

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# Biblioteca Digital FCEN-UBA

## Fenómenos de pardeo de "aislados" proteicos vegetales en procesos de secado : Funcionalidad de "aislados" proteicos (redispersibilidad en agua) en relación a sistemas de preservación (secado, enfriamiento y congelación)

Zaragoza, Graciela O.  
1978

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

[www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Contacto: [digital@bl.fcen.uba.ar](mailto:digital@bl.fcen.uba.ar)

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

FENOMENOS DE PARDEO DE "AISLADOS" PROTEICOS VEGETALES  
EN PROCESOS DE SECADO - FUNCIONALIDAD DE "AISLADOS"  
PROTEICOS (REDISPERSIBILIDAD EN AGUA) EN RELACION A  
SISTEMAS DE PRESERVACION (SECADO, ENFRIAMIENTO Y  
CONGELACION)

GRACIELA OLGA ZARAGOZA

Tesis presentada para optar al título  
de Doctora en Ciencias Químicas

1978

1343

Agradezco al Dr. Pedro Cattaneo,  
Director de esta tesis, sus en-  
señanzas y el constante estímulo  
brindado durante todas las etapas  
de este trabajo.

Agradezco también :

- A los Dres. María H. Bertoni, María S. Vigo y Eduardo N. Zerba , por la desinteresada y valiosa colaboración prestadas en el asesoramiento y experimentación en diversas etapas de este trabajo.
- A los doctorandos que me precedieron en la ejecución de mi trabajo y que permitieron disponer diversos "aislados" proteicos que fueron motivo de estudio en esta tesis.
- A mis compañeros de Bromatología, por su sincera y cordial amistad.



PARTE I

INTRODUCCION

## PROPIEDADES FUNCIONALES DE PROTEINAS EN ALIMENTOS

- Solubilidad : efectos de sales neutras, temperatura y de otras variables.
  
- Sorción de agua - Hinchazón - Viscosidad
  
- Gelación
  
- Propiedades de Superficie : Emulsificación (capacidad, estabilidad y actividad de emulsión).  
Propiedades de espuma (expansión, capacidad o rebosamiento y estabilidad de espuma).
  
- Propiedades Organolépticas
  
- Ligazón
  
- Formación de Masa
  
- Factores de Procesamiento y Propiedades Funcionales
  
- Modificación de Proteínas : Texturización, hidrólisis (ácida, alcalina), proteólisis. Producción de derivados.



## PROPIEDADES FUNCIONALES DE PROTEINAS EN ALIMENTOS

Las proteínas no se ingieren aisladamente, son componentes de alimentos o ingredientes de alimentos. Mientras las proteínas por sí mismas son reconocidas como nutrientes esenciales de la dieta, los alimentos proteicos comunes (carne, pescado, huevos y productos lácteos) deben su amplia demanda al placer gastronómico que confieren, más que a su valor nutricional. En estos alimentos, las proteínas son componentes estructurales que contribuyen con propiedades funcionales específicas, directamente asociadas a su popularidad como alimentos. Los alimentos proteicos de origen animal son o resultan caros, en términos de requerimiento de tierra y precios de mercado. En reconocimiento de la necesidad que existe en todo el mundo de aumentar las proteínas en la dieta, particularmente para los grupos de bajos ingresos, se han prodigado intensos esfuerzos para desarrollar alimentos proteicos de bajo costo y una creciente atención de la investigación se ha desviado de los alimentos proteicos tradicionales a las denominadas proteínas alimenticias "no convencionales". Existe, por lo tanto, la necesidad de tener información acerca de las propiedades funcionales de estas proteínas.<sup>1</sup>

De manera general, las propiedades funcionales de las proteínas indican ciertas propiedades fisicoquímicas las cuales, a juzgar por la calidad de los atributos del producto final, afectan el proceso y comportamiento de la proteína en sistemas de alimentos. Estas reflejan complejas interacciones entre la composición, estructura y propiedades fisi-



coquímicas de las proteínas en sí, de otros componentes de los alimentos y del medio ambiente al que se asocian y en el que se evalúan.

Las amplias categorías de propiedades funcionales más importantes en alimentos incluyen : propiedades organolépticas (color, olor, "flavor", textura); hidratación (solubilidad, dispersibilidad, hinchazón, ligazón de agua); propiedades de superficie (emulsión, espuma, adsorción); adhesividad ; texturizabilidad ; formación de masa ; formación de fibra y formación de film etc. .

Las propiedades funcionales están influenciadas y varían de acuerdo a la fuente de proteína, método de aislamiento, condiciones de deshidratación o secado, concentración, modificación (química, enzimática) y varias condiciones ambientales tales como temperatura, pH y fuerza iónica; así como la presencia de materiales adventicios : sales, lípidos, emulsificantes y carbohidratos.

Usualmente las proteínas de los alimentos están compuestas de varias proteínas diferentes, cada una con distintas propiedades (solubilidad, punto isoeléctrico , susceptibilidad a la desnaturalización, etc.). La funcionalidad asociada con ciertas preparaciones con proteínas puede no reflejar las propiedades de las proteínas totales, sino más bien de uno de los componentes; además, la funcionalidad particular varía con el sistema de alimento y su aplicación y por supuesto ninguna proteína desempeña todas las funciones deseadas.

La determinación sistemática de propiedades funcionales deberá realizarse cuando se desarrollan nuevas fuentes de proteínas, concentrados y "aislados". Estas son requeridas para evaluar y posiblemente predecir como se comportarán las nue-



vas proteínas en sistemas específicos, así como para demostrar si esas proteínas pueden o no ser usadas para simular o reemplazar a las proteínas "convencionales".

La evaluación de cada proteína en términos de sus propiedades funcionales se fue complicando a través del tiempo en razón de los distintos métodos empleados. Hasta el presente existen pocos métodos normalizados y los numerosos investigadores que operan en esta área emplean una variedad de métodos para medir propiedades funcionales. Como consecuencia muchos de los datos publicados son de uso limitado a fin de comparar resultados sobre funcionalidad de distintas proteínas. Por lo tanto son necesarios métodos cuantitativos normalizados para facilitar la tabulación de datos válidos sobre propiedades funcionales de proteínas de fuentes "convencionales" y "no convencionales".

Tradicionalmente, los nuevos ingredientes se ensayaban en productos alimenticios bajo condiciones prácticas. Mientras estos "tests" son finalmente necesarios, resultan costosos y consumen mucho tiempo para producir una información de aplicación muy limitada. Una solución a este problema es el uso de sistemas "modelo" en los cuales el comportamiento de la proteína puede ser medido objetivamente. Muchos ensayos de sistemas "modelo" se requieren para determinar la adecuación de las nuevas proteínas en aplicaciones específicas. Ello por el número y complejidad de los sistemas de alimentos, por el amplio rango de propiedades funcionales de las proteínas y por su variación con la fuente proteica. Esto hace dificultoso extrapolar válidamente los datos obtenidos en un sistema "modelo" a una aplicación en alimentos. A pesar de las dificultades encontradas en la extrapolación de resultados de sistemas "modelo"



a productos alimenticios, la sencillez de éstos últimos bien diseñados, garantizan su desarrollo continuo y su uso en muchas áreas de investigación.<sup>2</sup>

### SOLUBILIDAD

La mayoría de las propiedades funcionales importantes de las proteínas en alimentos se relacionan a las interacciones agua-proteína, por ejemplo : solubilidad, viscosidad, gelación, espuma y emulsificación.

El comportamiento frente a la solubilidad proporciona un buen índice de las aplicaciones potenciales y limitaciones de las proteínas y también suministra información útil acerca de la optimización de los procesos y la determinación de los efectos del calor, los cuales pueden afectar las aplicaciones actuales y potenciales<sup>3</sup>. La solubilidad es quizás el índice más práctico para determinar la extensión de la desnaturalización. Los perfiles de solubilidad de nitrógeno en función del pH están siendo usados crecientemente como una guía de funcionalidad, siendo a menudo la primera propiedad medida y debería realizarse en cada etapa de preparación y proceso<sup>1,4</sup>.

Varios términos designan diversos métodos utilizados para medir solubilidad de proteínas en alimentos con propósitos comerciales. Ellos son : WSP, "water-soluble protein" (proteína soluble en agua); WDP, "water-dispersible protein" (proteína dispersable en agua); PDI, "protein dispersibility index" (índice de dispersibilidad de proteína); NSI, "nitrogen solubility index" (índice de solubilidad de nitrógeno), siendo los dos últimos los más comunmente empleados como métodos oficiales del AOCS<sup>5</sup>.



Las etapas básicas para determinar solubilidad han sido descritas por Lawhon y Carter<sup>6</sup>, Hermansson<sup>3,7</sup> y Betschart<sup>4</sup>. Ellas involucran la dispersión de proteína en agua, ajustando el pH con ClH ó NaOH para obtener el valor deseado, agitando un tiempo determinado a una dada velocidad, al cabo del cual se centrifuga a velocidad y tiempos preestablecidos, determinando nitrógeno en el sobrenadante.

La solubilidad es afectada por un gran número de factores, a saber: fuente de proteína, historia del proceso, tratamiento en su preparación y procesado. El concepto de solubilidad usado para proteínas es dependiente de las condiciones experimentales y no puede ser definido por los productos de solubilidad usados para sales<sup>3</sup>, siendo afectado por las condiciones de ensayo tales como : pH, temperatura, iones y concentración de los mismos, velocidad y tiempo de agitación, velocidad de centrifugación, concentración de proteína y presencia de otros ingredientes.

Los cambios en la estructura macromolecular de las proteínas como función de las variables han sido analizados por von Hippel y Schleich<sup>8</sup>. Las variables pueden ser clasificadas de la siguiente forma :

Sales neutras : cuando las sales se agregan progresivamente a una solución de proteína, la solubilidad aumenta (fenómeno que recibe el nombre de solubilización por salado o "salting in"), pasando por un máximo y luego comienza a disminuir (efecto llamado precipitación por salado o "salting out").

El proceso de "salting in" ha sido explicado como interacciones electrostáticas no específicas entre las moléculas



de proteína cargada y el ambiente iónico. Estas interacciones llevan a cabo una disminución neta del coeficiente de actividad lo cual es reflejado por un aumento de la solubilidad.

El fenómeno de "salting out" observado con fuerzas iónicas elevadas posiblemente es el resultado de la rivalidad de las proteínas y de los iones salinos por las moléculas de agua disponibles; esto impide la total solvatación de la proteína con lo cual las interacciones proteína-proteína son más importantes que las interacciones proteína-agua, disminuyendo la solubilidad.

pH : un cambio de pH afecta la carga de la proteína y el balance electrostático. Por el lado alcalino del punto isoeléctrico, las proteínas tienen una carga neta negativa y las fuerzas repulsivas causan un incremento de la solubilidad. En el punto isoeléctrico la carga neta es cero y las moléculas se unen, dominan las fuerzas atractivas y el resultado es un mínimo de solubilidad. Por el lado ácido, la carga neta es positiva y nuevamente aumenta la solubilidad.

Temperatura : un incremento en la temperatura tiene un efecto de desorden sobre las proteínas y el solvente. Las proteínas podrán desdoblarse ocurriendo nuevas interacciones y a una cierta temperatura tiene lugar agregación y coagulación.

En el curso del desenrollamiento, los grupos hidrofóbicos están expuestos al agua, lo cual es termodinámicamente desfavorable e induce a interacciones hidrofóbicas parcialmente responsables de la agregación. La oxidación de grupos -SH a puentes -S-S- intra e intermoleculares puede contribuir a la agregación, pero la oxidación puede también in-



ducir la formación de grupos  $-SOH$ ,  $-SO_2H$  y  $-SO_3H$ .

Otras Variables : los solventes orgánicos pueden afectar las proteínas ya sea directamente por unión específica o indirectamente alterando el carácter del solvente. Los solventes orgánicos con grupos polares que pueden actuar con grupos polares de la superficie proteica y con grupos no polares que pueden interactuar con grupos hidrofóbicos del interior de las moléculas después del despliegue, son los más fuertes desnaturalizantes; en cambio los solventes altamente no polares insolubles en agua tienen un efecto desnaturalizante débil.

Las condiciones de ensayo difieren en los distintos trabajos. Las concentraciones de proteína utilizadas varían entre 0,2; 0,5; 1,0 y 2,0%, siendo la de 1% la preferida por la mayoría de investigadores. Betschart<sup>4</sup> informó que la solubilidad de la proteína de soja disminuye a medida que se incrementa la concentración de proteína del 1 al 5%; sin embargo Hermansson<sup>3</sup> utilizando ese mismo rango de concentraciones no encontró diferencias en la solubilidad de los "aislados" proteicos de soja, caseinato y concentrado proteico de suero. Recientemente Shen<sup>9</sup> estudiando el efecto de las condiciones experimentales sobre la solubilidad de "aislados" de soja observó que las solubilidades no eran afectadas por la concentración en el ensayo.

Las condiciones de centrifugación varían considerablemente en los distintos trabajos, empleándose condiciones tales como : 1500 rpm por 15 minutos<sup>5</sup>, 2000 rpm por 20 minutos<sup>6,10</sup>, 4300 x G por 20 minutos<sup>11</sup>, 10000 x G por 15 minutos<sup>1</sup> y 40000 x G por 30 minutos<sup>3</sup>. En general altas velocidades



des y tiempos prolongados de centrifugación resultan en valores aparentemente más bajos de solubilidad.

### SORCION DE AGUA - HINCHAZON - VISCOSIDAD

La absorción de agua y agua ligada han sido mencionadas intercambiabilmente por la literatura.

La adsorción de agua se define como el agua adsorbida por un polvo de proteína seco después de establecerse el equilibrio con vapor de agua a una humedad relativa conocida. Hagenmaier<sup>12</sup> determinó la unión de agua de varias proteínas de origen animal y de origen vegetal, observando en las primeras una mayor capacidad para ligar agua y concluyendo que existe una correlación lineal entre la capacidad de ligar agua y la presencia de grupos hidrofílicos (-OH y -C=O), con excepción de los grupos amida. El pH de las suspensiones acuosas (antes de liofilizarlas) tuvo poco efecto sobre la adsorción de agua y dado que la solubilidad es muy dependiente del pH, esta contrastante dependencia con el mismo indica que no existe correlación entre la solubilidad y el agua adsorbida por una proteína.

El agua ligada se refiere al agua que es retenida por una proteína luego de filtración o centrifugación suave. Este método<sup>13</sup>, esencialmente involucra mezclar la proteína con agua y centrifugar la dispersión; la cantidad de agua retenida en el "pellet" después de la centrifugación es informada como agua de absorción.

La capacidad de ligar agua varía con la proteína, su composición, presencia de hidratos de carbono (polisacáridos hidrofílicos), lípidos, pH y sales; así también es influen-



ciada por los procesos de calentamiento, tratamiento alcalino y uniones disulfuro, etc. .

La capacidad de ligar agua en las diferentes proteínas debe ser determinada para facilitar ajustes en alimentos formulados cuando se intercambian fuentes proteicas. Algunas proteínas con alta capacidad de ligar agua, cuando se agregan en una formulación pueden embeber una cantidad desproporcionada de agua y deshidratar otros componentes del sistema; entoces son necesarios ajustes en la proporción de agua para obtener la viscosidad requerida.

Un método llamado "hinchazón" es esencialmente otro camino para medir absorción de agua en preparaciones proteicas. La "hinchazón" puede ser definida como una incorporación espontánea de un solvente por un sólido y es un fenómeno frecuentemente observado como la primera etapa en la solvatación de polímeros. En este caso la "hinchazón" continúa indefinidamente y la situación de equilibrio trivial es una solución. En otros casos la solvatación puede ser impedida por la presencia de varias fuerzas intermoleculares en la muestra hinchada. El concepto de "hinchazón" no puede ser claramente definido y una descripción de su comportamiento deberá ser puramente empírico.

Hermansson<sup>14,15</sup> ha definido la "hinchazón" como un buen índice de funcionalidad y estudió esta propiedad en varios sistemas proteicos, observando que su comportamiento varía con la fuente de proteína, tamaño de partícula, pH, fuerza iónica y temperatura.

La "hinchazón" de proteínas es una propiedad funcional importante en salchichas, flanes y masas. En estos alimentos

las proteínas absorben agua pero no se disuelven a causa de la insuficiente cantidad de agua; en consecuencia se hinchan e imparten características tales como cuerpo, grosor y viscosidad.

El conocimiento de las propiedades de flujo y de viscosidad<sup>15</sup> de las dispersiones proteicas tiene significación práctica, provee la información necesaria para el óptimo diseño de procesos, puede ser usado en el control de calidad de procesos y de productos finales, así como sobre los campos apropiados de aplicación de las nuevas proteínas. Es de importancia en la sensación bucal y en consecuencia en la aceptabilidad de los productos terminados y finalmente puede ser informativo en relación a las interacciones fisicoquímicas entre las proteínas.

Las propiedades de flujo se gobiernan por el tamaño molecular, forma, carga y capacidad de "hinchazón" de las proteínas y además se afectan por las condiciones ambientales. Las proteínas solubles y no hinchables poseen baja viscosidad; las solubles con alta "hinchazón" inicial demuestran una viscosidad dependiente de la concentración y las proteínas con capacidad de "hinchazón" limitada muestran alta viscosidad a concentraciones relativamente bajas.

### GELACION

La capacidad de formar geles bajo condiciones prácticas es una propiedad importante de muchas proteínas alimenticias. Los geles de proteína son formados por interacciones intermoleculares las cuales producen una red tridimensional exhibiendo una estructura rígida, en la cual el agua es atrapada. Los geles se caracterizan por tener una viscosidad relativamente alta, plasticidad y elasticidad.



Los típicos geles de proteína son los de gelatina, clara de huevo coagulada, tofú de soja, cuajos de caseína y geles de miofibrillas de carne o pescado solubles en medio salino.

La formación de un gel de proteína, generalmente requiere un calentamiento previo de la proteína para causar al menos una desnaturalización parcial o el desdoblamiento de las cadenas polipeptídicas. Ferry<sup>16</sup> en una discusión sobre gelación estableció que los geles de proteínas desnaturalizadas pueden ser formados solamente cuando se alcanza un balance crítico de fuerzas atractivas y repulsivas. La gelación se puede describir como un proceso en dos etapas involucrando la desnaturalización inicial de la proteína nativa en polipéptidos desenvueltos, los que gradualmente se asocian para formar la matriz del gel (si las fuerzas atractivas y condiciones termodinámicas resultan adecuadas). En el enfriamiento los polipéptidos desenrollados se asocian para formar una red. El "cross-linking" puede involucrar múltiples enlaces hidrógeno, atracciones iónicas, uniones -S-S-, asociaciones hidrofóbicas o una combinación de éstos, tipos de uniones que varían cuali y cuantitativamente en los distintos geles de proteína.

El fenómeno de gelación, su mecanismo y los factores que lo afectan, tales como concentración de proteína, temperatura, pH, sales, iones y azúcares han sido estudiados para la gelatina y proteínas de soja. Otras proteínas investigadas por sus propiedades gelificantes son : proteínas del músculo, gluten de trigo, "aislados" de semilla de algodón y preparaciones de proteínas de hojas.



## PROPIEDADES DE SUPERFICIE

Las propiedades de emulsificación, espuma y batido son requerimientos funcionales primarios de muchas proteínas. Las propiedades están relacionadas a la capacidad de las proteínas para disminuir las tensiones interfaciales entre los componentes hidrofóbicos e hidrofílicos en los alimentos y su función refleja la composición y conformación de la proteína. Generalmente estas propiedades están relacionadas con la solubilidad acuosa de las proteínas.

### Emulsificación

Tres métodos diferentes se han usado en la investigación de propiedades de emulsificación de proteínas : Capacidad de emulsión , estabilidad de emulsión y actividad de emulsión. Las dos primeras son las más usadas y muy pocos trabajos sobre actividad de emulsión se citan en la literatura.

La capacidad de emulsión se define usualmente como el volúmen de aceite (ml) que puede ser emulsificado por gramo de proteína, antes que ocurra inversión de fase o colapso de la emulsión.

La estabilidad de emulsión se refiere a la capacidad de una proteína para formar una emulsión que permanezca inalterable durante un lapso establecido bajo condiciones específicas.

Los métodos para determinar capacidad de emulsión, punto final, colapso de emulsión o punto de inversión son variados. La mayoría de las condiciones usadas para determinar la capacidad de emulsión de proteínas han sido elegidas arbitrariamente por los distintos investigadores, dificultando ello la comparación de resultados.



El método más comunmente usado es el sistema modelo desarrollado por Swift y col.<sup>17</sup>; esencialmente este involucra la adición continua de un aceite o grasa a una dispersión proteica (en agua o en solución salina) durante la homogenización, midiendo el volumen de aceite agregado cuando se rompe la emulsión. Los valores de capacidad de emulsión se expresan en ml de aceite emulsificado, ml de aceite por unidad de peso de muestra, ml de aceite / unidad de proteína o de N en la muestra. El volumen de aceite requerido para alcanzar el punto de inversión se puede expresar como un porcentaje del volumen de la emulsión total<sup>18</sup> (volumen de aceite agregado más volumen de la solución proteica).

El conocimiento de todos los factores que gobiernan la formación de la emulsión es crítica para evaluar las aplicaciones potenciales de las nuevas proteínas, así como las condiciones prácticas bajo las cuales los productos emulsificados son mantenidos (por ej. : temperatura) que influenciarán la estabilidad de la emulsión.

La capacidad de emulsión de las proteínas es de suma importancia en su utilización en aderezos para ensaladas y en productos con carne picada.

Varios investigadores han estudiado sistemáticamente los diversos factores y condiciones que afectan la capacidad y estabilidad de las emulsiones. Al respecto y entre otros se pueden citar los trabajos de Saffle<sup>19</sup> y Swift<sup>17,20</sup> sobre emulsiones de carne y el de Crenweldge<sup>18</sup> sobre aislados de soja, algodón, hemoglobina bovina y leche descremada. La acción de las proteínas como emulsificadoras está influen-



ciada por la concentración de proteína, la velocidad de mezclado, el tipo de aceite, el test utilizado, sales ( tipo y concentración), pH, temperatura, azúcares y contenido acuoso. Además, factores del procesado tales como congelado, descongelado, altas temperaturas y bajos valores de pH, los cuales pueden conducir a desnaturalización que invariablemente, reduce la capacidad y estabilidad de emulsión.

### Propiedades de Espuma

La formación o capacidad para formar espumas estables con el aire es una propiedad funcional importante para varios productos, tales como : tortas esponjosas, bizcochuelos a base de claras ("angel food cakes"), soufflés, merengues y cubiertas batidas para postres, etc. . Los términos espuma y batido se emplean en forma intercambiable.

Estas propiedades se miden como expansión de espuma, capacidad de espuma o rebosamiento. Los métodos y criterios usados varían con los distintos investigadores, pero esencialmente involucran la medida del volumen de espuma obtenido a partir de un volumen y concentración conocida de una dispersión proteica, seguido por un batido o agitación intensa en un cilindro graduado o después de burbujear aire a través de una solución.

La estabilidad de espuma se refiere a su capacidad para retener su máximo volumen durante todo el tiempo y es generalmente determinada por la medición de la velocidad de pérdida de fluido a partir de la espuma (separación de fase líquida).

La formación de espuma, usualmente consiste en burbujas de aire dispersadas y cubiertas con un líquido conteniendo



un tensioactivo soluble. La proteína debe desempeñar concurrentemente dos funciones para permitir la formación de espuma, a saber : reducir la tensión superficial del líquido y formar films cohesivos continuos alrededor de las burbujas de aire. En esta última función es necesario un cierto grado crítico de cohesión (atracción proteína - proteína), la cual no ocurre si hay una atracción proteína - agua muy grande, pero una interacción excesiva proteína - proteína resulta en agregación. Es entonces necesario un film continuo de proteína soluble para impartir elasticidad a la membrana de modo tal que pueda adaptarse a cambios de volumen y una cohesión intermolecular que estabilice la espuma y forme la armazón estructural y en casos específicos, pueda coagular bajo calentamiento (cocción) preservando la estructura de la espuma original.

Numerosos factores influyen las propiedades absolutas y relativas de las proteínas para formar espuma, a saber : fuente de proteína, método de preparación y de medición, composición, concentración y solubilidad de la proteína, pH, temperatura, tiempo de batido, duración del calentamiento y presencia de sales, lípidos y azúcares.

La albúmina de huevo es una proteína que exhibe una excelente capacidad para encapsular aire y se usa como "patrón" para comparar otras proteínas. Debido a que las cualidades críticas deseadas en el bizcochuelo a base de claras (buen volumen, terneza y fina textura) están determinados por la capacidad de batido de la clara, el volumen de este bizcochuelo es frecuentemente usado para evaluar la habili-



dad de formar espumas por parte de claras de diferentes huevos y otras proteínas.

Varias investigaciones han sido realizadas para reemplazar la clara de huevo por otras proteínas en preparaciones de batido. Entre las proteínas estudiadas se hallan las proteínas del suero, el concentrado proteico de pescado, globina aislada de hemoglobina, gluten de trigo, proteínas de hojas de alfalfa y proteínas de semillas de oleaginosas, tales como soja, algodón y girasol.

#### PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS

El "flavor" es quizás la propiedad más importante en la determinación de la aceptabilidad y cuando es el rasgo menos dominante, la sensación en la boca o textura asumen importancia relativa.

Las proteínas afectan las propiedades sensoriales de los alimentos tales como: apariencia, textura (soluciones, geles, espumas, emulsiones o trozos extruídos), color (reacciones de "browning") y "flavor" (vía reacciones de "browning", reacciones de eliminación de  $\text{SH}_2$ , vía proteolisis y por atrapado o unión de "flavors" deseables e indeseables).

El color, olor, "flavor" y textura son los atributos claves de las nuevas proteínas que van a decidir si podrán ser usadas en muchos productos, dado que la introducción de estas proteínas podría ser la fuente de "flavors" inusuales o indeseables a partir de aminoácidos, péptidos, lípidos y lipoproteínas ("off - flavors").

Estos pueden ser contaminantes de la proteína en sí

o pueden ser generados durante las etapas de procesado y almacenamiento de los alimentos formulados.

Los "off - flavors" constituyen problemas en muchas proteínas (soja, caseína, maní, pescado, proteínas de hojas, etc.), generalmente ello resulta de la presencia de muy bajas concentraciones de lípidos en esas preparaciones. Si bien estos "off - flavors" están presentes en pequeñas cantidades (pocos mg/Kg) se adhieren a las proteínas y persisten en los productos a través del proceso. En tales casos la extracción de proteínas con solventes orgánicos relativamente polares (etanol) puede ser necesario. Desafortunadamente en esta etapa suele ocurrir desnaturalización alterándose la funcionalidad de la proteína.

Los componentes nitrogenados, tales como aminoácidos, péptidos y nucleótidos poseen una variedad de "flavors", tal es el caso del sabor amargo de los péptidos ricos en leucina, el sabor dulce de la glicina, alanina y glutamilpéptidos, los cuales enmascaran los "flavors" amargos<sup>21</sup>.

En adición a su acción como fuentes de "flavors" por sí, las proteínas unen compuestos responsables de "flavor"; en este caso cuando son usadas como ingredientes de los alimentos la capacidad de unir "flavors" es un atributo crítico de las nuevas proteínas, por ej. en la utilización exitosa de carnes simuladas. La pérdida de "flavor" durante el proceso comercial, almacenaje y preparación casera, así como la posibilidad de un "flavor" indeseable, son problemas significativos en este tipo de productos.

Los análogos de la carne podrían reemplazar el 20% del



mercado vacuno en 1980<sup>22</sup>. Este objetivo depende del logro exitoso en la simulación del "flavor" cárnico.

### LIGAZON

La ligazón se refiere a la habilidad de una proteína para mantener ingredientes juntos en estado sólido, semisólido y fluido y en algunos caso implica la prevención o disminución de la pérdida de componentes volátiles. Es una propiedad importante en relación a grasas, agua, "flavor" y otros componentes de los alimentos, así también en relación a la viscosidad y a la formación de fibras y "films" proteicos.

La ligazón y sus características están influenciadas por el pH y la fuerza iónica (ambas afectan las propiedades de superficie y area superficial de las moléculas de proteína), por la presencia de hidratos de carbono y lípidos, por el grado de emulsificación de la grasa, el tamaño de las partículas de proteína, la extensión de la agitación mecánica, la modificación enzimática o química y los tratamientos de temperatura.

Generalmente las proteínas más hidrofóbicas, que tienen tensión superficial más baja, muestran mejor unión a materiales lipofílicos (emulsificantes, lípidos y flavorizantes).

Las proteínas de la carne solubles en medio salino son importantes en la ligazón de componentes de la carne y en la textura y estructura de carnes procesadas. La capacidad de adhesión de estas proteínas está ejemplificada por su habilidad para unir trozos de carne triturada. Los ligantes se



usan rutinariamente en salchichas y "frankfurters" e incluyen entre otros caseinatos, harinas, concentrados y "aislados" de soja y leche en polvo descremada. Estos ligantes funcionan decisivamente en la estabilización de emulsiones de carne durante la cocción y el ahumado, formando una matriz estructural después del enfriado. Se usan frecuentemente para impartir funcionalidad adecuada a carnes deficientes en esa propiedad (baja cantidad de miofibrillas solubles en medio salino); se emplean en salchichas y en "frankfurters", y también en la simulación de estos últimos<sup>23</sup>.

#### FORMACION DE MASA

Una de las propiedades más singulares y universalmente explotadas de una proteína es su capacidad para formar masa. La habilidad para formar una verdadera masa (una red de proteína viscosa, elástica y extensible) en presencia de una adecuada cantidad de agua está confinada a las proteínas de cereales, especialmente al gluten de trigo (cebada y centeno en menor extensión).

Amasando las proteínas del trigo con agua se causa la hidratación de polímeros, se permite su parcial desenrollamiento y se facilita la asociación intra e intermolecular de estos polipéptidos vía uniones -S-S- lábiles, uniones hidrógeno y asociaciones hidrofóbicas con la formación de la masa de gluten. La habilidad para formar masa ha sido atribuida a una combinación en la proporción de gliadina y glutenina, a la composición y secuencia de aminoácidos de las proteínas del gluten, a la yuxtaposición crítica de los resi-



duos de aminoácidos, al elevado nivel de glutamina y al alto grado de asociación hidrofóbica entre las proteínas de gluten en estado hidratado.

Debido al uso potencial de panes fortificados con proteínas se han realizado investigaciones sobre los efectos de las proteínas agregadas en la formación de masa y en la calidad del pan. La harina de soja ha sido agregada a la harina de trigo como una fuente de lipoxigenasa, la cual ayuda al blanqueo del pan. El agregado de harina de soja también aumenta el color de la corteza tornándola más brillante, presumiblemente como resultado de reacciones entre proteínas de soja e hidratos de carbono de la harina de trigo. En macarrones la harina de soja disminuye la absorción de agua durante la cocción y en buñuelos previene la excesiva absorción de grasa durante la fritura.<sup>24</sup>

Los efectos de la adición de los productos de soja sobre la formación de masa fueron estudiados por Yasumatsu y col.<sup>25</sup> Los parámetros observados en un farinograma fueron clasificados en dos grupos; uno concerniente a la estabilidad de masa y otro a la absorción de agua. Estos autores encontraron que la adición de productos de soja a un nivel de 5% en harinas de trigo incrementa en general, la estabilidad de la masa y la absorción de agua. La absorción de agua de la masa observó correlación positiva con el contenido en proteína y con la dispersibilidad de los productos de soja agregados. La estabilidad de la masa fue correlativa con la solubilidad de la proteína agregada; sin embargo, una mejor absorción de agua se obtuvo con proteínas de soja par-



cialmente desnaturalizada.

Otras proteínas vegetales tales como las correspondientes a semilla de algodón, maní, girasol y sésamo agregadas en proporción del 17% condujeron a panes de miga más tosca.<sup>26</sup>

Estos y otros experimentos evidencian el hecho que las proteínas tradicionales poseen propiedades funcionales que no son apreciadas hasta que se intenta reemplazarlas. Mientras el gluten de trigo tiene una función obvia estructural, funciones en el control de humedad, textura de la miga y capacidad de unir "flavors", el hecho de reemplazarlo en forma parcial o total, o suplementarlo con otras proteínas no deberá ser solamente evaluado en base a los resultados obtenidos sobre el volúmen de la hogaza del pan, sino también en base a la aceptabilidad del consumidor.

#### FACTORES DEL PROCESADO Y PROPIEDADES FUNCIONALES

Numerosos factores incluyendo el genotipo (animal y vegetal), las condiciones de producción, recolección, extracción, aislación, procesado y almacenaje pueden tener influencia sobre el comportamiento funcional de las proteínas en los alimentos.

La magnitud de cada efecto sobre la funcionalidad es variada y el significado depende de la proteína en cuestión, de sus propiedades y del criterio particular con que está siendo evaluada.

Las condiciones de producción pueden afectar la composición y funcionalidad de las proteínas. Así las proteínas de leche varían según la estación del año y tipos de dietas; las del trigo con las condiciones de producción.



El estado fisiológico también puede influir sobre el contenido, composición y características físicas, por ej : durante la germinación cambia el carácter de las proteínas. El tratamiento particular de la fuente antes o durante la recolección puede indirectamente afectar a las proteínas, por ej. : en pescado, la activación de lipasas por tejidos dañados o el almacenaje a temperaturas de congelación puede conducir a la desnaturalización con pérdida en la capacidad de ligar agua y a cambios indeseables en la textura. Otro ejemplo es el ejercicio intensivo de animales antes de la matanza que puede resultar en una excesiva y rápida caída del pH del músculo "post-mortem" con la resultante pérdida de funcionalidad de estas proteínas.

El estado físico de la fuente (grado de molienda o maceración), el contenido en fibra y la presencia de lípidos, así como la extensión del tratamiento térmico<sup>6</sup>, tienen influencia sobre la extractabilidad de las proteínas.

El método de extracción afecta la naturaleza y cantidad de proteínas presentes en los extractos y tiene influencia en el producto final. Los factores que afectan la solubilidad (composición de proteína, solvente utilizado, fuerza iónica, pH, duración de la extracción, etc.) gobiernan la composición y las características fisicoquímicas de las proteínas extraídas. Mientras la extracción alcalina a valores de pH superiores a 9,5 generalmente resulta en una mayor producción de material nitrogenado, causa cierto grado de desnaturalización de las proteínas y pérdida del valor biológico.

Los métodos utilizados en el aislamiento, concentración



y recuperación de proteínas a partir de extractos, ejercen un efecto significativo sobre sus propiedades. Ciertos procesos de recuperación involucran desnaturalización, por ej.: la precipitación en caliente da como resultado una proteína insoluble de aplicaciones limitadas. La precipitación de proteínas a valores de pH ácidos es práctica muy utilizada para recuperar proteínas con propiedades funcionales requeridas; sin embargo, una prolongada exposición durante la precipitación isoelectrica resulta en una pérdida gradual de solubilidad<sup>27,28</sup>.

Los métodos modernos para la concentración y aislación de proteínas a partir del extracto por cromatografía en "sephadex" y ultracentrifugación, se usan en la producción de proteínas prácticamente "no desnaturalizadas" con óptima funcionalidad. Estos métodos son caros pero han sido adoptados comercialmente sobre una base limitada, en forma particular para la preparación de las proteínas del suero<sup>29</sup>, las cuales, en virtud de sus propiedades funcionales tienen un interés significativo.

Los procesos de secado ejercen un efecto obvio sobre las proteínas, por ej.: el secado a rodillo resulta en una pérdida de solubilidad; el secado por "spray" comunmente usado para la preparación de varias proteínas es generalmente compatible con la retención de propiedades funcionales y la liofilización reduce a un mínimo la desnaturalización y provee una estructura suelta, floja fácilmente dispersable en solución acuosa.

Se ha informado que el cosecado (por "spray") de hidrolizados de proteínas de pescado con carbohidratos resulta



en una mejor capacidad de emulsión<sup>30</sup>; el secado por "spray" de proteínas plasmáticas en presencia de lactosa mejora la retención de la solubilidad<sup>10</sup> y el agregado de hidratos de carbono de bajo peso molecular (como glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa y jarabe de maíz) a leches de soja antes del secado, mejora significativamente la redispersibilidad de los productos secos resultantes<sup>31</sup>. Una explicación posible del efecto dispersante del azúcar sería la separación física de las moléculas de proteína.

La exposición a otros agentes tales como desodorización por calor húmedo, remoción de lípidos por solventes, tratamientos de desolventización, agitación excesiva, congelación y descongelación son factores que deben considerarse cuando se evalúan propiedades funcionales y se proyectan formulaciones de productos alimenticios.

La retención o estabilidad de funcionalidad durante el almacenaje es un criterio importante que requiere estudio y evaluación bajo condiciones prácticas. Varias reacciones químicas pueden ocurrir: hidrólisis, desaminación, polimerización, agregación e interacciones con otros componentes tales como lípidos e hidratos de carbono. Estas reacciones son gobernadas por la luz, temperatura, pH,  $a_w$  y por la actividad inherente a los componentes<sup>32,33,34,35</sup>.

