetros evaluados	Resultados y Conclusiones	Referencia
Harina	Dispersión (8-12%); pH 4-6; expansión de espuma en presencia de azúcar	Similares resultados que harina de soja	Lawhon y col., 1972
Harina; Concentrado; Aislado	Dispersión (3%); capacidad de formación y estabilización de espumas	Aislado con similares resultados que aislado de soja; harina y concentrado con mejores resultados que harina y concentrados de soja.	Lin y col., 1974
Harina	Dispersión (1-10%); pH 2-11; T 15-85°C; expansión de espuma y estabilidad	A pH 4, mejor expansión de espuma; a pH 9 mejor estabilidad; T mayor a 55°C disminuye la expansión de la espuma	Huffman y col., 1975
Harina	Dispersión (3%); pH 7; estabilidad de la espuma	La re-extracción de la harina con distintos solventes (benceno, cloroformo, eter de petróleo, cloroformo/metanol, etanol/eter/agua) no afecta la estabilidad de la espuma; los lavados con metanol la incrementan	Wu y col., 1976
Harina; Concentrado; Aislado	Dispersión (3%); expansión de la espuma y estabilidad	La expansión y estabilidad de la espuma fueron los mayores para el aislado y los menores para la harina; con peores propiedades que las proteínas de soja	Canella y col., 1977
Harina; Concentrado	Dispersión (1-12%); pH 1-12; T 10-80°C; expansión de las espuma y estabilidad	La harina de girasol presentó la mayor expansión de espuma a pH 7-10 y la menor estabilidad; seguido por el concentrado de girasol y el concentrado de soja; la mayor estabilidad de la harina fue a pH 6-8 y la menor a pH 2-5	Canella y col., 1978
Harina	Dispersión (1%); capacidad de formación de espuma y estabilidad	Lavados con etanol acuoso disminuye la capacidad de formar espumas; con butanol aumenta; otros solventes la disminuyen	Rahma y col., 1981
Harina	Dispersión (5%), pH 2-7; capacidad de formar espuma y estabilidad	Formación y estabilidad de la espuma es alta a pH >5; aumenta el volumen de espuma y disminuye la estabilidad con el aumento de la fuerza iónica; mejores propiedades que la harina de soja	Rossi y col., 1982
Harina; Albúminas	Dispersión (8%); pH 2-10; expansión de la espuma y estabilidad	Albúminas dan espumas voluminosas (máximo a pH 7,7) y relativamente estables (pH 6-10)	Canella y col., 1985
Semillas; Harina; Aislado	Dispersión (0,3 mg/ml); pH 3-7; capacidad de formación y estabilidad de la espuma	Aislado a pH 7 presenta menor capacidad de formación, pero mayor estabilidad que la harina; la capacidad de formación máxima de la harina es a pH7 y la mínima a pH 4; la estabilidad máxima de la harina es a pH 4-5, y mínima a pH 7; calentando disminuye la capacidad de formación; las proteínas de soja tienen mayor capacidad de formar espumas	Khalil y col., 1985
Aislado	Dispersión (3%); pH 7; capacidad de formación de espuma y viscosidad	Menor capacidad de formación de espumas que las proteínas de soja; al calentar disminuye la expansión y viscosidad de la espuma	Khalil y col., 1985

Tabla 4: Propiedades espumantes de proteínas de girasol (continuación).

Material	Condiciones y parámetros evaluados	Resultados y Conclusiones	Referencia
Aislado	Dispersión (0,5-5%); pH 1,5-10,5; T 15-60°C; capacidad de formación de espuma y estabilidad	Máxima expansión de la espuma a pH 7,5; la mayor estabilidad a pH 6,5-10,5; no hay efecto de la T; aislado de girasol con mayores capacidad de formación y estabilidad de espuma que aislado de soja en condiciones óptimas	Raymond y col., 1985
Harina; Concentrado	Dispersión (4%); pH 2-9; capacidad de formación y estabilidad de la espuma	Alta capacidad de formación y estabilidad lejos del pI (4,5-5); se mejoran las propiedades de la espuma con el agregado de sal (pH 4-6,5); la desnaturalización por calor mejora levemente la expansión de la espuma y su estabilidad	Rossi y col., 1985
Harina; Aislado	Dispersión (0,5-2,5%); pH 4-10; expansión de la espuma y estabilidad	Similares propiedades de la espuma para aislados de girasol o soja, pero peores para harina de girasol; la mayor expansión de la espuma a pH 7-10; la estabilidad de la espuma disminuye a pH >6 en la harina	Kabirullah y col., 1988
Aislado	Dispersión (5%); pH 2,5-8; expansión de la espuma y estabilidad	Correlación lineal fuerte entre solubilidad y expansión de espuma, pero no con estabilidad; la desnaturalización por acidificación mejora la expansión y estabilidad de la espuma	Claughton y col., 1989
Harina; Heliantinina	Dispersión (8,7 y 1%); pH 6; capacidad de formación y estabilidad de la espuma	Heliantinina estabiliza la espuma	Booma y col., 1990
Harina	Dispersión (3%); volumen de espuma y estabilidad	Lavados con butanol y tratamientos térmicos generalmente disminuyen el volumen de espuma y la estabilidad	Venktesh y col., 1993
Concentrado; Aislado	Dispersiones en agua; capacidad de formación y estabilidad de la espuma	No presentan capacidad de formar espuma	Wastyn y col., 1993
Albúminas	Dispersión (0,2 y 0,3%); pH 7,8 y 8; capacidad de formación y estabilidad de espumas	Espumas con baja estabilidad	Guéguen y col., 1996
Albúminas	Dispersión (0,1%); pH 7; capacidad de formación y estabilidad de espuma	Pobre capacidad de formación y estabilización de espumas, la reducción de puentes disulfuro da espumas más densas y moderadamente estables	Popineau y col., 1998
Harina; Concentrado; Aislado	Dispersión (1%); capacidad de formación y estabilidad de espuma	Menor capacidad de formación en harina; la estabilidad es mayor en harina y aislado; la capacidad de formación se mejora luego de lavados con butanol	Pawar y col., 2001
Aislado; Aislado hidrolizado	Soluciones (3%); pH 7; capacidad de formación y estabilidad de espuma; efecto de polisacáridos	Un tratamiento enzimático limitado (DH=1,5%) mejora las propiedades espumantes. La capacidad de formación disminuyó al agregar un polisacárido, pero mejoró la estabilidad	Martínez y col., 2004

Tabla 4: Propiedades espumantes de proteínas de girasol (continuación).

Material	Condiciones y parámetros evaluados	Resultados y Conclusiones	Referencia
Aislado; Heliantinina; Albúminas	Soluciones de proteínas (0,05%); pH 3-8; volumen de espuma y estabilidad; efecto de la T y de desnaturalización ácida	Albúminas forman espumas con altos volúmenes, pero poco estables; Heliantinina produce bajos volúmenes de espuma en medio alcalino y neutro, pero con alta estabilidad; la desnaturalización de Heliantinina produce mejoras en las propiedades de las espumas	González-Pérez y col., 2005
Aislado; Aislado hidrolizado	Soluciones (1 y 10%); pH 7; capacidad de formación y estabilización de espuma	La capacidad de formación de la espuma y su estabilidad son mayores, al incrementar la concentración de proteínas	Rodríguez Patino y col., 2007
Aislado; Aislado hidrolizado	Dispersión (1%); pH 5,5 y 7; capacidad de formación y estabilidad de la espuma; efecto de polisacáridos y NaCl.	El aislado hidrolizado produce las espumas más estables. A pH 7 se logra la mayor estabilidad. La adición de NaCl mejora la capacidad de formar la espuma, pero no su estabilidad; lo que se logra agregando un polisacárido	Karayannidou y col., 2007

También es posible encontrar estudios en donde se mejoran las propiedades funcionales (solubilidad, espumas, emulsiones y geles) de las proteínas de girasol por medio de un tratamiento enzimático limitado (Pacheco de Delahaye y col., 1994; Cai y col., 1996; Sánchez y col., 1996; Sánchez y col., 1997; Villanueva y col., 1999; Yust y col., 2003; Miñones Conde y col., 2005; Martínez y col., 2005; Rodríguez Patino y col., 2007; Karayannidou y col., 2007).

Algunos autores han desarrollado productos con el agregado de proteínas de girasol. Por ejemplo, Wills y col. (1981) proponen emplear aislado proteico de girasol en un embutido cárnico, logrando retener mayor cantidad de agua y una emulsión más estable, pero con problemas de aceptación por parte del consumidor debido al color desarrollado. Por otra parte, el volumen de pan disminuye cuando a la masa se le adiciona harina proteica de girasol, así como también la aceptación de los consumidores (Della Gata y col., 1995).

Aún así, a diferencia de lo que ocurre con otras proteínas como las de soja, hay pocos estudios que analicen la incidencia de cambios en la estructura de las proteínas de girasol sobre las propiedades funcionales que estas exhiben.

6.- Ejes de trabajo

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, nos proponemos utilizar el *pellet* de girasol como materia prima en la elaboración de productos proteicos (concentrados y aislados) con mayor valor agregado.

1.- El *pellet* de girasol sufre tratamientos térmicos intensos que pueden afectar notoriamente las propiedades de las proteínas de girasol, como por ejemplo su solubilidad, lo que puede repercutir negativamente en los rendimientos de extracción y en sus propiedades funcionales. Por lo tanto, ¿es el *pellet* de girasol generado por la industria aceitera local adecuado para la producción de concentrados y/o aislados proteicos?

2.- Está descrito que los compuestos fenólicos reducen la solubilidad proteica y le confieren color a los productos obtenidos; sin embargo, también poseen propiedades antioxidantes que actualmente son deseables en la formulación de alimentos funcionales. ¿Es necesario eliminar los compuestos fenólicos presentes?

3.- El suero suele contener la mayor parte de los compuestos antinutricionales, como por ejemplo el factor antitriptico. En bibliografía existen datos contradictorios en relación a los compuestos antinutricionales de girasol. Entonces, ¿es necesario eliminar las proteínas del suero? ¿Los aislados proteicos presentan alguna ventaja extra respecto a los concentrados?

4.- En general, los productos obtenidos en escala de planta piloto pueden presentar propiedades fisicoquímicas y estructurales diferentes a las de los producidos en escala laboratorio, y éstas pueden afectar su comportamiento funcional. ¿Es posible extrapolar a escala de planta piloto los procedimientos desarrollados en el laboratorio para la obtención de concentrados y aislados de proteínas de girasol?

5.- Existen varios estudios que demuestran que las proteínas de girasol poseen buenas propiedades funcionales (solubilidad, capacidad espumante y emulsionante), sin embargo no se conoce la funcionalidad de las proteínas extraídas del *pellet* de girasol. Por lo tanto, los productos proteicos obtenidos ¿poseen propiedades funcionales interesantes para su empleo como aditivo en la industria alimentaria?

6.- Además, se conoce que las proteínas de girasol poseen la capacidad de formar películas, pero resulta necesario evaluar sus propiedades y optimizarlas para ampliar su campo de aplicación. ¿Sirven los productos proteicos de girasol como materias primas para la formación de materiales poliméricos biodegradables aplicables como *packaging* de alimentos o como plásticos para la agricultura?

7.- Conocer la relación entre propiedades fisicoquímicas y funcionales es importante para ver si es necesario y/o posible realizar cambios estructurales que produzcan mejoras en la funcionalidad. Entonces, ¿es posible establecer relaciones entre las propiedades estructurales de las proteínas de girasol y sus propiedades funcionales? ¿Son las medidas de propiedades fisicoquímicas una forma complementaria de caracterizar y comparar los productos proteicos obtenidos por distintos métodos?

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la obtención de concentrados y aislados proteicos de girasol, a partir del *pellet* residual de la industria aceitera local; y analizar las propiedades de los productos obtenidos en relación a sus potenciales aplicaciones en la industria alimentaria y de *packaging*.

Objetivos específicos

1.- Estudiar la obtención de concentrados y aislados proteicos de girasol con distintos contenidos de compuestos fenólicos, en escala de laboratorio, a partir del *pellet* residual de la industria aceitera local.

2.- Caracterizar y evaluar las propiedades fisicoquímicas de los productos proteicos de girasol resultantes.

3.- Estudiar la transferencia a escala de planta piloto de las metodologías desarrolladas en el laboratorio que resultaron adecuadas para la obtención de productos proteicos de girasol con propiedades deseadas para su uso industrial.

4.- Evaluar las propiedades funcionales y antioxidantes que presentan los distintos productos proteicos de girasol.

5.- Estudiar la obtención de materiales poliméricos biodegradables y/o comestibles a partir de proteínas de girasol y evaluar sus propiedades.

6.- Establecer relaciones entre las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de girasol y sus propiedades funcionales.

Capítulo I: Obtención y caracterización de productos proteicos de girasol

Capítulo I: “OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS PROTEICOS DE GIRASOL”

I.1.- Introducción

En la actualidad existe un interés creciente por la obtención de productos proteicos vegetales destinados para consumo humano debido, principalmente, a su menor costo comparado con las proteínas de origen animal, y además a la menor presión que tendría el sistema agropecuario si se modificaran los hábitos alimentarios de la población hacia este tipo de proteínas (Chrispeels y col., 2003). Las harinas desgrasadas vegetales, subproductos de la industria aceitera, constituyen importantes fuentes de proteínas. En general, el proceso industrial de extracción de aceite provoca desnaturalización proteica y disminución de su solubilidad (Moure y col., 2006; González-Pérez y col., 2008), afectando así los rendimientos de extracción de proteínas y su rentabilidad.

En particular, el *pellet* de girasol se encuentra sub-aprovechado, empleándose casi exclusivamente para alimentación animal (Abraham y col., 1991), a pesar de poseer un elevado contenido de proteínas de buena calidad nutricional (Taha y col., 1980; Miller y col., 1985). En parte, esto puede atribuirse a su gran cantidad de compuestos fenólicos, capaces de interaccionar con las proteínas y disminuir aún más su solubilidad, además de afectar las características organolépticas, las propiedades funcionales y la vida útil del producto (Sastry y col., 1984; Sripad y col., 1987; Prasad, 1990; Kroll y col., 2001; Pringent y col., 2002). Dado que estas razones limitan su empleo para la producción de productos proteicos, varios autores han propuesto diversas metodologías tendientes a eliminar estos compuestos fenólicos, siendo las más promisorias las extracciones con soluciones acuosas de alcoholes (Sodini y col., 1978; Rahma y col., 1981; Sripad y col., 1987; Vermeesch y col., 1987; Saeed y col., 1988; Prasad, 1990; Venkatesh y col., 1993; González-Pérez y col., 2002). Por otra parte, y en paralelo, en los últimos años ha crecido el interés de mantener estos compuestos, o en algunos casos agregarlos a la formulación, dada su acción como antioxidantes (Rice-Evans y col., 1995; Turkmen y col., 2006; Bastos y col., 2007), y los beneficios que

los mismos presentan en la prevención de enfermedades y en el retardo del envejecimiento (Oomah y col., 1999; Olthof y col., 2000; Raskin y col., 2002; Gotteland y col., 2007; Marques y col., 2009). En este contexto, no está bien establecido si es o no necesario remover este tipo de compuestos cuando se preparan productos enriquecidos en proteínas a partir del *pellet* de girasol. De la evaluación de todas las propiedades en conjunto, surgirá un criterio más concreto de la necesidad o no de eliminarlos para los distintos tipos de aplicación.

Además debe considerarse que la información disponible en bibliografía sobre la presencia de compuestos antinutricionales, por ejemplo inhibidores de proteasas, en girasol es contradictoria. Algunos estudios muestran su ausencia (Miller y col. 1985; Prasad, 1990), aunque la presencia de factor antitriptico en semillas de girasol ha sido descrita en variedades menos sensibles a esclerotina (Mendieta y col., 2004). Por lo tanto, pensando emplear los productos proteicos de girasol para alimentación humana, resulta imprescindible establecer la presencia o ausencia de estos compuestos en el *pellet* generado por la industria aceitera local y, en caso de estar presentes, conocer las condiciones necesarias para su inactivación.

El objetivo de este capítulo fue desarrollar metodologías que permitan obtener productos proteicos de girasol con distinto contenido de fenoles, a partir del *pellet* residual de la industria aceitera local; caracterizar sus propiedades estructurales y evaluar su posible aplicación para alimentación humana.

I.2.- Materiales y Métodos

I.2.1.- Materiales

Como materia prima se empleó un *pellet* desgrasado de girasol (*Helianthus annuus*) provisto por la Aceitera Santa Clara, de Molinos Río de La Plata (Rosario, Argentina). Durante la extracción de aceite, la torta residual sufrió tratamientos con presión (50 kg/cm²), solvente orgánico (hexano) y temperatura (150°C-170°C) (**Figura 4.**). El *pellet* se molió en un molino Bühler Miag MLGV Variostuhl, y se tamizó empleando una malla con diámetro de partícula de 1,19 mm, obteniéndose de esta forma el “*pellet* molido de girasol”.

I.2.2.- Obtención de productos proteicos de girasol en escala laboratorio

Obtención de concentrados proteicos de girasol: Se partió del *pellet* molido de girasol. El mismo se puso en contacto con agua empleando una relación 1:10 p/v. La extracción se realizó durante treinta minutos manteniéndose con agitación constante. Posteriormente se ajustó el pH con NaOH 2N. Se continuó la extracción durante treinta minutos más, midiéndose el pH a distintos tiempos y reajustándolo si fuera necesario. Se centrifugó a 30000 xg durante 15 minutos a 20°C en una centrífuga Avanti J-25 (Beckman Coulter, California, Estados Unidos) y se separó el sobrenadante (**S1**). El precipitado resultante (**P1**) se sometió a una nueva extracción de proteínas en iguales condiciones a la descrita anteriormente. El precipitado resultante (**P2**) se descartó y el sobrenadante obtenido en esta segunda etapa (**S2**) se mezcló con **S1**, se reajustó el pH, se congeló a -80°C y finalmente se liofilizó (Liofilizador Heto FD4, conectado a una bomba de vacío Vacuubrand RZ 5). Se obtuvo así un concentrado proteico de girasol, que se denominó **Co-L** (Concentrado-Laboratorio).

Para la obtención de concentrados proteicos de girasol con menor contenido de fenoles, se realizaron lavados sucesivos del *pellet* con diversos solventes a pH ácido, previo a la extracción de proteínas en medio alcalino. De esta manera, el *pellet* molido de girasol se puso en contacto con el medio de extracción de fenoles (relación 1:15

p/v), se ajustó el pH y se mantuvo en agitación constante durante treinta minutos (verificando la constancia en el valor de pH cada 10 minutos). Posteriormente se centrifugó a 30000 xg durante 15 minutos a 20°C (Avanti J-25 Beckman Coulter, California, Estados Unidos), se separó el precipitado al cual se lo sometió a una nueva extracción de compuestos fenólicos en iguales condiciones que las mencionadas anteriormente; mientras que el sobrenadante (extracto) se guardó para cuantificar proteínas y compuestos fenólicos. Luego de realizar las extracciones de fenoles, el *pellet* resultante se sometió a la extracción de proteínas en pH alcalino como se describió en la obtención de **Co-L**.

Los medios de extracción de compuestos fenólicos empleados en este trabajo fueron: agua; solución de Na₂SO₃ 0,1% p/v; etanol 70% v/v; metanol 80% v/v y butanol (1-butanol en HCl 0,005N; 92:8 v/v). Los concentrados proteicos obtenidos fueron denominados como: **CoExA-L**, **CoExS-L**, **CoExE-L**, **CoExM-L** y **CoExB-L**, respectivamente.

Obtención de aislados proteicos de girasol: se procesó el *pellet* molido de girasol en las condiciones descritas anteriormente para la obtención de los distintos concentrados proteicos; pero en este caso, los sobrenadantes (**S1** y **S2**) se mezclaron y las proteínas se precipitaron isoelectricamente, ajustando el pH con HCl 2N. Se agitó durante treinta minutos, centrifugándose posteriormente a 30000 xg durante 15 minutos a 4°C (Avanti J-25, Beckman Coulter, California, Estados Unidos). El sobrenadante resultante se desechó, mientras que el precipitado se lavó con agua destilada a pH adecuado y se volvió a centrifugar nuevamente. El precipitado obtenido se resuspendió en agua (hasta alcanzar aproximadamente 10% p/v) y se alcalinizó con NaOH 2N. La suspensión se agitó durante quince minutos, posteriormente se congeló a -80°C y se liofilizó (Liofilizador Heto FD4, conectado a una bomba de vacío Vacuubrand RZ 5). De esta forma se obtuvo **Ai-L**. **AiExA-L** y **AiExS-L** se obtuvieron agregando etapas de lavados sucesivos con agua ó Na₂SO₃ 0,1% p/v previo al procesamiento seguido para aislar las proteínas.

Rendimientos de los procesos se expresaron de dos formas: basados en materia seca (g producto/g *pellet* molido) y en proteínas (g proteínas en el producto/g proteínas en el *pellet* molido). También se determinaron los porcentajes de eliminación de compuestos fenólicos. Para todos los casos, se consideró como el 100% la cantidad inicial de *pellet* molido de girasol que se empleó para la obtención del producto en estudio.

I.2.3.- Determinación de la composición química

Se determinó la composición química porcentual del *pellet* molido de girasol y de los productos proteicos obtenidos.

Los valores de humedad y cenizas fueron determinados gravimétricamente, utilizando los métodos AOAC 935.29 y AOAC 923.03 (AOAC: Association of Official Analytical Chemists Inc., 1995), respectivamente. El contenido de proteínas se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC 920.53) utilizando 5,55 como factor de conversión de nitrógeno en proteínas (<http://www.nal.usda.gov>). La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó mediante espectrofotometría en el UV a 324 nm empleando ácido clorogénico (CGA, Chemika Fluka, Alemania) como patrón, como se detalla en **Anexo I**.

En el caso de *pellet* molido de girasol, además se determinó el contenido de lípidos por Soxhlet (AOAC 920.39) empleando n-hexano como solvente de extracción; y el de hidratos de carbono totales según el método de Felhing-Causse-Bonnans (AOAC 14023/24), previa hidrólisis de dos horas en medio ácido fuerte, empleando una solución de glucosa 0,5% p/v como patrón. El porcentaje de fibra se calculó por diferencia.

Todas las determinaciones se realizaron como mínimo por duplicado.

I.2.4.- Determinación de componentes antinutricionales

La determinación de actividad ureásica y antitriptica se realizó sobre el *pellet* molido de girasol y una harina de porotos remojados de soja sin tratamiento térmico, esta última empleada como control positivo.

Determinación de actividad ureásica: La actividad ureásica remanente, de los productos estudiados en presencia de urea en solución, fue determinada según el método AOCS, Ba 9-59 (1980) (Sorgentini y col., 1999). Este es un método indirecto en el que se determina el incremento de pH de la dispersión respecto al blanco (a un tiempo fijo) debido a la formación de amoníaco, que es el producto de la hidrólisis enzimática de la urea. La muestra (200 mg) se dispersó en 10 ml de buffer fosfato de sodio 0,1 M, conteniendo urea 3% p/v (Riedel-deHaën, Alemania) a pH 7. Se incubó a 30°C y luego de 30 minutos se determinó el valor de pH. En las mismas condiciones se realizó un blanco sin urea. En estas condiciones experimentales, la actividad ureásica remanente se expresó como la diferencia de pH entre la muestra y el blanco registrada en un período de 30 minutos de reacción (ΔpH). Esta determinación se realizó por triplicado.

Determinación de actividad antitriptica: Para la determinación de la actividad antitriptica en las muestras se siguió el protocolo descrito por AOCS, Ba 1275 (1995) (Della Gatta y col., 1988). En este método se emplea el sustrato sintético BAPA (benzoil-DL-arginina-p-nitroanalida hidrocloreuro), el cual es hidrolizado por la tripsina produciendo p-nitroanilina, un compuesto de color amarillo, cuya producción se puede seguir por medida de la absorbancia a 410 nm. La presencia de inhibidores de tripsina (actividad antitriptica), en una muestra de interés, se puede evaluar midiendo la disminución de velocidad de conversión de BAPA en p-nitroanilina cuando se emplea una cantidad fija de la enzima comercial.

Procedimiento para las muestras: Se pesó 1 g de muestra, se le agregó 50 ml de NaOH 0,01N, se incubó con agitación durante tres horas a temperatura ambiente. Luego se

tomaron alícuotas del extracto, de las que se separaron los sobrenadantes por centrifugación (23700 xg, 10 minutos a 20°C; Avanti J-25, Beckman Coulter, California, Estados Unidos). Se colocaron 400 µl del extracto (con 1 mg proteína/ml) en un tubo, se agregaron 400 µl de una solución 20 ppm tripsina (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Estados Unidos) en HCl 0,001M. Posteriormente se adicionó 1 ml de una solución 40 ppm BAPA (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Estados Unidos) en buffer Tris 0,05M, pH 8,2, CaCl₂ 25 mM. Se incubó a 37°C y se agitó ocasionalmente. Luego de 10 minutos, para detener la reacción enzimática se agregaron 200 µl de ácido acético 30% v/v y se midió la absorbancia a 410 nm (Abs_m).

Procedimiento para el blanco de la muestra: Se colocaron 400 µl del extracto (con 1 mg proteína/ml) en un tubo y se agregó 1 ml de sustrato BAPA. Se incubó a 37°C durante 10 minutos, luego se agregaron 200 µl de solución de ácido acético 30% v/v y 400 µl de la solución de enzima. Posteriormente se midió la absorbancia a 410 nm (Abs_{bm}). Este valor corresponde a la hidrólisis no enzimática del sustrato. La diferencia entre los valores de absorbancia de la muestra y el blanco de la muestra ($Abs_m - Abs_{bm}$), luego de 10 minutos de reacción enzimática, nos indica la actividad residual de la tripsina (Abs_{rT}) en las condiciones del ensayo.

Procedimiento para obtener la actividad tripsina total: Se colocaron 400 µl de NaOH 0,01N en un tubo, se agregaron 400 µl de la solución 20 ppm de enzima y 1ml de sustrato BAPA. Se mantuvo a 37°C durante de 10 minutos, posteriormente se adicionaron 200 µl de solución de ácido acético 30% v/v, y se midió la absorbancia a 410 nm (Abs_{AT}). Este valor de absorbancia determina la actividad máxima de la tripsina, luego de 10 minutos de reacción enzimática.

La actividad antitriptica (AAT) se expresó como la diferencia entre las absorbancias máxima y residual ($Abs_{AT} - Abs_{rT}$), luego de transcurridos 10 minutos de reacción enzimática, en las condiciones del ensayo.

Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

I.2.5.- Solubilidad de proteínas y fenoles en función del pH

Se pesaron aproximadamente 10 g de *pellet* molido de girasol y se dispersaron en 200 ml de agua destilada. Se agitó durante treinta minutos, se midió el pH de la suspensión obtenida y se mantuvo con agitación constante por un período de una hora. Se agregó NaOH (2N) o HCl (2N) para ajustar el pH en el valor deseado, se registró el volumen de solución agregado, se mantuvo con agitación durante treinta minutos y se verificó el pH. Se extrajo un volumen de dispersión que fue registrado. La dispersión se centrifugó a 23700 xg durante 15 minutos a 20°C (Avanti J-25, Beckman Coulter, California, Estados Unidos). En el sobrenadante se cuantificaron proteínas solubles por el método de Bradford (Bradford, 1976) y compuestos fenólicos por espectroscopía en el UV a 324 nm (**Anexo I**). Como patrones se emplearon seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) y ácido clorogénico (CGA, Chemika Fluka, Alemania), respectivamente.

También se determinó la solubilidad de proteínas y fenoles en agua a pH 8,25 de los concentrados y aislados siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Los resultados se expresaron como porcentaje respecto a la cantidad de proteínas o fenoles presentes originalmente en el material de partida. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

I.2.6.- Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial (H_o) de concentrados y aislados proteicos de girasol se determinó empleando la sonda fluorescente ANS (ácido 8-Anilino-1-naftalenosulfónico; Aldrich Chemical Company, Inc., Estados Unidos), cuya fluorescencia se modifica al encontrarse en un ambiente hidrofóbico, según el método descrito por Kato y col. (1980).

Las muestras se disolvieron en agua destilada (5 mg/ml, pH 8,25), se agitaron continuamente durante una hora a 20°C y luego se centrifugaron a 23700 xg, 15 minutos a 20°C (Avanti J-25, Beckman Coulter, California, Estados Unidos). La concentración de proteínas en cada sobrenadante se determinó por el método de

Bradford. Cada sobrenadante se diluyó con agua destilada de manera de obtener soluciones con concentración de proteínas en el rango de 5 mg/ml a 0,05 mg/ml. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

El método se estandarizó por ajuste de la intensidad de fluorescencia relativa, empleando un espectrofluorómetro Perkin-Elmer 2000 (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, Estados Unidos), a un 80% de la escala cuando se agregan 15 μ l de ANS 8 mM a 3 ml de metanol absoluto (calidad HPLC, J.T. Baker, Estados Unidos). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 365 nm y 485 nm, respectivamente.

Se determinó la cantidad de sonda necesaria para producir la saturación de la muestra. Para ello, a la muestra más concentrada se le adicionaron distintas cantidades de ANS hasta que no se produjeron cambios en la intensidad de fluorescencia. La cantidad de sonda necesaria para la saturación fue 25 μ l 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. La longitud de onda determinada fue 475 nm.

A cada dilución se le midió la intensidad de fluorescencia sin y con agregado de 25 μ l ANS (8 mM en agua). Se calcularon las diferencias en 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 Microcal Origin 6.0, Microcal Software Inc., Estados Unidos) fue usado como índice de hidrofobicidad superficial aromática (Ho) (**Ecuación I.1.**). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

$$\Delta IF = Ho \cdot [P] + a \quad \text{Ecuación I.1.}$$

Donde: ΔIF : diferencia en intensidad de fluorescencia entre la dilución de la muestra sin y con agregado de ANS (UA); [P]: concentración de proteínas en cada dilución (mg/ml, determinada por Bradford); Ho: hidrofobicidad superficial aromática (UA ml/mg); a : ordenada al origen resultante del ajuste matemático.

I.2.7.- Calorimetría diferencial de barrido

Por esta metodología se determinó la temperatura y el grado de desnaturalización de las proteínas. Se prepararon dispersiones de las muestras (*pellet* molido o productos proteicos de girasol) al 20% p/p en agua. Entre 15 y 20 mg de dichas dispersiones se colocaron en cápsulas de aluminio que se sellaron herméticamente. Las muestras fueron analizadas haciendo un barrido de temperaturas a 10°C/min entre 20 y 120°C, usando un Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC) Q100 V9.8 Build 296 (TA Instrument, New Castle, Del., Estados Unidos). El equipo fue previamente calibrado usando indio, ácido láurico y ácido esteárico como patrones de calor y temperatura. 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. De los termogramas obtenidos se determinaron la temperatura de pico y el área bajo la curva, que corresponden a la temperatura y a la entalpía de desnaturalización térmica de las proteínas respectivamente (Td en °C y ΔH en J/g proteína), empleando el software Universal Analysis V4.2E (TA Instruments, New Castle, Del., Estados Unidos). Las determinaciones se realizaron como mínimo por duplicado.

I.2.8.- Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida

La composición polipeptídica del *pellet* molido y de los productos proteicos de girasol fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de 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: Buffer de separación: 0,375 M Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 8,8; buffer de corrida: 0,025 M Tris-HCl, 0,192 M Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3; buffer de muestra: 0,125 M Tris-HCl, 20% v/v glicerol, 1% p/v SDS, 0,05% p/v azul de bromofenol, pH 6,8.

Todas las muestras fueron disueltas en el buffer de muestra. En particular, para analizarlas en condiciones reductoras, se les agregó 2- β mercaptoetanol (5%v/v) y se

calentaron a 100°C durante 5 minutos. Todas las muestras se centrifugaron 15 minutos a 18000 xg y temperatura ambiente (A 15, B. Braun Biotech International, Estados Unidos). En cada calle se sembró un volumen de sobrenadante correspondiente a 20-30 µg de proteínas. La electroforesis se realizó a voltaje constante (200V).

Los geles obtenidos se fijaron y colorearon simultáneamente (12 horas) con una solución de metanol, ácido acético y agua (5:5:2) conteniendo 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Anedra, Argentina). Posteriormente fueron decolorados con una solución acuosa de etanol 25% p/v y ácido acético 10% p/v.

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

Se tomaron imágenes de los geles y se analizaron con el software ImageJ (Bethesda, MD: US National Institute of Health; <http://resb.info.nih.gov/ij/>).

I.2.9.- Determinación de Color

El color de los concentrados y aislados proteicos de girasol 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). El equipo fue calibrado usando un set de tres placas provisto por el fabricante. Las muestras se esparcieron de manera homogénea sobre la superficie de la placa blanca con coordenadas $L_{placa}= 97,3$; $a_{placa}= 0,14$; $b_{placa}= 1,71$. La diferencia total de color (ΔE) fue calculada mediante la **Ecuación I.2**. Se realizaron nueve determinaciones sobre cada una de las muestras analizadas.

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

Donde: ΔE : diferencia total de color entre la muestra y la placa blanca. Parámetros Hunter-Lab L : luminosidad, a y b : cromaticidad, de la muestra y de la placa blanca.

I.2.10.- 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 Statgraphics plus, versión 5.1 (Statgraphics, Estados Unidos).

I.3.- Resultados y Discusión

I.3.1.- Caracterización del *pellet* molido de girasol

Con el objetivo de caracterizar la materia prima, el *pellet* molido de girasol, se determinó su composición química (% en base seca). Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla I.1**. Se puede observar que, debido al proceso industrial de extracción de aceite la cantidad de material lipídico es mínima, menor al 1%. Mientras que posee elevados contenidos de proteínas e hidratos de carbono. También es notorio el elevado porcentaje de sales y la gran cantidad de fibra que presenta la muestra, debido a la presencia de restos de cáscara. En general, la composición química porcentual detallada coincide con los resultados presentados por otros grupos de trabajo que emplearon materias primas similares (González y col., 1975; Ayhllon-Meixueiro y col., 2000; Vioque y col., 2001).

Tabla I.1.: Composición química (% base seca) del *pellet* molido de girasol.

Composición química (%)	
Proteínas (N x 5,55)	31,67 ± 0,06
Hidratos de Carbono	23,19 ± 0,87
Fibra	33,64 ± 2,25
Cenizas	7,98 ± 0,36
Fenoles	2,65 ± 0,03
Lípidos	0,88 ± 0,02

Se informa promedio ± desviación estándar. Porcentaje de humedad: 10,98±0,91.

El alto contenido proteico que presenta este subproducto, mayor al 30%, lo posiciona como una atractiva materia prima para la elaboración de productos enriquecidos en proteínas, como por ejemplo concentrados, aislados y/o hidrolizados. Una particularidad de este material, comparado con otras fuentes de proteínas vegetales

como soja por ejemplo, es que posee un elevado porcentaje de compuestos fenólicos (2,65%), mayoritariamente ácidos clorogénico (75%) y cafeico (19%) (**Anexo I**). El contenido de fenoles totales presentes en este *pellet* se encuentra dentro de los valores informados en bibliografía, entre 1,5 y 5,8%, para materias primas similares (**Tabla 1**) y concuerda con los perfiles descritos por Sastry y col. (1984), Sripad y col. (1987) y Prasad (1990).

I.3.1.1.- Componentes antinutricionales

Se determinaron las actividades ureásica y antitriptica del *pellet* molido de girasol. En ambos casos, se empleó como control positivo una harina de porotos remojados de soja sin tratamiento térmico. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla I.2**. Allí se puede observar que en el *pellet* molido de girasol no se encontró actividad ureásica remanente ($\Delta\text{pH}=0$), mientras que la harina de soja presentó actividad positiva, siendo esta última similar al valor informado por Wagner y Sorgentini (1998) y mucho mayor que el máximo establecido en el Código Alimentario Argentino (CAA) para harinas de soja aptas para consumo humano ($\Delta\text{pH}=0,3$) (<http://www.anmat.gov.ar>). Esta metodología, por ser rápida, sencilla y de bajo costo, es ampliamente utilizada en la industria alimentaria como indicador de tratamientos térmicos. Pero dado que este hecho no es suficiente para afirmar la inactivación del factor antitriptico debido a que, en ciertas condiciones, su resistencia puede ser mayor que la de ureasa (Sorgentini y col., 1999), se procedió a determinar su actividad (**Tabla I.2**). Se encontró que las muestras correspondientes al *pellet* molido de girasol mostraron una actividad antitriptica muy baja (AAT=0,01), mientras que las correspondientes a harina de soja presentaron una elevada actividad antitriptica (AAT=1,18), siendo este valor menor al informado por Della Gatta y col. (1988) (AAT=1,70).

Por lo tanto, la ausencia de estos compuestos antinutricionales en el *pellet* residual generado por la industria aceitera local permitiría la elaboración de productos proteicos de girasol, tanto concentrados como aislados, para ser empleados en alimentación humana, evitando la necesidad de someterlos a tratamientos térmicos intensos, que si bien inactivan los factores antinutricionales, también afectan las

características de los otros componentes presentes y significan un costo adicional de procesamiento.

Tabla I.2.: Actividad ureásica remanente y actividad antitriptica en *pellet* molido de girasol y en harina de porotos remojados de soja sin tratamiento térmico.

Muestra	Actividad ureásica*	Actividad antitriptica**
Pellet molido de girasol	0,00 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a
Porotos remojados de soja sin tratamiento térmico	2,41 ± 0,01 ^b	1,18 ± 0,04 ^b

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distinto superíndice son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$. * Δ pH. **AAT.

I.3.1.2.- Proteínas de girasol

Sabiendo que durante la extracción de aceite, las proteínas fueron tratadas con solventes orgánicos y se sometieron a esfuerzos de corte, altas presiones y temperaturas (**Figura 4.**), y que esto puede provocar desnaturalización proteica, se procedió a determinar el grado de desnaturalización de las proteínas de girasol mediante calorimetría diferencial de barrido. El termograma del *pellet* molido de girasol (**Figura I.1.A.**) presentó una única endoterma correspondiente a la desnaturalización de las proteínas presentes, indicándonos que éstas no se encuentran totalmente desnaturalizadas, probablemente debido a su elevada estabilidad térmica. Su temperatura de desnaturalización fue de 100,6°C, mayor que la reportada para las globulinas 11S de otras especies, por ejemplo soja, acorde con su elevado contenido de aminoácidos hidrofóbicos (Molina y col., 2004). La energía puesta en juego en el proceso de desnaturalización fue de 9,4 J/g proteína. Tomando como referencia el valor de $\Delta H = 14,5$ J/g proteína informado por González-Pérez y col. (2002) para un aislado de girasol en condiciones nativas, puede estimarse que el grado de desnaturalización proteica en el *pellet* utilizado es de 35%.

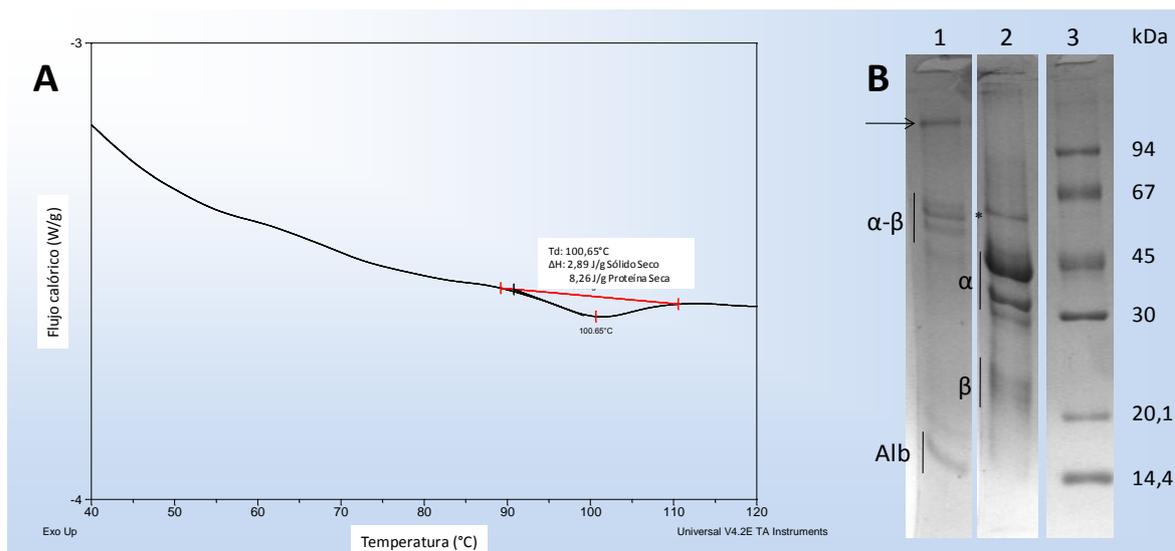


Figura I.1. A) Termograma obtenido por DSC de las proteínas presentes en el *pellet* molido de girasol. **B)** Perfil de electroforesis SDS-PAGE de las proteínas presentes en el *pellet* molido de girasol. Calle 1: SDS-PAGE. Calle 2: SDS-PAGE en condiciones reductoras (con 2- β mercaptoetanol). Calle 3: Patrones de bajo peso molecular (LMW).

La composición polipeptídica de las proteínas presentes en el *pellet* molido de girasol se analizó mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras y reductoras (**Figura I.1.B.**). Los perfiles electroforéticos obtenidos muestran la presencia de varias bandas con pesos moleculares entre 52-68 kDa (calle 1) correspondientes a las subunidades α - β de la globulina 11S (Heliantina). Cada una de estas subunidades está compuesta por dos cadenas polipeptídicas, una ácida (α) de peso molecular entre 30-40 kDa; y otra básica (β) de peso molecular entre 20-30 kDa, unidas entre sí por medio de puentes disulfuro (Molina y col., 2004). En condiciones reductoras (calle 2), es posible observar dichas bandas señaladas como α y β , respectivamente. Además es posible la visualización de bandas de menor peso molecular (15,6 kDa), las que corresponderían a albúminas 2S (calle 1, Alb); como lo describe González-Pérez y col. (2005). También se evidencia la presencia de una banda de elevado peso molecular (indicada con flecha en calle 1) correspondiente a agregados solubles mediados por puentes disulfuro, ya que dicha banda desaparece cuando se realiza el tratamiento con el agente reductor (calle 2).

Con estos resultados podemos concluir que el pellet molido de girasol posee un elevado contenido de proteínas, principalmente globulinas y albúminas. Estas proteínas se encuentran parcialmente desnaturalizadas debido al tratamiento térmico al que fueron sometidas durante la extracción de aceite. Este tratamiento también ha provocado la formación de agregados solubles mediados por uniones disulfuro. Este pellet carece de factores antinutricionales, por lo que no es necesario someter a nuevos tratamientos térmicos a los productos proteicos que se obtengan a partir del mismo. Por lo tanto, el pellet molido de girasol se podría emplear en la elaboración de productos proteicos con mayor valor agregado, destinados a alimentación humana.

I.3.2.- Selección de las condiciones de procesamiento para la obtención de productos proteicos de girasol

Entre los componentes del *pellet*, las proteínas son las que poseen mayor valor económico, por lo que una de las formas de conferirle mayor valor agregado es incrementar su concentración.

I.3.2.1.- Solubilidad de proteínas y fenoles presentes en el *pellet* molido de girasol en función del pH

Con el objeto de definir las condiciones de procesamiento para la obtención de productos proteicos de girasol, se estudió la solubilidad de las proteínas presentes en el *pellet* molido de girasol en función del pH (**Figura I.2.**). Se puede observar que a pH entre 2 y 6 se obtuvieron porcentajes de solubilidad proteica muy bajos (aproximadamente de 1 a 4%), y que los mismos fueron incrementándose a medida que el medio se tornó alcalino, alcanzando un valor de solubilidad máximo a pH 11, correspondiente al 40% de la proteína total (determinado por Kjeldahl). Este hecho nos estaría indicando que las proteínas presentes en el *pellet* han perdido solubilidad en agua, posiblemente debido a su desnaturalización parcial, detectada por DSC (**Figura I.1.A.**), producto del proceso industrial de extracción de aceite. Por su parte, Saeed y col. (1988) obtuvieron perfiles similares de solubilidad en función del pH, pero con

mayores porcentajes de solubilidad proteica (con un mínimo de 17% a pH 3-6 y un máximo de 90% a pH 10), probablemente debido a que emplearon harinas de girasol obtenidas en laboratorio en condiciones de procesamiento más suaves (descascarado manual y extracción de lípidos con n-hexano en sistema soxhlet). Por otra parte, en la **Figura I.2.** también se muestra la solubilidad de los compuestos fenólicos presentes en el *pellet* la cual varió de 2% a 3,5%, al pasar de pH ácido o alcalino a neutro.

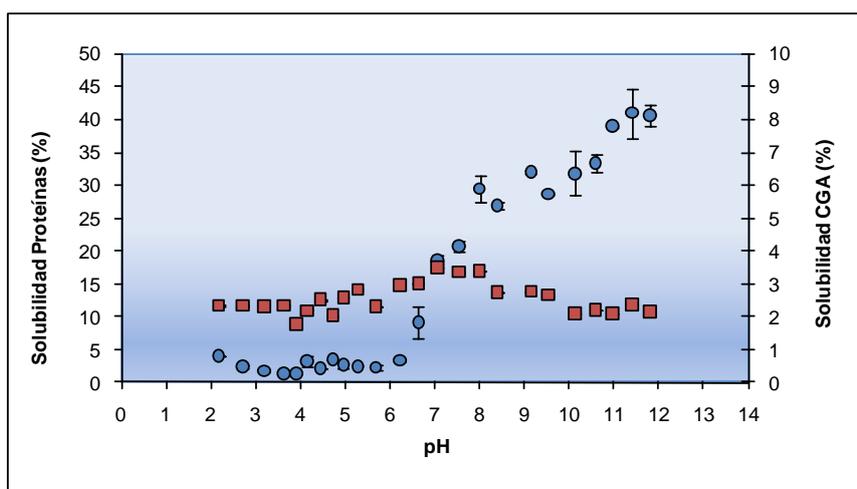


Figura I.2. Perfil de solubilidad en agua de las proteínas (●) y de los fenoles (■) presentes en el *pellet* molido de girasol en función del pH.

I.3.2.2.- Condiciones operativas para la obtención de productos proteicos de girasol

Se procedió entonces a realizar un protocolo de obtención de concentrados proteicos de manera clásica: solubilización de las proteínas en medio alcalino, separación del sobrenadante por centrifugación y su posterior liofilización. A pH 11 se esperaría un máximo rendimiento en el proceso de solubilización de proteínas, sin embargo Provansal y col. (1975) han descrito en dichas condiciones la formación de isopéptidos y compuestos que no son degradados por el organismo humano, por lo que se eligió solubilizar las proteínas en agua a pH 9. Para mejorar los rendimientos, se realizaron dos etapas sucesivas de solubilización de proteínas y los sobrenadantes

resultantes se mezclaron antes de su secado. El concentrado proteico obtenido mediante esta metodología se denominó **Co-L** (Figura I.3.).

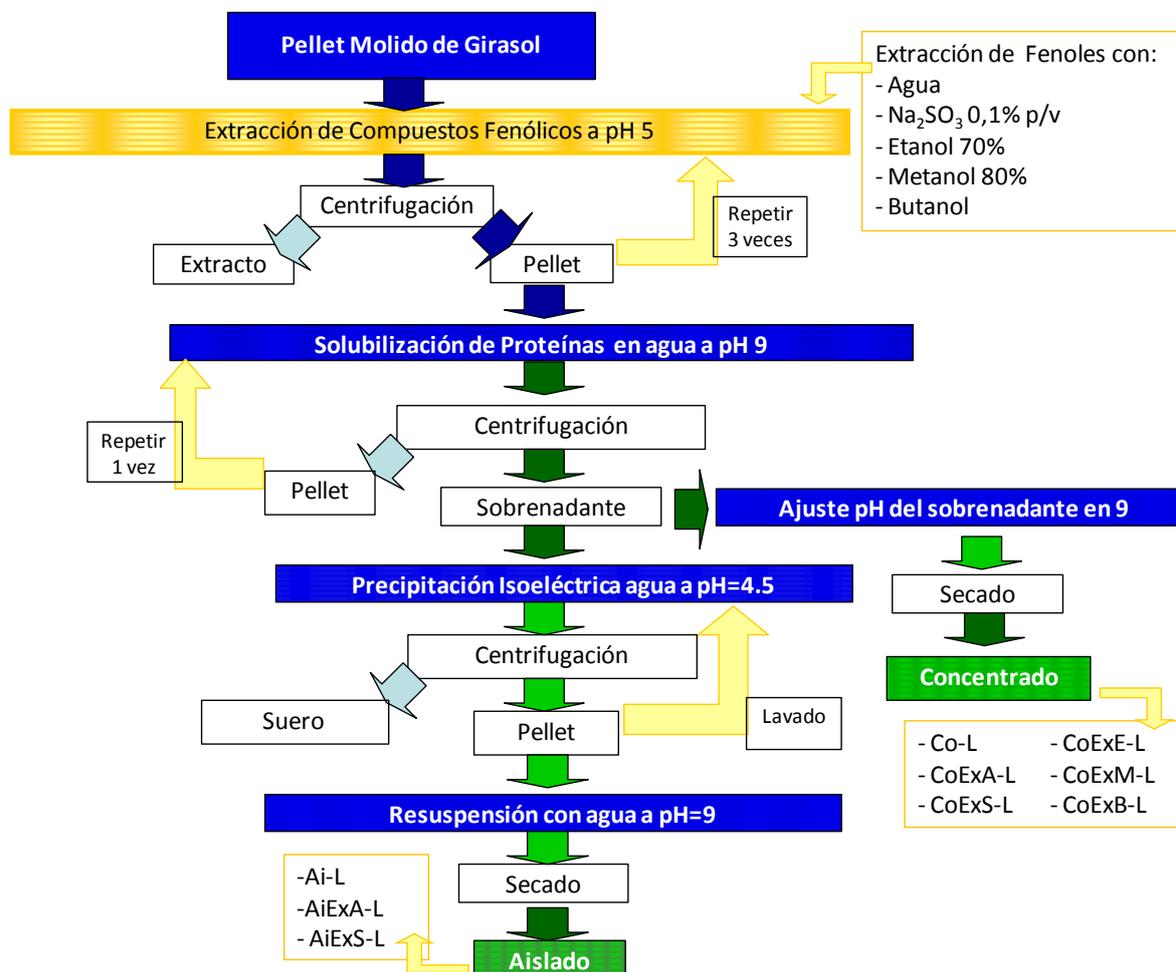


Figura I.3. Esquema empleado para la obtención de concentrados y aislados proteicos de girasol a partir del *pellet* molido, en escala laboratorio.

Para la obtención de productos enriquecidos en proteínas y con menor contenido de fenoles, se ensayaron protocolos similares al descrito anteriormente, en donde se anexaron etapas de lavado a pH 5 (para la remoción de compuestos fenólicos) previo a la solubilización de proteínas en pH alcalino. Se eligió este valor de pH debido a que las proteínas están cerca de su pH isoelectrico, esto disminuye su interacción con los compuestos fenólicos (Saeed y col., 1989) y su pérdida por solubilización en el

extracto, sin disminuir notoriamente la solubilidad del CGA (**Figura I.2.**). Según ensayos preliminares sobre el *pellet*, cuatro extracciones sucesivas con agua eliminaron aproximadamente el 95% de los fenoles presentes, por lo que en todos los casos se realizaron cuatro lavados en el medio extractivo correspondiente.

En este estudio, la remoción de los compuestos fenólicos la realizamos con distintos sistemas de extracción (todos a pH 5): agua, Na₂SO₃ 0,1% p/v, etanol 70%, metanol 80% y butanol. Los concentrados proteicos obtenidos mediante el empleo de estos protocolos se denominaron: **CoExA-L**, **CoExS-L**, **CoExE-L**, **CoExM-L** y **CoExB-L**, respectivamente (**Figura I.3.**). La elección de los sistemas extractivos alcohol-agua se basa en que la solubilidad del CGA en éstos es mayor que en agua (Sabir y col., 1974), pero restaría asegurar su completa remoción del producto final. Por otra parte, se propuso emplear sulfito de sodio como agente antioxidante, en concentraciones menores a las permitidas por la legislación alimentaria (< 500 ppm, CAA, <http://www.anmat.gov.ar>), para evitar la oxidación de los compuestos fenólicos y su interacción con las proteínas. También se evaluó la reducción de fenoles empleando sólo agua a pH 5, teniendo en cuenta su menor costo operativo.

Para la obtención de los aislados proteicos de girasol se realizó un protocolo básico (solubilización-precipitación isoelectrica), se siguió la metodología descripta para la elaboración de concentrados, pero los sobrenadantes resultantes de las extracciones de proteínas se sometieron a precipitación isoelectrica (a pH=4,5). Se eligió este valor de pH para realizar la precipitación por ser el que permitió mayor rendimiento proteico en ensayos preliminares. Posteriormente, el precipitado fue separado por centrifugación, lavado, resuspendido a pH=9 y liofilizado (**Figura I.3.**). De esta manera se obtuvo el aislado proteico de girasol **Ai-L**. Realizando las extracciones de compuestos fenólicos con agua o Na₂SO₃ 0,1% p/v se obtuvieron los aislados **AiExA-L** y **AiExS-L**, respectivamente.

I.3.3.- Caracterización de los concentrados y aislados proteicos obtenidos

Composición química: En la **Tabla I.3.** se muestran los resultados del análisis de composición química de los productos proteicos de girasol en estudio. Al analizar los concentrados proteicos de girasol, se puede observar que el **Co-L**, que es el producto con menor cantidad de etapas de concentración, fue el que presentó el menor contenido de proteínas y el mayor porcentaje de compuestos fenólicos. Este producto también presentó elevados contenidos de sales y de otros componentes, principalmente hidratos de carbono.

Tabla I.3.: Composición química de concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en laboratorio.

	Composición química (%)				
	Proteínas *	Fenoles *	Cenizas *	Otros *	Humedad
Co-L	46,64 ± 0,42 ^a	5,98 ± 0,22 ^d	9,09 ± 0,37 ^d	38,3	6,82 ± 0,01 ^c
CoExA-L	75,50 ± 0,81 ^f	1,99 ± 0,15 ^c	4,97 ± 0,35 ^b	17,5	8,12 ± 0,13 ^d
CoExS-L	71,43 ± 0,56 ^d	1,42 ± 0,04 ^a	6,36 ± 0,16 ^c	20,8	5,40 ± 0,29 ^b
CoExE-L	63,18 ± 0,01 ^c	1,40 ± 0,09 ^a	9,99 ± 0,94 ^d	25,4	9,37 ± 0,66 ^e
CoExM-L	59,80 ± 0,01 ^b	1,46 ± 0,07 ^{a,b}	12,54 ± 0,52 ^e	26,2	10,92 ± 0,80 ^f
CoExB-L	59,25 ± 0,12 ^b	1,47 ± 0,05 ^{a,b}	12,16 ± 0,42 ^e	27,1	10,03 ± 0,71 ^{e,f}
Ai-L	72,40 ± 0,46 ^e	1,69 ± 0,05 ^b	3,53 ± 0,08 ^a	22,4	3,32 ± 0,98 ^a
AiExA-L	78,83 ± 0,18 ^h	1,61 ± 0,06 ^{a,b}	2,69 ± 0,02 ^a	16,9	2,99 ± 0,10 ^a
AiExS-L	76,52 ± 0,30 ^g	1,41 ± 0,08 ^a	3,08 ± 0,10 ^a	19,0	2,76 ± 0,01 ^a

*Valores expresados en porcentaje en base seca. Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Al adicionar las etapas de extracciones sucesivas para eliminar compuestos fenólicos, se produjo un aumento en el contenido de proteínas de los concentrados, siendo este más significativo en los productos que se obtuvieron mediante los lavados con agua (**CoExA-L**) o con Na_2SO_3 (**CoExS-L**). Estos productos se caracterizaron por presentar

menor contenido de sales que **Co-L**, debido a la solubilización de las mismas en los medios extractivos acuosos. También se puede observar que las etapas de lavado disminuyeron significativamente el contenido de fenoles. Al emplear soluciones acuosas de alcoholes, se logró una mayor reducción de estos compuestos, comparable con el empleo de sulfito de sodio. Sin embargo, estos lavados alcohólicos resultaron menos eficientes en la extracción de otros componentes (que se solubilizan más fácilmente en agua), por ejemplo proteínas, sales e hidratos de carbono. De este modo, los concentrados obtenidos **CoExE-L**, **CoExM-L** y **CoExB-L** presentaron contenidos de proteínas intermedios entre **Co-L** y **CoExA-L** ó **CoExS-L**, y elevados porcentajes de sales. Además, fueron los productos que presentaron mayor contenido de humedad ($\approx 10\%$), posiblemente debido a su elevado porcentaje de otros componentes, mayoritariamente hidratos de carbono, capaces de ligar agua.

Al analizar la composición química de cada uno de los aislados proteicos de girasol estudiados (**Tabla 1.3.**), se puede observar que **Ai-L** presentó el menor porcentaje de proteínas (72% en base seca) y los mayores contenidos de fenoles y otros componentes, (hidratos de carbono). Al adicionar etapas de remoción de fenoles (lavados acuosos) se obtuvieron aislados con mayor contenido proteico (76-78% en base seca) y menores porcentajes de fenoles e hidratos de carbono, sin diferencias estadísticamente significativas en sus contenidos de sales y humedad.