Varios investigadores estudiaron los cambios de funcionalidad de proteínas durante el almacenaje. Nash y col.<sup>27</sup> reportaron que la extractabilidad y solubilidad de las fracciones 7s y 11s de las proteínas de soja disminuye con la duración del almacenaje. Smith y Circle<sup>28</sup> establecieron que la solubilidad de la proteína de soja disminuye aproxi-



madamente en 1% mensual durante el estacionamiento. Betschart y Kinsella<sup>36</sup> estudiaron algunos cambios tales como solubilidad, composición y digestibilidad que ocurren en concentrados proteicos de hojas de soja durante el almacenaje. Estos autores observaron que el concentrado proteico de hojas obtenido por precipitación isoelectrica no resultó marcadamente afectado durante un almacenaje superior a seis meses.

Diversas interacciones físicas y químicas son responsables de cambios deteriorativos en las proteínas. Una de las principales reacciones involucra la interacción del  $\epsilon$  - amino grupo de la lisina con grupos carbonilo. Las reacciones de "browning" no enzimático (Maillard) provocan oscurecimiento, desarrollo de "off - flavors", endurecimiento de la textura y pérdida del valor nutritivo. La extensión y los efectos finales del pardeo dependen principalmente de las condiciones de almacenaje, temperatura, contenido en agua, pH y composición de los materiales proteínicos, por ej.: presencia de azúcares reductores.

Los lípidos, componentes comunes de muchas preparaciones de alimentos, afectan significativamente la estabilidad y retención de la calidad y funcionalidad durante el almacenaje.

La oxidación de lípidos durante el almacenaje resulta en la generación de "off - flavors", destrucción de aminoácidos (lisina, metionina, cistina y tirosina), oscurecimiento, agregación y polimerización de proteínas. La severidad de estas reacciones varía con la fuente de proteína, contenido en lípidos, duración del almacenaje, tensión de oxígeno, actividad acuosa y temperatura.



## MODIFICACION DE PROTEINAS PARA MEJORAR LAS PROPIEDADES FUNCIONALES

La modificación de proteínas se refiere a la alteración intencional de la estructura y propiedades físicas por agentes químicos, físicos o enzimáticos a fin de mejorar las propiedades funcionales, tales como textura, solubilidad, estabilidad térmica, formación de espuma, etc. .

La modificación puede resultar directa o indirectamente en el mejoramiento del "flavor", color, eliminación de "off-flavors", destrucción de enzimas indeseables, factores anti-nutricionales, hemoaglutininas y alergénicos. Estas mejoras pueden expandir significativamente el uso de las nuevas proteínas. Idealmente la modificación no debe causar deterioro en la calidad nutricional; sin embargo, en la mejora de propiedades funcionales la pérdida de algunos aminoácidos esenciales puede ser inevitable.

La modificación de las proteínas puede involucrar alteraciones en la estructura o conformación a todos los niveles de organización : estructura primaria, secundaria y terciaria pudiendo incluir ruptura y reformación de enlaces covalentes y fuerzas secundarias.

Ejemplos comunes de modificación incluyen : texturización, hidrólisis (ácida, alcalina y enzimática) y modificaciones a través de formación de derivados<sup>38</sup> .

### Texturización

Las proteínas texturizadas se definen como productos alimenticios elaborados a partir de fuentes comestibles y se caracterizan por tener integridad estructural y textura



identificable, capaz de resistir la hidratación en la cocción y en otras preparaciones<sup>39</sup>.

Las proteínas texturizadas son útiles en la simulación de alimentos tradicionales y en la ampliación de aplicaciones potenciales de proteínas a nuevos productos, como es el caso de la proteína de soja. En el presente se usan en carnes simuladas, alimentos enlatados, salchichas, salsas etc. y se ha estimado un consumo anual de 2 billones de libras para 1985.

Las proteínas se texturizan convencionalmente por varios procesos incluyendo : hilado en fibras<sup>40</sup> ("fiber spinning"), la técnica de extrusión termoplástica<sup>41</sup>, la formación de un gel masticable, la formación de cuajo y la formación de "film" (yuba)<sup>42</sup>.

En los dos primeros las condiciones de procesamiento, tales como pH y temperatura se manipulan para mejorar las propiedades físicas y funcionales de los materiales crudos, a fin de obtener propiedades variadas y deseadas en los productos finales.

### Hidrólisis

Los hidrolizados de proteína se preparan comunmente por hidrólisis ácida de proteínas de soja, gluten, caseína, levadura y sangre. Las proteínas normalmente se hidrolizan con ácido clorhídrico (10 - 20%) durante 12 horas a presión atmosférica o 4-5 horas bajo presión. El hidrolizado se neutraliza con hidróxido de sodio a pH 6,0 y el material se filtra para remover las huminas y luego se trata con carbón para eliminar color y sabores amargos y se envasa en forma líquida, concentrado hasta consistencia de pasta o bien se seca por "spray"



obteniéndose un polvo.

La hidrólisis ácida es rápida y relativamente barata, resultando desventajoso el alto contenido en sales que se generan en el proceso y que pueden ser removidas por ultracentrifugación.

Hermansson<sup>43</sup> examinó un hidrolizado de proteína de nabo, observando que la hidrólisis ácida mejora seis veces la solubilidad, dos veces la capacidad de espuma y ocho veces la capacidad de emulsificación. Estos datos indican que la hidrólisis ácida controlada puede usarse para preparar proteínas funcionales a partir de proteínas insolubles.

Es poca la información disponible acerca del valor nutritivo de estos hidrolizados. Cierta isomerización de aminoácidos puede ocurrir, pero su alcance en un proceso comercial es desconocido. La hidrólisis ácida causa una destrucción variable de algunos aminoácidos como triptófano, serina, treonina y azufrados (especialmente cisteína).

El tratamiento alcalino se emplea para facilitar la extracción de varias proteínas tales como soja, nabo, hojas, pescado, etc. y es usado comunmente en la industria para mejorar la solubilidad de las proteínas, la capacidad de espuma y de emulsificación, para el hilado en fibras en los procesos de texturización, para inactivar enzimas y en la destrucción de toxinas y alergénicos.

El medio alcalino según la concentración, temperatura y duración puede causar un mero aflojamiento, desagregación y despolimerización ; puede producir una hidrólisis limitada con formación de polipéptidos y bajo condiciones intensas aminoácidos libres. Puesto que distintos productos se obtienen se-



Según las condiciones de reacción, las propiedades funcionales de las proteínas que han sufrido un tratamiento alcalino pueden ser bastante variables.

Respecto al valor biológico, el tratamiento alcalino causa formación de dehidroalanina a partir de serina y cistina, vía reacción de  $\beta$ -eliminación. Este compuesto reacciona con los  $\xi$ - amino grupos de la lisina para formar lisinoalanina, con la cistina para formar lantionina y con la ornitina para dar ornitoalanina. Además se puede producir racemización y "cross - linking" con pérdida del valor biológico.

### Proteolisis

La proteolisis parcial se ha usado por parte de varios investigadores para mejorar la solubilidad de las proteínas de pescado, nabo, algodón y soja, entre otras. Las proteínas de soja tratadas con pepsina son usadas como agentes de batido en reemplazo de la clara de huevo, en formulaciones para postres y los hidrolizados enzimáticos de caseína en la manufactura de dulces y bombones. La proteolisis de músculo bovino con papaína y bromelina aumenta la cantidad de proteínas solubles en medio salino y mejora la capacidad de emulsificación.

Un problema significativo en la hidrólisis enzimática es la hidrólisis excesiva, con acumulación de productos de bajo peso molecular, generación de "flavors" amargos, además del costo de las enzimas requeridas. La formación de productos de bajo peso molecular puede ser deseable para una bebida, pero para propiedades tales como ligazón y de superficie se requieren polipéptidos intactos. Se han realizado estudios para controlar la extensión de la hidrólisis y la



manipulación de parámetros tales como selección de enzima, concentración de sustrato, pH, temperatura y tiempo.

Fujimaki y Arai<sup>44</sup> han estudiado particularmente la reacción de plasteína que involucra la hidrólisis enzimática de proteínas en polipéptidos de bajo peso molecular seguida por la resíntesis de polipéptidos de alto peso molecular y de proteínas. Esta reacción facilita la remoción de factores antinutricionales, impurezas y componentes no péptidicos y la intercombinación de proteínas de varias fuentes para incorporar polipéptidos superiores desde el punto de vista nutricional y funcional.

#### Modificación a través de Derivados

La formación de derivados para modificar las propiedades funcionales de proteínas para alimentos ha recibido atención limitada. Los derivados catiónicos de las proteínas son rutinariamente usados, por ej. : "aislado" sódico de soja y caseinato de sodio y calcio. Estos derivados poseen mejores propiedades de humectabilidad, dispersibilidad y manipulación y la naturaleza del catión, puede alterar el comportamiento funcional.

La acilación (y alquilación) de varios grupos químicos en las proteínas provee un método mediante el cual un amplio espectro de compuestos funcionales pueden ser incorporados a ellas. Aunque numerosos estudios básicos han sido conducidos sobre la formación de derivados de "aislados" proteicos de alimentos para elucidar algunas propiedades fisicoquímicas, sólo recientemente han sido estudiados en relación a la mejora de propiedades funcionales. Las propiedades funcionales de proteínas succiniladas de pescado, gluten, levadura, soja y hojas



en sistemas "modelo" han sido estudiadas por varios investigadores<sup>45,46</sup>. Generalmente las proteínas modificadas mejoran la solubilidad, son relativamente estables al calor y demuestran buenas propiedades de emulsión.

Recientemente, Franzen y Kinsella<sup>46</sup> estudiaron las propiedades funcionales de proteínas de soja acetilada y succinilada. Observaron que la capacidad de emulsión aumentó tres veces, la estabilidad de emulsión un 30%, la capacidad para formar espuma un 20% y la estabilidad de espuma 50% en la proteína succinilada; en cambio, la acetilación causó cambios negligentes en la proteína de soja.

La reducción en el valor nutritivo, como resultado de la acilación puede retardar y desalentar el desarrollo y uso de esta técnica. Los grupos acil nucleofílicos reaccionan predominantemente con los  $\epsilon$ -amino grupos de la lisina y la naturaleza del grupo acilante afecta significativamente el valor nutritivo. Valores de PER de 2,5 ; 1,6 y 0,3 se han informado para ratas alimentadas con caseína, caseína acetilada y caseína succinilada respectivamente.

La succinilación parcial de las proteínas si bien mejora sus propiedades funcionales, tiene un efecto menos deletéreo sobre su valor nutritivo. En esas condiciones, la proteína de músculo de pescado succinilada, en la cual el 30-40% de los  $\epsilon$ - amino grupos fueron acilados observó un PER de 2,86 comparado con 3,64 para la caseína<sup>44</sup>. De este modo es posible modificar químicamente las proteínas mejorando su funcionalidad y reteniendo adecuados niveles de lisina disponible.



PARTE II

DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL

### COLOR DE AISLADOS PROTEICOS

- Obtención de "aislados" proteicos blancos - Agotamiento de los "aislados por etanol 96%, previo al secado - Congelación - Liofilización.
- Ensayos de pardeamiento de un "aislado" proteico blanco de semilla de lino
- Investigación de compuestos carbonílicos en harina de semilla de lino - Agotamiento de harina de lino por mezcla  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$  - Obtención de lípidos asociados y su fraccionamiento por cromatografía en placa delgada - Evidencia de la presencia de lípidos aldehídogenicos (plasmalógenos) y de azúcares en el extracto lipídico y de azúcares reductores y polisacáridos en la harina.
- Aislados proteicos de semilla de lino a partir de harinas agotadas por hexano y por mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ .

### FUNCIONALIDAD DE AISLADOS PROTEICOS

#### VALORES DE INDICE DE SOLUBILIDAD DE NITROGENO (ISN)

- Experiencias sobre "aislados" purificados por etanol 96%, secados a 45° - Influencia del pH y de concentración de "aislado".
- Experiencias sobre coágulos proteicos recientes, no sometidos a deshidratación - Preservación de coágulos recientes por congelación y por enfriamiento - Valores de lisina disponible.

#### AISLADOS DE SEMILLA DE SOJA Y DE CARTAMO

- Obtención por dispersión alcalina y floculación a pH isoeléctrico - Características de ambos "aislados" agotados por etanol y secados a 45° - Estudios de lípidos asociados y de aceites de extracción (soja).



COLOR DE AISLADOS PROTEICOS - FACTORES DETERMINANTES

Dos grandes tipos de materias primas vegetales son los que se emplean en la obtención de "aislados" proteicos. Un gran grupo debería conducir, a través del sistema de obtención tradicional (dispersión en medio alcalino y floculación de proteínas a pH isoelectrico) a la obtención de "aislados" blancos. A este grupo pertenecen los subproductos de la mayoría de las semillas oleaginosas (tortas, "expellers", harinas), exceptuando aquellos que naturalmente contienen polifenoles como el ácido clorogénico presente en la semilla de girasol u ortofenoles varios en hojas de plantas. En estos últimos casos la aplicación del método tradicional ya mencionado produce la oxidación a quinonas de los polifenoles (compuestos coloreados, generalmente verdes) a valores de pH superiores a 7,5. Las quinonas también pueden tener origen por oxidación catalizada por enzimas (polifenolasas), en el caso de hojas. Cualquiera sea el sistema de oxidación operado las quinonas se unen en forma irreversible a las proteínas, que resultan afectadas en color y en su valor biológico.

En idioma inglés el término "discoloration" no tiene equivalente en castellano pues significa un cambio de tonalidad. En el caso de partir de materias primas carentes de polifenoles la obtención de proteínas de color amarillo a pardo oscuro a través del método tradicional responde a un proceso de "discoloration". En cambio partiendo de harina de girasol y en la obtención de proteínas de hojas de plantas, el método tradicional no podrá evitar la obtención de



"aislados" proteicos de tonalidades verdosas, pudiendo en cambio sumarse a esa tonalidad la dependiente de un verdadero proceso de "discoloration" originado en otros causales que dan en llamarse "pardeamiento".

la) - Obtención de "aislados" blancos

En la Argentina los primeros trabajos a escala de laboratorio para el aislamiento de proteínas de subproductos de la industria aceitera, ocurrieron en los laboratorios del Instituto Nacional de Tecnología Industrial, en los que se operó (Centro de Investigación de Grasas y Aceites, CIGA), sobre un "expeller" industrial de semilla de lino<sup>47</sup>. En tal oportunidad, según el método tradicional (dispersión del "expeller" en agua a pH 9,5 seguido de separación de la fase líquida por centrifugación y precipitación de las proteínas a pH 4,0), se obtuvieron por secado proteínas de color pardo oscuro, operando en vacío y a temperatura de 40 - 50°. El producto era de granulometría despereja y duro, siendo muy difícil reducirlo a polvo por molienda en mortero.

Con posterioridad Bertoni y Cattaneo<sup>48,49</sup> retomaron el tema operando sobre harina de semilla integral de lino oleaginoso, obtenida en el laboratorio por agotamiento con hexano técnico. Confirmaron los resultados logrados en C.I.G.A. y finalmente pudieron obtener proteínas bajo forma de polvo fino liviano, insípido e inodoro y de color blanco, por secado (vacío, 45°) del coágulo obtenido a pH isoeléctrico (pH 4,0), previamente liberado de material lipídico por agotamiento con etanol 96%.



Este tratamiento se aplicó en base a la información de Smith y col.<sup>50</sup> quienes trabajando en la obtención de proteínas de lino señalaron la presencia de azúcares y compuestos nitrogenados solubles en el sobrenadante de la precipitación de proteínas. Así mismo los de Wolf y col.<sup>51</sup> y Nash y col.<sup>52</sup> que informaron la caracterización de diversos componentes asociados a proteínas de soja (azúcares, lípidos y compuestos nitrogenados y fosforados) extraíbles por etanol (3 lavados con etanol 83-86%, con relaciones no menores de 20:1 como ml etanol/gramos de proteína). En las experiencias realizadas con proteínas de semilla de lino por Bertoni y Cattaneo<sup>48</sup> se utilizó etanol de 96% en la relación 20:1 (ml etanol/g proteína seca). Previamente el coágulo había sido lavado con agua a pH isoeléctrico. En los líquidos acuosos de estos últimos, previa concentración en vacío parcial a no más de 45°, se registró reacción de Molish positiva para glúcidos en general y reductores (azul de metileno). De los líquidos alcohólicos reunidos por concentración a no más de 50°, se aisló un material viscoso de color pardo oscuro soluble en éter etílico, que fue estudiado analíticamente comprobando un elevado valor de número de acidez (55,5 mg KOH / g), valores de 198,4 ; 106,4 ; 7,61% ; 80,8% y 0,30-0,34 como P%, para índice de saponificación, índice de yodo, insaponificable, ácidos totales por saponificación y fósforo lipídico. Además se estudió por CGL de los ésteres metílicos de los ácidos totales, la composición acídica de estos lípidos. Estas experiencias fueron las primeras registradas en literatura acerca de la naturaleza y composición de la fracción lipídica extraíble por etanol de proteínas vegeta-



les recientemente floculadas a su valor de pH isoelectrico. Los mismos autores<sup>49</sup> al justificar el valor relativamente bajo de contenido en N% de las proteínas así obtenidas (secadas en vacío a 45°), como consecuencia de la presencia de alrededor de 20% de un polisacárido constituido por galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y glucosa fuertemente ligado a la fracción proteica, comprobaron que estas proteínas no estaban libres de lípidos desde que por aplicación de un drástico proceso de saponificación (potasa alcohólica al 6%) y según una adaptación de la técnica de Szutowicz<sup>53</sup>, se verificó un contenido en lípidos residuales de 0,35% referido a proteínas secas a 45°, constituido por material insaponificable y ácidos grasos, cuya composición acídica fue establecida por CGL de los ésteres metílicos de estos últimos. También parece haber sido la primera mención sobre la presencia de esta fracción lipídica en proteínas vegetales aisladas en la forma señalada.

En general los trabajos sobre "aislados" proteicos vegetales registrados en literatura no hacen mención a las características de color de los productos finales. Las técnicas más frecuentemente mencionadas para el secado final en escala de laboratorio o piloto son la de "spray" sobre coágulo disperso en agua a pH isoelectrico o sobre coágulo solubilizado a pH 7,0 (NaOH), obteniéndose en este último caso los llamados "proteínatos". La industria usa también casi exclusivamente el proceso "spray" el que, en función de la rapidez del proceso de secado (debido a los valores de temperatura y grado de división del material) provee proteínas finales secas, blancas o ligeramente amarillentas. Tan-



to por aplicación del proceso "spray" como por liofilización, se obtienen productos de estas características de color sobre coágulos conteniendo la totalidad de sus lípidos.

Indefectiblemente todo proceso de secado sobre coágulos no tratados por etanol, conduce a productos finales de color pardo, en tonos de intensidad variable, aún operando en condiciones que no pueden considerarse drásticas, tales como en vacío y a no más de 45°. Ello llevó a considerar que la presencia de lípidos (extraíbles por etanol) sería un factor preponderante en el pardeamiento durante el secado final sin excluir otros de incidencia menor, entre ellos la concentración de agua del precipitado, eliminable en los primeros tratamientos alcohólicos.

De esto último surge que en ausencia de compuestos polifenólicos el oscurecimiento de un "aislado" proteico recientemente floculado a pH isoeléctrico se vincula, entre otros factores, a su contenido acuoso, a la velocidad de deshidratación y a la temperatura operada en este proceso. El proceso "spray" aparece como el más indicado en razón de la alta velocidad de deshidratación, a su vez dependiente de la temperatura, de la velocidad del aire y del grado de subdivisión del material. La deshidratación térmica por otros procesos (ejemplo: vacío, temperatura no mayor de 50°) importa un proceso prolongado que demanda muchas horas y que es dependiente del espesor del material, de la temperatura y del grado de evacuación. Es razonable pensar que ese lapso es lo suficientemente prolongado como para exponer el producto, en un rango de contenido acuoso crítico y propicio para el desarrollo de pardeo no enzimático, en base



principal a restos lisina y compuestos carbonílicos existentes en el coágulo integral ( restos de azúcares reductores, lípidos aldehídogenicos, compuestos carbonílicos procedentes de autoxidación de lípidos, etc.).

La eliminación rápida de la casi totalidad del contenido acuoso de un coágulo reciente (lograble por "spray") puede alcanzarse también por otros procesos rápidos o por inmovilización del agua disponible.

#### Agotamiento por etanol

Un coágulo recién obtenido por centrifugación se suspende en suficiente volumen de etanol 96% (generalmente relación 1:20), desintegra a fondo y centrifuga decantando la fase líquida (generalmente de color amarillo pardo). Este proceso se repite dos veces más o hasta obtención de líquidos incoloros. El primer tratamiento fundamentalmente deshidrata, mientras que los posteriores completan ese proceso y extraen la mayor parte de los lípidos englobados en el coágulo (principalmente fosfolípidos, insaponificables, glicéridos, ácidos grasos libres, etc.). Estos lípidos por su composición acídica son en mayor o menor medida autoxidables, lo que implica generación de compuestos carbonílicos que como es sabido, intervienen indefectiblemente en procesos de pardeo no enzimático.

Un coágulo agotado por etanol 96% en la forma señalada no está libre de componentes lipídicos. En efecto, si se somete a un proceso de saponificación drástica (potasa alcohólica al 6%) es posible aislar una pequeña fracción lipídica compuesta por ácidos grasos e insaponificable. Un comportamiento similar se observa en coágulos agotados por



una mezcla de  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  que, a pesar de su polaridad, no elimina totalmente los lípidos retenidos. Un coágulo así agotado (por etanol o por mezcla ternaria) secado en vacío a no más de  $45^\circ$  conduce a un polvo blanco liviano, inodoro e insípido. Sin embargo si este producto final se añade de agua y elimina a ésta en vacío a temperatura de  $55^\circ$  se obtendrá un producto seco de otra textura (escamosa) y de color amarillo parduzco. De ahí que la velocidad de eliminación del agua tenga tanta incidencia en los fenómenos de pardeo.

Tanto los lípidos extraíbles por etanol como los lípidos residuales (extraídos luego del proceso drástico de saponificación), no preexisten como tales ni en la harina (en el primer caso), ni en el coágulo agotado por etanol (en el segundo). En efecto, durante la dispersión alcalina de las proteínas de una harina (pH 9-10,5) debe ocurrir saponificación, en razón del tiempo de contacto a esos valores de pH (dos períodos de una hora cada uno). Los jabones formados liberan los ácidos grasos al pH isoeléctrico y éstos coprecipitan con las proteínas. Ello surge claramente de los elevados valores de número de acidez libre de los lípidos aislados de los extractos etanólicos de numerosas fuentes de proteínas (50 - 150 mg KOH/g), como se observa en la Tabla 1. Estos lípidos en su forma preexistente deben contener principalmente lípidos polares, no extraídos por hexano técnico y contienen fósforo lipídico (0,20 - 1,74% como P; Tabla 1). Un examen de la composición ácida de estos lípidos muestran valores que difieren sensiblemente de los correspondientes a los ácidos totales de los aceites



seminales respectivos. Como consecuencia se registran en la mayoría de los casos valores sensiblemente menores para los índices de yodo de los ácidos totales de los lípidos etanólicos. Los contenidos en lípidos extraíbles por etanol son función de la materia prima (harina de partida) y oscilan entre 1 y 2% en la mayoría de los casos, si bien se observaron valores elevados para girasol (2 - 3,6% sobre proteína seca), en sésamo (4,4% sobre proteína seca) y en cítricos (5,2% sobre proteína seca), ver Tabla 1. Otra característica de estos lípidos es su riqueza en materiales insaponificables (4 - 38% sobre lípidos) y consecuentemente valores bajos de sus contenidos en ácidos totales por saponificación (29 - 86%).

Por su parte los llamados lípidos residuales (aislados luego de saponificación drástica de la proteína seca agotada por etanol) están constituidos (dada la técnica de obtención) por una fracción insaponificable y otra de ácidos grasos. Las composiciones acídicas de estos últimos difieren de las de los lípidos extraídos por etanol y en general son de mayores valores de índice de yodo que los ácidos totales de la fracción etanólica. Los valores de rendimiento % de proteína seca y de índice de yodo de los ácidos totales (calculados) de estos lípidos residuales correspondientes a diversos "aislados" fueron :

Cítricos (0,98% y 86,2) , tomate (0,27% y 101,6) , girasol (0,88% y 115,3) , girasol obtenido a partir de harina agotada por hexano y metanol (0,10% y 63,7), cártamo (0,78% y 117,5) , soja extraído a pH 7,0 (0,86% y 106,6) y "aislado" de soja extraído a pH 10,0 (0,94% y 114,4) respectivamente.



### Congelación

La congelación del agua libre de un "aislado" recientemente obtenido por centrifugación anula o inhibe la ocurrencia de procesos de pardeamiento no enzimático (por ausencia del solvente de los reactantes iniciadores de este proceso). Cabe admitir que un proceso de congelación rápida debe ser más efectivo que uno lento en razón de la velocidad de congelación y de la inhibición de los procesos de pardeo a muy bajas temperaturas. La inhibición a bajas temperaturas ( $8 - 10^{\circ}$ ) permite evitar pardeo sin congelación por lapsos de hasta dos semanas.

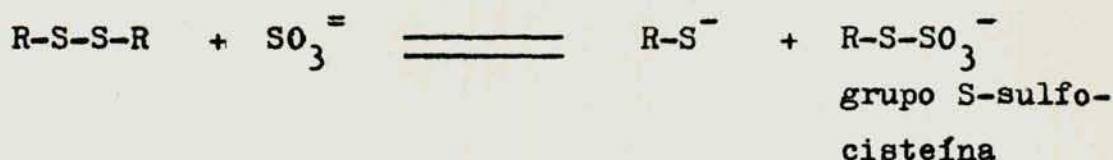
### Liofilización

Este proceso importa una deshidratación que se inicia con la inmovilización del contenido de agua libre (congelación) y que prosigue con su eliminación sin pasar por el estado líquido (sublimación). De este modo tampoco aquí los reactantes de un proceso de pardeo no enzimático podrían interaccionar.

Los procesos de pardeo de "aislados" proteicos durante las etapas de secado a partir de coágulos recientes integrales pueden evitarse o inhibirse empleando durante la dispersión alcalina agentes reductores como el sulfito de sodio, el ditionato de sodio o el ditionato de cinc o empleando anhídrido sulfuroso como agente precipitante para alcanzar el pH isoeléctrico. Es sabido, que los sulfitos son inhibidores de los procesos de pardeo no enzimático.

Tratándose de "aislados" a partir de harinas que contienen ácidos clorogénicos u otros polifenoles, los sulfitos

proveen en el medio alcalino de dispersión (pH 7,5) un medio reductor que se opone a la producción de compuestos coloreados (generalmente verdes) a partir de esas sustancias. También es sabido que los sulfitos reaccionan con grupos -S-S- (cistina) según:



Este proceso conduce a un aumento de solubilidad de las proteínas (caso de puentes -S-S- intermoleculares) y a una disminución del valor biológico, desconociéndose si los derivados con agrupación -S-SO<sub>3</sub>Na tienen o no efectos tóxicos.

En el caso particular de las proteínas de hojas la oxidación de o-difenoles a o-quinonas<sup>54</sup> es catalizada por polifenolasas. La acción de los polifenoles y quinonas sobre los ε- amino grupos de la lisina y la subsiguiente polimerización de polifenoles en complejos de tipo tanino-proteína puede involucrar numerosos aminoácidos, incluso esenciales que así se vuelven inaprovechables a través de procesos de digestión de animales monogástricos.

La explicación de los mecanismos de pardeamiento de "aislados" proteicos a través de procesos de secado involucrando "browning" no enzimático, nunca ha sido objeto de una prueba experimental concluyente. La existencia en las harinas de partida de azúcares reductores, así como la presencia de lípidos autoxidables en los "aislados" incluyendo fosfolípidos o lípidos aldehídogenicos (plasmalógenos)



proveen los compuestos carbonílicos que junto a los  $\epsilon$ - amino grupos de lisina y de etanolamina fosfolípidos pueden iniciar procesos de pardeo no enzimático que se optimizan a niveles de contenido acuoso apropiado durante el secado.

En cambio estos procesos de pardeamiento no enzimático han sido recientemente correlacionados con la disponibilidad de lisina en sistemas modelo constituidos con distintas proteínas (albúmina de huevo, proteínas de suero de queso, concentrado de proteína de pescado, gluten de trigo y proteínas texturizadas de soja) en iguales concentraciones en mezclas con celulosa microcristalina como soporte, conteniendo glicerol, aceite de Apiezon B, sorbato de potasio, glucosa y agua (valores de  $a_w$  0,63 - 0,78)<sup>55</sup>. Este estudio abarcó la apreciación del grado de pardeo no enzimático (por evaluación de color en extractivos) y de lisina disponible a distintos períodos de tiempo por estacionamiento a 30° durante 60 días en envases herméticos. Se comprobó que ocurrían comportamientos diferentes según la proteína presente en el sistema, atribuibles a distintos grados de pardeo y conjuntamente de lisina disponible, posiblemente debido a la intervención de otros aminoácidos (arginina, glutamina, asparagina, histidina, tirosina), así como a la configuración estructural de cada proteína, concluyendo que no existe una relación fija entre el grado de pardeo y pérdida de lisina disponible. A los fines de estas conclusiones se tuvieron en cuenta los tiempos de inducción (período previo a la aparición o visualización de pardeo, grado de pardeo durante el período de utilidad esperado para el modelo, producto o formulación y la proporción de lisina disponible, medida en días



para alcanzar mermas del 50%).

También recientemente<sup>56</sup> se informaron ensayos biológicos con caseína marcada ( $U^{14}C$ -L- lisina) de leche de cabra sometida a pardeo enzimático (en presencia de glucosa a 37° y con humedad relativa de 70%), confirmando que la causa principal de la reducción del valor biológico por pardeo reside en el bloqueo de la lisina, la que a través de procesos de digestión permanece en el intestino delgado bajo forma de un derivado de muy baja velocidad de absorción.

lb) - Ensayos previos de pardeamiento sobre un "aislado" blanco de semilla de lino

Disponiendo un "aislado" proteico blanco de semilla integral de lino, en forma de polvo liviano incoloro e insípido, obtenido según<sup>48</sup>, se llevaron a cabo experiencias sencillas por agregado de materiales lipídicos presentes en el coágulo o de derivados de los mismos. Si a este "aislado" se agregan ésteres metílicos de los ácidos grasos totales de aceite de semilla de lino disueltos en etanol 96% (un volumen suficiente para obtener una suspensión del "aislado" en esa solución) y se mantiene por dos horas en rota-vapor a 60-70° y luego se lleva a seco a esa temperatura y en vacío, se obtiene un producto en forma de polvo fino de color blanco. Pese a la presencia de ácidos grasos altamente autoxidables (18:2, 18:3) no se ha observado ningún cambio. En otra experiencia similar se operó en presencia de agua y solución alcohólica de los ésteres metílicos empleados en la experiencia anterior. El producto final luego de secado en rota-vapor a 60- 70° y en vacío parcial,



consistía de escamas amarillas adheridas al balón. Se concluye que la presencia de agua está vinculada a la aparición de color y al cambio de textura.

Podría suponerse que fueran los lípidos polares responsables de fenómenos de pardeo y en base a este supuesto se suspendió "aislado" blanco de semilla de lino en agua, mantuvo a 60-70° y agregó (disuelto en cloroformo) una fracción de lípidos extraídos por cloroformo a partir de una harina agotada previamente por hexano. Se procedió al calentamiento a esa temperatura por una hora y llevó a seco en rotavapor. Se obtuvo un producto oscuro en forma de escamas adheridas al balón. Resultó evidente que la presencia de lípidos polares y agua incrementaba por secado el color respecto de la presencia de agua y ésteres metílicos.

Tanto los lípidos inicialmente agregados como los recuperados del producto final pardo por extracción con cloroformo se analizaron por CGL (Figuras 1 y 2) con los resultados siguientes (% de ácidos totales) :

Lípidos polares (solubles en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , iniciales) : 14:0 (0,3), 16:0 (13,3) , 18:0 (3,4) , 18:1 (23,4) , 18:2 (21,0) , 18:3 (38,6) y rastros de 12:0 , 15:0 , 17:0 , 17:1 y 20:1.

Lípidos recuperados del producto pardo(extracción por  $\text{Cl}_3\text{CH}$ ) : 12:0 (1,2) , ? (0,3) , r-14:0? (0,3) , 14:0 (1,9) , 14:1 (0,2) , r-15:0 (0,1) , 15:1 + r-16:0? (0,5) , 16:0 (18,2) , 16:1 (4,6) , 17:0 (1,0) , 17:1 (0,5) , 18:0 (5,4) , 18:1 (24,2) , 18:2 (14,3) y 18:3 (26,9).

La comparación de estas cifras revela sensible merma en las concentraciones de 18:2 y 18:3 en los lípidos recuperados de los lípidos que sufrieron pardeo (14,3 y 26,9%



respectivamente frente a 21,0 y 38,6% en los lípidos polares inicialmente agregados en la experiencia). Ello podría explicarse por la ocurrencia de un proceso de autooxidación, posiblemente vinculado a la producción de compuestos carbonílicos intervinientes en el fenómeno de pardeo.

Finalmente se realizó otra experiencia en base al "aislado" blanco suspendido en agua, calentado a 50° por una hora y finalmente llevado a seco en rota-vapor en vacío parcial y a no más de 50°; se obtuvieron escamas adheridas al balón de color pardo claro.

En conclusión, la presencia de agua sola produce cambios de textura y de color a pardo claro; la presencia de agua y de ésteres metílicos de ácidos totales de aceite de lino provee cambio de textura y color amarillo claro y la presencia de agua y de lípidos polares conduce a cambios de textura y sensible intensificación del color. En cambio la ausencia de agua, aun en presencia de ácidos grasos autooxidables no produce cambios de color ni de textura.

Se desconoce el mecanismo que provee color por la presencia de agua en procesos de calentamiento y secado final no pudiéndose afirmar si ello está vinculado a la presencia en el "aislado" blanco de lípidos residuales no extraíbles por etanol, que por autooxidación proveerían compuestos carbonílicos iniciadores de procesos de pardeo.

El "aislado" inicial contenía 3,86 g lisina/16 g N. En las experiencias descriptas que se acompañaron al pardeo (agregado de agua más lípidos polares seguida de digestión a 50° y secado final a esa temperatura en vacío) se registraron contenidos de lisina en los productos finales de



3,71 y 3,59 g/16 g N, respectivamente. Estas cifras en ambos casos menores a los del contenido del producto original indican una leve pérdida de lisina disponible. Debe tenerse presente que el grado de pardeo que pudiese ocurrir por eliminación lenta del contenido acuoso se vería disminuido sensiblemente en las experiencias expuestas en razón de haberse reducido a un mínimo la disponibilidad de compuestos carbonílicos, de modo que la relación agrupación carbonílica/lisina era muy alejada de la que se considera óptima (agrupación carbonílica como glucosa / lisina = 3:1).

2) - Investigación sobre presencia de compuestos carbonílicos en harinas de semilla de lino - Obtención de harina de semilla de lino libre de lípidos extraíbles por hexano y por mezcla  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$

2a) - Experiencias previas

Sobre una partida de lino oleaginoso, var. Tezanos Pintos, se procedió a la molienda y agotamiento por hexano en Soxhlet.

La harina liberada del solvente al aire y en estufa de vacío a 60° respondió a los siguientes valores analíticos : agua : 12,57 ; cenizas : 6,15 ; fibra : 8,46 ; N total : 5,34 ("proteína bruta" como N x 6,25 s.s.s. 38,17%). Esta harina contenía lípidos principalmente polares que determinados por extracción con éter etílico (Soxhlet) representaron 1,64% sobre harina agotada por hexano. Operando sobre otra porción de harina agotada por hexano y según la técnica de Lyons y Lippert<sup>57</sup> se extrajeron los lípidos re-



residuales con la mezcla monofásica  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1,3:2,6:1,0 v/v) (ver Parte Experimental), obteniendo por centrifugación la fase líquida que, añadida de agua, separó una fase clorofórmica de la que por eliminación del solvente (rota-vapor) se aislaron lípidos que representaron 1,58% sobre harina original. Este valor fue muy similar al encontrado por extracción con éter etílico, así como los calculados sobre sustancia seca 1,88 y 1,96% respectivamente. Sin embargo ambos procedimientos conducen a harinas de contenidos acuosos sensiblemente distintos : 12,93% para la harina agotada por éter etílico y 19,36% para la obtenida con la mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  .

Los lípidos extraídos por hexano sobre semilla molida (aceite) y los residuales extraídos sobre la harina por éter etílico y por mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  contenían fosfolípidos en concentraciones muy distintas. Para el aceite (hexano) el contenido de fósforo total<sup>58,59</sup> fue 17,9 mg (como P)% g de aceite ; para los lípidos extraídos por éter etílico 163,9 mg (como P)% g de lípidos y para los aislados según Lyons y Lippert 1540,0 mg (como P)% g de lípidos. Estas cifras expresadas en fosfolípidos  $(N \times 25)^{60}$ , son : 0,45 ; 4,10 y 38,50 % respectivamente . En consecuencia la similitud de valores de contenido en lípidos residuales de la harina de origen (1,88 y 1,96 s.s.s.) es una mera coincidencia dado que la riqueza en fosfolípidos de los lípidos extraídos según Lyons y Lippert fue nueve veces mayor que la de los lípidos aislados con éter etílico.

Como complemento de los valores analíticos anteriores se procedió a la determinación de los contenidos en insapo-



nificable y en ácidos totales así como de los valores de índice de yodo de los insaponificables y composiciones acídicas (CGL) de los ácidos totales de los lípidos aislados por éter etílico, por la mezcla  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$  y del aceite extraído por hexano.

El Cuadro 2 resume los valores de composiciones acídicas pudiéndose deducir que las menores concentraciones en ácidos saturados se verificaron en el aceite de semilla y las mayores en los lípidos residuales extraídos por éter etílico, las mayores concentraciones en 18:3 (linolénico) se observaron en el aceite (57,5%) y las menores en los lípidos de éter etílico (32,0%). En base a las composiciones CGL se calcularon los índices de yodo de los ácidos totales con los valores siguientes : aceite : 197,9 ; lípidos residuales de éter etílico : 152,9 y lípidos residuales según Lyons y Lippert : 181,8.

La Tabla 3 resume algunas características analíticas de las fracciones de lípidos residuales en la harina destacando, además de las diferencias en el contenido de fósforo lipídico y de índice de yodo de los ácidos totales ya mencionadas , que los de éter etílico son de mayores contenidos en insaponificable (pero de menores valores de índice de yodo de estos últimos) y mayores contenidos en ácidos totales.

2b) - Obtención de harina de semilla de lino agotada por hexano y por  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  en frío y en presencia de antioxidante - Estudio de fracciones lipídicas

Las experiencias previas (2a) señalaron la existencia de lípidos polares (fundamentalmente fosfolípidos) en



una harina de semilla de lino agotada por hexano. Los valores de composición acídica de esta fracción lipídica indicaron una elevada concentración de ácido linolénico (altamente autoxidable).

La literatura menciona trabajos que atribuyen la tendencia a autoxidación de fosfolípidos en emulsiones acuosas<sup>61</sup> a dos factores principales : la composición acídica (en especial su concentración en ácidos polietilénicos) y el tipo de base nitrogenada presente en el fosfolípido (mayor autoxidabilidad en etanolaminafosfolípidos que en colinafosfolípidos). Consecuentemente se decidió, sobre una nueva partida de semilla de lino, obtener harina libre de lípidos agotada en primer lugar por hexano (fundamentalmente aceite) y luego según Lyons y Lippert, operando en ambos casos en frío (20°) y en presencia de BHT (diterbutilhidroxitolueno) en concentración de 0,004 g % ml para el hexano y de 0,002 g % ml para la mezcla  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$  (20 : 10 : 7,6 v/v). Se operó sobre 200g de semilla molida efectuando siete extracciones sucesivas con 500 ml de hexano por vez (los últimos extractos separados por centrifugación eran incoloros). Como resultado se obtuvo aproximadamente 100 g de harina libre de aceite conteniendo hexano que se suspendió en 915 ml de la mezcla  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$  mencionada , agitando periódicamente durante 24 horas y centrifugando. El insoluble (harina) se trató de igual modo por tres veces más, reuniendo los líquidos que se adicionaron de aproximadamente un l lt. de agua. Ello provocó la separación de una fase clorofórmica conteniendo los lípidos que fue decantada netamente de la fracción hidroalcohólica por centri-



fugación. La fase cloroformica fue concentrada en rota-vapor aislando un residuo lipídico oscuro y viscoso. Los líquidos hidroalcohólicos eran de color amarillo pardo y se concentraron en rota-vapor en vacío parcial a no más de 70° obteniendo un residuo pardo aparentemente amorfo, que se disolvió en la mezcla  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (144:50 v/v) llevando a volumen en matraz aforado para su ulterior análisis.

La Tabla 4 se refiere a valores de rendimiento y de diversas características fisicoquímicas de las tres fracciones de lípidos separadas de la segunda partida de semilla de lino, destacando el incremento notable en materiales insaponificables en el orden aceite < lípidos Lyons-Lippert < lípidos residuales que observaron el mayor valor de índice de yodo en el correspondiente a los lípidos residuales (134,0) y el menor en los lípidos extraídos por  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (86,4). Los contenidos en ácidos totales por saponificación de estos últimos lípidos y de los residuales fueron muy similares (59,5 y 58,1 % respectivamente) y desde ya muy inferiores a los del aceite (95%). El valor de fósforo lipídico determinado en los lípidos Lyons-Lippert (1200 mg P / 100 g) fue algo inferior pero del mismo orden observado para esos mismos lípidos en la harina de la primera partida de semilla de lino (1540,0 mg / 100 g).

Los ácidos totales del aceite y de las dos fracciones lipídicas se examinaron en sus composiciones acídicas por CGL de sus ésteres metílicos, observando los valores (% de ácidos totales que figuran en la Tabla 5 (Figuras 3, 1 y 4)).

De su observación surgen variaciones en los mismos



sentidos que los observados para el aceite y los lípidos según Lyons y Lippert de la primera partida (ver Tabla 2). La comprobación más notable se refiere a la existencia de lípidos residuales en la harina luego de los agotamientos por hexano y por mezcla  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$ , comportamiento que no ha sido registrado. Estos lípidos residuales mostraron tener ácidos de cadena corta (8:0 y 10:0) en concentraciones significativas (8,3 y 9,3%, respectivamente). El índice de yodo de los ácidos totales de esta fracción lipídica residual fue significativamente menor a los del aceite y de los lípidos Lyons- Lippert (127,4 frente a 194,1 y 164,6 respectivamente).

2c) - Fraccionamiento de lípidos extraídos por mezcla

$\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$  - Composiciones acídicas

Se llevó a cabo operando sobre esos lípidos, con los detalles que se exponen en la Parte Experimental, en placa delgada de sílica gel G en escalas analíticas y preparativa. La disponibilidad de algunos patrones y el uso de reactivos de revelación permitió separar lípidos neutros (LN), etanolaminafosfolípidos (EFL), un fosfolípido Dragendorff positivo con un corrimiento análogo a un patrón de esfingomielina, colinafosfolípidos (CFL), lisocolinafosfolípidos (LCFL) y dos probables glicolípidos (GL).

De las placas en escala preparativa y por elución de los raspados respectivos con éter etílico - cloroformo se aislaron fracciones de LN , EFL , CFL , LCFL y presuntos GL.



Desde que en cada una de estas fracciones pueden ocurrir la presencia de lípidos aldehidogénicos (fosforados o no), los eluidos de LN, EFL y CFL se saponificaron extrayendo con éter de petróleo presuntos insaponificables y recuperando en cada caso los ácidos totales libres de insaponificable. Los insaponificables deben contener los alcoholes vinílicos unidos como eteróxidos a la glicerina liberada en los procesos de saponificación, que son estables en medio alcalino. Los ácidos totales libres de insaponificable de cada fracción se transformaron en ésteres metílicos y examinaron por CGL. Los insaponificables se hirvieron a reflujo con metanol anhidro conteniendo ácido sulfúrico como catalizador, procesos que llevan a la obtención de dimetilacetales procedentes de aldehidos generados en base a los alcoholes vinílicos eterificados en los lípidos aldehidogénicos presuntivamente existentes<sup>62,63</sup>. Esos dimetilacetales también se examinaron por CGL

La Tabla 6 resume los valores de composición acídica de las fracciones de LN, CFL, EFL (operando sobre ésteres libres de dimetilacetales), de presuntos GL y de la fracción de LCFL incluyendo probables dimetilacetales (Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10). En todas las fracciones fueron componentes "mayores" el ácido palmítico (9,1 - 30,1%) y el ácido oleico (16,6 - 38,2%). El ácido linoleico fue componente "mayor" para LN y GL? observándose mayor concentración en estos últimos (27,4 y 31,4%). El ácido linoléico fue también componente "mayor" para LN y GL?, observando la mayor concentración (48,1%) para LN y concentraciones



sumamente bajas (0,3 - 1,8%) para LCFL , CFL y EFL. La complejidad de estas composiciones acídicas fue en todos los casos significativa por la presencia en bajas concentraciones de ácidos normales, ramificados e insaturados (monoetilénicos) entre  $C_{10}$  y  $C_{18}$  comprendiendo en algunos casos ácidos de número impar de átomos de carbono.

#### 2d) - Presencia de Lípidos aldehidogénicos

Según se ha expuesto y a partir de las fracciones insaponificables aisladas por saponificación de los LN , EFL y CFL se prepararon los dimetilacetales correspondientes (ver Parte Experimental), que se examinaron por CGL. En todos los casos se obtuvieron cromatogramas de gran complejidad observando alrededor de treinta picos, la mayoría de los cuales estuvieron presentes en los dimetilacetales de todas las fracciones citadas, así como en los dimetilacetales de todas las fracciones reunidas e hidrogenadas (Pd 10% / C, ciclohexano) a presión y temperatura normal. Se verificaron componentes con los siguientes tiempos de retención (medidos en cm a partir de la elución del pico solvente) :

0,31 - 0,32 ; 0,50 ; 0,63 - 0,65 ; 0,82 - 0,87 ; 1,03 - 1,07 ; 1,15 - 1,18 ; 1,50 ; 1,62 - 1,65 ; 1,90 - 1,92 ; 2,11 - 2,13 ; 2,30 ; 2,48 - 2,49 ; 2,82 ; 3,30 ; 3,40 ; 3,97 - 4,08 ; 4,50 - 4,58 ; 4,75 - 4,78 ; 5,51 - 5,54 ; 6,00 ; 6,50 ; 7,70 - 7,74 ; 8,45 - 8,65 ; 9,98 - 10,10 ; 11,10 - 11,20 ; 12,20 - 12,25 ; 13,30 ; y 14,25. Luego de hidrogenación se observaron también picos con valores de  $T_r$  : 1,28 ; 3,50 ; 5,10 ; 7,35 ; 14,40 y 15,40. (Figuras 11 , 12 , 13 y 14)



Teniendo en cuenta estos valores de  $T_r$  y según Farquhar<sup>62</sup> (quien estableció que a igual número de átomos de carbono los valores de  $T_r$  de dimetilacetales y de ésteres metílicos de ácidos ramificados saturados, son inferiores a los de los ésteres metílicos saturados normales) se ha evidenciado que en los LN, EFL y CFL los dimetilacetales corresponden a aldehídos de 8 - 10 a 20 átomos de carbono figurando algunos insaturados y casi seguramente otros ramificados.

Los fosfolípidos, como es sabido, son sustancias que están distribuidas en tejidos de seres de prácticamente todas las formas vivientes, incluyendo tejidos vegetales. Consecuentemente lo mismo puede decirse de los lípidos aldehídogenicos cuyos representantes más conocidos son fosfolípidos aldehídogenicos que se designan como "plasmalógenos" y que también se encuentran en tejidos de seres vivientes animales y vegetales<sup>64,65</sup>.

La base de procedimientos colorimétricos para la detección y valoración de "plasmalógenos" reside en la reacción coloreada (rojo violáceo) que se produce con el reactivo fucshina -  $SO_2$  y los aldehídos que en medio acuoso se liberan a partir de los "plasmalógenos"<sup>64</sup>. Normalmente la acidez del ácido sulfuroso en el reactivo es suficiente para liberar los aldehídos pero ello ocurre muy lentamente. Los compuestos finales coloreados entre el reactivo y los aldehídos son solubles en agua y también en líquidos inmiscibles con el agua tales como alcohol amílico y otros de mayor PM. De este modo es posible a los fines cuantitativos, extraer con alcohol amílico, caprílico etc. los complejos coloreados y apreciar la intensidad de color por vía fotométrica.



En el estudio de esta reacción aplicada a mezclas que comprenden fosfolípidos se demostró que bajo ciertas condiciones los lípidos o sustancias sintéticas con actividad de superficie inhibían el desarrollo de color con aldehídos grasos superiores y ello determinó largas discusiones acerca de la adopción de técnicas para fines principalmente cuantitativos, hasta que Feulgen y col.<sup>66</sup> precisaron cuidadosamente los detalles sobre reactivos, preparación y purificación así como la técnica a emplear en evaluaciones cuantitativas<sup>64</sup>.

Con carácter previo a los ensayos sobre las fracciones de supuestos dimetilacetales de LN, EFL y CFL separados por fraccionamiento preparativo en placa de sílica gel G se realizaron ensayos (ver detalles en la Parte Experimental) sobre hexanal, decanal y sobre los respectivos dimetilacetales previamente preparados. Se pudo confirmar que la acidez de ácido sulfuroso propia del reactivo liberaba lentamente a los aldehídos de los dimetilacetales, ocurriendo percepción claramente positiva en lapsos de hasta 20 minutos. El agregado de ácido clorhídrico 2N, tal como prescribe la reacción, seguido de calentamiento por 10 minutos a 55° conduce a reacciones positivas inmediatas.

En primer lugar se operó sobre el extracto bruto en la mezcla ternaria  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ , suponiendo que en la misma la concentración en "plasmalógenos" sería muy baja. Obrando sobre 0,5 mg de esos lípidos y aun liberando aldehídos por agregado de ácido clorhídrico 2N según se ha dicho, se obtuvo una reacción aparentemente negativa. Sin embargo por extracción de los productos de reacción con n-hexanol (de reacción negativa en un ensayo en blanco) seguida de separación de la



capa alcohólica ésta era de color rosado, indicando resultado positivo.

Remanentes de los eluidos de los raspados de fraccionamientos preparativos en sílica gel G, formados por CFL, EFL y LN reunidos, se disolvieron en ácido acético practicando reacciones sobre esta mezcla que contenía aproximadamente 2 mg de lípidos en 0,2 ml. Se obtuvo reacción netamente positiva, al igual que sobre un remanente de esos lípidos sometidos a hidrogenación catalítica y del que se había obtenido un cromatograma por CGL. De este modo se pudo probar que la fracción de lípidos polares extraída por  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  sobre harina agotada previamente por hexano, contenía lípidos aldehídogénicos, tal como había surgido de los exámenes por cromatografía gas-líquido.

2c) - Azúcares extraídos por mezcla  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$

Los extractos en  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (pág 54) reunidos separaron por adición de agua una capa clorofórmica de la que se aislaron los lípidos cuyo estudio se ha descrito y otra (sobrenadante) constituida por  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  que una vez separada, se concentró en rota-vapor (vacío parcial, temperatura máxima 70°), obteniendo un residuo de color amarillo pardo aparentemente amorfo que se disolvió en mezcla  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (144:50 v/v) llevando a volumen en matraz aforado. Sobre alícuotas se determinaron: el residuo por evaporación (5,36% sobre semilla), el contenido en N (0,098% sobre semilla; 0,61 expresado en "proteína bruta" % de semilla) e investigaron los azúcares presentes por proce-

sos cromatográficos (ver Parte Experimental), habiendo podido reconocer unicamente la presencia de sacarosa (la determinación de azúcares reductores en esta fracción soluble en  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  representó 0,15 % sobre semilla expresados en glucosa y la de invertibles 2,05 % sobre semilla, como sacarosa).

2f) - Investigación de azúcares y polisacáridos en harina de lino - Presencia de azúcares reductores

Las determinaciones se hicieron sobre harina obtenida a partir de la semilla de lino agotada por hexano en Soxhlet (primera partida).

Se investigó la presencia de azúcares reductores (0,21 % sobre harina, como glucosa), invertibles (3,52 % sobre harina, como sacarosa) e hidratos de carbono sacarificables (20,72 % sobre harina, como almidón).

En la identificación de azúcares por cromatografía en placa delgada se encontró glucosa, levulosa, maltosa y sacarosa (poca) como azúcares reductores e invertibles; glucosa y muy probablemente levulosa después de la inversión y glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa como constituyentes de los hidratos de carbono sacarificables (después de un proceso de hidrólisis con  $\text{ClH}$  densidad :1,125).

Como podrá observarse se ha verificado en harina de semilla de lino agotada por hexano la presencia de una baja concentración en azúcares reductores (glucosa, levulosa y maltosa), además de sacarosa como azúcar no reductor. Por el contrario y operando sobre la capa  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$



de la separación de lípidos extraídos por  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  de harina agotada por hexano, la estimación cuantitativa reveló una pequeña concentración de componentes reductores no habiendo sido posible evidenciar en esta fracción los azúcares reductores mencionados, pero si la presencia de sacarosa (no reductor). Esta aparente contradicción podría explicarse en base a la ocurrencia de una reacción de "browning no enzimático" a partir de los mencionados azúcares reductores (compuestos carbonílicos) con los EFL (que poseen un grupo amino libre primario). Este criterio (que no ha sido demostrado) se vería reforzado por haberse llevado a cabo la concentración en vacío parcial del extracto en  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ , circunstancias que harían aumentar la velocidad de reacción en el proceso Maillard en función de la temperatura y por haberse logrado una concentración acuosa crítica en determinado momento de la evaporación en rota-vapor. Además resulta llamativo el hecho de que la sacarosa (no reductor) haya sido reconocida en ambos extractos.

3) - Aislado proteico de semilla de lino agotada por hexano y por mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$

La experiencia sobre 200 g de semilla de lino agotada por hexano y por mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  en frío y en presencia de BHT condujo a la obtención de fracciones lipídicas y de una harina residual. Esta última, conteniendo mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  se suspendió en  $\text{CH}_3\text{OH}$  anhidro, centrifugó y repitió este tratamiento por dos veces más.

La harina residual se calentó a 50° en estufa de vacío hasta consistencia pulverulenta, conteniendo en esta condición 28,80% de agua. Dado este elevado valor se prosiguió el calentamiento en las mismas condiciones hasta un valor final de 10,37% de contenido acuoso. La harina así obtenida (96g) fue analizada registrándose 6,36% para cenizas (500-550°) sobre el producto tal cual y 6,90% de N sobre sustancia seca, equivalente a 43,13% de "proteína cruda". Esta harina supuestamente libre de aceite y lípidos polares se empleó para la obtención de un aislado proteico operando en las mismas condiciones<sup>48</sup> señaladas por Bertoni y Cattaneo (dispersión acuosa en medio alcalino a pH 9 -10) y precipitación a pH isoeléctrico (pH 4,0 , ver Parte Experimental).

Sorpresivamente se evidenció una disminución significativa del rendimiento en "aislado" respecto del obtenido a partir de harina agotada por hexano solamente. Este hecho, como más adelante se expone se vincula muy probablemente a desnaturalización durante la extracción con la mezcla  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$  (sumamente polar) y a un consiguiente cambio en el valor de pH isoeléctrico. El total del "aislado" floculado a pH 4,0 se fraccionó en dos partes aproximadamente iguales, una de las cuales se suspendió en etanol de 96% (como se opera en casos de "aislados" procedentes de harinas agotadas simplemente por hexano) y la proteína obtenida, secada en vacío a 45° resultó ser un polvo blanco insípido e inodoro. La otra fracción de coágulo se llevó a peso constante a 45° con aumento



gradual de vacío obteniendo un producto de color pardo. El total de "aislados" secos a 45° fue de aproximadamente 3g (3,7 % respecto de harina de partida), valor significativamente menor al que se observa en "aislados" de harinas agotadas por hexano (alrededor de 22%). Por otra parte los análisis de ambos "aislados" resultaron de tenores similares de lisina disponible (3,86 y 3,52 g lisina/16 g N para los "aislados" de harina agotada por hexano y por hexano seguida de mezcla ternaria, respectivamente).

Esta experiencia reveló que pese a los procesos de desnaturalización ocurridos y a la eliminación prácticamente exhaustiva de lípidos, el secado en vacío a 45° provoca pardeo en presencia de agua (el valor de lisina disponible del "aislado" así obtenido fue 3,36 g/16 g N). Ello hace suponer un probable pardeo no enzimático originado en los lípidos residuales (que permanecen en la harina aun después del agotamiento por hexano y mezcla ternaria, a través de compuestos carbonílicos de autoxidación). Este resultado coincide con el observado en una experiencia ya expuesta al comienzo de esta Discusión por simple mojado de una proteína de lino inicialmente blanca (por haber sido obtenida mediante tratamientos etanólicos, seguida de secado a baja temperatura). Complementariamente se recogió información respecto de las variaciones de los valores de N extraído % de N total a pH 9-10 en los ensayos sobre harina agotada por hexano y sobre esta harina posteriormente agotada por mezcla ternaria. En el primer caso

el valor de extracción fue de 62% y en el segundo de solo 27,1% con oscilaciones entre 24,5 - 33,7% para distintos valores de la relación harina/agua en el proceso de extracción (1/21 a 1/60) (valores de extracción referidos a N total expresados sobre sustancia seca). Por otra parte una serie de determinaciones practicadas sobre alícuotas del extracto obtenido a pH 9-10 a partir de harina agotada por hexano y por mezcla ternaria mostró un desplazamiento del valor de pH isoeléctrico (pH 4,0 para harina agotada por hexano) desde que no se observó un mínimo para el valor de N sobrenadante respecto de N total extraído en ensayos de precipitación entre pH 4,8 y 3,0.

En conclusión, el agotamiento lipídico de la semilla de lino por extracciones sucesivas con hexano y con mezcla ternaria  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  no impide los fenómenos de pardeo durante el secado de "aislados" proteicos en presencia de agua y en condiciones no drásticas de temperatura; tampoco provee una eliminación total de componentes lipídicos y provoca un proceso evidente de desnaturalización proteica que se traduce en una disminución significativa de los valores de solubilización de N total y de precipitación de N extraído.

La Tabla 7 informa los valores de N extraído y de N en residuo de extracción ( expresados % de harina) y % de N en harina , en experiencias de dispersión alcalina sobre harina de semilla de lino agotada por hexano y por mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  y sobre esta última adicionada sucesivamente de lípidos extraídos por esta mezcla de



solventes (capa  $\text{Cl}_3\text{CH}$ ) y de esos lípidos más una alícuota de la fracción  $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$  resultante de la dilución acuosa (ver Parte Experimental). Resulta evidente que tales agregados no corrigen la significativa pérdida de solubilización de proteínas luego del tratamiento por la mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ , por lo que se concluye que ésta ha provocado una evidente desnaturalización de aquéllas.

FUNCIONALIDAD DE AISLADOS PROTEICOS  
VALORES DE INDICE DE SOLUBILIDAD DE NITROGENO (ISN)

Con el objeto de evaluar algún parámetro vinculado a características de funcionalidad de "aislados" proteicos se recurrió en este trabajo exclusivamente a la determinación de los valores de índice de solubilidad de nitrógeno, por aplicación de la técnica del AACC Methods 46-23<sup>67</sup>.

- 1) - Aislados agotados por etanol 96% y secados a 45° en vacío - Valores de ISN en función del valor de pH y de la concentración de "aislado"

La Tabla 8 informa los valores de ISN logrados sobre un "aislado" proteico de semilla de lino, operando sobre 5, sobre 2,5 y sobre 1,5 g de "aislado" a valores de pH comprendidos entre 6,0 y 8,0.

Como se ha expuesto, el "aislado" de semilla de lino contiene alrededor de 20% de un polisacárido que indiscutiblemente se vincula a los altos valores de ISN registrados y a la elevada viscosidad observada en determinaciones de ISN, cuando se opera con 5 g en el ensayo y especialmente a pH 6,0, razón por la cual se aconseja operar sobre 1,5 a 2,5 g de "aislado" de semilla de lino.

Las Figuras 15, 16 y 17 son las representaciones gráficas de los valores de ISN operando con 1,5 ; 2,5 y 5 g. En general los valores de ISN en ensayos con 1,5 y 2,5 g de muestra señalaron un incremento del valor de ISN en función del pH, si bien tanto a pH 6,0 como a pH



8,0 las cifras fueron sumamente elevadas (93,1 - 103,1). Operando sobre 5 g se obtienen valores de ISN poco variables en función del pH (94,9 - 97,6), comportamiento que podría explicarse en razón de la elevada viscosidad observada en el ensayo a pH 6,0 que determinaría una mayor estabilidad del "aislado" en suspensión durante la etapa de centrifugación, con lo cual se obtendrían mayores valores de N sobrenadante.

Operando sobre un "aislado" de semilla de cártamo se determinaron valores de ISN en ensayos a pH 6,0 ; 7,0 y 8,0 operando sobre 5 g.

La Tabla 9 evidencia un incremento significativo de solubilidad (30,8 a 69,2), tal cual se aprecia en la Figura 18. Finalmente se realizó un tercer ensayo sobre "aislado" proteico de una mezcla de semillas cítricas (naranja, limón, mandarina y pomelo)<sup>68</sup> operando a valores de pH 6,0 ; 7,0 y 8,0 y sobre 2,5 g de "aislado" en razón de la presencia en éstos de 13,4% de un polisacárido íntimamente asociado a la fracción proteica. También en este caso se observó un significativo incremento de los valores de ISN en función del pH (13,9 a 88,0), como se puede apreciar en la Tabla 10 y en la Figura 19.

La Tabla 11 resume los valores de ISN operando a pH 7,0 en ensayos sobre 5g y en algunos casos sobre 2,5 y 5 g de caseína industrial, en coprecipitado de proteínas de lino con 40% de caseína industrial<sup>69</sup>, y de "aislados" de semilla de girasol<sup>70</sup>, de coco paraguayo (Acrocomia totai Mart)<sup>71</sup>, de zapallo<sup>72</sup>, de dos partidas de semilla de tomate<sup>73</sup>

de mezcla de variedades de cítricos, de pepas de carozo de damasco maduro sometido a calentamiento y crudo<sup>74</sup>, de semilla de lino y de mezcla de semillas de variedades de soja extraídas a pH 7,0 y 10,0.

Puede observarse, coincidentemente con lo ya expuesto, el elevado valor de ISN para el "aislado" de semilla de lino, así como el registrado para caseína industrial de buena calidad y lógicamente para el "aislado" obtenido por coprecipitación de proteínas de lino en presencia de 40% de caseína industrial. Los valores de ISN para "aislados" de semilla de cártamo, girasol y coco paraguayo fueron muy similares, oscilando entre 49,0 y 58,6. Los "aislados" de semilla de zapallo, de tomate y de pepa de damasco no sometido a cocción observaron bajos valores de ISN (29,2 a 30,4), al igual que el valor registrado para un "aislado" de semilla de soja obtenido por extracción a pH 7,0 (32,2). Un "aislado" de la misma partida de harina de soja obtenida por extracción a pH 10,0 registró un valor de ISN sensiblemente superior (49,1), al igual que el "aislado" de pepa de damasco sometido a cocción (65,1).

Los pares de determinaciones sobre los mismos "aislados" operando con 2,5 y con 5 g mostraron en dos casos (lino y cártamo) valores mayores de ISN para los ensayos con 2,5 g mientras en otros casos (zapallo y caseína) los valores fueron parejos y dentro de las diferencias esperadas en razón de la índole del método. El "aislado" procedente de harina de mezcla de semillas cítricas acusó un valor de ISN elevado (62,6) pero significativamente inferior



al observado para los "aislados" de lino, a pesar de que en ambos se probó la existencia indisoluble entre proteínas y polisacáridos, debiendo concluirse que otros factores determinan una mayor desnaturalización por acción del etanol en el caso de "aislados" de semillas cítricas.

En general los resultados de valores de ISN que figuran en la Tabla 11 son acordes con los mencionados en los distintos trabajos<sup>3,9</sup> respecto de la influencia de la concentración de "aislado" en el ensayo (en el supuesto de respetar en todos los casos el tamaño de partícula o granulometría del "aislado" en polvo, la temperatura durante el proceso de homogenización o mezclado, así como la velocidad de agitación en el mismo, la velocidad y tiempo de centrifugación y fundamentalmente el valor de pH de la dispersión). Como dato de interés se destaca que un factor previo a la determinación de los valores de ISN que parecería influir significativamente, es el valor de pH operado durante la dispersión alcalina de la harina de partida (tal es el caso ya mencionado de los valores de ISN para "aislados" de proteínas de soja operando por dispersión a pH 7,0 y 10,0 que fueron respectivamente 32,3 y 49,1). Cabría realizar un mayor número de experiencias con "aislados" de otras fuentes para juzgar con más fundamentación este particular.

En conclusión, en los procesos de obtención de "aislados" proteicos que comprenden el agotamiento por etanol de los coágulos obtenidos a pH isoeléctrico (con el objeto de obtener "aislados" blancos, inodoros e insípidos) caben distintos comportamientos en la dispersión acuosa de los

mismos según el origen de la materia prima (especie vegetal de partida, tratamientos operados en la obtención de las harinas etc.), que se traducen en características de funcionalidad distintas sin que fundamentalmente se afecte el valor nutritivo.

2) - "Aislados" no sometidos a deshidratación conteniendo materiales lipídicos

En páginas anteriores se ha hecho referencia a la obtención de "aislados" proteicos blancos como polvos finos, inodoros e insípidos por secado a 45° (vacío) luego de lavar los coágulos con agua a pH isoeléctrico y extraer lípidos y la mayor parte del agua con etanol de 96%. Se discutió la posible influencia de la presencia de lípidos y de agua (esta última en concentración crítica) en el desarrollo de procesos de pardeo durante el secado en vacío a 45°. Se pensó que de ocurrir un proceso de pardeo no enzimático, este debería inhibirse por disminución de temperatura (enfriamiento o refrigeración) durante la preservación de los coágulos integrales (conteniendo lípidos y el agua capaz de retenerse en las condiciones de precipitación y centrifugación adoptadas). Asimismo, que la eliminación de agua por deshidratación podría reemplazarse a través de procesos de congelación, que inmovilizarían el agua libre por solidificación impidiendo así procesos de pardeo al evitar interacción entre los reactantes (proteínas - compuestos carbonílicos). Este último tema (congelación) había sido tratado en los últimos años<sup>75,76,77,78</sup> preferen-



temente sobre la preservación de coágulos de "aislados" proteicos de soja. Las experiencias señalaron que en estos casos la congelación seguida de descongelación se acompaña de un cierto grado de desnaturalización de mayor magnitud para menores valores de la temperatura de congelación y estacionamiento en ese estado. Se atribuyó a la formación de enlaces -S-S- intramoleculares así como entre moléculas proteicas, la disminución de los valores de solubilidad por congelación y descongelación arguyéndose que por congelación del agua ocurre la aproximación de las moléculas de proteínas y una mayor concentración de éstas en la fase no congelada, que conduce a la formación de agrupaciones -S-S- intra e intermoleculares. Si la temperatura de congelación y estacionamiento fue tan baja como  $-20^{\circ}$  la insolubilización después de la descongelación fue menos evidente debido tal vez a que por congelación de la mayor parte del agua las moléculas de proteína se encontraban en un medio casi anhidro no pudiendo así ocurrir las reacciones mencionadas.

La Tabla 12 resume los valores de ISN para coágulos proteicos obtenidos a valores de pH isoeléctrico a partir de distintas harinas de extracción, figurando los valores de contenido acuoso de los coágulos (determinados en estufa de vacío a  $100^{\circ}$ ) para ensayos practicados inmediatamente después de la obtención de los coágulos (lavados con agua a pH isoeléctrico, ver Parte Experimental), luego de preservación por enfriamiento ( a  $8-10^{\circ}$ , en envases de vidrio herméticos por lapsos de 7 - 14 días) o por congelación



lenta en frascos de cierre hermético de 23 mm de diámetro interno, totalmente llenos (la congelación se operó a  $-15^{\circ}$  y todos los frascos al ser de las mismas dimensiones observaron también el mismo gradiente de enfriamiento durante la congelación). Teniendo en cuenta los contenidos acuosos de los coágulos y sus tenores en N total se calculó la cantidad de coágulo necesario para cada ensayo de NSI (correspondiente a  $\sim 5$ g de materia seca). Para las determinaciones sobre los ensayos por congelación se procedió a la descongelación por calentamiento de los envases cerrados a  $37^{\circ}$ , seguido de homogenización del producto, previamente a las pesadas, para determinaciones de contenido acuoso y de N (en razón de observar separación de fases líquidas en proporciones variables, según los casos).

El análisis de los valores de contenido acuoso de los coágulos a pH isoeléctrico revela que los "aislados" de semilla de lino, tomate y cítricos fueron en orden decreciente los de mayor capacidad de retención de agua (93; 80-81 y 76-78% respectivamente). Por el contrario los "aislados" de semilla de cártamo y de soja observaron los valores menores para retención acuosa (55-56 y 54-59% respectivamente). El resto ("aislados" de semilla de zapallo y de girasol) presentaron valores muy similares (66-69%) entre sí.

Aunque la columna de valores de contenido acuoso % de la Tabla 12 para los coágulos no presenta variaciones significativas en cada caso en función de los lapsos de estacionamiento a temperaturas de enfriamiento y/o congelación (en este último caso las temperaturas de congelación



y de estacionamiento en estado de congelación fueron las mismas), aparentemente la separación de fase acuosa líquida fue menos visible en los ensayos por enfriamiento que en los de congelación.

Respecto a los valores de ISN los "aislados" de semilla de lino, cítricos y girasol registraron los valores mayores ; el de lino tanto a tiempo cero como en los ensayos por refrigeración durante 7 días y por congelación durante 14 días (94-99%), el de semillas cítricas observó el valor máximo en los ensayos a tiempo cero (95%) y una discreta disminución en los ensayos por refrigeración y congelación hasta 14 días (80-85%) y en los de girasol en general, valores de hasta en 21 días (en congelación) de 88% frente a 98% a tiempo cero. Los "aislados" de semilla de zapallo, cártamo y tomate observaron significativas disminuciones de los valores de ISN en ensayos por congelación y refrigeración. De lo expuesto surge que la aplicación de los procesos de preservación de "aislados" proteicos conteniendo sus lípidos y el agua retenida a pH isoeléctrico luego de centrifugación a la velocidad elegida, son de utilidad en la preservación sin alteración del color (inhibición de procesos de "browning"), dependiendo de la materia prima de procedencia de los "aislados" el comportamiento frente a los valores de ISN y de la capacidad de retención acuosa.

Durante la experimentación y en los ensayos de preservación por enfriamiento a 8-10° en períodos de hasta 21 días se observó en algunos ensayos la proliferación de hongos,



no así en los de congelación. A este respecto se practicaron ensayos de preservación por refrigeración de un "aislado" de semilla de girasol, operando sobre un coágulo lavado a pH isoeléctrico con agua ajustada a ese valor por agregado de 1 g de ácido propiónico (agente fungicida y fungistático) puro a 500 ml de agua, seguida del agregado de NaOH hasta alcanzar aquél valor. Los valores de ISN observados en estos ensayos fueron del orden de los registrados en la Tabla 12 para refrigeración, observando a los 21 días incremento del pH y desarrollo de hongos.

Al igual que en los ensayos de ISN sobre "aislados" de soja liberados de lípidos y secados en vacío a 45°, se practicaron ensayos de ISN sobre coágulos recientes lavados con agua a pH isoeléctrico (conteniendo los lípidos asociados) pero procedentes de extracciones alcalinas a valores de pH 7,0 y 10,0. Las cifras de ISN fueron para el primer caso 85,3 y para el segundo 96,3, comportamiento en el mismo sentido que el observado para los "aislados" en polvo (32,3 y 49,1 respectivamente, ver Tabla 11).

La Tabla 13 reúne valores obtenidos para contenidos en lisina disponible de harinas de extracción, residuos agotados en los procesos de dispersión alcalina, "aislados" proteicos lavados por etanol y secos a 45°, fracción insoluble en las determinaciones de valores de ISN sobre "aislados" lavados por etanol y secos a 45°, sobre coágulos a pH isoeléctrico congelados y sobre coágulos a pH isoeléctrico sometidos a refrigeración para los casos de zapallo, cártamo, girasol, cítricos, coco paraguayo, tomate, soja y lino.



De su observación surge que son mayores los contenidos en lisina disponible de los residuos agotados por dispersión alcalina en los casos de zapallo, girasol, cítricos y tomate, similares en el caso de soja y menores para cártamo y lino respecto de los de las harinas de partida. Esta comparación se llevó a cabo por haber encontrado en literatura el precedente registrado en residuos agotados de semilla de algodón que poseía un elevado tenor de lisina respecto de las harinas de partida<sup>104</sup>.

Los "aislados" proteicos secos a 45° luego de agotamiento por etanol observaron contenidos en lisina disponible ligeramente inferiores a los de las harinas de partida en los casos de las harinas de lino, zapallo y girasol, cifras menores en mayor medida para cítricos y tomate y similares para soja. En cambio el caso de cártamo presenta para este "aislado" un valor sensiblemente mayor que los observados en la harina y residuo agotado respectivamente.

También se efectuaron las determinaciones de lisina disponible en las fracciones insolubles de las determinaciones de ISN en la mayoría de los "aislados" agotados por etanol y secos a 45° observando en éstas cifras ligeramente superiores para los casos de zapallo, cártamo, girasol, cítricos y tomate, menores en coco paraguayo y del mismo orden en soja.

Las pocas determinaciones efectuadas sobre fracciones insolubles en ensayos de ISN sobre coágulos congelados o refrigerados no mostraron comportamientos diferentes respecto de los coágulos agotados por etanol.