Los aislados proteicos presentaron, como era de esperar, mayores contenidos de proteínas que sus correspondientes concentrados. La mayor diferencia, se dio entre los productos **Co-L** y **Ai-L**, debido a la adición de la etapa de precipitación isoeléctrica. En las otras muestras, las diferencias resultaron menores debido a que los lavados previos realizados para extraer los fenoles estarían produciendo el mismo efecto concentrador que el de la precipitación isoeléctrica. Todos los aislados proteicos presentaron porcentajes de cenizas y humedad menores que los correspondientes a los concentrados. Respecto al contenido de compuestos fenólicos, las diferencias entre los distintos aislados son mínimas, pero significativas al compararlas con los respectivos concentrados, siendo considerable la diferencia entre **Co-L** y **Ai-L**, indicándonos que durante las etapas de precipitación isoeléctrica y lavado del precipitado proteico también se eliminan fenoles.

Rendimientos: En la **Tabla I.4.** se muestran los porcentajes de recuperación de masa y proteínas, y de eliminación de compuestos fenólicos, para cada uno de los procesos estudiados. Allí se puede apreciar que el proceso clásico de obtención de **Co-L** tuvo el mayor rendimiento en masa (de 29,9%), debido a que presentaba el menor número de etapas de procesamiento. En este producto se logró recuperar el 46,1% de las proteínas presentes en el *pellet* y se eliminó el 29,4% de los compuestos fenólicos. Al adicionar etapas de extracción de fenoles, el rendimiento en masa disminuyó significativamente (entre 10,5 y 14,5%). La misma tendencia se observó en el rendimiento en proteínas, posiblemente debido a que parte de éstas se perdieron en dichas etapas de lavado (probablemente durante las extracciones con las soluciones acuosas) o que perdieron solubilidad por agregación y no se extrajeron en medio alcalino (posiblemente en los medios alcohólicos).

Tabla I.4.: Rendimientos en recuperación de masa, proteínas y eliminación de fenoles.

	Rendimientos (%)		
	Masa	Proteínas	Eliminación de Fenoles
Co-L	29,9	46,1 ± 0,6 ^h	29,4 ± 3,9 ^a
CoExA-L	14,3	35,2 ± 0,5 ^f	88,9 ± 1,3 ^b
CoExS-L	14,5	34,8 ± 1,0 ^f	91,8 ± 0,4 ^{b,c,d}
CoExE-L	12,4	25,2 ± 0,1 ^c	93,3 ± 0,7 ^d
CoExM-L	11,7	22,1 ± 0,1 ^b	93,6 ± 0,5 ^d
CoExB-L	10,5	19,9 ± 0,1 ^a	94,1 ± 0,3 ^d
Ai-L	14,7	36,5 ± 0,3 ^g	89,8 ± 1,0 ^{b,c}
AiExA-L	10,7	29,1 ± 0,1 ^d	92,9 ± 0,8 ^{c,d}
AiExS-L	12,3	32,4 ± 0,2 ^e	92,9 ± 1,1 ^{c,d}

Se consideró el 100% la cantidad de materia, proteínas o fenoles presentes en el *pellet* molido de girasol. Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$. Todos los errores en rendimiento en masa fueron menores al 3%.

Paralelamente, los porcentajes de eliminación de compuestos fenólicos aumentaron al incluir las etapas de lavado (del 29% al 89-94%). En la **Figura I.4.A.** se muestra la cuantificación de fenoles en los extractos mediante espectroscopía UV. Se puede apreciar que la mayoría de estos compuestos se extrajeron en el primer lavado (entre 60 y 85%), siendo considerablemente menor la cantidad removida en la segunda extracción (entre 10 y 15%). En estas dos extracciones, se logró eliminar entre el 89-94% del total de fenoles totales, no siendo necesarios los dos lavados posteriores, en donde sólo fueron efectivas las extracciones en medio alcohólicos, removiendo menos del 5%. De los medios extractivos analizados, sólo el que posee butanol resultó efectivo hasta la cuarta extracción de fenoles. Las extracciones utilizando soluciones acuosas de alcoholes (etanol, metanol y butanol) resultaron ser las más efectivas en lo que respecta a la eliminación de fenoles, logrando mayores porcentajes de reducción (93-94%). Este hecho se explica debido a que el CGA es entre 10 y 25 veces más soluble en medios alcohólicos que en agua (Sabir y col., 1974). Sin embargo, en ninguno de los casos estudiados se logró la remoción total de los compuestos fenólicos, posiblemente debido a que una fracción de los mismos se encuentra interaccionando fuertemente con las proteínas. En la **Figura I.4.B.** se muestran, a modo de ejemplo, los cromatogramas RP-HPLC de **Ai-L**, detectados a 324 nm (longitud de onda utilizada para detectar fenoles, ver **Anexo I**) y a 280 nm (longitud de onda característica para detectar proteínas). En el cromatograma correspondiente a 324 nm se puede observar la presencia de CGA y CA que eluyen a 15,1 y 18,3 minutos respectivamente, dos picos de menor intensidad entre 4 y 8 minutos (marcados como "1"), atribuibles a compuestos fenólicos minoritarios o isómeros de posición del CGA (Fujioka y col., 2008), y otros dos picos que eluyen a mayores tiempos de retención (entre 27-32 minutos, marcados como "2"). Estos últimos corresponderían a compuestos fenólicos que eluyen "libres" con mayor tamaño molecular o hidrofobicidad, o a fenoles que estarían interaccionando con péptidos y/o proteínas, las cuales eluyen entre 27 y 40 minutos, evidenciándose por las altas absorbancias que presenta dicha fracción en los cromatogramas detectados a 280 nm (mayores que las absorbancias a 324 nm).

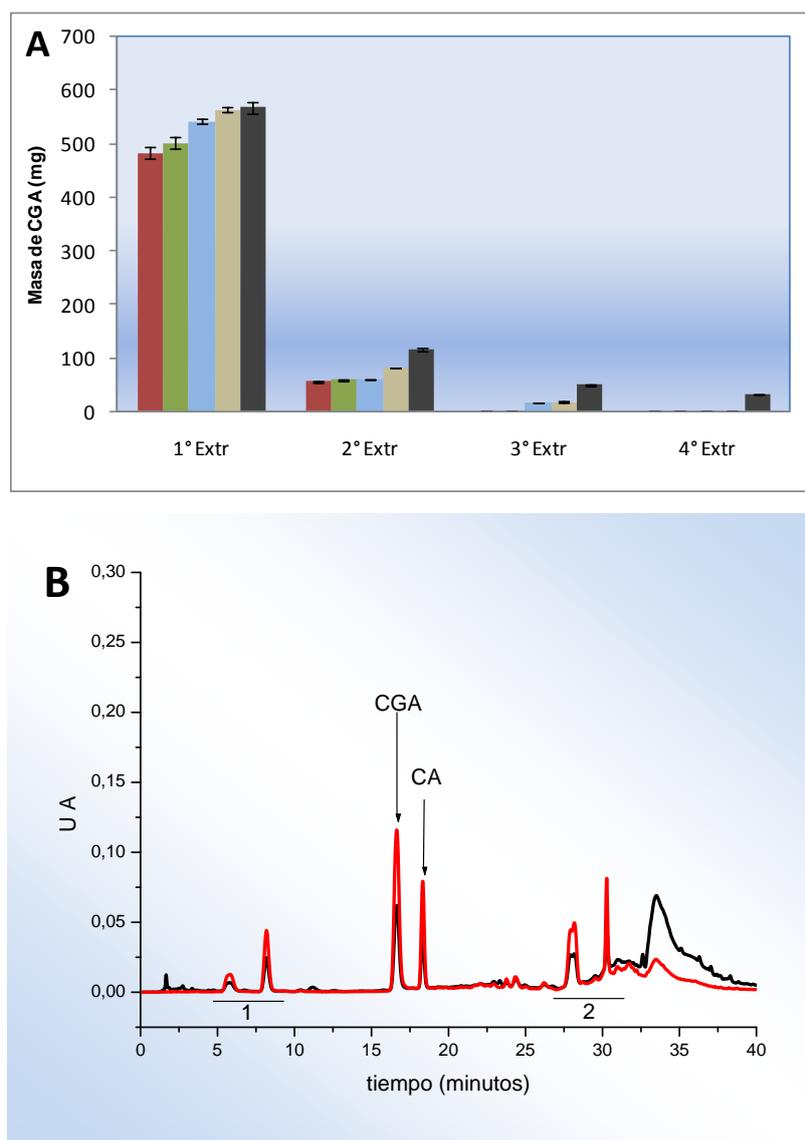


Figura I.3.: A) Cuantificación de CGA (por espectroscopía UV) en las extracciones con distintos medios -agua (■), sulfito de sodio (■), etanol (■), metanol (■), butanol (■)- durante la obtención de concentrados proteicos de girasol. **B)** Cromatograma RP-HPLC del Ai-L registrado a 280 nm (—) y 324 nm (—).

Todos los protocolos de obtención de aislados que se ensayaron tuvieron rendimientos en masa y en proteínas menores que los de los concentrados correspondientes, debido a la adición de etapas de procesamiento (precipitación isoeléctrica y lavado del precipitado) (**Tabla I.4.**). Además, es necesario remarcar que la eliminación de compuestos fenólicos fue más eficiente en los procesos de obtención de aislados

proteicos (entre 90 y 93%), debido a la precipitación isoeléctrica, eliminándose parte de estos compuestos en el suero. Sin embargo, este efecto es más notorio al comparar la eliminación obtenida en **Co-L** y **Ai-L**, 30% y 90%, respectivamente.

Los rendimientos (en masa y en proteínas) informados para la producción de los distintos aislados proteicos de girasol son similares a los informados por Petruccelli (1994) y Martínez (1997) en la obtención, a escala laboratorio, de aislados proteicos de soja y amaranto respectivamente.

Color: Una particularidad de estas muestras es que presentaron diferente coloración. En la **Figura I.5.** se muestra una fotografía del *pellet* molido de girasol y de los productos proteicos en estudio, y en la **Tabla 1.5.** los parámetros de color de Hunter-Lab correspondientes a los concentrados y aislados. En la **Figura I.5.** se puede observar que el *pellet* presentó coloración heterogénea, marrón oscuro con manchas negras, debido a la presencia de restos de cáscara. Los concentrados y aislados, mostraron diferencias en su coloración, dependiendo del procesamiento empleado para su producción. Las muestras **Co-L** y **Ai-L** presentaron color verde (valores negativos de a , **Tabla 1.5.**), debido a que durante la extracción de proteínas en medio alcalino se produce la oxidación de los compuestos fenólicos a o-quinonas, las cuales pueden condensar o reaccionar con los grupos catiónicos de las proteínas (Sosulski, 1978).

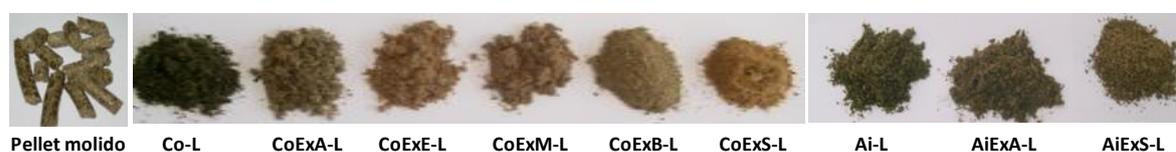


Figura I.5.: Fotografía del *pellet* molido de girasol y de los distintos productos proteicos obtenidos en escala de laboratorio.

Tabla I.5.: Parámetros de color Hunter-Lab de concentrados y aislados proteicos de girasol.

		Parámetros de Color Hunter-Lab			
		<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE
Productos Proteicos	Co-L	45,51 ± 0,46 ^b	-4,60 ± 0,07 ^a	7,42 ± 0,17 ^b	52,32 ± 0,44 ^d
	CoExA-L	49,02 ± 0,55 ^d	1,72 ± 0,06 ^c	10,85 ± 0,16 ^d	49,17 ± 0,54 ^b
	CoExS-L	53,82 ± 0,38 ^e	4,44 ± 0,06 ^f	16,22 ± 0,26 ^f	46,03 ± 0,40 ^a
	Ai-L	43,05 ± 0,19 ^a	-3,60 ± 0,08 ^b	4,33 ± 0,14 ^a	54,44 ± 0,18 ^e
	AiExA-L	46,38 ± 0,52 ^c	1,84 ± 0,03 ^d	9,37 ± 0,32 ^c	51,52 ± 0,47 ^c
	AiExS-L	49,44 ± 0,25 ^d	4,00 ± 0,04 ^e	11,76 ± 0,24 ^e	49,06 ± 0,20 ^b

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distinto superíndice son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Los productos proteicos a los que se les extrajeron los compuestos fenólicos con agua o sulfito de sodio presentaron una tonalidad más clara (mayores *L*) y su coloración varió de marrón-verde a marrón-amarillo, evidenciándose en mayores valores de los parámetros *a* y *b* (Tabla I.5.). **CoExS-L** y **AiExS-L** presentaron mayores valores de *L*, *a* y *b*, o sea menor coloración (ΔE), que **CoExA-L** y **AiExA-L** respectivamente. Estos resultados nos indican que el color se desarrolla durante la extracción alcalina de las proteínas, y que si bien se debe a la presencia de fenoles, el mismo no puede correlacionarse directamente con el contenido de fenoles en el producto final. Los productos proteicos con menor coloración son los que se obtuvieron realizando las extracciones de fenoles con soluciones acuosas de alcohol, debido a que con estos medios se logra una remoción más efectiva de estos compuestos, previo a la extracción de proteínas. Los **CoExS-L** y **AiExS-L** también presentaron menor coloración (ΔE), posiblemente debido a la protección que ofrece el sulfito de sodio, actuando como antioxidante. Obtener un producto con menor coloración podría resultar beneficioso para su empleo como ingrediente funcional, ya que este atributo podría condicionar su aceptación por parte del consumidor.

I.3.4.- Propiedades Físicoquímicas de Concentrados Proteicos de Girasol

Muchas de las aplicaciones de productos proteicos como ingredientes funcionales requieren que los mismos presente una alta solubilidad en agua, por este motivo se procedió a su determinación.

En la **Figura I.6.A.** es posible observar que los productos proteicos en estudio se pueden dividir en dos grupos con distintas propiedades y características, por un lado los concentrados acuosos (**Co-L**, **CoExA-L** y **CoExS-L**), y por otro los alcohólicos (**CoExE-L**, **CoExM-L** y **CoExB-L**). Los primeros presentaron elevados porcentajes de solubilidad proteica en agua, variando entre 77 y 97%, observándose un incremento de la misma cuando se disminuye el contenido de compuestos fenólicos. La misma tendencia siguieron los valores de H_o , mostrados en la **Figura I.6.B.** Aunque la diferencia en el contenido de fenoles entre **CoExS-L** (1,4%) y **CoExA-L** (1,9%) es pequeña, este último tiene una H_o mucho menor que el primero. La alta H_o de **CoExS-L** podría ser atribuida a la reducción de enlaces disulfuro de la muestra que permitirían la disociación de agregados. En cambio las muestras que no tienen un tratamiento reductor tienen una H_o muy baja que podría atribuirse a oxidaciones causadas por oxígeno del aire tanto en cisteínas libres como en los compuestos fenólicos presentes. Estas oxidaciones serían causantes de agregación con la consecuente reducción de la solubilidad y H_o .

Los termogramas correspondientes a estos tres concentrados acuosos presentaron una única endoterma, con temperatura de desnaturalización de 99°C. En la **Figura I.7.A.** se muestra, a modo de ejemplo, el termograma correspondiente a **CoExA-L**. Los valores de entalpía de desnaturalización encontrados nos confirman que las proteínas están parcialmente desnaturalizadas; siendo notorio el efecto sobre **Co-L** (**Figura I.7.B.**). Esta muestra es la que posee mayor contenido de fenoles, posiblemente estos compuestos estarían interaccionando con las proteínas, y al ser removidos mediante las extracciones acuosas, permitirían interacciones que estabilizarían a estas macromoléculas, incrementando así su entalpía de desnaturalización.

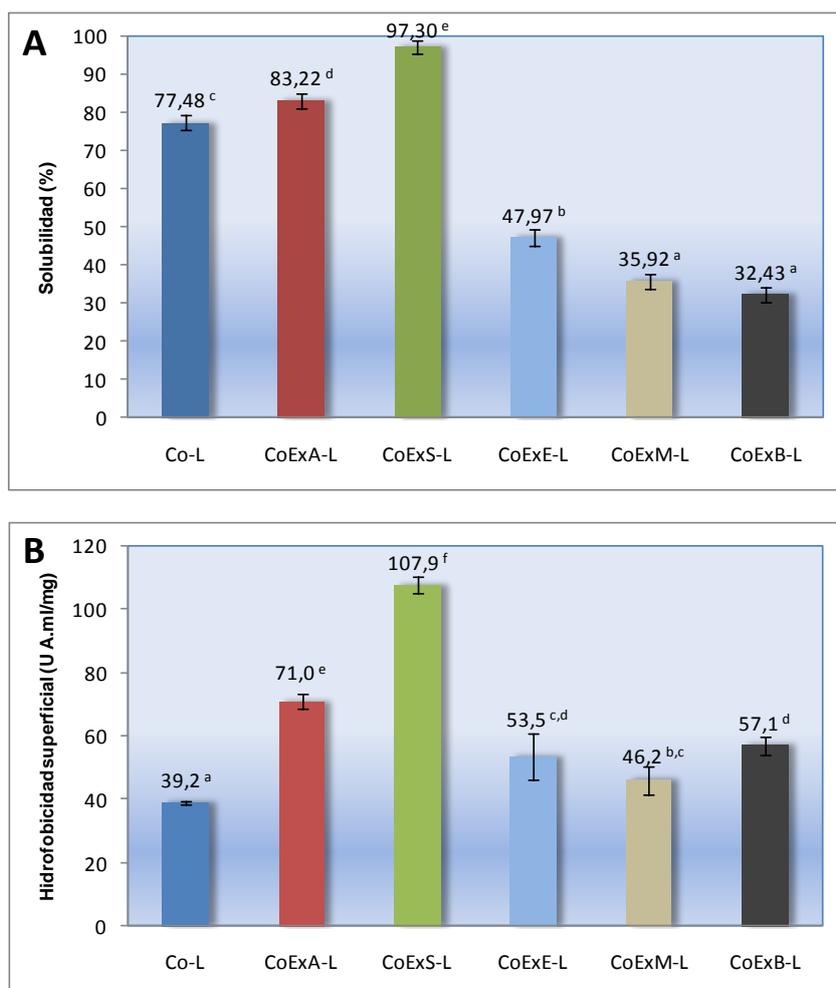


Figura I.6.: A) Solubilidad en agua y **B)** Hidrofobicidad superficial de las proteínas de girasol presentes en los concentrados. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Por otra parte, los concentrados alcohólicos presentaron solubilidades menores a 50% (entre 32 y 48%), siendo **CoExE-L** el más soluble (**Figura I.6.A.**), e hidrofobicidades superficiales intermedias a las de los concentrados acuosos e independientes del alcohol empleado (**Figura I.6.B.**). Sus termogramas se caracterizaron por presentar una única endoterma con elevadas temperaturas ($\approx 110^\circ\text{C}$) y entalpías de desnaturalización, siendo ambos parámetros superiores a los encontrados para las proteínas de los concentrados sometidos a extracciones acuosas y para las presentes en el *pellet* (**Figuras I.7.A. y I.7.B.**). Estos resultados nos indicarían que las proteínas extraídas mediante estas metodologías se encuentran agregadas, posiblemente por

interacciones hidrofóbicas, aumentando así su estabilidad térmica. También podría atribuirse al elevado contenido de sales que presentan estas muestras. En bibliografía es posible encontrar que, a pH 7,5 y I=0,54M, la heliantinina 11S de girasol presenta su máxima estabilidad térmica (de 20 a 25 J/g proteína), mostrando una endoterma a 105°C (Molina y col., 2004).

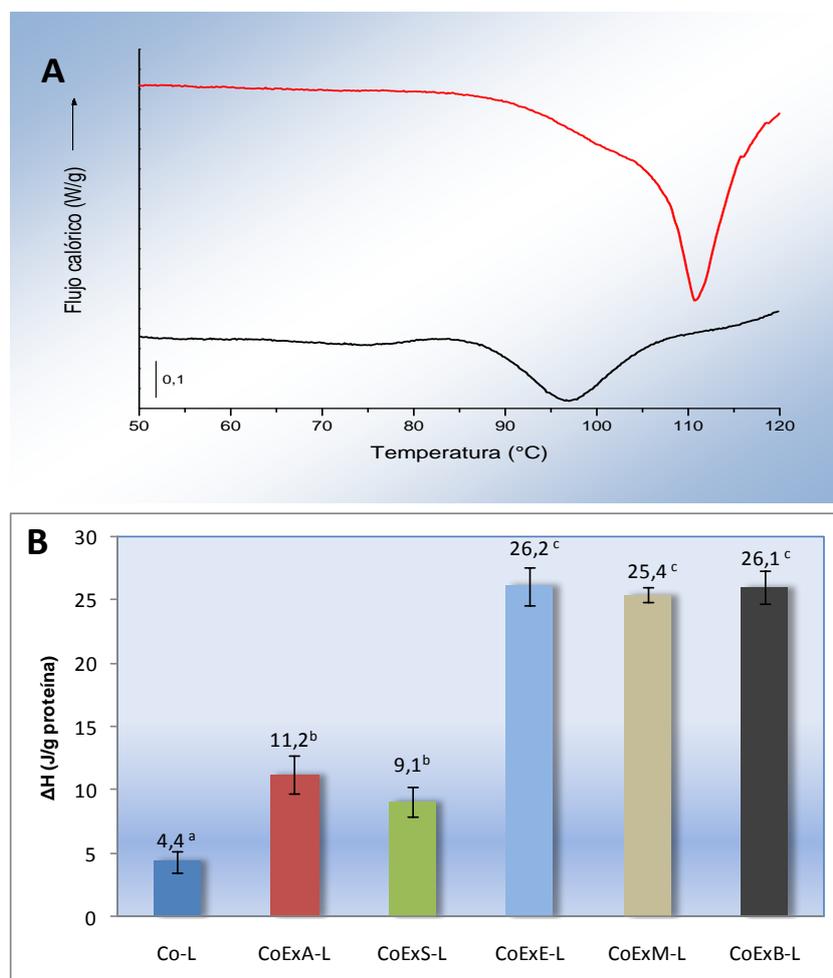


Figura I.7.: A) Termogramas obtenidos por DSC de CoExA-L (—) y CoExE-L (—) y B) Entalpías de desnaturalización de las proteínas de girasol presentes en los concentrados. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

En la **Figura I.8.A.** se muestran los perfiles SDS-PAGE en condiciones no reductoras de las muestras en estudio. Allí se observa que todos los concentrados contienen mayoritariamente a las globulinas 11S de girasol, cuyas subunidades α - β poseen masa

molecular entre 55 y 65 kDa. También se aprecia, en todas las muestras, agregados solubles de alto peso molecular que no alcanzaron a entrar al gel (marcados con una flecha), siendo estas bandas más intensas para los concentrados alcohólicos. En las calles correspondientes a los productos alcohólicos y a **CoEXS-L**, se destaca la presencia de bandas de pesos moleculares entre 30-40 kDa y 20-30 kDa, correspondientes a las subunidades ácidas (α) y básicas (β) respectivamente. Estos resultados, confirman las suposiciones hechas anteriormente al analizar Ho y solubilidad. Además, los concentrados alcohólicos muestran bandas de peso molecular entre 14 y 18 kDa, correspondiente a la fracción albúminas (2S), presentes en **Co-L**, pero ausentes en **CoExA-L** y **CoExS-L** debido a que las mismas fueron extraídas durante los extracciones acuosas de compuestos fenólicos. En los perfiles SDS-PAGE en condiciones reductoras, mostrados en la **Figura I.8.B.**, todos los concentrados presentaron las bandas características de las subunidades α y β , además de agregados solubles de alto peso molecular (que no se lograron separar con el gel) en menor concentración que en condiciones no reductoras.

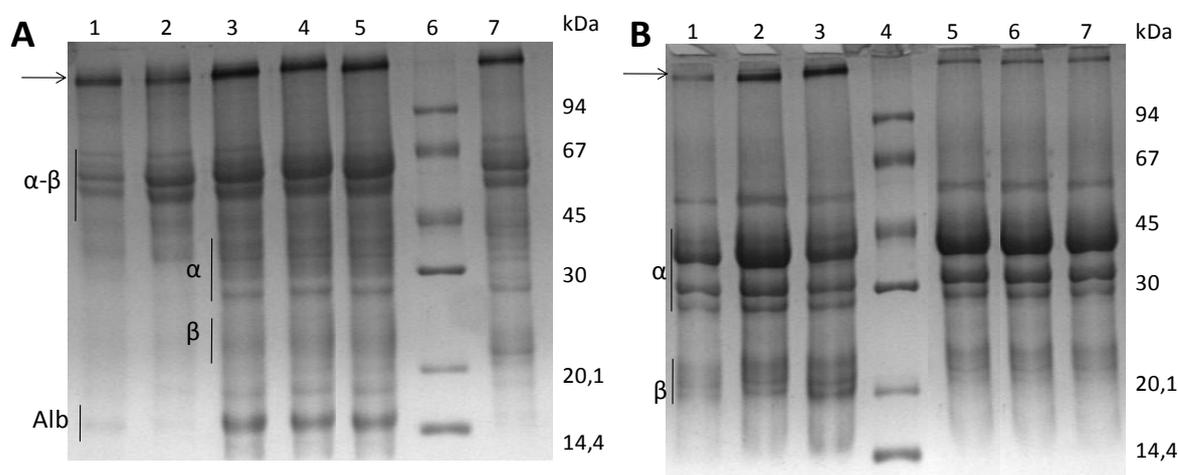


Figura I.7.: A) Electroforesis SDS-PAGE. Calles: 1: **Co-L**, 2: **CoExA-L**, 3: **CoExE-L**, 4: **CoExM-L**, 5: **CoExB-L**, 6: LMW, 7: **CoExS-L**. **B)** Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras. Calles: 1: **Co-L**, 2: **CoExB-L**, 3: **CoExM-L**, 4: LMW, 5: **CoExE-L**, 6: **CoExA-L**, 7: **CoExS-L**.

Con estos resultados, se puede concluir que el empleo de mezclas acuosas de alcoholes con el objetivo de eliminar fenoles, produce concentrados proteicos de girasol de menor coloración -debido a la eficiente remoción de estos compuestos previo a la solubilización de las proteínas en medio alcalino-, menor solubilidad en agua e hidrofobicidad superficial. Mientras que, las extracciones con agua o Na_2SO_3 , además de lograr reducir el contenido de fenoles en un 90%, producen concentrados con elevada solubilidad proteica en agua (83-97%) e hidrofobicidad superficial, a pesar que en los mismos las proteínas se encuentran parcialmente desnaturalizadas.

I.3.5.- Propiedades Físicoquímicas de Aislados Proteicos de Girasol

Se continuó el estudio obteniendo aislados proteicos de girasol empleando la metodología tradicional, y para eliminar compuestos fenólicos se utilizaron los medios de extracción acuosos.

La solubilidad en agua de las proteínas presentes en los distintos aislados proteicos se presenta en la **Figura I.9.A**. En ella se observa que todos los productos presentaron elevados porcentajes de solubilidad en agua (84% en promedio), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al procesamiento utilizado para la remoción de fenoles. Estos valores de solubilidad resultaron superiores a los que se presentan en bibliografía para aislados proteicos de girasol a partir de harinas obtenidas en el laboratorio, por molienda de semillas desgrasadas no tratadas térmicamente. Por ejemplo, Rodríguez Patino y col. (2007) obtuvieron aislados de girasol con 30% de solubilidad, mientras que Bau y col. (1983) y Sripad y Rao (1987) informan valores de 50-55% (todas medidas en agua a pH8).

A pesar de no observar diferencias en la solubilidad de las proteínas en agua, al analizar los valores de hidrofobicidad superficial, que se presentan en la **Figura I.9.B.**, se encontró que el **Ai-L** presentó menor H_o que **AiExA-L** y **AiExS-L**. Si bien estos productos tienen concentraciones de fenoles similares, los mismos se extrajeron en distintas etapas. En principio, en los aislados con mayor H_o , los fenoles se eliminaron principalmente en los lavados previos a la extracción proteica, mientras que en el **Ai-L**

la remoción de fenoles se produjo durante la precipitación isoelectrónica. Por lo tanto podría suponerse que las proteínas presentes en los distintos aislados presentaron diferentes estados de agregación que condujeron a distintos valores de H_0 .

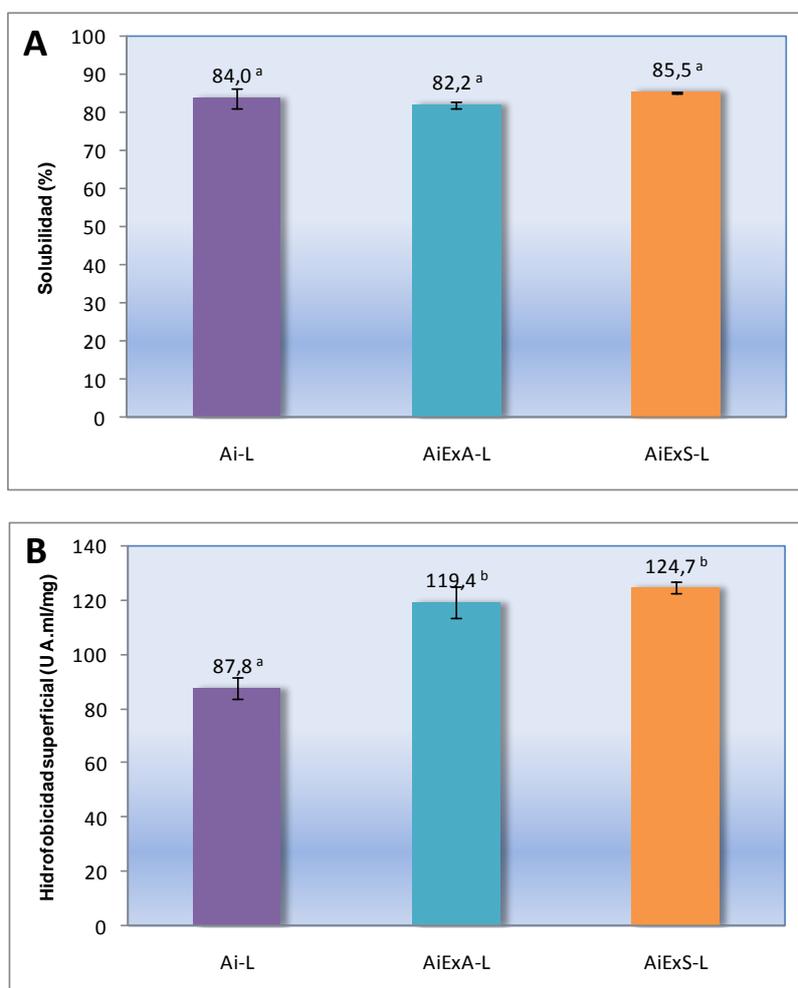


Figura I.8.: A) Solubilidad en agua y **B)** Hidrofobicidad superficial de las proteínas de girasol presentes en los aislados. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Los termogramas de los tres aislados presentaron una única endoterma, con temperatura de desnaturalización de 100°C (no mostrados). En todos los casos, las proteínas se encontraron parcialmente desnaturalizadas. Las entalpías de desnaturalización de los distintos aislados, en promedio 7,2 J/g proteína, se muestran

en la **Figura I.9.A.** Allí se aprecia que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas, siendo el porcentaje de desnaturalización cercano al 50%.

En los perfiles electroforéticos SDS-PAGE en condiciones no reductoras, que se muestran en la **Figura I.9.B.**, se puede observar que todos los aislados contienen a las subunidades α - β de la globulina 11S de girasol, evidenciándose en las bandas de masa molecular entre 55 y 65 kDa. También se aprecian agregados solubles de alto peso molecular que no alcanzaron a entrar al gel (marcados con una flecha), que desaparecen en condiciones reductoras (**Figura I.9.C.**), por lo que estarían unidos por enlaces disulfuro. Por otra parte, no se pueden visualizar las bandas con masas moleculares menores a 20 kDa, que corresponderían a las albúminas (fracción 2S), posiblemente debido a que éstas son altamente solubles en agua y en estos procesos se realizaron varias etapas de concentración en medio acuoso. En la SDS-PAGE en condiciones reductoras (**Figura I.9.C.**) se pueden visualizar bandas de masa molecular entre 30-40 kDa y 20-30 kDa, correspondientes a los polipéptidos ácidos (α) y básicos (β) respectivamente.

Comparando las propiedades fisicoquímicas de los concentrados proteicos con las de los correspondientes aislados, se encontró que éstos presentaron proteínas con mayor hidrofobicidad superficial y grado de desnaturalización que las de los concentrados. Tanto los concentrados como los aislados proteicos de girasol presentaron similar composición polipeptídica -mayoritariamente globulinas-, y elevados valores de solubilidad en agua.

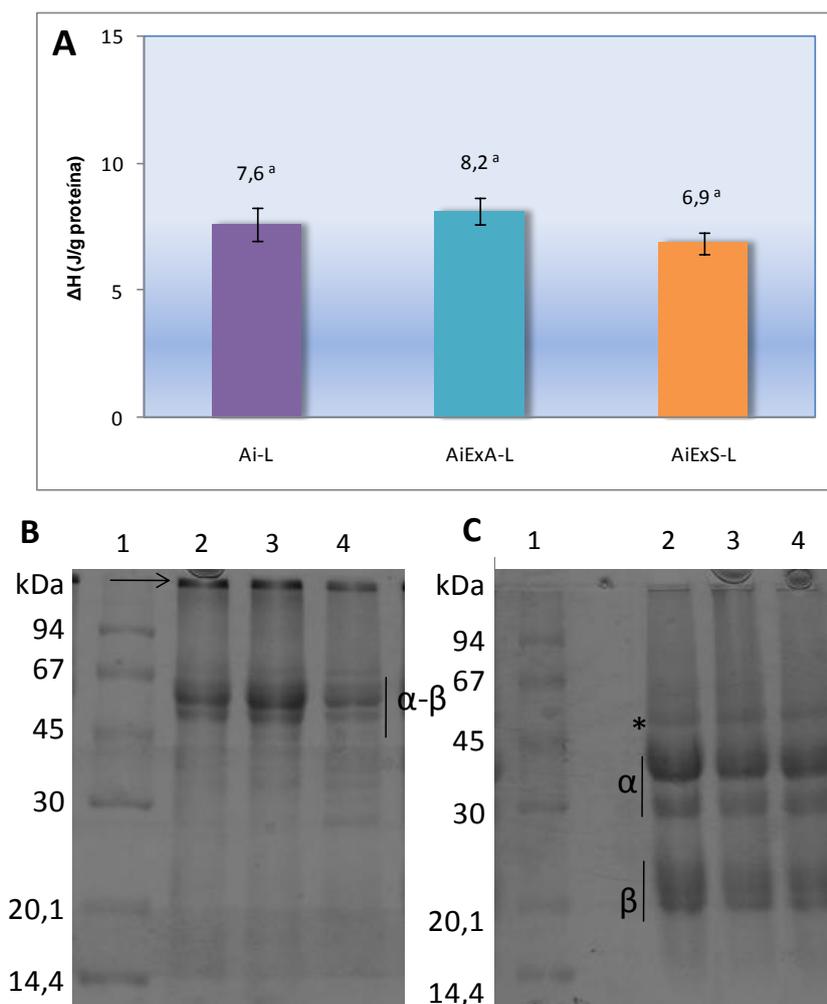


Figura I.9.: **A)** Entalpías de desnaturalización de los aislados proteicos de girasol. **B)** Electroforesis SDS-PAGE. Calles 1: LMW, 2: **AiExS-L**, 3: **AiExA-L**, 4: **Ai-L**. **C)** Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras. Calles 1: LMW, 2: **AiExS-L**, 3: **AiExA-L**, 4: **Ai-L**. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Con estos resultados, se puede concluir que empleando las metodologías propuestas en este trabajo se obtienen aislados proteicos de girasol, a partir del pellet de la industria aceitera, con reducido contenido de compuestos fenólicos, que presentan diferente composición química, coloración e hidrofobicidad superficial. Siendo para destacar sus elevados valores de solubilidad en agua.

I.4.- Conclusiones

Con los resultados expuestos, se puede concluir que:

a.- El *pellet* de girasol, subproducto de la industria aceitera local, posee un elevado contenido de proteínas y carece de factores antinutricionales, resultando apto para ser utilizado en la obtención de productos proteicos para alimentación humana sin necesidad de recurrir al uso de tratamientos térmicos intensos o bien precipitaciones isoeléctricas y lavados para eliminarlos.

b.- Las metodologías desarrolladas permitieron obtener concentrados y aislados proteicos de girasol con diferentes características y propiedades fisicoquímicas. Aquellas con etapas de extracción con mezclas acuosas de alcoholes previo a la extracción proteica en medio alcalino, fueron más eficientes en la remoción de compuestos fenólicos, pero produjeron proteínas con menor solubilidad en agua, baja hidrofobicidad superficial y con una alta temperatura de desnaturalización (que podría deberse al alto contenido salino de estas muestras). Por su parte, las metodologías que involucraron lavados con agua o solución de sulfito de sodio previo a la extracción proteica, también lograron remover casi la totalidad de los fenoles presentes a la vez de recuperar un porcentaje mayor de proteínas -mayoritariamente globulinas-, que si bien se encontraban parcialmente desnaturalizadas presentaron mayores solubilidades en agua.

c.- Tanto el agregado de etapas acuosas previas, así como la precipitación isoeléctrica, conduce a la eliminación casi total de compuestos fenólicos. Existiendo un contenido residual de los mismos que resulta imposible de eliminar, debido a que estarían interaccionando intensamente con las proteínas.

d.- La coloración de los productos proteicos, atribuible a los compuestos fenólicos presentes en la harina, varió según el protocolo de extracción ensayado, dependiendo de la eficiencia en la remoción de los compuestos fenólicos previo a la etapa de solubilización de proteínas en medio alcalino.

e.- Los concentrados acuosos y todos los aislados proteicos de girasol obtenidos, a pesar de poseer proteínas con diferentes H_0 y grados de

desnaturalización, presentaron elevados porcentajes de solubilidad en agua, siendo ésta una característica importante para su empleo como ingredientes funcionales.

Considerando el buen valor nutricional de las proteínas, que las mismas no contienen componentes antinutricionales, y que presentan altas solubilidades en agua, nace el interés en evaluar las propiedades funcionales que estos productos proteicos presentan, pensando en sus posibles aplicaciones como ingredientes funcionales en alimentos.

Capítulo II: Producción de productos proteicos de girasol en planta piloto

Capítulo II: “PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS PROTEICOS DE GIRASOL EN PLANTA PILOTO”

II.1.- Introducción

Al pensar en la posibilidad de emplear estos productos proteicos como ingredientes funcionales aplicables en la industria alimentaria o como materias primas en la formación de materiales biodegradables, surge la necesidad de obtenerlos en una mayor escala. Es sabido que la funcionalidad que exhiben las proteínas depende de sus características estructurales y de sus propiedades fisicoquímicas, y que éstas, a su vez y entre otros factores, están condicionadas por la metodología empleada para su extracción y las condiciones de su almacenamiento (González y col., 1995; Martins y col., 2006).

Las condiciones de obtención de concentrados y aislados proteicos en el laboratorio son diferentes de las que se verifican en un proceso industrial, entre ellas gradientes de temperatura, tratamientos mecánicos, niveles de concentración, condiciones de operación, equipamiento, etc., y por lo tanto las propiedades de los productos proteicos pueden diferir notablemente (González y col., 1995). Wagner y col. (2000) y Añón y col. (2001) encontraron diferencias marcadas al comparar la hidrofobicidad superficial, la solubilidad y la funcionalidad de aislados proteicos de soja obtenidos en laboratorio con las de los aislados proteicos de soja comerciales, atribuyendo estas diferencias a efectos del proceso industrial, por ejemplo secado a altas concentraciones de proteínas o presencia de sales. En bibliografía no se encontraron estudios similares realizados con productos proteicos de girasol. De hecho, existen muy pocos trabajos (publicaciones y patentes) en donde se proponen métodos a escala piloto para obtener productos proteicos de girasol. Particularmente, González y col. (1975) estudiaron el equilibrio práctico de la extracción de proteínas a partir de harinas industriales de girasol, con el objetivo de diseñar equipos extractores continuos. Lawhon y col. (1982) describieron un proceso en el que evitaron la oxidación de los fenoles presentes -controlando pH, presencia de oxígeno y actividad de la enzima polifenoloxidasas-, mediante el cual lograron obtener un aislado proteico

de girasol de color blanco a partir de harina de girasol preparada en el laboratorio. Castor Normandin y col. (1984) llevaron a escala piloto el método para la obtención de aislados proteicos de girasol a partir del *pellet* propuesto por Raymnod y col. (1984). Sin embargo, en estos trabajos no se estudiaron en profundidad las propiedades fisicoquímicas ni funcionales de los productos obtenidos. En consecuencia, la escala piloto es una etapa necesaria para todo intento de desarrollo de productos proteicos con las propiedades deseadas para usos industriales masivos.

Las proteínas también pueden sufrir cambios en sus propiedades en función de las condiciones y los tiempos de almacenamiento. Da Silva Pinto y col. (2005) y Martins y col. (2006) informaron que durante el almacenamiento de aislados proteicos de soja a distintas temperaturas y humedades relativas (25-42°C, 19-74%HR) se produjeron reacciones de agregación por formación de uniones disulfuro o interacciones hidrofóbicas que provocaron una disminución en su solubilidad, condicionando así la potencial aplicación de esos productos como ingredientes funcionales. El efecto del almacenamiento sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales de productos proteicos de girasol aún no ha sido estudiado. El hecho de que los productos proteicos de girasol posean compuestos fenólicos difíciles de eliminar completamente, y que estos sean sensibles a la oxidación, determina la importancia de hacer estudios detallados en estos sistemas.

En este contexto, los objetivos planteados en este capítulo fueron: estudiar el escalado a nivel de planta piloto de las metodologías desarrolladas en el laboratorio que resultaron adecuadas para la obtención de concentrados y aislados proteicos de girasol con propiedades deseadas para uso industrial, y evaluar la estabilidad de los aislados proteicos de girasol durante su almacenamiento.

II.2.- Materiales y Métodos

II.2.1.- Materiales

Como materia prima se empleó el *pellet* molido de girasol descrito en el **Capítulo I** (sección **I.2.1.**).

II.2.2.- Procesos de obtención de productos proteicos de girasol en planta piloto

Se obtuvieron concentrados y aislados proteicos de girasol en las instalaciones de la Planta Piloto del Instituto de Tecnología en Alimentos, ITA-UNL, Santa Fe, Argentina.

Las condiciones operativas para la producción en planta piloto de concentrados y aislados proteicos de girasol se fijaron basándonos en los resultados obtenidos en escala de laboratorio y considerando al equipamiento disponible. Un esquema de los procesos de obtención de productos proteicos de girasol a partir del *pellet* se muestra en la **Figura II.1.**

Extracción de compuestos fenólicos: El *pellet* molido de girasol se puso en contacto con agua o Na_2SO_3 0,1% p/v; en relación sólido/líquido inicial 1:15 p/v. Se ajustó el pH en 5 con HCl 3N. Se mantuvo en agitación durante 1 hora (con agitador tipo ancla a 60 rpm), reajustando el valor de pH en caso necesario. La separación sólido/líquido se realizó a con una centrífuga con tela filtrante a 2800 rpm a temperatura ambiente. De este modo, se obtuvieron un extracto fenólico I (**EF1**) y un residuo I (**R1**). Para lograr mayor rendimiento de extracción, **R1** fue extraído por segunda vez en iguales condiciones, obteniéndose un extracto fenólico II (**EF2**) y un residuo II (**R2**).

Obtención de concentrados proteicos de girasol: el *pellet* molido de girasol o **R2** -si correspondía la extracción de fenoles previa- se dispersó en agua, en una relación sólido/líquido inicial 1:10 p/v. Se ajustó el pH a 9 con NaOH 3N y se mantuvo en agitación constante durante 1 hora -con agitador tipo ancla a 60 rpm- verificando el valor de pH cada 10 minutos y reajustando en caso necesario. La separación sólido/líquido se realizó con una centrífuga con tela filtrante a 2800 rpm a temperatura

ambiente. De este modo, se obtuvieron un extracto proteico I (**EP1**) y un residuo I (**RP1**). Para lograr mayor rendimiento de extracción, **RP1** fue extraído por segunda vez en iguales condiciones, obteniéndose un extracto proteico II (**EP2**) y un residuo II (**RP2**). La mezcla de **EP1** y **EP2** se deshidrató en un secador spray Niro Atomizer Production Minor, con temperatura de entrada de 170-190°C y temperatura de salida de 80-90°C.

De esta forma se obtuvieron tres concentrados proteicos de girasol: **Co-P** -al que no se le realizó ninguna etapa de extracción de fenoles-, y **CoExA-P** y **CoExS-P**, a los que se les disminuyó el contenido de fenoles con dos lavados sucesivos con agua ó Na₂SO₃ 0,1% p/v respectivamente.

Obtención de aislados proteicos de girasol: Para obtener los aislados proteicos de girasol, los correspondientes extractos proteicos **EP1** y **EP2** se mezclaron y se sometieron a una precipitación isoeléctrica a pH 4,5 con HCl 3N en agitación continua durante 30 minutos con un agitador tipo ancla a 60 rpm. La separación del precipitado I (**PP1**) y del suero I (**S1**) se realizó con una centrífuga de platos autodeslodante Westfalia SADDH205. El **PP1** se lavó con agua a pH 4,5 durante media hora, y posteriormente se centrifugó, obteniéndose el precipitado II (**PP2**) y el suero II (**S2**). El **PP2** se resuspendió en agua (relación sólido/líquido 1:5 p/v) y se pasó por un homogeneizador Manton Gaulin de dos etapas (200 y 50 kg/cm²), ajustando el pH en 9 con NaOH 3N. La dispersión resultante **PR** se deshidrató en un secador spray Niro Atomizer Production Minor, con temperatura de entrada de 170-190°C y temperatura de salida de 80-90°C.

De esta forma se obtuvieron tres aislados proteicos de girasol: **Ai-P** -al que no se le realizó ninguna etapa de extracción de fenoles-, y **AiExA-P** y **AiExS-P**, a los que se les disminuyó el contenido de fenoles con dos lavados sucesivos con agua ó Na₂SO₃ 0,1% p/v respectivamente.

Los rendimientos de los procesos se calcularon según se detalló en el **Capítulo I (I.2.2.)**.

II.2.3.- Caracterización de concentrados y aislados proteicos de girasol

Se determinó la composición química (humedad, proteínas, cenizas y fenoles), color, solubilidad en agua, hidrofobicidad superficial, temperatura y calor de desnaturalización por calorimetría diferencial de barrido, y composición polipeptídica por SDS-PAGE de los concentrados y aislados proteicos obtenidos en planta piloto mediante la metodología descrita en el **Capítulo I**.

II.2.4.- Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los aislados proteicos de girasol, obtenidos en el laboratorio y en la planta piloto, se dispersaron sobre una cinta adhesiva doble faz, se metalizaron con oro en un Sputter coater (Pelco 91000) y se observaron con un microscopio electrónico de barrido EVO40 (LEO, Cambridge, Inglaterra) a un potencial de 7 kV.

II.2.5.- Almacenamiento de los aislados proteicos obtenidos

Los aislados proteicos de girasol obtenidos, **Ai-P**, **AiExA-P** y **AiExS-P**, se colocaron en bolsas de polietileno de baja densidad y se almacenaron por 6 meses bajo dos condiciones de temperatura y humedad controladas: a 4°C y 64,3 %HR y a 20°C y 58,9 %HR (humedad relativa obtenida con solución saturada de NaBr (Anedra, Argentina)). La estabilidad de los respectivos aislados se evaluó determinando solubilidad en agua, hidrofobicidad superficial, grado de desnaturalización, composición polipeptídica y color, a diferentes tiempos de almacenamiento: 0, 30, 60, 90, 120 y 180 días.

II.2.6.- 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 Statgraphics plus, versión 5.1 (Statgraphics, USA).

II.3.- Resultados y Discusión

II.3.1.- Escalado de las metodologías para la obtención de productos proteicos de girasol

De acuerdo a los resultados obtenidos en el laboratorio y al equipamiento disponible en la planta piloto, se efectuó el escalado de las metodologías desarrolladas para la producción de concentrados y aislados proteicos a partir del *pellet* residual de girasol. Cabe recordar que en el capítulo anterior se mostró que el empleo de soluciones acuosas de alcoholes (etanol, metanol o butanol) en las etapas iniciales del proceso, con el fin de eliminar fenoles, produjo concentrados proteicos con menor contenido de estos compuestos, pero también con menores rendimientos en proteínas y solubilidad en agua que los concentrados acuosos, por lo que esas metodologías no fueron escaladas.

El procedimiento clásico de producción de concentrados y aislados proteicos (extracción de proteínas en medio alcalino, precipitación isoeléctrica, secado) se aplicó en escala de planta piloto al *pellet* molido de girasol, permitiéndonos obtener **Co-P** y **Ai-P** (Figura II.1.). Como era de esperar, el equipamiento de planta piloto fue diferente del empleado en el laboratorio. Se utilizaron centrífugas de tela filtrante y autodeslodante para la separación de los extractos proteicos y del precipitado proteico respectivamente, en lugar de las centrífugas de botellas empleadas en el laboratorio. La resuspensión del precipitado isoeléctrico se llevó a cabo en un molino coloidal y, finalmente, el secado se realizó en un secador spray a diferencia del liofilizador utilizado en el laboratorio.

Por otra parte, para la obtención de productos proteicos con menor contenido de fenoles se redujo a dos el número de lavados con agua o Na_2SO_3 0,1% p/v previos a la extracción de proteínas en medio alcalino (**CoExA-P**, **AiExA-P**, **CoExS-P** y **AiExS-P**) (Figura II.1.). Esta modificación se realizó debido a que cuando se emplearon estos sistemas extractivos en el laboratorio, sólo los dos primeros lavados fueron eficientes en la remoción de fenoles (89% a 94%), según lo discutido en el **Capítulo I** (Figura

I.3.A.). De este modo se logró, disminuir considerablemente el tiempo de procesamiento y los volúmenes de desechos acuosos (extractos de compuestos fenólicos).

Estas condiciones de obtención son semejantes a las de un proceso industrial, y posiblemente las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los productos proteicos así obtenidos difieran de las encontradas para los producidos en escala de laboratorio. Por lo tanto, resulta importante conocer cómo se modifican dichas propiedades en función de la escala de procesamiento.

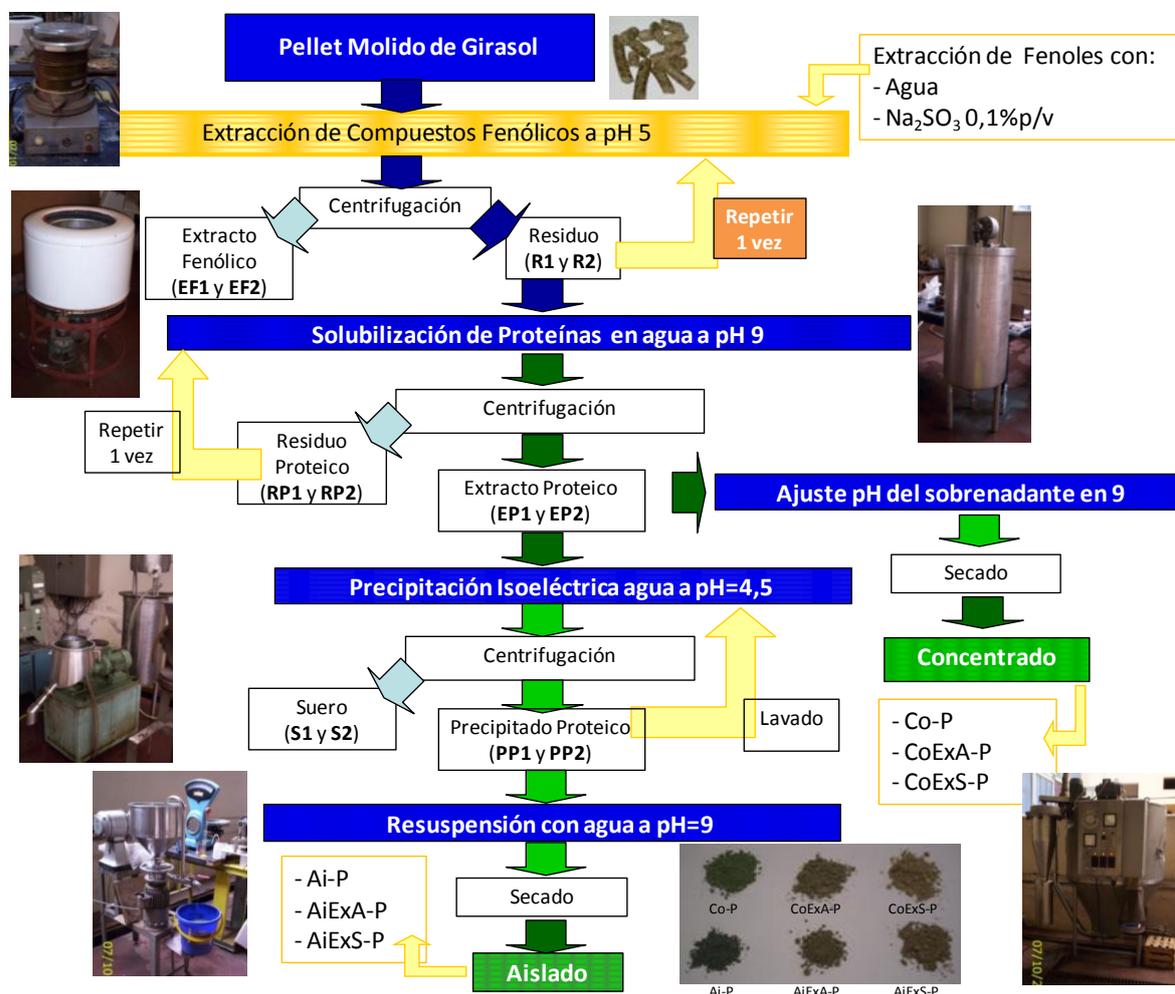


Figura II.1.: Esquema empleado para la obtención en planta piloto de concentrados y aislados proteicos de girasol a partir del *pellet* molido.

II.3.2.- Caracterización de Concentrados y Aislados Proteicos de Girasol

Composición química y rendimientos: La composición química de cada uno de los productos proteicos obtenidos se presenta en la **Tabla II.1.**, mientras que los rendimientos de los procesos de producción se muestran en la **Tabla II.2.** En la **Tabla II.1.** se puede observar que **Co-P** fue el producto que presentó el menor contenido proteico (41,4 %) y las mayores cantidades de sales, hidratos de carbono y compuestos fenólicos; y también el que presentó los mayores rendimientos del proceso expresados tanto como masa de producto obtenido o como proteína, referidos a los valores iniciales en el *pellet* (**Tabla II.2.**). Estos resultados pueden atribuirse a la menor cantidad de etapas de concentración proteica durante su obtención. Por el contrario, los otros productos, que fueron sometidos a un número superior de etapas de concentración -lavados para eliminar fenoles y/o precipitación isoeléctrica- mostraron mayores contenidos de proteínas, entre 62% y 70%. Esta misma razón justifica los menores valores de cenizas que presentaron los aislados respecto a los de los correspondientes concentrados, así como también sus menores rendimientos en masa y proteínas (**Tabla II.2.**).

Tabla II.1.: Composición química de concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto.

		Composición química (%)				
		Proteínas*	Fenoles*	Cenizas*	Otros*	Humedad
Productos Proteicos	Co-P	41,39 ± 2,91 ^a	5,40 ± 0,30 ^c	11,40 ± 0,09 ^d	41,8	6,29 ± 0,06 ^c
	CoExA-P	65,55 ± 0,51 ^c	1,91 ± 0,22 ^a	7,02 ± 0,10 ^b	25,5	5,47 ± 0,07 ^{b,c}
	CoExS-P	62,12 ± 0,19 ^b	1,96 ± 0,15 ^a	8,79 ± 0,02 ^c	27,1	5,23 ± 0,33 ^b
	Ai-P	70,35 ± 0,75 ^d	2,51 ± 0,14 ^b	4,02 ± 0,10 ^a	23,1	4,89 ± 0,36 ^{a,b}
	AiExA-P	70,07 ± 1,39 ^d	2,15 ± 0,12 ^a	4,45 ± 0,01 ^a	23,3	5,68 ± 0,10 ^{b,c}
	AiExS-P	66,69 ± 0,80 ^c	1,82 ± 0,04 ^a	4,02 ± 0,44 ^a	27,5	4,14 ± 0,88 ^a

*Valores expresados en porcentaje en base seca. Se informan valores promedio ± desviación estándar.

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

Tabla II.2.: Rendimientos en el proceso de obtención de aislados proteicos de girasol en planta piloto.

		Rendimientos (%) [*]		
		Masa	Proteínas	Eliminación de Fenoles
Productos Proteicos	Co-P	30,0	41,3 ± 0,4 ^d	35,7 ± 0,5 ^a
	CoExA-P	11,8	25,9 ± 0,3 ^c	91,0 ± 1,6 ^{b,c}
	CoExS-P	13,8	28,8 ± 0,1 ^c	89,1 ± 1,2 ^b
	Ai-P	7,0	16,6 ± 0,2 ^b	92,9 ± 0,6 ^{b,c}
	AiExA-P	5,3	12,4 ± 0,3 ^a	95,4 ± 0,4 ^c
	AiExS-P	6,3	14,3 ± 0,2 ^{a,b}	95,4 ± 0,2 ^c

*Se consideró el 100% la cantidad de materia, proteínas o fenoles presentes en el pellet molido de girasol. Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$. Todos los errores en rendimiento en masa fueron menores al 5%.