AISLADOS PROTEICOS DE SEMILLA DE SOJA

En el curso de las experiencias expuestas se ha hecho referencia a "aislados" proteicos de semilla de soja. Estos fueron preparados especialmente a partir de semilla de producción Nacional (cosecha 75/76) procedente de la localidad Los Cerrillos (provincia de Salta), de las variedades "Cerrillos - W 65", "Halesoy 71" y "Clark 63". En operaciones separadas (ver Parte Experimental) alrededor de 500 g de semilla entera molida de cada variedad se agotó (Soxhlet) con hexano técnico, obteniendo los aceites crudos de extracción y las harinas respectivas, que fueron estudiadas en sus valores de composición.

a) - Estudios sobre aceites crudos de soja  
Valores de rendimiento y de características  
fisicoquímicas

Los valores de contenido en aceite % de semilla seca de la Tabla 14 están comprendidos entre los registrados en la literatura (13-26) (18-22 como cifras más corrientes)<sup>79</sup> y de las cifras observadas para las variedades más cultivadas en las Repúblicas de Paraguay (18,7 -22,3)<sup>80</sup>, Colombia (20,3 - 28,9)<sup>81</sup>, Ecuador (21,2- 23,4)<sup>82</sup> y Perú (20,3-23,0)<sup>83</sup>. De los demás valores, los de índice de yodo son los de mayor interés, desde que se vinculan a los de composición acídica ( variables en función agroclimática y varietal). Las cifras halladas (130,9 ; 131,8 y 134,4) están comprendidas entre los extremos indicados por Eckey<sup>79</sup>



(117-141; con valores más frecuentes entre 127 y 138); por AOCS<sup>84</sup> (120-140 como valores extremos y 127-138 como los más corrientes); mientras la Comisión Mixta del Codex Alimentarius FAO/OMS<sup>87</sup> fija valores extremos de 120-143. Son valores elevados y parejos y difieren sensiblemente de los señalados para aceites de semilla de Paraguay (112,5-123,7)<sup>80</sup>. La razón de estas diferencias obedece principalmente a las distintas condiciones climáticas reinantes durante el periodo de maduración de frutos (biosíntesis de ácidos grasos) en las zonas agrícolas de Paraguay y de la provincia de Salta. Cabe señalar que en Paraguay se registraron valores de índice de yodo (112,5) sensiblemente inferiores a los mínimos registrados en valores extremos para diversas zonas de producción importantes del mundo (117-129).

La estabilidad frente a autooxidación, es fundamentalmente dependiente de la concentración en ácidos polietilénicos (18:2 , 18:3) y la de antioxidantes naturales presentes (tocoferoles); los valores hallados para estos últimos (69,7 ; 72,0 y 79,8 mg%g) resultaron del orden de los valores mínimos más frecuentes registrados en la literatura<sup>86,85</sup> (70-180 y 150-380 mg%g).

Cabe señalar que dos de los aceites obtenidos presentan valores de índice de saponificación inferiores a los señalados como valores mínimos de valores extremos (189-195). Un comentario especial se refiere a los elevados contenidos de insaponificable (2,59 ; 2,73 y 4,47%) superiores a los máximos de la bibliografía (2,00%)<sup>84</sup>; pro-

bablemente atribuible al empleo de distintos solventes de extracción (éter etílico en el presente trabajo) y al hecho de que la mayor parte de la información bibliográfica se refiere a aceites refinados o comerciales y no a aceites crudos.

#### Composiciones acídicas y en esteroides

Operando sobre ésteres metílicos de los ácidos totales de los aceites de las tres variedades (libres de insaponificable) se determinaron las composiciones acídicas por CGL que expresadas en % de ácidos totales acusaron los valores mencionados en la Tabla 15. La Figura 20 se refiere al cromatograma del aceite de la variedad "Halesoy 71" (el de mayor concentración en 18:3).

Los valores hallados (Tabla 15) son prácticamente acordes con los extremos propuestos por la Comisión Mixta FAO/OMS a través de su Comité de Grasas y Aceites en 1974,<sup>88</sup> excepción hecha de los valores para ácido palmítico que coinciden con el máximo de FAO/OMS en un caso y son superiores en los otros dos. Este comportamiento se verifica también en los aceites de semilla de soja del Paraguay<sup>80</sup>, Colombia<sup>81</sup>, Ecuador<sup>82</sup> y Perú<sup>83</sup>, cuyos valores extremos fueron:

16:0 (10,9-12,6 ; 10,9-13,2 ; 12,2-13,8 y 12,3-13,3),  
18:0 (3,0-3,9 ; 2,4-3,9 ; 3,4-4,6 y 2,8-3,5),  
18:1 ( 20,7-32,0 ; 19,7-28,0 ; 18,9-24,6 y 19,4-26,1),  
18:2 (47,3-59,0 ; 50,5-59,3 ; 51,4-58,4 y 51,0-59,3) y  
18:3 (4,7-6,6 ; 5,2-8,1; 5,4-7,0 y 6,2-7,1) , respectivamente.



Las composiciones acídicas de los aceites de semilla de soja aparecen como simples en razón del número de componentes acídicos (cinco) cuando se los examina por CGL de ésteres metílicos de ácidos totales. Sin embargo, el número de componentes ácidos es mucho mayor, como fue demostrado<sup>81</sup> por exámen CGL de las fracciones y residuo de destilación a presión reducida (0,5 Torr) de ésteres metílicos de ácidos totales libres de insaponificable de un aceite de soja var. Hardee de Ecuador, que condujo a los siguientes valores:

12:0 (vest), 14:0 (0,06) , 15:0 (vest) , 16:0 (11,99) ,  
17:0 (0,01), 18:0 (3,71) , 20:0 (0,30) , 21:0 (0,05),  
22:0 (0,51), 23:0 (0,05) , 24:0 (0,18) , 15:1 (0,02),  
16:1 (0,08), 17:1 (vest) , 18:1 (19,38), 20:1 (0,20),  
18:2 (56,13) y 18:3 (7,33).

La producción de soja en el país se incrementa en forma significativa año a año sin que, hasta el presente, se halla realizado un estudio sistemático de las variaciones de composición acídica en función varietal y/o agroclimática para los aceites de producción nacional, como ha ocurrido con los demás aceites de semillas oleaginosas.

Como se expone en la Parte Experimental las concentraciones de esteroides totales de estos aceites se determinaron por precipitación como digitónidos a partir de los insaponificables, registrando valores de 376 -440 mg%g de aceite. Estas cifras figuran entre los máximos (en un caso superior) registrados en la literatura<sup>85</sup> (150 - 380 mg%g).

A través de los fraccionamientos de los insaponificables en placa preparativa de sílica gel se aislaron las fracciones de esteroides, que se examinaron por CGL identificando los esteroides presentes a través de los valores de  $Tr/Tr$  colesterol previamente determinados en base a patrones (colesterol, campesterol, stigmasterol y sitosterol). En todos los casos se registraron los mismos picos: colesterol ( $Tr\ col.= 1,00$ ), campesterol ( $Tr/Tr\ col.= 1,31$ ), stigmasterol ( $Tr/Tr\ col.=1,42$ ), sitosterol ( $Tr/Tr\ col = 1,62$ ) y un pico menor con valor de  $Tr/Tr\ col= 0,80$  (desconocido).

Por computación de áreas se calcularon las concentraciones en esteroides % de esteroides totales de cada aceite, con los valores que figuran en la Tabla 16. (La Figura 21 reproduce el cromatograma de la fracción de esteroides del aceite de la var. Cerrillos W-65). El componente mayor resultó ser sitosterol (48-57%) y en orden decreciente campesterol (21-24%), stigmasterol (16-23%) y finalmente el componente desconocido  $Tr/Tr\ col\ 0,80$  (5-7%). Con excepción de este último componente, los demás ya fueron registrados en literatura para esteroides de aceite de soja (campesterol, stigmasterol y sitosterol)<sup>89</sup>.

Si bien no se lograron cifras de concentración en esteroides particulares en la literatura consultada, el valor hallado para sitosterol (48-57%) es coincidente con el registrado<sup>90</sup> para esteroides de hojas de soja (55%). La presencia de colesterol no sorprendió desde que al presente se admite que puede existir en cantidades detectables (cercanas



al 1% sobre esteroides totales) en la mayoría de los lípidos vegetales<sup>90</sup>. Se lo ha señalado a través de métodos de CGL en el aceite de palma africana (Elaeis guineensis)<sup>89</sup>, en el de semilla de palma "Caranday" (Copernicia alba) y en el de pulpa de palma "Yatay" (Butia yatay)<sup>91</sup>, en el de semilla de "Calafate" (Berberis buxifolia Lam)<sup>92</sup>, en el de aceite de salvado de arroz (10,4% sobre esteroides totales)<sup>93</sup>, en el de aceites de semilla del género "Capsicum" (9,0% sobre esteroides totales) y el de Fagra coco (1,0%)<sup>94</sup> y en de aceites de semilla de tomate (Lycopersicon esculentum)<sup>73,95,96</sup>, entre otros.

Tanto los aceites de semilla de soja como el aceite de lino dan reacción bromada de Halphen positiva (formación de compuestos de bromo adición insolubles en éter etílico anhidro, cloroformo o tetracloruro de carbono a 0°). La investigación de la presencia de aceite de semilla de lino en aceites de soja necesita el estudio de una técnica analítica.

La Figura 22 muestra el cromatograma correspondiente a la fracción esteróica de aceite de semilla de lino (lograda en forma ya señalada para el caso de los aceites de soja). Por computación de áreas se encontraron los siguientes valores porcentuales :

Campesterol (26,3) , stigmasterol (1,2) , sitosterol (60,3)  $\Delta^5$ - avenasterol (?) (9,5) y dos componentes no identificados con valores de Tr/Tr col 0,66 y 0,80 (0,7 y 2,0%, respectivamente). La comparación de estos componentes en aspectos cuali-cuantitativos con los de esteroides de aceite

de soja (Tabla 16) señala notables diferencias, como ausencia de colesterol y concentración muy inferior de stigmasterol en aceite de semilla de lino, así como la presencia en el mismo de  $\Delta^5$ -avenasterol (?) (10%~), ausente en esteroides de aceite de soja.

b) - Composición de las Harinas de Extracción de Semilla de Soja

Estos materiales residuales de la extracción con hexano del aceite de semilla se liberaron del solvente por aireación y en estufa de vacío a 40°. Una vez remolidas se analizaron determinando valores de N total (Kjeldahl), de contenido acuoso (100°, vacío) y de ISN. Se obtuvieron los siguientes valores para las variedades "Cerrillos W-65", "Clark 63" y "Halesoy 71", respectivamente :

N s.s.s.% (8,58 ; 8,09 y 7,99) , Agua % (10,04 ; 9,42 y 8,54) e ISN (75,6 ; 78,2 y 77,6).

La similitud de los valores para N total s.s.s. y de ISN sugirió mezclar partes iguales en peso de las tres harinas a los fines de la obtención de un "aislado" proteico.

Con carácter previo se llevó a cabo un análisis más completo de la harina mezcla así obtenida registrando los siguientes valores :

agua (100°, vacío).....	9,19%
cenizas (500-550°).....	5,61%
N total (Kjeldahl).....	7,36% (x)
Fibra cruda (AOAC).....	5,09%
Lisina disponible <sup>119</sup> .....	6,51 g/16 g N

(x)- 8,11% sss , equivalente a 50,7% de "proteína bruta".



Los valores de "proteína bruta" sobre sustancia seca para harinas de soja desgrasadas observadas en literatura oscilan entre 53,5 y 56,2%<sup>24,40,98,99,100</sup> cifras superiores a las encontradas en este trabajo (50,7%). Tal diferencia reside en el hecho de que las harinas industriales derivan de grano descascarado, circunstancia no observada en la harina preparada en el laboratorio. Como consecuencia el valor para fibra cruda (5,09%) resultó superior al observado en literatura para harinas desgrasadas (2,5-3,5%).

El valor de lisina disponible 6,51 g/16 g N está comprendido entre los valores mencionados para lisina total para porotos de soja (5,01 - 7,63 g lisina /16 g N , con un valor medio de 6,38)<sup>101</sup>.

c) - Obtención de un "aislado" proteico de semilla de soja

La literatura presenta valores de pH para la dispersión de proteínas de harinas desgrasadas de semilla de soja que oscilan en un amplio rango (6,6 - 9,0)<sup>102</sup>. Partiendo de la harina mezcla ya mencionada (ver Parte Experimental) se determinaron los valores de N soluble % N total en harina por dispersión en agua (relación harina/agua 1:20) ajustando con solución de NaOH a valores de pH 7,0 ; 8,0 ; 9,0 y 10,0. Por centrifugación y determinación de N en los sobrenadantes se encontraron los siguientes valores :

pH 7,0 (73,1) ; pH 8,0 (76,9) ; pH 9,0 (78,9) y pH 10,0 (79,2%), valores que configuran la curva de la Figura 23.

Teniendo en cuenta que los valores de extracción de N entre los de pH 7,0 y 10,0 no presentan una gran di-

ferencia se decidió , operando sobre 50-100 g de harina mezcla, obtener "aislados" (a valores de pH de extracción 7,0 y 10,0 considerando el pH isoeléctrico de 4,5 y purificando los precipitados separados por centrifugación mediante lavados por agua a pH isoeléctrico y con etanol, seguido de secado en vacío a 45°), para observar características generales de composición de ambos "aislados", contenidos en lisina disponible y valores de ISN. En ese sentido, se registraron los siguientes valores de rendimiento en "aislado" % de harina, pérdida de peso (100°, vacío), N % s.s.s., "proteína bruta" (N x 6,25) % s.s.s. , lisina disponible (g /16 g N) e ISN, respectivamente :

pH 7,0 : 30,7 ; 3,04 ; 15,00 ; 93,75 ; 6,71 y 32,3

pH 10,0: 33,2 ; 4,17 ; 14,92 ; 93,25 ; 6,73 y 49,1

El análisis de estas cifras muestra como lo más destacable el mayor valor de ISN para el "aislado" obtenido por dispersión a pH 10,0 no observándose diferencias en los valores de proteína cruda y de lisina disponible.

Con el fin de disponer de "aislados" de soja en cantidad suficiente para un análisis químico más exhaustivo y confirmar los valores de ISN ya señalados se procedió a la obtención de "aislados" a partir de la harina mezcla por dispersión a valores de pH 7,0 y 10,0 y a partir de 200g de harina en cada caso. Los coágulos proteicos obtenidos por centrifugación a pH isoeléctrico (4,5) se lavaron con agua a ese pH y con etanol de 96% (ver Parte Experimental). Los "aislados" se mantuvieron en estufa de vacío a 45° (5 Torr)



hasta peso constante y se obtuvieron productos en forma de polvo blanco, inodoro e insípido. De los extractos etanólicos reunidos se eliminó el etanol en rota-vapor (vacío parcial) obteniendo residuos viscosos constituidos principalmente por materiales lipídicos, determinándose rendimiento % de proteína purificada y seca y sometiéndolos a determinaciones analíticas ( número de acidez, índice de yodo, índice de saponificación, insaponificable total, ácidos totales por saponificación, índice de yodo del insaponificable y fósforo lipídico).

La Tabla 17 se refiere a los valores de rendimiento y de algunas características químicas de ambos "aislados" por extracción a valores de pH 7,0 y 10,0. Quedó confirmado el menor valor de rendimiento por extracción a pH 7,0, así como el mayor valor para ISN para el "aislado" obtenido a pH 10,0. El porcentaje de fósforo de ácido fítico respecto del fósforo total fue similar en ambos casos (46,1 a pH 7,0 y 51,6 a pH 10,0). No es corriente encontrar información acerca de cifras sobre fósforo total y fósforo de ácido fítico en "aislados" o concentrados proteicos. De las diversas determinaciones efectuadas en los laboratorios donde se realizó este trabajo de tesis surgen las siguientes cifras : fósforo de ácido fítico respecto de fósforo total en "aislados" proteicos de harinas de semilla de zapallo<sup>59</sup>, tomate<sup>73</sup> y durazno<sup>74</sup> (90-91%), en "aislados" de semilla de lino<sup>48</sup>, damasco<sup>74</sup> y girasol<sup>70</sup> (69-80%) y para los "aislados" de harinas de semilla de cártamo, ciruela<sup>68</sup> y sésamo<sup>103</sup> (45-55%), de lo que surge que para

el caso de los "aislados" de soja los valores para ácido fítico corresponden a los más bajos.

En la Tabla 17 figuran valores de contenido en lípidos residuales asociados de 0,86 y 0,94% para los "aislados" obtenidos a pH 7,0 y 10,0 respectivamente. Se trata de lípidos íntimamente ligados al "aislado", no eliminables por los tratamientos por alcohol de 96%; se los obtiene a partir de los "aislados" a través de un proceso de saponificación drástica<sup>7</sup> y están constituidos exclusivamente por material insaponificable y ácidos grasos, dadas las condiciones de aislamiento. En el "aislado" correspondiente a la extracción a pH 7,0 (0,86%) estaban formados por 0,74% de insaponificable y 0,12% de ácidos grasos, mientras que en el correspondiente a pH 10,0 (0,94%) lo estaban por 0,56% de insaponificable y 0,38% de ácidos grasos. En ambos casos los ácidos grasos libres de insaponificable se examinaron en sus composiciones acídicas por CGL de sus respectivos ésteres metílicos, obteniendo los siguientes valores (% de ácidos totales) para los lípidos de "aislados" a pH 7,0 y 10,0 respectivamente :

12:0 (0,1-0,05) , 13:0 (0,1-vest) , 14:0 (0,5-0,2) ,  
15:0 (0,1-0,05) , 16:0 (31,9-28,1) , 18:0 (3,8-2,0),  
18:1 (12,1-15,0) , 18:2 (48,5-52,0) y 18:3 (2,9-2,5),  
observando en ambos casos rastros de r-14:0, r-15:0, 15:1  
y 17:0 . Los valores de índice de yodo calculados en base  
a las composiciones acídicas fueron : pH 7,0 (106,6) ;  
pH 10,0 (114,4).



La Figura 24 reproduce el cromatograma correspondiente a los ésteres metílicos de los lípidos residuales de "aislado" proteico de soja obtenido por dispersión a pH 7,0.

La Tabla 18 resume valores de rendimiento (% de proteína purificada y seca a 45°) y de características químicas de los lípidos extraídos por etanol 96% de las proteínas precipitadas a pH isoelectrico sobre los extractivos acuosos a pH 7,0 y 10,0. Cabe destacar los elevados valores para número de acidez y los bajos tenores en ácidos totales luego de saponificación, esto último en razón principal de la presencia de fosfolípidos en concentraciones significativas como surge de los valores en fósforo lipídico (1,20 y 1,74% respectivamente).

Los ácidos totales libres de insaponificable de estos lípidos se examinaron en sus composiciones acídicas (CGL de ésteres metílicos) observando los siguientes valores % de ácidos totales para los lípidos procedentes de los "aislados" de extracciones a valores de pH 7,0 y 10,0 respectivamente:

16:0 (30,0-25,7) , 18:0 (5,1-5,4) , 18:1 (14,9-15,6) , 18:2 (47,1-50,4) , 18:3 (2,9-2,9), con rastros de 12:0, 14:0 , 17:0 y 17:1. Los valores de índice de yodo de estos ácidos calculados en base a las composiciones acídicas son : pH 7,0 (106,6) y pH 10,0 (113,2). (ver Figura 25).

Operando a valores de pH 7,0 y 10,0 se obtuvieron "aislados" bajo forma de coágulos que se lavaron solamente

con agua a pH isoeléctrico (es decir sin tratamiento por etanol 96%) ; los coágulos así obtenidos se llevaron a peso constante a 45° y en vacío obteniéndose productos de t~~o~~no pardo, cuyos contenidos en lisina disponible fueron sensiblemente menores al correspondiente a los mismos coágulos tratados por etanol 96% y secados. ( pH 7,0 : 6,06 ; pH 10,0 : 6,15 frente a 6,46 y 6,62 g lisina /16 g N respectivamente).



AISLADOS PROTEICOS DE SEMILLA DE CARTAMO

a) - Harinas de Extracción

Las experiencias que se han mencionado en esta Discusión sobre valores de ISN en función del pH operando sobre "aislado" proteico agotado por etanol y secado en vacío a 45° o sobre "aislados" con sus lípidos integrales y preservados por refrigeración, lo fueron partiendo de semilla de cártamo (Carthamus tinctorius L) de la variedad Gila procedente de la Estación Experimental Agropecuaria de Paraná (Entre Ríos). Según datos suministrados por Bertoni y Cattaneo<sup>(x)</sup>, la semilla rendía por resolución manual 46,9% de cáscara y 50,1% de pepa, fracciones que presentaron los valores de composición que figuran en la Tabla 19. Las cifras encontradas están comprendidas entre los extremos mencionados en la literatura, para semilla entera, cáscara y pepa respectivamente : aceite (22,6-47,7 ; 1,4-5,7 y 50,8-64,0) ; proteína (N x 6,25) (15,4-22,5 ; 3,1-10,0 y 23,0-35,7) ; cenizas (2,3-3,5 ; 0,9-5,1 y 2,6-4,4) y fibra cruda (11,2-35,5 ; 46,2 -65,8 y 0,9-2,8) y acordes con los correspondientes a semilla entera, cáscara y pepa de la var. Gila: aceite (38,1 ; 3,2 y 60,9) ; proteína (16,7 ; 4,3 y 24,9) ; cenizas (2,6 ; 2,0 y 3,1) y fibra (35,9 ; - y 4,1) % en base seca. Así mismo, con los de semilla entera de distintas variedades de los EEUU de Norteamérica : aceite 20-37, proteína 12-22, humedad 5-10 y cáscara 35-52<sup>79</sup> y especialmente para los de semilla de California que pro-

(x) - Comunicación privada

ducen harinas (libres de aceite) que contienen 16-24% de proteína y 30-37% de fibra cruda.

Por agotamiento por hexano se obtuvo una harina que se liberó de solvente por aireación y en estufa de vacío a 40°, que respondió a los siguientes valores de composición general : humedad (100°, vacío) 5,20 ; cenizas (500-550°) 4,51 ; N total (Kjeldahl) 4,42 ; N x 6,25 (proteína cruda) 27,62 y fibra cruda 36,20%.

b)- "Aislado" Proteico (x)

Con carácter previo se estableció que el valor máximo de dispersión del material nitrogenado de la harina ocurría en medio acuoso y a temperatura normal a pH 10,5 (77,3 % del N total ) y el mínimo a pH 3,5 (13,1%).

El pH de máxima precipitación habiendo operado a pH 10,5 resultó ser 4,5. Como ha sido expuesto el coágulo proteico de color blanco crema, lavado con agua a pH isoeléctrico y secado en vacío a 45° tomó color pardo intenso. El agotamiento previo del coágulo recién obtenido (extracción por etanol de 96%) permitió la obtención de proteínas en forma de polvo blanco inodoro e insípido.

El aislamiento en operaciones sucesivas operando sobre partidas de 200 g de harina por vez permitió obtener suficiente "aislado" proteico que analizado respondió a los siguientes valores :

Pérdida a 100° (vacío).....	3,56%
Cenizas (500-550°).....	0,18%

(x)- M.H.Bertoni y P.Cattaneo, Comunicación privada



N (Kjeldahl).....	16,47% <sup>(a)</sup>
Fósforo total(como P) <sup>9</sup> .....	0,47%
Fósforo de ácido fítico (como P)..	0,21%
Lípidos residuales <sup>7</sup> .....	0,78%

(a)- 17,10 s.s.s. y libre de cenizas.

Los extractos etanólicos resultantes de la purificación de estos "aislados" produjeron por destilación a presión reducida (rota-vapor) un material lipídico (2,27% referido a proteína seca a 45°) de las siguientes características analíticas : número de acidez (mg KOH / g) 118,8; índice de yodo (Wijs) 131,8 ; índice de saponificación 178,0 ; insaponificable 7,69% ; ácidos totales (por saponificación) 70,15% y fósforo lipídico total (como P) 0,37%.

Los ácidos totales de estos lípidos revelaron la siguiente composición acídica :

12:0 (0,3) ; 14:0 (0,3) ; 15:0 (0,1) ; 16:0 (9,2) ; 16:1(0,2)  
18:0 (2,7) ; 18:1 (10,5); 18:2 (76,4); 18:3 (0,3) y rastros de 17:0 ; 17:1 y 20:0 % de ácidos totales

Los ácidos de los lípidos residuales (luego del agotamiento por etanol)<sup>53</sup> tenían la siguiente composición acídica :

14:0 (0,2) ; 16:0 (26,3) ; 18:0 (5,1) ; 18:1 (6,9) y 18:2 (61,5), con rastros de 12:0 y 17:0 % de ácidos totales.

---

En resumen este trabajo, además de proveer información y características de nuevos "aislados" proteicos (soja, cártamo, etc.) ha tenido por finalidad principal evidenciar tanto en harinas (subproductos de partida) como en coágulos proteicos recientemente floculados a pH isoelectrico, la presencia de componentes iniciadores de procesos de pardeo no enzimático, a la postre responsables del color amarillo pardo que adquieren los "aislados" por secado en condiciones no drásticas (40 - 45°, vacío).

En base a las experiencias realizadas surgen dos grupos de compuestos directamente vinculados a los fenómenos de pardeo, a saber :

- 1) a)- Lípidos atrapados en el coágulo obtenido a pH isoelectrico, principalmente formados por glicéridos, fosfolípidos (incluso plasmalógenos), ácidos grasos libres, insaponificables y probablemente glicolípidos (extraíbles por solventes deshidratantes como el etanol).
- b)- Lípidos residuales y no extraíbles de los coágulos por acción de solventes polares (mezcla ternaria  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$ ).
- 2) - Compuestos carbonílicos preexistentes (azúcares reductores).

Los del grupo 1 podrían intervenir en los procesos de pardeo no enzimático durante el secado de coágulos, aun operando a baja temperatura (40-50°) y presión reducida,



por vías tales como :

- a) - Autoxidación, con producción de compuestos carbonílicos.
- b) - Descomposición de compuestos aldehydogénicos (fosforados o no) con producción de aldehídos.
- c) - Por parte de grupos  $-NH_2$  (etanolamina fosfolípidos) como cefalinas
- d)- Por descomposición de glicolípidos presuntamente presentes, con liberación final de azúcares reductores , principalmente galactosa.

Los del grupo 2 existen en bajas proporciones en las harinas de partida y podrían actuar directamente durante la dispersión alcalina, iniciando procesos de pardeo no enzimático.

Las experiencias han probado que el agotamiento por etanol de coágulos recientemente precipitados al valor del pH isoeléctrico, evita el pardeo por posterior secado a temperaturas de aproximadamente 40-50°.

Esta comprobación sugiere :

- a)- El etanol elimina inicialmente la mayor parte del agua y compuestos carbonílicos solubles en mezclas hidroalcohólicas o en etanol (principalmente azúcares reductores remanentes).
- b)- El etanol, al eliminar el agua libre, impide la interacción de los iniciadores de procesos de pardeo no enzimático, por falta del solvente que lo posibilita.

- c)- El etanol elimina de los coágulos la mayor parte de los lípidos englobados en los mismos, sin duda autooxidables y generadores de compuestos carbonílicos.
- d)- El etanol no agota de lípidos a los coágulos, restándo en éstos los llamados lípidos retenidos o residuales, evidenciables por saponificación drástica (KOH al 6% en etanol) y subsiguiente acidificación y extracción con éter de petróleo o hexano.

La presencia de agua en un coágulo, disminuye gradualmente durante el secado en vacío y a baja temperatura. Inicialmente la concentración acuosa es muy elevada (70-80%) y ello reduce en solución la de los compuestos iniciadores de procesos de pardeo, principalmente la de compuestos carbonílicos.

Por ello, este último ocurre hacia el final del proceso de secado, como consecuencia del aumento de concentración de esos iniciadores en solución.

Otros procesos de secado que participan en la eliminación muy rápida del agua, tampoco provocan pardeo, tal es el caso del secado por "spray".

Así mismo, la inmovilización del agua libre por congelación permite preservar los coágulos sin pardeo. Igualmente, la liofilización, que primero inmoviliza el agua libre y luego la elimina por sublimación, sin pasar por el estado líquido



La inhibición de procesos de pardeo en coágulos proteicos con 70-80% de contenido acuoso fue satisfactoria por enfriamiento a 8-10° en lapsos de hasta 15 días. No obstante cabe destacar que ese lapso quedó limitado por el desarrollo de hongos y no por pardeo. En cambio el desarrollo de hongos no ocurrió en los ensayos por congelación en períodos de hasta 20 días. Debe destacarse que en los ensayos de preservación por enfriamiento no se observó progreso de desnaturalización proteica (apreciada visualmente por la separación de fases líquidas), no así en algunos ensayos por congelación, en los que ocurrió separación de estas últimas.

PARTE III

PARTE EXPERIMENTAL



COLOR DE AISLADOS PROTEICOS1) - Obtención de "aislados" proteicos blancos

Buena parte de la experimentación de este trabajo a ocurrido en base a "aislados" proteicos obtenidos por floculación a pH isoeléctrico de extractivos alcalinos de harinas de extracción de semillas oleaginosas. Un detalle completo de la obtención de estos últimos, de la determinación de pH isoeléctrico y de la purificación de los coágulos logrados por centrifugación han sido expuestos por Bertoni y Cattaneo<sup>48</sup>. Tan solo se describe aquí la purificación de los coágulos. Ello se logró por suspensión de éstos en agua ajustada a pH isoeléctrico (relación proteína : agua, 1/22), seguido por centrifugación y repetición de este tratamiento. En el caso de "aislado" de semilla de lino se obtuvieron así coágulos de color blanco cremoso con fuerte retención acuosa. Por tres veces consecutivas y a temperatura ambiente los coágulos anteriores se disgregaron en etanol de 96% (relación proteína seca: etanol, 1:22) centrifugando después de cada añadido (2800 rpm, 15 min.) y reuniendo los líquidos alcohólicos (el primer extracto fue nítidamente amarillo y el tercero incoloro). Las proteínas así purificadas se presentaron como una masa amorfa consistente, de color blanco cremoso. Por secado en capa delgada a 45° en vacío (5 Torr) se presentaron bajo forma de polvo blanco, homogéneo, inodoro e insípido. Este procedimiento de purificación ha conducido en todos los

casos a productos de las características señaladas, excepción hecha de las proteínas de harinas de semilla de girasol (color verde claro, por presencia de ácidos clorogénicos en las harinas de partida).

2) - Ensayos de pardeamiento de un "aislado" proteico blanco de semilla de lino

En la Discusión se han reseñado distintos probables procesos de pardeo señalando los posibles componentes iniciadores de los mismos. Con carácter previo se llevaron a cabo las siguientes experiencias :

- a) - Experiencia N°1 (posible generación de compuestos carbonílicos por oxidación de ésteres metílicos de ácidos grasos de semilla de lino ). 0,5 g de "aislado" blanco obtenido según 1) se añadió de 0,01 g de ésteres metílicos de ácidos grasos totales de aceite de semilla de lino cubriendo con 50 ml de etanol 96 %. En rota-vapor se mantuvo por 2 horas con agitación a 60 - 70° y finalmente se llevó a seco a esa temperatura y en vacío. Se obtuvo un residuo en forma de polvo blanco similar al producto de partida.
- b) - Experiencia N°2 (similar a la Experiencia N°1 pero incluyendo el agregado de agua ). 0,5 g del mismo "aislado" blanco se añadió de 50 ml de agua y de 0,01g de ésteres metílicos de ácidos totales de aceite de lino disueltos en 2 ml de etanol 96 %. Se mantuvo en



rota-vapor a 60-70° por 2 horas con agitación y finalmente se llevó a seco en vacío a esa temperatura. Se obtuvieron escamas traslúcidas y ligeramente amarillas adheridas a la pared del balón.

- c) - Experiencia N°3 (posible influencia, vía autooxidación de lípidos polares). 4 g del "aislado" blanco anterior se añadió de 100 ml de agua destilada (pH 4,15; 20°), calentando por 2 horas a 60-70° por agitación en rota-vapor. La viscosidad aumentó notoriamente agregando entonces 0,04g de lípidos extraídos por  $\text{Cl}_3\text{CH}$  (cuya composición acídica había sido determinada por CGL) a partir de harina de semilla de lino previamente agotada por hexano. Se mantuvo por una hora en rota-vapor a 60-70° con agitación llevando finalmente a seco en vacío a esa temperatura. Se obtuvieron escamas oscuras adheridas al balón. Este material se llevó a peso constante a 45°, 5 Torr en estufa de vacío, obteniendo aproximadamente 3,60 g de un producto oscuro que se destinó a determinaciones de N total y lisina disponible.
- d) - Experiencia N°4 Repetición de la experiencia N°3. Sobre el producto final reducido a un polvo en mortero se extrajeron lípidos que se examinaron por CGL.
- e) - Experiencia N°5 (posible intervención en los procesos de pardeo de los lípidos residuales en el "aislado purificado). 4,00g de "aislado" blanco anterior se suspendió en 100 ml de agua y mantuvo a 50° con agita-

ción en rota-vapor durante una hora. Se eliminó el agua en vacío parcial a 50-60° y llevó a peso constante en estufa de vacío a 45°. Se obtuvo alrededor de 3,7g de escamas que una vez molidas en mortero, se presentaron como un polvo de color pardo claro que se reservó para la determinación de N total y lisina disponible.

### 3) - Investigación de Compuestos Carbonílicos

#### 3-1) Agotamiento de harina de semilla de lino por distintos solventes polares

Se partió de harina de semilla de lino (var. Tezanos Pintos) agotada por hexano técnico. 30g de la misma se agotó con éter etílico (Soxhlet) obteniendo 0,4922 g de lípidos (llevados a peso constante a 100°, 5 Torr) que representaron 1,64% sobre harina tal cual (1,88% sobre harina seca).

En operación separada 35g de harina agotada por hexano se añadieron de 320 ml de mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O} = 1,3:2,6:1,0$  v/v (Lyons-Lippert) agitando periódicamente durante 24 horas a temperatura ambiente. Se filtró (trompa) y el insoluble se lavó con 30 ml de la mezcla anterior. Los filtrados reunidos se añadieron de 85 ml de agua, agitó y dejó decantar por 24 horas. La capa inferior ( $\text{Cl}_3\text{CH}$ ) se lavó con solución acuosa diluida de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , filtró y recuperó el solvente en rota-vapor. El residuo, tomado por éter etílico (totalmente soluble) se llevó a peso constante (100°, 5 Torr)



obteniendo 0,5513 g de lípidos (1,58% sobre harina tal cual; 1,96 % sobre harina seca).

Ambas fracciones lipídicas fueron analizadas en sus características y composiciones acídicas con los resultados que figuran en la Tablas 2 y 3, comentadas en la Discusión. Fue evidente el mayor contenido acuoso de la harina resultante del agotamiento con mezcla polar ternaria (19,36% frente a 12,93 para la harina agotada por éter etílico).

3-2) Agotamiento (escala macro) de harina de semilla de lino por mezcla  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$  (Lyons-Lippert)

Operando sobre una nueva partida de semilla de lino de la misma variedad, se procedió a la molienda de 200g de la misma y a su agotamiento en frío con hexano técnico conteniendo 0,02g del antioxidante primario BHT (diterbutilhidroxitolueno). A este fin la semilla molida se cubrió con 500 ml de solvente y agitó periódicamente durante 2 horas, centrifugó y lavó el insoluble con 100 ml de hexano. Esta operación de extracción y lavado se repitió 6 veces más (el último extracto era prácticamente incoloro). De los extractos reunidos se recuperó el hexano por destilación y obtuvo el aceite crudo de extracción eliminando los últimos restos de solvente por arrastre con vapor de agua, tomando el aceite por éter etílico, lavando la solución en ampolla con agua, deshidratando con  $SO_4Na_2$ , recuperando el solvente por destilación y llevando a peso constante a 100°, 5 Torr (se obtuvieron 73,42 g de aceite crudo ; 36,71% sobre semilla tal cual).



La harina resultante del agotamiento por hexano ( $\approx 100g$ ) se suspendió en la solución ternaria  $CH_3OH:Cl_3CH:H_2O$  (20:10:7,6 v/v) ( $CH_3OH$  486 ml ;  $Cl_3CH$  243 ml ;  $H_2O$  186 ml ; total 915 ml) conteniendo BHT, se agitó periódicamente y a las 24 horas se centrifugó (20 minutos, 2800 rpm). El insoluble se lavó con 200 ml de la mezcla solvente citada, centrifugó y repitió el proceso de extracción con otros 915 ml de la mezcla ternaria. En total se realizaron 4 extracciones reuniendo todos los extractos líquidos que se adicionaron de 1120 ml de agua. Ello provocó la separación de una capa inferior ( $Cl_3CH$ ) que se decantó nítidamente por centrifugación, deshidrató con  $SO_4Na_2$  filtró y concentró en rota-vapor (vacío parcial) obteniendo 3,4569 g de un residuo lipídico (llevando a peso constante  $100^\circ$ , 5 Torr) que representó 1,73% sobre semilla tal cual ó 2,73% sobre harina agotada por hexano.