Respecto al contenido de compuestos fenólicos, se puede apreciar que la mayor diferencia entre concentrados y aislados la presentan **Co-P** y **Ai-P**, indicándonos que durante la precipitación isoeléctrica se remueven gran parte de estos compuestos. Los aislados y concentrados sometidos a lavados previos con agua y o sulfito (**CoExA-P**, **CoExS-P**, **AiExA-P** y **AiExS-P**) no presentaron diferencias significativas en su contenido fenólico; lográndose remover entre el 91% y 95% de los mismos, porcentajes superiores que los correspondientes a **Ai-P**. Estos resultados sugieren una mayor efectividad de los lavados iniciales que la precipitación isoeléctrica en la eliminación de fenoles. Posiblemente porque la precipitación isoeléctrica se realiza después de la extracción de proteínas a pH alcalino, etapa en donde los fenoles se asociarían con las proteínas a través de interacciones que no se rompen al disminuir el pH durante la precipitación isoeléctrica. Mientras que al realizar los lavados previos se estarían eliminando fenoles que aún no se han asociado a las proteínas (**Anexo II**). Los rendimientos de estos procesos, en masa y proteínas (**Tabla II.2.**), son similares a los obtenidos en la obtención de aislados proteicos de lupino o soja en planta piloto

(D'Agostina y col., 2006; González y col., 1995), pero mayores que los informados por Andrich y col. (2007) en el aislamiento de proteínas de amaranto.

Color: Los productos proteicos obtenidos en planta piloto mostraron diferencias en su coloración. Los parámetros Hunter-Lab se muestran en la **Tabla II.3.** Allí se puede observar que **Co-P** y **Ai-P** son de color verde oscuro (a - ; mayor ΔE), debido a la oxidación de los compuestos fenólicos, favorecida por el tratamiento a pH alcalino, y a su interacción con las proteínas (Sosulski, 1978).

Tabla II.3.: Parámetros de color Hunter-Lab de concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto.

		Parámetros de Color Hunter-Lab			
		<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE
Productos Proteicos	Co-P	52,80 ± 0,33 ^c	-8,29 ± 0,18 ^a	15,50 ± 0,13 ^c	47,27 ± 0,30 ^c
	CoExA-P	54,52 ± 0,55 ^d	2,12 ± 0,06 ^c	16,41 ± 0,15 ^d	45,28 ± 0,53 ^b
	CoExS-P	59,44 ± 0,28 ^e	5,79 ± 0,12 ^e	19,50 ± 0,28 ^f	42,21 ± 0,26 ^a
	Ai-P	42,33 ± 0,15 ^a	-1,71 ± 0,06 ^b	6,8 ± 0,08 ^a	55,24 ± 0,16 ^e
	AiExA-P	49,12 ± 0,44 ^b	4,72 ± 0,09 ^d	13,83 ± 0,12 ^b	49,89 ± 0,41 ^d
	AiExS-P	53,17 ± 0,78 ^c	7,87 ± 0,08 ^f	16,78 ± 0,09 ^e	47,27 ± 0,74 ^c

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distinto superíndice son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Al anexar etapas de remoción de fenoles previas al tratamiento alcalino, los valores de a , b y L aumentaron, produciéndose así un cambio en la coloración tendiente al marrón, así como una disminución en el parámetro ΔE , indicándonos que estas muestras (**CoExA-L**, **CoExS-L**, **AiExA-L** y **AiExS-L**) presentaron una menor coloración. Este hecho se explica debido a que, en estas muestras, es menor la concentración de fenoles presentes durante la extracción proteica en medio alcalino, etapa en donde de estar presentes los fenoles los aislados toman la coloración verdosa. En particular, y a

pesar de poseer el mismo contenido de compuestos fenólicos, las muestras obtenidas empleando sulfito de sodio fueron más claras que las producidas realizando las extracciones con agua (mayor L y menor ΔE). En este caso, es posible pensar que durante la solubilización de proteínas estén presentes cantidades residuales de sulfito de sodio, actuando como antioxidante y disminuyendo así la posterior oxidación de los fenoles remanentes y el desarrollo de una coloración intensa. En los productos **CoExS-P** y **AiExS-P**, la cantidad de sulfito de sodio residual fue menor que a 500 ppm, contenido máximo establecido por el CAA (<http://www.anmat.gov.ar>), no siendo un impedimento para su empleo en alimentación humana.

II.3.3.- Propiedades fisicoquímicas de concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto.

En la **Figura II.2.A.** se muestran los porcentajes de solubilidad en agua de las proteínas presentes en concentrados y aislados de girasol. Es para destacar que todas las muestras presentaron altos valores de solubilidad en agua, superiores a los mencionados en bibliografía para productos proteicos obtenidos a partir de harinas desgrasadas obtenidas a partir de semillas de girasol en el laboratorio, en procesos que no incluyen tratamientos térmicos (Lawhon y col., 1982; Miñones Conde y col., 2007; Bau y col., 1983; Sripad y Rao, 1987). Dentro del grupo de los concentrados, el **CoExS-P** presentó la menor solubilidad, mientras que no se detectaron diferencias significativas en las solubilidades de los aislados proteicos, siendo éstas superiores a las de sus respectivos concentrados con iguales etapas de extracción de fenoles. Cabe señalar que no se registró ninguna relación entre la solubilidad y la concentración de fenoles.

La hidrofobicidad superficial de las proteínas se muestra en la **Figura II.2.B.** Allí se puede observar que, tanto para concentrados como para aislados, al agregar etapas de extracción de compuestos fenólicos las proteínas presentaron mayor hidrofobicidad superficial. Este incremento fue mayor en las muestras tratadas con sulfito de sodio, indicándonos que este tratamiento provoca que las proteínas expongan más sus zonas hidrofóbicas, posiblemente causada por disociación de agregados solubles,

modificación del estado oligoméricos (equilibrios entre monómeros, trímeros y hexámeros de la heliantina) o simplemente cambios conformacionales.

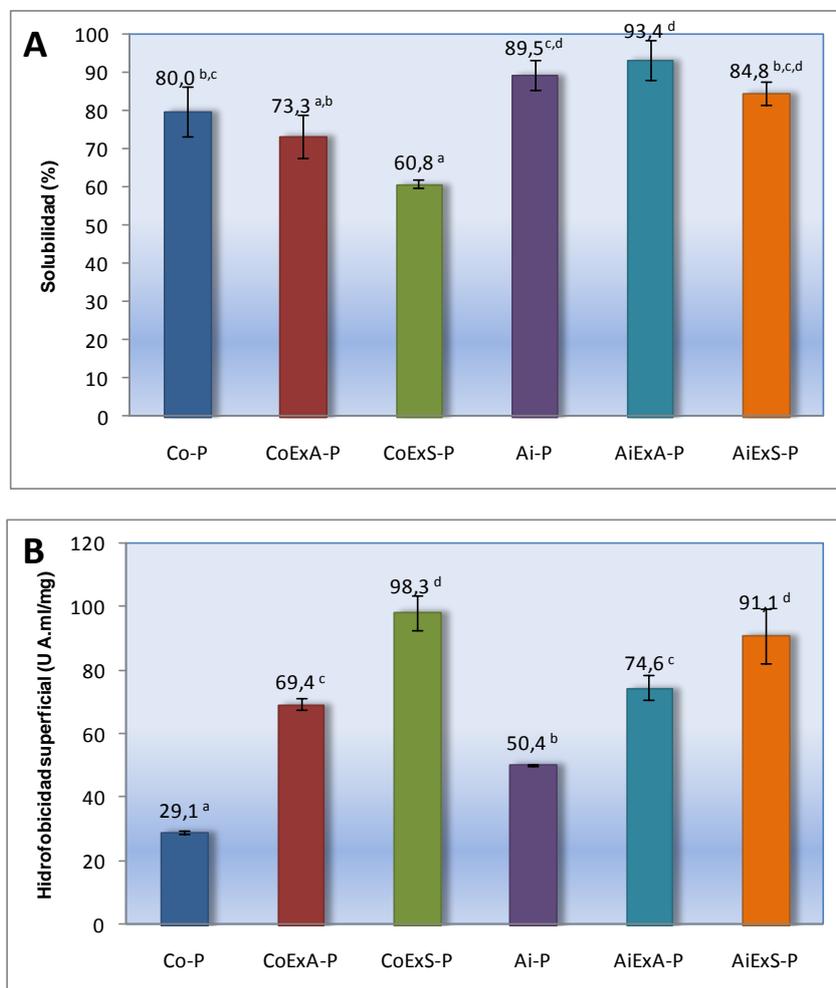


Figura II.2.: A) Solubilidad en agua y B) Hidrofobicidad superficial de concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto. Las barras con distinto superíndice son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Las proteínas presentes en **Co-P** presentaron menor H_o que las de **Ai-P**, posiblemente debido a la presencia de compuestos fenólicos capaces de interactuar con las proteínas por medio de sus zonas hidrofóbicas. Mientras tanto, los demás concentrados de planta no presentaron diferencias significativas respecto a los correspondientes aislados, probablemente debido a que para ambos aislados y

concentrados, los fenoles removibles fueron eliminados en las etapas de lavado (con agua con o sin sulfito) dejando a las proteínas con conformaciones similares, que no fueron modificadas durante la precipitación isoeléctrica. Las diferencias observadas en H_0 no se correlacionaron con las solubilidades de las muestras estudiadas.

El grado de desnaturalización proteica se estudió mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Todos los termogramas presentaron una única endoterma con temperatura de desnaturalización de 100-102°C. Las entalpías de desnaturalización se muestran en la **Figura II.3.A**. Allí se puede observar que todas las muestras se encuentran parcialmente desnaturalizadas, entre 50% y 70%, considerando que la heliantinina en estado nativo presenta un $\Delta H=14,5$ J/g proteína (González-Pérez y col., 2005). La energía puesta en juego para desnaturalizar las proteínas presentes en los concentrados con menor contenido fenólico (**CoExA-P** y **CoExS-P**) fue ligeramente mayor que la correspondiente a **Co-P**. Esta muestra es la que posee mayor contenido de fenoles, posiblemente estos compuestos estarían interaccionando con las proteínas, y al ser removidos mediante las extracciones acuosas, permitirían interacciones que estabilizarían a estas macromoléculas, incrementando así su entalpía de desnaturalización. Mientras que no se observaron diferencias significativas en las entalpías de desnaturalización de los aislados proteicos. Se encontró que los ΔH de las muestras **CoExA-P** y **CoExS-P** fueron levemente mayores que la de sus respectivos aislados.

La composición polipeptídica se analizó mediante los perfiles electroforéticos en SDS-PAGE sin y con 2- β mercaptoetanol (**Figura II.3.B.** y **II.3.C.** respectivamente). En estas dos figuras se puede apreciar que todos los productos proteicos presentaron perfiles electroforéticos similares entre sí. En la **Figura II.3.B.** se observaron bandas de peso molecular entre 45 y 62 kDa, correspondientes a las subunidades α - β de la heliantinina; las que, en presencia de un agente reductor, se disociaron en bandas de peso molecular entre 30-40 kDa y 20-30 kDa correspondientes a los polipéptidos ácidos (α) y básicos (β) respectivamente (**Figura II.3.C.**). En todas las calles de ambos geles, se pueden observar bandas de peso molecular menor a 20 kDa, correspondientes a albúminas 2S (señaladas como Alb). También es para destacar que todas las muestras presentaron bandas muy intensas (marcadas con flecha)

correspondientes a agregados solubles de alto peso molecular (que no ingresaron en el gel), que en presencia del agente reductor no se visualizaron, por lo que estarían estabilizados por uniones disulfuro, y cuya formación podría estar favorecida por el secado spray.

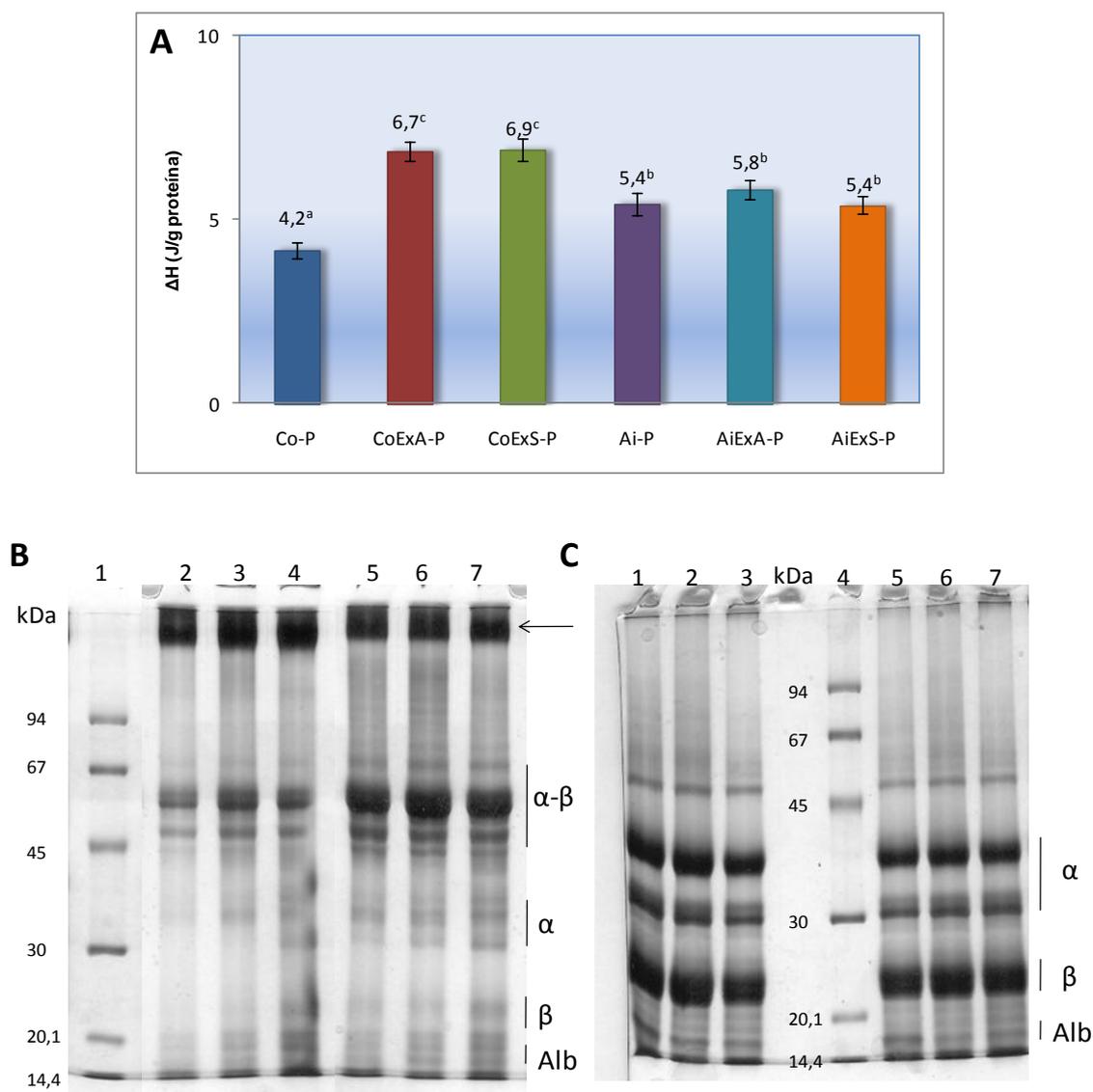


Figura II.3.: A) Entalpías de desnaturalización de concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto. **B)** Electroforesis SDS-PAGE. Calles: 1: LMW, 2: **Co-P**, 3: **CoExA-P**, 4: **CoExS-P**, 5: **Ai-P**, 6: **AiExA-P** y 7: **AiExS-P**. **C)** Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras. Calles: 1: **Co-P**, 2: **CoExA-P**, 3: **CoExS-P**, 4: LMW, 5: **Ai-P**, 6: **AiExA-P** y 7: **AiExS-P**. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

II.3.4.- Comparación Laboratorio vs. Planta Piloto

Al comparar los productos proteicos obtenidos en planta piloto con los producidos en el laboratorio, se observó que estos últimos presentaron mayores rendimientos en masa y proteínas, pero similares porcentajes de remoción de fenoles. Cabe recordar que si bien en el laboratorio se realizaron dos etapas de extracción de fenoles más que en planta que favorecieron a la mayor concentración de proteínas, las mismas no contribuyeron a una mayor eliminación de fenoles, debido a que parte de estos no pueden ser eliminados por estar interaccionando fuertemente con las proteínas. Esta variación significó reducciones en los tiempos de proceso y costos operativos, y también afectó la composición polipeptídica de los productos proteicos. En los concentrados y aislados obtenidos en planta piloto se observa la presencia de globulinas y albúminas, mientras que en los de laboratorio no se observa la presencia de componentes de bajo peso molecular correspondiente a la fracción de albúminas (**Figuras II.3.B y II.3.C.** versus **Figuras I.9.B. y I.9.C.**), además es para destacar la presencia de agregados solubles mediados por uniones disulfuro en los productos de planta piloto, posiblemente favorecidos por el secado spray. Las proteínas presentes en estos productos presentaron similar estabilidad térmica ($T_d \approx 100^\circ\text{C}$) y mayor grado de desnaturalización (menores ΔH) que las de los productos obtenidos en el laboratorio. Durante el procesamiento en planta piloto, estas proteínas podrían haber sufrido desnaturalización por tratamientos con presión debido a la homogeneización en molino coloidal, o por temperatura durante el secado spray, en donde es posible llegar a temperaturas cercanas a 90°C en la salida, siendo este valor próximo a las temperaturas de *onset* que presentaron las endotermas (entre 90 y 95°C). El tipo de secado también afectó la morfología de las partículas proteicas. Durante el secado spray se formaron partículas esféricas, pequeñas y porosas, cuya superficie posee mayor carácter hidrofóbico (**Figura III.4.B**), mientras que la morfología de los aislados liofilizados (de laboratorio) se correspondió con placas finas, irregulares y compactas (**Figura III.4.A.**). Esta observación coincide con las morfologías que describieron Añón y col. (2001) para aislados proteicos de soja de laboratorio y comercial. Las proteínas presentes en los concentrados y aislados de planta piloto presentaron menor H_o que las presentes en los correspondientes productos de laboratorio, posiblemente debido

a su mayor agregación, siendo consistente con la mayor proporción de agregados solubles mediados por uniones disulfuro detectados en sus perfiles de SDS-PAGE. Aún así, todos los productos proteicos presentaron elevados valores de solubilidad en agua, siendo esta una característica importante para su empleo como ingredientes funcionales en alimentos.

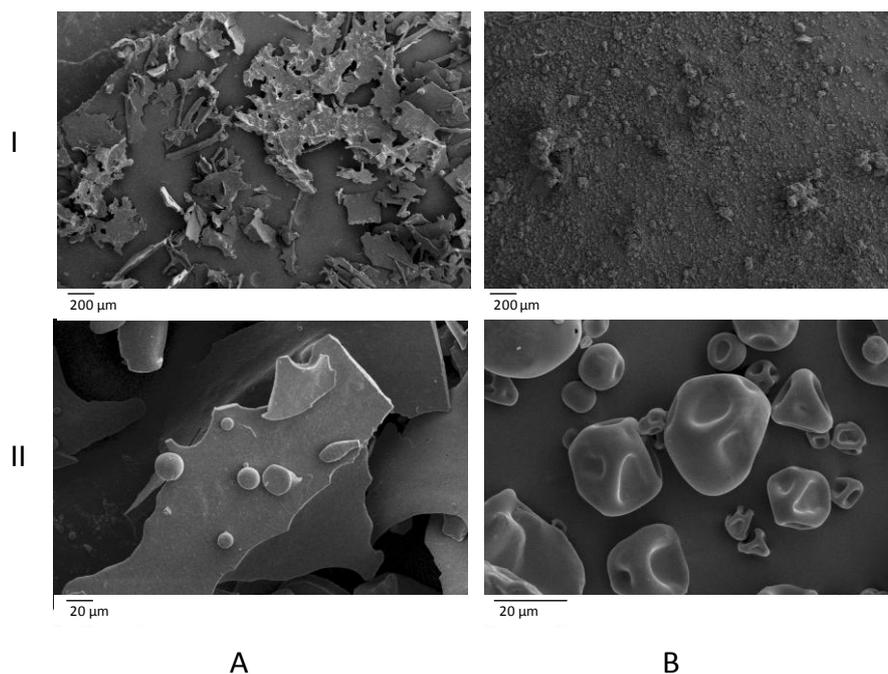


Figura III.4.: Microscopías electrónicas de barrido (SEM) de aislados proteicos de girasol de **A)** laboratorio (**Ai-L** en **I)** 100X, **II)** 1000X) y de **B)** planta piloto (**Ai-P** en **I)** 100X, **II)** 5000X).

II.3.5.- Almacenamiento de aislados proteicos de girasol

Se estudió la estabilidad de los aislados proteicos frente a diversas condiciones de almacenamiento: refrigeración o temperatura ambiente a una humedad relativa intermedia. En las **Figuras II.5.A.** y **II.5.B.** se muestra, a modo de ejemplo, cómo variaron la solubilidad en agua y la hidrofobicidad superficial del aislado proteico de girasol **Ai-P** en función del tiempo de almacenamiento bajo las dos condiciones estudiadas, 4°C, 64,3 %HR y 20°C, 58,9 %HR, ya que los otros dos aislados de planta,

AiExA-P y **AiExS-P**, presentaron igual comportamiento. En la **Figura II.5.A.** se observa que inicialmente alrededor del 90% de las proteínas presentes en los aislados son solubles en agua, pero que en el primer mes de almacenamiento, la solubilidad disminuyó llegando a 65% (en promedio para **Ai-P** y **AiExA-P**) o 55% (para **AiExS-P**), y luego se mantuvo aproximadamente constante durante el período estudiado (6 meses). Martins y Netto (2006) describieron un comportamiento similar en aislados proteicos de soja, Da Silva Pinto y col. (2005) también informaron una disminución en la solubilidad de proteínas de soja, pero en condiciones de almacenamiento más severas (42°C).

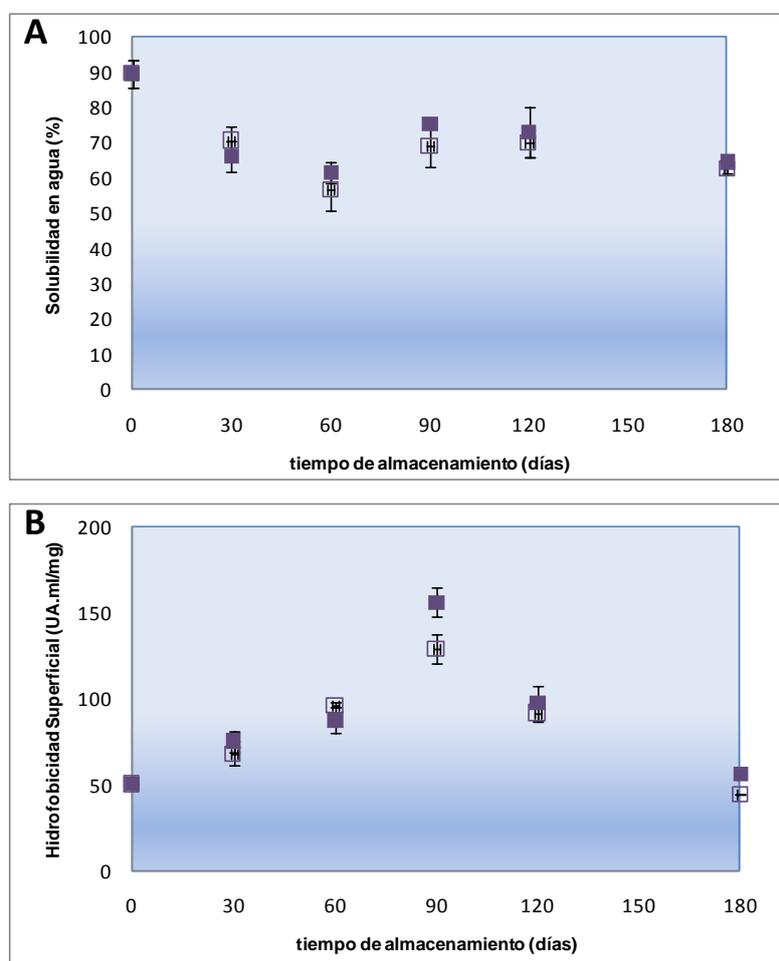


Figura II.5.: **A)** Solubilidad en agua y **B)** hidrofobicidad superficial de un aislado proteico de girasol obtenido en plata piloto (**Ai-P**), en función del tiempo de almacenamiento a: 4°C y 64,3 %HR (■) ó 20°C y 58,9 %HR (□).

En cuanto a la hidrofobicidad superficial, en la **Figura II.5.B.** se puede apreciar que durante los primeros 3 meses, los valores de H_o fueron incrementándose hasta llegar a un valor máximo y durante los tres meses posteriores se produjo un decaimiento en este valor. Estas observaciones sugieren que durante la primera etapa, se producirían modificaciones en el estado de asociación-disociación o cambios conformacionales que producirían exposición de los residuos hidrofóbicos al medio. Mientras que en la segunda etapa, las proteínas se estarían agregando, posiblemente, por medio de interacciones hidrofóbicas o por uniones disulfuro. Como se aprecia en ambas figuras, no hay una relación entre solubilidad e hidrofobicidad superficial, por lo que se podría pensar que la pérdida de solubilidad se debe a cambios conformacionales seguidos por agregación proteica. Estos cambios conformacionales no fueron confirmados por análisis calorimétrico y electroforesis, ya que no se apreciaron cambios en los termogramas obtenidos por DSC, ni en los perfiles electroforéticos. Tampoco se observaron cambios en la coloración de los productos proteicos durante el período estudiado. Resultados similares describen Hou y Chang (2004) en el estudio de proteínas de soja (glicinina).

Cabe señalar, que no se observaron diferencias significativas en las propiedades evaluadas respecto a las condiciones de almacenamiento (T y HR) a la que los productos proteicos de girasol fueron sometidos. Y dado que las muestras estudiadas presentaron similar comportamiento, independientemente del contenido de fenoles presentes en cada aislado, podría suponerse que estos compuestos no estarían afectando su almacenamiento. Probablemente los fenoles remanentes, que estarían interaccionando con las proteínas, se encuentran protegidos, o menos susceptibles a la oxidación que podrían sufrir en el tiempo que si estuvieran libres.

II.4.- Conclusiones

a.- Se logró escalar satisfactoriamente a nivel de planta piloto la metodología de obtención de concentrados y aislados proteicos de girasol a partir del *pellet* residual de la industria aceitera.

b.- La metodología propuesta en este trabajo permitió obtener concentrados y aislados proteicos de girasol con elevadas solubilidades en agua (90% en promedio), siendo este un requisito frecuente para su empleo como ingrediente funcional.

c.- Estos productos proteicos presentaron diferencias en su composición química, coloración, hidrofobicidad superficial y grado de desnaturalización a pesar de mostrar perfiles electroforéticos similares (con presencia de agregados solubles mediados por puentes disulfuro, posiblemente producidos durante el secado spray).

d.- Los procesos de obtención de productos proteicos de girasol efectuados en planta piloto presentaron menores rendimientos, expresados en masa y proteínas, que los obtenidos en escala de laboratorio. Mientras que la eficiencia en la remoción de fenoles fue similar en las dos escalas de procesamiento ensayadas. Los productos proteicos obtenidos en planta piloto presentaron menores valores de hidrofobicidad superficial y mayor grado de desnaturalización. Además se observaron diferencias en los perfiles electroforéticos al comparar productos de planta piloto con los de laboratorio, lo que sugiere que los primeros tendrían mayor cantidad de albúminas que los segundos y también poseen agregados solubles mediados por uniones disulfuro, no observados en los productos de laboratorio. Estas diferencias podrían atribuirse al menor número de etapas de proceso y al secado spray realizado en la planta piloto. Como consecuencia de las diferencias señaladas se esperaría que estos productos exhiban propiedades funcionales diferentes.

e.- Los ensayos de almacenamientos realizados nos indican que sería posible almacenar durante 6 meses a los aislados proteicos de girasol obtenidos empleando las metodologías aquí descritas, período en el cual conservan una solubilidad en agua de aproximadamente 55%-65%. Durante este período de almacenamiento se

produjeron cambios en la hidrofobicidad superficial de las proteínas, pero no se observaron cambios en los termogramas ni en los perfiles electroforéticos. El contenido de fenoles y el color tampoco se vieron afectados. Además se demostró, en base a las diferentes propiedades fisicoquímicas medidas, que los productos proteicos pueden ser almacenados tanto a temperatura ambiente como en ambientes refrigerados empleando una humedad relativa intermedia.

Capítulo III: Propiedades funcionales y antioxidantes de productos proteicos de girasol

Capítulo III: “PROPIEDADES FUNCIONALES y ANTIOXIDANTES DE PRODUCTOS PROTEICOS DE GIRASOL”

III.1.- Introducción

Las proteínas son componentes importantes en la formulación de alimentos, no sólo por sus propiedades nutricionales, sino también porque exhiben una amplia gama de propiedades funcionales que le otorgan a éstos características organolépticas únicas. Dentro de las propiedades funcionales de estas macromoléculas podemos mencionar: solubilidad, capacidad de absorción y/o de retención de agua o aceite, viscosidad, capacidad de formación y estabilización de espumas y emulsiones, formación de masas, fibras y geles, etc. (Petruccelli, 1994; Pilosof, 2000; Wagner, 2000). Estas propiedades poseen gran importancia tecnológica, por lo que resulta imprescindible entonces conocer qué funcionalidad presentan las proteínas en estudio para definir su potencial campo de aplicación como ingrediente funcional.

Para evaluar la funcionalidad de las proteínas, es frecuente emplear sistemas modelos sencillos y determinar parámetros que brinden información sobre su capacidad de contribuir a la propiedad de interés. Estas determinaciones no reflejan su comportamiento final en el alimento, que es una matriz más compleja, pero resultan una primera aproximación muy importante como paso previo a su formulación (Paulson y col., 1984).

Las propiedades funcionales que pueden presentar las proteínas son sumamente complejas, ya que dependen de varios factores, por ejemplo del origen de las proteínas, de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las proteínas, de las características del medio, de la metodología de estudio, etc. Es conocido que las proteínas vegetales, por lo general, poseen una funcionalidad más limitada que las de origen animal (Moure y col., 2006). Aún así, las proteínas vegetales extraídas de distintas variedades del mismo cultivo también presentan funcionalidad diferente (Utsumi y col., 1980, 1993 y 2002). Es deseable que las proteínas presenten elevadas solubilidades para poder ser empleadas como agentes espumantes y/o emulsificantes,

sin embargo, la presencia de fracciones proteicas insolubles, o parcialmente desnaturalizadas, mejora la capacidad de imbibición y de retención de agua (Arrese y col., 1991, Petruccelli y col., 1994, Añón y col., 2001). Por lo general, las albúminas forman rápidamente espumas y emulsiones, debido a su alta velocidad de migración a la interfase, sin embargo estos sistemas resultan más inestables que cuando se forman a partir de globulinas, moléculas que presentan mayor flexibilidad molecular (González-Pérez y col., 2005). Por otra parte, la presencia de polisacáridos en el medio permite obtener espumas más estables (Martínez y col., 2004; Karayannidou y col., 2007), mientras que al adicionar iones se puede incrementar la estabilidad de las emulsiones (McClements, 2004; Damodaran y col. 2005), o mejorar las propiedades gelificantes (Puppo y col., 1998). Como es posible observar existe una estrecha relación estructura-funcionalidad, sin embargo resulta muy difícil de establecer debido a la multifactorialidad del problema.

En bibliografía existe un gran número de trabajos en donde se estudian las propiedades funcionales de harinas, concentrados, aislados, hidrolizados y fracciones proteicas de girasol. En ellos se describe que estas proteínas presentan moderadas propiedades espumantes y emulsificantes (Lawhon y col., 1972; Huffman y col., 1975; Sosulski, 1979; Canella y col., 1985; Kabirullah y col., 1988; Venkatesh y col., 1993; Guéguen y col, 1996; Pawar y col., 2001; González-Pérez y col, 2005), pero que no poseen la capacidad de gelificar (Sosulski, 1979; Sánchez y col., 1997). Varios autores mencionan que es posible mejorar estas propiedades por medio de modificaciones físicas, químicas o enzimáticas (Claugthon y col., 1989; Sánchez y col., 1997; Miñones Conde y col., 2005; Martínez y col., 2005; Karayannidou y col., 2007; Rodríguez Patino y col, 2007). Cabe resaltar que en la mayoría de estos trabajos se emplean productos proteicos de girasol con muy bajo contenido de fenoles, obtenidos en el laboratorio a partir de semillas de variedades europeas y sin tratamientos térmicos. En los capítulos anteriores se desarrollaron metodología que permitieron obtener concentrados y aislados proteicos de girasol, en escala de laboratorio y de planta piloto a partir del *pellet* residual de la industria aceitera local. Estos productos presentaron diferencias en su composición química, perfiles polipeptídicos y características estructurales, por lo que se esperaba que su comportamiento funcional también sea diferente. Además,

a diferencia de lo que ocurre con otras proteínas como las de soja, son pocos los estudios que analizan la incidencia de cambios en la estructura de las proteínas de girasol sobre las propiedades funcionales que éstas exhiben.

Por otra parte, algunos autores mencionan que la presencia de compuestos fenólicos disminuye la solubilidad de las proteínas de girasol (Pringent y col., 2002), lo que modificaría su funcionalidad. Sin embargo, como se mostró en los capítulos anteriores, todos los productos proteicos estudiados en este trabajo, aun aquellos con diferentes contenidos de compuestos fenólicos, mantienen una elevada solubilidad en agua (90% en promedio). Si se tiene en cuenta que en los últimos años ha crecido el interés en las propiedades antioxidantes que poseen estos compuestos (Rice-Evans y col., 1995; Velioglu y col., 1998; Gülçin, 2005; Turkmen y col., 2006), sería importante analizar si los distintos productos proteicos de girasol presentan además de una funcionalidad adecuada, capacidad antioxidante.

El objetivo de este capítulo fue evaluar las propiedades funcionales y la capacidad antioxidante de los distintos productos proteicos de girasol, y relacionarlas con las propiedades fisicoquímicas y estructurales de sus proteínas, siendo esta clase de estudios una etapa necesaria para conocer y ampliar su potencial campo de aplicación.

III.2.- Materiales y Métodos

III.2.1.- Materiales

Se emplearon muestras de concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en laboratorio (**Co-L**, **CoExA-L**, **CoExS-L**, **Ai-L**, **AiExA-L** y **AiExS-L**) y en planta piloto (**Co-P**, **CoExA-P**, **CoExS-P**, **Ai-P**, **AiExA-P** y **AiExS-P**). Los concentrados de girasol en los se extrajeron los fenoles en sistemas alcohólicos (**CoExE-L**, **CoExM-L** y **CoExB-L**) fueron descartados por presentar valores bajos de solubilidad en agua (entre 32 y 48%).

III.2.2.- Propiedades funcionales dependientes de la interacción proteína-agua.

Determinación de actividad acuosa (a_w): La actividad acuosa a 25°C de concentrados y aislados proteicos de girasol fue determinada en un equipo Aqualab 3TE (Decagon Devices, Inc., Estados Unidos). Este equipo se basa en la medición de la temperatura de rocío, que es detectada por el cambio de reflectancia de un haz luminoso sobre un espejo instalado en la cámara donde se coloca la muestra. El equipo se calibró utilizando soluciones saturadas de $MgCl_2$, K_2CO_3 y $MgNO_3$ (Anedra, Argentina), cuyas actividades acuosas a 25°C son 0,328, 0,432 y 0,529 respectivamente. La saturación ($a_w=1$) fue corroborada usando agua bidestilada. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado.

Solubilidad en agua: Se determinó según la metodología descrita en el **Capítulo I**, sección **I.2.5**.

Capacidad de imbibición de agua (WIC): La capacidad de imbibición de agua de los aislados proteicos de girasol a 20°C fue determinada empleando el dispositivo de Baumann (**Figura III.1.A.**), siguiendo el método modificado por Sorgentini y col. (1991). Este método determina la absorción espontánea de agua (en estado líquido) por parte de la muestra a una determinada temperatura. Un papel de filtro

humedecido se colocó en un embudo conectado, por medio de una manguera flexible, a una pipeta graduada enrasada con agua destilada (1 ml), sostenida en posición horizontal y al mismo nivel que el papel de filtro. La muestra deshidratada (50 mg) se esparció en forma de una fina capa uniforme sobre el papel de filtro y se cerró la boca del embudo con una tapa. Para cada muestra, la cantidad de agua absorbida (ml) se registró en función del tiempo, hasta llegar a un valor constante o de equilibrio (Elisalde y col., 1996). Las curvas de absorción de agua se describieron matemáticamente según la **Ecuación III.1.**, propuesta por Pilosof y col. (1985) (**Figura III.1.B.**).

$$q = \frac{Q \cdot t}{B + t} \quad \text{Ecuación III.1.}$$

Donde: q: Cantidad de agua absorbida (ml H₂O/g sólido seco), Q: máxima capacidad de absorción de agua (ml H₂O/g sólido seco), t: tiempo de ensayo (s) y B: tiempo necesario para absorber la mitad de la cantidad máxima de agua (s).

Los parámetros Q y B se obtuvieron por regresión no lineal empleando el programa Microcal Origin 6.0 (Microcal Software Inc., Estados Unidos). Las determinaciones se realizaron por duplicado, como mínimo.

Capacidad de retención de agua (WHC): Se determinó la capacidad de retención de agua de los aislados proteicos de girasol bajo la acción de una fuerza centrífuga. Para tal fin se preparó una suspensión 10% p/v de la muestra en agua destilada. Se agitó cada 10 minutos con vortex durante una hora. Posteriormente se separó el sobrenadante del precipitado por medio de centrifugación a 9000 xg durante 20 minutos a 20°C (A15, B. Braun Biotech International, Estados Unidos). Se determinó la masa del precipitado y se cuantificó la concentración de proteínas por Bradford en el sobrenadante (m₃). La capacidad de retención de agua de los aislados se calculó empleando la **Ecuación III.2.**

$$WHC = \frac{m_2 - (m_1 - m_3)}{m_1 \cdot \delta} \quad \text{Ecuación III.2.}$$

Donde: WHC: Capacidad de retención de agua (ml H₂O/g aislado), m₁: peso inicial de aislado inicial (g), m₂: peso del precipitado (g), m₃: peso de proteínas en sobrenadante (g) y δ : densidad del agua (1 g/ml).

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

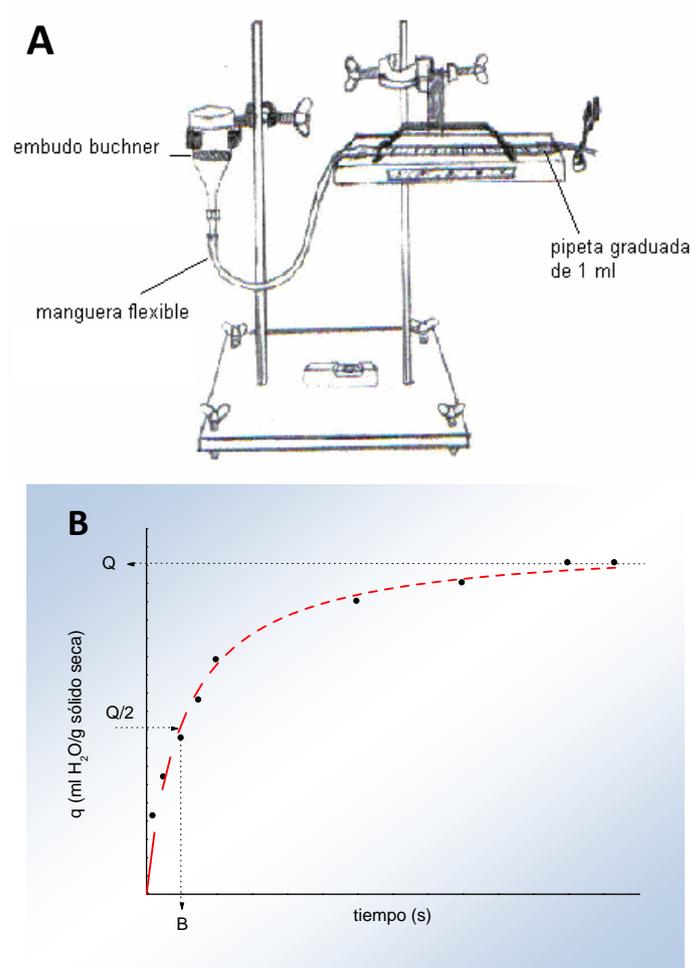


Figura III.1.: Capacidad de imbibición de agua (WIC). **A)** Dispositivo empleado para la determinación de WIC. **B)** Curva de absorción de agua en función del tiempo, en donde se muestran los puntos experimentales (●), el modelo matemático (- - -) y como se calculan los parámetros Q y B empleados para describir el comportamiento de la muestras.

III.2.3.- Propiedades de Superficie: Emulsiones y Espumas

Preparación de las muestras: Se prepararon dispersiones de concentrados y aislados proteicos de girasol en buffer fosfato de sodio 0,1 M a pH 3 ó 7 y fuerza iónica 0,08 M ó 0,54 M NaCl. Las dispersiones se agitaron continuamente durante una hora y se centrifugaron a 23700 xg durante 15 minutos a 20°C (Avanti J-25, Beckman Coulter, California, Estados Unidos). Se cuantificó la concentración de proteínas de los sobrenadantes por Bradford (Bradford, 1976), y se fijó la concentración proteica de los mismos a 1 mg/ml realizando una dilución adecuada con el sistema buffer correspondiente.

Como patrones se emplearon soluciones acuosas de un aislado proteico de soja comercial (**ASoja**, Supro 500E, Solae Company, Brasil) y seroalbúmina bovina (**BSA**, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos).

Propiedades Emulsificantes: Se prepararon emulsiones aceite en agua (O/W 25:75 p/p) a temperatura ambiente con un homogeneizador ULTRA-TURRAX T25 (IKA-Werke, GmbH & Co., Alemania; diámetro de rotor=0,8 mm) a 20000 rpm durante 60 segundos. Las soluciones proteicas (1 mg/ml) fueron empleadas como la fase acuosa, mientras que como fase lipídica se utilizó aceite de girasol "Natura" (Aceitera General Deheza, Argentina). Las emulsiones se realizaron por duplicado.

Se determinó el índice de actividad emulsionante (IAE), según la técnica descrita por Pearce y Kinsella (1978). El fundamento de este método es que la turbidez producida por una dispersión de partículas es proporcional al área interfacial. La emulsión preparada en las condiciones antes mencionadas se diluyó inmediatamente con una solución estabilizadora (buffer fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,1 M, SDS 0,1% p/v, pH 7). Se realizaron dos diluciones seriadas 1/10 y 1/25 rápidamente (a los 15 y 45 segundos respectivamente, después de finalizada la homogeneización), y se midió la absorbancia de la última dilución a 500 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650. Los valores de IAE se calcularon según la **Ecuación III.3**.

$$IAE = \frac{2 \cdot 2,303 \cdot Abs_{500} \cdot D}{L \cdot \Phi \cdot [P] \cdot 1000} \quad \text{Ecuación III.3.}$$

Donde: IAE: índice de actividad emulsificante (m^2/g), Abs_{500} : Absorbancia a 500 nm de la dilución 1/250, D: factor de dilución (250), L: camino óptico (0,01 m), Φ : fracción volumétrica de fase lipídica (0,25) y [P]: Concentración de proteínas en la solución antes de la emulsificación, cuantificada por Bradford (mg/ml).

Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado para cada una de las emulsiones obtenidas.

Todas las emulsiones, inmediatamente luego de la homogeneización, se colocaron en celdas de medida cilíndricas de vidrio y fueron caracterizadas empleando un analizador vertical de barrido QuickScan (Beckman-Coulter Inc., Fullerton, CA, Estados Unidos). Este equipo mide *Back Scattering* (BS) y transmitancia (T) en función de la altura de la muestra (**Figura III.2.A.**). Dichos perfiles se determinaron cada un minuto durante una hora y luego de 24 horas, a 20°C. En la **Figura III.2.B.** se muestra un perfil típico de una emulsión y los parámetros definidos para su caracterización. Para evaluar la formación, se determinó el valor de *Back Scattering* inicial (BS_0 , %) a lo largo del tubo a tiempo cero. En la zona inferior del tubo (entre 15-20 mm) se determinó la cinética de desestabilización, obteniéndose un valor de tiempo medio ($t_{1/2}$, s) definido como el tiempo para el cual el BS es la mitad del BS_0 . Mientras que en la zona superior del tubo (entre 45-50 mm) se determinó la cinética de cremado, de allí se pudo obtener el índice de cremado, según la **Ecuación III.4.**

$$IC = \frac{BS_{24h} - BS_0}{BS_0} \cdot 100 \quad \text{Ecuación III.4.}$$

Donde: IC: índice de cremado (%), BS_0 : *Back Scattering* inicial (en la zona superior del tubo) y BS_{24h} : *Back Scattering* a las 24 horas (en la zona superior del tubo).

Las determinaciones se realizaron, al menos por duplicado.

La morfología de las gotas se observó por microscopía óptica. Se tomaron 20 μl de la emulsión, se colocaron entre cubre y portaobjetos, e inmediatamente después se observaron en un microscopio equipado con una cámara Leica DC100 (Bensheim, Alemania) y se tomaron fotografías (10X).

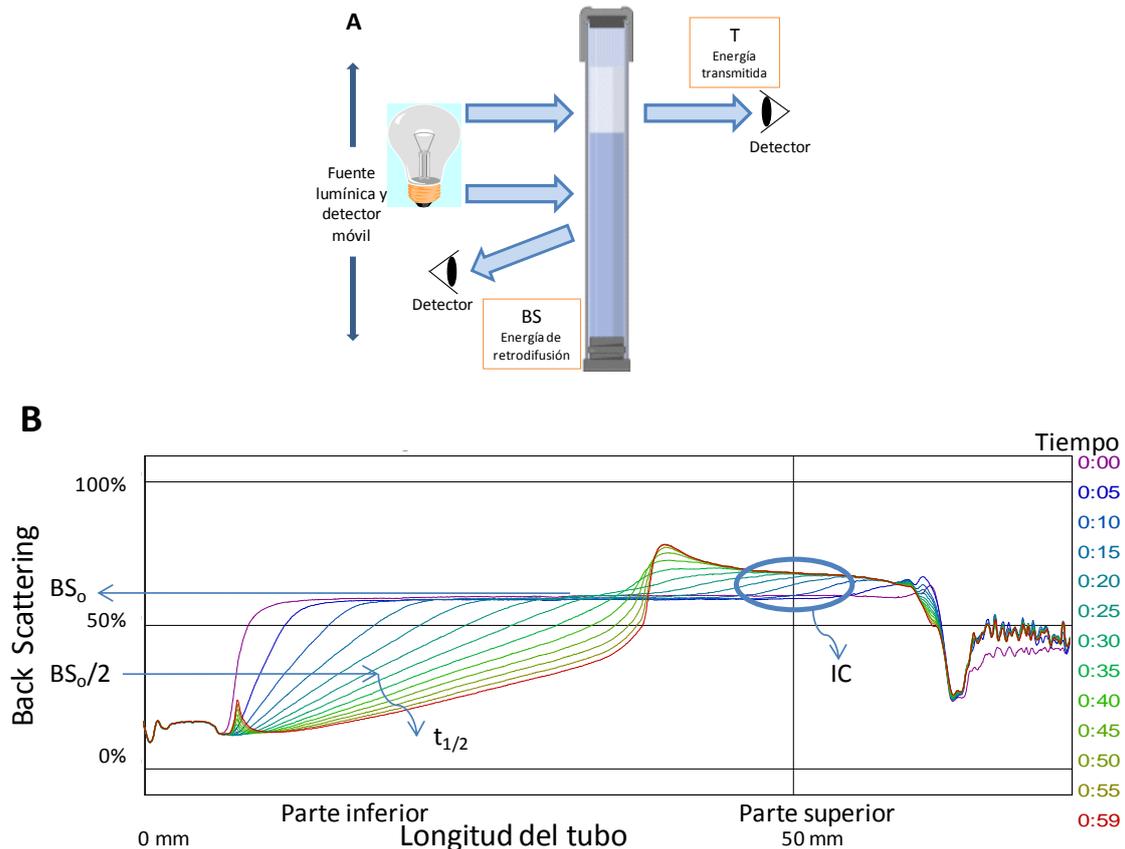


Figura III.2.: Propiedades emulsificantes. **A)** Principio de funcionamiento del QuickScan. **B)** Perfiles típicos de la variación temporal de BS en función de la longitud del tubo, de donde se determinan los parámetros de formación (BS_0), y estabilización ($t_{1/2}$ e IC) de la emulsión en estudio.

Propiedades Espumantes: Las determinaciones se efectuaron en una columna (3 cm de diámetro y 30 cm de alto) equipada con un par de electrodos verticales fijos localizados en su base y con un disco de vidrio fritado (tipo G4, 5-15 μm) (Petruccelli y col., 1994) (Figura III.3.A.).

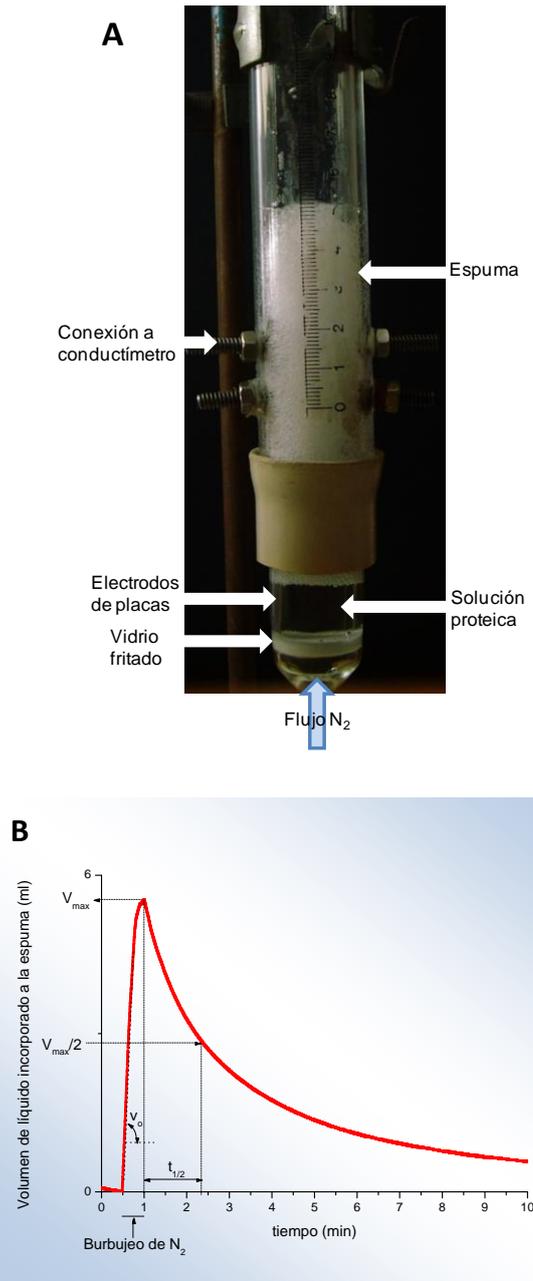


Figura III.3.: Propiedades espumantes. **A)** Dispositivo empleado para la formación de espumas por burbujeo. **B)** Gráfico de variación temporal del líquido incorporado a la espuma, de donde se obtienen los parámetros de formación (v_0 y V_{max}) y de estabilidad ($t_{1/2}$) de la espuma en estudio.

En la columna se introdujeron 6 ml de la solución de proteínas, de manera de cubrir los electrodos, y la espuma se generó por burbujeo de N₂ (caudal: 1,33 ml/s) durante 30 segundos. Se registró la variación temporal de la conductividad de la solución proteica

empleando un conductímetro y un adquirente (ambos desarrollados en el laboratorio de Electrónica del CIDCA). Sabiendo que la conductividad de la solución es inversamente proporcional al volumen de líquido incorporado en la espuma, fue posible conocer su variación en función del tiempo (**Figura III.3.B.**). De dichas curvas se determinaron los siguientes parámetros: el volumen máximo de líquido incorporado en la espuma (V_{max} , ml), la velocidad de incorporación de líquido a la espuma (v_o , ml/min), y el tiempo en el que drena la mitad del líquido incorporado en la espuma al finalizar el período de burbujeo ($t_{1/2}$, s). Se tomaron fotografías de la espuma formada con una cámara Genius para estudiar su morfología. Las determinaciones se realizaron por quintuplicado.

III.2.4.- Propiedades funcionales dependientes de la interacción proteína-proteína.

Gelificación: Se prepararon suspensiones acuosas con distintas concentraciones de los tres aislados proteicos obtenidos en planta piloto **Ai-P**, **AiExA-P** y **AiExS-P** (7,5, 10, 12,5 y 15% p/v) a pH 8 y a temperatura ambiente. Tubos conteniendo 5 ml de cada suspensión se colocaron en un baño de agua a 100°C durante 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. Inmediatamente después se enfriaron en un baño con agua a 4°C y se mantuvieron refrigerados a la misma temperatura durante 24 horas. La concentración mínima de gelación fue determinada observando que la muestra no se deslizara ni cayera cuando el tubo era invertido (Adebowale y Lawal, 2003). Se evaluó sensorialmente la dureza de los geles formados realizando un ensayo de compresión y cuantificando los valores por medio de la siguiente escala hedónica: 1: gel muy débil, 2: gel débil, 3: gel medio, 4: gel fuerte y 5: gel muy fuerte.

III.2.5.- Capacidad Antioxidante

En este ensayo se determinó la capacidad de capturar al radical $ABTS^{*+}$ (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)) que poseen los concentrados y aislados proteicos de girasol en estudio, cuantificando la decoloración del radical $ABTS^{*+}$ (a 734 nm) a un tiempo determinado (10 minutos) (Re y col., 1999).

Preparación del radical ABTS^{•+}: El radical ABTS^{•+} fue producido a partir de una solución acuosa 7 mM de ABTS (Fluka, Sigma-Aldrich, Alemania), a la que se le agregó 2,45 mM de persulfato de potasio (Anedra, Argentina) y se la almacenó durante 12-16 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Previo a su utilización, la solución se diluyó con buffer fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,4 hasta obtener una absorbancia a 734 nm de $0,70 \pm 0,03$ en un espectrofotómetro Beckman DU650.

Preparación de las muestras: De cada muestra se pesaron 2 mg, se disolvieron en 1 ml de buffer fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,4, se agitaron continuamente durante una hora y posteriormente se separaron los sobrenadantes por centrifugación a 13000 xg durante 10 minutos a 20°C (A15, B. Braun Biotech International, Estados Unidos). En los sobrenadantes obtenidos se determinó la capacidad de capturar al radical ABTS^{•+} y el contenido de fenoles por espectroscopía UV a 324 nm (**Anexo I**).

Ensayo: Para estudiar la capacidad antioxidante de cada muestra, a 950 µl de la solución conteniendo el radical ABTS^{•+} (con absorbancia de 0,7) se le adicionaron 25 µl de buffer fosfato de sodio 0,01 M (pH 7,4) y 25 µl de la muestra en estudio. Se agitó inmediatamente, y a los 10 minutos se midió la absorbancia a 734 nm. Como blanco de reactivo se realizó el mismo procedimiento, colocando 25 µl de buffer fosfato de sodio 0,01 M pH 7,4 en lugar de la muestra. La capacidad antioxidante, de capturar al radical ABTS^{•+}, se determinó según la **Ecuación III.5**.

$$CAO = \frac{Abs_{br} - Abs_m}{Abs_{br}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación III.5.}$$

Donde: CAO: capacidad antioxidante, de capturar al radical ABTS^{•+} (%), Abs_{br}: Absorbancia a 734 nm del blanco de reactivos, Abs_m: Absorbancia a 734 nm de la muestra.

Como patrones, se emplearon soluciones de ácidos gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Estados Unidos) y hidroxitolueno butilado (BHT, 2,6-di(tertbutil)-4- metilfenol, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Estados Unidos). Las concentraciones empleadas fueron: 10-1000 ppm.

Las determinaciones de capacidad antioxidante se realizaron por triplicado.

III.2.6.- 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 Statgraphics plus, versión 5.1 (Statgraphics, Estados Unidos).

III.3.- Resultados y Discusión

III.3.1.- Propiedades funcionales dependientes de la interacción proteína-agua.

Actividad acuosa (a_w): En primera instancia se determinó la actividad acuosa de concentrados y aislados proteicos de girasol. Este parámetro resulta de importancia para definir sus condiciones de almacenamiento y conocer su estabilidad química y microbiológica. Todas las muestras en estudio presentaron valores de a_w entre 0,363 y 0,496 (**Figura III.4.A.**), asegurándonos que estos productos son estables desde el punto de vista microbiológico ya que presentan a_w menores a 0,6 (Beuchat, 1981). Este parámetro mostró diferencias debido a la composición de las muestras y al proceso por el cual éstas fueron obtenidas. Se observó que la a_w de los productos proteicos de girasol disminuyó al adicionar etapas de lavado para remover compuestos fenólicos. En la **Figura III.4.B.** se muestra la relación lineal inversa existente entre a_w y H_o de los distintos concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en el laboratorio ($r=-0,9809$) y en la planta piloto ($r=-0,9419$). Además, en ella es posible observar que los productos obtenidos en planta piloto presentaron, en términos generales, menores a_w que las de sus respectivos productos de laboratorio, hecho que puede atribuirse a la diferencia en la forma de secado. Los **Co-L** y **Co-P** presentaron mayores a_w que **Ai-L** y **Ai-P**, pudiéndose atribuir esta diferencia al mayor contenido de carbohidratos y fenoles de los primeros. Los valores de a_w encontrados fueron similares al que presentó el **ASoja** ($0,432\pm 0,003$) y a los informados por Jovanovich y col. (2003) para aislados proteicos de soja nativos (de laboratorio) y desnaturalizadas (comerciales). En resumen, si bien existe una relación inversa entre contenido de fenoles y H_o , no fue posible encontrar una relación entre fenoles y a_w .