En la experiencia comentada se separó por centrifugación la capa clorofórmica (inferior) de una capa  $CH_3OH:H_2O$  (superior). Esta última se concentró en rota-vapor en vacío parcial con temperatura final de  $70^\circ$ . Se obtuvo un residuo amarillo pardo aparentemente amorfo que secado en vacío a no más de  $50^\circ$  hasta peso constante consistió de 10,728 g (5,36% sobre semilla molida original). Este producto se reservó para su análisis ulterior.

### 3-3) Lípidos residuales en harina de semilla de lino agotada por hexano y por mezcla Lyons-Lippert

En la Discusión se ha hecho mención de la existencia



de lípidos en harinas agotadas por solventes polares y no polares. 5,0637 g de la harina agotada por hexano y por mezcla ternaria se hirvió a reflujo una hora con 50 ml de solución de KOH al 6% en etanol 96%. Enfrío, acidificó con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  (1:1 v/v, placa de toque) y centrifugó por 20 minutos a 2800 rpm, lavando por centrifugación 2 veces con 15 ml de etanol por vez. Los líquidos alcohólicos reunidos adicionados de 60 ml de agua se extrajeron en ampolla 3 veces con 60 ml por vez de hexano, previamente pasado por el insoluble. Los extractos en hexano reunidos se lavaron con agua, filtraron y llevaron a seco en rota-vapor. El residuo se tomó por 30 ml de mezcla etanol:agua (2:1 v/v), alcalinizó con solución alcohólica de KOH (fenolftaleína) y extrajo el material insaponificable con éter etílico. De los líquidos hidroalcohólicos se aislaron los ácidos grasos libres de insaponificable previa acidificación con ácido  $\text{SO}_4\text{H}_2$  diluido (heliantina) por extracción con éter etílico. Se obtuvieron (luego de llevar a peso constante, 100°, 5 Torr) 0,0091 g de insaponificable (0,18% sobre harina agotada, 41,93% sobre lípidos residuales totales) y 0,0126 g de ácidos grasos (0,249% sobre harina agotada, 58,07% sobre lípidos residuales totales). El total de lípidos residuales así obtenidos fue 0,429 g (0,43% sobre harina agotada).

El total de ácidos grasos recuperados (0,0126 g) se transformó en ésteres metílicos por esterificación con 5 ml de  $\text{CH}_3\text{OH}$  anhidro conteniendo 1,5% en peso de ácido  $\text{SO}_4\text{H}_2$  como catalizador de esterificación (reflujo 2 horas),<sup>105</sup>



y los ésteres se reservaron para el estudio de su composición acídica.

Tanto sobre el aceite seminal (hexano) como sobre los lípidos aislados por la mezcla ternaria  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$  se practicaron determinaciones analíticas que figuran en la Tabla 4 y en la que se incluyen algunos valores para estos últimos lípidos y para los lípidos residuales (aislados por saponificación drástica) calculados en base a las composiciones acídicas CGL respectivas. Así mismo la Tabla 5 resume los valores de estas últimas, encontradas por CGL de los ésteres metílicos de los ácidos totales respectivos.<sup>105</sup> Las composiciones acídicas que se mencionan en este trabajo se determinaron usando un equipo Perkin-Elmer "Vapor - Fractometer", Mod. 154, equipado con detector de ionización de llama, columna de 3 metros de largo y 4,5 mm de diámetro interno, con material de relleno formado por Chromosorb G-HP (60 - 80) y adipato de etilenglicolpolímero (14% sobre relleno total), temperatura 194°, nitrógeno como fase móvil y con inyecciones de 2 a 4  $\mu$ l de solución de ésteres al 5% en éter etílico. Las composiciones se hallaron por triangulación.

3-4) Fraccionamiento en capa delgada de lípidos aislados por mezcla ternaria  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$

Los distintos componentes lipídicos que se pudieron identificar lo fueron sobre placas de vidrio recubiertas con una suspensión de sílica gel en agua (1:2 p/v) extendida en un equipo Desaga. El espesor de capa fue de 250  $\mu$



para la escala analítica; las placas se dejaron secar al aire 24 horas y luego se activaron a  $110^{\circ}$  por una hora, preservándose en desecador hasta lograr que llegaran a temperatura ambiente. Como solvente de saturación y desarrollo se utilizó:  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4 v/v) de acuerdo a lo señalado por Wagner y col.<sup>106</sup> La preparación de las placas así como otras operaciones de tipo general respondieron a lo aconsejado por Stahl<sup>107</sup>. La siembra se llevó a cabo con jeringa Hamilton de  $50\ \mu\text{l}$  de solución de lípidos aproximadamente al 0,1% en mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1 v/v). Como testigos se sembraron  $5\ \mu\text{l}$  de soluciones aproximadamente al 0,1% en ese solvente, de lecitina, esfingomielina, lisolecitina y aceite de girasol (lípidos neutros). La muestra se corrió por triplicado y el sector correspondiente al corrimiento se reveló independientemente cubriendo el resto de la placa con un vidrio.

Las soluciones de revelado fueron :

- a) - Reactivo para fosfolípidos según Dittmer y Lister<sup>108</sup>
- Solución 1 : a un litro de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  25N se agregó 40,11g de  $\text{MoO}_3$  y la mezcla se calentó a ebullición hasta disolución del óxido.
- Solución 2 : a 500 ml de la Solución 1 se agregó 1,78 g de Mo en polvo y se calentó a ebullición durante 15 minutos. La solución fría fue filtrada.
- Solución de revelado : a una mezcla de volúmenes iguales de Solución 1 y 2 se agregó 2 volúmenes de agua. Las manchas reveladas desarrollaron color azul en frío.

- b) - Reactivo de Dragendorff (para fosfolípidos conteniendo colina)

Solución 1 : se disolvieron 0,85 g de nitrato básico de bismuto en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua.

Solución 2 : se disolvieron 0,85g de IK en 20 ml de agua.

Solución de revelado : se mezclaron 5 ml de Solución 1, 5 ml de Solución 2 y 20 ml de ácido acético glacial y se completó con agua hasta 100 ml.

El color característico de las manchas fue anaranjado.

- c) -- Vapores de yodo - exposición de la placa revelada a vapores de yodo que permiten visualizar los lípidos neutros como manchas pardas . Es un reactivo de revelado totalmente inespecífico.
- d) - Reactivo para aminofosfátidos : ninhidrina al 0,2% en etanol. Luego de pulverizado y por calentamiento del sector de la placa con aire caliente las manchas correspondientes desarrollan color rojo violáceo. Visualiza los fosfolípidos que contiene grupos  $-NH_2$ .
- e) - Reactivo para azúcares  
Anisaldehído - ácido  $SO_4H_2$  : 1 ml de  $SO_4H_2$  concentrado se agregó a una solución de 0,5 ml de anisaldehído en 50 ml de ácido acético (recientemente preparada).  
Tratamiento : después de la aplicación se calienta a 100-105° hasta máximo desarrollo de color.



$\alpha$  Naftol -  $\text{SO}_4\text{H}_2$  : se hizo una mezcla de 10,5 ml de solución etanólica de naftol al 15%, 6,5 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado, 40,5 ml de etanol y 4 ml de agua. Tratamiento : después de la aplicación se calentó 3 a 6 minutos a 100°.

En escala analítica la mancha revelada más próxima a los puntos de siembra correspondió a lisocolinafosfolípidos (igual corrimiento que un patrón de lisolecitina) seguido de un componente fosfolípido con igual corrimiento que un patrón de colinafosfolípido (lecitina), un fosfolípido Dragendorff positivo con idéntico corrimiento de un patrón de esfingomielina, etanolaminafosfolípidos y lípidos neutros ( los dos últimos con corrimientos similares a etanolaminafosfolípidos de lecitina comercial y de aceite de girasol, respectivamente).

Las separaciones en escala analítica mostraron hasta 6 componentes con valores de  $R_f$  muy próximos (difícil resolución) entre las manchas correspondientes a etanolaminafosfolípidos y lípidos neutros. Dos de ellas dieron reacciones positivas o dudosas con reveladores para componentes conteniendo azúcares, una de tono violáceo con reactivo de  $\alpha$ -naftol y lila con el de anisaldehído; la otra violeta con este último reactivo y negativo con el de  $\alpha$ -naftol.

A los fines del estudio de las composiciones acídicas de algunos componentes separables en sílica gel G (escala preparativa) se corrieron sobre placas recubiertas

con espesor de  $500\mu$  40-60 mg de los lípidos extraídos por la mezcla ternaria de solventes disueltos en la mínima cantidad de  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1 v/v) en bandas de 15 cm de largo con microjeringa de  $50\mu$  l con dosificador. Lateralmente se sembraron franjas de aproximadamente 1 cm que fueron reveladas en forma independiente, cubriendo el resto de la placa con un vidrio. Una de las bandas laterales fue revelada con reactivos para fosfolípidos, otra con ninhidrina 0,2% en etanol y posterior calentamiento parcial sólo en la zona, con aire caliente. El sector central de la placa se pulverizó con solución 0,2% de 2-7 diclorofluoresceína en etanol<sup>109</sup> y se observó al UV a 254 nm. Según las coloraciones características y las posiciones relativas en los cromatogramas, se ubicaron bandas correspondientes a lípidos neutros, etanolaminafosfolípidos, colinafosfolípidos y dos probables glicolípidos. Habiéndose corrido dos placas en la forma descripta se reunieron los raspados de los lípidos mencionados, procedentes de la parte central de cada placa, delimitada por el revelado con 2-7 diclorofluoresceína, reactivo no destructivo, indicado para un análisis posterior de composición acídica por CGL de los lípidos adsorbidos. Los raspados se preservaron para su posterior estudio en atmósfera de  $\text{N}_2$  a  $-15^\circ$  y en la oscuridad hasta el momento de sus eluciones. Estas precauciones se reforzaron manteniendo hasta ese momento los lípidos adsorbidos sobre la sílica gel en razón de lo aconsejado por Slawson y Mead<sup>110</sup>, en el sentido de que el sistema sílica



gel - adsorbido, es de mayor estabilidad frente a procesos de deterioro oxidativo.

3-5) Composiciones acídicas de lípidos neutros (LN) - etanolaminafosfolípidos (EFL) y colinafosfolípidos (CFL)

Los raspados respectivos fueron eluidos con mezcla éter etílico -  $\text{Cl}_3\text{CH}$  (1:1 v/v) recuperando los lípidos (rota-vapor, vacío), que se saponificaron por reflujo durante 30 minutos con 5 ml de solución de KOH al 4% en etanol libre de aldehídos. En los casos de lípidos neutros, etanolamina y colinafosfolípidos se hicieron extracciones de presuntos insaponificables con éter de petróleo (de existir plasmalógenos o lípidos aldehidogénicos no fosforados, la saponificación engendraría insaponificables constituidos por glicerina eterificada en uno de sus hidroxilos con alcoholes  $\alpha$ - $\beta$  insaturados). Estos insaponificables se reservaron para su posterior transformación en dimetilacetales a examinar por CGL. De los líquidos alcalinos conteniendo los jabones libres de insaponificables se aislaron los ácidos totales por extracción con éter etílico previa acidificación a pH 4 (he-liantina). Los ácidos se esterificaron con  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{SO}_4\text{H}_2^{105}$  y los ésteres obtenidos se examinaron en sus composiciones acídicas por CGL con los resultados que figuran en la Tabla 6. Esta incluye las composiciones acídicas de los lípidos presuntivamente glicolípidos (GL) (1) y (2)

y de lisocolinafosfolípidos (LCFL) para los cuales no se operó la separación de insaponificable luego de las saponificaciones respectivas. Las Figuras 5 , 6 , 7 , 8 , 9 y 10 corresponden a los cromatogramas de LN , CFL , EFL , LCFL y GL, de los cuales solo los de LN , CFL y EFL responden a verdaderos ésteres metílicos, mientras que en los restantes puede haber interferencia por la presencia de presuntos dimetilacetales (en muy bajas concentraciones) en los ésteres metílicos.

Los insaponificables procedentes de la saponificación de las fracciones LN, CFL y EFL se hirvieron a reflujo con 10 ml de  $\text{CH}_3\text{OH}$  anhidro conteniendo 1,5% en peso de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado (transformación de los esteróxidos en dimetilacetales). Después de enfriar los líquidos se vertieron sobre 50 ml de solución de  $\text{CO}_3\text{K}_2$  al 3% extrayendo los dimetilacetales por éter etílico (este proceso persiguió evitar la presencia simultánea de dimetilacetales y agua en medio ácido, que habría provocado la descomposición de los dimetilacetales con la formación de los aldehídos respectivos). Por evaporación del éter se aislaron los dimetilacetales que se examinaron por CGL registrando los componentes con tiempos de retención que se mencionaron en la Discusión de la Parte Experimental. Dado el número de componentes, parte de los remanentes de estos dimetilacetales se reunieron e hidrogenaron (ciclohexano, Pd 10% /C)<sup>111</sup>, examinando por CGL esa mezcla de dimetilacetales saturados (ver Discusión de la Parte Experimental).



Las Figuras 11, 12, 13 y 14 se refieren a los cromatogramas de los dimetilacetales obtenidos a partir de los eluidos de LN , CFL, EFL y de los remanentes de éstos reunidos e hidrogenados.

### 3-6) Confirmación de la presencia de plasmalógenos

Operando sobre lípidos totales extraídos por mezcla ternaria de  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$  y sobre fracciones eluidas de las separaciones de estos lípidos en capa delgada preparativa se investigaron plasmalógenos siguiendo las indicaciones de Klenky Debuch<sup>64</sup>. Se dispuso además de hexanal y decanal y de los respectivos dimetilacetales preparados expreso (ebullición por reflujo con  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{SO}_3\text{H}_2$  y aislamiento posterior por extracción con éter de petróleo previa neutralización de la acidez con solución de  $\text{CO}_3\text{K}_2$ ).

Preparación del reactivo : Fucsina - ácido  $\text{SO}_3\text{H}_2$ .

1 g de clorhidrato de pararosanilina (Fucsina básica) se disolvió en aproximadamente 700 ml de agua a la cual se había agregado 50 ml de  $\text{ClH}$  2N y 5,0 g de  $\text{SO}_3\text{HNa}$  puro y seco. Se llevó a volúmen con agua destilada y estacionó agitando ocasionalmente hasta decoloración total. Se mantuvo en frasco de muy buen cierre para evitar pérdidas de  $\text{SO}_2$ .

Además se dispuso de ácido acético glacial p.a. y de n-hexanol, ambos previamente ensayados comprobando que daban reacción totalmente negativa.

### Ensayos previos

7 mg de hexanal se disolvieron en 10 ml de ácido acético. A 0,2 ml de esta solución se agregó 0,2 ml de ClH 2N y calentó en baño de agua por 10 minutos a 55°. Después de enfriar el tubo en agua a temperatura ambiente se agregaron 0,22 ml de solución acuosa de NaOH 2 N mezclando muy bien antes de agregar 2,0 ml de reactivo Fucsina - SO<sub>2</sub>. La reacción resultó netamente positiva (0,014 mg de hexanal en el ensayo). Un ensayo idéntico sobre 0,2 ml de solución de decanal en ácido acético glacial (0,09 mg de decanal) fue también netamente positiva (tono más violáceo que con hexanal).

Una reacción practicada sobre 0,2 ml de dimetilacetal (0,09 mg de dimetilacetal) sin agregado de ácido ClH 2N condujo a reacción positiva neta en un lapso de 20 minutos ( la liberación de decanal a partir de su dimetilacetal ocurrió por acción de la acidez provista por el SO<sub>2</sub> del reactivo). En presencia de ácido ClH 2N la reacción fue netamente positiva en forma inmediata .

### Ensayos sobre lípidos extraídos por la mezcla ternaria



Suponiendo que la concentración en plasmalógenos de estos lípidos sería muy baja se practicó una reacción sobre 0,5 mg de los mismos disueltos en 0,2 ml de ácido acético. Se procedió tal cual ha sido indicado por agregado de 0,2 ml de ClH 2 N, calentando por 10 minutos a 55° etc., obteniendo reacción aparentemente negativa.

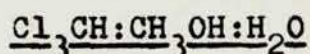


Por agregado de 1 ml de hexanol (de reacción negativa en un ensayo en blanco) seguida de agitación y decantación por reposo, se observó coloración ligeramente roja en la capa de n-hexanol (ensayo positivo).

#### Ensayos sobre dimetilacetales de CFL + EFL + LN

Los remanentes de estos supuestos dimetilacetales que se habían examinado por CGL se reunieron obteniendo alrededor de 2-3 mg de mezcla que se disolvió en 1 ml de ácido acético glacial (practicando reacciones sobre 0,2 ml de la solución así obtenida se obtuvo ensayo positivo). Igualmente y operando sobre una solución en ácido acético del remanente del exámen CGL de estos dimetilacetales hidrogenados, también se obtuvo ensayo positivo. Como conclusión surgió que esta fracción de lípidos fundamentalmente polares, extraídos de una harina de semilla de lino (previamente agotada por hexano) por mezcla  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ , contiene lípidos aldehídogenicos.

#### 3-7) Determinación de azúcares extraídos por mezcla



En la extracción de lípidos polares con mezcla ternaria según Lyons- Lippert a partir de harina previamente agotada por hexano técnico se obtuvo por dilución con agua un sistema bifásico en el que la capa líquida superior ( $CH_3OH + H_2O$ ) se llevó a seco a temperatura no mayor

de 70° (rota-vapor , vacío). Se obtuvo un residuo aparentemente amorfo totalmente soluble en  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (144:50 v/v) que se llevó a volúmen de 500 ml en un matraz aforado con dicha mezcla de solventes. Por evaporación de una alícuota de 25 ml se obtuvieron 0,5364 g de un residuo pardo por calentamiento a peso constante en vacío y a no más de 50° ( 5,36% sobre semilla). En total se dispuso de 10,7280 g de este material que se destinó a su análisis ( determinaciones de N total y azúcares reductores e invertibles), con los siguientes resultados :

N total (Kjeldahl) : 0,098% sobre semilla ( 0,61%  
como proteína "bruta")  
Azúcares reductores (Bertrand)<sup>112</sup> : 0,15% sobre se-  
milla (como glucosa)  
Azúcares invertibles (Bertrand)<sup>112</sup> : 2,05% sobre se-  
milla (como sa-  
carosa)

### 3-8) Investigación de azúcares y polisacáridos en harina de lino

#### Análisis cuantitativo en hidratos de carbono

Azúcares reductores : Aproximadamente 30 g de harina se pesaron en un erlenmeyer, neutralizando por agregado de 1g de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  ; se agregaron 125 ml de etanol 50% (v/v) y se mantuvo en baño de agua (1 hora a 83-87°) empleando un pequeño embudo en el cuello del erlenmeyer como condensador.



Una vez frío se estacionó por una noche, diluyó a 250 ml con etanol 95% (neutralizado a la fenolftaleína), centrifugó 15 minutos a 2800 rpm, lavó por 2 veces el residuo con 50 ml de etanol neutro y reunió los líquidos de lavado al sobrenadante original. El líquido se concentró en rota-vapor (45°, vacío parcial) hasta un volumen de aproximadamente 30 ml (eliminación del etanol) y se agregó 50 ml de agua. Se transfirió a un tubo de centrifuga en donde se procedió a la defecación por agregado de solución de acetato neutro de Pb (c.a. 2 ml) y agitó por 15 minutos observando la formación de un precipitado flocculento. El exceso de Pb se eliminó por agregado de solución saturada de oxalato de K seguida por centrifugación (20 -25 minutos a 2500 rpm). Finalmente se llevó a volumen en matraz aforado (250 ml) (A.O.A.C. Official Method 22.043, 1965) (modificado).

Los azúcares reductores se determinaron volumétricamente por el método de Bertrand<sup>112</sup> a partir de una alícuota de 100 ml ( 0,21% sobre harina, como glucosa).

Azúcares invertibles: (A.O.A.C. Official Method 29.026, 1965)

A una alícuota de 10 ml de la solución obtenida para la determinación de azúcares reductores, se agregó 1,25 ml  $\text{ClH} \text{ } \int = 1,10$  y calentó en baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Se neutralizó la solución con NaOH 10% (tornasol). Los azúcares invertibles se determinaron por el método de Bertrand<sup>112</sup> (3,52% sobre harina, como sacarosa).

Hidratos de Carbono Sacarificables<sup>113</sup>: Se partió de aproximadamente 10 g de harina (neutralizando con 1 g de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ ), suspendió en 125 ml de etanol 50% y mantuvo en baño de agua 1 hora; luego se decantó el líquido, se lavó el residuo con etanol neutro y se secó en estufa de vacío a 50°. El residuo seco se trató con 671 ml de agua más 67,1 ml de ácido  $\text{ClH}$   $\mathcal{S}=1,125$  y calentó a reflujo por 2 horas. Luego se filtró y se llevó a volumen final de 1000 ml. A partir de esta solución se tomó una alícuota de 25 ml determinando los hidratos de carbono sacarificables por el método citado anteriormente (20,72% sobre harina, como almidón).

#### Identificación de Hidratos de Carbono

Se operó sobre las soluciones preparadas para las determinaciones de azúcares reductores y de azúcares invertibles y directamente sobre el residuo remanente de la extracción etanólica de azúcares se realizó la sacarificación ( $\text{ClH}$   $\mathcal{S} = 1,125$ ) para obtener la solución de los hidrolizados de los hidratos de carbono sacarificables. En todos los casos se procedió a la purificación de las soluciones para su posterior análisis cromatográfico.

Purificación : una vez obtenidas las soluciones problema se las concentró en rotavapor (45°, vacío parcial) hasta unos 20 ml. Cada solución se pasó por columnas de intercambio iónico (para eliminar interferencias debidas a las sales). Las resinas utilizadas fueron : De Acidite FF



aniónica y Amberlite IR-120 catiónica previamente activadas. Se sembró la columna con la muestra problema y se eluyó con agua destilada, recogándose los primeros 500 ml (goteo lento); las columnas se lavaron con 2-3 litros de agua destilada para eliminar los azúcares retenidos mecánicamente por las resinas. Los primeros 500 ml recogidos se evaporaron en rota-vapor (40°, vacío parcial) con pequeños agregados de etanol para ayudar la evaporación hasta sequedad. El residuo se tomó con etanol para la siembra cromatográfica.

#### Identificación cromatográfica de hidratos de carbono

Se prepararon placas de 20 x 20 cm con aplicador Desaga 250  $\mu$  de espesor, según la técnica de Lewis y Smith<sup>107</sup>.

Se sembraron 2-3 gotas de patrones (10 mg/ml) cada 2 cm con capilar de vidrio y para las muestras las siembras variaron entre 3-16 gotas según la concentración de azúcares presentes.

Para la identificación de glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa y maltosa se prepararon placas del espesor indicado con 20g de Kielserghur G con 40 ml de buffer fosfato de pH 5,0 (para 5 placas), dejándolas secar al aire durante una noche. El solvente de desarrollo fue : n-butanol + acetona + buffer fosfato de pH 5,0 (40:50:10 v/v) y se reveló con ácido ftálico + anilina,<sup>114</sup> obteniéndose color rojo ciruela para las pentosas y marrón para las hexosas.

Para la identificación de sacarosa, las muestras se sembraron en placas de sílica gel G (30 g de sílica gel en 60 ml de solución de acetato de sodio 0,02 M para 5 placas). Estas placas se activaron por 30 minutos a 110° antes de su uso. El solvente de desarrollo fue: acetona + cloroformo + agua + metanol (75:10:5:10 v/v) y el revelador anilina + difenilamina +  $\text{PO}_4\text{H}_3$ <sup>115,116,117</sup> dando sacarosa una mancha característica de color gris.

La fructosa se identificó en cromatografía en papel descendente, usando la misma concentración de siembra que en la placa tanto para el patrón como para las distintas muestras. Se corrió durante 20 horas en forma descendente, con una mezcla de butanol + etanol + agua (10:4:4 v/v)<sup>118</sup> y el papel, una vez seco se reveló con resorcina + butanol + ClH 0,25N (reactivo de grupo ceto), dando la fructosa una mancha rosada. Los resultados de este análisis cualitativo fueron considerados en la Discusión.

Con técnicas similares se procedió a la identificación de presuntos azúcares reductores e invertibles presentes en la capa  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  resultante de la dilución del extracto en la mezcla ternaria  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  operado para la extracción de lípidos polares. Como ha sido expuesto en la Discusión de la Parte Experimental no pudo reconocerse ningún azúcar reductor y solamente sacarosa entre los invertibles. Este comportamiento ha sido comentado en la Discusión mencionada.



4) - "Aislado" proteico de semilla de lino agotada por hexano y por mezcla  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$

Según se ha expuesto en la Discusión, la harina resultante del agotamiento por hexano y por mezcla ternaria  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$  (ambos conteniendo BHT como antioxidante) se suspendió en 300 ml de  $CH_3OH$  anhidro, centrifugó y repitió el tratamiento por 2 veces más empleando 200 ml de  $CH_3OH$  por vez. La harina resultante se calentó en estufa de vacío a  $50^\circ$  hasta consistencia pulverulenta (28,8% de pérdida de peso a  $100^\circ$ ) prosiguiendo entoces el calentamiento en vacío a  $50^\circ$  hasta observar pérdida de peso a  $100^\circ$  y en vacío de 10,4%. Se obtuvo un total de 96 g de harina que contenía 6,36% de cenizas (500 -550°) y 6,90% de N total (Kjeldahl) referido a sustancia seca, equivalente este último a 43,13% de "proteína cruda".

Sobre esta harina se procedió a la obtención de un "aislado" proteico. A tal fin 80 g se adicionaron de 1680 ml de agua destilada (relación 1:21) y agitó por una hora a temperatura ambiente manteniendo el valor de pH entre 9 y 10 por agregado de NaOH 5N. Al cabo, se centrifugó (30 minutos, 2800 rpm) obteniendo un residuo y un líquido decantado (líquido I). El residuo se adicionó de 400 ml de agua destilada (pH 9 -10) y centrifugó (20 minutos, 2800 rpm), obteniendo un nuevo residuo insoluble y un líquido decantado (líquido II). El residuo se sometió a una nueva extracción con 915 ml de agua

destilada ajustada a pH 9-10 con NaOH 5N. La extracción se prolongó por agitación mecánica durante 45 minutos, separando por centrifugación un residuo que se desechó y un líquido decantado (líquido III). Los líquidos decantados I, II y III se reunieron y llevaron a pH 4,0 con agitación mecánica (pH isoeléctrico) después de lo cual se separó el precipitado por centrifugación (30 minutos, 2800 rpm). El precipitado se trató 2 veces con agua destilada ajustada a pH 4,0 operando por centrifugación para obtener un insoluble final que se dividió en 2 partes aproximadamente iguales en peso. Una de ellas se sometió a la purificación por suspensión en etanol (4 tratamientos con etanol 96% en la relación 1:22 y un lavado final con éter etílico). Después de centrifugar el precipitado se llevó a peso constante en estufa de vacío a 45°, obteniendo un polvo fino blanco y muy adherente (1,36 g de "aislado").

La otra fracción de coágulo contenía 97,7% de agua y se mantuvo en desecador y finalmente llevó a peso constante en estufa de vacío a 45°, obteniendo 1,23 g de un producto de color pardo. Aproximadamente el total de "aislado" seco a 45° fue de 2,64 g, cifra significativamente baja si se la compara con la que se obtiene partiendo de harina agotadas solamente por hexano ( $\sim$  22%)

Con el objeto de esclarecer si el bajo rendimiento en "aislado" seco a 45° se debía a un bajo valor de extracción de N a pH 9-10 o a un bajo valor de insolubilización a pH 4,0 se practicaron ensayos para determi-



nar los valores de N extraído a pH 9-10 con distintos valores de relaciones harina : agua. Operando sobre 5 g de harina agotada por hexano y por mezcla ternaria y con agua ajustada a pH 9-10 (cubriendo el ámbito de relaciones harina : agua 1:21 a 1:60), se obtuvieron valores de N extraído % N en harina que oscilaron entre 24,5 y 33,7 %. Estas cifras son sumamente bajas respecto de las observadas sobre harina de lino extraída solamente por hexano ( $\sim$  69%)

A fin de establecer si la ausencia de sustancias en la harina agotada por hexano y por mezcla ternaria modificaba la extracción de material nitrogenado, se realizaron ensayos añadiendo a la harina así obtenida los distintos productos extraídos por la mezcla de solventes. Para ello se realizaron 3 ensayos :

Ensayo N°1 : A 5,06 g de harina agotada por hexano y por mezcla ternaria  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$  se agregó 0,1535 g de lípidos extraíbles por la mezcla mencionada, disueltos en  $Cl_3CH$ . Luego se cubrió toda la harina con  $Cl_3CH$  y se agitó en rota-vapor por 30 minutos a  $40-42^\circ$ . Finalmente se destiló el solvente a  $40^\circ$  en vacío. La extracción de esta harina se realizó en la forma habitual (relación harina: agua, 1:21) obteniéndose un valor de N extraído % N en harina de 27,6.

Ensayo N°2 : A 5,02 g de harina agotada por hexano y por mezcla ternaria  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ , se agregó 25 ml correspondientes a la capa  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (corresponden a 0,48 g del extracto). Se agitó en rotavapor 30-45 minutos a  $40^\circ$ , destilando el solvente a esa temperatura y en vacío. La extracción de esta harina se realizó en la forma descripta anteriormente obteniéndose un valor de N extraído % N en harina de 20,7.

Ensayo N°3 : A 5,06 g de harina agotada por hexano y por mezcla ternaria  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  se añadió 25 ml correspondientes a la capa  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  más 0,1496 g de lípidos polares disueltos en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ . Se agitó 30 minutos a  $45^\circ$  en rota-vapor y se destiló el solvente en vacío a esa temperatura. La extracción de este producto se realizó en la forma habitual, logrando un valor de N extraído % N en harina de 28,8.

Como se expone en la Discusión de la Parte Experimental, estos valores sugieren un proceso de desnaturalización causado por el tratamiento de la harina con la mezcla ternaria, puesto que el agregado de lípidos extraídos por la mezcla de solventes y de la fracción  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  no mejora la extracción de proteína.

Por último y teniendo en cuenta que la precipitación de los "aislados" se operó a pH 4,0 (valor de pH



isoelectrico determinado para el caso de "aislados" a partir de harinas agotadas solamente por hexano), se procedió a la determinación de N sobrenadante por acidificación de extractivos logrados a pH 9-10 sobre harina agotada por hexano y por mezcla ternaria (cubriendo el rango de pH 4,8 - 3,0) ; sin observar un valor mínimo (este comportamiento ha sido comentado en la Discusión).

FUNCIONALIDAD DE AISLADOS PROTEICOS  
DETERMINACIONES DE VALORES DE ISN

1) - Técnica de determinación

Todos los valores de índice de solubilidad de nitrógeno (ISN) se lograron por aplicación de la técnica del AACC<sup>67</sup>, dejando constancia de haber ajustado en cada caso el valor de pH al deseado. En resumen la técnica se describe así :

5 g de "aislado", previamente tamizado a través de una malla 149 ASTM (equivalente a 100 mallas) se pesaron en un vaso de 400 ml. Se midieron 200 ml de agua destilada (a 30°), de los cuales 150 ml se agregaron en pequeñas porciones a la vez dispersando el material con una varilla de vidrio (utilizando la última porción para lavar esta última). Se llevó al pH requerido en el ensayo con NaOH y agitó 120 minutos a 120 rpm a 30° con un agitador de vidrio cuyo diámetro de paleta fue de 50 mm. El pH se controló hasta estabilización utilizando los 50 ml de agua restantes para enjuagar el electrodo en cada determinación. Al cabo de las 2 horas se transfirió a un matraz aforado de 250 ml, llevando a volúmen con agua destilada, se agregaron 1-2 gotas de antiespumante ( alcohol octílico) enrasó y homogenizó. Se esperó unos minutos y decantó 40 ml en tubos de centrifuga de 50 ml, centrifugó 10 minutos a 1500 rpm y decantó el sobrenadante a través de un embudo con lana de vidrio para evitar el pasaje de sólidos. El filtrado se recogió en un



vaso y se tomaron alícuotas por triplicado para determinar N (Kjeldahl). Con los valores obtenidos y teniendo en cuenta el N total del material de partida se calcularon los valores de ISN (% de N total solubilizado).

Otra modificación surgió en determinaciones con algunos "aislados" (lino, cítricos) que en razón de consistir de asociaciones indisolubles proteína - polisacáridos provocaban una elevada viscosidad del medio líquido empleando 5 g en las determinaciones. Ello llevó a efectuar las evaluaciones con 1,5 ó 2,5 g según los casos. Así mismo y en los ensayos de evaluación de ISN practicados sobre coágulos recientes no sometidos a deshidratación o en aquellos procedentes de ensayos de preservación por enfriamiento o congelación se operó sobre cantidades de coágulos que contuviesen cantidades de materia seca próxima a 5,0 ó 2,5 g, según los casos. Estos últimos tipos de muestras requirieron una correcta homogenización (previa a las pesadas) tanto para las determinaciones de ISN como de contenido en N total (Kjeldahl).

2) - Experiencias sobre "aislados" purificados por etanol 96° y secados a 45° en vacío

Con la técnica descripta en 1) se practicaron determinaciones de ISN sobre un "aislado" de semilla de lino operando sobre 1,5 ; 2,5 y 5,0 g y cubriendo en rango de pH 6,0-8,0. Así mismo un estudio similar se realizó sobre un "aislado" de semilla de cártamo operando sobre 5 g y

otro sobre "aislado" de mezcla de semillas de frutos cítricos, operando sobre 2,5 g. Los resultados obtenidos en estos ensayos figuran en las Tablas 8, 9 y 10 y en las Figuras 15, 16, 17, 18 y 19.

Así mismo (ver Tabla 11) y operando a pH 7,0 se hicieron determinaciones de los valores de ISN para "aislados" operando sobre 2,5 y 5,0 g (según los casos) sobre caseína industrial y sobre "aislados" obtenidos por coprecipitación de proteína de lino con 40% de caseína industrial, al igual que sobre "aislados" de semilla de girasol, coco paraguayo, de semilla de zapallo, de tomate, de mezcla de semillas de frutos cítricos y de proteínas de pepas de carozos de damasco (procedentes de frutos sometidos o no a calentamiento), sobre "aislados" de semilla de lino y de mezclas de variedades de soja (estas últimas por precipitación a pH isoeléctrico de extractivos logrados a pH 7,0 y 10,0).

3) - Experiencias sobre "aislados" no sometidos a deshidratación, conteniendo materiales lipídicos

Operando sobre "aislados" obtenidos por precipitación a pH isoeléctrico sometidos exclusivamente a suspensión en agua ajustada a ese valor de pH seguida de centrifugación, se lograron los valores de ISN que figuran en la Tabla 12. Comprenden "aislados" de semilla de zapallo, tomate, cártamo, girasol, de mezcla de semillas de frutos cítricos y de mezcla de semillas de variedades de soja ;



las cifras se refieren a valores de ISN a tiempo cero (coágulos recién obtenidos) o de los mismos preservados por refrigeración (8-10°) o por congelación lenta (-15°) en lapsos de hasta 21 días. En estos últimos casos los "aislados" se sometieron a enfriamiento o congelación dentro de frascos de vidrio de 23 mm de diámetro interno totalmente llenos y con cierre hermético (tapón esmerilado y parafina). Los resultados de todas estas experiencias han sido expuestas y analizadas en la Discusión de la Parte Experimental.

#### 4) - Valores de contenido en Lisina Disponible

Operando sobre harinas de extracción de partida, residuos agotados en los procesos de extracción alcalina (previamente lavados por etanol y llevados a peso constante a 45°, vacío), sobre los "aislados" precipitados a valores de pH isoeléctrico y purificados por lavado con agua ajustada a ese pH, con etanol 96% y llevados a peso constante a 45° en vacío y sobre las fracciones no dispersables de las determinaciones de ISN sobre "aislados" purificados y sobre "aislados" (coágulos) preservados por refrigeración o congelación, se determinaron los valores de lisina disponible por estricta aplicación de la técnica de Conker-ton y Frampton<sup>119</sup>. Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 13 comentada en la Discusión de la Parte Experimental.

## AISLADOS PROTEICOS DE SEMILLA DE SOJA

Como se expuso en la Discusión, se dispuso de partidas de semilla de soja (var. "Cerrillos W 65", "Halesoy 71" y "Clark 63") correspondientes a la cosecha 1975/76, de la localidad Los Cerrillos, provincia de Salta. Esas partidas se destinarían a la obtención y estudio de "aislados" según el método tradicional de dispersión alcalina.

### 1) - Aceites crudos de extracción

Obligadamente se debieron obtener harinas de extracción (agotamiento por hexano técnico en Soxhlet, previa molienda). De los extractos en hexano por recuperación del solvente (destilación) en baño de agua hirviente y arrastre con vapor de agua, disolución en éter etílico, lavado en ampolla con solución de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  a semisaturación, deshidratación con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro, recuperación del solvente y calentamiento en estufa de vacío ( $100^\circ$ , 5 Torr) se obtuvieron los aceites crudos que se preservaron en ampollas de vidrio prácticamente llenas a  $-15^\circ$ , hasta su estudio.

La Tabla 14 resume los valores de algunas características de la semilla : peso/Hl, peso medio del grano y humedad del grano, los de rendimiento en aceite sobre semilla tal cual y seca y los de algunas características fisicoquímicas y contenidos en componentes menores. Estos últimos se practicaron con las siguientes técnicas :



Densidad relativa 25/4° (picnómetro) ; Índice de refracción a 25° (AOCS Official Method Cc 7-25) ; Número de acidez (I.U.P.A.C. 11 D 1., sobre 0,5 g de aceite) ; Índice de saponificación (AOCS Official Method Da 15-48); Índice de yodo (Wijs) ; Insaponificable total (AOCS Ca 6b- 53) (adaptado a los líquidos residuales de la determinación de índices de saponificación) ; Índice de Yodo del Insaponificable (Rosemund) ; Esteroles totales (digitonina)<sup>120</sup> y Tocoferoles totales ( $\alpha$ - $\alpha$  dipiridilo)<sup>121</sup>.

Las composiciones acídicas se determinaron por CGL operando sobre los ésteres metílicos preparados en base a los ácidos totales libres de insaponificables recuperados de los líquidos de valoración de los índices de saponificación respectivos. Las esterificaciones se lograron por reflujo con metanol anhidro conteniendo 1,5% en peso de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado<sup>105</sup>. Se empleó el equipo, columna, fase fija y técnica de CGL ya expuestos. Los distintos componentes se identificaron según valores de tiempos de retención y los de composición acídica porcentuales por estimación de áreas. Los resultados cuantitativos habían sido previamente controlados por examen CGL de mezclas de ácidos de composición conocida, por determinación de las concentraciones de ácido linolénico y linoleico en UV previa isomerización alcalina y por cálculo de los valores de índices de yodo de los ésteres en base a las composiciones CGL encontradas, que resultaron coincidentes con los valores determinados experimentalmente.



La Tabla 15 resume las composiciones acídicas así encontradas. Además de evaluar las cantidades en esteroides totales se efectuaron exámenes de composición en esteroides particulares. A tal fin se procedió al fraccionamiento de insaponificables en placas de sílica gel G<sup>89</sup>, aislando por elución con éter etílico los esteroides del raspado de la banda respectiva y efectuando el examen CGL utilizando un equipo Aerograph Gas Chromatograph modelo 204, equipado con detector de ionización de llama, columna de vidrio Pyrex de 2 metros de largo y 3 mm de diámetro interior, relleno constituido por Chromosorb G-HP (silanizado, granulometría 80-100) conteniendo 2% de fase fija (polaridad media) OV - 17, temperatura de horno 260°, temperatura de inyector y detector 315°, N como fase móvil (presión de entrada 75-80, escala empírica), atenuación x 12,8 y con inyecciones de 10  $\mu$ l de esteroides en solución al 5% en cloroformo puro.

Las identificaciones de los distintos picos de esteroides, así como las evaluaciones cuantitativas se llevaron a cabo según lo expuesto en la Discusión. La Figura 21 muestra el cromatograma de la fracción de esteroides del aceite variedad "Cerrillos W 65" y la Tabla 16 las composiciones en esteroides de los 3 aceites considerados.

Paralelamente se obtuvo la composición en esteroides (por la misma técnica) del aceite de lino obtenido en este trabajo (agotamiento de semilla de lino var. Tezanos Pintos). El cromatograma respectivo se observa en la Figura



ra 22 y los valores de composición esterófica en la Discusión.

2) - Composición de harinas de extracción y obtención de "aislado" proteico.

Las harinas de extracción correspondientes a las semillas de las 3 variedades de soja liberados de solvente, se analizaron según métodos expuestos en la Discusión. La similitud de valores aconsejó la mezcla íntima de estas harinas, un nuevo análisis de la misma y su utilización en la obtención de 2 "aislados" proteicos a distintos valores de pH de extracción.

2-1) - Curva de extracción de N en función del pH

La curva de extracción de material nitrogenado a partir de la harina mezcla se realizó a valores de pH : 7,0 ; 8,0 ; 9,0 y 10,0.

En balón de 3 bocas provisto de agitador, se colocaron 5 g de harina de soja, que se suspendieron en 100 ml de agua (relación harina/agua 1:20) ajustada al valor de pH requerido en el ensayo . Se agitó la mezcla mecánicamente durante una hora a 30°, manteniendo el valor de pH establecido por agregado de solución de NaOH. El conjunto se trasvasó a tubos de centrifuga y centrifugó por 30 minutos a 2800 rpm. El líquido sobrenadante se trasvasó a un matraz aforado filtrando a través de tela metálica de acero inoxidable ( 200 mallas/cm) . El residuo

se lavó por agitación con 25 ml de agua (relación 1:5) previamente llevada a ese pH, centrifugó nuevamente (20 minutos, 2800 rpm) y el líquido decantado pasado por embudo con malla se reunió al anterior. El residuo se pasó nuevamente al balón de extracción donde se procedió a una segunda extracción en las mismas condiciones (30°, 1 hora, agitación permanente, pH establecido) siendo la relación harina/agua de 1:10, centrifugando al final del período de extracción. Los líquidos sobrenadantes decantados procedentes de las 2 extracciones y lavados reunidos, se llevaron a volumen con agua destilada (500 ml) y sobre alícuotas por triplicado se determinó el N total extraído.

Los resultados obtenidos que configuran la curva de la Figura 23 se consideran en la Discusión.

#### 2-2) - "Aislados" proteicos a valores de pH 7,0 y 10,0

Teniendo en cuenta los valores de extracción de N obtenidos, se decidió preparar "aislados" a valores de pH extracción 7,0 y 10,0 considerando el pH isoelectrico a 4,5 a raíz de los trabajos observados en la literatura.

A tal fin se procedió a realizar una macroextracción (con cada valor de pH de extracción) para obtener suficiente cantidad de "aislado" para su análisis posterior. (previamente se efectuaron operaciones en escala menor, ver Discusión).

Se partió de 200 g de harina mezcla operando se-



gún la técnica descripta para la extracción. El líquido de extracción se ajustó a pH 4,5 (elegido como de máxima precipitación) separando el coágulo de proteínas por centrifugación (30 minutos a 2800 rpm). Después decantar el líquido sobrenadante el precipitado se lavó 2 veces (con agitación) con 500 ml de agua destilada cada vez, previamente ajustada a pH 4,5 y centrifugando al final de cada lavado (20 minutos a 2800 rpm). El "aislado" así lavado se purificó (3 lavados etanólicos, 500 ml de etanol 96% en cada lavado) por agitación y desmenuzando a fondo los grumos en una licuadora. Los extractos etanólicos se separaron por centrifugación (8 minutos a 2800 rpm) y juntaron para su análisis posterior. El "aislado" así obtenido se secó en estufa de vacío a 45°, obteniéndose un polvo blanco, inodoro e insípido.

En la extracción a pH 7,0 se obtuvieron 55,0 g de "aislado" (27,5%) y 67,8 en la operada a pH 10,0 (33,9%).

Sobre ambos "aislados" y además de los valores de rendimiento se efectuaron determinaciones de :  
Pérdida de peso (100°, 5 Torr), Cenizas (500-550°),  
N total (Kjeldahl), Lisina disponible<sup>119</sup>, P total<sup>58,59</sup>,  
P de ácido fólico<sup>122</sup>, lípidos residuales asociados<sup>53</sup>  
 e ISN<sup>67</sup>, con los resultados que figuran en la Tabla 17  
 y que fueron comentados en la Discusión de la Parte Experimental.

2-3) - Estudio de los lípidos extraídos por etanol en el proceso de purificación de los "aislados"

Los líquidos etanólicos procedentes de la purificación de cada "aislado" (pH 7,0 y pH 10,0) proteico obtenido (correspondientes a 55,0 g y 67,8 g de proteína seca a 45° respectivamente) se concentraron a un volumen de 100 ml (rota-vapor 60°, vacío parcial), transfiriendo el concentrado a una ampolla de decantación donde se extrajo exhaustivamente con éter etílico. Los extractos etéreos reunidos se trataron en ampolla con solución acuosa de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  a media saturación y de la capa etérea tratada con  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro se destiló el éter en baño de agua hirviente y llevó a peso constante el residuo en estufa de vacío (100°, 5 Torr). Se obtuvieron (a pH 7,0) 1,5724 g y (a pH 10,0) 2,3171 g, equivalentes a 2,86 y 3,42% respectivamente, sobre proteína final.

Sobre estos materiales se determinaron los valores de índices de saponificación, índices de yodo (Wijs), números de acidez, insaponificable total % (éter etílico), índices de yodo de los insaponificables (Rosemund), ácidos totales % (por saponificación) y P lipídico<sup>58,59</sup> con los resultados que figuran en la Tabla 18.

Operando sobre los ácidos totales de estos lípidos transformados en ésteres metílicos<sup>105</sup> se determinaron las composiciones acídicas por CGL empleando el equipo, columna y técnicas ya mencionadas, con los resultados comentados en la Discusión de la Parte Experimental.



2-4) - Determinación del contenido y características de los lípidos residuales en los "aislados" purificados y secos

Para el caso de pH 7,0 y habiendo partido de 5,0213g de "aislado" se obtuvo un residuo lipídico de 0,0434 g (0,86%) constituido de 0,0372 g de insaponificable (0,74%) y 0,0062 g de ácidos grasos (0,12%); para el "aislado" procedente de la extracción a pH 10,0 se partió de 5,0400g del mismo obteniendo 0,0476 g de lípidos (0,94%) formados por 0,0281 g de insaponificable (0,56%) y 0,0195 g de ácidos totales (0,38%).

Los ácidos totales de estos lípidos se esterificaron en operaciones separadas con metanol<sup>105</sup> y examinaron en sus composiciones acídicas por CGL con los resultados transcriptos y comentados en la Discusión de la Parte Experimental.

TABLAS Y FIGURAS



Tabla 1 - Lípidos asociados a proteínas de diversas fuentes, extraíbles por etanol -

Rendimientos y algunas características químicas

Fuente (harina desgrasada)	Lípidos % proteínica en seco	Acidez mg KOH/g	Ácidos totales %	Insaponificable %	P lípido (comop) %	Índice yodo	Índice saponificación	Índice yodo insaponificable	Índice yodo total (calc)
Sésamo	4,38	149,4	80,28	5,10	0,20	109,2	179,3	71,1	124,9
Zapallo	1,10	85,0	74,09	10,14	0,92	86,6	189,5	100,8	87,2
Esponja vegetal	1,41	--	--	--	0,50	--	--	--	68,4
Sandía	1,14	--	--	--	0,80	--	--	--	83,9
Melón	1,50	--	--	--	0,74	--	--	--	65,1
Lino	1,44	55,5	80,8	7,61	0,30-0,34	106,4	198,4	--	106,9
Cítricos	5,18	108,0	85,98	3,64	0,22	97,2	236,7	--	100,3
Tomate	6,70	128,0	79,64	5,24	0,18	115,5	190,4	103,1	122,4
Girasol <sup>a</sup>	2,07	71,6	76,80	4,55	0,91	115,4	205,0	86,5	137,1
Girasol <sup>b</sup>	3,37	77,8	70,79	8,04	--	93,8	180,3	44,66	--
Girasol <sup>c</sup>	3,61	134,2	83,68	11,00	0,25	87,5	178,6	58,1	--
Girasol <sup>d</sup>	0,10	--	29,2	37,7	--	--	--	--	--
Girasol <sup>e</sup>	1,36	99,8	56,17	34,44	0,19	--	--	--	107,9
Cártamo	2,27	118,8	70,15	7,69	0,37	131,8	178	86,94	148,7

Soja (ext. pH 7,0)	--	51,3	58,40	5,10	1,20	92,6	209,9	70,9	106,6	132,4
Soja (ext. pH 10,0)	--	49,8	64,24	3,74	1,74	91,9	203,1	76,4	113,2	132,4

---

- a - "aislado" obtenido a partir de harina de pepa industrial
- b - "aislado" obtenido a partir de "lex" en presencia de sulfito
- c - "aislado" obtenido a partir de harina de pepa industrial en presencia de  $\text{SO}_3\text{Na}_2$
- d - "aislado" obtenido a partir de harina (hexano) agotada por metanol
- e - "aislado" obtenido a partir de harina por extracción en medio salino



TABLA 2 - Composiciones acídicas de aceite de semilla de lino (var. Tezanos Pintos) y de lípidos residuales en harina, extraídos por éter etílico y según Lyons- Lippert (% de ácidos totales)

	Aceite (hexano)	Lípidos (éter etílico)	Lípidos ( $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$ )
<u>12:0</u>	vest.	vest.	vest.
<u>14:0</u>	vest.	0,2	0,1
<u>16:0</u>	6,4	16,6	10,7
<u>16:1</u>	vest.	vest.	vest.
<u>18:0</u>	4,7	4,1	2,6
<u>18:1</u>	17,8	23,8	21,4
<u>18:2</u>	13,6	24,3	17,0
<u>18:3</u>	57,5	32,0	48,2
Ind.yodo ácidos to- tales (calc.)	197,9	152,9	181,8

TABLA 3 - Características de los lípidos residuales  
en harina de semilla de lino agotada por  
hexano

	Lípidos (extraí- dos por éter e- tílico)	Lípidos (extraí- dos según Lyons- Lippert)
Insaponificable %	14,88	10,07
Ind.yodo insaponificable	77,0	114,3
Acidos totales %	62,55	58,32
Ind.yodo ácidos totales (x)	152,9	181,8
Fósforo lipídico (mg P % g lípidos)	163,9	1540,0

(x) - Valores calculados en base a las composiciones  
 acídicas CGL (ver Cuadro 2)



TABLA 4 - Valores de rendimiento y de características de composición de aceite crudo de semilla de lino (hexano), de lípidos extraídos de harina por  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  y de lípidos residuales.

	Aceite	Lípidos Lyons- Lippert	Lípidos residuales
Rendimiento % semilla t/cual	36,71	1,73 (x)	0,43 (xx)
Indice de refracción (25°)	1,4791	--	--
Indice de Saponificación	190,8	187,4	--
Indice de yodo	181,7	136,8	--
Insaponificable %	2,15	10,15	41,93
Ind.yodo insaponificable	109,5	86,4	134,0
N° de acidez (mg KOH/g)	1,6	--	--
Esteroles totales (mg % g)	543,0	--	--
Fósforo lipídico (mg P % g)	--	1200	--
Acidos totales (°)	--	59,51	58,07

(x) - 2,73% sobre harina agotada por hexano

(xx) - sobre harina agotada según Lyons y Lippert

(°) - por saponificación

TABLA 5 - Composiciones acídicas (% ácidos totales) de aceite de semilla de lino, lípidos en harina (extraídos por  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ ) y de lípidos residuales (extraídos luego de saponificación drástica) (2<sup>da</sup> partida)

	Aceite	Lípidos ( $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ )	Lípidos resi- duales (sap. drástica)
<u>8:0</u>			8,3
<u>10:0</u>			9,3
<u>12:0</u>		vest.	0,1
<u>14:0</u>	vest.	0,3	0,4
<u>15:0</u>		vest.	0,3
<u>15:1</u> ?			0,2
<u>16:0</u>	6,3	13,3	13,1
<u>16:1</u>			0,2
<u>17:0</u>	vest.	vest.	0,1
<u>18:0</u>	4,7	3,4	4,0
<u>18:1</u>	19,7	23,4	19,5
<u>18:2</u>	14,2	21,0	13,2
<u>18:3</u>	55,1	38,6	31,3
<u>20:1</u>		vest.	
Ind.yodo de ácidos tot. (calc.)	194,1	164,6	127,4



TABLA 6 - Composiciones acídicas (% de ácidos totales) de lípidos neutros (LN), colinafosfolípidos (CFL) etanolaminafosfolípidos (EFL), glicolípidos ? (GL) y lisocolinafosfolípidos (LCFL)

	LN	CFL	EFL	GL (1) (x)	GL (2) (x)	LCFL (x)
<u>10:0</u>	0,1	0,5	0,3	vest.	0,3	0,5
<u>11:0</u>	--	0,5	vest.	vest.	0,2	vest.
<u>r-12:0</u>	--	vest.	vest	0,4	0,1	0,5
<u>12:0</u>	0,1	2,3	2,5	1,2	1,2	2,0
<u>r-13:0</u>	--	vest.	vest.	2,0	vest.	0,2
<u>13:0</u>	vest.	0,5	0,5	0,5	0,6	1,1
<u>r-14:0</u>	0,1	0,5	0,4	0,2	0,6	0,6
<u>14:0</u>	0,3	4,2	4,9	2,4	1,7	4,0
<u>14:1+r-15:0</u>	vest	0,4	0,9	0,7	0,6	0,7
<u>15:0</u>	0,1	1,1	1,1	1,1	0,9	1,2
<u>r-16:0</u>	0,1	1,2	1,5	3,0	3,1	1,9
<u>16:0</u>	10,7	27,1	30,1	16,0	9,1	24,3
<u>16:1</u>	0,9	6,1	8,3	4,4	4,5	12,0
<u>17:0</u>	vest.	1,0	1,1	2,7	3,3	3,6
<u>17:1+r-18:0</u>	vest.	0,9	2,3	0,2	vest.	1,1
<u>18:0</u>	3,1	8,7	9,8	7,6	6,0	9,8
<u>18:1</u>	21,6	38,2	28,6	16,6	19,6	31,1
<u>18:2</u>	14,8	5,0	5,7	27,4	31,4	5,1
<u>18:3</u>	48,1	1,8	1,7	11,5	15,9	0,3
<u>r-20:0</u>	--	vest.	0,3	--	--	vest.
<u>20:1</u>	--	--	--	2,1	0,9	--

(x) - Esteres metílicos más presuntos acetales

TABLA 7 - Valores de N extraído y de N en residuos de extracción, expresados % de harina y % de N en harina, en experiencias de dispersión alcalina sobre harina de lino agotada por hexano y por mezcla ternaria  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$

Fuente	g de harina de partida	g de residuo obtenido	N % harina	N % de residuo	N extr. % de harina	N residuo % harina	N extr. % N tot. en harina	N residuo % N tot. en harina
Harina agotada por hexano	5,00	2,30	6,11	3,14	3,73	1,44	62,0	23,6
Harina agotada por hexano y mezcla ternaria	5,00	3,62	6,37	5,56	1,73	4,02	27,1	63,2
Harina agotada por hexano y mezcla ternaria + A	5,06	3,77	6,37	5,83	1,75	4,34	27,6	68,2
Harina agotada por hexano y mezcla ternaria + B	5,02	3,81	6,37	6,29	1,32	4,77	20,7	74,9
Harina agotada por hexano y mezcla ternaria + A + B	5,06	3,86	6,37	5,63	1,83	4,29	28,8	67,4

A - Lípidos extraíbles en la mezcla  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$ , disueltos en  $Cl_3CH$  ( 0,15g)

B - 25 ml correspondientes a la capa  $CH_3OH:H_2O$



TABLA 8 - Valores de ISN para "aislado" (agotado por etanol y seco a 45°) de semilla de lino, en función del valor de pH y peso del "aislado" en el ensayo

Experiencia N°	"Aislado" en el ensayo (g)	Valor de pH	% de N solubilizado	I.S.N.	% N de "aislado"
1	5,0021	6,0	10,60	96,2	11,02
2	5,0086	7,0	10,46	94,9	11,02
3	5,0182	7,5	10,50	95,3	11,02
4	5,0068	8,0	10,76	97,6	11,02
5	2,5012	6,0	10,51	96,7	10,87
6	2,5042	7,0	11,21	103,1	10,87
7	1,5042	6,0	10,12	93,1	10,87
8	1,5081	7,0	10,55	97,0	10,87
9	1,5008	8,0	10,91	100,4	10,87

TABLA 9 - Valores de ISN para "aislado" (agotado por etanol y secado a 45°) de semilla de cártamo, en función del pH

"Aislado" en ensayo (g)	Valor de pH	% de N solubilizado	I.S.N.	% N de "aislado"
5,0076	5,8 - 5,9	4,34	30,8	14,08
5,0600	6,8 - 6,9	6,88	48,9	14,08
5,0370	7,8 - 7,9	9,74	69,2	14,08

TABLA 10 - Valores de ISN para "aislado" (agotado por etanol y secado a 45°) de semillas de frutos cítricos, en función del pH

"Aislado" en ensayo (g)	Valor de pH	% de N solubilizado	I.S.N.	% N de "aislado"
2,5006	6,0	1,71	13,9	12,30
2,5050	7,0	7,70	62,6	12,30
2,5052	8,0	10,82	88,0	12,30



TABLA 11 - Valores de ISN a pH 7,0 de diversos "aislados" proteicos agotados por etanol y secados en vacio a 45°

"Aislado" de	gramos en ensayo (x)	% de N solubilizado	I.S.N. N	% de "aislado" (x)
Semilla de lino	2,5042	11,21	103,1	10,87
Semilla de lino	5,0086	10,46	94,9	11,02
Caseína industrial	2,5097	12,23	96,9	12,63
Caseína industrial	5,0133	12,02	98,7	12,18
Coppdo.prot.lino + 40% caseína	2,5080	11,38	98,7	11,52
Semilla de cártamo	2,5030	7,58	55,4	13,70
Semilla de cártamo	5,0600	6,88	48,9	14,08
Semilla de coco paraguayo	5,0036	8,42	58,6	14,36
Semilla de girasol	5,0013	7,99	57,6	13,88
Semilla de zapallo (C.máxima)	2,5147	4,26	29,2	14,57
Semilla de zapallo	5,0000	4,57	31,5	14,49
Semilla de cítricos	2,5050	7,70	62,6	12,30
Semilla de tomate (I)	5,0049	3,94	29,7	13,28
Semilla de tomate (II)	5,0026	4,30	30,4	14,15
Semilla de damasco (pepa) (xx)	5,0087	5,67	39,0	14,55
Semilla de damasco (pepa) (xxx)	5,0000	9,74	65,1	14,96
Semilla de soja (°)	5,0050	4,64	32,3	14,36
Semilla de soja (°°)	5,0116	6,95	49,1	14,15

(x) - Sobre producto tal cual

(xx)- de fruto maduro no sometido a cocción

(xxx)- de fruto maduro sometido a cocción

(°) - "aislado" extraído a pH 7,0

(°°)- "aislado" extraído a pH 10,0

**Tabla 12 - Valores de ISN de diversos "aislados" proteicos no sometidos a deshidratación**

*Aislado" de	Forma de pre-servación	gramos en ensayo coágulo	H <sub>2</sub> O % coágulo	M % de coágulo	% de M solubilizado	I.S.N.
Semilla de Zapallo	<u>Refrigeración</u>					
	Tiempo cero	17,93	69,37	4,94	4,64	93,9
	14 días	16,87	68,56	5,06	3,74	73,9
	21 días	16,76	68,19	5,13	3,22	62,9
Semilla de Zapallo	<u>Congelación</u>					
	Tiempo cero	16,52	68,99	4,78	4,65	97,3
	7 días	16,51	69,01	4,78	3,07	64,2
Semilla de Cártamo	<u>Refrigeración</u>					
	Tiempo cero	13,03	55,61	6,78	4,84	71,4
	14 días	11,34	55,94	6,74	3,04	45,1
	21 días	11,82	56,12	6,72	3,17	47,2
Semilla de Girasol	<u>Refrigeración</u>					
	Tiempo cero	14,23	67,10	4,83	4,75	98,3
	7 días	14,49	66,65	4,89	4,83	98,8
	14 días	15,29	66,20	4,88	4,45	91,2
Semilla de Girasol	<u>Congelación</u>					
	Tiempo cero	15,02	68,12	4,74	4,57	96,4
	7 días	15,15	67,77	4,79	4,19	87,5
	14 días	15,20	67,47	4,84	4,46	92,1



Semilla de Tomate	<u>Congelación</u>						
	Tiempo cero	20,40	3,85	81,14	2,75	1,90	69,1
	11 días	20,02	4,00	80,00	2,90	1,13	39,0
Semilla de Lino	<u>Refrigeración</u>						
	Tiempo cero	39,20	2,52	93,56	0,78	0,76	97,4
	7 días	39,71	2,81	92,93	0,85	0,82	96,5
Semilla de Lino	<u>Congelación</u>						
	Tiempo cero	39,20	2,52	93,56	0,78	0,76	97,4
	7 días	39,36	2,49	93,66	0,77	0,76	98,7
	14 días	39,89	2,57	93,53	0,78	0,73	93,6
Semilla de Cítricos	<u>Refrigeración</u>						
	Tiempo cero	11,78	2,56	78,25	2,88	2,75	95,5
	7 días	11,48	2,66	76,86	3,07	2,45	79,8
Semilla de Cítricos	<u>Congelación</u>						
	Tiempo cero	11,78	2,56	78,25	2,88	2,75	95,5
	7 días	11,80	2,78	76,45	3,12	2,66	85,2
	14 días	9,79	2,30	76,45	3,12	2,64	84,6
Semilla de Soja extracción pH 7,0	Tiempo cero	11,65	5,36	54,00	6,33	5,40	85,3
	extracción pH 10	11,55	4,68	59,47	5,89	5,67	96,3

TABLA 13 - Valores de contenido en lisina disponible (g/ 16g N)

Fuente de partida	Harina	Residuo de extracción	"Aislado" (x)	Insol. ISN (x)	Insol. ISN coágulo cong.	Insol. ISN coág. refriger.
Semilla zapallo	3,89	5,69	3,21	3,47	3,14 <sup>a</sup>	3,15 <sup>b</sup>
Semilla cártamo	1,77	0,70	2,75	3,18	3,08 <sup>c</sup>	--
Semilla girasol	3,21	3,94	2,74	3,31	--	--
Semilla cítricos	4,23	6,66	2,63	2,77 <sup>d</sup>	--	--
Semilla coco parag.--	--	--	4,51	4,03	--	--
Semilla tomate	6,59	8,55	3,90	4,11	--	--
Semilla soja	6,51	5,64 <sup>e</sup> 6,42 <sup>f</sup>	6,46 <sup>e</sup> 6,62 <sup>f</sup>	6,67 <sup>e</sup> 6,60 <sup>f</sup>	--	--
Semilla lino (hex.)	4,17	3,70	3,86	--	--	--
Semilla lino (g)	4,42	4,02	3,52	--	--	--

(x) - lavados con agua a pH isoeléctrico, con etanol 96% y secados a 45° (vacío)

(xx)- fracciones insolubles de las determinaciones de ISN sobre "aislados" purificados según (x).

a - coágulo preservado 7 días

b - coágulo preservado 14 días

c - coágulo recién obtenido

d - fracción insoluble en la determinación a pH 6,0

e - correspondiente a la extracción a pH 7,0

f - correspondiente a la extracción a pH 10,0

g - agotada por hexano y por mezcla CH<sub>3</sub>OH:Cl<sub>3</sub>CH:H<sub>2</sub>O



Tabla 14 - Aceites de semilla de soja - Características fisicoquímicas

	<u>Cerrillos</u> <u>W-65</u>	<u>Halesoy</u> <u>71</u>	<u>Clark</u> <u>63</u>
Semilla (peso/Hl) (Kg)	68,2	65,8	66,7
Semilla (peso medio grano)(g)	0,22	0,15	0,21
Humedad en semilla %	8,28	8,13	8,08
Aceite % semilla tal cual	17,66	17,87	19,65
Aceite % semilla seca	19,25	19,45	21,37
Densidad relativa (25/4°)	0,9130	0,9137	0,9185
Indice de refracción (25°)	1,4722	1,4725	1,4728
Indice de saponificación	185,1	186,3	190,2
N° de acidez (mg KOH/g)	2,04	2,63	1,84
Indice de yodo (Wijs)	130,9	134,4	131,8
Insaponificable %	2,59	4,47	2,73
Ind. yodo insaponificable	78,4	57,1	64,5
Tocoferoles totales (mg % g)	72,0	69,7	79,8
Esteroles totales (mg % g)	359,9	439,9	376,2

TABLA 15 - Aceites de semilla de soja de producción nacional  
(Los Cerrillos, Salta) - Composiciones acídicas  
 (% de ácidos totales)

	<u>Cerrillos</u> <u>W-65</u>	<u>Halesoy</u> <u>71</u>	<u>Clark</u> <u>63</u>
<u>16:0</u>	14,3	12,0	12,3
<u>18:0</u>	3,2	3,4	3,9
<u>18:1</u>	21,1	19,7	24,9
<u>18:2</u>	54,4	56,2	52,7
<u>18:3</u>	7,0	8,7	6,2

En todos los aceites rastros de 12:0 , 14:0 , 17:0 y 17:1

TABLA 16 - Aceites de semilla de soja - Composición  
en Esteroles (% de esteroles totales)

<u>Esterol</u>	<u>Cerrillos</u> <u>W- 65</u>	<u>Halesoy</u> <u>71</u>	<u>Clark</u> <u>63</u>	<u>Tr/Tr col.</u>
?	5,0	6,7	4,8	0,80
colesterol	0,4	vest.	vest.	vest.
campesterol	22,4	21,0	23,7	1,31
stigmasterol	18,4	15,7	23,2	1,42
sitosterol	53,8	56,6	48,3	1,62



TABLA 17 - "Aislados" proteicos de harina de semilla de soja (macro extracciones) - Valores de composición y de rendimiento

	pH 7,0	pH 10,0
Rendimiento (% de harina tal cual)	27,5	33,9
Pérdida a 100° (vacío)	5,01	3,65
Cenizas % (500 -550°)	0,58	0,79
N total (Kjeldahl) % s.s.s.	15,35	15,20
"Proteína bruta" % s.s.s. libre de cenizas	96,51	95,23
Lisina disponible ( g/ 16 g N)	6,22	6,51
Fósforo total (como P) %	0,26	0,31
Fósforo de ácido fítico (como P) %	0,12	0,16
Lípidos residuales asociados %	0,86	0,94
I.S.N.	33,2	47,5

TABLA 18 - Lípidos extraídos de "aislados" de harina de semilla de soja (pH 7,0 y 10,0) por etanol 96%  
Valores de rendimiento y de características de composición

	pH 7,0	pH 10,0
Rendimiento (% "aislado" purificado , seco a 45°)	2,86	3,42
Índice de saponificación	209,9	203,1
Índice de yodo (Wijs)	92,6	91,9
Número de acidez (mg KOH / g)	51,3	49,8
Insaponificable total (éter etílico)	5,10	3,74
Índice de yodo insaponificable (Rose-mund)	70,9	76,4
Ácidos totales % (por saponificación)	58,4	64,2
Fósforo lipídico (como P % lípidos)	1,20	1,74

TABLA 19 - Composición general de la semilla de cártamo var. Gila - (Valores en base seca)

	Cenizas %	N total %	Proteína (N x 6,25) %	Aceite %	Fibra cruda
Semilla entera	3,20	2,88	18,00	38,62	40,50
Cáscara	2,49	0,93	5,81	5,49	--
Pepa	3,76	4,25	26,56	62,29	3,55



Figura 1 : Cromatografía gas- líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de lípidos extraídos por mezcla ternaria ( $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ ) operando sobre harina de semilla integral de lino agotada por hexano técnico (Experiencia N°4, ver Discusión).

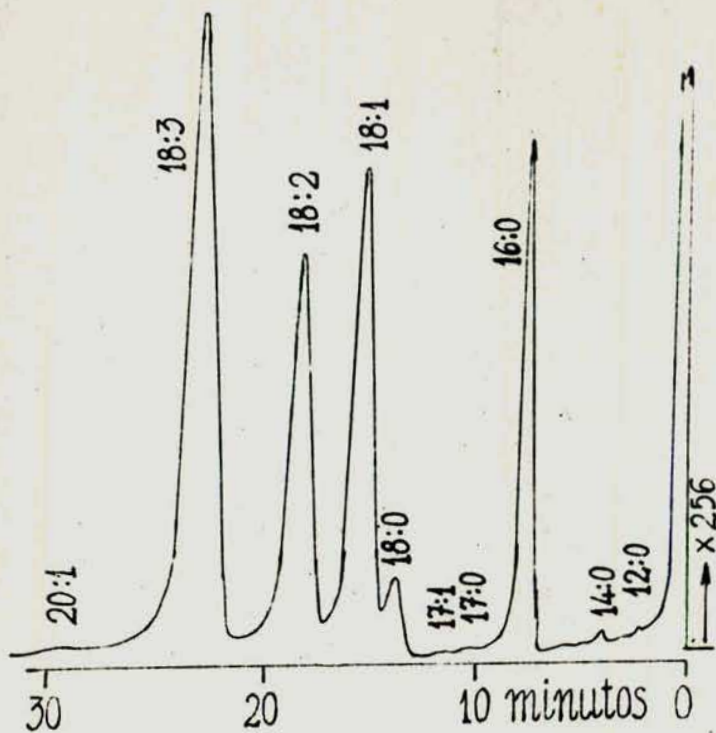
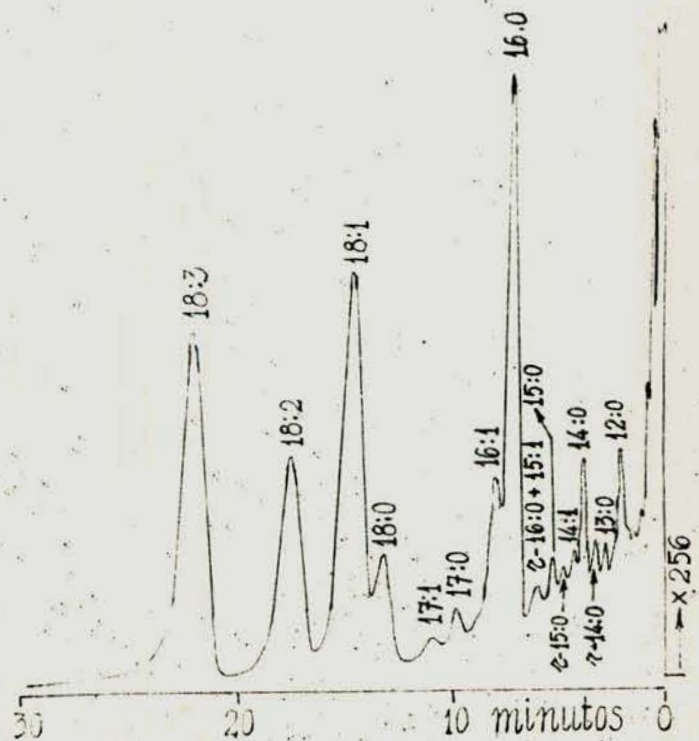


Figura 2 : Cromatografía gas- líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de los lípidos recuperados por extracción de la Experiencia N°4 (ver Figura 1), sobre un "aislado" proteico de semilla de lino purificado.