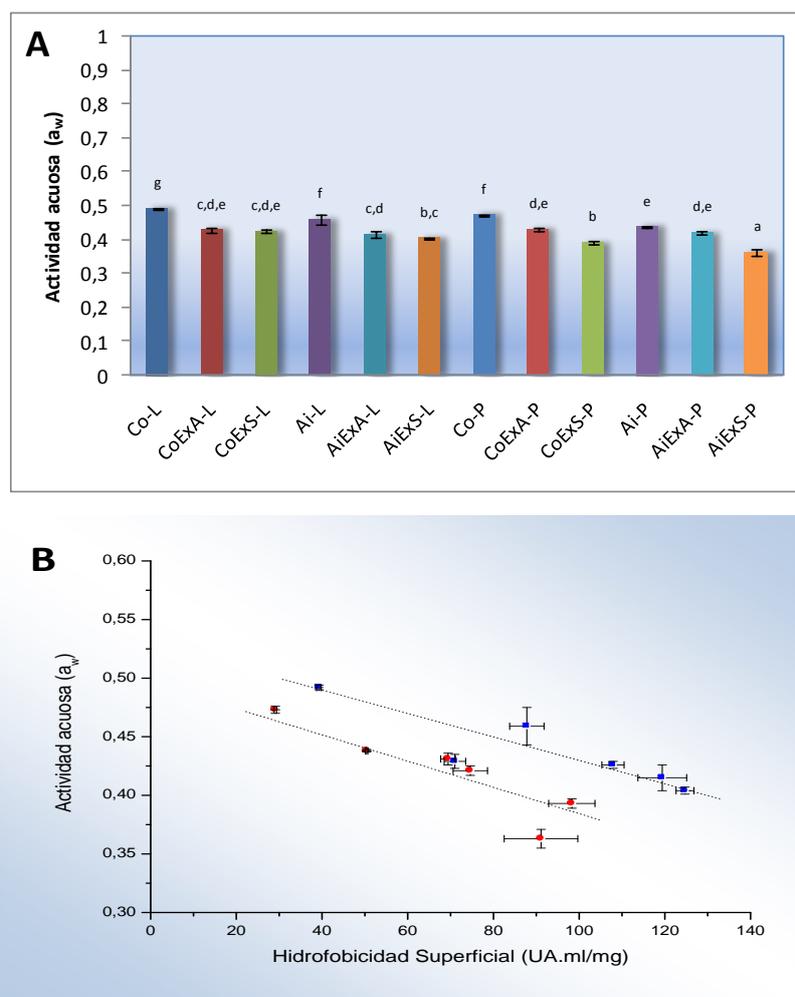


Figura III.4.: Actividad acuosa. **A)** Valores de a_w de los distintos productos proteicos de girasol. **B)** Relaciones entre a_w y H_o de los productos proteicos de girasol obtenidos en laboratorio (■) y en planta piloto (●). Se muestran valores promedio \pm desviación estándar. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Solubilidad: Todos los productos proteicos de girasol presentaron elevados porcentajes de solubilidad en agua, los resultados se presentaron en el **Capítulo I** (secciones I.3.4. y I.3.5.) y en el **Capítulo II** (sección II.3.3.). Tanto los aislados proteicos de laboratorio como los de planta piloto fueron más solubles en agua que sus respectivos concentrados. Obtener productos proteicos con elevada solubilidad resulta importante ya que es un requisito para que estos presenten otras propiedades funcionales, por ejemplo capacidad espumante y emulsificante.

Capacidad de imbibición de agua (WIC): Mediante la metodología de WIC se cuantificó la cantidad de agua que el material proteico fue capaz de absorber en forma espontánea bajo la fuerza de gravedad. Los valores de máxima capacidad de absorción de agua (Q) y tiempos de imbibición (B) de los aislados proteicos de girasol estudiados se muestran en las **Figuras III.5.A.** y **III.5.B.** respectivamente. Se puede observar que Q se incrementó al adicionar etapas tendientes a eliminar los compuestos fenólicos (**Figura III.5.A.**), siendo mayor en los productos extraídos en presencia de sulfito de sodio. Los tiempos de imbibición (B) también mostraron dicha tendencia (**Figura III.5.B.**), excepto para la muestra **AiExS-P**, que fue la que presentó la mayor Q y el menor B. Los incrementos en ambos parámetros obtenidos al remover fenoles podrían atribuirse a que durante la extracción de estos compuestos las proteínas sufrieron cambios conformacionales, evidenciados en H_o , permitiendo que los grupos hidrofílicos estén más accesibles para interactuar con el agua. En la **Figura III.5.C.** se muestran las relaciones entre Q y H_o de los aislados proteicos obtenidos en el laboratorio ($r=0,906$) y en la planta piloto ($r=0,966$). También fue posible observar en las **Figuras III.5.A.** y **III.5.B.** que los aislados obtenidos en planta piloto presentaron mayores valores de Q y B que los respectivos aislados de laboratorio. Este hecho se podría atribuir a que los aislados obtenidos en planta piloto estaban constituidos por proteínas con mayor grado de desnaturalización que los obtenidos en el laboratorio, facilitando así las interacciones proteína-agua. Resultados similares describieron Arrese y col. (1991), quienes informaron que los aislados proteicos de soja parcialmente desnaturalizados presentaron mayor Q que los nativos o los totalmente desnaturalizados. Cabe recordar que los aislados proteicos de girasol de planta piloto y los de laboratorio presentaron diferencias en sus morfologías (**Capítulo II**, sección **III.3.4.**). Durante el secado spray se formaron partículas esféricas, pequeñas y porosas, cuya superficie posee mayor carácter hidrofóbico (**Figura III.4.A.**), estas características podrían explicar los mayores valores de Q y B respectivamente; mientras que la morfología de los aislados liofilizados (de laboratorio) corresponde a placas finas, irregulares y compactas (**Figura III.4.B.**). Añón y col. (2001) informaron similares morfologías para aislados proteicos de soja de comercial y de laboratorio respectivamente, y manifestaron diferencias en sus valores de WIC y en la viscosidad de sus dispersiones proteicas.

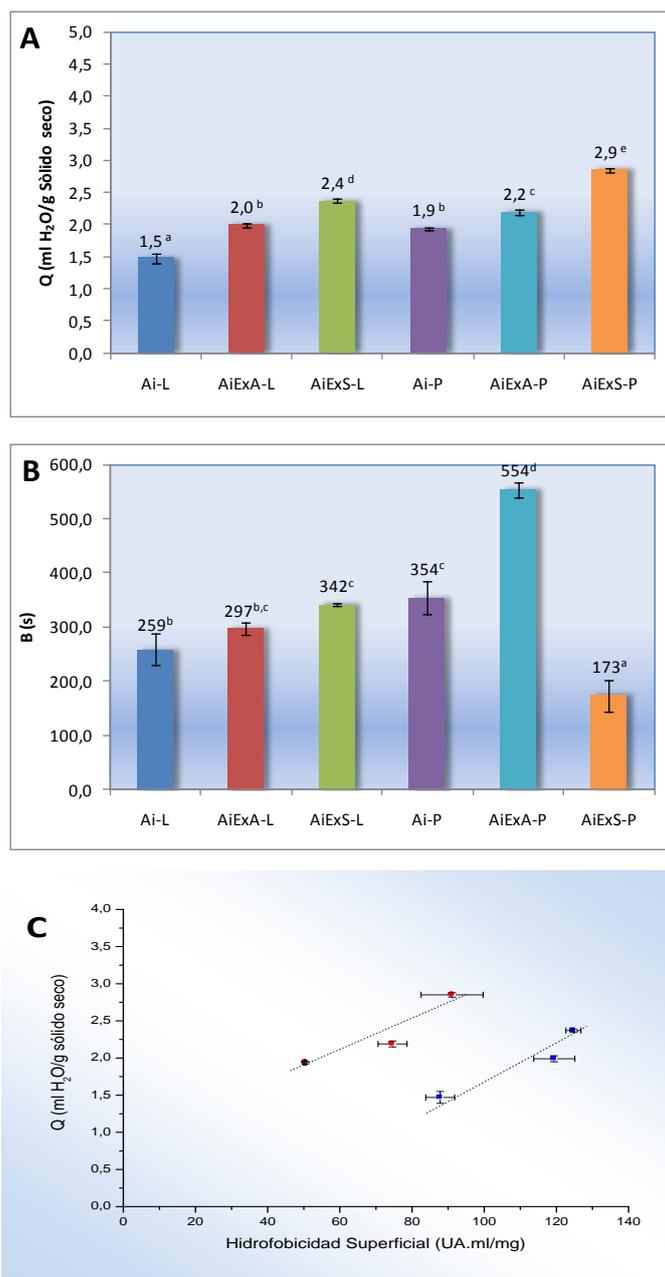


Figura III.5.: Capacidad de imbibición de agua (WIC) de los distintos aislados proteicos de girasol en estudio. **A)** Máxima capacidad de absorción de agua (Q) y **B)** tiempo de imbibición (B). **C)** Relaciones entre Q e Ho de los productos proteicos de girasol obtenidos en laboratorio (■) y en planta piloto (●). Se muestran valores promedio \pm desviación estándar. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

La máxima capacidad de imbibición de agua (Q) de las muestras de girasol varió entre 1,5 y 2,8 ml H₂O/g sólido seco. Estos valores son similares a los informados para aislados proteicos de amaranto y quinua (1,7-2,8 ml H₂O/g sólido seco, Abugoch y col., 2008), pero menores que para aislados proteicos de soja (4,2-12,8 ml H₂O/g sólido seco, Arrese y col., 1991; Remondetto y col., 2001; Jovanovich y col., 2003). Los valores de B encontrados en literatura son notablemente menores a los informados en este trabajo (3-9 minutos). Estos resultados muestran que todos los aislados proteicos de girasol poseen baja capacidad de imbibición de agua, siendo consistente con sus elevados valores de solubilidad.

Capacidad de retención de agua (WHC): En el ensayo de WHC se determina la cantidad de agua que un material puede retener bajo la acción de una fuerza centrífuga. En la **Figura III.6.** se observan los valores de WHC de los aislados proteicos de girasol. No se encontró dependencia de WHC con el contenido de fenoles de los productos analizados, sin embargo, es evidente que los aislados obtenidos en el laboratorio retienen aproximadamente el doble de agua que los obtenidos en planta piloto. Está descrito en bibliografía que las muestras muy solubles en agua poseen baja WHC (Petruccelli, 1993). Este hecho podría explicar el comportamiento de los aislados obtenidos en planta piloto, sin embargo, las muestras de laboratorio también poseen elevada solubilidad en agua. Se podría pensar entonces, que los aislados de laboratorio se agregaron de manera más homogénea, permitiendo mayor interacción con el agua.

Los valores de WHC que presentaron las muestras en estudio fueron mayores que los encontrados en bibliografía para aislados proteicos de girasol, variando entre 0,8-3,9 ml H₂O/g sólido seco (Lin y col., 1974; Sosulski y Fleming, 1977; Vermeersch y col., 1987). Aislados de proteínas de lupino, guayaba y quinua presentaron valores de 1,4-4,5 ml H₂O/g sólido seco (Lqari y col., 2002; D'Agostina y col., 2006; Bernardino-Nicanor y col., 2007; Abugoch y col., 2008). Petruccelli y Anón (1994) informan valores de WHC menores a 5 ml H₂O/g sólido seco para aislados nativos de proteínas de soja,

mientras que al someterlos a un tratamiento térmico este valor se incrementa hasta llegar a 20-25 ml H₂O/g sólido seco.

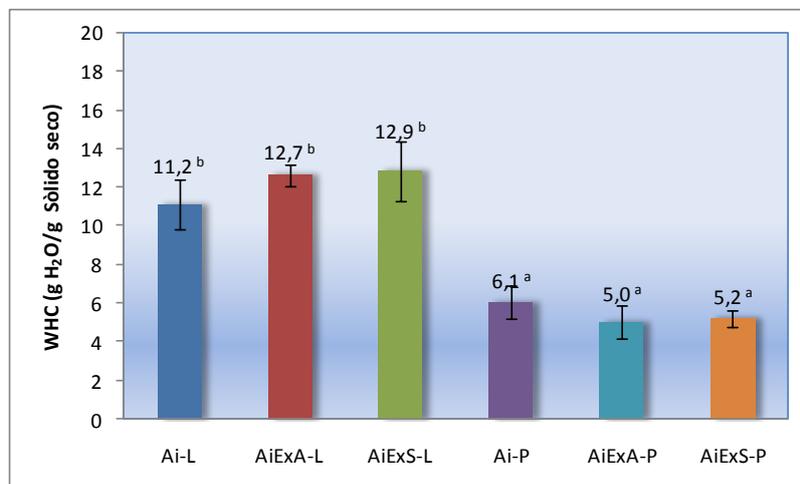


Figura III.6.: Capacidad de retención de agua (WHC) de los aislados proteicos de girasol. Se muestran valores promedio \pm desviación estándar. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Se puede concluir que los productos proteicos de girasol son estables desde el punto de vista microbiológico y poseen elevada solubilidad en agua. Al disminuir el contenido de fenoles o al producirlos en planta piloto se obtuvieron aislados proteicos de girasol con mayor capacidad de imbibición de agua. La capacidad de retención de agua sólo se vio afectada por la escala de procesamiento, siendo mayor en los aislados de laboratorio.

III.4.2.- Propiedades de Superficie

Se analizó la capacidad de formar y estabilizar emulsiones y espumas de soluciones obtenidas con concentrados y aislados proteicos de girasol (1 mg de proteína/ml buffer fosfato 0,1 M) producidos en planta piloto. Se cuantificó proteínas en la solución por el método de Bradford (Bradford, 1976) y se realizó la dilución correspondiente para ajustar su valor. Con el objetivo de emplear estos productos como ingredientes

funcionales en la industria de alimentos, el pH del buffer fue ajustado en 3 ó 7 y la fuerza iónica fue ajustada a 0,08 M ó 0,54 M por agregado de NaCl. Estas condiciones experimentales son acordes a los valores límites de pH y fuerza iónica que se encuentran en los alimentos (Lakemond y col., 2000). Es conocido que cambios en pH y fuerza iónica pueden modificar la estructura de las proteínas de girasol (Molina y col., 2004 y González-Pérez y col., 2008), por lo que es factible que estas proteínas presenten un comportamiento funcional diferente dependiendo del medio empleado.

Capacidad de formar y estabilizar emulsiones: El proceso de formación de una emulsión consiste en crear área interfacial entre dos líquidos inmiscibles, generalmente aceite y agua, mediante trabajo mecánico. Una emulsión es un sistema termodinámicamente inestable y tiende a desestabilizarse por diferentes mecanismos (cremado, floculación, desproporción, coalescencia e inversión de fases), resultando en la separación parcial o total de las fases inmiscibles (Wagner 2000). Las proteínas, por ser de naturaleza anfifílica, poseen la capacidad de disminuir la tensión interfacial agua-aceite, para ello es necesario que ésta migre del seno de la solución a la interfase, penetre en ella y se reordene. Durante esta etapa se prefieren moléculas pequeñas, solubles, con adecuado balance hidrofóbico-hidrofílico y que presenten flexibilidad molecular. Una vez en la interfase, las macromoléculas deben interaccionar entre ellas para formar una película alrededor de cada gota de aceite. La naturaleza de estas interacciones define las propiedades viscoelásticas de la película interfacial y la estabilidad de la emulsión formada. Por ejemplo, las proteínas con capacidad de polimerizar por intercambio de SH/SS forman un film interfacial con mayor resistencia a la coalescencia, también se conoce que los residuos proteicos remanentes en la fase acuosa pueden disminuir, por repulsión electrostática o impedimento estérico, la floculación y coalescencia (Dickinson y col., 1991, 1998, 2001; Fang y col., 1996; Damodaran y col., 1997; McClements, 2004).

En este estudio, la capacidad de formación de las emulsiones se evaluó mediante el índice de actividad emulsificante (IAE) y el *Back Scattering* inicial (BS₀). El tiempo medio ($t_{1/2}$, definido como el tiempo necesario para que el BS tome el valor de BS₀/2)

y el índice de cremado (IC) los empleamos para determinar la estabilidad de las emulsiones en estudio.

La capacidad de formación de emulsiones a partir de los concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto se muestran en la **Figura III.7.A** y **III.7.B.** respectivamente. En ellas se puede observar que la capacidad de emulsificación (IAE) no se vio afectada por las diferencias en composición de las muestras. En la **Figura III.7.C** se muestran, a modo de ejemplo, las microscopías ópticas de las emulsiones de **AiExS-P** (sin dilución, 10X), pudiéndose observar que las distribuciones iniciales de tamaño de gota fueron no unimodales y además dependientes del pH y de la fuerza iónica del medio. Es posible apreciar que tanto para concentrados como aislados a pH 3 y 0,54 M NaCl presentaron los menores IAE (**Figura III.7.A** y **III.7.B.** respectivamente), indicándonos que igual cantidad de proteínas generaron menor área interfacial, produciendo así menor cantidad de gotas y de mayor tamaño (**Figura III.7.C.**). En estas condiciones (pH 3-0,54 M NaCl), la heliantinina se encuentra en forma de monómeros (2S, subunidades $\alpha\beta$) (Molina y col., 2004 y González-Pérez y col., 2008), su elevada H_0 (430-2430 UA ml/mg) y menor flexibilidad podrían interferir en su reordenamiento en la interfase y en la formación de la película interfacial.

Por otra parte, altos valores de BSo nos indican que hay mayor densidad de gotas en la emulsión. En todos los casos estudiados, los valores de BSo variaron entre 54-60% y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (datos no mostrados). Las diferencias descriptas al comparar los IAE no se manifestaron en los valores de BSo.

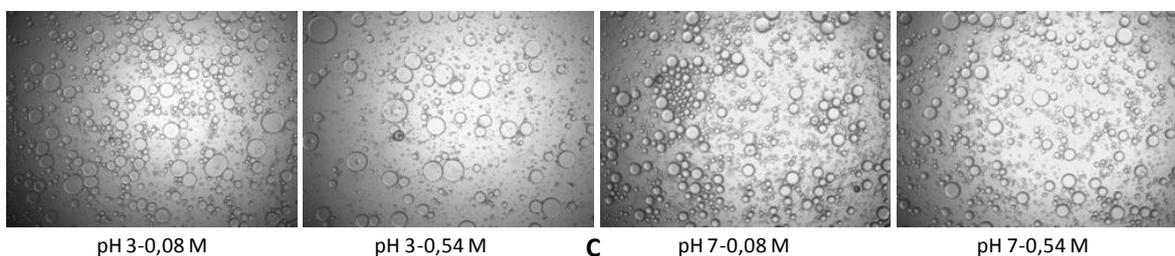
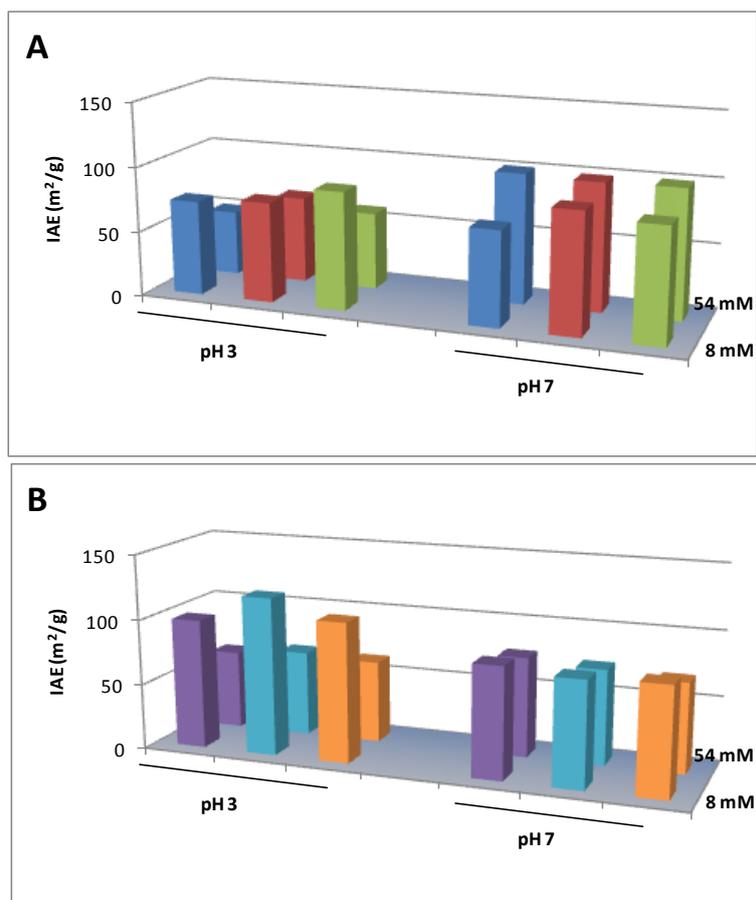


Figura III.7.: Propiedades emulsificantes. Capacidad de formación (IAE) de emulsiones a partir de **A)** concentrados (**Co-P** (■), **CoExA-P** (■) y **CoExS-P** (■)) y **B)** aislados (**Ai-P** (■), **AiExA-P** (■) y **AiExS-P** (■)) proteicos de girasol obtenidos en planta piloto, en función del pH y la fuerza iónica. **C)** Microscopía óptica (10X) de las emulsiones O/W obtenidas con **AiExS-P** en distintas condiciones de pH y fuerza iónica, en donde se observa la distribución inicial de tamaño de gota.

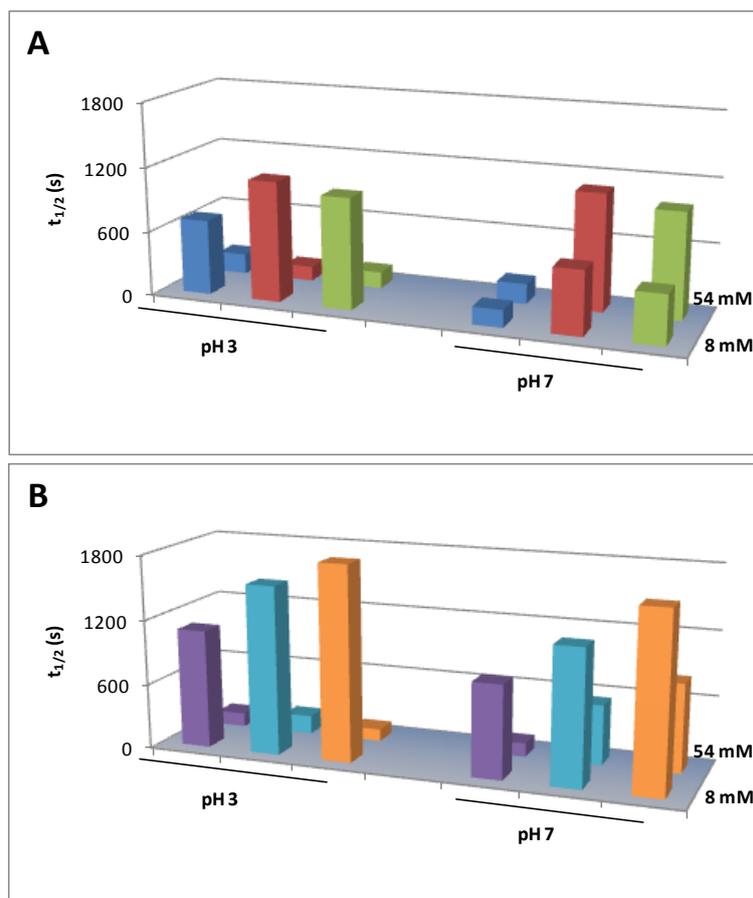


Figura III.8.: Propiedades emulsificantes. Estabilidad ($t_{1/2}$) de las emulsiones formadas a partir de **A)** concentrados (**Co-P** (■), **CoExA-P** (■) y **CoExS-P** (■)) y **B)** aislados (**Ai-P** (■), **AiExA-P** (■) y **AiExS-P** (■)) proteicos de girasol obtenidos en planta piloto, en función del pH y la fuerza iónica.

Al analizar la estabilidad de las emulsiones de los concentrados proteicos se observó que el $t_{1/2}$ de **CoExA-P** y **CoExS-P** fueron similares entre sí, y mayores que el $t_{1/2}$ de **Co-P** en todos los medios estudiados, excepto en pH 3-0,54 M NaCl, en donde todas las muestras se comportan igual (**Figura III.8.A.**). La menor estabilidad en este medio se podría atribuir a que las proteínas de girasol, en su conformación 2S, no son capaces de formar una película interfacial con las propiedades adecuadas y también a diferencias en la carga de la proteína a este pH. El parámetro IC (\approx 5-15%) siguió la misma tendencia descrita para el $t_{1/2}$ (datos no mostrados).

La estabilidad de las emulsiones de aislados proteicos de girasol, evaluada mediante $t_{1/2}$, fue mayor en las muestras con menor contenido fenólico por lo que la presencia de estos compuestos incide negativamente en esta propiedad. Se observó además una relación directa de la estabilidad de las emulsiones con los valores de H_o de las proteínas (con $r^2 > 0,90$; **Figura III.9.**), resultados similares para varias proteínas diferentes informaron Kato y Nakai (1980). Sin embargo, esta relación no es unívoca, indicándonos que hay más factores involucrados en el proceso de desestabilización, por ejemplo la presencia de agregados, la carga neta y el grado de desnaturalización, siendo más difíciles de cuantificar tales relaciones. El comportamiento observado para las muestras tratadas con sulfito, indicaría que las uniones disulfuro juegan un rol en la estabilización de las emulsiones, pudiendo contribuir a este fenómeno también su mayor H_o en relación a las muestras que no sufrieron este tratamiento.

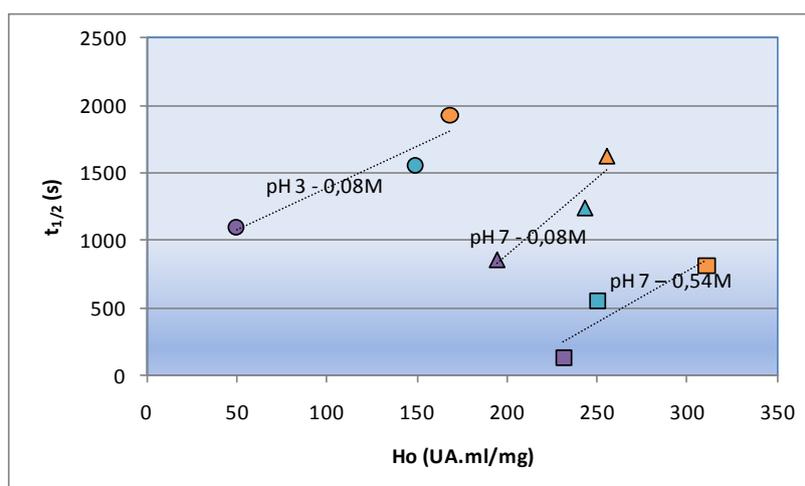


Figura III.9.: Relaciones entre la estabilidad ($t_{1/2}$) de las emulsiones y la H_o de las proteínas presentes en los aislados proteicos de girasol en distintos medios: pH 3-0,08 M NaCl (○), pH 7-0,08 M NaCl (△), pH 7-0,054 M NaCl (□). Los puntos con distintos colores corresponden a los aislados estudiados: Ai-P (■), AiExA-P (■) y AiExS-P (■).

Mientras tanto, todas las emulsiones que se obtuvieron a pH 3-0,54 M NaCl fueron muy inestables. Los aislados producen emulsiones estables a bajas fuerzas iónicas (0,08 M NaCl), siendo $t_{1/2}$ levemente superior a pH ácido, posiblemente debido a que la

proteína posee carga neta positiva, ayudando a mantener separadas las gotas de aceite por repulsión electrostática. Estos resultados están de acuerdo con los informados por González-Pérez y col. (2005), quienes estudian la estabilidad de las emulsiones de un aislado proteico de girasol con reducido contenido de fenoles.

Finalmente, es para destacar que las emulsiones elaboradas a partir de los productos proteicos de girasol obtenidos en planta piloto presentaron características similares a las producidas con soluciones de aislado proteico de soja comercial en agua (1 mg/ml) (BSo=57%; $t_{1/2}$ =2218 s; IC=13%).

Con estos resultados, es posible concluir que los productos proteicos de girasol son capaces de formar emulsiones, presentando mayor estabilidad a baja fuerza iónica. Las propiedades emulsificantes de los aislados fueron mejores que la de los concentrados.

Capacidad de formar y estabilizar espumas: El proceso de formación de una espuma consiste en la incorporación de gas, en general aire, a una solución proteica con creación de área interfacial, o sea formar burbujas rodeadas por una película proteica (Wagner, 2000). Para ejercer acción tensioactiva, la proteína debe ser rápidamente adsorbida en la interfase, o sea que debe difundir del seno de la solución hasta la interfase, penetrar en ella y acomodarse. En esta etapa se requieren moléculas solubles, pequeñas, flexibles y con adecuado balance hidrofóbico-hidrofílico. Posteriormente, las moléculas adsorbidas en la interfase deben ser capaces de interactuar entre sí para formar una película proteica con propiedades reológicas adecuadas rodeando las burbujas, en esta etapa deben formar agregados de gran tamaño, mínima carga superficial y alta capacidad de absorción de agua. Este sistema tiende a desestabilizarse por diferentes mecanismos (drenaje del líquido, flotación de las burbujas, desproporción y colapso), siendo la película proteica la barrera mecánica que se opone a este proceso (Damodaran, 1997).

Se evaluó la capacidad de formación de espumas mediante la velocidad de incorporación de líquido a la espuma (v_o) y el volumen máximo de líquido incorporado

(V_{max}). La estabilidad de la espuma formada se determinó mediante el parámetro $t_{1/2}$, que nos indica el tiempo necesario para que drene la mitad del líquido incorporado a la espuma al finalizar el burbujeo. En la **Figuras III.10.A. y III.10.B.** se muestra la capacidad de formación de espumas de los concentrados proteicos de girasol producidos en planta piloto. Se observó que todas las muestras presentaron similares v_o y V_{max} , excepto **Co-P** a pH 7, por lo que las diferencias en el contenido de fenoles no estarían afectando significativamente estos parámetros. Las proteínas presentes en estas muestras migraron rápidamente a la interfase (elevados $v_o \approx 10-12$ ml/min) e incorporaron gran cantidad de líquido en la espuma ($V_{max} \approx 5$ ml). La variación de pH sólo afectó a **Co-P**, que a pH 7 presentó la menor capacidad de formación de espuma (menores v_o y V_{max}), mientras que la fuerza iónica no tuvo efecto significativo sobre estos parámetros. Sólo las muestras de **Co-P** a pH 7 presentaron menor capacidad espumante. El **Co-P** es el que presentó los mayores contenidos de fenoles y de otros componentes, mayoritariamente glúcidos, que tal vez sean los responsables de este comportamiento.

Respecto a la estabilidad, se observó que muestras con distinto procesamiento y composición se comportan de manera diferente (**Figuras III.10.C.**), también se apreció que el pH y la fuerza iónica del medio afectaron a $t_{1/2}$, sugiriéndonos que estas variables modifican las propiedades de las películas proteicas interfaciales. Al disminuir el contenido de fenoles en los concentrados se observó un incremento en la estabilidad de las espumas formadas a ambos pHs, siendo más notorio a pH 3. Las espumas de concentrados proteicos de girasol presentaron la mayor estabilidad a pH 3 y 0,08 M NaCl (**Figura III.10.C.**). En esas condiciones las proteínas presentaron carga neta positiva y bajos valores de H_o (49-245 UA ml/mg). Al incrementar la fuerza iónica del medio a pH 3, la estabilidad de las espumas disminuyó posiblemente debido a que las proteínas adquieren conformación monomérica (2S ó subunidades $\alpha\beta$, **Figura 5.A.**) (Molina y col., 2004 y González-Pérez y col., 2008), siendo moléculas pequeñas, con elevada H_o (430-2435 UA ml/mg) y con menor capacidad de formar una película proteica interfacial resistente. Mientras que, a pH neutro, la estabilidad de las espumas aumentó con el incremento de la fuerza iónica del medio. A pH 7-0,08 M NaCl las proteínas de girasol formarían agregados solubles 15-18S que constituirían una

película proteica interfacial con mejores características que las formadas por la conformación hexamérica (11S, a pH 7-0,54 M NaCl, **Figura 5.C.**).

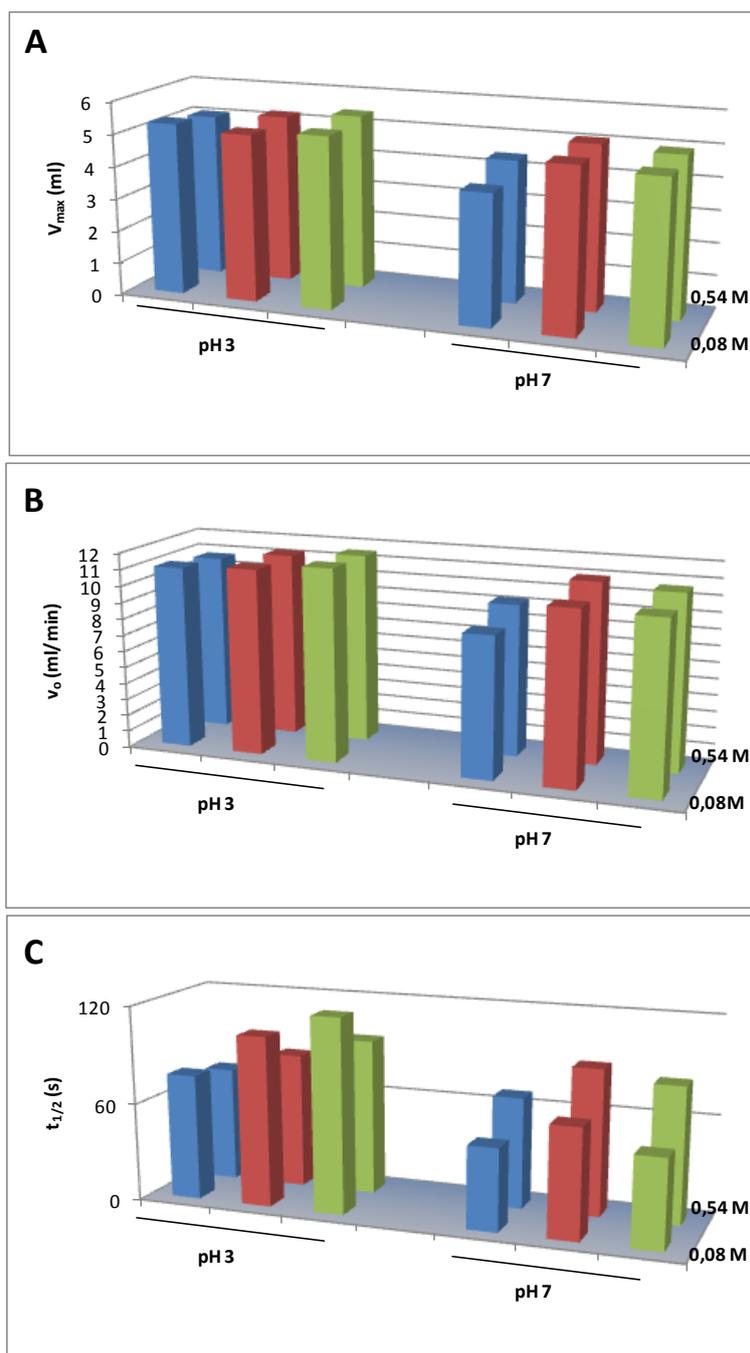


Figura III.10.: Propiedades espumantes de concentrados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto: **Co-P** (■), **CoExA-P** (■) y **CoExS-P** (■) en función del pH y la fuerza iónica. Estudio de la capacidad de formación: **A**) volumen máximo de líquido incorporado a la espuma (V_{max}) y **B**) velocidad de incorporación de líquido a la espuma (v_0). **C**) Estabilidad ($t_{1/2}$) de las espumas.

Al analizar las espumas de los aislados proteicos de girasol, se observó que todos presentaron similar capacidad de formación ($v_o \approx 11$ ml/min y $V_{max} \approx 5$ ml), independientemente de la composición o de las características del medio, sólo el pH tuvo efecto significativo sobre su estabilidad, siendo ésta mayor a pH neutro que a pH ácido (**Figura III.11.C.**). En la **Figura III.12.** se muestra, a modo de ejemplo, la desestabilización de espumas de **Ai-P** en pH 3 o pH 7 y 0,08 M NaCl. Se puede observar que al finalizar el burbujeo estas espumas presentaron una distribución homogénea con gran número de burbujas pequeñas y esféricas. Si bien todos los mecanismos de desestabilización ocurren de manera simultánea y sinérgicamente, en las espumas recién formadas predominan el drenaje del líquido y la flotación de las burbujas (Walstra, 1989). Al transcurrir en el tiempo, las características de ambas espumas se modificaron, las burbujas crecieron adquiriendo forma poliédrica y presentando una distribución heterogénea. En esta etapa los mecanismos que predominan son los de desproporción y colapso (Wagner, 2000). Se puede observar que éstos son más importantes en la desestabilización de las espumas formadas a pH 3 y 0,08 M NaCl. Este resultado no coincide con lo informado por González-Pérez y col. (2005), quienes emplean un aislado proteico de girasol con reducido contenido de fenoles, y obtienen espumas por el método de batido.

Las espumas obtenidas con proteínas de girasol presentaron características comparables a las de **BSA** (1 mg proteína/ml de agua) ($v_o=9,7$ ml/min, $V_{max}=4,7$ ml y $t_{1/2}=92$ s).

Con los resultados obtenidos, no fue posible encontrar relación entre los parámetros empleados para caracterizar las espumas y las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de girasol, entre ellas H_o . Esta situación también la describen otros autores, mencionando que sería conveniente relacionar dichos parámetros con la hidrofobicidad promedio y la densidad de carga neta de las macromoléculas (Townsend y col., 1983; Nakai, 1983; Kato y col., 1983; Damodaran, 2005). Estas observaciones podrían explicarse pensando que la proteína se despliega casi en su totalidad en la interfase aire-agua, debido a su elevada energía libre, exponiendo sus sitios hidrofóbicos ocultos, por lo que la hidrofobicidad superficial sólo facilitaría el anclaje de la proteína en la interfase (Damodaran, 2005).

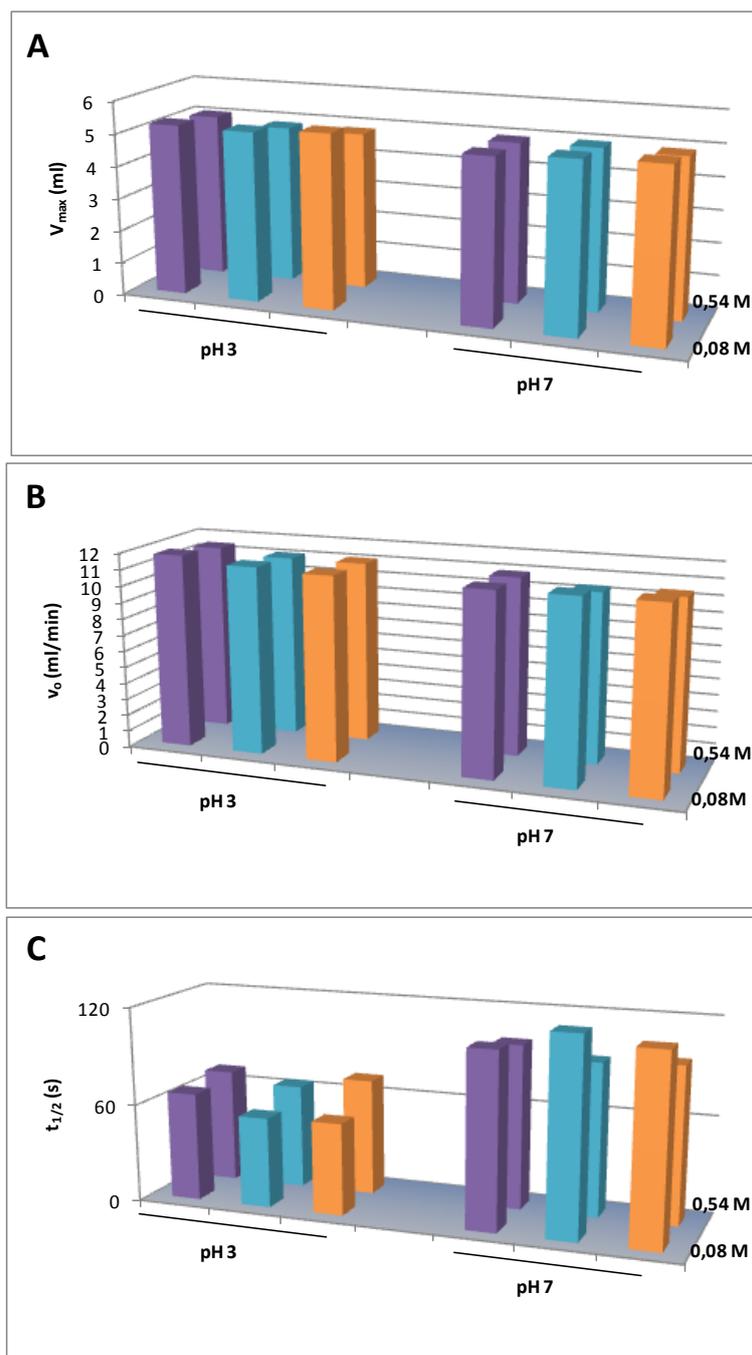


Figura III.11.: Propiedades espumantes de aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto: Ai-P (■), AiExA-P (■) y AiExS-P (■) en función del pH y la fuerza iónica. Estudio de la capacidad de formación: **A)** volumen máximo de líquido incorporado a la espuma (V_{max}) y **B)** velocidad de incorporación de líquido a la espuma (v_0). **C)** Estabilidad ($t_{1/2}$) de las espumas.

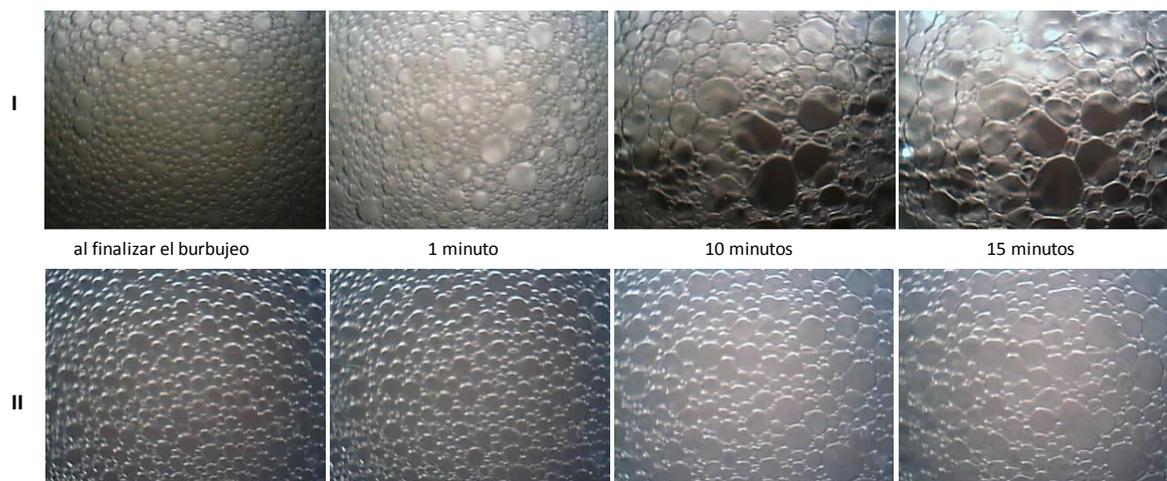


Figura III.12.: Desestabilización de espumas formadas con **Ai-P a I)** pH 3 y 0,08 M NaCl, y a **II)** pH 7 y 0,08 M NaCl.

Estos resultados nos indican que los productos proteicos de girasol obtenidos en planta piloto presentan buenas propiedades espumantes. Los concentrados proteicos forman espumas más estables en medio ácido, mientras que a pH neutro es conveniente emplear los aislados.

III.3.3.- Propiedades dependientes de la interacción proteína-proteína.

Gelificación: Se determinó la concentración mínima de aislado proteico de girasol que produce, por inducción térmica, un gel capaz de autoportarse. En este estudio se requiere gran cantidad de muestra, por lo que sólo se analizaron los aislados obtenidos en planta piloto. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura III.13.A**. En ella se puede apreciar que todos los aislados proteicos de girasol fueron capaces de formar geles. Se observó que las concentraciones mínimas de aislados requeridas para producir un gel proteico disminuyeron de 12,5% a 10% a medida que el tiempo de calentamiento se incrementó de 5-15 a 20-25 minutos. Sólo se necesitó, como mínimo, 15% del **Ai-P** para formar un gel al ser calentado durante 5 minutos, por lo que los fenoles no tendrían un efecto marcado en la formación del gel para tiempos mayores a 5 minutos.

Es conocido que varias proteínas de origen vegetal de la familia de las cupinas, como soja y amaranto, presentan buenas propiedades gelificantes (Puppo y col., 1995; O'Kane y col., 2004; Avanza y col., 2005; Makri y col., 2005; Ee y col., 2009), por lo que se esperaría que las proteínas de girasol también presenten dichas propiedades. La mínima concentración para formar geles de aislados proteicos de amaranto es 7% (Avanza y col., 2005), mientras que para aislados de soja varía entre 10 y 14% (Puppo y col., 1995; O'Kane y col., 2004; Makri y col., 2005; Ee y col., 2009). Sin embargo, en bibliografía es posible encontrar resultados controvertidos respecto a la capacidad de gelificación de las proteínas de girasol. Por un lado, Sosulski (1979) y Sánchez y Burgos (1997) informaron que las proteínas de girasol no poseen la capacidad de gelificar. Por otro, González-Pérez y col. (2008) reportan que es posible formar geles por inducción térmica (a 98°C) a partir de dispersiones de proteínas de girasol (al 10% p/v), pero que éstos resultaron más débiles que los obtenidos en iguales condiciones con las glicininas de soja (G' : 500 Pa y 5000 Pa, respectivamente).

El aspecto de los geles obtenidos fue diferente, su color varió dependiendo del aislado proteico empleado para su elaboración, según lo discutido previamente. En todos los casos se observó, como es de esperar, que al incrementar la concentración de proteínas, éstos se volvieron más oscuros. Esta característica tendría que tenerse en cuenta al emplearlo en la formulación de alimentos.

La dureza del gel se vio afectada por la concentración de proteínas, el tipo de aislado proteico y el tiempo de calentamiento. Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras III.13.B., III.13.C. y III.13.D.** Allí se puede observar que, para todos los aislados estudiados en concentraciones mayores al 10%, al incrementar la concentración de proteínas y/o el tiempo de calentamiento, se producen geles más resistentes, con mayor dureza. Posiblemente debido a la mayor probabilidad de interacción entre las cadenas polipeptídicas, debido a la concentración y/o a la desnaturalización proteica ocurrida en las condiciones de formación, que permite que las proteínas expongan sus sitios de interacción que antes estaban ocultos. Cabe recordar que las muestras en estudio se encontraban parcialmente desnaturalizadas y no presentaban diferencias significativas en sus grados de desnaturalización, sin embargo se observó un comportamiento particular: el **Ai-P** formó geles más débiles que los de aislados con

extracción de fenoles. Este hecho nos indica que la presencia de fenoles interfiere en la formación de la matriz proteica, formando un gel más blando. En general, en medio alcalino, la estabilidad de los geles proteicos está relacionada principalmente con la formación de uniones disulfuro, y en menor medida por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Las uniones disulfuro incrementan la dureza de la matriz proteica, mientras que las interacciones no covalentes ayudan a mantener su estructura (Zheng y col., 1993; Puppo y col., 1998; Avanza y col., 2005). Consecuentemente, se podría pensar que los geles de **Ai-P** son más blandos (menos resistentes) que los de **AiExA-P** y **AiExS-P**, debido a que posee mayor cantidad de compuestos fenólicos capaces de interactuar con los grupos sulfhidrilos de las proteínas (Venkatesh y col., 1993; Rawel y col., 2001), disminuyendo así la posibilidad de formar de uniones disulfuro.

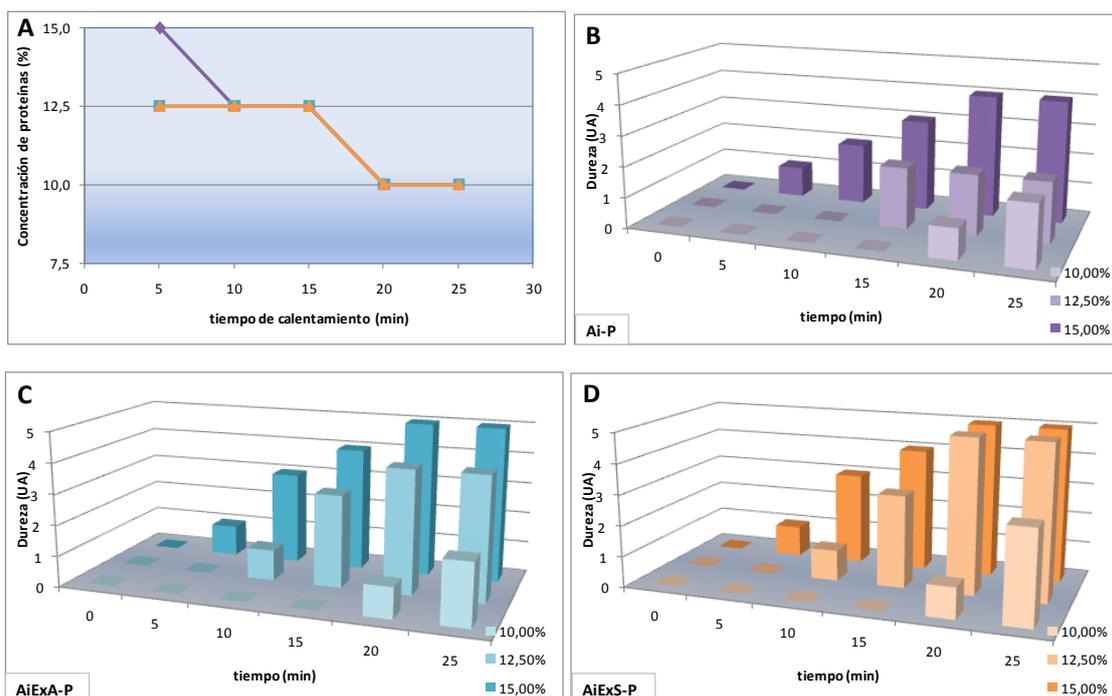


Figura III.13.: Propiedades de gelificación. **A)** Concentración mínima de gelificación de los distintos aislados proteicos de girasol (Ai-P (●), AiExA-P (■) y AiExS-P (▲)) en función del tiempo de calentamiento. Efecto del tiempo de calentamiento (a 100°C) y la concentración de **B) Ai-P**, **C) AiExA-P** y **D) AiExS-P** sobre la dureza de los geles formados.

Cabe mencionar que estos estudios son preliminares, pero demuestran que los aislados proteicos de girasol producidos en planta piloto poseen la capacidad de formar geles autosoportados con diferentes características y propiedades. Por lo tanto, se genera la necesidad de ahondar en el estudio de las propiedades físicas, texturales y reológicas de los geles proteicos obtenidos, para permitirnos conocer el sistema y sus potenciales aplicaciones en la industria de alimentos.

III.3.4.- Capacidad antioxidante

Está descrito en bibliografía que los compuestos fenólicos poseen propiedades antioxidantes (Prior y col., 2005), por ende, se podría pensar que las muestras con las que estamos trabajando también exhibirían dicha capacidad. La metodología desarrollada para evaluar la capacidad antioxidante es muy diversa. En este trabajo elegimos realizar el ensayo de inhibición del radical ABTS^{•+} por ser un método sencillo, por ser el radical soluble en medios acuosos y orgánicos, y porque los cambios de pH y fuerza iónica no interfieren en su determinación (Prior y col., 2005). En la **Figura III.14.A.** se presentan los resultados obtenidos para los productos proteicos de girasol. En ella se puede apreciar que todas las muestras en estudio presentaron capacidad antioxidante. Los **Co-L** y **Co-P** son las muestras que presentaron mayor capacidad antioxidantes y las que poseen mayor contenido de compuestos fenólicos. También se puede apreciar que **CoExS-L** presentó valores mayores que **CoExA-L**, a pesar que ambos poseen bajo contenido de fenoles. Este hecho podría explicarse debido a que **CoExS-L** podría retener cantidades residuales de sulfito de sodio (menor a 500 ppm), compuesto con carácter reductor, que interferiría en esta determinación. El mismo comportamiento lo registran los respectivos productos de planta. Todos los concentrados presentaron mayor capacidad antioxidante que sus respectivos aislados proteicos de girasol, debido a su mayor contenido de compuestos fenólicos. Por otra parte, el cambio de escala (de laboratorio a planta piloto) sólo afectó a las muestras que se obtuvieron sin extracción de fenoles (**Co-L**, **Co-P**, **Ai-L** y **Ai-P**), lográndose menor porcentaje de inhibición en los productos de planta, posiblemente por oxidación de fenoles durante el secado spray.

Si bien los fenoles están interaccionando con las proteínas, éstos no perdieron su capacidad de capturar al radical $ABTS^+$. Todas las muestras proteicas de girasol presentaron mayor capacidad antioxidante que **Asoja**, el que presentó una capacidad de inhibición del radical $ABTS^{•+}$ de 12,9%. Finalmente, en la **Figura III.14.B.** se muestra la correlación lineal obtenida entre capacidad de inhibición del radical $ABTS^{•+}$ y porcentaje de compuestos fenólicos solubles ($r^2=0,9501$).

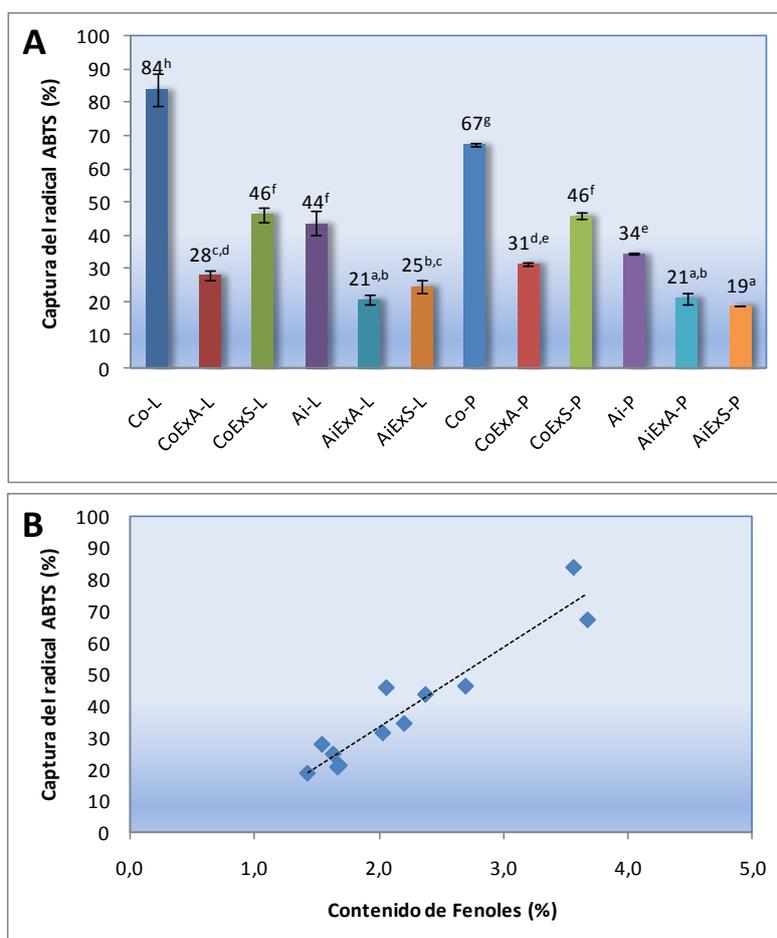


Figura III.14.: Propiedades antioxidantes. **A)** Capacidad antioxidante (inhibición del radical $ABTS^+$) de concentrados y aislados proteicos de girasol. **B)** Correlación lineal entre capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos presentes en las muestras. Se muestran valores promedio \pm desviación estándar. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Estos resultados nos indican que la presencia de compuestos fenólicos (imposibles de eliminar por estar interaccionando fuertemente con las proteínas) en productos proteicos de girasol le confiere buenas propiedades antioxidantes. Este hecho plantea la necesidad de realizar estudios más detallados sobre esta propiedad, y al mismo tiempo, amplía el campo de aplicación de concentrados y aislados proteicos de girasol.