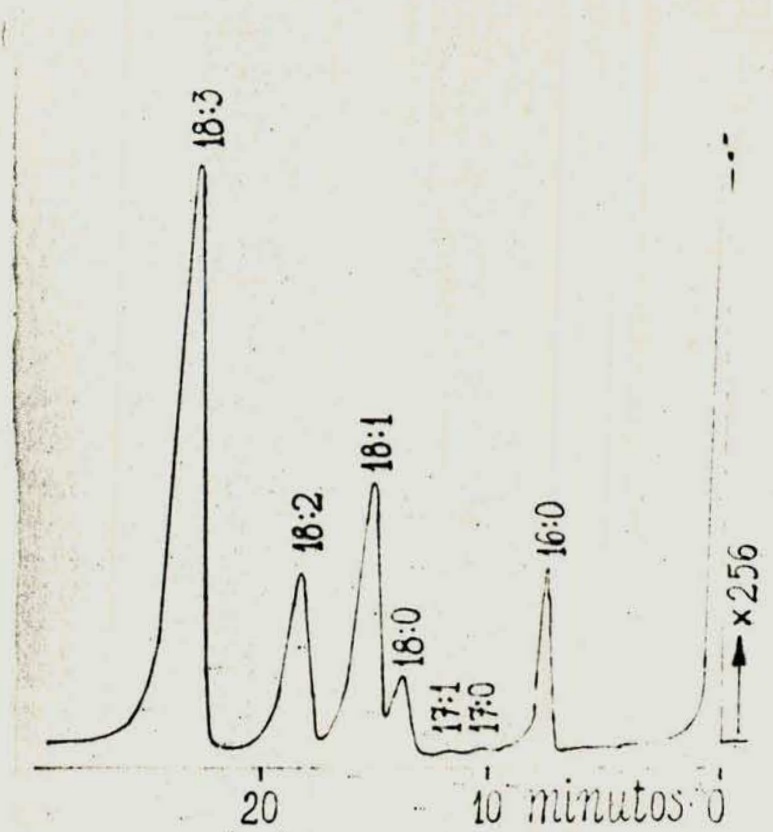


Figura 3 : Cromatografía gas - líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de aceite de semilla de lino (2<sup>da</sup> partida) extraída por hexano en presencia de BHT



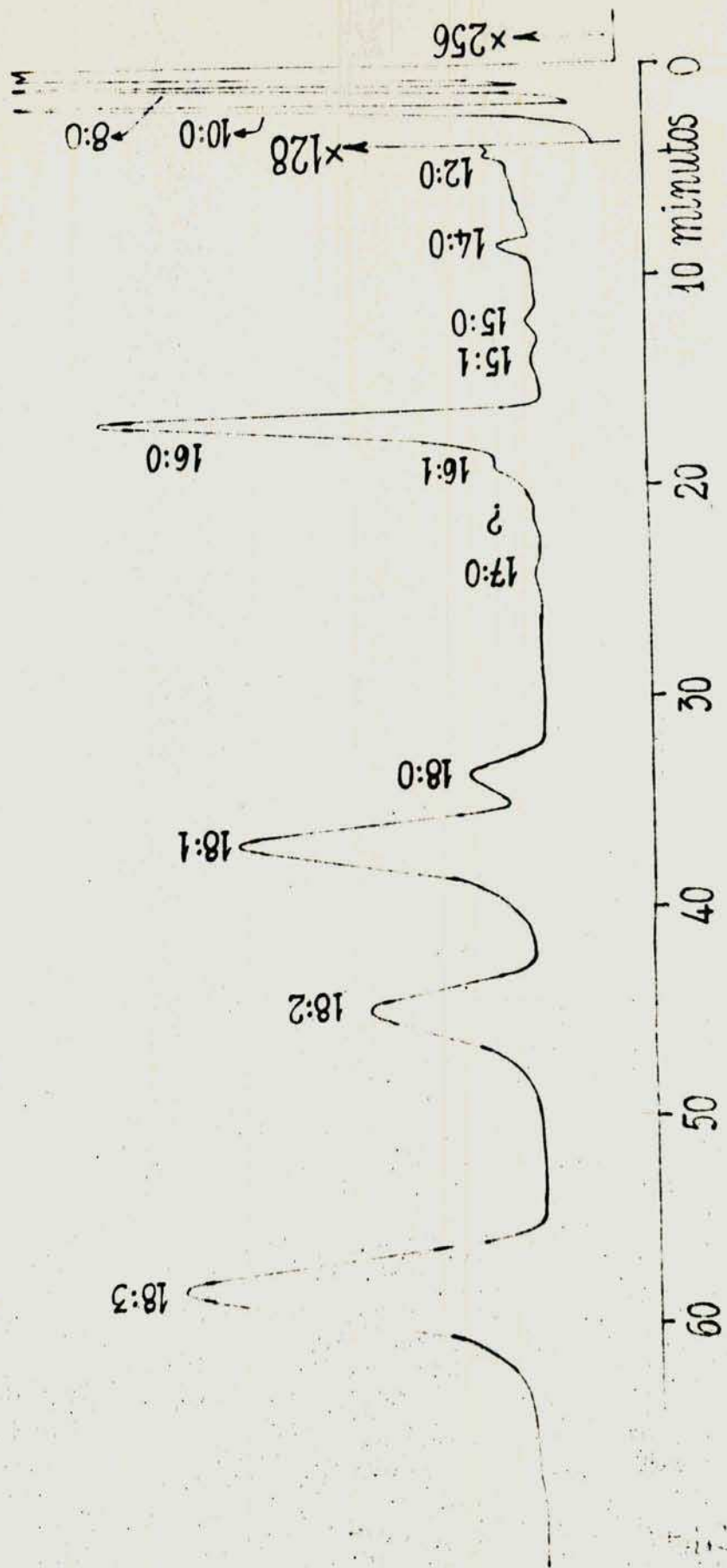


Figura 4 : Cromatografía gas-líquido de lípidos asociados a una harina de semilla de lino previamente agotada por hexano y por mezcla ternaria  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  en presencia de BHT

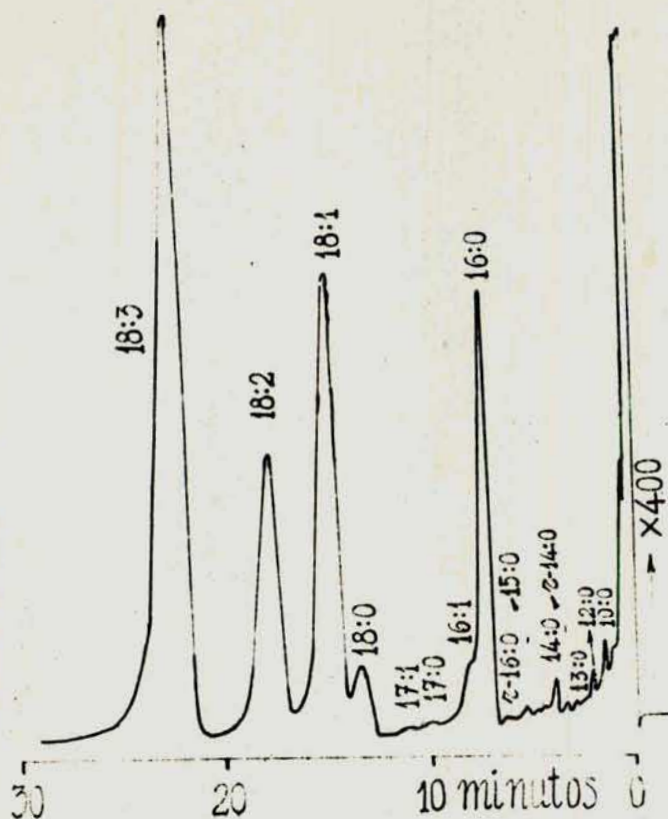
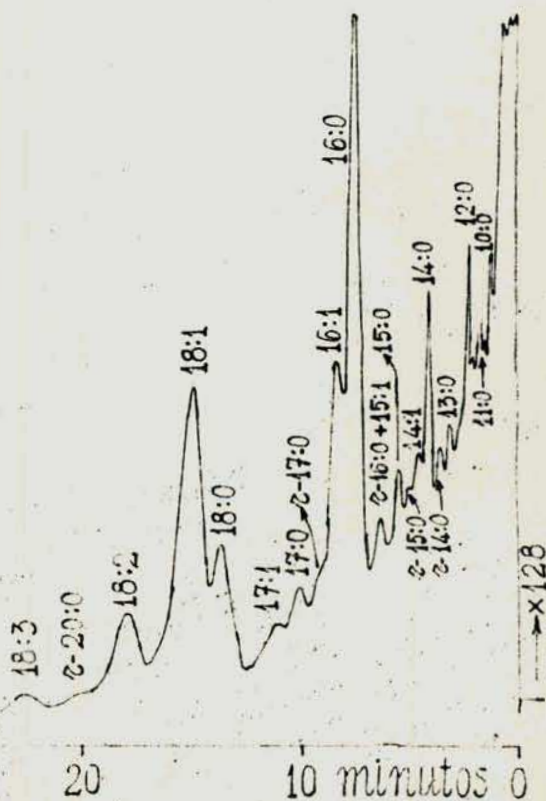


Figura 5 : Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de la fracción de los lípidos neutros (LN) del fraccionamiento de los lípidos extraídos por mezcla ternaria  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  a partir de harina de semilla de lino agotada por hexano (libres de dimetil-acetales).

Figura 6 : Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de la fracción de colinafosfolípidos (CFL) del fraccionamiento de los lípidos extraídos por la mezcla ternaria  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  a partir de harina de semilla de lino agotada por hexano. (libres de dimetil-acetales)





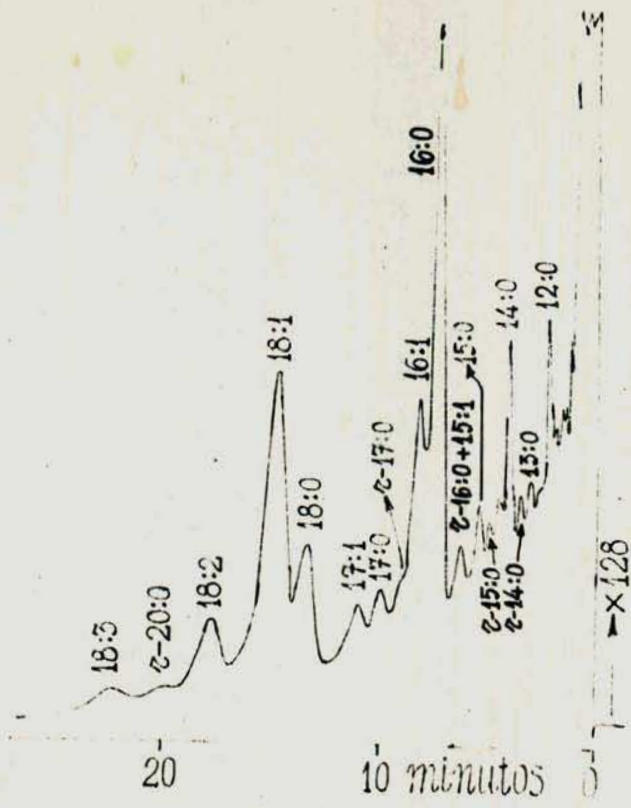
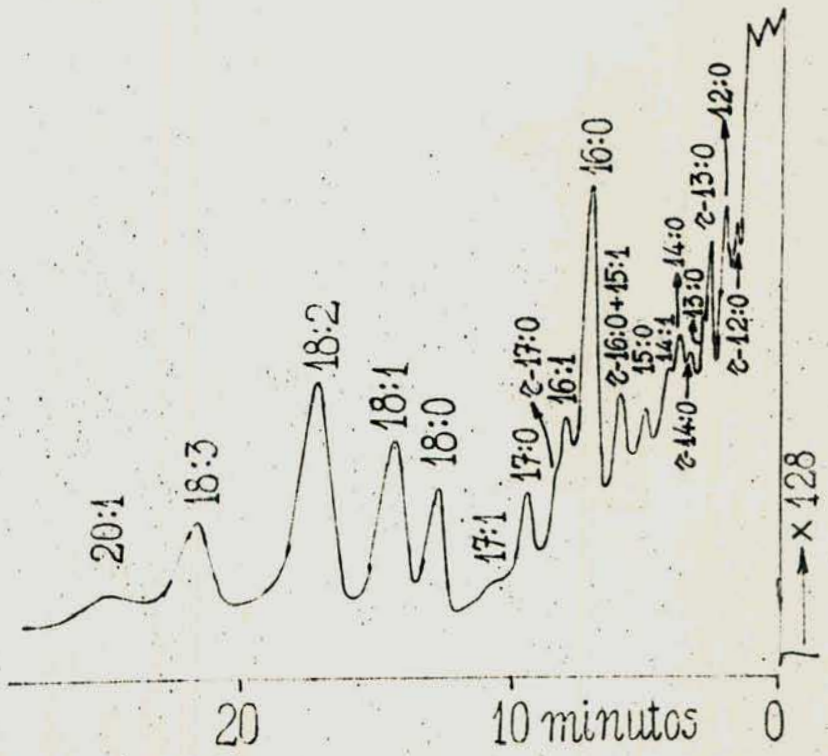


Figura 7 : Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de la fracción de etanolaminafosfolípidos (EFL) del fraccionamiento de los lípidos extraídos por mezcla ternaria  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$  a partir de harina de semilla de lino agotada por hexano (libres de dime-tilacetales)

Figura 8 : Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de la fracción de presuntos glicolípidos (GL<sub>1</sub>?) del fraccionamiento de los lípidos extraídos por la mezcla ternaria  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$  a partir de harina de semilla de lino agotada por hexano



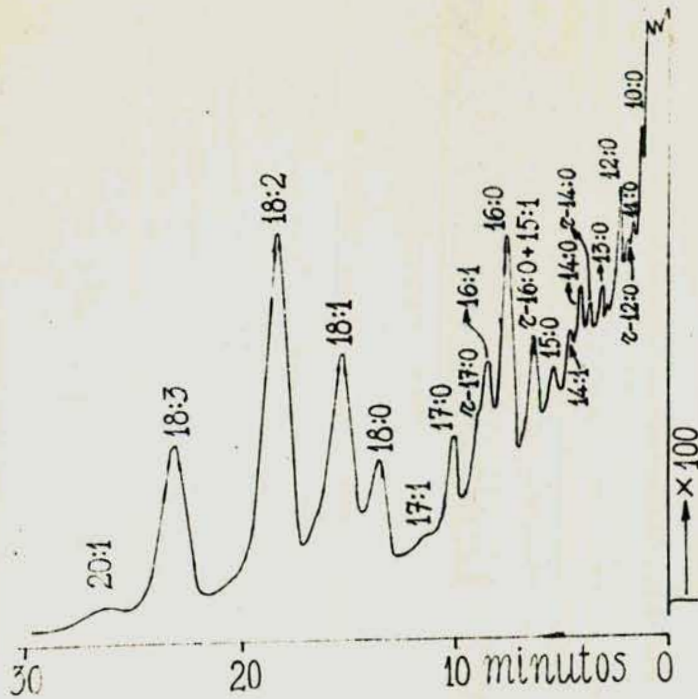
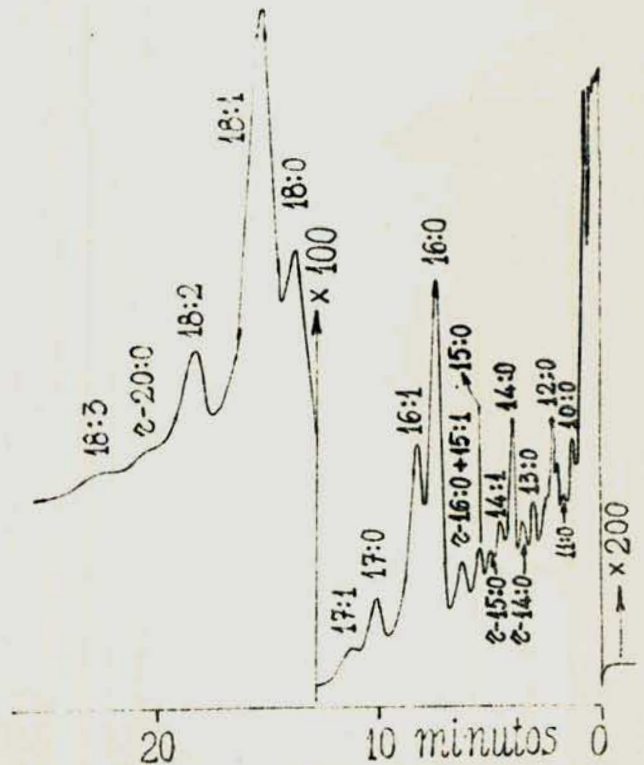


Figura 9 : Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de la fracción de presuntos glicolípidos (GL<sub>2</sub>?) del fraccionamiento de los lípidos extraídos por la mezcla ternaria Cl<sub>3</sub>CH:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O a partir de harina de semilla de lino agotada por hexano

Figura 10: Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de la fracción lisocolinafosfolípidos (LCFL) del fraccionamiento de los lípidos extraídos por mezcla ternaria Cl<sub>3</sub>CH:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O a partir de harina de semilla de lino agotada por hexano.





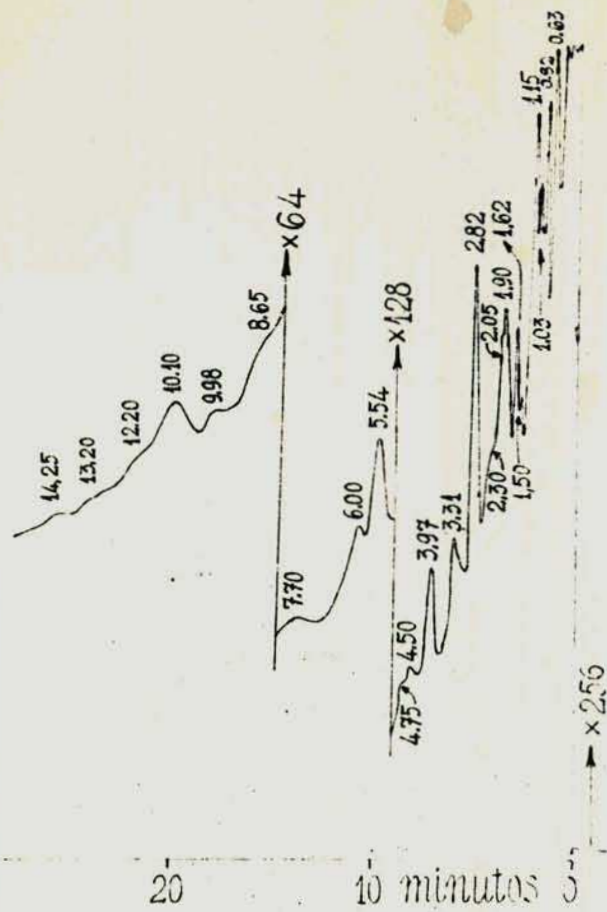


Figura 11: Cromatografía gas-líquido de los dimetilacetales de las fracciones aldehídicas correspondientes a los lípidos neutros (LN) separados en placa delgada de lípidos aislados por mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  a partir de harina de semilla de lino agotada por hexano (Las cifras indican tiempos de retención medidos en cm a partir de la elución del solvente)

Figura 12: Cromatografía gas-líquido de los dimetilacetales de las fracciones aldehídicas correspondientes a colinafosfolípidos (CFL) separadas en placa delgada de lípidos aislados por mezcla  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  a partir de harina de semilla de lino agotada por hexano (Las cifras indican tiempos de retención medidos en cm a partir de la elución del solvente).

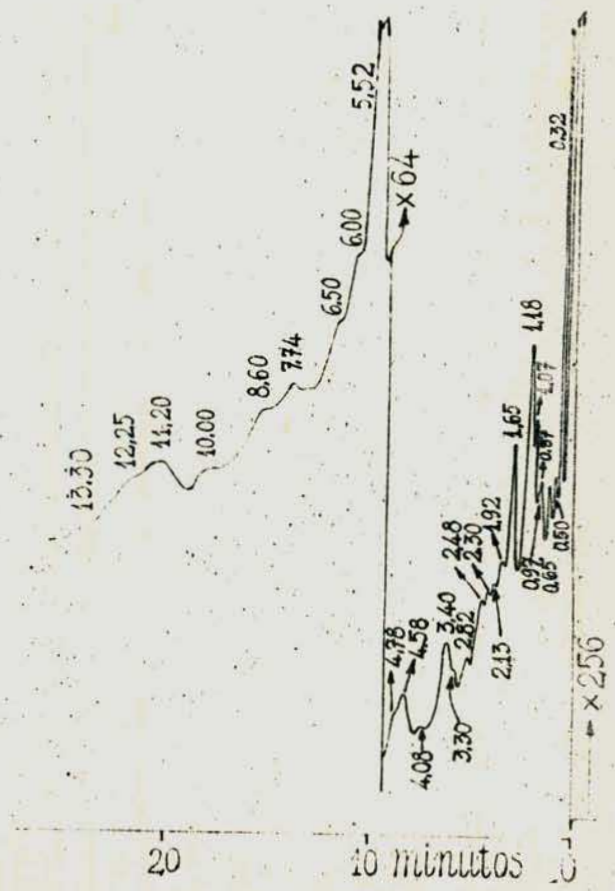




Figura 13: Cromatografía gas-líquido de los dimetilacetales de las fracciones aldehídicas correspondientes a etanolaminofosfolípidos (EFL) separadas en placa delgada de lípidos aislados por mezcla  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$  a partir de harina de semilla de lino agotada por hexano. (Las cifras indican los tiempos de retención medidos en cm a partir de la elución del solvente).

Figura 14: Cromatografía gas-líquido de los dimetilacetales hidrogenados de compuestos aldehídicos de las fracciones de LN+ CFL+EFL de lípidos extraídos por mezcla  $Cl_3CH:CH_3OH:H_2O$  a partir de harina de semilla de lino agotada por hexano. (Las cifras indican tiempos de retención medidos en cm a partir de la elución del solvente).





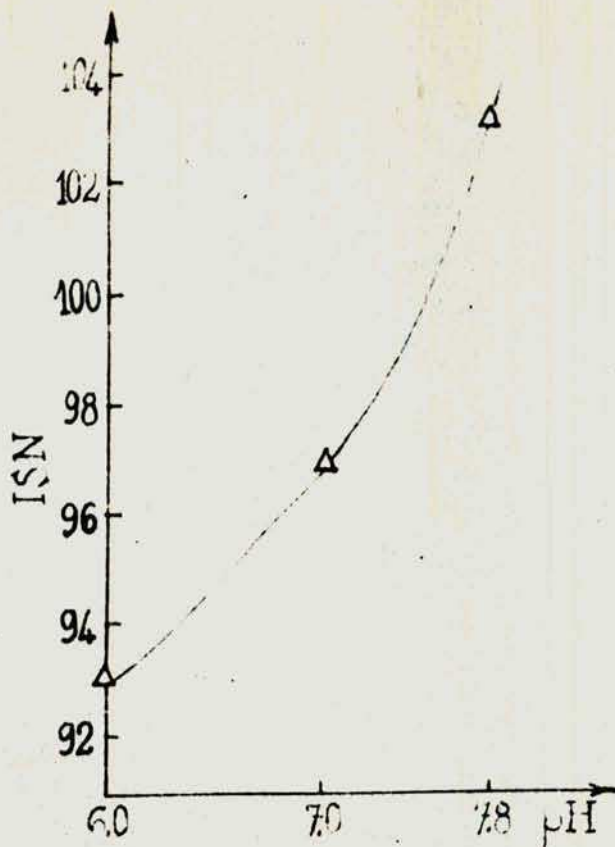
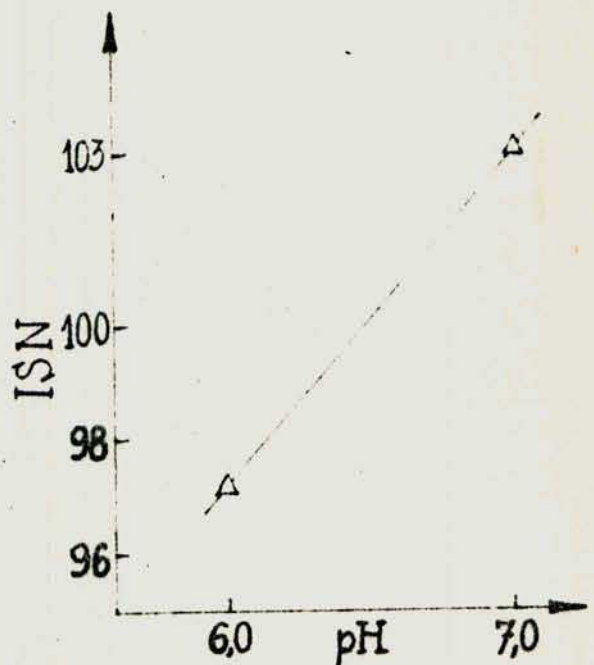
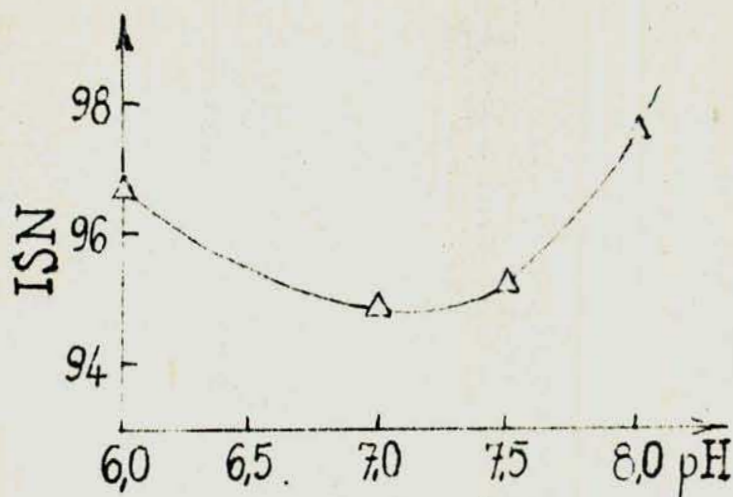


Figura 15: "Aislado" proteico purificado de semilla de lino (lavado por etanol y seco a 45° en vacío) - Valores de ISN a pH 6,0; 7,0 y 8,0. Operando sobre 1,5g de "aislado" (Técnica AACC).

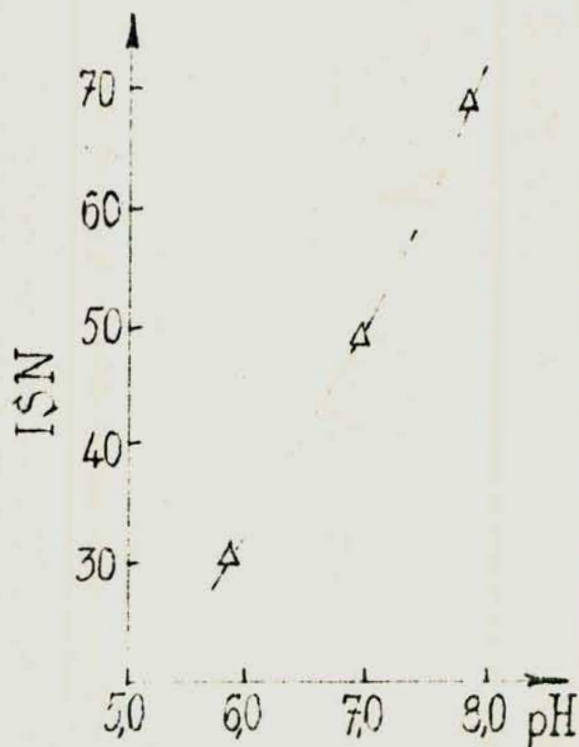
Figura 16: "Aislado" proteico purificado de semilla de lino (lavado por etanol y seco a 45° en vacío) - Valores de ISN a pH 6,0 y 7,0. Operando sobre 2,5g de "aislado" (Técnica AACC)





**Figura 17:** "Aislado" proteico purificado de semilla de lino (lavado por etanol y seco a 45° en vacío). -Valores de ISN a pH 6,0; 7,0; 7,5 y 8,0. Operando sobre 5,0g de "aislado" (Técnica AACC).

**Figura 18:** "Aislado" proteico purificado de semilla de cártamo (lavado por etanol y seco a 45° en vacío) Valores de ISN entre pH 5,8 y 7,9. Operando sobre 5,0g de "aislado" (Técnica AACC).





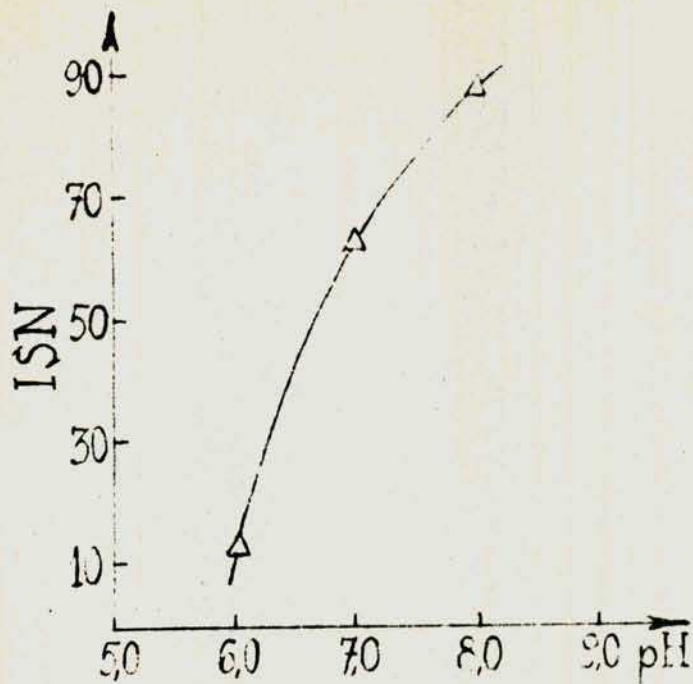
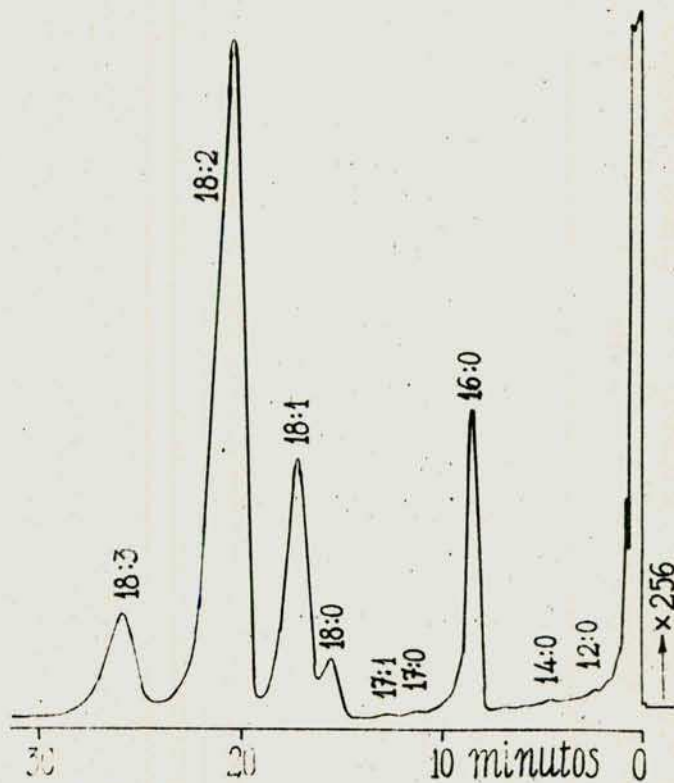


Figura 19: "Aislado" proteico purificado de mezcla de semillas cítricas (lavado por etanol y seco a 45° en vacío) Valores de ISN entre pH 6,0 y 8,0. Operando sobre 2,5g de "aislado" (Técnica AACC).

Figura 20: Aceite de soja (var. "Halesoy 71")- Cromatografía gas-líquido de ésteres metílicos de ácidos totales.



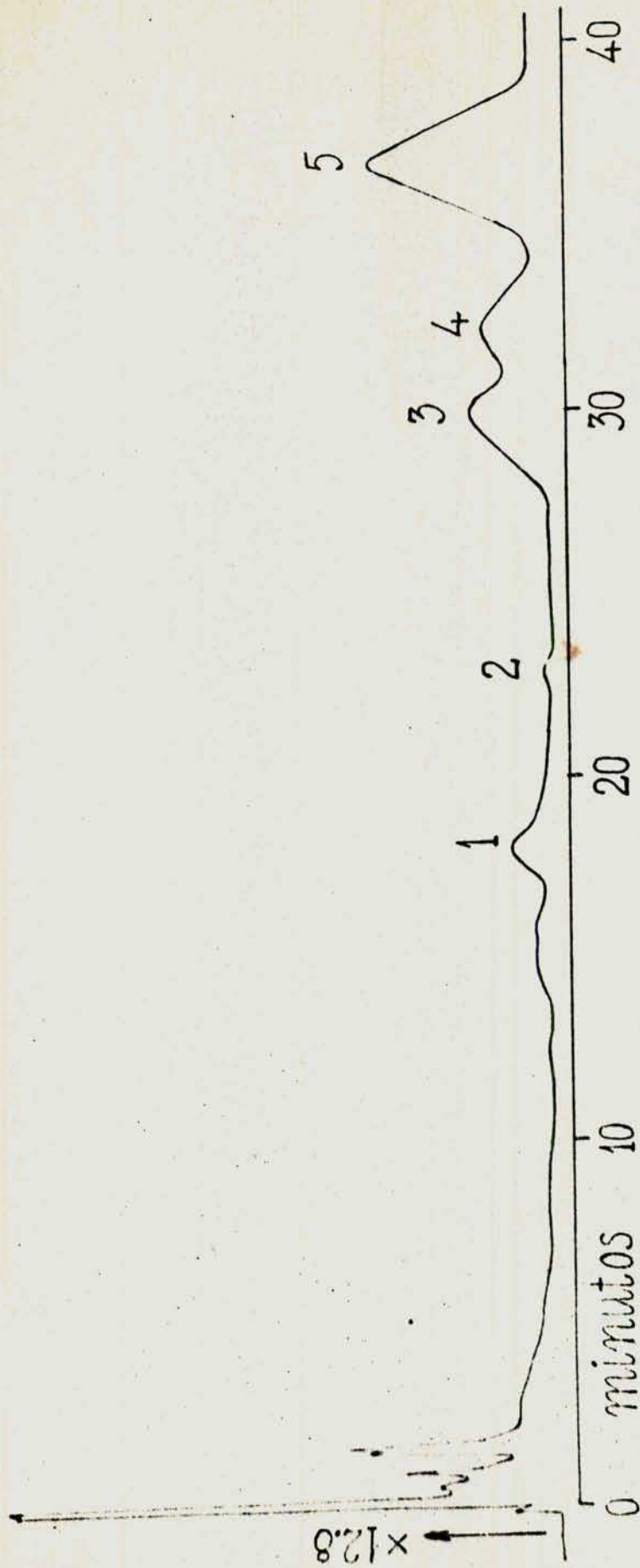
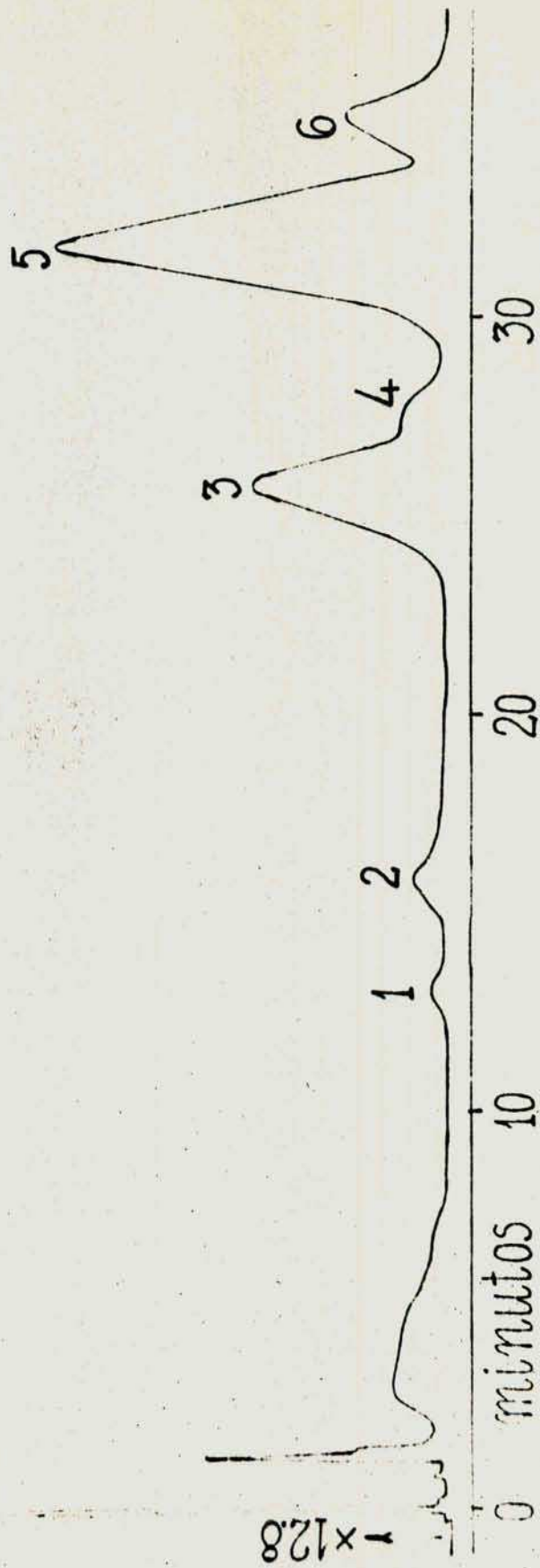


Figura 21 : Aceite de semilla de soja (var. "Cerrillos W-65") - Cromatografía gas-líquido de la fracción de esteroides.

1: Tr/Tr col. 0,80(?), 2: colesterol, 3: campesterol, 4 stigmasterol, 5: sitosterol





**Figura 22:** Aceite de semilla de lino (var. Tezanos Pinto) - Cromatografía gas-líquido de la fracción de esteroides.  
1: Tr/Tr col. 0,66 (?), 2: Tr/Tr col. 0,80 (?), 3: campesterol, 4: stigmatsterol, 5: sitosterol, 6:  $\Delta^5$ -avenasterol (?).

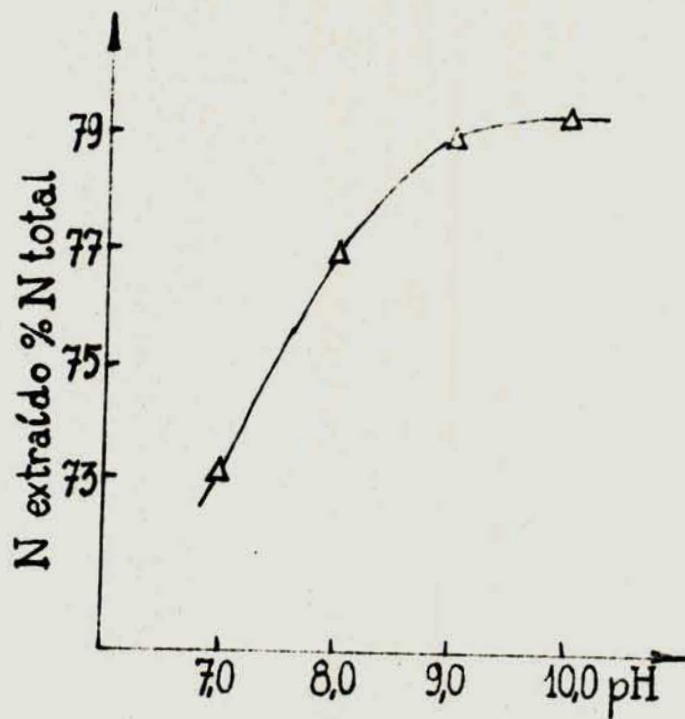


Figura 23 : Harina mezcla de semilla de soja  
Valores de dispersibilidad de N  
total en función del pH de ex-  
tracción.