III.4.- Conclusiones

a.- Los productos proteicos de girasol obtenidos en este trabajo presentaron a_w menores a 0,6, resultando seguros desde el punto de vista microbiológico. Además, presentaron elevada solubilidad, baja capacidad de imbibición de agua y moderada capacidad de retención de agua. Los cambios conformacionales que sufrieron las proteínas al realizar los lavados para eliminar compuestos fenólicos, evidenciados en mayores H_o , favorecieron las interacciones proteína-agua, reflejándose en menores a_w y mayores Q .

b.- Los concentrados y los aislados proteicos de girasol fueron capaces de formar emulsiones, siendo éstas más estables en medios con baja fuerza iónica. Las propiedades emulsificantes de los aislados fueron mejores que las de los correspondientes concentrados proteicos. La estabilidad ($t_{1/2}$) de los aislados proteicos se pudo correlacionar de manera directa, pero no unívoca, con la H_o de las proteínas presentes. Las muestras tratadas con sulfito mostraron mayor estabilidad e hidrofobicidad superficial.

c.- Los productos proteicos de girasol obtenidos en planta piloto presentaron buena capacidad para formar espumas a distintos pHs y fuerzas iónicas. Las mayores diferencias se encontraron en la estabilidad de estos sistemas. Los concentrados proteicos formaron espumas más estables en medio ácido, mientras que a pH neutro son más estables las obtenidas con los aislados proteicos.

d.- Empleando los aislados proteicos de girasol producidos en planta piloto fue posible obtener geles autoportables por inducción térmica, con distintas características y propiedades. La presencia de compuestos fenólicos afectó el aspecto visual de los geles obtenidos y disminuyó su dureza. Resultaría importante la realización de estudios más detallados sobre las propiedades gelificantes de estos productos proteicos de girasol.

e.- Todos los productos proteicos de girasol presentaron buenas propiedades antioxidantes, encontrándose una correlación lineal directa entre ésta y el contenido

de compuestos fenólicos solubles. La capacidad antioxidante de los concentrados fue mayor que la de los respectivos aislados proteicos. Con estos resultados surge la necesidad de realizar estudios más exhaustivos sobre esta propiedad, dado que amplía el potencial campo de aplicación de estos productos proteicos.

Capítulo IV: Películas flexibles, biodegradables y/o
comestibles obtenidas a partir de aislados
proteicos de girasol

Capítulo IV: “PELÍCULAS FLEXIBLES, BIODEGRADABLES Y COMESTIBLES OBTENIDAS A PARTIR DE AISLADOS PROTEICOS DE GIRASOL”

IV.1.- Introducción

Durante los últimos años ha crecido el interés por el uso de polímeros biodegradables para el desarrollo de nuevos materiales como posible solución a los problemas de contaminación ambiental y manejo de residuos sólidos causados por la acumulación de envases sintéticos no degradables, así como también al futuro incierto del suministro de petróleo (Petersen y col., 1999; Arvanitoyannis, 1999; Heller y col., 2003). El uso de biopolímeros derivados de la agricultura se presenta como una alternativa interesante a los polímeros sintéticos, especialmente para aquellas aplicaciones de vida corta y/o cuando la degradación rápida se presenta como una ventaja, por ejemplo *packaging* de alimentos y plásticos para la agricultura (Cuq y col., 1998). Estos polímeros naturales además de ser recursos renovables y estar ampliamente disponibles, resultan económicos frente a otros polímeros biodegradables (por ejemplo ácido poliláctico, polihidroxicanoatos, etc.), especialmente si provienen de residuos o subproductos industriales (Cruz-Romero y col., 2008).

Numerosas agro-proteínas como las de gluten de trigo (Gontard y col., 1994; Mangata y col., 2000; Irissin-Mangata y col., 2001; Olabarrieta y col., 2006), zeínas de maíz (Gennadios y col., 1990; Lai y col., 1997), de soja (Brandengurg y col., 1993; Rhim y col., 2003; Kim y col., 2003; Ou y col., 2005; Mauri y col., 2006; Denavi y col., 2009), de amaranto (Tapia-Blácido y col., 2007), de arroz (Gnanasambandam y col., 1997; Adebisi y col., 2008), de algodón (Marquie y col., 1995), de sorgo (Emmambux y col., 2004) y de girasol (Ayhllon-Meixueiro y col., 2000; Orliac y col., 2003; Roulliy y col., 2006) han sido estudiadas por su capacidad de formar películas comestibles y/o biodegradables (Gennadios, 2002).

En la actualidad, las películas formuladas a partir de proteínas pueden formarse por dos procesos tecnológicos: uno “húmedo” basado en la dispersión o solubilización de

las proteínas (“*casting*”), y otro “seco” basado en las propiedades termoplásticas de estas macromoléculas a bajas concentraciones de agua (Cuq y col., 1997). Si bien en los últimos años ha crecido el interés en la obtención de estos materiales con técnicas de procesamiento de polímeros: moldeo por compresión, inyección y extrusión (Cuq y col., 1997; Micard y col., 2001; Foulk y col., 2001; Zhang y col., 2001; Orliac y col., 2002; Orliac y col., 2003; Rouilly y col., 2006; Hernández-Izquierdo y col., 2008), la obtención de los mismos por el proceso húmedo sigue siendo extensamente estudiada, ya que existen antecedentes de escalado de este tipo de procesos (“*spread coating*”) y también es la forma en que generalmente se obtienen los recubrimientos.

Comparadas con las películas sintéticas (polietileno de baja -LDPE- y de alta densidad -HDPE-, por ejemplo), las películas proteicas suelen presentar excelentes propiedades de barrera al oxígeno, a los lípidos y a los aromas; propiedades mecánicas moderadas, pero comúnmente muestran alta permeabilidad al vapor de agua, debido al carácter hidrofílico de estas macromoléculas (Gennadios y col., 1994; Krochta 1997; Cuq y col., 1998). Estas propiedades están determinadas por la microestructura de las películas, la que a su vez depende significativamente de la estructura inicial de las proteínas y del método de preparación (Denavi y col., 2008). La estructura tridimensional de las proteínas y las variaciones en la formulación y en las condiciones de obtención de las películas condicionarán fundamentalmente la habilidad de las proteínas para interactuar entre sí y con los otros componentes de la formulación, determinando así el número y tipo de interacciones que estabilizan la matriz polimérica, entre ellas: enlaces disulfuro, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas. Las interacciones proteína-proteína involucradas en la formación de la película determinarán el grado de entrecruzamiento y el carácter hidrofílico-hidrofóbico de la matriz, y se correlacionarán con las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera de las películas resultantes (Mauri y col., 2006 y 2008).

Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas y barrera de estos materiales y así poder extender su uso, numerosos estudios se ocuparon de la modificación de las formulaciones iniciales por tratamientos físicos, químicos y enzimáticos (Ghorpade y col., 1995; Rangavajhyala y col., 1997; Stuchell y col., 1994; Krochta, 1997; Rhim y col., 2000; Mauri y col., 2006 y 2008), de la formación de materiales a partir de mezclas de

proteínas con otros polímeros (Shih, 1994; Rhim y col., 1999; Cao y col., 2007; Su y col., 2007), del agregado de lípidos a la formulación (Gontard y col., 1995; Weller y col., 1998; Debeaufort y col., 2000) y del refuerzo de las matrices proteicas con fibras (Beg y col., 2005, Liu y col., 2004 y 2005) y con nanocargas (Dufresne y col., 1997; Eichhorn y col., 2001; Noishiki y col., 2002; Angles y col., 2000 y 2001). Los beneficios de estas películas además podrían incrementarse aún más si se utilizan como vehículos de distintos tipos de aditivos, tales como antioxidantes, agentes microbianos, vitaminas, *flavors* y colorantes (León y col., 2006; Flores y col., 2006; Han y col., 2007; Gómez-Estaca y col., 2008).

Particularmente, las proteínas de girasol han demostrado poseer propiedades adecuadas para su utilización en la obtención de películas por *casting* (Ayhllon-Meixueiro y col., 2000) y por termopresado (Orliac y col., 2003). En estos estudios sólo se evaluaron algunas de las propiedades de los materiales resultantes, sin considerar relaciones entre éstas y las características estructurales de estas proteínas.

Como se mostró en los capítulos anteriores, las proteínas de girasol poseen compuestos fenólicos asociados, los cuales presentaron elevada capacidad antioxidante. Por lo tanto las películas formadas a partir de los aislados proteicos de girasol en estudio podrían presentar como ventaja estar activas naturalmente.

En este contexto, se plantearon como objetivos para este capítulo:

- Evaluar si los fenoles presentes en los productos proteicos de girasol convierten a las películas proteicas obtenidas en activas, y analizar como su presencia afecta la funcionalidad de estos materiales.
- Optimizar las propiedades mecánicas y de barrera de las películas proteicas desarrolladas mediante variaciones simples en la formulación inicial.

IV.2.- Materiales y Métodos

IV.2.1.- Materiales

Se estudió la formación de películas biodegradables y/o comestibles a partir de los concentrados y aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto: **Co-P**, **CoExA-P**, **CoExS-P**, **Ai-P**, **AiExA-P**, **AiExS-P** y un aislado proteico de soja comercial (**ASoja**, Supra 500E, The Solae Company, Brasil), que se usó como patrón. Como plastificantes se emplearon: glicerol (**G**, Anedra, Argentina), sorbitol (**S**, Anedra, Argentina), polietilenglicol 400 (**PEG**, Anedra, Argentina). Se formaron películas bicapa agregando una capa de cera de abejas (**Bicapa**, Sigma-Aldrich, Alemania), y películas compuestas a las que se les agregó celulosa microcristalina (**CM**; Avicel® PH-101, Fluka, Sigma-Aldrich, Alemania).

IV.2.2.- Formación de las películas

Las películas proteicas se obtuvieron por *casting* a partir de dispersiones acuosas de los productos proteicos (5% p/p) y el plastificante. Las dispersiones se formaron agitando magnéticamente los componentes durante 30 minutos a temperatura ambiente, ajustando el pH al valor deseado (2,5, 7 u 11) 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 5 horas. Las películas así formadas se acondicionaron a 20°C y 58% HR (solución saturada de NaBr) durante 48 horas previo a su caracterización.

Las variables que se estudiaron fueron: tipo de producto proteico -**Co-P**, **CoExA-P**, **CoExS-P**, **Ai-P**, **AiExA-P**, **AiExS-P** y **ASoja**-, tipo de plastificante -**G**, **S**, **PEG**-, cantidad de plastificante -10%, 20%, 30%, 40% p/p respecto de la masa de aislado- y pH de la dispersión inicial -2,5, 7, 11-. Además se estudió el agregado de celulosa microcristalina en polvo en la dispersión inicial (5% y 10% p/p respecto de la masa de aislado, **CM-5** y **CM-10** respectivamente). También, se adicionó una capa de cera de abejas fundida sobre la película proteica previamente formada, se esparció de manera homogénea y se enfrió permitiendo la formación de una película bicapa (**Bicapa**) (Denavi, 2009).

IV.2.3.- Caracterización de las películas proteicas

Contenido de humedad: Se determinó luego de secar la película en una estufa a 105°C durante 24 horas. Las películas fueron cortadas en pequeños especímenes y se colocaron en placas de Petri, se pesaron antes y después del secado en la estufa. El contenido de humedad se calculó como el porcentaje de pérdida de peso, respecto del peso original (ASTM D644-94; 1994). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

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

Opacidad: Se analizó el espectro de absorbancia de las películas en función de la longitud de onda, entre 400 y 800 nm. Para ello 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 ($UA\text{ mm}^{-1}$) 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 cuadruplicado.

Color: para su determinación se empleó un colorímetro (CR 300, Minolta Chroma Co., Osaka, Japón), procediendo como se detalló en el **Capítulo I**, sección **I.2.9**. Los valores informados son la media de nueve determinaciones sobre cada una de las muestras.

Determinación de temperatura de transición vítrea (T_g): Las T_g 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

colocaron pequeños trozos de las películas proteicas ($\cong 10$ 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 y por último calentamiento entre -100 y 220°C a 10°C/min. La temperatura de transición vítrea (T_g , 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 col., 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.

Capacidad antioxidante: La capacidad antioxidante de las películas proteicas se determinó mediante el ensayo con el radical $ABTS^{\bullet+}$ (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)), que fue producido según se describió en el **Capítulo III**, sección **III.2.5**. Para realizar el ensayo, se colocaron 5 mg de la película proteica, se le agregaron 50 μ l de buffer fosfato de sodio (0,01M y pH 7,4) y 950 μ l de la solución conteniendo el radical $ABTS^{\bullet+}$ (con absorbancia de 0,7). Se agitó durante 2 minutos en vortex y posteriormente se centrifugó a 9000xg durante 3 minutos a temperatura ambiente (A15, B. Braun Biotech International, Estados Unidos). El sobrenadante fue separado y, a los 6 minutos de haber agregado el radical $ABTS^{\bullet+}$, se midió su absorbancia a 734 nm. Como blanco de reactivo se realizó el mismo procedimiento, colocando 25 μ l adicionales del buffer fosfato de sodio en lugar de la película proteica. La capacidad antioxidante, de capturar el radical $ABTS^{\bullet+}$, se calculó según la **Ecuación IV.1**.

$$CAO = \frac{Abs_{br} - Abs_m}{Abs_{br}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación IV.1.}$$

Donde: CAO : Capacidad antioxidante, de capturar el radical $ABTS^{\bullet+}$ (%); Abs_{br} : Absorbancia a 734 nm del blanco de reactivos; Abs_m : Absorbancia a 734 nm de la muestra.

Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Isotermas de sorción: Se determinaron las isotermas de sorción de las películas proteicas por el método estático. Las películas fueron almacenadas a 20°C en atmósferas con diferentes humedades relativas (a_w : 0,07, 0,249, 0,337, 0,431, 0,580, 0,655, 0,754, 0,853, 0,907) obtenidas utilizando distintas soluciones salinas saturadas (NaOH, $KC_2H_3O_2$, $MgCl_2$, K_2CO_3 , NaBr, $NaNO_2$, NaCl, KCl, y $BaCl_2$ respectivamente) (Labuza y col., 2000). Se colocaron pequeñas porciones de las películas previamente deshidratadas en recipientes cerrados a humedades relativas constantes a 20°C y sin circulación de aire, hasta asegurarse alcanzar el equilibrio (21 días). Se determinó la cantidad de agua absorbida por gramo de película seca (X_{eq}) por diferencia entre el peso inicial y el peso final. Para cada formulación se realizaron triplicados.

Los valores experimentales (X_{eq}) se ajustaron con el modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB), según la **Ecuación IV.2.**

$$X_{eq} = \frac{X_o \cdot K \cdot C \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)} \quad \text{Ecuación IV.2.}$$

Donde: X_{eq} : contenido de humedad de las muestras (en base seca) en el equilibrio (gH_2O/g película seca) a determinada actividad acuosa (a_w), X_o : contenido de humedad (en base seca) de la monocapa (gH_2O/g película seca), C: constante de Guggenheim asociada al calor de sorción en la monocapa, y K: Constante asociada al calor de sorción de multicapas.

Los parámetros del modelo (X_o , K y C) se determinaron por regresión cuadrática de a_w/X_{eq} versus a_w , empleando el programa Statgraphics plus, versión 5.1 (Statgraphics, Estados Unidos).

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°C, colocando las celdas en un desecador (**Figura IV.1.a.**). La fuerza impulsora a través de la película, expresada como el gradiente de presión parcial de vapor, fue de 1753,35 Pa. Para mantener dicha fuerza impulsora se utilizó sílica anhidra ($HR_c=0$) en la celda de permeación, y solución saturada de NaCl ($HR_d=0,75$) en el desecador. La humedad relativa dentro de la celda

fue siempre menor que la del desecador, por lo que 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 8 determinaciones de peso de la celda de permeación, durante 5 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 (Figura IV.1.B.). La permeabilidad al vapor de agua se calculó según la **Ecuación IV.3.**

$$WVP = \frac{(\Delta m / \Delta t)}{P_v^{H_2O} \cdot (HR_d - HR_c) \cdot A} \cdot e \quad \text{Ecuación IV.3.}$$

Donde: WVP: Permeabilidad al vapor de agua ($\text{g H}_2\text{O Pa}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-1}$); $\Delta m/\Delta t$: velocidad de permeación del vapor de agua ($\text{g H}_2\text{O s}^{-1}$); e : espesor de la película; $P_v^{H_2O}$: presión de vapor de agua (Pa); 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 por triplicado.

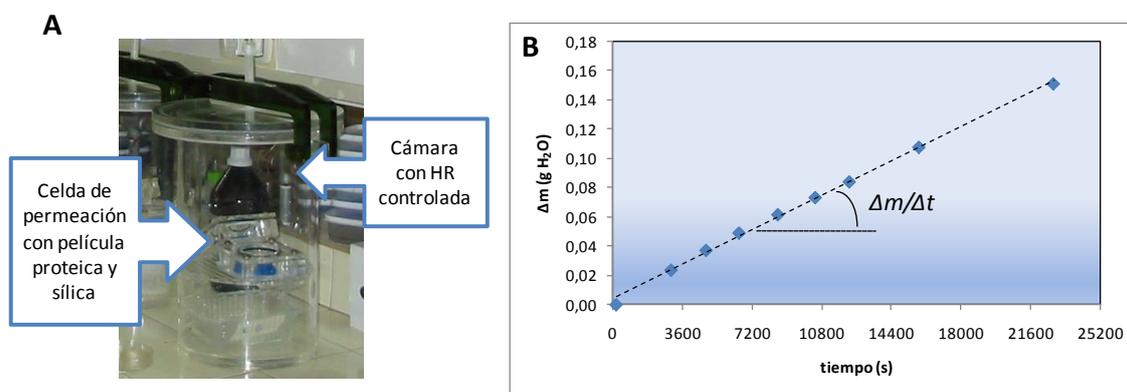


Figura IV.1. Medida de la permeabilidad al vapor de agua. **A)** Dispositivo de medida, en donde se puede observar la película proteica colocada en la celda de permeación (con sílica en su interior, $HR_c=0$) dentro de una cámara con humedad relativa controlada (con solución saturada de NaCl, $HR_d=0,75$). **B)** Determinación de la velocidad de permeación del vapor de agua a través de la película proteica ($\Delta m/\Delta t$).

Coefficientes de solubilidad y difusividad efectiva del agua en la película: Se determinaron empleando la metodología descrita por Larotonda y col. (2005). El coeficiente de solubilidad del agua en la película proteica (β), se calculó por medio de la **Ecuación IV.4.**, que se obtiene de diferenciar el modelo de GAB (**Ecuación IV.2.**) respecto de a_w y dividir el resultado por la presión de vapor de agua ($P_v^{H_2O}$) a la temperatura de trabajo (20°C).

$$\beta = \frac{C \cdot K \cdot X_o}{P_v^{H_2O}} \cdot \left[\frac{1}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)} - \frac{a_w}{[(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w)]^2} \times [-K \cdot (1 - K \cdot a_w + C \cdot K \cdot a_w) + (1 - K \cdot a_w) \cdot (-K + C \cdot K)] \right] \quad \text{Ecuación IV.4.}$$

Donde: β : coeficiente de solubilidad del agua en la película proteica (g H₂O/Pa g película seca); ρ^s : densidad de la película seca (g película seca/m³); X_o , C y K los parámetros del modelo de GAB (a 20°C), X_o : contenido de humedad (en base seca) de la monocapa (g H₂O/g película seca), C: constante de Guggenheim asociada al calor de sorción en la monocapa y K: constante asociada al calor de sorción de multicapa; $P_v^{H_2O}$: presión de vapor de agua (Pa) y a_w : actividad acuosa.

El coeficiente de difusión efectivo del agua en la película proteica (D_{ef}) se determinó mediante la **Ecuación IV.5.**

$$D_{ef} = \frac{WVP}{\rho^s \cdot \beta} \quad \text{Ecuación IV.5.}$$

Donde: D_{ef} : coeficiente de difusión efectivo del agua en la película proteica (m² s); WVP: permeabilidad al vapor de agua determinada a 75% HR y 20°C (g H₂O Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹); β : coeficiente de solubilidad del agua en la película proteica a $a_w=0,75$; 20°C (g H₂O/Pa g película seca); ρ^s : densidad de la película seca (g película seca/m³).

Propiedades mecánicas: se determinaron las propiedades mecánicas en ensayos de 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 (**Figura IV.2.A.**). 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 IV.2.B.** se muestra una de estas curvas a modo de ejemplo. De las mismas se obtuvieron la resistencia máxima a la tracción al momento de ruptura (σ_{\max}), el porcentaje máximo de elongación (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 seis determinaciones por cada película evaluada, empleando al menos dos películas por formulación.

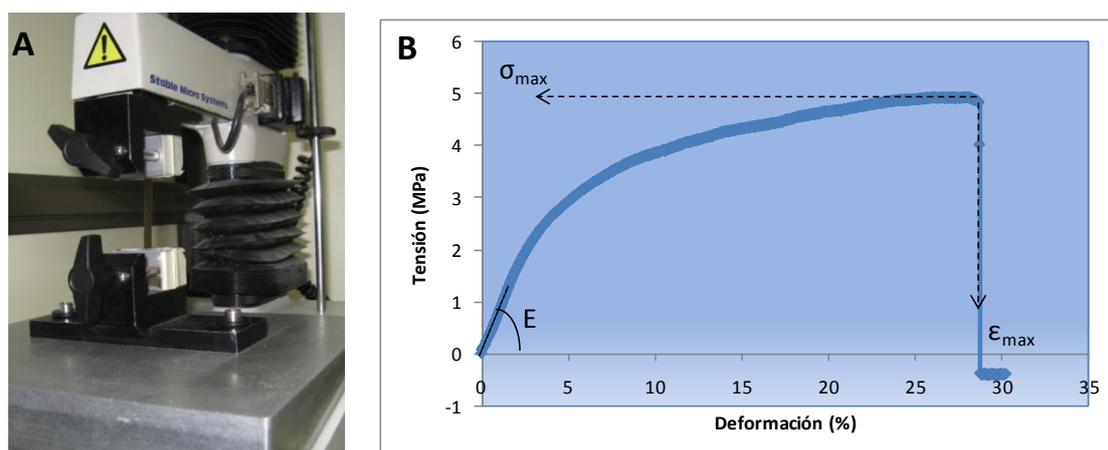


Figura IV.2. Evaluación de las propiedades mecánicas. **A)** Dispositivo empleado en el ensayo de tracción. **B)** Curva tensión vs. deformación para una película proteica de girasol, en donde se pueden observar los parámetros evaluados: módulo elástico (E), resistencia máxima a la tracción al momento de ruptura (σ_{\max}), y el porcentaje máximo de elongación (ϵ_{\max}).

Solubilidad diferencial de proteínas: Se determinó la solubilidad diferencial de las proteínas presentes en las películas según el método descrito por Mauri y col. (2006), con algunas modificaciones menores. Pequeñas porciones de las películas (\cong 100 mg) fueron pesadas y colocadas en tubos conteniendo 1 ml de solvente. Se estudió la solubilidad en agua (**A**) y cinco sistemas buffer diferentes: i) **BF:** buffer fosfato pH 7,5

0,1M, 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, v) **BFDUM**: BFSU con mercaptoetanol 2,5% v/v (Sigma-Aldrich, Alemania), todos a pH 7,5. Los tubos fueron agitados a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente las suspensiones fueron centrifugadas a 9000 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente. La concentración de proteínas en los sobrenadantes fue determinada utilizando 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, y expresada como porcentaje (%p/p) respecto a la cantidad total de proteína presente en cada película. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Alícuotas de los sobrenadantes se corrieron en geles de electroforesis SDS-PAGE, siguiendo la metodología descrita en el **Capítulo I** (sección **1.2.8.**) con el fin de observar la composición polipeptídica disuelta.

IV.2.4.- 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 Statgraphics plus, versión 5.1 (Statgraphics, Estados Unidos).

IV.3.- Resultados y Discusión

Se formaron películas biodegradables por *casting* a partir de dispersiones proteicas de los productos proteicos de girasol con distinto contenido de fenoles, obtenidos en planta piloto: **Co-P**, **CoExA-P**, **CoExS-P**, **Ai-P**, **AiExA-P** y **AiExS-P** (5% p/p), usando glicerol (**G**; 1,5% p/p) como plastificante. Dada la gran cantidad de materia prima requerida para estos estudios, los productos proteicos obtenidos en laboratorio no fueron incluidos. También se empleó un aislado proteico de soja comercial (**ASoja**) como patrón de comparación, debido al conocimiento previo de sus propiedades. Si bien todas las muestras derivadas del *pellet* de girasol fueron capaces de formar películas homogéneas, las producidas a partir de los concentrados proteicos de girasol (**Co-P**, **CoExA-P** y **CoExS-P**) no pudieron ser desmoldadas. Esto podría deberse a que, bajo las condiciones de procesamiento utilizadas (concentraciones de proteína y plastificante, y condiciones de secado), estas películas sufren un proceso de deshidratación incompleta, que podría atribuirse a sus mayores contenidos de hidratos de carbono y/o sales, que retendrían mayor contenido de agua. Los porcentajes de humedad de estas películas fueron elevados, próximos a 35-37%.

IV.3.1.- Caracterización de películas biodegradables formadas a partir de aislados proteicos de girasol

En la **Tabla IV.1.** se presentan los espesores y los porcentajes de humedad de las películas obtenidas por *casting* a partir de **Ai-P**, **AiExA-P**, **AiExS-P** y **ASoja**. Todas las películas presentaron espesores entre 71 y 80 μm y contenidos de humedad cercanos al 25%, no observándose diferencias significativas en estos valores al variar el aislado proteico utilizado.

Los termogramas obtenidos por DSC de todas las películas proteicas estudiadas presentaron dos temperaturas de transición vítrea, una a temperaturas cercanas a -69°C y otra a -28°C (**Tabla IV.1.**), no observándose diferencias significativas en sus valores al variar el aislado, ni siquiera al comparar las películas de girasol con las de soja. Dado que todas las películas presentaban el mismo contenido de plastificantes

(glicerol y agua), si se hubiesen encontrado diferencias estas se hubiesen atribuido a distintos grados de entrecruzamiento. La presencia de dos temperaturas de transición vítrea, según Sobral y col. (2001), es típica de sistemas que presentan separaciones de fases. Las mismas podrían atribuirse a la existencia de zonas enriquecidas en los distintos componentes, siendo Tg_1 (-69°C) correspondiente a una fase rica en glicerol, mientras que Tg_2 (-28°C) se debería a una fase rica en proteínas. Cherian y col. (1995) también informaron dos valores de Tg en películas de proteínas de gluten de trigo plastificadas con sacarosa y, por su parte, Sobral y col. (2001) observaron el mismo comportamiento en películas de proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de peces plastificadas con glicerol. Mientras que, otros autores sólo informaron una Tg en películas de proteínas de suero de leche (Anker y col., 1991), de gluten de trigo (Gontard y col., 1996) y de soja (Shaw y col., 2002; Denavi y col., 2009), todas plastificadas con glicerol.

Tabla IV.1.: Espesor, contenido de humedad y temperaturas de transición vítrea (Tg_1 , Tg_2) de las películas obtenidas a partir de aislados proteicos de girasol

Aislados Proteicos	Espesor (μm)	Humedad (%)	Transición Tg_1 ($^\circ\text{C}$)	Vítrea Tg_2 ($^\circ\text{C}$)
Ai-P	71 ± 11^a	$25,88 \pm 2,38^a$	$-69,94 \pm 0,01^a$	$-29,12 \pm 0,18^a$
AiExA-P	74 ± 13^a	$26,34 \pm 1,13^a$	$-69,93 \pm 0,01^a$	$-28,74 \pm 0,11^a$
AiExS-P	80 ± 10^a	$24,93 \pm 1,35^a$	$-69,94 \pm 0,01^a$	$-28,93 \pm 0,52^a$
ASoja	75 ± 17^a	$23,97 \pm 1,45^a$	$-69,92 \pm 0,02^a$	$-28,71 \pm 0,21^a$

Se informan valores promedio \pm desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Para conocer las potenciales aplicaciones de estos materiales proteicos, es necesario evaluar sus propiedades de barrera y mecánicas. Se determinaron entonces las permeabilidades al vapor de agua (WVP) de las películas obtenidas, los resultados se muestran en la **Tabla IV.2.** En ella es posible apreciar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de WVP, a pesar que los

aislados con menor contenido de fenoles (**AiExA-P** o **AiExS-P**) habían mostrado tener proteínas con mayor hidrofobicidad superficial (**Capítulo II**, sección **II.3.3**). La WVP depende, tanto de la solubilidad como de la difusividad efectiva del agua en la película proteica, por lo tanto se determinaron dichos parámetros (β y D_{ef} respectivamente) y los resultados se muestran en la **Tabla IV.2**. Allí se observa que las distintas muestras no presentaron diferencias en estos parámetros, explicando de este modo los resultados de WVP. Tampoco se observaron diferencias entre la WVP de las películas proteicas de girasol y de soja, a pesar de la diferencia en la composición en residuos de aminoácidos entre estas proteínas (Molina y col., 2004). Los valores de WVP encontrados en este estudio son característicos de películas proteicas (Gennadios y col., 1993; Rhim y col., 2000; Mauri y col., 2006; Martelli y col., 2006; Denavi y col., 2009), pero mayores que las WVP de los polímeros sintéticos (polipropileno: $6,5 \cdot 10^{-13}$, cloruro de polivinilo: $0,7-2,4 \cdot 10^{-13}$, polietileno de baja densidad: $7,3-9,7 \cdot 10^{-13}$ y polietileno de alta densidad: $2,4 \cdot 10^{-13}$ g H₂O Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹) (Gennadios y col., 1993; Cuq y col., 1998; Lin y col., 2007).

Tabla IV.2.: Permeabilidad al vapor de agua (WVP), parámetros del modelo de GAB para las isotermas de sorción de las películas proteicas en estudio, coeficiente de solubilidad del agua en la película (β) y difusividad efectiva (D_{ef}).

Aislados Proteicos	WVP* (*10 ⁻¹⁰)	Isotermas de Sorción - Modelo GAB*				β^* (*10 ⁻⁴)	D_{ef}^* (*10 ⁻⁷)
		X ₀	C	K	r ²		
Ai-P	1,45 ± 0,01 ^a	0,2416	50,40	0,8724	0,9840	7,7	1,28
AiExA-P	1,49 ± 0,07 ^a	0,1756	86,15	0,9459	0,9761	8,5	1,17
AiExS-P	1,46 ± 0,01 ^a	0,1793	41,52	0,9265	0,9761	7,9	1,23
ASoja	1,49 ± 0,07 ^a	0,1647	9,98	0,9508	0,9879	8,5	1,21

*Unidades de WVP: gH₂O Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹; X₀: g H₂O/g película seca; de β : g H₂O/Pa g película seca; de D_{ef} : m² s⁻¹. Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con p≤0,05.

En la **Figura IV.3**. se muestran las isotermas de sorción de las películas proteicas en estudio. Allí se observa que las isotermas presentaron una forma sigmoidea (con C >2),

volviéndose asintótica cuando la a_w tiende a 1, siendo esta forma característica de productos ricos en proteínas o almidón. Además es posible apreciar que las películas de **Ai-P** fueron las que adsorbieron mayor cantidad de agua en el rango de 0,070-0,853, mientras que a mayores valores de a_w todas las películas presentaron el mismo comportamiento. El modelo de GAB fue adecuado para describir matemáticamente las isothermas de sorción ($r^2 > 0,97$). Sin embargo a altas humedades relativas ($a_w > 0,9$) el modelo se separa de los datos experimentales, debido a que asume adsorción física en multicapas, y en esta zona el sorbato presenta propiedades de agua pura.

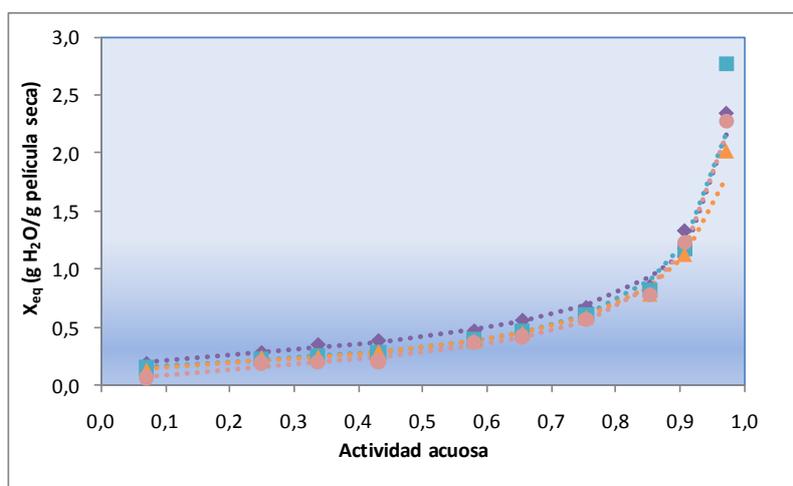


Figura IV.3.: Isothermas de sorción de las películas proteicas de girasol: **Ai-P** (●), **AiExA-P** (■) y **AiExS-P** (▲) y de soja: **ASoja** (●). Los símbolos llenos corresponden a los puntos experimentales y las curvas punteadas a su ajuste empleando el modelo de GAB.

En la **Tabla IV.2.** se presentan los parámetros que se obtuvieron al ajustar los datos experimentales con el modelo de GAB. En ella es posible observar que el valor de humedad en monocapa (X_0) fue mayor en las películas de **Ai-P**, siendo este aislado el que presentó la mayor cantidad de hidratos de carbono y además, sus proteínas fueron las que poseían la menor hidrofobicidad superficial. Cabe señalar que los niveles de adsorción de agua encontrados en este estudio fueron similares a los informados por otros autores para distintas películas proteicas (Gennadios y col., 1994; Cuq y col., 1997; Velásquez y col., 2001).

Los resultados obtenidos en la evaluación de las propiedades mecánicas de las películas proteicas en tracción se presentan en la **Tabla IV.3**. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de tensión (≈ 4 MPa) y de elongación a la rotura ($\approx 24\%$), ni en el módulo elástico ($\approx 0,58$ %/MPa) de las películas obtenidas con los distintos aislados proteicos de girasol. Estas propiedades mecánicas son moderadas y se encuentran en el rango de las reportadas en bibliografía para otras películas proteicas (Aydt y col., 1991; Gennadios y col., 1993; Rhim y col., 2000; Sobral y col., 2001; Ou y col., 2005; Moore y col., 2006; Tapia-Blácido y col., 2007; Denavi y col., 2009). Cabe destacar que Ayhllon-Meixueiro y col. (2000) obtuvieron películas de proteínas de girasol por *casting* con similares valores de tensión (3,9 MPa) pero con mayores valores de deformación a la rotura (250%), a partir de dispersiones proteicas más concentradas (10% p/p) y mayor proporción de glicerol (50% p/p respecto de la masa de aislado). El mayor espesor de esas películas (170-200 μm), así como el mayor contenido de plastificante seguramente hayan influido negativamente en el comportamiento barrera al vapor de agua de esas películas, valor que no fue informado (McHugh y col., 1993; Ghorpade y col., 1995; Gennadios y col., 1996).

Tabla IV.3.: Propiedades mecánicas en tracción. Tensión a la ruptura (σ_{max}), deformación (ϵ_{max}) y módulo elástico (E) de las películas proteicas en estudio.

Aislados Proteicos	Propiedades mecánicas		
	σ_{max} (MPa)	ϵ_{max} (%)	E (MPa/%)
Ai-P	$4,21 \pm 1,12^{a,b}$	$25,96 \pm 3,06^b$	$0,60 \pm 0,17^a$
AiExA-P	$3,62 \pm 0,59^a$	$25,86 \pm 5,27^{a,b}$	$0,53 \pm 0,11^a$
AiExS-P	$4,07 \pm 0,50^{a,b}$	$19,98 \pm 7,08^a$	$0,60 \pm 0,10^a$
ASoja	$4,55 \pm 0,70^b$	$102,18 \pm 10,94^c$	$0,89 \pm 0,18^b$

Se informan valores promedio \pm desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Por otra parte, las películas de **ASoja** evaluadas en este trabajo, presentaron similar resistencia pero mayores deformaciones a la rotura (aproximadamente 4 veces) y

módulo elástico (aproximadamente 1,5 veces) que las formadas con aislados proteicos de girasol. Estos resultados sugieren que hay características diferenciales entre las matrices proteicas de girasol y de soja que afectan las propiedades de las películas, especialmente la capacidad de deformarse antes de alcanzar la ruptura (ϵ_{\max}) y el módulo elástico (E). Dado que todas las películas estaban constituidas por la misma concentración de proteínas y plastificante (agua y glicerol), las diferencias encontradas tendrían que estar asociadas a la forma en que las proteínas se encuentran interactuando en la matriz que forma la película. Para avanzar en este sentido se estudió la solubilidad diferencial de las proteínas de las películas en sistemas buffers que tienen la capacidad de romper distintos tipos de interacciones, con el fin de conocer el tipo y la proporción de interacciones involucradas en la estabilización de la red proteica. En la **Figura IV.4.A.** se muestran los resultados obtenidos. Se observó que las películas obtenidas a partir de **Ai-P** presentaron valores moderados de solubilidad en agua ($\approx 40\%$). En este sistema estamos cuantificando los polipéptidos libres que no están fuertemente ligados a la red proteica. Como era de esperar, estos valores fueron menores que la solubilidad proteica en agua del aislado **Ai-P** ($\approx 90\%$). Al emplear buffer fosfato de sodio 0,1M a pH 7,5 (BF), la solubilidad proteica de la película disminuyó, posiblemente porque este medio estaría favoreciendo las interacciones iónicas entre las cadenas polipeptídicas produciendo un efecto de *salting out*. El detergente SDS (BFD) tiene la capacidad de debilitar interacciones hidrofóbicas, mientras que la urea (BFU) modifica la capacidad de formar puentes de hidrógeno. El incremento de la solubilidad observado al tratar las películas con estos buffers indicaría que tanto las interacciones hidrofóbicas como puentes de hidrógeno estabilizarían la estructura de la película. Finalmente, la adición de β -mercaptoetanol (BFDUM) pone en evidencia la presencia de enlaces por puentes disulfuro. Se puede ver que este tipo de interacción también cumple un importante papel en la formación de la red proteica, ya que al romper este tipo de enlace, es posible alcanzar valores de solubilidad muy altos (80-90%). En la **Figura IV.4.A.** también es posible observar que las películas proteicas de girasol obtenidas a partir de **AiExA-P** y **AiExS-P**, presentaron mayores solubilidades en agua pero comportamientos similares en el resto de los buffers respecto de los descrito para las películas de **Ai-P**.

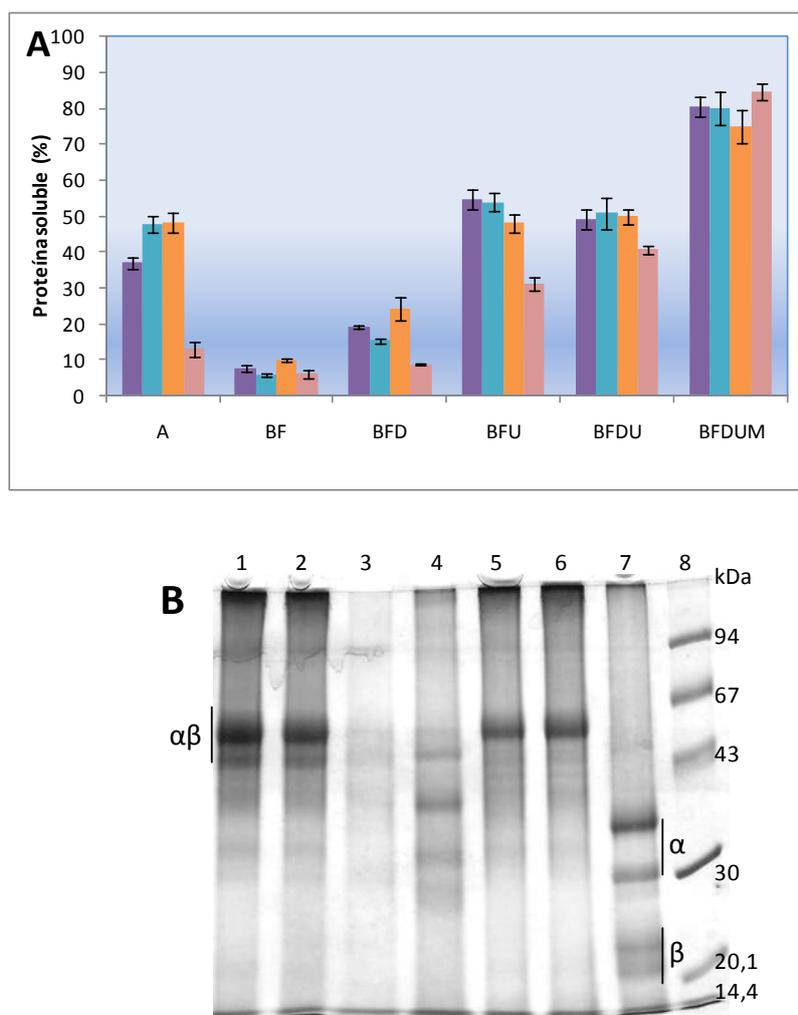


Figura IV.4.: Solubilidad diferencial de las películas proteicas: **Ai-P** (■), **AiExA-P** (■), **AiExS-P** (■) y **ASoja** (■). **A)** Porcentajes de proteína soluble en medios con distinta actividad química: Agua (A), Buffer fosfato de sodio 0,1M (BF), BF con SDS 0,1% p/v (BFD), BF con urea 6M (BFU), BF con SDS 0,1% p/v y urea 6M (BFDU), BFDU con β-mercaptoetanol 2,5% v/v (BFDUM), todos a pH 7,5. **B)** Electroforesis SDS-PAGE. Calles: **1)** solución filmogénica inicial de **Ai-P**, proteínas solubles en **2)** A, **3)** BF, **4)** BFD, **5)** BFU, **6)** BFDU, **7)** BFDUM, **8)** patrones de bajo peso molecular (LMW). Se informan valores promedio ± desviación estándar.

En la **Figura IV.4.B.** se muestran los perfiles electroforéticos de las fracciones proteicas solubles en cada sistema, de las películas de **Ai-P**, a modo de ejemplo. Se puede observar la presencia de subunidades αβ de la heliantina (45-62 kDa) en la solución

filmogénica inicial (calle 1). Estas subunidades también fueron extraídas de la película con agua (calle 2), pero están ausentes en las calles 3 y 4, en donde se solubilizaron componentes de menor tamaño molecular. Las subunidades $\alpha\beta$ también pudieron ser extraídas al utilizar los buffers conteniendo urea y SDS (calles 5 y 6), y cuando se agregó un agente reductor se observó la disociación de la misma en los polipéptidos α y β (calle 8). Estos resultados indican que la globulina 11S tiene un rol preponderante en la formación de la estructura de la película. La disminución de solubilidad de las películas observada al emplear el BF, estaría de acuerdo con la tendencia de esta proteína a formar agregados 15S a esta fuerza iónica (Molina y col., 2004).

Las proteínas presentes en las películas de **ASoja** presentaron un perfil de solubilidades diferenciales distinto a las de girasol. En la **Figura IV.4.A.** se observa que las de soja presentaron menores valores de solubilidad en agua y en buffer fosfato, hecho que llama la atención ya que las globulinas 7S y 11S de soja son mucho más polares y solubles que las de girasol. Evidentemente estas características les permiten generar asociaciones mucho más fuerte entre sí y con otros componentes de las películas. Estas interacciones fueron debilitadas al incluir SDS y urea en el buffer, alcanzándose en este caso valores aún menores pero más cercanos a los de girasol. En presencia de un agente reductor también se alcanzaron valores de solubilidad altos ($\approx 90\%$).

Las altas solubilidades obtenidas tanto para las películas conteniendo proteínas de girasol como de soja, en un medio desnaturizante en presencia de un agente reductor, indicarían que las uniones disulfuro juegan un rol muy importante en la formación de este tipo de películas. Se ha mostrado en bibliografía que aquellos materiales con mayor capacidad de unirse por este tipo de interacciones forman matrices más resistentes y más elongables (Pérez-Gago y col., 2001; Choi y col., 2003). En este trabajo no se encontraron diferencias en resistencia, pero sí en elongación. Este hecho sugiere que la cantidad de uniones disulfuros que forman la red proteica de **ASoja** es tal que permite incrementar la elongación (cuatro veces mayores que los de girasol), sin modificar significativamente la tensión que puede soportar el material. Las proteínas de soja presentan menor contenido de cisteína que las de girasol (<http://www.expasy.org>; <http://www.asagir.org.ar>; <http://www.solae.com>), por lo que se podría pensar que estas últimas tienen mayor probabilidad para formar uniones

disulfuro, sin embargo también hay que considerar que este proceso se ve facilitado cuando las proteínas se encuentran desnaturalizadas (Darby y col., 1995), como sucede en **ASoja**. Cabe recordar que los aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto presentaron una alta proporción de agregados solubles mediados por uniones disulfuro y que sus proteínas aún mantenían cierto grado de conformación nativa (grado de desnaturalización del 60%) (**Capítulo II, Figura II.3.A.**), estas razones justifican la menor disponibilidad de estos grupos para interactuar entre sí y las diferencias de solubilidad en BFDUM descritas (**Figura IV.4.A.**).

La elasticidad asociada a la presencia de uniones disulfuro puede compararse con lo que sucede en la formación de la red de gluten en la masa panaria (Lindsay y col., 1999), en este caso estas proteínas poseen una estructura de tipo ordenamiento al azar, lo que apoyaría la hipótesis que una desnaturalización de la proteína sería importante para conferir las características a la película.

Entre el 15 y 20% de las proteínas presentes en las películas de girasol o de soja no fueron solubilizadas en los medios extractivo utilizados. Este hecho nos estaría indicando la presencia de interacciones covalentes como las que se forman al someter proteínas a pH alcalino y altas temperaturas y/o a la reacción entre los grupos amino de la proteína y los azúcares reductores presentes en los aislados (reacción de Maillard).

Las interacciones que forman la red proteica afectan las propiedades de barrera de estas películas. En bibliografía se menciona que los materiales unidos mayoritariamente por puentes de hidrógeno, como sucede en las películas proteicas de girasol comparadas con las de soja, en general terminan presentando mayores WVP (Sobral y col., 2008), sin embargo, esta relación no se observó en este trabajo.

Las películas de **Ai-P**, el aislado con mayor contenido de fenoles, presentaron propiedades térmicas, mecánicas y de barrera similares a las de los otros aislados proteicos de girasol estudiados (**AiExA-P** y **AiExS-P**), sugiriéndonos que el contenido de compuestos fenólicos no afecta estas propiedades. Sin embargo, el aspecto de las películas fue totalmente diferente (**Figura IV.5.**).

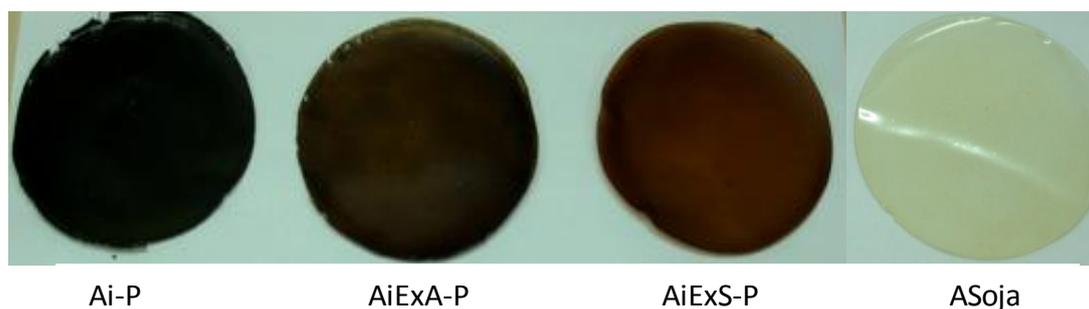


Figura IV.5.: Fotografía de las películas obtenidas por *casting* a partir de aislados proteicos de girasol de planta piloto: **Ai-P**, **AiExA-P** y **AiExS-P**, y de **ASoja**.

Las propiedades ópticas (color y opacidad) de las películas obtenidas se muestran en la **Tabla IV.4**. Se evidenció una relación directa entre la coloración de las películas y el color de los aislados proteicos que las formaron. Las películas de **Ai-P** presentaron los menores valores de a (siendo estos negativos), de L y b indicándonos una tonalidad verde oscura. Mientras que al emplear los aislados proteicos de girasol con menor contenido de fenoles (**AiExA-P** y **AiExS-P**) en la formulación de las películas, se observó un incremento en sus parámetros de cromaticidad y luminosidad, indicándonos que las películas se vuelven de color marrón (a y b positivos) y más claras (mayor L), lo que resulta en una menor coloración general (menor ΔE). Las películas de **ASoja**, que a la vista presentan una suave coloración amarilla, mostraron los mayores valores de L , moderados valores de a y b y el menor ΔE . En cuanto a su opacidad (**Tabla IV.4.**), la tendencia de este parámetro resultó similar a la descrita para el ΔE . Las películas de girasol presentaron mayor opacidad que las de **ASoja**, siendo las películas de **Ai-P** las que mostraron mayor opacidad. La coloración intensa sin duda limita algunas posibles aplicaciones de estos materiales en *packaging* de alimentos. Así por ejemplo, no podrían utilizarse para empacar productos que interesan visualizarse a través del envoltorio (por ejemplo vegetales mínimamente procesados), pues la dificultad en la visualización disminuiría la aceptabilidad por parte de los potenciales consumidores.

Tabla IV.4.: Propiedades ópticas de las películas proteicas obtenidas a partir de aislados proteicos de girasol y de soja.

Aislados Proteicos	Parámetros de Color Hunter Lab				Opacidad (UA mm ⁻¹)
	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE	
Ai-P	29,49 ± 0,86 ^a	-1,49 ± 0,55 ^b	2,72 ± 1,13 ^a	67,85 ± 0,83 ^a	22,34 ± 1,63c
AiExA-P	37,27 ± 2,10 ^b	6,59 ± 0,10 ^c	15,06 ± 2,94 ^b	61,92 ± 1,38 ^b	17,75 ± 1,00b
AiExS-P	43,10 ± 1,52 ^c	15,21 ± 0,64 ^d	24,62 ± 2,11 ^c	60,79 ± 0,57 ^b	16,81 ± 0,47b
ASoja	93,23 ± 0,69 ^d	-3,83 ± 0,32 ^a	16,91 ± 1,53 ^b	16,24 ± 1,65 ^c	1,50 ± 0,48a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Como recubrimientos solo podrían proteger alimentos de coloración similar, aunque dado el espesor muy delgado de los recubrimientos no siempre se observan cambios en la coloración de los productos recubiertos. Sin embargo podrían emplearse, si sus propiedades lo admiten, para aplicaciones donde no interesa la coloración o donde ésta termina teniendo alguna finalidad extra. Este el caso de los plásticos utilizados en *mulching* -o acolchado-. Esta es una técnica que consiste básicamente en cubrir el suelo con distintos materiales, evitando así que el terreno quede expuesto al contacto con el aire. Tiene efectos sobre el suelo y el ambiente: conserva la humedad, mantiene una buena estructura, ofrece una mejor utilización de los abonos, da protección en el nacimiento de las plantas, reduce el número de frutos dañados y favorece a la eliminación de las malas hierbas. El color y la transparencia como aditivos inteligentes agregados a la fabricación pueden lograr un material con un efecto térmico y herbicida que no mancha ni quema los frutos. Actualmente, con esta finalidad se comercializan materiales sintéticos con distintas coloraciones, entre ellas *mulching* verde, que por presentar la capacidad de reflejar luz fotosintéticamente activa y permitir pasar el resto del espectro logra un efecto herbicida, un mayor desarrollo radicular y la mineralización de la materia orgánica (<http://www.agroredes.com.ar>). La aplicación de materiales biodegradables en agricultura intensiva, es de suma importancia debido a la dificultad que implica la gestión de residuos plásticos en las zonas donde se encuentra los invernaderos en nuestro país, y la distancia que separa unos de otros. En la **Figura**

IV.6. se muestra el espectro visible de las películas proteicas de girasol y el de la clorofila. De la misma se deduce que especialmente la película de **Ai-P** podría llegar a emplearse para esta finalidad dado que absorbe en la misma zona que la clorofila, por lo que seguramente no permitiría el crecimiento de malezas.

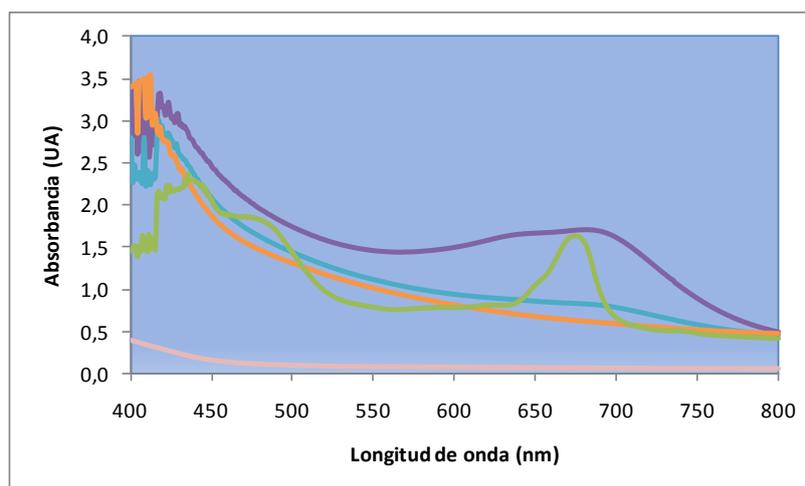


Figura IV.6.: Espectros visibles de las películas proteicas de girasol: **Ai-P** (—), **AiExA-P** (—) y **AiExS-P** (—), películas proteicas de soja: **ASoja** (—), y de clorofila (—) extraída de espinaca (*Spinaca oleracea*) con una solución acuosa de acetona 40%.

En los últimos años se han publicado trabajos en donde se agregan compuestos antioxidantes a distintas matrices proteicas para aumentar la vida útil del producto en contacto con la película (Han y col., 2007; Gómez-Estaca y col., 2008). Debido a la actividad antioxidante registrada en los productos proteicos de girasol, por la presencia de compuestos fenólicos, se evaluó esta propiedad en las películas proteicas, encontrándose que todos los materiales producidos con proteínas de girasol presentaron propiedades antioxidantes (**Figura IV.7.**). Entre ellas, las películas de **Ai-P** y **AiExS-P** presentaron una mayor capacidad de capturar al radical $ABTS^{\bullet+}$ ($\approx 10\%$), que las de **AiExA-P** (que sólo lo capturaron en un 7,5%). A diferencia de las películas de girasol, las de **ASoja** no presentaron esta propiedad. Esta característica resulta de interés, ya que las películas proteicas de girasol estarían actuando como “*carriers*” de compuestos antioxidantes, de forma natural, sin la necesidad de agregar otro tipo de

compuestos, que después habría que evaluar si lograron tener la actividad una vez retenidos en la matriz proteica. A pesar que los resultados de evaluación de las propiedades antioxidantes resultaron positivos, sería necesario evaluar la actividad de estas películas en un sistema alimentario real, siendo necesario realizar estudios más exhaustivos. Por otra parte, cabe resaltar que si es esta propiedad la que resulta interesante aplicar en un sistema real, valdría la pena buscar las condiciones apropiadas de obtención de las películas proteicas a partir del concentrado proteico **Co-P**, que de los productos estudiados en este trabajo de tesis es el presentaba mayor contenido de compuestos fenólicos.

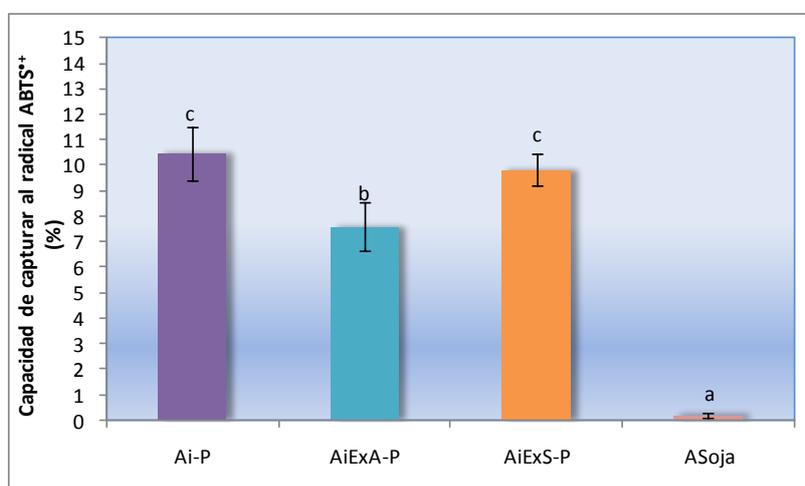


Figura IV.7.: Actividad antioxidante, capacidad de capturar al radical ABTS⁺, de las películas proteicas de girasol (**Ai-P**, **AiExA-P** y **AiExS-P**) y de soja (**ASoja**). Se informan valores promedio \pm desviación estándar. Los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

De esta manera se puede concluir que los aislados proteicos de girasol obtenidos en planta piloto pueden formar películas biodegradables por casting. Estas presentan permeabilidad al vapor de agua y tensión a la ruptura comparables a las películas de ASoja. Si bien estas propiedades son inferiores a las que presentan los materiales sintéticos, estos materiales proteicos servirían para aplicaciones determinadas, teniendo como ventaja adicional su biodegradabilidad. El contenido de fenoles sólo

afectó su apariencia (color) y sus propiedades ópticas (opacidad), lo que si bien podría pensarse como una limitación para algunas aplicaciones como packaging de alimentos, podría llegar a ser ventajosa para otros usos, tales como en plásticos para la agricultura (por ejemplo en "mulching"). Además estas películas pueden considerarse "activas" debido a la actividad antioxidante que presentan, y están actuando naturalmente como "carriers" de compuestos fenólicos.

IV.3.2.- Optimización de la funcionalidad de las películas de Ai-P a través de variaciones simples en la formulación utilizada.

Con el fin de mejorar algunas de las propiedades presentadas por estos materiales, se estudiaron algunas variaciones sencillas en las formulaciones en base a aislados proteicos de girasol **Ai-P**.