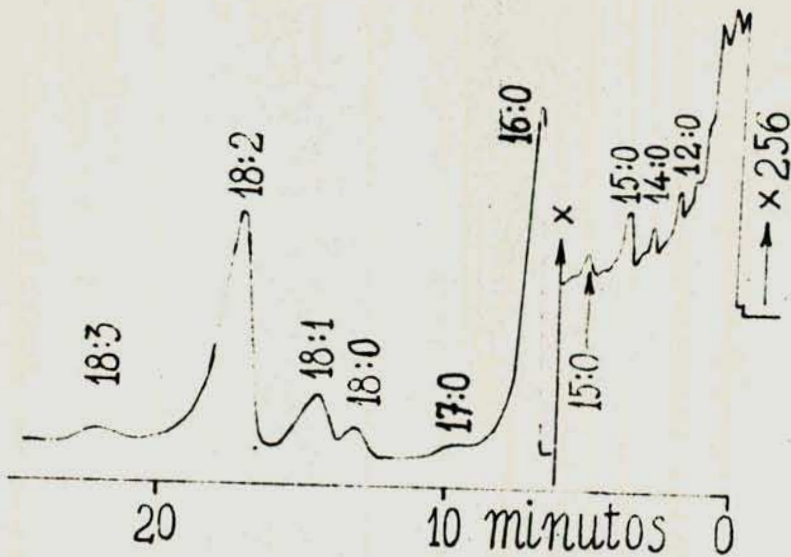
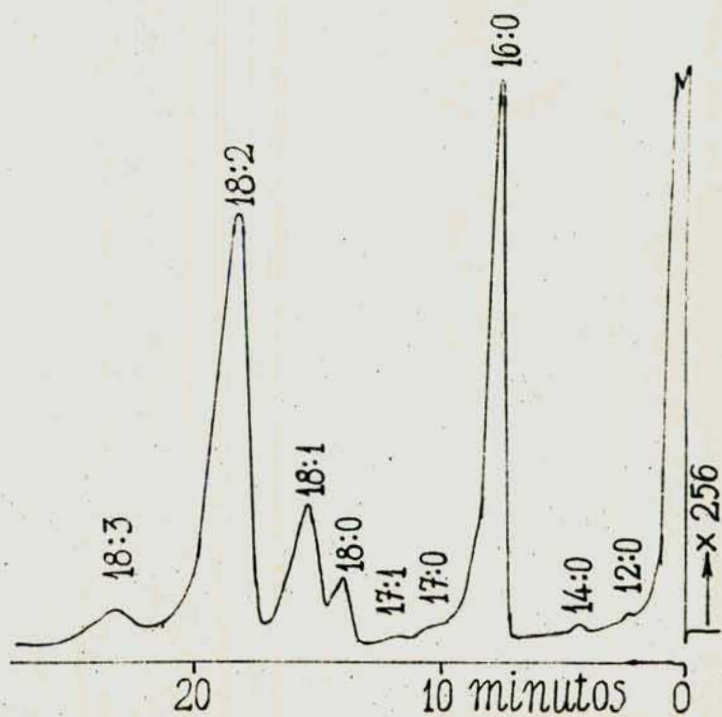


Figura 24: Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de los lípidos residuales (extraíbles luego de saponificación drástica) de un "aislado" proteico de harina de semilla mezcla de soja, obtenido por dispersión a pH 7,0.

Figura 25: Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos totales de los lípidos solubilizados por etanol durante el proceso de purificación de un "aislado" proteico de harina de semilla mezcla de soja floculado a pH isoelectrico previa dispersión a pH 7,0.



PARTE IV

CONCLUSIONES



A modo de introducción se presenta una revisión de los aspectos funcionales de los alimentos y en particular, de la parte inherente a las proteínas que los integran y de los diversos factores que más las influyen, tanto aquellos que de ellas dependen, como de los que surgen del medio o ambiente que componen. Esto último configura, tal vez, el mayor inconveniente en la evaluación comparativa de las propiedades funcionales, dada la gran variedad de características fisicoquímicas y aún biológicas de los distintos alimentos que pueden contener una misma mezcla de proteínas o una misma proteína. De ahí la utilización de sistemas "modelo" con fines comparativos o para determinar aplicaciones específicas y su adecuación en proteínas nuevas o no tradicionales.

La experimentación realizada tuvo como finalidad principal, operando sobre "aislados" proteicos recientemente floculados (al valor de pH de máxima precipitación) a partir de dispersiones alcalinas procedentes de harinas de extracción de semillas oleaginosas, evidenciar en aquellos la presencia de componentes iniciadores de procesos de "pardeo no enzimático". Estos, de existir, podrían justificar las tonalidades amarillo-pardas que esos coágulos toman por secado en vacío a 40-45°.

De la información bibliográfica recogida y de los resultados logrados sobre nuevos "aislados" proteicos, surge la existencia en todos ellos, de compuestos lipídicos que se vinculan a la producción de componentes car-

bonflicos o a la provisión de compuestos con agrupaciones  $-NH_2$ .

Se puede conjeturar:

- 1) - La existencia en los "aislados" recientemente flocu-  
lados de lípidos de por si no intervinientes como tales  
en procesos de "pardeo no enzimático" pero generadores  
por autoxidación de compuestos carbonílicos o de estos  
últimos por procesos de descomposición en medio acuoso  
y ácido.
- 2) - La existencia de compuestos carbonílicos preexisten-  
tes (azúcares reductores) que fundamentalmente existen  
en los subproductos (harinas de extracción) de partida,  
que podrán en este caso iniciar directamente procesos de  
"pardeo no enzimático" (preferentemente durante el proce-  
so de dispersión alcalina por adecuación de pH y durante  
el secado, por incremento de su concentración).
- 3) - Dentro de los componentes lipídicos deben conside-  
rarse dos tipos de componentes generadores de compuestos  
carbonílicos que no requieren autoxidación, a saber :
  - a) - Compuestos aldehidogénicos : comprenden los compues-  
tos aldehidogénicos fosforados o plasmalógenos y  
los compuestos aldehidogénicos no fosforados. Am-  
bos tipos generan aldehídos superiores en medio acuo-  
so y a pH ácido.
  - b) - Glicolípidos, corrientemente constituidos en vegeta-  
les por galacto o digalactodiglicéridos. En medio  
acuoso y ácido generan azúcares reductores.



4) - Las experiencias previas han probado que los materiales lipídicos integrantes de coágulos proteicos responden a componentes en parte preexistentes y en parte generados durante el proceso de obtención de los "aislados".

La mayor parte de esos lípidos se aíslan por agotamiento con etanol de 96% y consisten en glicéridos, fosfolípidos (incluso plasmalógenos), componentes de insaponificables (incluso esteroides) y ácidos grasos libres. Estos últimos pueden representar un porcentaje significativo de los lípidos totales y casi seguramente se generan por saponificación durante el proceso de dispersión alcalina ( pH 9 - 10, 2 horas ). No es improbable la presencia de glicolípidos y diglicéridos, estos últimos procedentes de la descomposición de galactolípidos o de componentes aldehídicos no fosforados en medio acuoso y ácido.

5) - El simple agotamiento por etanol de un "aislado" recién floculado no elimina todos los lípidos presentes en este último. Se ha podido confirmar la existencia de lípidos llamados residuales , no extraíbles por etanol , intimamente asociados a la fracción proteica. Tales lípidos cuya composición no ha sido establecida se manifiestan sometiendo los coágulos agotados por etanol a procesos de saponificación drástica, seguidos de acidificación (pH 4,0) y extracción por hexano. Los productos aislados están constituidos por ácidos grasos libres y com-

ponentes de insaponificables.

6) - Operando sobre semilla de lino oleaginoso se planificó una experimentación tendiente a evidenciar los tipos de compuestos contaminantes de coágulos proteicos, capaces de intervenir en procesos de "pardeo no enzimático". A tal fin se procedió a :

a) - Obtención de harina de extracción

Consistió en el agotamiento de la semilla finamente molida con hexano técnico conteniendo BHT (diterbutilhidroxitolueno) como antioxidante con el objeto de prevenir autoxidación. Se llevó a cabo un estudio del aceite crudo de extracción principalmente en su composición acídica y en esteroides, por procesos de CGL.

b) - Obtención de harinas libres de lípidos polares

La harina obtenida según a) se agotó en frío con una mezcla solvente polar ternaria (Lyons - Lippert,  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ ) conteniendo también BHT. Se obtuvieron lípidos que se estudiaron en su composición acídica y que se fraccionaron por ácido silícico en capa delgada, evidenciando la presencia de lisocolinafosfolípidos, colinafosfolípidos, un fosfolípido Dragendorff positivo con un corrimiento análogo a un patrón de esfingomielina, etanolaminafosfolípidos, lípidos neutros y probablemente glicolípidos. Se estudiaron las composiciones acídicas (CGL) de las



fracciones mencionadas (excepto el fosfolípido Dragendorff positivo con un corrimiento análogo a un patrón de esfingomielina) operando sobre ésteres metílicos de ácidos totales libres de insaponificable en los casos de lípidos neutros, colinafosfolípidos y etanolaminafosfolípidos (ésteres metílicos libres de dimetilacetales).

Así mismo operando sobre lípidos polares totales y sobre fracciones aisladas por fraccionamiento preparativo (sílica gel), se evidenció la presencia de componentes lipídicos aldehidogénicos a través de los ensayos de coloración del reactivo Fucsina-SO<sub>2</sub> y por CGL de los dimetilacetales obtenidos a partir de los insaponificables separados de lípidos neutros, colinafosfolípidos y etanolaminafosfolípidos.

7) - La separación de lípidos polares por el solvente ternario (Lyons -Lippert) permitió el aislamiento de una fracción no lipídica en la que se evidenció la presencia de compuestos reductores frente al reactivo de Bertrand (para determinar azúcares reductores) y de azúcares invertibles. Entre los primeros y por cromatografía en placa delgada no fue posible identificar ningún azúcar reductor; los azúcares invertibles revelaron estar constituidos solamente por sacarosa.

8) - El exámen de composición en hidratos de carbono de la harina de semilla de lino (agotada por hexano) reveló

la presencia de azúcares reductores, no reductores e hidratos de carbono sacarificables. Los primeros (en muy baja proporción) estaban formados por glucosa, levulosa y maltosa; los segundos por sacarosa, mientras que los hidratos de carbono sacarificables estaban constituidos por glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa.

Tanto los azúcares reductores como los no reductores debieron haberse evidenciado también en la fracción no lipídica del extracto de lípidos polares por mezcla ternaria Lyons - Lippert. Esta sólo acusó la presencia de sacarosa, atribuyendo la ausencia de maltosa, glucosa y levulosa a procesos de "pardeo no enzimático" ocurridos durante la concentración del extracto por interacción con etanolaminafosfolípidos.

9) - Se efectuaron diversos ensayos en base a un "aislado" de semilla de lino agotado por etanol y llevado a peso constante a 45° en vacío ("aislado" en forma de polvo blanco, inodoro e insípido) a fin de observar desarrollo de "pardeo". Consistieron en :

- a) - Probable influencia de ésteres de ácidos polietilénicos en ausencia de agua. La incorporación en solución alcohólica de éstos seguida de calentamiento y destilación del solvente no produjo "pardeo".
- b) - La misma experiencia operada en presencia de agua condujo por secado final a "pardeo" y cambio de textura (escamas).



- c) - La influencia de lípidos polares (extraídos por mezcla ternaria) en presencia de agua , calentamiento y secado intensificó el pardeo y el cambio de textura.
- d) - El tratamiento simple por agregado de agua , calentamiento a seco a 50° (vacío) produjo "pardeo" y cambio de textura.

En conclusión estas experiencias señalaron que los lípidos en ausencia de agua no proveerían "pardeo", interpretándose que ello se debe a la imposibilidad de interacción entre compuestos carbonílicos (de autoxidación, generados por descomposición de plasmalógenos o azúcares reductores) y proteínas en ausencia de un solvente que la posibilite.

10) -Se concluye que todo proceso que elimine el agua en forma rápida de un coágulo proteico o que la inmovilice evitaría el desarrollo de "pardeo no enzimático", aun en presencia de iniciadores de los mismos. Por ello el proceso industrialmente usado ("spray") se ha impuesto (eliminación muy rápida del contenido acuoso). Igualmente, la liofilización que inmoviliza el agua por congelación rápida y luego la elimina por sublimación (sin pasar por el estado líquido).

La experimentación realizada en este trabajo con numerosos coágulos obtenidos a pH isoeléctrico (conteniendo todos sus lípidos), congelados en forma lenta (-15°)



mostró ausencia de "pardeo" en lapsos de hasta 21 días. Igualmente y desde que los procesos de "pardeo no enzimático" se inhiben notoriamente por disminución de la temperatura de estacionamiento, se logró por enfriamiento a 8-10° preservar coágulos proteicos obtenidos a pH isoeléctrico por lapsos de hasta 15 días sin "pardeo".

Finalmente la obtención de "aislados" bajo forma de polvos finos, blancos, inodoros e insípidos por agotamiento de coágulos (obtenidos a pH isoeléctrico) con etanol de 96% obedece no solo a la extracción de la mayor parte de lípidos retenidos por los coágulos sino, muy especialmente a la eliminación del agua contenida en los mismos.

11) -La presunción de que el agotamiento por hexano y por mezcla ternaria Lyons -Lippert conduciría a una harina exenta de lípidos, capaz de producir "aislados" proteicos que pudiesen secarse a 45° sin "pardeo" no se vio confirmada (la harina mostró contener lípidos residuales que se evidenciaron luego de un proceso de saponificación drástica). El "aislado" pardeó por secado en esas condiciones. La harina así agotada fue estudiada en su composición y el "aislado" obtenido por el método tradicional (dispersión alcalina) observó un rendimiento significativamente menor al registrado operando sobre harinas agotadas por hexano. Diversos ensayos incorporando durante la dispersión lípidos polares y demás componentes extraídos por la mezcla ternaria de solventes, no aumentaron ese valor de rendimiento, por lo que se concluyó que el tratamiento había provocado un serio proceso de desnaturalización.



En otro orden de finalidades este trabajo comprendió la apreciación de valores de índice de solubilidad de nitrógeno (ISN), como parámetro de evaluación de propiedades funcionales de diversos "aislados" proteicos.

Se pudo establecer :

- 1) - "Aislados" purificados con etanol 96% y secos a 45° en vacío

Se determinaron valores de ISN de diversos "aislados" proteicos tales como : "aislados" de semilla de lino, caseína industrial, coprecipitados de "aislados" de lino con 40% de caseína, "aislados" de semillas de cártamo, girasol, coco paraguayo, zapallo, tomate, mezcla de semillas de frutos cítricos, de pepa de carozo de damasco sometido o nó a cocción y de "aislados" de semilla de soja extraídos a pH 7,0 y 10,0.

Los valores obtenidos para los distintos "aislados" resultaron muy variables, concluyendo que los procesos de obtención de los mismos, el origen de la materia prima (especie vegetal de partida), el tratamiento operado en las harinas de partida, la susceptibilidad a la desnaturalización y las características propias del "aislado" se traducen en comportamientos funcionales distintos.

En el caso de "aislados" de semilla de lino, cártamo y mezcla de semillas de frutos cítricos se estudió la influencia del valor de pH (entre 6,0 y 8,0) sobre la dispersibilidad acuosa de los mismos, observando un aumento significativo de solubilidad para el caso de cártamo

y cítricos, no así para el "aislado" de lino cuyos valores de ISN resultaron muy elevados en todo el rango de pH considerado.

En los "aislados" de semilla de lino, caseína, zapallo y cártamo se operó con distintas concentraciones de "aislado" en el ensayo de ISN. Los resultados indicaron mayores valores de ISN al disminuir la concentración para lino y cártamo y muy parejos para zapallo y caseína. Este comportamiento frente a la concentración de "aislado" en la experiencia, fue acorde con los trabajos de otros investigadores.

## 2) - "Aislados" proteicos no sometidos a deshidratación

A fin de estudiar los valores de ISN de "aislados" no sometidos a deshidratación, se obtuvieron coágulos lavados con agua a pH isoeléctrico determinando la dispersibilidad acuosa de los mismos recién obtenidos y luego de su preservación por enfriamiento o por congelación en lapsos de hasta 21 días.

Los "aislados" estudiados fueron los de semilla de lino, semillas de frutos cítricos, soja, zapallo, tomate, cártamo y girasol. Los "aislados" de semilla de lino, cítricos y girasol registraron los mayores valores, el de lino tanto a tiempo cero como en los ensayos de refrigeración durante 7 días y por congelación durante 14 días; el de semillas cítricas observó un valor máximo en el coágulo recién obtenido y una discreta disminución en los ensayos por refrigeración y por congelación. En el caso



de los "aislados" de girasol se observó una ligera disminución en los coágulos congelados.

Los "aislados" de semilla de zapallo, cártamo y tomate observaron significativas disminuciones de los valores de ISN en ensayos por congelación y refrigeración.

Estas experiencias indicaron que la aplicación de los procesos de preservación de "aislados" proteicos conteniendo sus lípidos y el agua retenida a pH isoelectrico luego de centrifugar a la velocidad elegida, son de utilidad en la preservación sin alteración de color, dependiendo de la materia prima de procedencia de los "aislados" el comportamiento frente a los valores de ISN.

Debe destacarse que durante la experimentación en ensayos por enfriamiento (8-10°) en períodos de hasta 21 días se observó deterioro de los coágulos a causa de la proliferación de hongos, en la mayoría de los casos; en cambio los ensayos por congelación resultaron exentos de esas alteraciones.

Se consideró de interés la evaluación de valores de lisina disponible tanto en los subproductos como en "aislados" (purificados por etanol y secos a 45° en vacío), subproductos agotados (por extracción alcalina) y sobre insolubles resultantes de las determinaciones de ISN, estos últimos procedentes de "aislados" purificados (lavados por etanol y secos a 45°), de coágulos a pH isoelectrico congelados y de coágulos a pH isoelectrico preservados por refrigeración. Se operó sobre zapallo, cártamo

mo, girasol, cítricos, coco paraguayo, tomate, soja y lino.

Se pudo establecer:

1) - Los valores de lisina disponible fueron superiores en los residuos agotados por dispersión alcalina en los casos de zapallo, girasol, cítricos y tomate ; similares para soja y menores para cártamo y lino respecto de los contenidos de las harinas de partida correspondientes.

2) - Los "aislados" purificados (agotados por etanol, secos a 45°) observaron valores ligeramente inferiores de lisina disponible en los casos de lino, zapallo y girasol ; cifras menores de mayor significación para cítricos y tomate y similares para soja respecto de los valores de las harinas de partida correspondientes. El "aislado" de cártamo resultó con un contenido en lisina disponible significativamente superior a los observados para la harina de partida y residuo agotado.

3) - La mayoría de los "aislados" purificados por etanol y secos a 45° produjeron insolubles en las determinaciones de ISN cuyos contenidos en lisina disponible fueron ligeramente superiores que los de los "aislados" correspondientes (zapallo, cártamo, girasol, cítrico y tomate). En cambio resultó ser ligeramente superior en el "aislado" de coco paraguayo y del mismo orden en el caso de soja.

4) - Las pocas determinaciones efectuadas sobre fracciones



insolubles en los ensayos de ISN sobre coágulos congelados o refrigerados no mostraron comportamientos diferentes respecto de los coágulos agotados por etanol.

Las experiencias sobre "aislados" de semilla integral de soja obligaron a la obtención de harinas por agotamiento con hexano técnico de grano molido de las variedades : "Cerrillos W-65", "Halesoy 71" y "Clark 63" (provincia de Salta, cosecha 1975/76.

1) - Sobre los aceites crudos se determinaron sus valores de rendimiento, características fisicoquímicas, contenidos en tocoferoles y esteroides totales, composiciones ácidas (CGL) y de las fracciones de esteroides.

No se observaron cifras de composición ácida que se aparten de los extremos registrados en literatura. Se destaca que los contenidos en tocoferoles observados fueron del orden de los valores mínimos consignados en la literatura (70-80 mg % g). Así mismo se informa que la composición de la fracción de esteroides de estos aceites mostró como componente principal a sitosterol (48-58%) y en orden decreciente campesterol (21-24%), stigmasterol (16-23%) y un componente no identificado con Tr/Tr col. 0,80 (5-7%). Los 3 aceites contenían colesterol en el orden de rastros, si bien en la var. "Cerrillos W-65" se registró un valor de 0,4% sobre esteroides totales.

Un estudio similar sobre la composición en esteroides de aceite de semilla de lino mostró : sitosterol

(60,3%), campesterol (26,3%), stigmasterol (1,2%),  $\Delta$  5-avenasterol ? (9,5%) y 2 componentes no identificados con valores de Tr/Tr col. 0,66 y 0,80 (0,7 y 2,0% respectivamente). La presencia de  $\Delta$  5-avenasterol en aceite de lino (ausente en aceite de soja) señala un cambio para la investigación del primero en mezclas con aceite de soja.

2) - Las harinas de extracción mostraron valores de composición general muy similares razón por la cual se mezclaron intimamente. La harina mezcla contenía 50,7% de "proteína bruta" sobre sustancia seca, valor algo inferior al ámbito observado en literatura (53,5 - 56,2%), atribuible a la presencia de cáscara en el producto estudiado. Consecuentemente se observó mayor contenido en fibra (5,1%) y valores dentro de los extremos señalados en literatura para lisina total (6,51 g/ 16 g N, para lisina disponible).

3) - Por dispersión alcalina y floculación a pH isoeléctrico se obtuvieron "aislados" a partir de harina de soja mezcla operando a valores de pH de 7,0 y 10,0. Los "aislados" se purificaron por etanol y llevaron a peso constante a 45° (vacío) obteniendo polvos blancos, inodoros e insípidos. Ambos "aislados" se estudiaron en su composición general, observando valores muy similares para todas las determinaciones excepto cifras ligeramente superiores para rendimiento, a partir de extractivo a pH 10,0 y valores sensiblemente superiores de ISN para ese mismo "aislado" respecto del procedente de extractivo a pH 7,0.



Se informan valores de rendimiento en lípidos extraídos por etanol y en lípidos residuales así como características fisicoquímicas y composiciones acídicas de ambas fracciones lipídicas.

BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

- 1)- K.F. Mattil, J. Am. Oil Chem. Soc., 48, 477 (1971)
- 2)- J.E. Kinsella, Critical Rev. Food Sci. & Nutrition, 7, 219 (1976).
- 3)- A.M. Hermansson, Bilaga Till Malu. University of Lund (Sweden) Bulletin 2 (1973).
- 4)- A.A. Betschart, J. Food Sci., 39, 1110 (1974)
- 5)- American Oil Chemists Society, Official and Tentative Methods 3<sup>o</sup> ed., Champaign, Illinois (1972).
- 6)- J.T. Lawhon y C.M. Carter, J. Food Sci., 36, 372 (1971)
- 7)- A.M. Hermansson, Problems in Human Nutrition, J. Porter y B. Rolls Eds. Academic Press pag. 407, 1973.
- 8)- P.H. Hippel y T. Schleich, "Structure and Stability of Biological Macromolecules", S.N. Timassheff y G.D. Fasman Eds., cap 6, New York 1969. (mencionado por A.M. Hermansson, ver cita 3).
- 9)- J.L. Schen, Cereal Chemistry, 53, 902 (1976).
- 10)- P.T. Tybor, C.W. Dill y W.A. Landmann, J. Food Sci., 40, 155 (1975).
- 11)- P.S. Lu y J.E. Kinsella, J. Food Sci., 37, 94 (1972)
- 12)- R. Hagenmair, J. Food Sci., 37, 965 (1972)
- 13)- N.A. Janicki y J. Walczak, Adv. Food Res., 10, 355 (1954)

- 14)- A.M.Hermansson, Lebensmitt-Wiss Technol, 5 , 24 (1972)
- 15)- A.M.Hermansson, J.Texture Stud., 5 , 425 (1975)
- 16)- J.D.Ferry, Adv. Protein Chem., 4 , 1 (1948)
- 17)- C.E.Swift, C.Lockett y A.J.Fryer, Food Technol. (Chicago) , 15 , 468 (1961)
- 18)- D.Crenwelge, C.W.Dill, P.T.Tybor y W.A.Landmann ,  
J. Food Sci., 39 , 175 (1974)
- 19)- R.L.Saffle, Adv. Food Res., 16 , 105 (1968)
- 20)- C.E.Swift y W.L.Sulzbacher, Food Technol. (Chicago)  
17 , 106 (1963)
- 21)- M.Noguchi, M.Yamashita, S.Arai y M.Fujimaki, J.Food Sci. , 40 , 367 (1975)
- 22)- K.Bird, J.Am.Oil Chem.Soc., 52 , 240A (1975)
- 23)- R.M.Lanck, J.Food Sci.,40 , 736 (1975)
- 24)- W.J.Wolf, J.Agric.Food Chem., 18 , 969 (1970)
- 25)- K.Yatsumatsu, S.Moritaka, J.Toda, T.Wada, K.Ishii y  
K.Sawada, Agric.Biol.Chem., 36 , 729 (1972)
- 26)- L.W.Rooney, C.B.Gustafson, S.P.Clark y C.M.Carter,  
J.Food Sci., 37 , 1 (1973)
- 27)- A.M.Nash, W.F.Kwolek y W.J.Wolf, Cereal Chem., 48 ,  
360 (1971).
- 28)- A.K.Smith y S.J.Circle, Soybeans: Chemistry and Technology, Avi Westport, Connecticut pag 339, 1972 (mencionado por J.E.Kinsella, ver cita 2).



- 29)- S.H.Richert, J.Dairy Sci., 58 , 985 (1975)
- 30)- B.J.Kowey y J.Spinelli, J.Food Sci., 40 , 58 (1975)
- 31)- H.Sugimoto y J.P.van Buren, J.Food Sci., 36 , 346 (1971)
- 32)- L.W.Acker, Food Technol. (Chicago), 23 , 1257 (1969)
- 33)- J.E.Kinsella, Adv. Food Res., 19 , 148 (1971)
- 34)- T.P.Labuza, N.Heidelbaugh, M.Silver y M.Karel, J.Am. Oil Chem.Soc., 48 , 86 (1971)
- 35)- L.B.Rockland, Food Technol.(Chicago), 23 , 1241 (1969)
- 36)- A.A.Betschart y J.E.Kinsella, J.Agric.Food Chem., 22, 116 (1974)
- 37)- T.M.Reynolds, Adv.Food Res., 14 , 168 (1965)
- 38)- J.E.Kinsella, Chem. & Ind., pag 177 (1977)
- 39)- N.R.Lockmiller, Food Technol. (Chicago) , 26 , 56 (1972)
- 40)- F.E.Horan, J.Am.Oil Chem.Soc., 51 , 67 A (1974)
- 41)- J.Ziemba, Food Eng., 41 , 72 (1969) y 43, 66 (1971)
- 42)- L.D.Wu y R.P.Bates, J.Food Sci., 40 , 160 (1975)
- 43)- A.M.Hermansson, I.Olson y B.Holmberg, Lebens-Wiss Technol. , 7 , 176 (1974)
- 44)- M.Fujimaki, S.Arai y M.Yamashita, Proc.ISFM, 1975, 19 (mencionado por J.E.Kinsella, ver cita 2).
- 45)- S.H.Groniger Jr., J.Agric.Food Chem., 21 , 978 (1973)

- 46)- K.L.Franzen y J.E.Kinsella, J.Agric.Food Chem., 24 , 788 (1976)
- 47)- C.I.G.A., Centro de Investigación de Grasas y Aceites, INTI, IAGA. Informes Trimestrales, Diciembre 1965 y Marzo 1966.
- 48)- M.H.Bertoni y P.Cattaneo, Anales Asoc.Quím.Argentina, 60, 363 (1972)
- 49)- M.H.Bertoni y P.Cattaneo, Anales Asoc.Quím.Argentina, 61, 129 (1973)
- 50)- A.K.Smith, V.L.Johnson y A.C.Beckel, Ind.Eng.Chem., 38 , 353 (1946)
- 51)- W.J.Wolf, A.C.Eldridge y G.E.Babcock, Cereal Chem., 40 , 504 (1963)
- 52)- A.M Nash, A.C.Eldridge y W.J.Wolf, J.Am.Food Chem., 15, 102 (1967)
- 53)- W.Szutowicz, J.Am.Oil Chem.Soc., 42 ,254 (1965)
- 54)- N.W.Pirie, Leaf Protein,its agronomy, preparation, quality and use, Blackwell Scientific, Pub. Oxford and Edinbeerg, pag 78- 85 (1971)
- 55)- R.A.Schnickels, H.C.Warmbier y T.P.Labuza, J.Agric.Food Chem., 24 , 901 (1976)
- 56)- B.Mori y H.Nakatsuji, Agric.Biol.Chem., 41 (2), 345 (1977)
- 57)- M.J.Lyons y L.F.Lippert, Lipids , 1 , 136 (1966)
- 58)- G.R.Bartlet, J.Biol.Chem., 234 ,466 (1969)



- 59)- M.S.Vigo, Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1972).
- 60)- W.W.Marion, S.T.Maxon y R.M.Wangen, J. Am. Oil Chem. Soc , 47 , 391 (1970)
- 61)- G.A.Corless y L.R.Dugan Jr., Lipids, 5 , 846 (1970)
- 62)- J.W.Farquhar, J. Lipid Res., 3 , 21 (1962)
- 63)- E.N.Zerba, Tesis , Fac de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1974).
- 64)- E.Klenk y H.Debuch, en "Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids" , Pergamon Press, New York, 1963 , vol. 6, pag. 1.
- 65)- C.Piantadosi y F.Snyder, J. Pharm. Sci., 59 , 283 (1970)
- 66)- R.Feulgen, W.Boguth y G.Andresen, Z. physiol. Chem., 287 , 90 (1951)
- 67)- American Associated Cereal Chemist, AACC Methods 46 - 23 (1968)
- 68)- A.E.Tortosa, Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1976)
- 69)- S.C.Revuelto, Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1976)
- 70)- A.O.Rucci y M.H.Bertoni, Anales Asoc. Quím. Argentina, 61 , 165 (1973)
- 71)- L.A.Zaputovich, M.H.Bertoni y P.Cattaneo, Anales Asoc. Quím. Argentina , 61 , 43 (1972)

- 72)- M.S.Vigo, M.H.Bertoni y P.Cattaneo, Anales Asoc.Quím. Argentina, 61, 241 (1973)
- 73)- M.S.Vigo, I.Dasso y P.Cattaneo, Anales Acad.Nac.Ciencias Exactas,Físicas y Naturales (en prensa).
- 74)- J.A.Funes, Comunicación privada.
- 75)- K.Hashizume, K.Kakiuchi, E.Komaya y T.Watanabe, Agric. Biol.Chem, 35 , 449 (1971)
- 76)- K.Hashime, S.Kita y T.Watanabe, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai Shi, 16 ,10 (1969)
- 77)- K.Hashizume, N.Nakamura y T.Watanabe, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai Shi, 21 , 198 (1974)
- 78)- K.Hashizume, K.Kosaka, E.Komaya y T.Watanabe, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai Shi, 21 , 193 (1974)
- 79)- E.W. Eckey, "Vegetables fats and oils". Reinhold Publ. Corp. New York, pag. 509 y 777 (1954).
- 80)- L.A.Zaputovich (becario de O.E.A.) Plan multinacional de Química - Comunicación privada.
- 81)- C.López Lopéz (becario de O.E.A.) Plan multinacional de Química - Comunicación privada.
- 82)- M. de la Paz (becaria de O.E.A.) Plan multinacional de Química - Comunicación privada
- 83)- J.Silva Lara (becario de O.E.A.) Plan multinacional de Química - Comunicación privada
- 84)- A.O.C.S. , Official and Tentative Methods of American Oil Chemists Society, Vol.II Tabla I- 1-46 (1962)



- 85)- W.Lange, J. Am. Chem. Soc., 27 , 414 (1950)
- 86)- M.W. Dicks, "Vitamin E Content of Foods and Feeds for Human and Animal Consumption" Agric. Exp. Station University of Wyoming Laramie U.S.A. pag 54 (1965).
- 87)- F.A.O./O.M.S. Comisión del Codex Alimentarius - Norma para aceite de soja comestible. CAC/RS 20 - 1969.
- 88)- G.F.Spencer, J. Am. Oil Chem. Soc., 53 , 94 (1976)
- 89)- E.Fedeli, A.Lanzani, P.Capella y G.Jacini, J. Am. Oil Chem. Soc., 43 , 254 (1966)
- 90)- J.A.Svobda, M.J.Thompson, T.C.Elden y W.E.Robins , Lipids , 9 , 752 (1974)
- 91)- M.L.Rodenstein y P.Cattaneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, 62 , 333 (1974)
- 92)- N.D.Sztarker, Tesis, Fac de Ciencias Exactas y Naturales U.B.A. (1974).
- 93)- S.A. Babackhodzhaeva, T.A. Abdullalv (U.R.S.S.), Tr. Tashk. Politekh Inst., 90, 68 (1972); C.A. :83 : 176879 w .
- 94)- T.M.Jeong, T.Iloh. T.Tamura y T.Maysumo , Lipids, 9 , 921 (1974)
- 95)-S.Mannino y G.Amelotti , Riv.Ital.Sost.Grasse, 52 , 79 (1975)
- 96)- E.Tiscornia , F.Camurati, P.Gastaldo y M.A.Pagano, Riv.Ital.Sost.Grasse, 53, 119 (1976)

- 97)- U.S.Dptment. of Agric. - Agriculture Handbook N°8  
"Composition of Foods" .Washington D.C. , pag. 58  
(1963).
- 98)- R.L.Kellor, J. Am. Oil Chem. Soc., 51 , 77 A (1974)
- 99)- F.Tello, J. Am. Oil Chem. Soc., 52 , 242 A (1975)
- 100)- J.J.Rackis, J.E.Ghu y A.H.Honig, J. Am. Oil Chem. Soc.,  
52 , 249 A (1975)
- 101)- F.A.O. Contenido en Aminoácidos de los Alimentos y  
datos biológicos sobre Proteínas, Roma, pag 56 (1970)
- 102)- A.M.Altschul, "Processed Plant Protein Foodstuffs";  
Academic Press Inc., Publ., New York (1958).
- 103)- L.Villegas Varela y M.H.Bertoni, Anales Asoc. Quím.,  
Argentina, 62 , 309 (1974)
- 104)- R.Bressani, Proteína de semilla de algodón y proteína  
na microbiana - ICAITI, Informe 1971/72 Guatemala.  
1972.
- 105)- T.P.Hilditch, "The chemical constitution of natural  
fats", Chapman & Hall Ltd., London, pag 688 (1964)
- 106)- H.Wagner, L.Hormmer y P.Wolff, Biochem Z., 334, 1975  
(1961)
- 107)- E.Stahl, "Thin Layer Chromatography", Springer Verlag,  
Berlin, pag 52 , 379 , 810 y 811 (1969).
- 108)- J.Dittmer y R.Lester, J. Lipid Res., 5 , 126 (1964)
- 109)- D.Mallens y H. Mangold, J. Am. Oil Chem. Soc., 37 , 576  
(1960).



- 110)- V.Slanson y J.F.Mead, J.Lipid Res., 13 , 143 (1972)
- 111)- S.S.Yiong y H.I.Waterman , Chimie et Industrie, 81,  
204, (1959)
- 112)- G.Denigés, "Precis de Chimie Analytique", Ed.N.Maloi-  
ne, Paris Tomo II, 1931.
- 113)- M.L.Rodenstein, Tesis, Fac. Ciencias Exactas y Natu-  
rales, U.B.A. (1974).
- 114)- L.Hough, J.K.Jones y W.W.Wadman , J.Chem.Soc., 1702,  
(1950)
- 115)- R.W.Bailey y E.J.Bourne, J.Chromatog., 4 , 206 (1960)
- 116)- J.L.Buchan y R.J.Savage, Analyst , 77 , 401 (1952)
- 117)- S.Schwinmer y A.Bevne, Science , 23 , 543 (1955)
- 118)- P.Partridge, Biochem. J., 42 , 238, (1948)
- 119)- E.J.Conkerton y V.L.Frampton, Archives of Biochemis-  
try and Biophysics, 81 , 133 (1959)
- 120)- V.C.Mehlenbacher, "The Analysis of Fats and Oils",  
The Garrad Press, Publ., Champaign, Ill., pag 592  
(1960)
- 121)- M.H.Bertoni y P.Cattaneo, Anales Asoc.Quím.Argentina,  
47 , 52 (1959)
- 122)- A.O.Rucci y M.H.Bertoni, Anales Asoc. Quím Argentina,  
62 , 365 , (1974)