Efecto del tipo y concentración de plastificante: Las películas sólo formadas a partir de proteínas son muy frágiles, debido al gran número de interacciones entre las cadenas polipeptídicas, por lo que se quiebran fácilmente al manipularlas (Gennadios, 2002). Este comportamiento se puede evitar con el agregado de plastificantes, los cuales por lo general son moléculas pequeñas que se introducen entre las cadenas poliméricas, aumentando el volumen libre y la movilidad entre ellas, disminuyendo así el número de interacciones proteína-proteína y produciendo películas más elásticas pero menos resistentes (Orliac y col., 2003; Sobral y col., 2008). En general, con esta función se agregan glicerol, sorbitol, polietilenglicol, sacarosa, etc. a la formulación. El agua presente en las películas, también actúa como plastificante. El tipo y la cantidad de plastificante también afectan las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas proteicas o de polisacáridos (Gennadios y col., 1996; Mali y col., 2006).

En este trabajo se estudió el efecto del agregado de tres plastificantes: glicerol (**G**), sorbitol (**S**) ó polietilenglicol 400 (**PEG**), en distintas proporciones (10%, 20%, 30% y 40% p/p respecto a la masa de aislado) a la formulación inicial.

El tipo y la cantidad de plastificante no tuvieron efecto sobre el espesor de las películas (75 µm, en promedio). El contenido de humedad de las películas proteicas se presenta

en la **Tabla IV.5.** Se observó que las películas de **Ai-P** plastificadas con **S** o con **PEG** presentaron contenidos de humedad cercanos al 12-14%, sin mostrar variaciones al incrementar el contenido de plastificante. El mismo contenido de humedad presentaron las películas con 10% de glicerol, sin embargo este valor se incrementó con la concentración de plastificante. Estos resultados nos indican que **G** posee mayor poder plastificante que **S** y **PEG**. Similares resultados describieron Gennadios y col. (1996).

Tabla IV.5.: Contenido de humedad (%) de las películas proteicas obtenidas a partir de **Ai-P**, con diferente tipo -Glicerol (**G**), Sorbitol (**S**) y Polietilenglicol (**PEG**)- y contenido de plastificantes.

Tipo de Plastificante	Contenido de Plastificante (%)			
	10	20	30	40
G	13,96 ± 2,51 ^a	19,77 ± 0,02 ^b	25,88 ± 2,38 ^c	32,63 ± 0,96 ^d
S	14,21 ± 0,74 ^a	12,94 ± 0,48 ^a	13,33 ± 0,13 ^a	13,64 ± 1,80 ^a
PEG	12,07 ± 0,54 ^a	13,66 ± 1,72 ^a	12,12 ± 1,25 ^a	13,33 ± 0,56 ^a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, y en filas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Las propiedades de barrera al vapor de agua y mecánicas de las películas en estudio se muestran en las **Figura IV.8.A.** y **IV.8.B.**, respectivamente. Las películas plastificadas con 10% y 20% de **S** ó **PEG** y con 10% de **G** no pudieron ser evaluadas debido a su gran fragilidad. En la **Figura IV.8.A.** se puede observar que la WVP de las películas, aumentó con el incremento de **G** o **PEG**. Mientras que el aumento en el contenido de **S** no produjo diferencias significativas en esta propiedad, siendo éstos los menores valores de WVP. En general, las películas proteicas (Gontard y col., 1993; Gennadios y col., 1994; Jangchud y col., 1999; Lim y col., 1999; Coupland y col., 2000; Alvarez Hayes y col., 2003; Tapia-Blácido y col., 2007) o de polisacáridos (García y col., 1998; Mali y col., 2005; Müller y col., 2008) plastificadas con glicerol son más higroscópicas y presentan mayor WVP que las obtenidas empleando sorbitol. En bibliografía se ha reportado que

el sorbitol posee tendencia a cristalizar durante el almacenamiento de las películas, lo que representa una desventaja significativa que se deberá tener en cuenta cuando este es utilizado como plastificante (Müller y col., 2008).

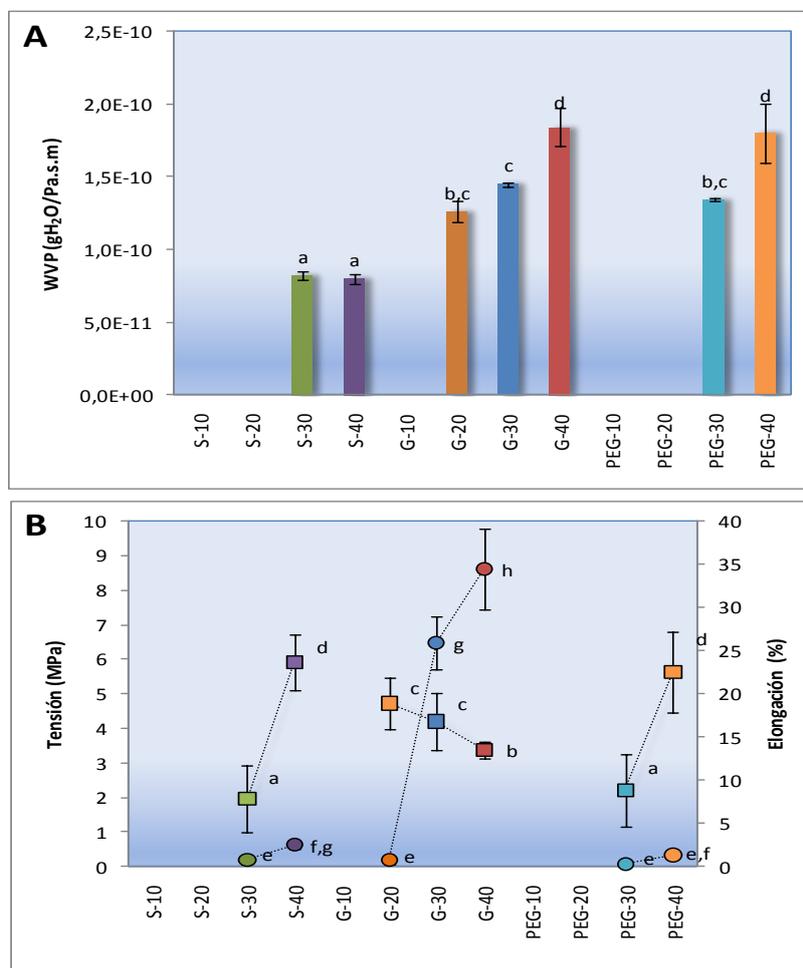


Figura IV.8.: Propiedades **A)** de barrera (WVP) y **B)** mecánicas (Tensión (□), en eje izquierdo, y Elongación (○), en eje derecho) de las películas de **Ai-P** en función del tipo y cantidad de plastificante (tipo: **S**, **G** y **PEG**; cantidad: 10%, 20%, 30% y 40%) empleado en su formulación. Se informan valores promedio \pm desviación estándar. Los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

El comportamiento mecánico de las películas fue distinto, dependiendo del plastificante empleado en su formulación, tal como se observa en la **Figura IV.8.B**. Al aumentar la concentración de **G** en la formulación, las películas resultaron más elongables pero menos resistentes (siendo más significantes los cambios en

deformación que en tensión), resultados similares describen Gennadios y col. (2006) y Alvarez Hayes y col. (2003) en la obtención de películas de proteínas de soja y de amaranto plastificadas con glicerol. Sin embargo, al aumentar la concentración de **S** o **PEG**, las películas aumentaron significativamente su resistencia a la rotura y levemente su elongación. Ayhllon-Meixueiro y col. (2000) también estudiaron la obtención por *casting* de películas proteicas de girasol (10% p/p) con distintos plastificantes (50% p/p). Ellos informaron que las películas con glicerol fueron más elongables que las plastificadas con sorbitol (ϵ_{\max} = 250% y 80% respectivamente), pero con resistencia similar (3,9 MPa).

Finalmente, se observó que el tipo y la concentración de plastificantes no afectaron las propiedades ópticas de las películas proteicas estudiadas.

*Podemos concluir entonces que, las películas de **Ai-P** plastificadas con 30% de glicerol presentaron buenas propiedades mecánicas y de barrera. Sin embargo, al emplear 40% de sorbitol como plastificante es posible obtener materiales con mayor resistencia y menor WVP, pero mucho menos elongables. El empleo de PEG como plastificante produce películas con WVP similares a las obtenidas con glicerol, pero con peores propiedades mecánicas, por lo que se descartó para estudios posteriores.*

Efecto de pH en la formulación inicial: El pH es una de las tantas variables experimentales posibles de cambiar con el fin de modificar la estructura de las proteínas y las interacciones que forman entre ellas. Dependiendo cómo se modifique el estado de asociación y disociación de la proteína, se podrán formar diferentes tipos de redes (por asociación de monómeros u oligómeros). De esta manera, las redes proteicas que forman las películas tendrán características estructurales diferentes y en consecuencia propiedades distintas. Por lo tanto, se estudió el efecto del pH de las dispersiones proteicas iniciales (2,5, 7 y 11) en las propiedades de las películas plastificadas con 30% de glicerol.

En primera instancia, se observó que el pH no tuvo efecto sobre el espesor ni el contenido de humedad. La WVP de las películas tampoco se modificó al variar el pH de la formulación (**Figura IV.9.A.**), a diferencia de lo informado por Mauri y col. (2006 y 2008) quienes describieron que al incrementar el pH de las dispersiones de proteínas nativas de soja se formaban películas menos permeables al vapor de agua.

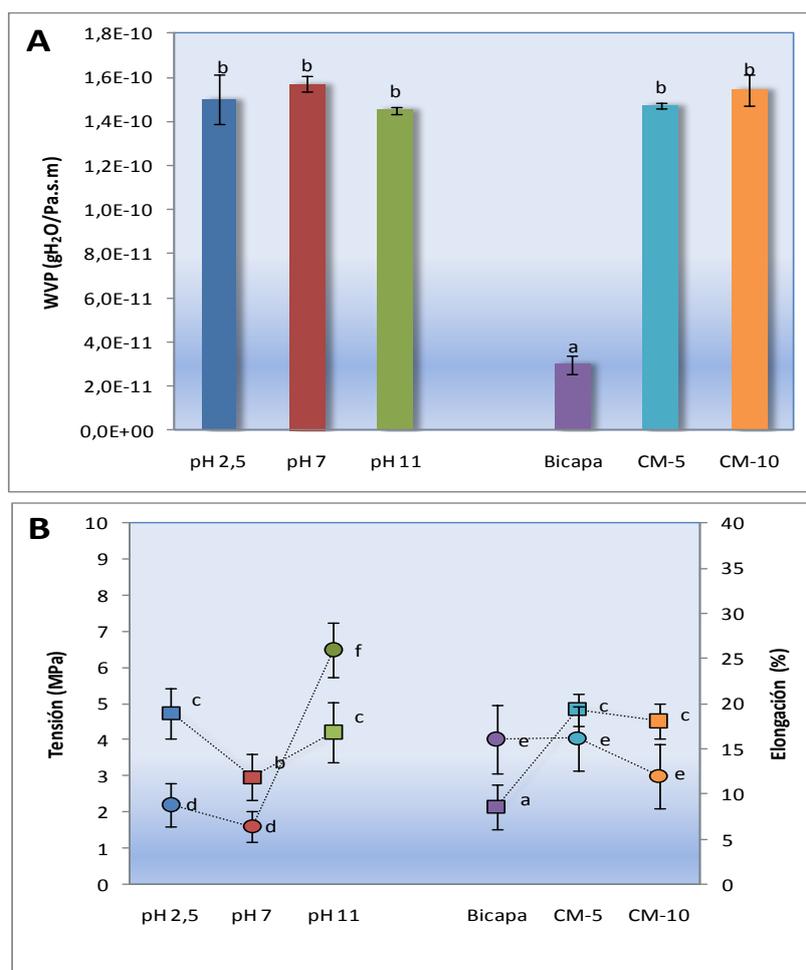


Figura IV.9.: Propiedades **A)** de barrera (WVP) y **B)** mecánicas (Tensión (□), en eje izquierdo, y Elongación (○), en eje derecho) de las películas de **Ai-P** en función del pH de la dispersión inicial (**pH 2,5**, **pH 7** y **pH 11**) y del agregado de distintos aditivos: Cera de abejas (**Bicapa**), 5% o 10% de celulosa microcristalina (**CM-5** y **CM-10** respectivamente). Se informan valores promedio \pm desviación estándar. Los valores con distintos superíndice son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Por otra parte, las películas a pH 11 fueron las que presentaron las mejores propiedades mecánicas (**Figura IV.9.B.**). Las películas menos elongables fueron las que se obtuvieron al disminuir el pH de la dispersión inicial (a 2,5 o 7), mientras que las menos resistentes fueron producidas a pH 7. Al trabajar a pH extremos (2,5 y 11), las cadenas proteicas poseen carga neta y esto podría favorecer las interacciones entre ellas. Además a pH alcalino se favorecen las reacciones de intercambio SH/SS y la formación de uniones disulfuro, resultando así una matriz con mayor grado de entrecruzamiento, reflejándose en su mayor resistencia y elongación. En general, las películas con mayor grado de entrecruzamiento presentan mayor resistencia y menor WVP (Ou y col., 2005; Chambi y col., 2006). Las propiedades mecánicas encontradas en este estudio se condicen con lo expuesto, aunque la variación en el pH de la formulación inicial no afectó significativamente los valores de WVP.

Las variaciones en el pH modificaron las propiedades ópticas de las películas. A pH ácido se obtuvieron películas verdes ($a -$) con menor coloración (mayores L y b, menores ΔE) que a pH neutro o alcalino. Mientras que las películas a pH neutro presentaron la menor opacidad ($12,52 \pm 2,38$ UA mm⁻¹).

*Por lo tanto, se seguirán estudiando las propiedades de las películas de **Ai-P** plastificadas con 30% de glicerol a pH 11, por haber presentado buenas propiedades de barrera y las mejores propiedades mecánicas.*

Efecto del agregado de aditivos: Con el objetivo de disminuir la WVP se agregó una capa de cera de abejas (**Bicapa**) fundida sobre la película ya formada, mientras que para mejorar las propiedades mecánicas se adicionó celulosa microcristalina (**CM-5** y **CM-10**) a la formulación inicial. Se estudió el efecto del agregado de estos aditivos sobre las propiedades de las películas proteicas resultantes y se compararon con las películas de **Ai-P** a pH 11 plastificadas con 30% de glicerol.

Con el agregado de la capa de cera se logró reducir 5 veces la WVP de la película control **Ai-P**, logrando un valor de $2,97 * 10^{-11}$ g H₂O/Pa s m (**Figura IV.9.A.**). Además se

observó que la película **Bicapa** presentó mayor espesor ($113 \pm 25 \mu\text{m}$) y menor contenido de humedad ($18,73 \pm 1,29 \%$) que la película control, debido a la adición de la capa de material lipídico. Esta modificación también afectó las propiedades mecánicas, produciendo películas menos resistentes y elongables que las de **Ai-P** (**Figura IV.9.B.**). Los termogramas de las películas **Bicapa**, obtenidos por DSC, mostraron una única T_g a -76°C , y un pico endotérmico a 64°C correspondiente a la fusión de la cera de abejas, indicando que la cera en la película está parcialmente cristalizada ($\approx 40\%$). Las películas **Bicapa** presentaron un aumento en los parámetros b ($4,56 \pm 1,56$) y ΔE ($82,56 \pm 1,52$). Datos obtenidos en nuestro laboratorio, mostraron que la adición de una capa de cera de abejas sobre películas proteicas de soja disminuyó 19 veces la WVP sin afectar significativamente las propiedades mecánicas de la misma (Denavi, 2009).

Por otra parte, la adición de **CM** a la formulación tiene como objetivo obtener materiales con mayor resistencia a la tracción, pudiendo también disminuir su WVP por generar mayor tortuosidad en la matriz polimérica (Dogan y col., 2007). Sin embargo en las condiciones estudiadas en este trabajo no pudimos observar dichos efectos. En la **Figura IV.9.A.** se muestra que las WVP de **CM-5** y **CM-10** no presentan diferencias significativas con las de **Ai-P**, mientras que en la **Figura IV.9.B.** se puede observar una leve disminución en la elongación de las películas con **CM**, sin modificar significativamente sus valores de tensión. Estas películas presentaron espesores (entre $79-88 \mu\text{m}$) y coloración similar a las de **Ai-P**. Sólo el contenido de humedad ($\approx 22\%$) y la opacidad ($\approx 20 \text{ UA/mm}$) fueron disminuyeron con respecto a la película control, debido a la presencia de **CM**.

Finalmente se estudiaron las isotermas de sorción de las películas de **Ai-P** con mejores propiedades: 1) **Ai-P**; 2) **S-40**; 3) **Bicapa**; 4) **CM-5**. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura IV.10**. Los resultados experimentales fueron ajustados satisfactoriamente con el modelo de GAB ($r^2 > 0,93$), los parámetros resultantes se muestran en la **Tabla IV.6**. Allí se puede apreciar que las películas **Ai-P** y **CM-5** son las más higroscópicas, reflejándose en los valores de humedad de monocapa (X_0). Mientras que las películas menos permeables al vapor de agua (**Bicapa** y **S-40**) fueron las que presentaron menores valores de X_0 . Sin embargo, sus menores WVP se explican por distintos mecanismos. Las películas **S-40** presentaron menor β ,

indicándonos que a las moléculas de agua les cuesta solubilizarse en la matriz proteica. Por otra parte, los materiales **Bicapa** mostraron el menor D_{ef} (disminuye en un orden de magnitud), significando que hay una resistencia mayor al flujo de las moléculas de agua, debido a la capa de cera de abejas depositada sobre la película.

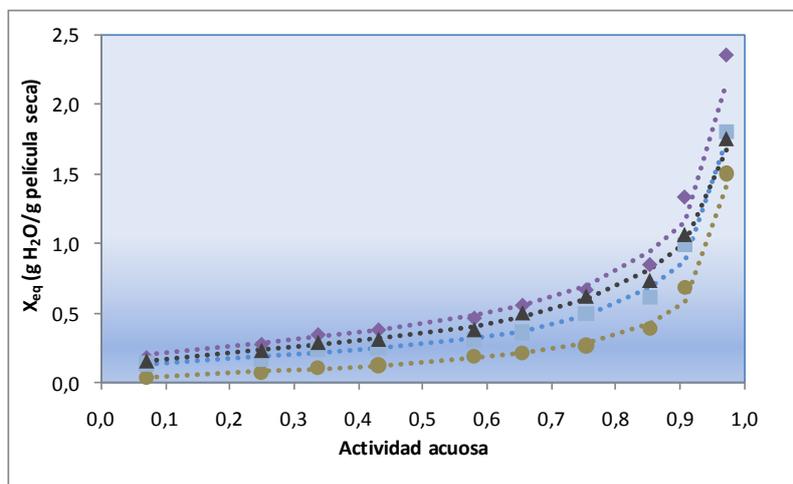


Figura IV.10.: Isotermas de sorción de películas proteicas de girasol: **Ai-P** (●). Efecto del agregado de sorbitol: **S-40** (■), de una capa de cera: **Bicapa** (▲) y de celulosa microcristalina: **CM-5** (●). Se representan con símbolos llenos los puntos experimentales y con línea punteada su ajuste empleando el modelo de GAB.

Tabla IV.6.: Efecto del agregado de aditivos: cera de abejas (**Bicapa**), celulosa microcristalina (**CM-5**), sorbitol (**S-40**); sobre los parámetros de GAB y los coeficientes de solubilidad (β) y difusividad efectiva (D_{ef}) del agua en las películas de **Ai-P**.

	WVP*	Isotermas de Sorción - Modelo GAB*				β^*	D_{ef}^*
	(*10 ⁻¹⁰)	X_0	C	K	r^2	(*10 ⁻⁴)	(*10 ⁻⁷)
Ai-P	1,45 ± 0,01 ^c	0,2416	50,40	0,8724	0,9840	7,7	1,28
S-2,0	0,80 ± 0,03 ^b	0,0889	7,70	0,9375	0,9605	4,2	1,34
Cera	0,30 ± 0,04 ^a	0,1508	76,30	0,9136	0,9379	6,1	0,32
CM-5	1,47 ± 0,01 ^c	0,2051	39,97	0,8776	0,9367	6,8	1,52

*Unidades de WVP: gH₂O Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹; X₀: g H₂O/g película seca; β : g H₂O/Pa g película seca; D_{ef} : m² s⁻¹. Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, y en filas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con p≤0,05.

*Por lo tanto, al agregar una capa de cera de abejas es posible reducir 5 veces la WVP de las películas proteicas de girasol **Ai-P**, mientras que, en las condiciones estudiadas, la **CM** no tuvo efecto sobre sus propiedades mecánicas y de barrera de las películas. Podemos concluir entonces que realizando modificaciones simples en la formulación inicial resulta posible obtener una amplia gama de películas biodegradables de **Ai-P** con diferentes propiedades mecánicas y de barrera, que podrían emplearse en aplicaciones específicas dependiendo de sus requerimientos.*

IV.4.- Conclusiones

a.- Los aislados proteicos de girasol son adecuados para la obtención de películas biodegradables flexibles por *casting*, con propiedades mecánicas y de barrera en el orden de otras películas proteicas. El contenido de compuestos fenólicos remanentes en los aislados sólo modificó el color y la opacidad de las películas, además de conferirle propiedades antioxidantes.

b.- Se observó que la red proteica que constituye la película está formada mayoritariamente por puentes de hidrógeno y uniones disulfuro, y estabilizada en menor medida, por interacciones hidrofóbicas e iónicas.

c.- Modificando la formulación inicial fue posible obtener materiales con distintas propiedades. Al incrementar el contenido de glicerol se obtuvieron películas más permeables al vapor de agua, menos resistentes, pero más elongables. El empleo de sorbitol produjo películas con menores WVP pero muy frágiles. El pH tuvo efecto sobre las propiedades en estudio, la opacidad y la tensión a la ruptura disminuyen a pH 7, mientras que la elongación es máxima a pH 11. Las películas proteicas de girasol plastificadas con glicerol al 30% p/p presentaron buenas propiedades de barrera y mecánicas. Se logró mejorar su WVP 5 veces por formación de películas bicapa con cera de abejas. Bajo las condiciones experimentales estudiadas no se logró reforzar la matriz proteica por agregado de celulosa microcristalina.

d.- Si bien bajo las condiciones estudiadas no se lograron obtener buenas películas a partir de los concentrados proteicos de girasol, es de esperar que con modificaciones de la metodología de obtención se logren formar las mismas, que seguramente tendrán todavía mejores propiedades antioxidantes dado su mayor concentración de fenoles

e.- Si bien la coloración de estas películas podría limitar algunas de sus posibles aplicaciones en *packaging* de alimentos, estos materiales podrían emplearse, si sus propiedades lo admiten, como “*mulching*” en agricultura intensiva.

Capítulo V: Materiales compuestos, rígidos y biodegradables obtenidos a partir de aislados proteicos de girasol, almidón de mandioca y fibras de celulosa

Capítulo V: “MATERIALES COMPUESTOS, RÍGIDOS Y BIODEGRADABLES OBTENIDOS A PARTIR DE AISLADOS PROTEICOS DE GIRASOL, ALMIDÓN DE MANDIOCA Y FIBRAS DE CELULOSA”

V.1.- Introducción

Aproximadamente el 41% de los plásticos producidos a partir de derivados del petróleo son destinados a la industria de envases, siendo los envases de los alimentos uno de los destinos más importantes (47%) (Fomin y col., 2001), por lo que la sustitución de estos plásticos por biopolímeros, con el objetivo de disminuir los actuales problemas de contaminación ambiental y de recurrir al uso de productos renovables, constituye un desafío. En este contexto, los polímeros naturales obtenidos de distintas fuentes constituyen una alternativa interesante para ser empleado en *packaging*. En el capítulo anterior, se estudió la capacidad que presentan las proteínas de girasol para la formación de películas flexibles por *casting*. Estas proteínas presentan propiedades termoplásticas, por lo que también resulta posible su procesamiento por metodologías más cercanas a las de los plásticos sintéticos, entre ellas termoprensado, inyección, moldeo y extrusión (Orliac y col., 2003; Rouilly y col., 2006), con las que es posible obtener materiales flexibles o rígidos.

Entre los materiales más empleados como contenedores de alimentos, se encuentran las espumas de poliestireno expandido, utilizadas como bandejas con distintas aplicaciones (por ejemplo para fiambres, carnes, productos de panadería, etc.). Para algunas aplicaciones, estas bandejas podrían ser reemplazadas por materiales biodegradables, entre ellos biopolímeros, por distintos procesos. Por ejemplo se ha descrito el uso de mezclas de almidón y agua para la obtención de este tipo de materiales por procesos como la filtración en vacío (Matsui y col., 2004) o el termoprensado (Shogren y col., 1998; Glenn y col., 2001; Shogren y col., 2002; Soykeabkaew y col., 2004; Schmidt, 2006; Shey y col., 2006). Estos materiales también se pueden obtener por un proceso conocido como “*foam baking*”. Este proceso cuando es aplicado a suspensiones de almidón, consta de dos etapas: en una primera ocurre la gelatinización del almidón y la evaporación del agua, expandiendo la mezcla y

formando una espuma, mientras que en la segunda etapa la espuma se seca hasta alcanzar valores de humedad entre 2 y 4% (Shogren y col., 1998). Las grandes limitaciones que tiene el uso de estos polímeros en la fabricación de este tipo de material es que los productos obtenidos poseen una fragilidad elevada y una gran afinidad por el agua (Glenn y col., 2001).

Con el fin de mejorar estas propiedades se ha estudiado la formación de estos materiales a partir de almidones modificados, así como el agregado de plastificantes, polímeros, fibras y/o aditivos a la formulación inicial. Shogren y col. (1998) encontraron que al aumentar la concentración de almidón, el peso molecular y el contenido de amilosa, se incrementó la resistencia y la densidad de las espumas (o bandejas), mientras que su flexibilidad disminuyó. También se ha informado que los almidones de tubérculos, por ejemplo papa, producen bandejas con baja densidad y mayor flexibilidad que las correspondientes a almidones de cereales, por ejemplo maíz. Otros autores describieron que espumas de almidones químicamente modificados presentaron menores tiempos de proceso, menores pesos y mayores deformaciones que los almidones sin modificar; y que las formadas con almidones genéticamente modificados (*waxy*) adicionadas con polivinil alcohol presentaron mayores elongaciones a la rotura (Shogren y col., 2002). También se mejoró la resistencia de espumas de almidón, y en algunos casos la deformación a la rotura, con el agregado de distinto tipo de fibras, como por ejemplo fibras de madera de álamo, yute y lino (Glenn y col., 2001; Shogren y col., 2002; Lawton y col., 2004; Soykeabkaew y col., 2004). Además, se logró mejorar la resistencia al agua de bandejas de almidón con el agregado de una proporción alta de fibras de maíz y polivinilalcohol, agregando látex de caucho a las formulaciones, y obteniendo espumas de almidón laminadas con aluminio, papel *tissue*, polivinilalcohol y películas de policloruro de vinilo (Glenn y col., 2001; Cinelli y col., 2006). Gáspár y col. (2005) estudiaron el efecto de agregar otros polisacáridos o proteínas, como celulosa, hemicelulosa y zeínas de maíz a la formulación, encontrando las mejores propiedades mecánicas para los compuestos con hemicelulosa y zeínas. Otros autores también informaron que la combinación de almidones con otros biopolímeros, como proteínas o celulosas, produjeron materiales biodegradables con mejores propiedades (Arvanitoyannis y col., 1996; Psomiadou y

col., 1996; Arvanitoyannis y col., 1997; Jagannath y col., 2003; Coughlan y col., 2004; Wongsasulak y col., 2006; Wongsasulak y col., 2007).

Conociendo estos antecedentes, nos planteamos la posibilidad de utilizar proteínas de girasol, mayoritariamente globulinas, en la producción de materiales rígidos compuestos a partir de almidón de mandioca y fibras de celulosa. Para ello, no propusimos los siguientes objetivos: Evaluar las posibilidades de obtención de materiales rígidos biodegradables compuestos, a partir de almidón de mandioca, proteínas de girasol y fibras de celulosa, mediante el proceso *“foam baking”*; y optimizar la formulación variando las proporciones relativas de los tres componentes a fin de mejorar las propiedades físicas y mecánicas de los materiales resultantes.

V.2.- Materiales y Métodos

V.2.1.- Materiales empleados en la obtención de bandejas

Se utilizó almidón de mandioca con 17% de amilosa (Molinari S.A., Brasil), aislados proteicos de girasol (**Ai-P**, **AiExA-P** y **AiExS-P**) y fibras cortas de celulosa proveniente de eucaliptus (Klabin S.A., Brasil). También se utilizaron estearato de magnesio (Quimidro Ltda., Brasil), glicerol (Nuclear Casa da Química Ind. e Com. Ltda., Brasil) y goma guar (Nicrom Química Ltda., Brasil) como aditivos.

V.2.2.- Diseño experimental

Para estudiar el efecto de la formulación en las propiedades de los materiales resultantes, se planteó un diseño experimental factorial con dos factores (porcentaje de fibras, **F**, y contenido de proteínas, **P**) y tres niveles (3^2) en un bloque y sin punto central, resultando un total de 9 experiencias (Statistica 6.0, StatSoft, Inc, Estados Unidos) (Montgomery, 2003). En base a resultados preliminares, se evaluaron porcentajes de fibra entre 10-20% y concentraciones de proteínas entre 0-20%. Las formulaciones iniciales de los materiales estudiados se muestran en **Tabla V.1**.

V.2.3.- Obtención de bandejas por *foam baking*

Para preparar cada formulación (**Tabla V.1.**), inicialmente se dispersaron las fibras de celulosa en el agua mezclando 5 minutos con un agitador mecánico (Fisaton modelo 713D, Brasil), posteriormente se agregó el almidón de mandioca, el aislado proteico de girasol y los aditivos (4% p/p de estearato de magnesio, 1,5% p/p de goma guar y 4% p/p de glicerol) y se continuaron mezclando 5 minutos con el agitador mecánico. Entre 42 y 45 g de cada formulación se esparcieron homogéneamente sobre un plato de Teflon® de 16 cm por 11 cm, con una guía metálica de 1,5 mm de espesor. Se dispuso una tapa de Teflon® encima de la mezcla y se termopresó con una prensa hidráulica con sistema eléctrico de calentamiento, medidor de temperatura Pt100 y controlador PID. Primero se realizó una pre-prensada a 150-155°C durante 4 minutos con el

objetivo de eliminar agua por evaporación y producir la expansión de la mezcla, seguido de una prensada de 3 minutos a 0,36 MPa a la misma temperatura. Finalmente las bandejas se retiraron de la prensa, se enfriaron 3 minutos a temperatura ambiente y se desmoldaron.

Las bandejas obtenidas se acondicionaron 4 días a 25°C y 75 %HR previo a la caracterización de sus propiedades físicas y mecánicas.

Tabla V.1.: Diseño experimental factorial. Formulaciones iniciales para la obtención de bandejas biodegradables.

Muestras	Almidón de mandioca (g)	Fibras de celulosa (g)	Aislado proteico de girasol (g)	Agua (g)
10F-0P	90	10	0	170
10F-10P	81	10	9	170
10F-20P	72	10	18	170
15F-0P	85	15	0	190
15F-10P	76,5	15	8,5	190
15F-20P	68	15	17	190
20F-0P	80	20	0	210
20F-10P	72	20	8	210
20F-20P	64	20	16	210

V.2.4. Caracterización de las bandejas obtenidas

Espesor: se determinó empleando un calibre digital (Digimatic, Mitutoyo, Japón). El valor informado para cada formulación resultó de promediar tres medidas sobre cada 10 cuerpos de prueba.

Densidad: La densidad se calculó mediante la relación entre peso y volumen (Shogren y col., 1998). Los valores presentados son promedios de cinco determinaciones para cada formulación.

Contenido de humedad: Se determinó luego del secado en estufa a 105°C durante 24 horas. Muestras de 12,5 cm² fueron colocadas en placas de Petri y fueron pesadas antes y después del secado (ASTM D644-94, 1994). Los valores informados son el promedio de 10 determinaciones para cada formulación, y se calculó como el porcentaje de peso perdido respecto del peso original.

Color: El color de las bandejas fue determinado utilizando un colorímetro (CR 300, Minolta Chroma Co., Osaka, Japón), como se describió en **Capítulo I**, sección **I.2.9**. Los valores informados son la media de cinco determinaciones sobre cada cuerpo de prueba, empleando cinco probetas para cada formulación.

Absorción de agua por inmersión: Para esta determinación, muestras de 2,5 cm por 5 cm previamente pesadas se sumergieron en agua destilada por 60 segundos. Luego se retiraron, se secó el exceso de agua con papel *tissue* y se pesaron nuevamente. La cantidad de agua absorbida se obtuvo por diferencia de los pesos registrados y se expresó como g H₂O/g bandeja inicial (norma ABNT NBR NM ISO 535, 1999). Los resultados mostrados son el promedio de cinco determinaciones para cada formulación.

Adsorción de agua a altas humedades relativas: Las bandejas de almidón conteniendo 20% de fibras, sin y con 10% de proteínas (20F-0P y 20F-10P; respectivamente) fueron colocadas en desecadores a 75%HR y 90%HR hasta alcanzar el equilibrio. Luego, la humedad de equilibrio (en base seca) fue determinada por el método gravimétrico.

Microscopía electrónica de barrido (SEM): Las muestras se recubrieron con una fina capa de oro con un metalizador (SCD 005, BAL-TEC, Suiza). Las microscopías se realizaron en un microscopio electrónico de barrido (XL-30, Philips, Holanda). El voltaje de aceleración utilizado para el análisis de todas las muestras fue de 10 kV.

Propiedades Mecánicas: Se empleó un texturómetro modelo TA.XT2i (SMS, Surrey, Inglaterra), con una celda de carga de 25 N para determinar las propiedades mecánicas de las bandejas en ensayos de tensión y punción.

Los **ensayos en tracción** se realizaron utilizando probetas de 100 mm de longitud por 25 mm de ancho, con una separación inicial de mordazas de 80 mm y una velocidad de cabezal de 2 mm/s (**Figura V.1.A.**). Se registraron las curvas de tensión-deformación y se determinaron los valores de tensión de ruptura (σ). Se realizaron 10 determinaciones para cada formulación, los valores informados son el promedio de ellas.

Ensayos de punción: se utilizaron probetas de 10 cm por 10 cm. Durante el ensayo se registró la curva fuerza-distancia de penetración, usando una sonda esférica de 21 mm de diámetro. La velocidad de punción fue de 1 mm/s con una carga de 0,5 N (**Figura V.1.B.**). La deformación relativa (δ) se calculó como el cociente entre la distancia vertical que recorrió la sonda desde que se contactó con la muestra hasta la ruptura y el diámetro de la muestra que coincide con el diámetro del orificio del accesorio utilizado para medir (80 mm). Los valores informados son el promedio de cuatro determinaciones para cada formulación.

Los valores de tensión a la ruptura (σ) y de deformación relativa (δ), nombrados como Y_i , se ajustaron con Statistica 6.0 (StatSoft, Inc, Estados Unidos) a una ecuación de segundo grado (**Ecuación V.1.**) en función de las variables independientes: contenido de Fibras (**F**) y porcentaje de Proteínas (**P**), siendo b_n constantes de ajuste.

$$Y_i = b_0 + b_1F + b_2P + b_{12}FP + b_{11}F^2 + b_{22}P^2$$

Ecuación V.1.

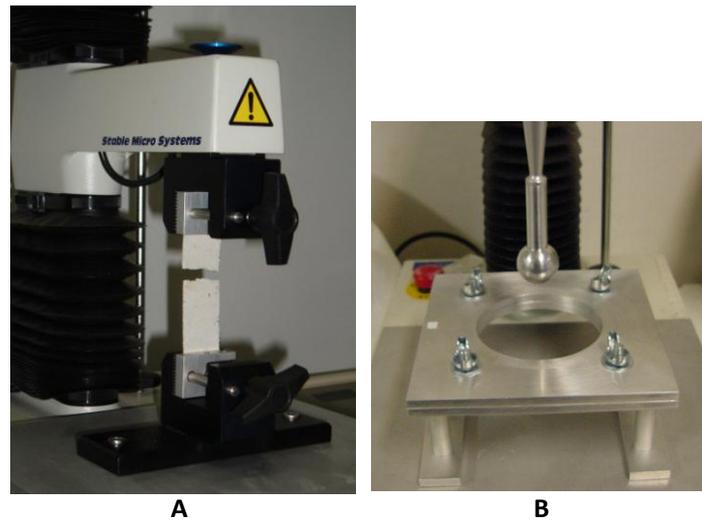


Figura V.1.: Dispositivos empleados para la evaluación de las propiedades mecánicas en **A)** ensayo de tracción y **B)** punción de las bandejas obtenidas.

V.2.5.- 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 Tuckey, con un nivel de significación $\alpha=0.05$. Para ello se empleó el programa SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation, Estados Unidos).

V.3.- Resultados y Discusión

V.3.1.- Formulaciones empleadas y variables del proceso de *foam baking*

Los límites de concentración para cada componente (almidón, proteínas y fibras) (**Tabla V.1.**) se fijaron en base a resultados experimentales preliminares y datos bibliográficos. En este estudio el almidón de mandioca (*Manihot esculenta*) es el componente que forma la matriz polimérica, siendo el ingrediente mayoritario de la formulación. Con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas de los materiales obtenidos, se adicionaron fibras de celulosa y proteínas de girasol (*Helianthus annus*), esperando que estas últimas también pudieran disminuir la afinidad por el agua de las bandejas. En cuanto a la concentración de fibras, Shogren y col. (2002) informaron que la adición de bajos contenidos de fibras de madera de álamo (*Populus alba*) (5-10%) mejoró las propiedades mecánicas de bandejas de almidón de maíz (*Zea mays*). Cinelli y col. (2006) reportaron que al incrementar el contenido de fibras (hasta 54,7%) en las mezclas de almidón de papa (*Solanum tuberosum*), se producía un aumento en la viscosidad de la mezcla inicial impidiendo llevar a cabo el proceso. Finalmente, Schmidt (2006) informó que las bandejas de almidón de mandioca con porcentajes mayores a 30% de fibra de celulosa presentaron discontinuidades (huecos) que afectaron sus propiedades mecánicas. Teniendo en cuenta estos resultados, en este trabajo se varió la concentración de fibras de celulosa entre 10 y 20%. Además, se estudió el agregado de proteínas de girasol hasta un 20%, ya que para concentraciones superiores las bandejas presentaron imperfecciones superficiales que afectaban sus propiedades mecánicas además de su apariencia. Por otra parte, el volumen de agua agregado a cada formulación estuvo directamente relacionado con el contenido de fibras. Los valores que se muestran en la **Tabla V.1.** corresponden a los volúmenes mínimos de agua que facilitaron la incorporación de las fibras de celulosa y que permitieron lograr una dispersión homogénea de la mezcla. A todas las formulaciones se les agregó: estearato de magnesio, que es un compuesto hidrofóbico que ayuda al desmolde de las bandejas; goma guar para aumentar la viscosidad de la suspensión y evitar la separación de los sólidos; y glicerol como plastificante (Shogren y col., 1998).

Durante la obtención de bandejas por *foam baking*, las mezclas de almidón y fibras se someten a temperaturas entre 180 y 200°C durante dos a cuatro minutos (Glenn y col., 2001; Lawton y col., 2004 y Schmidt, 2006). Al repetir esas condiciones de proceso sobre las formulaciones que contenían proteínas de girasol, las bandejas resultantes presentaron un aspecto “quemado”, aún utilizando menores tiempos de proceso. Por este motivo, se decidió procesar las mezclas a menor temperatura (150-155°C) durante 7 minutos, resultando este proceso similar al realizado por Gáspár y col. (2005) para obtener bandejas a partir de almidón de maíz con zeínas.

V.3.2.- Estudio de las propiedades físicas y mecánicas de las bandejas biodegradables

En esta sección se presentan y discuten los resultados de las bandejas obtenidas con el aislado proteico de girasol **Ai-P**. En primera instancia se determinaron el espesor, la densidad y el contenido de humedad de las bandejas obtenidas (**Tabla V.2.**), debido a que estas características afectan sus propiedades mecánicas. En la **Tabla V.2.** se puede observar que todos los materiales desarrollados presentaron espesores promedios entre 1,55 y 1,76 mm y densidades promedios entre 0,46 y 0,59 g/cm³. La variación en el contenido de fibras de celulosa no afectó el espesor ni la densidad de las bandejas de almidón. Solo en presencia de un 10% de proteínas, se observó que al aumentar el contenido de fibras disminuyó el espesor de las bandejas acompañado de un aumento en su densidad. Para las bandejas con 10% de fibras, al aumentar el contenido de proteínas, el espesor aumentó sin modificarse significativamente la densidad. Pero para mayores porcentajes de fibra, el espesor fue mínimo y la densidad fue máxima para las bandejas que contienen un 10% de proteínas. La máxima densidad fue registrada para la bandeja de almidón con 10% de proteínas y 15% de fibra. Glenn y col. (2001) observaron, como en este trabajo, que la densidad de sus bandejas disminuía con el agregado de fibras de maíz. La misma tendencia fue descrita por Schmidt (2006) para bandejas de almidón de mandioca, fibras de celulosa y CaCO₃. Los valores de densidad registrados en este trabajo son superiores al que presenta el poliestireno expandido - aproximadamente de 0,06 g/cm³ según Shey y col. (2006) y Glenn y col. (2001) -, el *paperboard* - 0,18 g/cm³ (Glenn y col., 2001)-, y las obtenidas

por otros autores para bandejas de almidones de trigo (*Triticum aestivum*), maíz, papas y mandioca - 0,07-0,41 g/cm³ (Shogren y col., 1998; Glenn y col., 2001; Cinelli y col., 2006; Carr y col., 2006)-. Pero son inferiores a las informadas por Schmidt (2006) para bandejas formuladas con el mismo almidón e iguales fibras, pero con el agregado de CaCO₃ -entre 0,63-1,3 g/cm³-.

Tabla V.2.: Espesor, densidad y contenido de humedad de las bandejas en estudio.

Muestras	Espesor (mm)	Densidad (g.cm ⁻³)	Humedad (%)
10F-0P	1,6298 ± 0,0987 ^{a,b}	0,482 ± 0,043 ^{a,b,c}	10,81 ± 0,01 ^e
10F-10P	1,7216 ± 0,0853 ^{b,c}	0,474 ± 0,038 ^{a,b,c}	10,32 ± 0,14 ^{c,d}
10F-20P	1,7623 ± 0,0910 ^c	0,511 ± 0,049 ^{b,c}	10,18 ± 0,05 ^{b,c}
15F-0P	1,6197 ± 0,0650 ^{a,b}	0,518 ± 0,042 ^c	10,58 ± 0,04 ^{d,e}
15F-10P	1,5509 ± 0,0750 ^a	0,587 ± 0,044 ^d	10,14 ± 0,19 ^{b,c}
15F-20P	1,7207 ± 0,0873 ^{b,c}	0,463 ± 0,028 ^{a,b}	10,00 ± 0,13 ^{a,b}
20F-0P	1,6932 ± 0,1480 ^{b,c}	0,476 ± 0,044 ^{a,b,c}	10,35 ± 0,12 ^{c,d}
20F-10P	1,5490 ± 0,0587 ^a	0,522 ± 0,034 ^c	10,00 ± 0,18 ^{a,b}
20F-20P	1,6866 ± 0,0691 ^{b,c}	0,456 ± 0,013 ^a	9,74 ± 0,12 ^a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con p≤0,05.

Si bien el porcentaje de humedad de las bandejas al momento de ser desmoldadas se encontraba entre 2 y 4%, las mismas adsorbieron agua durante el almacenamiento (4 días a 25 °C y 75 %RH). En la **Tabla V.2.** se muestra el contenido de humedad para cada formulación al momento de su caracterización. Se puede observar una leve disminución del contenido de agua con el agregado de proteínas y de fibras, que se correlaciona con una disminución en la concentración de almidón de la formulación. Pero no se observaron diferencias significativas en este valor al aumentar el contenido de proteínas del 10 al 20%.

Una de las principales limitaciones de los materiales basados en almidón y fibras es que presentan poca resistencia al agua, debido a la gran higroscopicidad de sus

componentes. En particular, si se piensa en ellos para ser empleados como contenedores de alimentos, interesa conocer su capacidad de absorción de agua. Este ensayo resulta más drástico que las condiciones reales a las que se someterán estos materiales, debido que involucra someter a los mismos a una inmersión total en agua, pero es la técnica habitualmente usada para informar estos resultados. Intentando conseguir asemejarnos al comportamiento de las bandejas de poliestirenos, el resultado deseado es que la capacidad de absorción de agua fuera mínima, para poder asegurar así su integridad y funcionalidad. Los resultados correspondientes a este ensayo se presentan en la **Figura V.2**. Se puede observar que para las bandejas de almidón, al aumentar el contenido de fibras del 10 al 20%, aumentó la absorción de agua aproximadamente en un 18%, mientras que el agregado de proteínas de girasol a la formulación la disminuyó hasta un 44%, siendo estas variaciones significativas al agregar solo un 10% de proteínas. En presencia de proteínas no se observó el aumento en esta propiedad con el agregado de fibras.

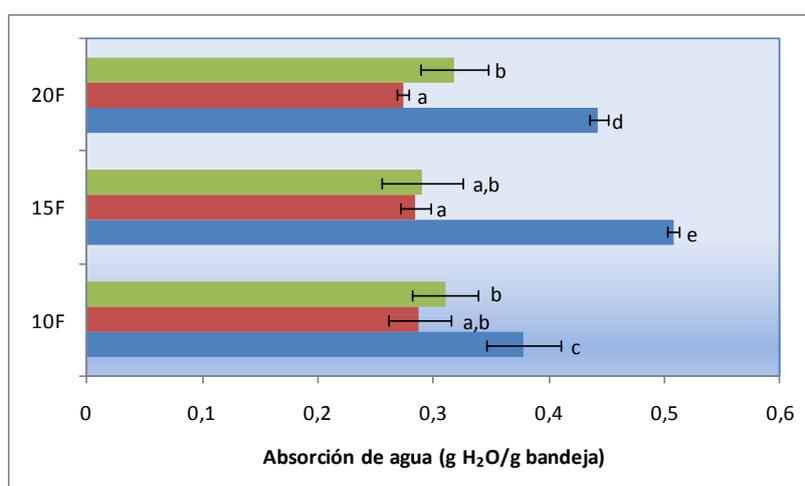


Figura V.2.: Absorción de agua por inmersión de las bandejas biodegradables formuladas a partir de almidón de mandioca, fibras de celulosa (10F, 15F, 20F) y proteínas de girasol (Ai-P; 0P (■); 10P (■); 20P (■)). Se muestran valores promedio \pm desviación estándar. Las barras con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Con estos resultados, resulta evidente que la presencia de proteínas disminuyó la sensibilidad al agua de las bandejas y enmascaró el efecto de las fibras. Si bien la absorción de agua alcanzada por estos materiales fue mayor que las respectivas a las bandejas obtenidas en otros estudios por el proceso de impregnación o utilizando acetato de almidón o polivinil alcohol (Cinelli y col., 2006), la reducción alcanzada es importante en magnitud y amplía las posibilidades de estos materiales.

Con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de las bandejas obtenidas, se estudió el efecto del agregado de fibras y de proteínas a la formulación sobre sus propiedades mecánicas, específicamente sobre su resistencia a la ruptura al ser sometidas a ensayos de tracción y sobre su deformación relativa en ensayos de punción, ya que estas dos son las propiedades mecánicas más significativas de este tipo de materiales. Los valores de tensión de ruptura obtenidos para las distintas bandejas se presentan en la **Figura V.3**. En ella se puede apreciar que para las bandejas de almidón, la resistencia a la tracción no se modificó significativamente al aumentar el porcentaje de fibra del 10 al 20%. En contraste, para las bandejas que poseen proteínas de girasol, la tensión aumentó con el agregado de fibras, siendo este aumento más significativo para las que contienen 20% de proteínas. Se puede apreciar también que el agregado de un 10% de proteína a la formulación aumentó los valores de tensión respecto de los de las bandejas de almidón de mandioca con el mismo contenido de fibras, pero al aumentar la cantidad de proteínas a un 20% la tensión disminuyó, especialmente para los materiales con 10 y 15% de fibra. Los mayores valores de tensión ($6,57 \pm 1,16$ MPa) se encontraron para la muestra con 20% de fibra y 10% de proteína. Existe una estrecha relación entre la tensión y la densidad de las bandejas, las bandejas más densas son las que presentaron la mayor resistencia. En concordancia con estos resultados, Shogren y col. (1998) observaron que la tensión y rigidez de las espumas de almidón estaban altamente relacionadas con la densidad y con su contenido de amilosa. En la **Figura V.3** también se muestra la superficie de respuesta que ajustó a los datos experimentales con $r^2=0,945$, y que es representada por la **Ecuación V.2**. Del análisis estadístico de los resultados, se encontró que la variable concentración de proteína (P) resultó ser significativa ($p \leq 0,05$) en los términos lineales y cuadráticos, mientras que la concentración de fibras (F) solo resultó ser significativa ($p \leq 0,05$) para el término

lineal. Mientras que las interacciones Fibra-Proteína (F P) y Fibra-Fibra (F^2) no fueron significativas ($p \geq 0,05$).

$$\sigma = 4,035 + 0,198 F + 0,028 P + 0,006 F P - 0,005 F^2 - 0,009 P^2$$

Ecuación V.2.

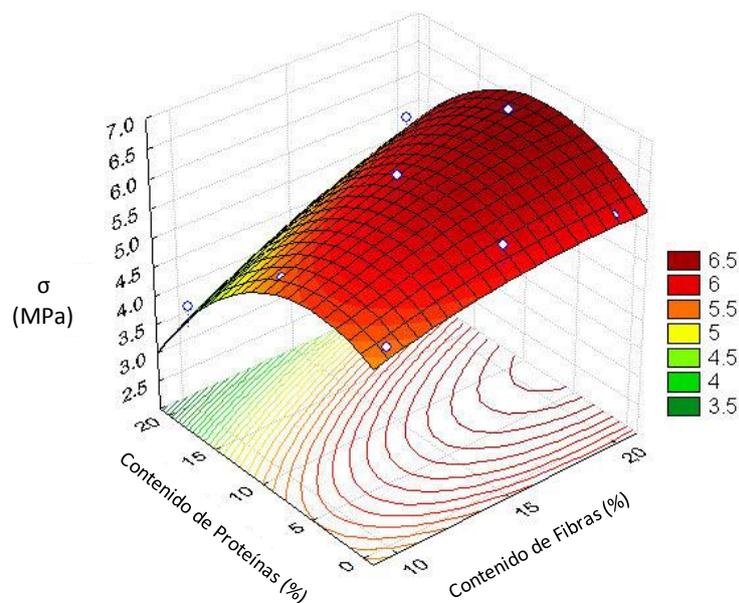


Figura V.3.: Tensión a ruptura presentada por la bandejas (en ensayo de tracción) en función de contenido de proteínas y fibras. Se muestran los puntos experimentales (○) y la superficie de respuesta resultante del ajuste matemático ($r^2=0,945$).

Por otra parte, los porcentajes de deformación relativa que soportan las bandejas cuando son sometidas al ensayo de punción, se presentan en la **Figura V.4**. Se puede observar que el agregado de fibras a las bandejas de almidón produjo un aumento en la deformación a la rotura de las bandejas, pero esta variación fue menos significativa en la medida que se aumentó la concentración de proteínas. Si bien en dicha figura también se observa una tendencia marcada a disminuir la deformación relativa con el agregado de proteínas, las diferencias solo fueron estadísticamente significativas para las muestras que contenían 20% de fibra. En la **Figura V.4**. también se muestra la

superficie de respuesta representada por la **Ecuación V.3.**, que ajusta a los datos experimentales con $r^2=0,891$. Mediante el análisis estadístico de los datos podemos afirmar que sólo el término lineal de proteínas resultó ser significativo ($p<0,05$) en la deformación relativa, mientras que no se observó un efecto de las Fibras, ni interacciones Proteínas-Fibra (F P).

$$\delta = 0,07304 + 0,00018 F - 0,00112 P - 0,00004 F P + 0,00002 F^2 + 0,00006 P^2 \quad \text{Ecuación V.3.}$$

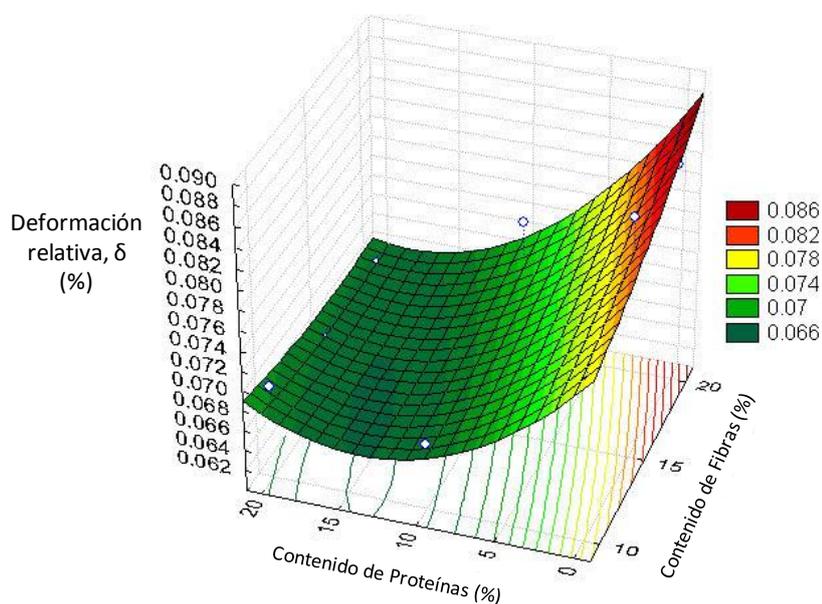


Figura V.4.: Deformación relativa de las bandejas (en ensayo de punción) en función del contenido de proteínas y fibras. Se muestran los puntos experimentales (○) y la superficie de respuesta resultante del ajuste matemático ($r^2=0,891$).

Las propiedades mecánicas de los materiales obtenidos son similares a los descritos por Schmidt (2006) para bandejas de almidón de mandioca, fibras de celulosa y CaCO_3 . Lawton y col. (1999) informaron que usando almidones con alto contenido de amilopectina resultaron en espumas livianas con menores resistencias. Cabe resaltar

que las bandejas producidas en este trabajo, que poseen densidades superiores a las informadas en la bibliografía, resultaron ser materiales más resistentes. Otros autores mostraron mejoras en la resistencia de sus materiales al agregar entre 15 y 30% de fibras de madera de álamo a la formulación, dado que en ese rango, las fibras se adhirieron bien a la matriz de almidón y lograron reforzarla; por debajo de esas concentraciones no se observaron mejoras, y por encima, la resistencia comenzó a disminuir a causa de la distribución no homogénea de las fibras en la matriz de almidón (Shogren y col., 2002; Lawton y col., 2004). Gáspár y col. (2005) también observaron una mejora en la tensión de bandejas de almidón de maíz, agregando un 10% de zeínas a la formulación. Ellos atribuyeron este efecto y el de baja absorción de agua a la compatibilidad de ambos biopolímeros que le permite formar una estructura más compacta. A pesar de conocer que el agua tiene un fuerte efecto plastificante en los materiales basados en polisacáridos y proteínas (Gontard y col., 1993; Wongsasulak y col., 2006), en este trabajo no se encontró relación entre las propiedades mecánicas y el contenido de agua post-prensado de las bandejas.

Sabiendo que la adsorción de agua durante el almacenamiento de estos materiales puede modificar sus propiedades mecánicas y determinar su empleo comercial, se cuantificó la humedad de equilibrio (X_{eq}) en ambientes con elevada humedad relativa (75% y 90% de HR) del material con mejores propiedades mecánicas (20F-10P) y de su correspondiente bandeja sin el agregado de proteínas (20F-0P). Las X_{eq} de las muestras 20F-0P y 20F-10P acondicionadas a 75% de HR fueron 0,078 y 0,082 g H₂O/g bandeja seca respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre estos valores. El mismo comportamiento se observó a 90% de HR, en donde las X_{eq} de ambas muestras fueron cercanas a 0,105 g H₂O/g bandeja seca. Estos niveles de humedad no cambiaron las características de las bandejas, indicándonos que estos materiales son estables en ambientes de alta humedad relativa. Este efecto también fue observado por Gáspár y col. (2005) al agregar proteínas de maíz (zeínas) a bandejas de almidón de maíz. Ellos realizaron estudios de adsorción de agua a diferentes humedades relativas sobre bandejas de almidón de maíz con celulosa, hemicelulosa, zeínas y policaprolactona. Todos estos materiales compuestos presentaron una alta resistencia a la adsorción de agua, pero luego de 14 días de acondicionamiento, los materiales

basados en almidón de maíz con zeínas fueron los más resistentes, presentando los menores porcentajes de adsorción de agua.

El color de los materiales desarrollados fue diferente, en la **Tabla V.3.** se muestran los parámetros Hunter-Lab de las bandejas estudiadas. Como se mencionó en los capítulos anteriores, los aislados proteicos de girasol (**Ai-P**) presentaron una coloración verde ($L=42,33 \pm 0,15$, $a= -1,71 \pm 0,06$, $b= 6,80 \pm 0,08$ y $\Delta E= 55,24 \pm 0,16$), debida a la oxidación de los fenoles presentes en la harina de girasol durante el tratamiento alcalino en el proceso de obtención de los aislados (Shamanthaka Sastry y col., 1997).

Tabla V.3.: Parámetros de color Hunter-Lab de las bandejas biodegradables obtenidas.

Muestras	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE
10F-0P	$88,68 \pm 0,42^{f,g}$	$0,03 \pm 0,07^c$	$6,77 \pm 0,27^a$	$9,99 \pm 0,47^{a,b}$
10F-10P	$51,82 \pm 1,58^d$	$-2,99 \pm 0,41^a$	$9,15 \pm 0,18^c$	$46,19 \pm 1,58^d$
10F-20P	$41,54 \pm 0,65^e$	$-2,58 \pm 0,17^a$	$8,01 \pm 0,29^c$	$56,18 \pm 0,64^c$
15F-0P	$87,57 \pm 0,71^f$	$0,10 \pm 0,14^c$	$7,48 \pm 0,32^b$	$11,32 \pm 0,63^b$
15F-10P	$53,62 \pm 1,08^e$	$-2,84 \pm 0,12^a$	$9,69 \pm 0,28^c$	$44,51 \pm 1,07^c$
15F-20P	$44,85 \pm 1,20^a$	$-2,65 \pm 0,41^{a,b}$	$9,29 \pm 0,34^b$	$53,07 \pm 1,13^e$
20F-0P	$89,43 \pm 0,33^g$	$-0,20 \pm 0,07^c$	$7,49 \pm 0,35^b$	$9,78 \pm 0,40^a$
20F-10P	$54,63 \pm 1,08^b$	$-2,90 \pm 0,34^{a,b}$	$9,36 \pm 0,66^c$	$43,47 \pm 1,09^f$
20F-20P	$46,86 \pm 0,61^c$	$-2,33 \pm 0,36^b$	$9,75 \pm 0,76^c$	$51,14 \pm 0,52^g$

Se informan valores promedio \pm desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Dado que el almidón de mandioca y las fibras de celulosa son blancas, las bandejas sin proteínas presentaron una leve coloración amarillenta (*b* levemente positivos), probablemente debido a las altas temperaturas de procesamiento utilizadas en su obtención. En esas bandejas, no se observaron diferencias significativas en el color debidas a cambios en la concentración de las fibras de celulosa. Al aumentar la proporción de proteínas en la formulación, se intensificó la coloración verdosa (*a* - y *b* +) y los valores de *L* disminuyeron, produciendo un aumento en el parámetro ΔE .

V.3.3.- Morfología de las bandejas biodegradables obtenidas

Los materiales biodegradables obtenidos fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), permitiéndonos conocer su microestructura y relacionarla con sus propiedades mecánicas. En la **Figura V.5.** se muestran las microestructuras superficial (a) y transversal (b) de las bandejas obtenidas con: 1) almidón + 20% de fibra (20F-0P), 2) almidón + 20% de fibra + 10% de proteína (20F-10P), y 3) almidón + 10% de fibra + 20% de proteína (10F-20P). Producto de su proceso de obtención, las bandejas de almidón presentaron cáscaras superficiales más densas debido a que al estar en contacto con el molde caliente, la pasta de almidón se secó más rápidamente y no se pudo expandir demasiado (Shogren y col., 1998). Además, las mismas presentaron numerosas cavidades o agujeros en sus superficies (C), posiblemente causadas por burbujas de vapor o aire, que se contrajeron y se rompieron durante el secado (**Figura V.5.A.**). Mientras que el interior de este tipo de bandejas resultó menos denso, como una espuma, con celdas abiertas formadas al escaparse el agua hacia el molde con la consecuente ruptura de las celdas (Glenn y col., 2001; Shogren y col., 2002; Cinelli y col., 2006). En la micrografía del área transversal de la bandeja formada por almidón y fibras (**Figura V.5.BI.**), se observan celdas no demasiado grandes, con las fibras esparcidas homogéneamente en todo el material. Lawton y col. (2004) describieron que las fibras de madera de álamo reforzaron las espumas de almidón de maíz, pero no se orientaron debido a las características del proceso de producción (*foam baking*). En la microscopía **Figura V.5.BII.** correspondiente al área transversal de la bandeja que contiene igual cantidad de fibra pero con un 10% de proteínas, se observa una mayor homogeneidad y densidad que en la bandeja sin proteínas (**Figura V.5.BI.**). La misma diferencia puede ser observada en sus superficies (**Figuras V.5.AI.** y **V.5.BI.** respectivamente). En las bandejas que incluyen proteínas en su formulación prácticamente no se observaron las celdas abiertas interiores, y tampoco se lograron identificar zonas atribuibles a cada componente. Este material es el que presentó las mejores propiedades mecánicas, una menor absorción de agua, un menor espesor y una mayor densidad. Al aumentar la concentración de proteína a 20%, el interior de la bandeja cambió nuevamente su aspecto (**Figura V.5.BIII.**) pareciéndose más al de la bandeja 20F-0P, con celdas tal vez aún más grandes. El interior no resultó homogéneo, la región S1 más cerca de la

superficie presentó una apariencia más esponjosa, mientras que hacia el interior las paredes de las celdas más grandes, fueron más lisas (S2).

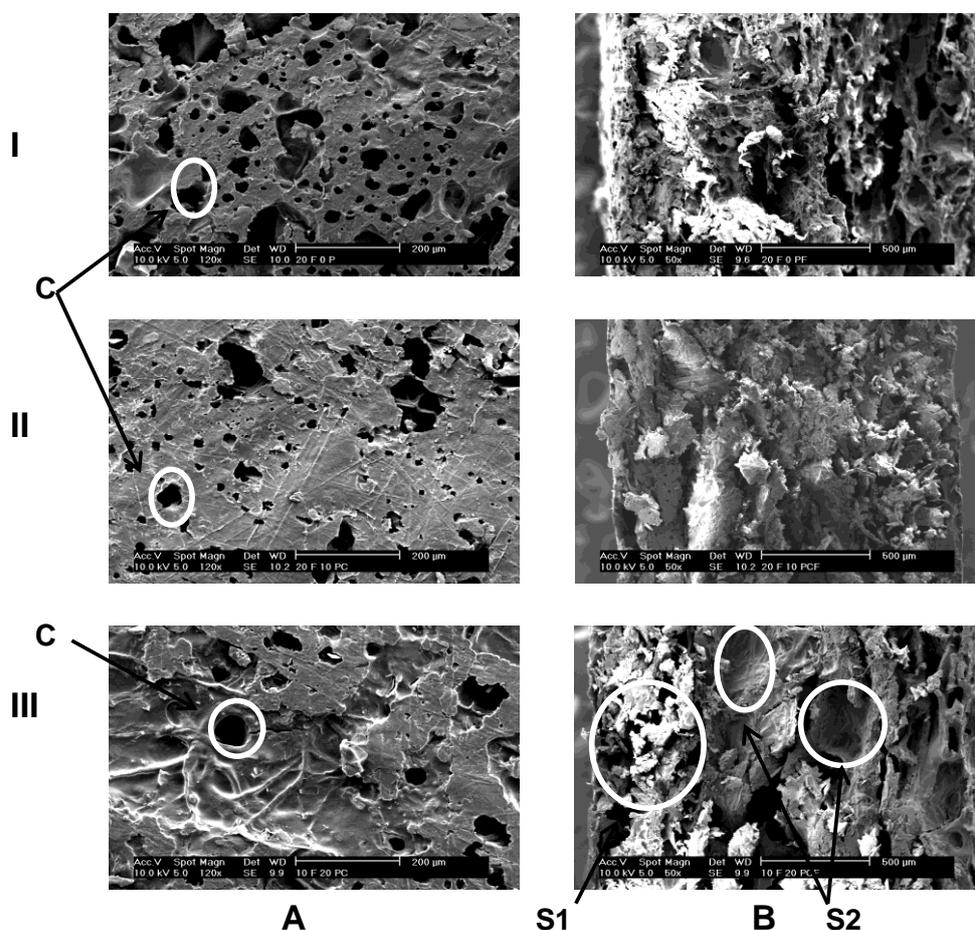


Figura V.5.: Microscopías electrónicas de barrido (SEM) **A)** superficiales (a 120X) y **B)** transversales (a 50X) de las bandejas en estudio. Los números **I, II** y **III** representan a las bandejas 20F-0P, 20F-10P y 10F-20P, respectivamente. En esta figura se muestran numerosas cavidades superficiales (C), mientras que en el interior se presentan zonas con distinta apariencia (S1 y S2).

Conociendo la microestructura que presentan las películas proteicas y de almidón obtenidas por *casting* (Mauri y col., 2006; Tapia-Blácido y col., 2007), estas zonas (S2) podrían ser atribuibles a una fase rica en proteínas. En esa fase, las fibras se observan bien arraigadas e impregnadas, seguramente reforzando a esa matriz. Probablemente al aumentar la concentración de proteínas, estas interfieren en la formación de la red de almidón, lo que se refleja en una disminución de la densidad y en la obtención de bandejas con peores propiedades mecánicas. Se conoce que los sistemas proteínas-polisacáridos se caracterizan por su limitada compatibilidad entre estos

macrocomponentes, resultando ocasionalmente en separación de fases (Donald y col., 1995; Arvanitoyannis y col., 1996; Arvanitoyannis y col., 1997; Grinberg y col., 1997). Para estos sistemas, al agregar fibras de celulosa, estas se impregnarían principalmente en la matriz proteica, mejorando las propiedades mecánicas sin afectar la absorción de agua.

V.3.4.- Efecto del contenido de fenoles sobre las propiedades de las bandejas biodegradables

La obtención de bandejas compuestas también se realizó utilizando como fuente de proteínas otros dos aislados proteicos de girasol (**AiExA-P** y **AiExS-P**) con menor contenido de fenoles que **Ai-P**. Los resultados se presentan en el **Anexo III**. Los materiales obtenidos presentaron el mismo comportamiento que las bandejas con **Ai-P**. Sus propiedades mecánicas también siguieron las tendencias descritas anteriormente, la tensión se incrementó con la adición de fibras de celulosa, mientras que la deformación relativa disminuyó al incrementar la concentración de proteínas en la formulación. El agregado de proteínas de girasol a las bandejas, también disminuyó hasta en un 44% su capacidad de absorción de agua, siendo las variaciones significativas al adicionar 10% de **AiExA-P** o **AiExS-P**. Estas materias primas sólo afectaron significativamente el color de las bandejas obtenidas, las que adoptaron la coloración característica de dichos aislados proteicos, según se discutió anteriormente (**Capítulo II**, sección **II.3.2.**). Además, se observó que al aumentar el contenido de proteínas se produjo un incremento en los parámetros *a* y *b*, obteniéndose bandejas de color marrón; mientras que el valor de *L* disminuyó, resultando así materiales más oscuros (con mayores ΔE).

Estos resultados muestran que es posible obtener materiales rígidos biodegradables a partir de almidón de mandioca y fibras de celulosa, y que al adicionarle 10% de aislado proteico de girasol, disminuye su capacidad de absorción de agua y mejoran sus propiedades mecánicas en tensión. Estos materiales podrían ser una alternativa al empleo de bandejas de poliestireno expandido en algunas aplicaciones, sin embargo su utilización aún requiere estudios más detallados

V.4.- Conclusiones

a.- Se obtuvieron bandejas biodegradables por *foam baking* a partir de almidón de mandioca, aislado proteico de girasol y fibras de celulosa.

b.- La adición de proteínas de girasol a las bandejas de almidón y fibras de celulosa produjo una importante reducción en el contenido de agua post-prensado y la capacidad de absorción de agua, sin afectar significativamente otras propiedades.

c.- La formulación que contiene 70% de almidón de mandioca, 20% de fibras de celulosa y 10% de aislado proteico de girasol (**Ai-P**) fue la que exhibió las mejores propiedades, incluyendo máxima resistencia y una notable reducción en la absorción de agua. Estas características se corresponden su microestructura más homogénea y compacta.

d.- El contenido de compuestos fenólicos presentes en los aislados proteicos de girasol sólo modificó la coloración de los materiales obtenidos.

e.- Los resultados informados en este trabajo muestran que estos materiales representan una alternativa a las bandejas de poliestireno expandido, sin embargo su utilización aún requiere estudios más detallados, considerando las necesidades específicas de cada caso y la seguridad que cada alimento necesite.

Conclusiones generales

CONCLUSIONES GENERALES

Se encontró que el *pellet* de girasol, subproducto de la industria aceitera local, posee un elevado contenido de proteínas y carece de factores antinutricionales, por lo que resultó apto para ser utilizado en la obtención de productos proteicos para alimentación humana sin necesidad de recurrir al uso de tratamientos térmicos intensos o bien precipitaciones isoelectricas y lavados para eliminarlos.

La baja solubilidad de las proteínas presentes en el *pellet* junto con la presencia de compuestos fenólicos fueron los problemas a resolver para obtener productos proteicos de girasol con potenciales aplicaciones en la industria alimentaria y de *packaging*.

En este trabajo se desarrollaron metodologías que permitieron producir concentrados y aislados proteicos de girasol con diferente composición, características y propiedades fisicoquímicas. Empleando las metodologías que involucraron lavados con agua o con solución de sulfito de sodio previo a la extracción proteica, se logró remover casi la totalidad de los fenoles presentes y recuperar un porcentaje mayor de proteínas que al utilizar los lavados alcohólicos. Los productos proteicos así obtenidos presentaron elevados porcentajes de solubilidad en agua, siendo ésta una característica importante para su empleo como ingrediente funcional.

Estas metodologías fueron escaladas satisfactoriamente a planta piloto, logrando obtener productos proteicos altamente solubles y con similar reducción en el contenido fenólico. Los productos obtenidos en planta piloto presentaron diferente composición química y polipeptídica, características y propiedades fisicoquímicas. Como consecuencia de las diferencias señaladas se esperaría que estos productos exhiban diferente funcionalidad.

La presencia de compuestos fenólicos en los productos proteicos de girasol, tanto de laboratorio como de planta piloto, afectó su coloración, pero no disminuyó la solubilidad en agua de sus proteínas. Si bien todos estos productos presentaron capacidad antioxidante, debido a la presencia estos compuestos, resulta necesario

realizar estudios más exhaustivos, ya que este hecho permitiría ampliar su campo de aplicación.

Se evaluaron las propiedades funcionales de los productos proteicos de girasol. Los aislados de girasol presentaron baja capacidad de imbibición de agua y moderada capacidad de retención de agua, debido a su elevada solubilidad. Al eliminar fenoles las proteínas sufrieron cambios conformacionales, evidenciados en mayores hidrofobicidades superficiales, que favorecieron las interacciones proteína-agua, reflejándose en menores a_w y mayores Q. Los productos proteicos de girasol obtenidos en planta piloto fueron capaces de formar emulsiones, siendo éstas más estables en medios con baja fuerza iónica. Las propiedades emulsificantes de los aislados fueron mejores que las de los correspondientes concentrados proteicos, y su estabilidad ($t_{1/2}$) se pudo correlacionar de manera directa, pero no unívoca, con la H_0 de las proteínas presentes. Estos productos también presentaron buena capacidad para formar espumas a distintos pHs y fuerzas iónicas. Las mayores diferencias se encontraron en la estabilidad de estos sistemas. Los concentrados proteicos formaron espumas más estables en medio ácido, mientras que a pH neutro fueron más estables las obtenidas con los aislados proteicos. Si bien estos productos poseen buenas propiedades, aún se podría plantear la posibilidad de incrementar su funcionalidad por tratamientos físicos, químicos o enzimáticos.

Los aislados producidos en planta piloto fueron capaces de formar geles autoportables por inducción térmica, con distintas características y propiedades. La presencia de compuestos fenólicos afectó el aspecto visual de los geles obtenidos y disminuyó su dureza. Resultaría importante la realización de estudios más detallados sobre las propiedades gelificantes de estos productos proteicos de girasol.

Además se estudió la obtención de materiales poliméricos biodegradables y/o comestibles a partir de proteínas de girasol. Los aislados proteicos de girasol son adecuados para la producción de películas biodegradables flexibles por *casting*, con propiedades mecánicas y de barrera en el orden de otras películas proteicas. Modificando la formulación inicial fue posible obtener materiales con distintas propiedades. Dicha red proteica está formada mayoritariamente por puentes de

hidrógeno y uniones disulfuro, y estabilizada en menor medida, por interacciones hidrofóbicas e iónicas. Se logró mejorar su WVP por formación de películas bicapa con cera de abejas, sin embargo bajo las condiciones experimentales estudiadas no se logró reforzar la matriz proteica por agregado de celulosa microcristalina. El contenido de compuestos fenólicos remanentes en los aislados, además de modificar el color y la opacidad de las películas, le confirió propiedades antioxidantes a la película, activándola naturalmente. Sería importante ajustar la metodología de obtención de películas a partir de concentrados proteicos, dado su mayor contenido de fenoles es esperable que sus propiedades antioxidantes aumentan.

También se obtuvieron bandejas biodegradables por *foam baking* a partir de almidón de mandioca, aislado proteico de girasol y fibras de celulosa, que podrían ser utilizadas como sustitutos de las bandejas de poliestireno para algunas aplicaciones. La adición de proteínas de girasol a las bandejas de almidón y fibras de celulosa produjo una importante reducción en el contenido de agua post-prensado y la capacidad de absorción de agua, sin afectar significativamente otras propiedades. La formulación que contenía 70% de almidón de mandioca, 20% de fibras de celulosa y 10% de aislado proteico de girasol (**Ai-P**) fue la que exhibió las mejores propiedades, incluyendo máxima resistencia y una notable reducción en la absorción de agua. Estas características se corresponden su microestructura más homogénea y compacta. El contenido de compuestos fenólicos presentes en los aislados proteicos de girasol sólo modificó la coloración de los materiales obtenidos. Estos materiales representan una alternativa a las bandejas de poliestireno expandido, sin embargo su utilización aún requiere estudios más detallados, considerando las necesidades específicas de cada caso y la seguridad que cada alimento necesite.

Estos estudios muestran:

- que el *pellet* de girasol de la industria aceitera local, actualmente utilizado para alimentación animal, constituye una materia prima interesante por su rica composición en proteínas de buena calidad y por la ausencia de factores antinutricionales.

- que es posible a través de procesos relativamente sencillos obtener productos enriquecidos en proteínas: aislados o concentrados, a escala de laboratorio e industrial (probado en planta piloto).

- que independientemente de la cantidad de compuestos fenólicos que estos productos retengan presentan altas solubilidades en agua, lo que los hace atractivos para algunas aplicaciones:

i) como ingredientes alimentarios: Ya que presentan la capacidad de formar y estabilizar espumas y emulsiones, aun a pH ácidos que son los que tienen la mayoría de los alimentos. Así como la de formar geles por inducción térmica.

ii) como materias primas para la formación de materiales biodegradables y /o comestibles flexibles y rígidos aplicables en packaging de alimentos o en plásticos para la agricultura.

- que la presencia de estos compuestos fenólicos además le otorgan propiedades antioxidantes a estos productos proteicos, hoy muy revalorizadas. En particular interesantes para la formación de recubrimientos comestibles.

- que las propiedades funcionales resultantes de estos productos todavía pueden optimizarse ya sea por modificación estructural de las proteínas, así como por variaciones en las formulaciones o por modificaciones en las técnicas utilizadas para la formación de las espumas, de las emulsiones o de los materiales.

Los resultados obtenidos en este trabajo tanto por los rendimientos del proceso como por las propiedades funcionales estudiadas muestran que los productos enriquecidos en proteínas de girasol podrían emplearse en la elaboración de productos de mayor valor agregado de la misma manera que actualmente se emplean las proteínas de soja.

Referencias Bibliográficas

Referencias bibliográficas

- Abraham, G. & Hron, R. J. (1991) Oilseeds and their oil. John Wiley & Sons, Inc. New York, Vol. III.
- ABNT NBR NM ISO 535. (1999). Papel e Cartao. Determinacao da capacidade de absorcao de água. Método de Cobb.
- Abugoch, L.E., Romero, N., Tapia, C.A., Silva, J., Rivera, M. (2008) Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa wild*) protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4745-4750.
- Adachi M, Kanamori J, Masuda T, Yagasaki K, Kitamura K, Mikami B, Utsumi S. (2003) Crystal structure of soybean 11S globulin: Glycinin A3B4 homohexamer. *Proc Nat Acad Sci USA* 100:7395–400.
- Adebiyi, A.P.; Adebiyi, A.O.; Jin, D-H.; Ogawa, T.; Muramoto, K. Rice bran protein-based edible films. (2008). *International Journal of Food Science and Technology.* 43, 476-483.
- Adebowale, K.O.; Lawal, O.S. (2003). Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates *Food Chemistry.* 83, 237-246
- Agroredes S.R.L. <http://www.agroredes.com.ar> (Junio 2009).
- Alvarez Hayes, J.; Díaz Ramírez, L.E.; Mauri, A.N.; Añón, M.C. (2005) Obtención de películas biodegradables a partir de proteínas de amaranto *Proteínas y Coloides de Interés Industrial*. Ed. Univ. de Sevilla, Secretariado de Publicaciones. p. 215-22.
- Andrich, O.; Carrara, C.; Castel, V.; Netto, F.M.; Santiago, L. (2007). Concentración de Proteínas de Amaranto por Ultrafiltración Trabajo en extenso AATA 2007.
- Angles M.N., Ferrando F., Farriol X., Salvado J. (2001). Suitability of steam exploded residual softwood for the production of binderless panels. Effect of the pre-treatment severity and lignin addition. *Biomass and Bioenergy*, 21 (3), pp. 211-224.
- Anisimova, I. N.; Konarev, A. V.; Gavrilova, V. A.; Rozhkova, V. T.; Fido, R. F.; Tatham, A. S.; Shewry, P. R. (2002). Polymorphism and inheritance of methionine-rich 2S albumins in sunflower. *Euphytica.* 129, 99-107.
- Anker, M., stading, M., Hermansson, A.M. (1999). Effects of pH and the gel state on the mechanical properties, moisture contents, and glass transition temperatures of whey protein films. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1878-1886.
- Añón, M.C.; Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. (2001). Relationships between Different Hydration Properties of Commercial and Laboratory Soybean Isolates *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 10, 4852-4858.
- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, 1995.
- AOCS, Ba 9-59 (1980). American Oil Chemist Society. Urease activity. Official Method Ba 9-58. American Oil Chemists Society, Champagne, Illinois
- AOCS, Ba 1275 (1995) Official Methods and Recommended Practices of the AOCS (Métodos Oficiales y Prácticas Recomendadas de la AOCS) – 5a edición, AOCS, Champaign, Il. 1995.
- Arrese, E.L.; Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R.; Añón, M.C. (1991). Electrophoretic, Solubility, and Functional Properties of Commercial Soy Protein Isolates *J. Agric. Food Chem.* 39, 6, 1029-1032.
- Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., & Nakayama, A. (1996). Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol. Part 1. *Carbohydrate Polymers*, 31, 179–192.

Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aiba, S., & Yamamoto, N. (1997). Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. *Food Chemistry*, 60(4), 593–604.

Arvanitoyannis, I.S. (1999). Totally-And-Partially Biodegradable Polymer Blends Based on Natural and Synthetic Macromolecules: Preparation and Physical Properties and Potential as Food Packaging materials. *J. Macromol. Sci. - Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C39(2), pp.205-271.

ASTM E 96-80. 1989. Standard test methods for water vapor transmission of materials. Annual book of ASTM Standards. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA USA, 15: 745-54.

ASTM D644-94. (1994). Standard Test Methods for Moisture Content of Paper and Paperboard by Oven Drying. In Annual Book of ASTM Standards; ASTM (pp. 1–2). Philadelphia, PA.

Asociación argentina de girasol. <http://www.asagir.org.ar> (Junio 2009).

Avanza, M.V.; Puppo, M.C.; Añón, M.C. (2005). Rheological characterization of amaranth protein gels *Food Hydrocolloids*. 19, 889-898.

Ayhlion-Meixueiro, F.; Vaca-García, C.; Silvestre, F. (2000). Biodegradable Films from Isolate of Sunflower (*Helianthus annuus*) Proteins *J. Agric. Food Chem.* 48, 7, 3032-3036.

Azcona, J.O., Schang, M.J. y Cortamira, O. (2003). Pellets de girasol baja fibra: caracterización química-biológica. Cuadernillo Informativo Nº 4. Usos Alternativos del girasol en alimentación animal. ASAGIR. <http://www.asagir.org.ar>

Bartholomai, G.B., Pilosof, A.M. (2000). Caracterización funcional y estructural de proteínas. 2000. EUDEBA. CYTED. Buenos Aires, Argentina.

Bastos, D.H.M., de Olivera, D.M., Teixeira, R.L.M., Carvalho, P.O., Ribeiro, M.L. (2007). Yerba maté: Pharmacological properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 1, 1, 37-46.

Bau, H.M.; Mohtadi Nia, D.J.; Mejean, L. & Debry, G. (1983) Preparation of colorless sunflower protein products: Effect of processing on physicochemical and nutritional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1141-1148.

Beilinson, V., Z. Chen, R. C. Shoemaker, R. L. Fischer, R. B. Goldberg and N. C. Nielsen (2002). "Genomic organization of glycinin genes in soybean." *Theoretical and Applied Genetics* 104(6-7): 1132-1140.

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.

Bernardino-Nicanor, A., Scilingo, A.A., Añón, M.C. y Dávila Ortiz, G. (2005). Guava seed storage protein. Fractionation and characterization. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology*. 53, 3613-3617.

Beuchat, L.R. (1981). Microbial stability as affected by water activity. *Cer Foods World*. 25, 7, 345-349.

Bilani, N.; Hayashi, K.; Haraguchi, K.; Kasumi, T. (1989). Utilization of sunflower proteins in yogurt. *J. Food Sci. Technol.* 26, 205-209.

Booma, K., Prakash, V. (1990). Functional properties of the flour and the major protein fraction from sesame seed, sunflower seed and safflower seed. *Acta Alim.* 19,163–176.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.- Wiss.- u.- Technol.* 28, 25-30.

Brandengurg, A.H., Weller, C.L, Testin, R.F. (1993). Edible films and coatings from soy protein. *J Food Sci.* 58, 5, 1086-1089.

Brueckner, J., Mieth, G., Muschiolik, G. (1986). Functional properties of plant proteins in selected foods. *Nahrung.* 30,428–429.

Burger, J.C., Chapman, M.A., Burke, J.M. (2008). Molecular insights into the evolution of crop plants. *American Journal of Botany.* 95, 2, 113–122.

Burnett, G.R.; Rigby, N.M.; Mills, E.N.C.; Belton, P.S.; Fido, R.J.; Tatham, A.S.; Shewry, P.R. (2002). Characterization of the Emulsification Properties of 2S Albumins from Sunflower Seed *Journal of Colloid and Interface Science.* 247, 177-185.

Cámara de la Industria Aceitera de la República Argentina (CIARA). <http://www.ciaracec.com.ar/ciara/> (Junio 2009).

Cater, C. M.; Gheyasuddin, S.; Mattil, K. F. (1972). The effect of chlorogenic, quinic, and caffeic acids on the solubility and color of protein isolates, especially from sunflower seed. *Cereal Chem.* 49, 508-514.

Cai, T.; Chang, K-C.; Lunde, H. (1996). Physicochemical Properties and Yields of Sunflower Protein Enzymatic Hydrolysates As Affected by Enzyme and Defatted Sunflower Meal *J. Agric. Food Chem.* 44, 11, 3500-3506.

Campbell, M.F.; Fiala, R.J.; Wideman, J.D. & Rasche, J.F. (1981) Bland vegetable protein product and method of manufacture. United States Patent 4,265,925

Canella, M., Castriotta, G., Sodini, G. (1977). Functional properties of sunflower products after extraction of phenolic pigments by acid butanol. *Riv Ital Sost Grasse.* 54, 73–76.

Canella, M.; Castriotta, G.; Bernardi, A.; Boni, R. (1985). Functional properties of individual sunflower albumin and globulin. *Lebensm.-Wiss. Technol.-Food Sci. Technol.* 18, 288-292.

Cao, N., Fu, Y., He, J. (2007). Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids.* 21, 1153-1162.

Castor Normandin, F.; Ducastaing, A.; Prevot, A.; Raymond, J. (1984). Preparation of protein isolates from sunflower cakes. *ReV. Fr. Corps Gras.* 7-8, 293-299.

Carr, L. G., Parra, D. F., Ponce, P., Lugao, A. B., & Buchl, P. M. (2006). Influence of fibers on the mechanical properties of cassava starch foams. *Journal of Polymer Environment,* 14, 179–183.

Chambi, H.; Grosso, C. (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase *Food Research International.* 39, 458-466.

Cheftel, J. C. (1989) In *Proteínas Alimentarias*; Ed. Acribia, Zaragoza, A. S. A. Ch. 4, pp 49-100.

Cherian G., Gennadios A., Weller C. and Chinachoti P. (1995). Thermomechanical behavior of wheat gluten films: effect of sucrose, glycerin, and sorbitol. *Cereal Chemistry.* 72, 1, 1-6.

Chrispeels M.J. y Sadava D.E. (2003). Agricultural R&D, productivity and global food prospects. En: *Plants, genes and crop biotechnology.* Second edition. Jones & Bartlett Publishers. Chapter 2, 22-51.

Cinelli, P., Chiellini, E., Lawton, J. W., & Iman, S. H. (2006). Foamed articles based on potato starch, corn fibers and poly(vinyl alcohol). *Polymer Degradation and Stability,* 91, 1147–1155.

Claughton, S.M., Pearce, R.J. (1989). Preparation and properties of acid-modified sunflower protein isolate. *J Food Sci.* 54:357–361.

Clifford, M.N.; Knight, S.; Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSn *J. Agric. Food Chern.* 53, 10, 3821-3832.

Código Alimentari Argentino (CAA). <http://www.anmat.gov.ar>

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.

Coupland, J.N., Shaw, N.B., Monahan, F.J., O’Riordan, E.D., O’Sullivan, M. (2000). Modelling the effect of glycerol on the moisture sorption behavior of whey protein edible films. *J Food Eng.* 43, 1, 25-30.

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. (1997). Packaging material based on natural polymers. *Ind. Aliment. Agric.* 114:110-6.

Cuq B, Gontard N, Guilbert N. (1998). Proteins as agricultural polymers for packaging production. *Cereal Chemistry.* 75:1-9.

D’Agostina, A.; Antonioni, C.; Resta, D.; Arnoldi, A.; Bez, J.; Knauf, U.; Wäsche, A. (2006). Optimization of a Pilot-Scale Process for Producing Lupin Protein Isolates with Valuable Technological Properties and Minimum Thermal Damage *J. Agric. Food Chem.* 54, 1, 92-98.

Dalgalarondo, M.; Raymond, J.; Azanza, J. L. (1984). Sunflower seed proteins: characterization and subunit composition of the globulin fraction. *J. Exp. Bot.* 35, 1618-1628.

Damodaran S. (1997). Protein-stabilized foams and emulsions. In: Damodaran S, Paraf A, editors. *Food proteins and their applications*. New York: Marcel Dekker. p 57–110.

Damodaran, S. (1989). Interrelationship of Molecular and Functional Properties of Food Proteins. In *Food Proteins*; Kinsella, J. E., Soucie, W. G., Eds.; American Oil Chemists’ Society: Champaign, IL. Chapter 3, pp 21-51.

Damodaran, S. (1990). "Interfaces, Protein Films, and Foams." 34: 1-79.

Damodaran, S. (2005). Protein Stabilization of Emulsions and Foams *J. Food Sci.* 70,3, R54-R66.

Da Silva Pinto, M., Lajolo, F. M., Genovese, M.I. (2005). Effect of storage temperature and water activity on the content and profile of isoflavones, antioxidant activity, and in vitro protein digestibility of soy protein isolates and defatted soy flours. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6340-6346.

Dao, L., Friedman, M. (1992). Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.* 40, 11, 2152-2156.

Darby N. and Creighton T.E. (1995). Disulfide bonds in protein folding and stability. In: Shirley, B.A. (ed), *Protein stability and folding. Theory and Practice*. Totowa, New Jersey. pp. 219-252.

Davis, G., & Song, J. H. (2006). Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. *Industrial Crops and Products*, 23, 147–161.

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J., Delporte, B. & Voilley, A. (2000). Lipid Hydrophobicity and Physical State Effects on the Properties of Bilayer Edible Films. *Journal of Membrane Science.* 180. 47-55.

Della Gatta, C., Piergiovanni, A.R., Perrino, P. (1988). An improved method for the determination of trypsin inhibitor levels in legumes. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 21, 315-318.

Della Gatta, C.; Piergiovanni, A.R. (1996). Technological and nutritional aspects in hyperproteic bread prepared with the addition of sunflower meal *Food Chemistry.* 57, 4, 493-496.

Denavi, G.A. (2009). Películas y recubrimientos comestibles para alimentos en base a proteínas de soja. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

- Dickinson, E., Matsumura, Y. (1991). Time-dependent polymerization of lactoglobulin through disulphide bonds at the oil-water interface in emulsions. *Int J Biol Macromol.* 13, 26–30.
- Dickinson E. (1998). Proteins at interfaces and in emulsions: Stability, rheology and interactions. *J Chem Soc Faraday Trans.* 88, 2973–85.
- Dickinson E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 20, 197–210.
- Dirección Nacional de Alimentos (SAGPyA), Argentina. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar> (Junio 2009).
- Dogan, N.; McHugh, T.H. (2007). Effects of Microcrystalline Cellulose on Functional Properties of Hydroxy Propyl Methyl Cellulose Microcomposite Films *J. Food Sci.* 72, 1, E16-E22.
- Donald, A. M., Durrani, C. M., Jones, R. A., Rennie, A. R., & Tromp, R. H. (1995). Physical methods to study phase separation in protein–polysaccharide mixtures. In S. E. Harding, S. E. Hill, & J. R. Mitchell (Eds.), *Biopolymer mixture* (pp. 99–116). Nottingham: Nottingham University Press.
- Dreher, M.L., Holm, E.T. (1983). A high performance liquid chromatographic method for chlorogenic acid determination in sunflower seeds. *J Food Sci.* 48, 1, 264-265.
- Duca, M., A. Levitchi and I. Anisimova (2008). "Polymorphism of helianthinin polypeptides from various sunflower genotypes." *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 22(4): 897-900.
- Dufresne A., Cavaillé J-Y. & Vignon, M.R. (1997). Mechanical behavior of sheets prepared from sugar beet cellulose microfibrils. *Journal of Applied Polymer Science*, 64 (6), pp. 1185 – 1194.
- Dunwell, J.M. (1998). Cupins: a new superfamily of functionally diverse proteins that include germins and plant storage proteins. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 15, 1–32.
- Earle, F.R., Vanetten, C.H., Clark, T.F., Wolff, I.A. (1968). Compositional data on sunflower seed. *J Am Oil Chem Soc.* 45, 876–879.
- Ee, K.Y., Agboola, R.S., Zhao, J. (2009). Influence of heat processing on functional properties of Australian wattle seed (*Acacia victoriae* Benth) extracts. *Food Hydrocolloids* 23, 116–124.
- Eichhorn S.J., Baillie C.A., Zafeiropoulos N., Mwaikambo L.Y., Ansell M.P., Dufresne A., Entwistle K.M., Herrera-Franco P.J., Escamilla G.C., Groom L., Hughes M., Hill C., Rials T.G. & Wild P.M. (2001). Review: Current international research into cellulosic fibres and composites. *Journal of Materials Science*, 36 (9), pp 2107-2131.
- Elisalde, B. E., Pilosof, A. M. R., Bartholomai, G. B. (1996). Empirical model for water and hydration rate of food powders by sorption and Baumman methods. *Journal of Food Science*, 61(2), 407–409.
- Emmambux, M.N., Standing, M., Taylor, J.R.N. (2004). Sorghum kafirin film property modification with hydrolysable and condensed tannins. *J Cereal Sci.* 40, 2, 127-135.
- ExPASy Proteomics Server. <http://www.expasy.org> (Junio 2009).
- Fang, Y., Dalgleish, D.G. (1996). Competitive adsorption between dioleoylphosphatidylcholine and sodium caseinate on oil-water interfaces. *J Agric Food Chem.* 44, 59–64.
- Fleming, S. E.; Sosulski, F. (1975). Gelation and thickening phenomena of vegetable protein products. *J. Food Sci.* 40, 805-807.
- Flores, S., Conte, A., Campos, C., Gerschenson, L. & Del Nobile, M. (2007). Mass Transport Properties of Tapioca-Based Active Edible Films. *Journal of Food Engineering.* 81. 580–586.
- Fomin, V. A., & Guzeev, V. V. (2001). Biodegradable Polymers, their present state and future prospects. *Progress in Rubber and Plastics Technology*, 17(3), 186–204.

Foulk, J.A.; Bunn, J.M. (2001). Properties of compression-molded, acetylated soy protein films. *Industrial Crops and Products*. 14, 11-22.

Fujioka, K.; Shibamoto, T. (2008). Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chemistry*. 106, 217-221.

García, M. A., Martino, M. N. & Zaritzky, N. E. (1999) Edible starch films and coatings characterization: Scanning electron microscopy, water vapor transmission and gas permeabilities. *Scanning*, 21, 348–353.

García, S.C., Santini, F.J., y Pavan, E. (2003). Uso de harina de girasol en la alimentación de ganado vacuno en pastoreo y en alimentación a corral. Cuadernillo Informativo N° 4. Usos Alternativos del girasol en alimentación animal. ASAGIR. www.asagir.org.ar

García-Alonso, M., Rimbach, G., Rivas-Gonzalo, J.C., Pascual-Teresa, S. (2004). Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A- studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.* 52, 11, 3378-3384.

Gaspar, M., Benko, Z., Dogossy, G., Reczey, K., & Czigany, T. (2005). Reducing water absorption in compostable starch-based plastics. *Polymer Degradation and Stability*, 90, 563–569.

Gheyasuddin, S.; Cater, C. M.; Mattil, K. F. (1970). Preparation of a colourless sunflower protein isolate. *Food Technol.* 24, 242-243.

Gennadios, A., Weller, C.L. (1990). Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*. 44, 10, 63-69.

Gennadios, A., Brandenburg, A.H., Weller, C.L., Testin, R.F. (1993). Effect of pH on properties of wheat gluten and soy protein isolate films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 41: 1835-1839.

Gennadios, A., McHugh, T.H., Weller, C.L., Krochta, J.M. (1994). Edible coatings and film based on proteins. In: J.M. Krochta, E.A. Baldwin & M. Nisperos-Carriedo (Eds.), *Edible coatings and films to improve food quality*. Lancaster:Technomic Publishing Co., Inc. p. 201-77.

Gennadios, A., Weller, C.L. Hanna, M.A., Froning, G.W. (1996). Mechanical and barrier properties of egg albumen film. *J Food Sci.* 61, 3, 585-589.

Gennadios, A. (2002). *Protein-based Films and Coatings*. CRC Press. USA.

Ghorpade, V.M., Li, H., Gennadios, A., Hanna, M.A. (1995). Chemically modified soy protein films. *Trans. ASAE*, 38 (6): 1805-1808.

Glenn, G. M., & Orts, W. J. (2001). Properties of starch-based foam formed by compression/explosion processing. *Industrial Crops and Products*, 13, 135–143.

Glenn, G. M., Orts, W. J., & Nobes, G. A. R. (2001). Starch, fiber and CaCO₃ effects on the physical properties of foams made by a baking process. *Industrial Crops and Products*, 14, 201–212.

Gnanasambandam R., Hettiarachchy N.S. and Coleman M. (1997). Mechanical and barrier properties of rice bran films. *Journal of Food Science* 62: 395-398

Gontard N., Guilbert S. and Cuq J.L. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science* 58: 206-211.

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., Ring, S. (1996). Edible wheat gluten film: influence of water content on glass transition temperature. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3474-3478.

González, R.J., Urquía, M.A. (1975). Estudio del equilibrio práctico de extracción de proteínas a partir de harinas industriales de girasol. *ITA UNL*. 1, 75-80.

González, R.J., Remondetto, G.E., Coutaz, R., Santiago, L.G., Ronaldo, A.G. (1995). Efectos de variables del proceso en planta piloto sobre algunas propiedades de los aislados proteicos de soja. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 35, 1, 77-91.

González-Pérez, S.; Merck, K. B.; Vereijken, J. M.; Van Koningsveld, G. A.; Gruppen, H.; Voragen, A. G. J. (2002). Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid-free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1713-1719.

González-Pérez, S. (2003). Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins. Ph.D. thesis Wageningen University, The Netherlands.

González-Pérez, S.; Merck, K. B.; Vereijken, J. M.; Van Koningsveld, G. A.; Gruppen, H.; Voragen, A. G. J. (2004). Conformational states of sunflower (*Helianthus annuus*) helianthinin: effect of heat and pH. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6770- 6778.

González-Pérez, S., van Koningsveld, G., Vereijken, J.M, Merck, K.B., Gruppen, H., Voragen, A.G.J. (2005). Emulsion Properties of Sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2261-2267.

González-Pérez, S., Vereijken, J.M, van Koningsveld, G.A., Gruppen, H., Voragen, A.G.J. (2005). Formation and stability of foams made with sunflower (*Helianthus annuus*) proteins. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6469-6476.

González-Pérez, S., Vereijken, J.M. (2008). Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *J Science of Food Agric.*

Gómez Estaca J., Giménez B. Gómez-Guillén C &Montero, P. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films base don sole skin or a comercial fish skin gelatin. *Journal of Food Engineering* 92:78-85.

Gotteland, M., Saturnino, P.V. (2007). Algunas verdades sobre el café. *Revista Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología.* 34, 2, 1-23.

Grinberg, V., & Tolstoguzov, V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solution. *Food Hydrocolloids*, 11, 145–158.

Guéguen, J.; Popineau, Y.; Anisimova, I. N.; Fido, R. J.; Shewry, P. R.; Tatham, A. S. (1996). Functionality of the 2S albumin seed storage proteins from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 44, 1184-1189.

Gülçin, I. (2005). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.* 217, 2-3, 213-220.

Han, J. H. (2002) Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents. En: *Protein-based Films and Coatings*. Ed. A. Gennadios. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pág. 485-499.

Harter A.V., Gardner, K.A., Falush, D., Lentz, D.L. Bye, R.A., Rieseberg, L.H. (2004). Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature.* 430, 201–205.

Heiser C.B., Jr. (2008). The sunflower (*Helianthus annuus*) in Mexico: further evidence for a North American domestication. *Genet Resour Crop Evol.* 55, 9–13.

Hernandez-Izquierdo, V.M. & Krochta, J.M. (2008). Thermoplastic processing of proteins for film formation - A review. *Journal of Food Science* 73 (2), 30-39.

Hou, D.H., Chang, S.K. (2004). Structural characteristics of purified glycinin from soybeans stored under various conditions. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3792-3800.

Huffman, V. L.; Lee, C. K.; Burns, E. E. (1975). Selected functional properties of sunflower meal (*Helianthus annuus*). *J. Food Sci.* 40, 70-74.

Irissin-Mangata, J., Bauduin, G., Boutevin, B., Gontard, N. (2001). New plasticizers for wheat films. *European Polymer Journal.* 37, 8, 1533-1541.

- Jagannath, J. H., Nanjappa, C., Das Gupta, D. K., & Bawa, A. S. (2003). Mechanical and barrier properties of edible starch–protein-based films. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(1), 64–71.
- Jangchud, A., Chinnan, M.S. (1999). Peanut protein film as affected by drying temperature and pH of film forming solution. *Journal of Food Science* 64, 153-157
- Johnson, L.A. & Wen, H. (1983) Process for the preparation of protein isolate of improved quality from vegetable protein sources using alkali metal borohydrides. United States Patent 4,402,874
- Jovanovich, G.; Puppo, M.C.; Giner, S.A.; Añón, M.C. (2003). Water uptake by dehydrated soy protein isolates Comparison of equilibrium vapour sorption and water imbibing methods *Journal of Food Engineering*. 56, 331-338
- Jung, R., M. P. Scott, Y. W. Nam, T. W. Beaman, R. Bassuner, I. Saalbach, K. Muntz and N. C. Nielsen (1998). "The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins." *Plant Cell* 10(3): 343-57.
- Kabirullah, M.; Wills, R. B. H. (1983). Characterization of sunflower protein. *J. Agric. Food Chem.* 31, 953-956.
- Kabirullah, M.; Wills, R. B. H. (1988). Foaming properties of sunflower seed protein. *J. Food Sci. Technol.* 25, 16-19.
- Karayannidou, A.; Makri, E.; Papalamprou, E.; Doxastakis, G.; Vaintraub, I.; Lapteva, N.; Artico, G. (2007). Limited proteolysis as a tool for the improvement of the functionality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates produced by seeds or industrial by-products (solvent cake) *Food Chemistry*. 104, 1728-1733.
- Kato, A.; Nakai, S. (1980). Hydrophobicity Determined by a Fluorescence Probe Method and its Correlation with Surface Properties of Proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 624, 13-20.
- Kato A, Osako Y, Matsudomi N, Kobayashi K. (1983). Changes in emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agric Biol Chem* 47, 33–8.
- Kim K.M., Weller C.L., Hanna M.A. and Gennadios A. (2002). Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. *Lebensm Wiss u Technol.* 35: 140-145.
- Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of food proteins.: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7, 219.
- Kinsella, J. E. (1984).Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1984, 21, 197-262.
- Krochta J.M. (1997). Edible Protein Films and Coatings. In: Damodaran, S. and Paraf, A. (ed), *Food proteins and their applications*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 529-49.
- Kroll, J.; Rawel, H.M.; Rohn, S. (2003). Reactions of Plant Phenolics with Food Proteins and Enzymes under Special Consideration of Covalent Bonds *Food Sci. Technol. Res.* 9, 3, 205-218.
- Labuza, T.P., Bell, L.N. (2000). Moisture sorption: practical aspects of isotherm measurements and use. 2nd ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, M.N.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 681-685.
- Lakemond, C. M. M.; de Jongh, H. H. J.; Helsing, M.; Gruppen, H.; Voragen, A. G. J. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1985-1990.
- Lapteva, N.; Vaintraub, I. & Kakhovskaya, I. (2004) Process for obtaining a food proteic isolate from sunflower groats. MD2621F

- Larotonda, F.D.S.; Matsui, K.N.; Sobral, P.J.A.; Laurindo, J.B. (2005). Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate *Journal of Food Engineering*. 71, 394-402.
- Lawhon, J.T., Cater, C.M., Mattil, K.F. (1972). A comparative study of the whipping potential of an extract from several oilseed flours. *Cereal Sci Today* 17, 240–244 (1972).
- Lawhon, J. T.; Glass, R. W.; Manak, L. J.; Lusas, E. W. (1982). Whitecolored protein isolate from sunflower: processes and products. *Food Technol.* 36, 86-87.
- Lawton, J. W., Shogren, R. L., & Tiefenbacher, K. F. (1999). Effect of batter solids and starch type on the structure of baked starch foams. *Cereal Chemistry*, 76, 682–687.
- Lawton, J. W., Shogren, R. L., & Tiefenbacher, K. F. (2004). Aspen fiber addition improves the mechanical properties of baked cornstarch foams. *Industrial Crops and Products*, 19, 41–48.
- Lentz, D.L., Pohl, M.D.L., Alvarado, J.L., Tarighat, S., and Bye, R. (2008). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. *PNAS*. 105, 17, 6323-6237.
- León, P.G., Rojas, A.M. (2007). Gellan gum films as carriers of L-(+)-ascorbic acid. *Food Research International*. 40, 5, 565-575.
- Leung, J., Fenton, T.W., Clandinin, D.R. (1981). Phenolics components of sunflower flour. *J Food Sci.* 46, 5, 1386-1388.
- Lin MJY, Humbert ES and Sosulski FW, (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *J Food Sci.* 39, 368–370.
- Lindsay, M.P., Skerritt, J.H. (1999). The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trends in Food science & Technology*. 10, 247-253.
- Liu W, Amar K. Mohanty, Per Askeland, Lawrence T. Drzal and Manjusri Misra. 2004. Influence of fiber surface treatment on properties of Indian grass fiber reinforced soy protein based biocomposites. *Polymer*, 45, 7589-7596
- Liu W, Manjusri Misra, Per Askeland, Lawrence T. Drzal and Amar K. Mohanty. 2005. Green composites from soy based plastic and pineapple leaf fiber: fabrication and properties evaluation *Polymer*, 46, 2710-2721
- Lqari y col., 2002 Lqari, H.; Vioque, J.; Pedroche, J.; Millán, F. (2002). *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization *Food Chemistry*. 76, 349-356.
- Loomis, W.D., Battaile, J. (1966). Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*. 5, 423-438.
- Makri, E. ; Papalamprou, E.; Doxastakis, G. (2005). Study of functional properties of seed storage proteins from indigenous European legume crops (lupin, pea, broad bean) in admixture with polysaccharides *Food Hydrocolloids*. 19, 583-594.
- Mali, S.; Grossmann, M.V.E.; García, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. (2005). Mechanical and thermal properties of yam starch films *Food Hydrocolloids*. 19, 157-164.
- Mali, S.; Grossmann, M.V.E.; García, M.A.; Martino, M.N.; Zaritzky, N.E. (2006). Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources *Journal of Food Engineering*. 75, 453-460.
- Marques, V. & Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medical plants and infusions. *Food Chemistry* 113, 1370–1376.

- Martelli, S.M. ; Moore, G. ; Silva Paes, S.; Gandolfo, C. ; Laurindo, J.B. (2006). Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 39, 292-301.
- Martínez, E.N. (1997) Caracterización de proteínas de amaranto. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Martínez , K.D., Baeza, R.I., Millán, F. Pilosof, A.M.R. (2004). Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloids.* 19, 3, 361-369.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.J., Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 50, 1, 5-18.
- Martins, V.B.; Netto, F.M. (2006). Physicochemical and functional properties of soy protein isolate as a function of water activity and storage *Food Research International.* 39, 145-153.
- 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." *J Agric Food Chem* 47(12): 5278-84.
- Matsui, K. N., Larotonda, F. D. S., Paes, S. S., Luiz, D. B., Pires, A. T. N., & Laurindo, J. B. (2004). Cassava bagasse-Kraft paper composites: Analysis of influence of impregnation with starch acetate on tensile strength and water absorption properties. *Carbohydrate Polymers*, 55, 237–243.
- Mauri A.N., Añón M.C. (2006). Effect of the 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.
- Mauri A.N., Añón M.C. (2008). Mechanical and physical properties of soy protein films with pH modified microstructures. *Food Science and Technology International.* 2, 119-125.
- McClements, D.J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 9, 305–313.
- McHugh H.T., Avena-Bustillos R. and Krochta J.M. (1993). Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Ibid* 58: 899-903.
- Melgarejo, M. Cuadernillo N° 3. Girasol/Usos. ASAGIR. 2003. www.agagir.org.ar
- Mendieta, J.R., Giudici, M.A., de la Canal, L. (2004). Occurrence of antimicrobial serin-proteinases in sunflower seeds. *J Phytopathology.* 152, 1, 43-47.
- Micard V., Morel M.H., Bonicel J. & Guilbert S. (2001). Thermal properties of raw and processed wheat gluten in relation with protein aggregation. *Polymer*, 42 (2), pp. 477-485.
- Miller, N.; Pretorius, E. (1985). Evaluation of the effect of processing on sunflower protein quality. *Food Chem.* 17, 65-70.
- Miñones Conde, J., Rodríguez Patino, J.M., Miñones Trillo, J. (2005). Structural characteristics of hydrolysates of proteins from extracted sunflower flour at the air-water interface. *Biomacromolecules.* 6, 3137-3145.
- Miñones Conde, J.; Rodríguez Patino, J.M. (2007). Phospholipids and hydrolysates from a sunflower protein isolate adsorbed films at the air–water interface *Food Hydrocolloids.* 21, 212-220.
- Miñones Conde, J.; Rodríguez Patino, J.M. (2007). The effect of enzymatic treatment of a sunflower protein isolate on the rate of adsorption at the air–water interface *Journal of Food Engineering.* 78, 1001-1009.

Molina y col., 2004 Molina, M.I.; Petruccelli, S.; Añón, M.C. (2004). Effect of pH and Ionic Strength Modifications on Thermal Denaturation of the 11S Globulin of Sunflower (*Helianthus annuus*) J. Agric. Food Chem. 52, 6023-6029.

Molina Ortiz, S. E., Wagner, J.R. (2002). "Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: Structural characteristics, solubility and foaming properties." Food Research International 35(6): 511-518.

Montgomery, D. C. (1993). Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V., 3rd ed., México.

Moore, G.R.P.; Martelli, S.M. ; Gandolfo, C. ; do Amaral Sobral, P.J. ; Laurindo, J.B. (2006). Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films Food Hydrocolloids. 20, 975-982.

Moores, R. G.; McDermott, D. L.; Wood, T. R. (1948). Determination of chlorogenic acid in coffee. *Anal. Chem.* 20, 620-624.

Moure, A.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; Parajó, J.C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review Food Research International. 39, 945-963.

Muntz, K. (1998). "Deposition of storage proteins." Plant Molecular Biology 38: 77-99.

Müller, C.M.O.; Yamashita, F. ; Laurindo, J.B. (2008). Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach Carbohydrate Polymers.

Nakai, S. (1983). Structure-function relationships of food proteins: with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. J. Agric. Food Chem. 31 (4), 676-683.

National Institute of Health. Image J <http://resb.info.nih.gov/ij/>. (junio 2009).

National sunflower association <http://www.sunflowerusa.com> (junio 2009).

Noishiki, Y., Nishiyama Y., Wada M., Kuga S. & Magoshi, J. (2002). Mechanical properties of silk fibroin-microcrystalline cellulose composite films. Journal of Applied Polymer Science, 86 (13), pp. 3425 – 3429.

Nuzzolo, C.; Vignola, R.; Groggia, A. (1980). Method for preparing a proteinic isolate from sunflowerseed meal using aluminum salts. United States Patent 4,212,799.

O'Connor D.E. (1971). Preparing light-colored protein isolate from sunflower meal by acid washing prior to alkaline extraction. United States Patent (3,586,662).

O'Connor D.E. (1971). Preparing light-coloured protein isolate from sunflower meal by alkali extraction under an inert gas blanket followed by membrane ultrafiltration. United States Patent (3,622,556).

O'Kane, F.E., Happe, R.P., Vereijken, J.M., Gruppen, H., van Boekel, M.A.J.S. (2004). Heat-induced gelation of pea legumin: comparison with soybean glycinin. J. Agric Food Chem. 52, 16, 5071-5078.

Olabarrieta, I.; Gallstedt, M.; Ispizua, I.; Sarasua, J.R.; Hedenqvist, M.S. (2006). Properties of Aged Montmorillonite-Wheat Gluten Composite Films J. Agric. Food Chem. 54, 4, 1283-128..

Olthof, M.R.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. (2001). Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans J. Nutr. 131, 66-71.

Oomah, B. D. & G. Mazza (1999). "Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops." Trends in Food Science & Technology 10(6-7): 193-198.

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.; Rouilly, A.; Silvestre, F.; Rigal, L. (2003). Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins *Industrial Crops and Products*. 18, 91-100.

Osborne, T. (1924) *En. The Vegetable Proteins*. 2da. edición ed. Longmans y Green, Nueva York.

Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C. Jackson, M.G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *J Food eng*. 70, 2, 205-210.

Pacheco de Delahaye, E.; Sánchez, M.; Girlando, R.; Sánchez, E. (1994). Obtención de aislados proteínicos de girasol por hidrólisis con bromelina y papaína, composición química y propiedades funcionales *Agronomía Trop*. 2, 299-315.

Pantoja-Uceda, D.; Shewry, P.R.; Bruix, M.; Tatham, A.S.; Santoro, J.; Rico, M. (2004). Solution Structure of a Methionine-Rich 2S Albumin from Sunflower Seeds: Relationship to Its Allergenic and Emulsifying Properties *Biochemistry*. 43, 6976-6986.

Pawar, V. D.; Patil, J. N.; Sakhale, B. K.; Agarkar, B. S. (2001). Studies on selected functional properties of defatted sunflower meal and its high protein products. *J. Food Sci. Technol*. 38, 47-51.

Pearce, R. J. (1984). Preparation of protein isolate from sunflower seed. United States Patent 4,435,319.

Pearce, R. J.; Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem*. 26, 716-723.

Pérez-Gago, M., Krochta, J. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanicals properties of whey protein /beeswax emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49. 996-1002.

Petersen K, Nielsen PV, Bertelsen G, Lawther M, Olsen MB, Nilsson NH, Mortensen G. (1999). Potential of biobased materials for food packaging. *Trends in Food Science and Technology* 10:52-68.

Petit, L.; Davin, A.; Gueguen, J.(1979). Purified sunflower seed protein isolates. United States Patent 4,174,313.

Petrucelli, S. (1993). Modificaciones estructurales de aislados proteicos de soja producidas por tratamientos reductores y térmicos y su relación con propiedades funcionales. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.

Petrucelli, S. and M. C. Añón (1994). "Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties." *J. Agric. Food Chem* 42: 2161-2169.

Petrucelli, S. and M. C. Añón (1994). "Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates: 2. Surface properties." *J. Agric. Food Chem* 42: 2170-2176.

Petrucelli, S. and M. C. Añón (1995). "Thermal aggregation of soy protein isolates." *J. Agric. Food Chem* 43: 3035-3041.

Pierpoint, W.S. (1969). O-Quinones formed in plant extracts; their reactions with amino acids and peptides. *Biochem J* .112, 609-616.

Pilosofo, A.M., Bartholomai, G.B., Boquet, R. (1985). Kinetics of water uptake by food powders. *J. Food Sci*. 50, 278-280.

- Pilosof, A. M. R. (2000). Propiedades de hidratación. En A. M. R. Pilosof & G. B. Bartholomai. Caracterización funcional y estructural de proteínas, chap. 1 (pp. 17–28). Eudeba. CYTED. Buenos Aires, Argentina.
- Pometa, J. V.; Burns, E. E. (1971). Factors affecting chlorogenic, quinic and caffeic acid levels in sunflower kernels. *J. Food Sci.* 36, 490-492.
- Popineau, Y.; Tatham, A. S.; Shewry, P. R.; Marion, D.; Guéguen, J. (1998). 2S sunflower albumins: functional properties of native and modified proteins. In *Plant Proteins from European Crops. Food and non-food applications*; Popineau, Y., Ed.; INRA Editions: Nantes, France. pp 131-135.
- Prasad, D.T. (1987). Characterization of sunflower albumins. *Food Sci Technol* 20, 22–25.
- Prasad, D. T. (1990). Proteins of the phenolic extracted sunflower meal: I. Simple method for removal of polyphenolic components and characteristics of salt soluble proteins. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 23, 229-235.
- Pringent, S.V.E.; Gruppen, H.; Visser, A.J.W.G.; van Koningsveld, G.A.; De Jong, G.A.H.; Voragen, A.G.J. (2003). Effects of Non-covalent Interactions with 5-O-Caffeoylquinic Acid (Chlorogenic Acid) on the Heat Denaturation and Solubility of Globular Proteins *J. Agric. Food Chem.* 51, 17, 5088-5095.
- Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements *J. Agric. Food Chem.* 53, 10, 4290-4302.
- Provansal, M. M. P.; Cuq, J. L. A.; Cheftel, J. C. (1975). Chemical and nutritional modifications of sunflower proteins due to alkaline processing. Formation of amino acid cross-links and isomerization of lysine residues. *J. Agric. Food Chem.* 23, 938-943.
- Psomiadou, E., Arvanitoyannis, I., & Yamamoto, N. (1996). Edible films made from natural resources; microcrystalline cellulose (MCC), methylcellulose (MC) and corn starch and polyols-Part 2. *Carbohydrate Polymers*, 31, 193–204.
- Puppo, M.C.; Lupano, C.E.; Añón, M.C. (1995). Gelation of Soybean Protein Isolates in Acidic Conditions. Effect of pH and Protein Concentration *J. Agric. Food Chem.* 43, 9, 2356-2361.
- Puppo, M.C.; Añón, M.C. (1998). Structural Properties of Heat-Induced Soy Protein Gels As Affected by Ionic Strength and pH *J. Agric. Food Chem.* 46, 3583-3589.
- Puppo, M.C.; Añón, M.C. (1998). Effect of pH and Protein Concentration on Rheological Behavior of Acidic Soybean Protein Gels *J. Agric. Food Chem.* 46, 8, 3039-3046.
- Rahma, E. H.; Narasinga Rao, M. S. (1979). Characterization of sunflower proteins. *J. Food Sci.* 579-582.
- Rahma, E. H.; Narasinga Rao, M. S. (1981). Removal of polyphenols from sunflower meal by various solvents: effects on functional properties. *J. Food Sci.* 46, 1521-1522.
- Rahma E.H., Narasinga Rao M.S. (1981). Isolation and characterization of the major protein fraction of sunflower seeds. *J. Agric. Food Chem.* 29, 518-521.
- Rangavajhala N., Ghorpade V. & Hanna M. (1997). Solubility and Molecular Properties of Heat-Cured Soy Protein Films. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (11), pp. 4204 -4208.
- Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Illic N., Poukev, A., Bortsjuk, N., Brinker, A., Moreno, D., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neil, J. Cornwell, T., Fridlender, B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* 20, 522-31.
- Raymond, J.; Dalgalarondo, M.; Azanda, J. L.; Ducastaing, A. (1984). Preparation of protein isolates from sunflower cakes. *ReV. Fr. Corps Gras.* 6, 233-242.

- Raymond, J.; Robin Jean, M.; Azanza Jean, L. (1995). 11 S seed storage proteins from *Helianthus* species (*Compositae*): Biochemical, size and charge heterogeneity. *Plant Syst. Evol.* 198, 195-208.
- Rawel, H.M.; Rohn, S.; Kruse, H-P.; Kroll, J. (2002). Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid Food Chemistry. 78, 443-455.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M & Rice-Evans. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237.
- Remondetto, G.; Añón, M.C.; González, R.J. (2001). Hydration Properties of Soybean Protein Isolates Brazilian Archives of Biology and Technology. 44, 4, 425-431.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1995). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids *Free Radical Biology & Medicine*. 20, 7, 933-956.
- Rhim, J.W., Wu, Y., Weller, C.L., Schnepf, M. (2000) Physical characteristic of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate. *J. Food Sci.* 64, 149-152.
- Rhim J.W., Gennadios A., Handa A., Weller C.L. and 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. (2004). Increase in water vapor barrier property of biopolymer-based edible films and coatings by compositing with lipid materials. *Food Science and Biotechnology* 134. 528-535.
- Rodríguez Patino y col., 2007 Rodríguez Patino, J.M.; Caro, A.L.; Rodríguez Niño, M.R.; Mackie, A.R.; Gunning, A.P.; Morris, V.J. (2007). Some implications of nanoscience in food dispersion formulations containing phospholipids as emulsifiers *Food Chemistry*. 102, 532-541.
- Rossi, M. (1988). Textured sunflower protein for use as a meat extender. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 21, 267-270.
- Rouilly, A.; Mériaux, A.; Geneau, C.; Silvestre, F.; Rigal, L. (2006). Film extrusion of sunflower protein isolate. *Polym. Eng. Sci.* 2006, 46, 1635–1640.
- Rouilly, A., Orliac, O., Silvestre, F., & Rigal, L. (2006). New natural injection-moldable composite material from sunflower oil cake. *Bioresource Technology*, 97, 553–561.
- Sabir, M. A.; Sosulski, F. W.; MacKenzie, S. L. (1973). Gel chromatography of sunflower proteins. *J. Agric. Food Chem.* 21, 988-993.
- Sabir, M. A.; Sosulski, F. W.; Kernan, J. A. (1974). Phenolic constituents in sunflower flour. *J. Agric. Food Chem.* 22, 572-574
- Sabir, M. A.; Sosulski, F. W.; Finlayson, A. J. (1974). Chlorogenic acid-protein interactions in sunflower. *J. Agric. Food Chem.* 22, 575-578.
- Saeed, M.; Cheryan, M. (1988). Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphenols and phytate. *J. Food Sci.* 53, 1127-1143.
- Saeed, M.; Cheryan, M. (1989). Chlorogenic Acid Interactions with Sunflower Proteins *J. Agric. Food Chem.* 1989. 37, 5, 1270-1274.
- Sánchez, A. C.; Burgos, J. (1995). Thermal Gelation of Sunflower Proteins. In *Food Macromolecules and Colloids*; Dickinson, E., Lorient, D., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, United Kingdom; pp 426-430.
- Sánchez, A.C.; Burgos, J. (1996). Thermal Gelation of Trypsin Hydrolysates of Sunflower Proteins: Effect of pH, Protein Concentration, and Hydrolysis Degree *J. Agric. Food Chem.* 44, 12, 3773-3777.

- Sánchez, A. C.; Burgos, J. (1997). Gelation of sunflower globulin hydrolysates: Rheological and calorimetric studies. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2407-2412.
- Sastry, M. C. S.; Subramanian, N. (1984). Preliminary studies on processing of sunflower seed to obtain edible protein concentrates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 1039-1042.
- Sastry, M. C. S.; Rao, M. S. N. (1990). Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11S protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed. *J. Agric. Food Chem.* 38, 2103-2110.
- Sastry, M. C.S., Narasinga Rao, M. S. (1997). Binding of chlorogenic acid by the isolated polyphenol-free 11s protein of sunflower (*Helianthus annuus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(12), 2103–2110.
- Schmidt, V. C. (2006). Desenvolvimento de embalagens biodegradáveis a partir da fécula de cassava, calcério e fibra de celulose. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brasil.
- Schwenke, K. D.; Prah, L.; Rauschal, E.; Gwiazda, S.; Dabrowski, K.; Rutkowski, A. (1981). Functional properties of plant proteins. II. Selected physico-chemical properties of native and denatured isolates from faba beans, soybeans, and sunflower seed. *Nahrung.* 25, 59-69.
- Shaw, N.B.; Monahan, F.J.; O'Rioran, E.D.; O'Sullivan, M. (2002). Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composites WPI films *Journal of Food Engineering.* 51, 299-304.
- Shey, J., Imam, S. H., Glenn, G. M., & Orts, W. J. (2006). Properties of baked starch foam with natural rubber latex. *Industrial Crops and Products*, 24, 34–40.
- Shih FF. (1994). Interaction of soy isolate with polysaccharide and its effect on film properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 71:1281-5.
- Shogren, R. L., Lawton, J. W., Doane, W. M., & Tiefenbacher, K. F. (1998). Structure and morphology of baked starch foams. *Polymer*, 39(25), 6649–6655.
- Shogren, R. L., Lawton, J. W., & Tiefenbacher, K. F. (2002). Baked starch foams: Starch modifications and additives improve process parameters, structure and properties. *Industrial Crops and Products*, 16, 69–79.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 3, 144-158.
- Sripad, G.; Narasinga Rao, M. S. (1987). Effect of methods to remove polyphenols from sunflower meal on the physicochemical properties of the proteins. *J. Agric. Food Chem.* 35, 962-967.
- Sobral, P. J. A., & Habitante, A. M. Q. B. (2001). Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 377-382.
- Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., & Roques, M. A. (2001). Mechanical water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids*, 15, 423–432.
- Sobral, P.J.A.; Alvarao, J.D.; Zaritzky, N.E.; Laurindo, J.B.; Gómez-Guillén, C.; Añón, M.C.; Montero, P.; Denavi, G.; Molina Ortiz, S.E.; Mauri, A.; Pinotti, A.; García, M.A.; Martino, M.N.; Carvalho, R.A. (2008). Films based on biopolymers from conventional and non conventional sources “*Food Engineering: Integrated Approaches*”. Nueva York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. p. 193-225.
- Sodini, G.; Canella, M. (1977). Acidic Butanol Removal of Color-Forming Phenols from Sunflower Meal. *J. Agric. Food Chem.* 25, 822-825.
- Sodini, G. & Canella, M. (1978) Method for extracting phenols and oligosaccharides from vegetables tissues. United States Patent 4,072,671

- Sodini G., Canella M. (1977). Acidic butanol removal of color-forming phenols from sunflower meal. *J. Agric. Food Chem.* 1977, 25, 822-825.
- Solae Company. <http://www.solae.com> (Junio 2009).
- Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R.; Arrese, E.L.; Añón, M.C. (1991). Water Imbibing Capacity of Soy Protein Isolates: Influence of Protein Denaturation *J. Agric. Food Chem.* 39, 8, 1386-1391.
- Sorgentini, D.A.; Wagner, J.R. (1999). Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins *Journal of Food Biochemistry.* 23, 489-507.
- Sosulski, F.; Fleming, S. E. (1977). Chemical, functional, and nutritional properties of sunflower protein products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54, 100A-104A.
- Sosulski F, (1979). Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review. *J Am Oil Chem Soc* 56, 711–715.
- Sosulski F, (1979). Food uses of sunflower proteins. *J Am Oil Chem Soc* 56, 438–442.
- Soykeabkaew, N., Supaphol, P., & Rujiravanit, R. (2004). Preparation and characterization of jute- and flax-reinforced starch-based composite foams. *Carbohydrate Polymers*, 58, 53–63.
- Stuchell Y.M.& Krochta, J.M. (1994) Enzymatic Treatments and Thermal Effects on Edible Soy Protein Films. *J.of Food Science*, 59 (6), pp. 1332 – 1337.
- Su, J.F., Huang, Z., Liu, K., Fu, L.L., & Liu, H.R. (2007). Mechanical properties, biodegradation and water vapor permeability of blend films of soy protein isolate and poly (vinyl alcohol) compatibilized by glycerol. *Polymer Bulletin* 58 (5-6), 913-921.
- Taha, F.S.; Abbasy, M.; El-Nockrashy, A.S. & Shoeb, Z.E. (1981) Countercurrent extraction-isolectric precipitation of sunflower seed protein isolates. *J. Sci. Food Agric.*, 32, 166-174.
- 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 Science.* 72, 5, E293-E300.
- Townsend, A. A.; Nakai, S. (1983). Relationships Between Hydrophobicity and Foaming Characteristics of Food Proteins. *J. Food Sci.* 588-594.
- Turkmen, N.; Sari, F. ; Y.S., Velioglu (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods *Food Chemistry.* 99, 835-841.
- USDA, United States Department of Agriculture. National Agricultural Library. <http://www.nal.usda.gov> (junio 2009).
- Utsumi, S. y Mori, T. (1980). Heterogeneity of broad bean legumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* 621, 2, 179-189.
- Utsumi, S., J. E. Kinsella (1985). Structure-function relationship in food proteins: subunit interactions in heat induced gelation of 7S, 11S and soy isolate proteins. 33(2): 297-303.
- Utsumi, S., Matsumura, Y. (1997). Structure-function relationships of soy proteins. *Food Proteins and Their Applications.* Damodaran S and Paraf A. New York., Marcel Dekker: 257-291.
- Utsumi S, Maruyama N, Satoh R, Adachi M. (2002). Structure-function relationships of soybean proteins revealed by using recombinant systems. *Enzyme Microb Technol* 30:284–8.
- Utsumi S, Gidamis AB, Kanamori J, Kang IJ, Kito M. (1993). . Effects of deletion of disulfide bonds by protein engineering on the conformation and functional properties of soybean proglycinin. *J Agric Food Chem* 41:687–91.

- Vázquez, M., Sánchez, F., Hiche, E., Yáñez, E. (1979). Sensory evaluation of textured sunflower soy/protein. *J. Food Sci.* 44, 1717-1719.
- Venktesh, A.; Prakash, V. (1993). Low molecular weight proteins from sunflower (*Helianthus annuus L.*) seed: effect of acidic butanol treatment on the physicochemical properties. *J. Agric. Food Chem.* 41, 193-198.
- Venktesh, A.; Prakash, V. (1993). Functional properties of the total proteins of sunflower (*Helianthus annuus L.*) seed: effect of physical and chemical treatments. *J. Agric. Food Chem.* 41, 18-23.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4113-4177.
- Vermeesch, G.; Briffaud, J.; Joyeux, J. (1987). Sunflower proteins in human food. *ReV. Fr. Corps Gras.* 7-8, 333-344.
- Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J. Millán, F. (1999). Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *JAOCS.* 76, 12, 1455-1460.
- Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Pedroche, J.; Yust, M.M.; Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos. *Grasas y Aceites.* 52, 2, 127-131.
- Vonder Haar, R. A.; Allen, R. D.; E. A., C.; Nessler, C. L.; Thomas, T. L. (1988). Organization of the sunflower 11S storage protein gene family. *Gene.* 74, 433-443.
- Yust, M.M.; Pedroche, J.; Megías, C.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Millán, F. & Vioque, J. (2003). Improvement of protein extraction from sunflower meal by hydrolysis with alcalase. *Grasas y Aceites,* 54, 4, 419-423.
- Wagner, J. R., Sorgentini, D. A., Añón, M. C. (2000). Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 48, 3159–3165.
- Wagner, J. (2000). Propiedades superficiales. En *Caracterización funcional y estructural de proteínas.* Bartholomai, G., Pilosof, A. Editores, Cyted, Editorial Universitaria de Buenos Aires, pg. 55-70.
- Wagner, J.R., Sorgentini, D.A. (1998). Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. *J Food Biochemistry.* 23, 5, 489-507.
- Walstra, P. (1988). The role of proteins in stabilization of emulsion. En: Phillips GO, Wedlock, DJ, Williams, PA, editors. *Gums and stabilizers for the food industry.* Oxford: IRL Press. 323-36.
- Weller, C., Gennadios, A., Saravia, R. 1998. Edible Bilayer Films from Zein Grain Sorghum Wax or Carnauba Wax. 279-285
- Wills, D.M. and Burke, J.M. (2006). Chloroplast DNA Variation Confirms a Single Origin of Domesticated Sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Journal of Heredity.* 97, 4, 403–408.
- Wills, R.B.H & Kabirullah, M. (1981) Use of sunflower protein in sausages. *J. Food Sci.,* 46, 1657
- Wongsasulak, S., Yoovidhya, T., Bhumiratana, S., Hongsprabhas, P., McClements, D. J., & Weiss, J. (2006). Thermo-mechanical properties of egg albumen–cassava starch composite films containing sunfloweroil droplets as influenced by moisture content. *Food Research International,* 39, 277–284.
- Wongsasulak, S., Yoovidhya, T., Bhumiratana, S., & Hongsprabhas, P. (2007). Physical properties of egg albumen and cassava starch composite network formed by a salt-induced gelation method. *Food Research International,* 40, 249–256.
- Zhang J., Mungara P. & Jane J. (2001). Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. *Polymer,* 42 (6), pp. 2569-2578.
- Zheng, B.; Matsumura, Y.; Mori, T. Relationship between the thermal denaturation and gelling properties of legumin from broad bean. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 1993, 57, 1087-1090.

Anexos

Anexo I: Cuantificación de compuestos fenólicos en productos proteicos de girasol

AI.1.- Introducción

Una particularidad del *pellet* de girasol es que posee un elevado contenido de compuestos fenólicos, siendo el ácido clorogénico (CGA: ácido 5-cafeil-quinico) el más abundante. También se han reportado importantes cantidades sus productos de hidrólisis: ácido cafeico (CA) y ácido quinico (QA), así como también cantidades minoritarias de los ácidos p-cumárico, isoferúlico, ferúlico, sinápico y trans-cinámico (Sabir y col., 1974; Lawhon y col., 1982; Sastry y col., 1984).

Existen varios métodos que permiten cuantificar compuestos fenólicos, entre ellos podemos citar: espectroscopía en el ultravioleta (UV), colorimetría Folin-Ciocalteu y cromatografía líquida de alta performance en fase reversa (RP-HPLC).

Las técnicas espectrofotométricas fueron las que primero se desarrollaron, basándose en que la estructura base de estos compuestos es un anillo aromático y que, por lo tanto, presentan absorbanza en el UV entre 200 y 400 nm. En esta zona del espectro también absorben proteínas y ácidos nucleicos, por lo que podrían interferir en este método. En la bibliografía se ha reportado el uso de esta metodología para la cuantificación de ácido clorogénico en café y papas (Moore y col., 1948; Dao y col., 1992).

Otra técnica ampliamente utilizada para cuantificar fenoles totales es la colorimetría de Folin-Ciocalteu. En este método, se lleva a cabo la reacción de oxidación de los grupos fenólicos presentes empleando los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico, produciéndose un producto coloreado que absorbe a 760 nm (Singleton y Rossi, 1965). En este caso hay que tener presente que la reacción detecta todos los grupos fenólicos presentes en el extracto, incluidos los de las proteínas, por lo que deben tomarse recaudos para disminuir esta interferencia. Además los compuestos con capacidad reductora, como azúcares reductores, ácido ascórbico y sulfito de sodio entre otros, interfieren en esta determinación. (Prior y col., 2005).

Mediante cromatografía RP-HPLC es posible lograr la separación de los compuestos fenólicos según su tamaño e hidrofobicidad y además se pueden cuantificar, por ejemplo, utilizando un detector de fotiodo UV (Dreher y col., 1983; González-Pérez y col., 2002). Esta metodología presenta mayor sensibilidad que los métodos espectrofotométricos y colorimétricos, pero sus costos fijos y operativos son más elevados, justificándose su empleo cuando es imprescindible conocer el perfil fenólico de la muestra en estudio. La gran ventaja de este método es que se evitan las interferencias antes mencionadas, ya que incluye una etapa de separación de los distintos compuestos que interfieren en la cuantificación de los fenoles.

Conociendo los fundamentos y las limitaciones de cada método, y sabiendo que la cantidad de fenoles informada depende, entre otras variables, de la complejidad de la muestra en estudio y de la metodología de análisis empleada (Dreher y col., 1983), resulta necesario contar con un método confiable para su cuantificación.

El objetivo planteado en esta sección fue evaluar la metodología a utilizar en la cuantificación de compuestos fenólicos en productos proteicos de girasol.

AI.2.- Materiales y métodos

La determinación de compuestos fenólicos se realizó por tres métodos diferentes: espectroscopía UV, colorimetría Folin-Ciocalteu y cromatografía RP-HPLC. Las muestras sólidas (concentrados) se solubilizaron en agua (1 mg/ml), mientras que las líquidas (extractos fenólicos) se procesaron tal cual.

Espectroscopía en UV: Se siguió el protocolo propuesto por Moores y col. (1948). Se realizaron diluciones de las muestras en buffer fosfato de sodio 0,1 M a pH 7,5, y se registró el espectro UV entre 200 y 400 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 650 Spectrophotometer, Estados Unidos). También se obtuvieron los espectros UV de los patrones fenólicos: ácidos clorogénico (CGA, Chemika Fluka, Alemania), ácido cafeico (CA, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos) y ácido quínico (QA, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos); y de seroalbúmina bovina (BSA,

Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos), empleada como patrón de proteínas. La cuantificación de fenoles se realizó a partir de los valores de absorbancia obtenidos a 324-328 nm, empleándose soluciones de ácido clorogénico de 0,1 a 0,5 mg/ml, como patrón.

Colorimetría Folin-Ciocalteu: Se siguió el protocolo descrito por Singleton y col. (1965). Se tomaron 50 μ l de la muestra correspondiente y se le adicionaron 600 μ l de agua destilada y 100 μ l de reactivo de Folin (1N) (Anedra, Argentina). Se dejó a temperatura ambiente durante 3 minutos y luego se agregaron 750 μ l de solución de Na_2CO_3 20% p/v (Anedra, Argentina). Después de una hora se midió la absorbancia a 760 nm (Beckman DU 650 Spectrophotometer, Estados Unidos). En el caso de concentrados y aislados, previo a la determinación se realizó una precipitación de las proteínas por agregado de ácido tricloroacético (TCA, Anedra, Argentina) hasta una concentración final de 8%. Las proteínas se separaron por centrifugación a 18000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente (A15, B. Braun Biotech International, Estados Unidos), y el sobrenadante se neutralizó con NaOH 1N y se tomó como la muestra correspondiente. Para la cuantificación de fenoles se emplearon soluciones de CGA (de 0,1 a 0,5 mg/ml) como patrón.

Cromatografía RP-HPLC: Se tomó 1 ml de la muestra correspondiente, se filtró con membrana (0,2 μ m) y 10 μ l del filtrado se inyectaron en una columna Symmetry C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m, 100 Å) equilibrada con la mezcla A (4% CH_3COOH ; 6% CH_3OH ; 90% H_2O). Se empleó un cromatógrafo Waters Millipore con un arreglo de fotodiodos como detector (996 Photodiode Array Detector). La separación se realizó a temperatura ambiente a una velocidad de flujo de 0,95 ml/min, empleándose la mezcla A y la B (4% CH_3COOH , 90% CH_3OH , 6% H_2O). Las condiciones utilizadas fueron: 5 minutos de 100% A, gradiente lineal de 100% A a 70% A en 10 minutos, elución isocrática por 10 minutos, gradiente lineal de 70% A a 100% B en 10 minutos, elución isocrática por 10 minutos, gradiente lineal de 100% B a 100% A en 20 minutos. Se registró la absorbancia a 280 y 324 nm en función del tiempo de retención. Para la

cuantificación de fenoles se utilizaron los valores obtenidos a 324 nm. Patrones de CGA, CA y QA fueron separados en las mismas condiciones que las muestras. Se construyó una curva de calibración graficando Área del pico con tiempo de retención de 15 minutos (UA) vs. la concentración del patrón CGA. Para la cuantificación de fenoles totales, se sumaron todas las Áreas de los picos con absorbancia a 324 nm y se expresaron como CGA.

En todos los casos, las determinaciones se hicieron, como mínimo, por duplicado.

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 Statgraphics plus, versión 5.1 (Statgraphics, Estados Unidos).

AI.3.- Resultados y Discusión

Cuantificación de fenoles por espectroscopía UV: Los espectros UV característicos de CGA, CA y QA, usados como patrones de compuestos fenólicos, y de seroalbúmina bovina (BSA), empleada como patrón de proteínas, se muestran en la **Figura AI.1.a**. Allí se puede apreciar que el CGA presentó un pico de absorción máxima a 324 nm, mientras que a esta longitud de onda no absorbieron el QA ni las proteínas. El CA posee un máximo a 310 nm que contribuye a la absorbancia determinada a 324 nm. Por lo tanto, al emplear la detección a 324 nm estamos cuantificando fenoles totales - principalmente CGA, pero también CA-, sin interferencia de las proteínas.

Por otra parte, se observó que dependiendo del solvente en donde se encuentre el CGA, su pico de absorción máxima se puede desplazar de 324 nm cuando se emplea agua a 328 nm cuando se emplean alcoholes, por ejemplo etanol, metanol o butanol. Otra característica distintiva del CGA puro es que en su espectro UV posee un mínimo de absorción a 260 nm (**Figura AI.1.A.**). Este comportamiento también es posible observarlo en el espectro UV del primer extracto acuoso para eliminar fenoles, que se

le realizó al *pellet*, sugiriéndonos la extracción de fenoles “libres” (**Figura AI.1.B.**). Sin embargo, el espectro del **CoExA-L** (**Figura AI.1.b.**) presenta un máximo en dicha longitud de onda, que correspondería a la interacción de proteínas y fenoles (Venkatesh y col., 1993).

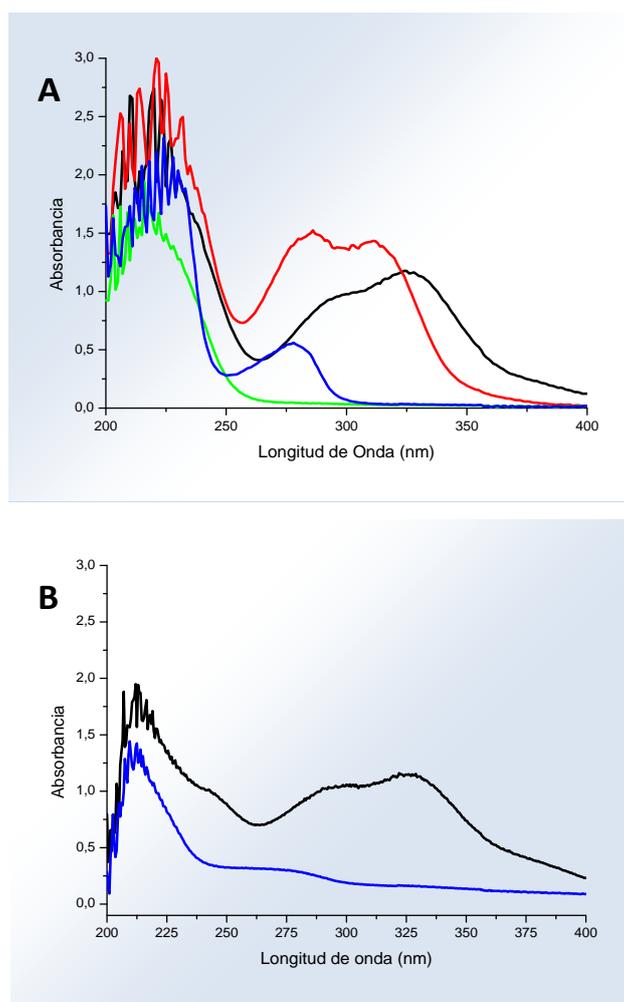


Figura AI.1.: A) Espectros UV ($\lambda=200-400$ nm) de los patrones que se utilizaron en la cuantificación de compuestos fenólicos: CGA (—), CA (—) y QA (—), y proteínas: BSA (—). **B)** Espectros UV del primer extracto fenólico acuoso realizado sobre el *pellet* de girasol (—) y **CoExA-L** (—).

Finalmente, en la **Figura AI.1.A.** también es posible apreciar que los compuestos fenólicos (CGA y CA) interfieren cuando se dosa proteínas midiendo absorbancia a 280 nm, resultando en una sobreestimación del contenido proteico real. En todos los espectros se observan picos a longitudes de onda menores a 250 nm, característicos de los dobles enlaces, entre otros.

Cuantificación de fenoles por colorimetría Folin-Ciocalteu: Las proteínas interfieren en este método debido a la presencia de residuos de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina), resultando necesario eliminarlas del medio, por ejemplo precipitándolas con ácido tricloroacético (TCA). Sin embargo, al precipitarlas también se eliminan los compuestos fenólicos que estaban interaccionando con ellas, teniendo una estimación de su contenido por defecto.

Cuantificación de fenoles por cromatografía RP-HPLC: Los cromatogramas RP-HPLC de la separación de los patrones de CGA, CA y QA se muestran en la **Figura AI.2.A.** En ella se pueden ver que el CGA eluyó a 15,1 minutos y el CA lo hizo a 18,3 minutos, mientras que el QA no se pudo cuantificar por este método, por no absorber en el UV. En la **Figura AI.2.B.** se muestran los cromatogramas (a 280 y 324 nm) del primer extracto fenólico acuoso realizado sobre el *pellet* molido de girasol. En ella se puede apreciar la presencia de dos picos que corresponderían a CGA y CA en base a sus tiempos de retención, representando el 75% y el 19% de los fenoles totales respectivamente.

También es posible observar la presencia de varios picos cuya absorbancia a 324 nm es superior que a 280 nm, y que corresponderían también a compuestos fenólicos que no hemos identificado. De estos picos se pueden diferenciar dos grupos, uno con menores tiempos de elución (entre 4 y 8 minutos, marcados como "1") que corresponderían a fenoles que eluyen "libres", posiblemente isómeros de posición del CGA (Fujioka y col., 2008); y otro con mayores tiempos de elución (entre 27 y 32 minutos, marcados como "2") posiblemente fenoles "libres" con mayor tamaño o hidrofobicidad, o fenoles "unidos" a proteínas, ya que éstas eluyen entre 27 y 40 minutos (presentando mayor

absorbancia a 280 nm). Los fenoles pertenecientes al primer grupo representan el 2,5%, mientras que los que se encuentran dentro del segundo constituyen el 3,5% de los compuestos fenólicos totales presentes en este extracto.

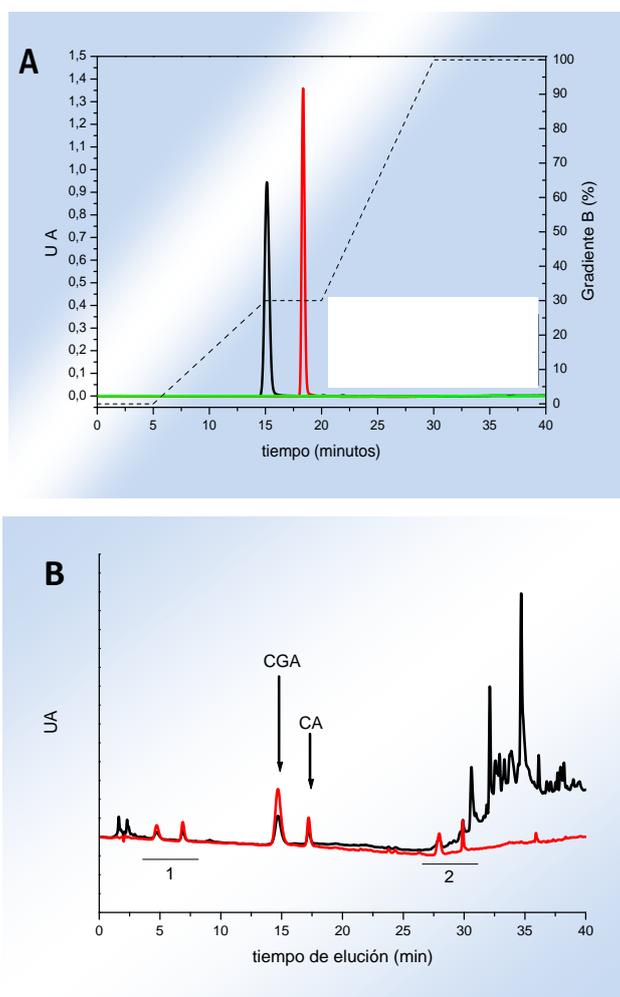


Figura AI.2.: A) Cromatograma RP-HPLC con detector UV ($\lambda=324$ nm) de los patrones que se utilizaron en la cuantificación de fenoles -CGA (—), CA (—) y QA (—)-, y el gradiente empleado en la elución de las muestras (- - -) (Solución A: ácido acético: 4%, metanol: 6%, agua: 90%. Solución B: ácido acético: 4%, metanol: 90%, agua: 6%). **B)** Cromatograma RP-HPLC con detector UV -a 280 nm (—) y a 324 nm (—)- del primer extracto fenólico acuoso realizado sobre el *pellet* molido de girasol.

Comparación de las metodologías: Para comparar las metodologías descriptas, se solubilizaron en agua distintos concentrados proteicos de girasol: **Co-L**, **CoExA-L**, **CoExS-L**, **CoExE-L** y **CoExM-L**. Posteriormente, los fenoles se cuantificaron por espectroscopía UV (a 324 nm), colorimetría Folin-Ciocalteu (F-C) y cromatografía RP-HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla AI.1**. En ella se puede observar que para los concentrados acuosos **Co-L** y **CoExA-L**, UV y F-C no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Mientras que en las otras muestras (**CoExS-L**, **CoExE-L** y **CoExM-L**) el contenido de fenoles determinado por F-C fue mayor que el encontrado por UV. Este hecho se podría explicar debido a interferencias en F-C producidas por la presencia de componentes con características reductoras, por ejemplo, el sulfito de sodio residual en **CoExS-L** o los azúcares reductores en **CoExE-L** y **CoExM-L** (en mayor concentración que en **Co-L**).

Tabla AI.1.: Contenido de compuestos fenólicos presentes en concentrados proteicos de girasol evaluados por espectroscopía UV, colorimetría Folin-Ciocalteu (F-C) y cromatografía RP-HPLC.

	Contenido de compuestos fenólicos (mg/ml)				
	Co-L	CoExA-L	CoExS-L	CoExE-L	CoExM-L
UV	0,495 ± 0,008 ^c	0,245 ± 0,007 ^c	0,175 ± 0,009 ^b	0,105 ± 0,007 ^c	0,105 ± 0,007 ^c
F-C	0,465 ± 0,021 ^c	0,235 ± 0,007 ^c	0,540 ± 0,014 ^d	0,215 ± 0,007 ^d	0,245 ± 0,009 ^d
RP-HPLC Total	0,355 ± 0,010 ^b	0,214 ± 0,007 ^b	0,203 ± 0,009 ^c	0,076 ± 0,002 ^b	0,072 ± 0,002 ^b
RP-HPLC CGA	0,195 ± 0,008 ^a	0,056 ± 0,007 ^a	0,041 ± 0,008 ^a	0,018 ± 0,001 ^a	0,018 ± 0,001 ^a

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Por otra parte, los valores de CGA informados por RP-HPLC representan el 55% de los fenoles totales presentes en **Co-L**, en concordancia con lo informado por Sastry y col. (1984). Mientras que en las otras muestras, el CGA representa entre el 20-26% de los fenoles totales. Aún así, se obtiene que los valores de fenoles totales informados por UV sobreestiman los valores encontrados con RP-HPLC, excepto en **CoExS-L**. Dreher y

col. (1983) también informaron un comportamiento análogo al comparar el contenido de fenoles detectado por UV o RP-HPLC en extractos acuosos realizados sobre harinas desgrasadas de girasol. Por lo tanto, al cuantificar fenoles por espectroscopía UV estamos sobreestimando el valor real, siendo éste entre 12 y 30% menor, dependiendo de la muestra analizada.

AI.4.- Conclusiones

A partir de estas observaciones, se seleccionó la espectroscopía UV como metodología para la cuantificación de los fenoles presentes en los productos proteicos de girasol estudiados en este trabajo de tesis, debido a que es una técnica reproducible, rápida, sencilla y de bajo costo, teniendo en cuenta sus limitaciones. La técnica de RP-HPLC se empleó para comprobar la existencia de interacciones entre los compuestos fenólicos y las proteínas. Folin-Ciocalteu se descartó por presentar mayor cantidad de interferencias.

Anexo II: Balances de materia del proceso de obtención de concentrados y aislados proteicos de girasol en planta piloto

AII.1.- Objetivo

En este anexo se presentan los balances de materia de los procesos de obtención de concentrados y aislados proteicos de girasol a partir del *pellet* residual de la industria aceitera local, en escala de planta piloto. El objetivo de esta sección fue evaluar la pérdida de proteínas y la eliminación de compuestos fenólicos, permitiéndonos optimizar los procesos desarrollados.

AII.2.- Materiales y Métodos

Se realizaron los protocolos detallados en el (**Capítulo II**, sección **II.2.2.**), representados esquemáticamente en la **Figura II.1**. En cada una de las etapas del proceso (extracción de fenoles -**EF1**, **R1**, **EF2** y **R2**-, solubilización de proteínas -**EP1**, **RP1**, **EP2**, **RP2** y **EP1+EP2**-, precipitación isoeléctrica -**PP1** y **S1**-, lavado -**PP2** y **S2**-, resuspensión -**PR**-) se determinaron los porcentajes de sólidos totales (AOAC 935.29) y proteínas (AOAC 920.53). La cantidad de compuestos fenólicos se determinó sólo en las muestras líquidas mediante espectroscopía en el UV ($\lambda=324$ nm) según Moores y col. (1948), como se detalló en el **Anexo I**. Todas las determinaciones se realizaron como mínimo por duplicado.

Los porcentajes de pérdida de proteínas y de eliminación de fenoles se calcularon respecto al contenido inicial de estos componentes en el *pellet* molido de girasol.

AII.3.- Resultados y Discusión

En las **Figuras AII.1** se muestran los porcentajes (en base seca) de proteínas (**AII.1.A.**) y de compuestos fenólicos (**AII.1.B.**) presentes en cada una de las etapas. Mientras que la pérdida de proteínas y la eliminación de fenoles en los extractos fenólicos (**EF1** y

EF2) y en los sueros (S1 y S2) se muestran en las Figuras AII.2.A y AII.2.B respectivamente.

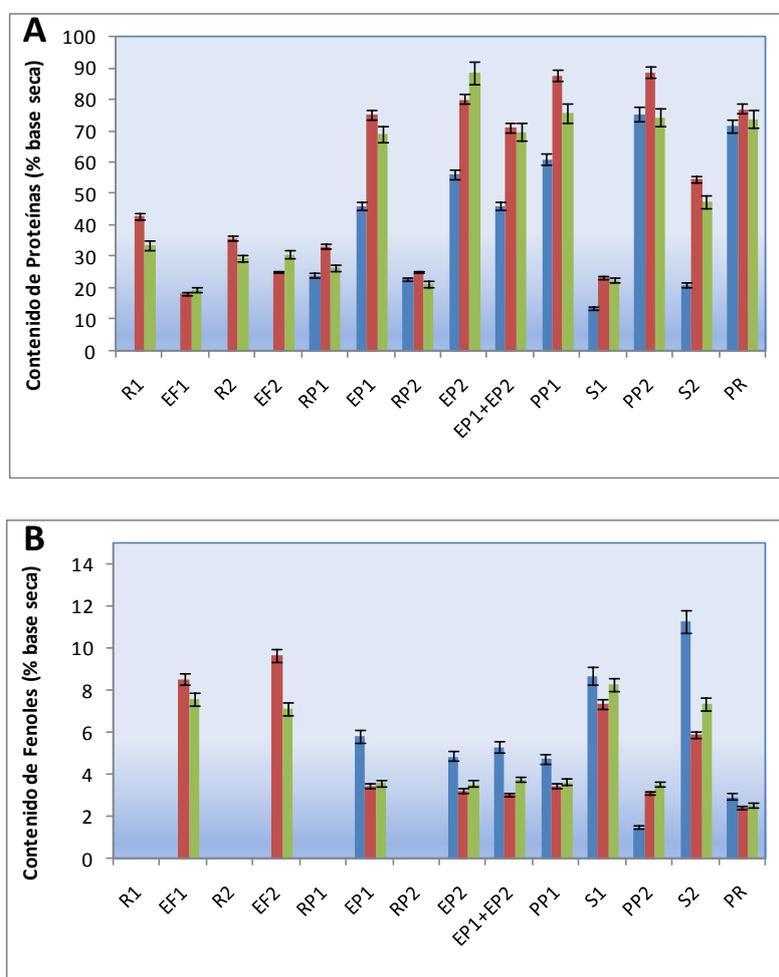


Figura AII.1.: Porcentajes (en base seca) de **A)** proteínas y **B)** fenoles en cada una de las etapas de los procesos de obtención de productos proteicos de girasol en planta piloto: sin extracción de fenoles (■), extracción de fenoles con agua (■) ó Na₂SO₃ 0,1 %p/v (■). Se muestran promedios ± desviación estándar.

En la **Figura AII.1.A.** se puede observar que, para la producción de **Ai-P**, el porcentaje de proteínas en los residuos de las extracciones proteicas (**RP1** y **RP2**) fue disminuyendo, mientras que en los extractos proteicos (**EP1** y **EP2**), las proteínas representaron el 46% y 56%, respectivamente. En la segunda extracción proteica se

extrajo menor cantidad de sólidos, entre el 25% y 30% de lo obtenido en **EP1**, siendo mayoritariamente proteína. Por lo que la cantidad de proteínas aportada por el **EP2** representó entre 10-15% del total de las proteínas presentes en el *pellet*, mejorando así los rendimientos obtenidos. También se observa que durante las etapas de precipitación isoeléctrica y lavado del precipitado se produjo un incremento en el porcentaje de proteínas, debido a la eliminación de sólidos en el suero (**S1** y **S2**). En ambas etapas se perdió menos del 4% de las proteínas totales (**Figura AII.2.A.**), valor coincidente con la cantidad de proteínas solubles en cercanías del punto isoeléctrico que se describió anteriormente (**Capítulo I, Figura I.2.**). Respecto al balance para los compuestos fenólicos (**Figura AII.1.B.**), se puede apreciar que durante la solubilización de proteínas parte de los fenoles presentes en el *pellet* las acompañaron; pero aproximadamente el 65% de estos se eliminaron durante la precipitación isoeléctrica y el lavado del precipitado proteico (**S1** y **S2**, en **Figura AII.2.B.**).

Cuando se analizan los procesos destinados a eliminar fenoles, se puede observar que en los extractos **EF1** y **EF2**, entre el 7% y 10% de los sólidos removidos fueron compuestos fenólicos. En estas etapas, a pesar de estar trabajando a pH 5 (cerca de su pI) también se removieron proteínas (entre 15-20% de las proteínas totales, **EF1** y **EF2** en **Figura AII.2.A.**). Como es de esperar, en los residuos fenólicos (**R1** y **R2**) el porcentaje de proteínas disminuyó. Mientras tanto, el porcentaje de fenoles presentes en los extractos proteicos fue menor a los informados para **Ai-P**, debido a que parte de estos compuestos ya fueron eliminados en las etapas previas (entre 80 y 84%, **EF1** y **EF2** en **Figura AII.2.B.**). Finalmente, cuando se realizaron las etapas de precipitación isoeléctrica y lavado del precipitado, también se eliminaron fenoles, entre 7-8% y 2-3% respectivamente (**S1** y **S2** en **Figura AII.2.B.**). Considerando las muestras **EP1+EP2** y **PR**, que corresponden a los concentrados y aislados proteicos antes de alimentar el secador spray, se puede observar que los porcentajes de proteínas y de compuestos fenólicos informados en la **Tabla II.1.** coinciden con los presentados en el seguimiento de los procesos, con diferencias del 10%, aceptables desde el punto de vista ingenieril.

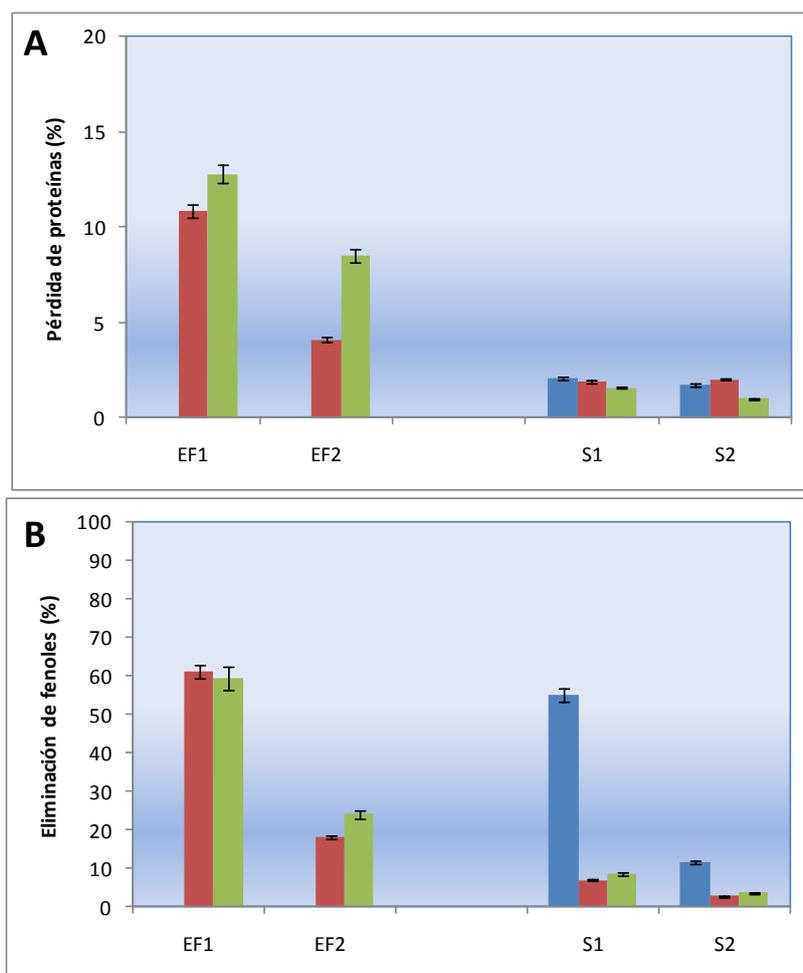


Figura AII.2.: Porcentajes de **A)** pérdida de proteínas y **B)** eliminación de fenoles en los extractos fenólicos (**EF1** y **EF2**) y en los sueros provenientes de la precipitación isoeléctrica (**S1**) y del lavado del precipitado (**S2**) durante los procesos de obtención de productos proteicos de girasol en planta piloto: sin extracción de fenoles (■), extracción de fenoles con agua (■) ó Na₂SO₃ 0,1 %p/v (■). Los porcentajes fueron calculados respecto al contenido de proteínas o fenoles presentes en el *pellet*, en todos los casos se muestran los promedios ± desviación estándar.

AII.4.- Conclusiones

Se encontró que en los lavados con agua o solución de sulfito de sodio se extraen entre 80-84% de los fenoles iniciales. Las etapas de precipitación isoeléctrica y lavado del precipitado ayudan a reducir el contenido de fenoles inicial (10% ó 65%) dependiendo del proceso. Además, se observó que durante los lavados destinados a eliminar

fenoles, se pierde entre 15-20% del total de las proteínas, mientras que en los sueros, dicho valor no supera el 4%. Sin embargo, la segunda extracción proteica aporta entre 10-15% de proteínas.

Anexo III: Materiales compuestos, rígidos y biodegradables obtenidos a partir de almidón de mandioca, fibras de celulosa y aislados proteicos de girasol con menor contenido de fenoles

AIII.1.- Objetivo

En el **Capítulo V** de esta tesis se estudió la obtención y caracterización de materiales compuestos, rígidos y biodegradables a partir de almidón de mandioca, fibras de celulosa y proteínas de girasol provenientes del aislado proteico **Ai-P**. En esta sección se estudió el efecto del agregado de aislados proteicos de girasol con menor contenido de fenoles sobre las propiedades de las bandejas obtenidas.

AIII.2.- Materiales y Métodos

Las bandejas se obtuvieron y caracterizaron según la metodología descrita en el **Capítulo V** (sección **V.2.**). En este caso se emplearon como fuente de proteínas dos aislados proteicos de girasol, **AiExA-P** y **AiExS-P**, con menor contenido de fenoles que **Ai-P**.

AIII.3.- Resultados y Discusión

Los espesores, densidades y contenidos de humedad de los materiales obtenidos se muestran en la **Tabla AIII.1**. Se puede observar que las bandejas con los aislados proteicos de girasol con menor contenido de fenoles (**AiExA-P** y **AiExS-P**) presentaron espesores entre 1,57 y 1,76 μm , densidades entre 0,45 y 0,59 g/cm^3 y contenidos de humedad entre 9,47 y 10,68%; y mostraron similar comportamiento que las bandejas con **Ai-P**.

Tabla AIII.1.: Espesor, densidad y contenido de humedad de las bandejas obtenidas.

Muestras		Espesor (mm)	Densidad (g.cm ⁻³)	Humedad (%)
Control sin proteínas	10F-0P	1,6298 ± 0,0987 ^{c,d}	0,482 ± 0,043 ^{a,b,c}	10,81 ± 0,01 ⁱ
	15F-0P	1,6197 ± 0,0650 ^c	0,518 ± 0,042 ^{c,d,e}	10,58 ± 0,04 ^h
	20F-0P	1,6932 ± 0,1480 ^{e,f}	0,476 ± 0,044 ^{a,b,c}	10,35 ± 0,12 ^g
10 % de AiExA-P	10F-10P	1,7324 ± 0,0946 ^{f,g}	0,514 ± 0,040 ^{c,d,e}	10,68 ± 0,15 ^{h,i}
	15F-10P	1,6162 ± 0,0811 ^c	0,505 ± 0,025 ^{b,c,d}	10,28 ± 0,11 ^{f,g}
	20F-10P	1,6006 ± 0,0597 ^{b,c}	0,495 ± 0,034 ^{b,c,d}	9,47 ± 0,39 ^a
20% de AiExA-P	10F-20P	1,5649 ± 0,0681 ^{a,b}	0,526 ± 0,064 ^{c,d,e}	10,31 ± 0,13 ^g
	15F-20P	1,6880 ± 0,0864 ^e	0,517 ± 0,037 ^{c,d,e}	10,06 ± 0,05 ^{d,e}
	20F-20P	1,7668 ± 0,0607 ^g	0,434 ± 0,023 ^a	10,03 ± 0,18 ^{c,d}
10% de AiExS-P	10F-10P	1,5470 ± 0,1141 ^a	0,595 ± 0,010 ^f	10,00 ± 0,07 ^{c,d}
	15F-10P	1,7113 ± 0,1051 ^{e,f}	0,501 ± 0,029 ^{b,c,d}	9,63 ± 0,16 ^b
	20F-10P	1,7122 ± 0,0774 ^{e,f}	0,550 ± 0,037 ^{d,e,f}	9,60 ± 0,13 ^{a,b}
20% de AiExS-P	10F-20P	1,6725 ± 0,0561 ^{d,e}	0,567 ± 0,019 ^{e,f}	10,40 ± 0,08 ^g
	15F-20P	1,6318 ± 0,0526 ^{c,d}	0,450 ± 0,058 ^{a,b}	9,90 ± 0,07 ^c
	20F-20P	1,6392 ± 0,0520 ^{c,d}	0,551 ± 0,048 ^{d,e,f}	10,17 ± 0,12 ^{e,f}

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

En la **Tabla AIII.2.** se presentan los resultados correspondientes a la capacidad de absorción de agua de estos materiales. Se observó que el agregado de proteínas de girasol a las bandejas, disminuyó hasta en un 44% su capacidad de absorción de agua, siendo las variaciones significativas al adicionar 10% de **AiExA-P** o **AiExS-P**. Este comportamiento fue similar al presentado por las bandejas con **Ai-P**. Sus propiedades mecánicas, presentadas en la **Tabla AIII.2.** también siguieron las tendencias descritas anteriormente, para **Ai-P**, la tensión se incrementó con la adición de fibras de celulosa, mientras que la deformación relativa disminuyó al incrementar la concentración de proteínas en la formulación.

Tabla AIII.2.: Absorción de agua, tensión a ruptura y deformación relativa de las bandejas obtenidas.

Muestras		Absorción de agua (g agua/g bandeja)	Tensión a ruptura (MPa)	Deformación relativa (%)
Control sin proteínas	10F-0P	0,38 ± 0,03 ^f	5,39 ± 1,07 ^{a,b}	0,076 ± 0,013 ^{b,c,d,e}
	15F-0P	0,51 ± 0,01 ^h	6,18 ± 1,10 ^{b,c,d,e,f}	0,084 ± 0,020 ^e
	20F-0P	0,44 ± 0,01 ^g	5,84 ± 1,58 ^{a,b,c,d,e}	0,082 ± 0,001 ^{d,e}
10 % de AiExA-P	10F-10P	0,28 ± 0,03 ^{b,c}	5,53 ± 0,61 ^{a,b,c}	0,067 ± 0,003 ^b
	15F-10P	0,32 ± 0,04 ^{d,e}	5,65 ± 1,05 ^{a,b,c,d}	0,081 ± 0,013 ^{c,d,e}
	20F-10P	0,32 ± 0,03 ^{d,e}	5,50 ± 0,73 ^{a,b,c}	0,069 ± 0,001 ^{b,c,d}
20% de AiExA-P	10F-20P	0,24 ± 0,01 ^a	5,87 ± 0,83 ^{a,b,c,d,e}	0,051 ± 0,003 ^a
	15F-20P	0,28 ± 0,02 ^{b,c}	6,38 ± 0,89 ^{d,e,f}	0,069 ± 0,0016 ^{b,c,d}
	20F-20P	0,32 ± 0,04 ^{d,e}	5,28 ± 0,48 ^a	0,068 ± 0,001 ^{b,c}
10% de AiExS-P	10F-10P	0,33 ± 0,01 ^e	5,54 ± 0,94 ^{a,b,c}	0,065 ± 0,003 ^b
	15F-10P	0,29 ± 0,02 ^{c,d}	5,26 ± 0,73 ^a	0,065 ± 0,001 ^{b,c}
	20F-10P	0,25 ± 0,04 ^{a,b}	6,40 ± 0,71 ^{d,e,f}	0,068 ± 0,001 ^{b,c}
20% de AiExS-P	10F-20P	0,27 ± 0,02 ^{a,b,c}	6,23 ± 0,36 ^{c,d,e,f}	0,066 ± 0,001 ^b
	15F-20P	0,34 ± 0,02 ^e	6,45 ± 0,93 ^{e,f}	0,067 ± 0,020 ^b
	20F-20P	0,25 ± 0,03 ^{b,c,d}	6,74 ± 0,81 ^f	0,070 ± 0,001 ^{b,c,d}

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

Los distintos aislados proteicos de girasol empleados sólo afectaron significativamente el color de las bandejas obtenidas, las que adoptaron la coloración característica de dichos productos proteicos, según se discutió anteriormente (**Capítulo II**, sección **II.3.2.**). Los parámetros de color Hunter-Lab de las bandejas se presentan en la **Tabla AIII.3**. Las bandejas de almidón de mandioca y fibras de celulosa poseen una leve coloración amarillenta (*b* levemente positivos). Al aumentar el contenido de proteínas se produjo un incremento en los parámetros *a* y *b*, obteniéndose bandejas de color marrón; mientras que el valor de *L* disminuyó, resultando así materiales más oscuros

(con mayores ΔE). Las bandejas con **AiExS-P** poseen menor coloración (menor ΔE) que las de **AiExA-P**.

Tabla AIII.3.: Parámetros de color Hunter-Lab de las bandejas biodegradables obtenidas.

Muestras		<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	ΔE
Control sin proteínas	10F-0P	88,68 ± 0,42 ^j	0,03 ± 0,07 ^c	6,77 ± 0,27 ^a	9,99 ± 0,47 ^a
	15F-0P	87,57 ± 0,71 ⁱ	0,10 ± 0,14 ^c	7,48 ± 0,32 ^b	11,32 ± 0,63 ^b
	20F-0P	89,43 ± 0,33 ^j	-0,20 ± 0,07 ^b	7,49 ± 0,35 ^b	9,78 ± 0,40 ^a
10 % de AiExA-P	10F-10P	54,30 ± 1,20 ^d	0,06 ± 0,34 ^c	11,84 ± 0,75 ^e	44,18 ± 1,15 ^h
	15F-10P	56,26 ± 1,19 ^e	0,33 ± 0,47 ^{d,e}	12,53 ± 0,64 ^f	42,45 ± 1,19 ^g
	20F-10P	58,53 ± 1,06 ^f	-0,44 ± 0,12 ^a	11,01 ± 0,43 ^c	39,88 ± 0,98 ^e
20% de AiExA-P	10F-20P	46,51 ± 1,02 ^a	0,21 ± 0,34 ^{c,d}	11,35 ± 0,48 ^{c,d}	51,70 ± 0,93 ^l
	15F-20P	50,60 ± 1,54 ^b	-0,20 ± 0,12 ^b	11,60 ± 0,40 ^{d,e}	47,74 ± 1,44 ^j
	20F-20P	52,13 ± 1,09 ^c	0,45 ± 0,14 ^e	11,40 ± 0,44 ^{c,d}	46,16 ± 1,00 ⁱ
10% de AiExS-P	10F-10P	59,14 ± 0,99 ^f	3,34 ± 0,26 ^g	16,10 ± 0,26 ⁱ	40,91 ± 1,01 ^f
	15F-10P	62,27 ± 1,44 ^g	2,82 ± 0,16 ^f	15,47 ± 0,28 ^h	37,73 ± 1,43 ^d
	20F-10P	64,00 ± 0,41 ^h	2,67 ± 0,05 ^f	14,85 ± 0,39 ^g	35,89 ± 0,42 ^c
20% de AiExS-P	10F-20P	50,27 ± 1,00 ^b	4,52 ± 0,11 ^j	15,98 ± 0,40 ⁱ	49,35 ± 0,86 ^k
	15F-20P	53,93 ± 0,85 ^d	3,90 ± 0,22 ⁱ	15,89 ± 0,31 ⁱ	45,78 ± 0,86 ⁱ
	20F-20P	56,10 ± 1,28 ^e	3,63 ± 0,20 ^h	15,45 ± 0,40 ^h	43,58 ± 1,29 ^h

Se informan valores promedio ± desviación estándar. En columnas, los valores con distintos superíndices son significativamente diferentes con $p \leq 0,05$.

AIII. 4.- Conclusiones

Estos resultados muestran que la presencia de compuestos fenólicos residuales en los distintos aislados proteicos de girasol sólo modificó significativamente el color de los materiales rígidos biodegradables obtenidos a partir de almidón de mandioca y fibras de celulosa.