



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral,
para la obtención del Grado Académico de:

· **MAGÍSTER EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS** ·

**“Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y
fisiológicas de las proteínas de amaranto”**

Autor:

Lic. María Virginia Castel

Director:

Dr. Carlos R. Carrara

Codirector:

MSc. Liliana G. Santiago

Jurados:

Dra. Roxana A. Verdini

Dra. Susana E. Zorrilla

MSc. María E. Pirovani

Realizada en el Instituto de Tecnología de Alimentos-FIQ-UNL

-2010-

DEDICATORIA

A mi amado padre, que está siempre en mi corazón....

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por indicarme el camino y darme fuerzas para seguirlo.

A mi madre y mis tíos, por el inmenso amor y apoyo incondicional en todo lo que hago.

A mi hermano, por su paciencia y ayuda constante en lo profesional y personal.

A Alejandro, por su amor, compañía y comprensión en todo momento.

A Carlos y Liliana, por la confianza y orientación académica y personal.

A Oscar, por la ayuda, enseñanza y conocimientos compartidos.

A Flávia, por la oportunidad de realizar gran parte de la tesis bajo su dirección.

Al Instituto de Tecnología de Alimentos, por la experiencia de trabajo y camaradería.

A mis colegas del ITA, que en mayor o menor medida contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

A los Proyectos: CAID-UNL: Desarrollo de biomateriales a partir de proteínas de suero lácteos y polisacáridos (PI-57283); CAPES-SECyT: Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas e hidrolizados proteicos de amaranto (BR/PA05-EIX/052015/05).

ÍNDICE

RESUMEN	XVII
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Aspectos generales de Amaranto.....	3
1.1.2. Características fisicoquímicas de las proteínas del amaranto.....	7
1.2. Métodos de concentración de proteínas.....	10
1.2.1. Precipitación isoelectrica.....	11
1.2.2. Ultrafiltración.....	12
1.2.3. Otros métodos.....	12
1.3. Hidrólisis de proteínas.....	13
1.4. Actividad antioxidante de compuestos vegetales.....	13
1.4.1. Mecanismo de acción de los antioxidantes.....	17
1.4.2. Compuestos fenólicos	19
1.4.3. Capacidad antioxidante de proteínas, péptidos y aminoácidos	23
1.4.4. Reacción entre compuestos fenólicos y proteínas.....	26
1.4.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad antioxidante	28
1.4.5.1. Método del DPPH.....	29
1.5. Propiedades funcionales de las proteínas.....	30
1.5.1. Propiedad de espumado.....	32
1.5.1.1. Rol de las proteínas en la formación y estabilización de espumas.....	32

1.5.1.2. Fundamentos de la obtención y estabilidad de espumas.....	33
1.5.1.3. Desestabilización de las espumas.....	34
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. Objetivo General.....	39
2.2. Objetivos específicos.....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1. Obtención de concentrados proteicos por diferentes procesos de separación y determinación de la composición centesimal.	41
3.1.1. Obtención de la harina desgrasada de amaranto.....	41
3.1.2. Concentración de proteínas por precipitación isoelectrica.....	41
3.1.3. Obtención de muestras proteicas de amaranto por métodos alternativos.....	42
Extracción ácida y precipitación isoelectrica.....	42
Tratamientos por ultrafiltración.....	44
3.1.4. Obtención de hidrolizados a partir de los concentrados proteicos.	46
3.1.5. Determinación de humedad.....	47
3.1.6. Determinación del contenido graso.....	47
3.1.7. Determinación de cenizas.....	48
3.1.8. Determinación de proteínas totales.....	48
3.2. Caracterización fisicoquímica.....	49

3.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-Page)	49
3.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-Page-Tricina para separación de proteínas de bajo peso molecular.	50
3.2.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia de exclusión molecular (HPLCSEC)51	
3.2.4. Determinación de solubilidad de proteínas.....	51
3.2.5. Determinación de la hidrofobicidad superficial.....	53
3.3. Cuantificación de aminoácidos de las muestras proteicas por HPLC.....	54
3.4. Determinación de compuestos con actividad bioquímica con potencial fisiológico	54
3.4.1. Extracción metanólica.....	54
3.4.2. Extracción acuosa.....	55
3.4.3. Determinación de compuestos fenólicos en extractos metanólicos y acuosos..	55
3.4.4. Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> en extractos metanólicos y acuosos	56
3.5. Evaluación de las propiedades de espumado.....	57
3.5.1. Preparación de muestras.....	57
3.5.2. Determinación de la capacidad de espumado (Overrun).....	58
3.5.3. Medida de estabilidad de espumas con el método volumétrico.....	58
3.5.4. Medida de estabilidad de espumas. Funcionamiento del equipo Turbiscan Classic MA 2000.....	58

3.6. Análisis estadístico y herramientas gráficas.....	62
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
4.1. Procesos de separación: Contenido proteico y rendimiento.....	64
Conclusiones parciales de la sección 4.1.....	71
4.2. Caracterización fisicoquímica.....	72
4.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-Page).....	72
4.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-Page-Tricina para separación de proteínas de bajo peso molecular.....	77
4.2.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia de exclusión molecular (HPLC-SEC).....	79
4.2.4. Hidrofobicidad superficial y solubilidad.....	82
Conclusiones parciales de la sección 4.2.....	85
4.3. Contenido de aminoácidos de las muestras proteicas por HPLC.....	86
Conclusiones parciales de la sección 4.3.....	92
4.4. Contenido de compuestos con actividad bioquímica con potencial fisiológico.....	94
4.4.1. Contenido de compuestos fenólicos en extractos metanólicos y acuosos.....	94
4.4.2. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> en extractos metanólicos y acuosos.....	100
Conclusiones parciales de la sección 4.4.....	108
4.5. Propiedades de espumado.....	109

4.5.1. Capacidad de espumado.....	109
4.5.2. Análisis de estabilidad de espumas con Turbiscan Classic. Cinética de drenaje y desproporción.....	111
4.5.3. Análisis de estabilidad de espumas con el método volumétrico. Fenómeno de colapso	120
Conclusiones parciales de la sección 4.5.....	122
5. CONCLUSIONES.....	123
6. BIBLIOGRAFÍA.....	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del grano de amaranto.....	5
Figura 2. Foto del grano de amaranto.....	6
Figura 3. Daños y enfermedades causadas por las especies reactivas de oxígeno.....	17
Figura 4. Mecanismo de autoxidación lipídica.....	18
Figura 5. Mecanismos de interrupción de la autoxidación.....	19
Figura 6. Acción de los antioxidantes fenólicos.....	20
Figura 7. Ecuación de reducción del radical libre DPPH.	30
Figura 8. Succión capilar del líquido del centro de la película hasta los bordes de Plateau.....	35
Figura 9. Flotación de las burbujas y acumulación en la parte superior.....	36
Figura 10. Aspecto de la evolución de una espuma por difusión gaseosa intra- burbuja...	36
Figura 11. Diagrama de obtención de concentrado proteico de amaranto.	45
Figura 12. Principio de funcionamiento del Turbiscan Classic.....	59
Figura 13. Cinéticas y parámetros del drenaje y la desproporción representados por las Ecuaciones 8 y 9.....	62
Figura 14. Distribución de proteínas en las distintas etapas respecto a las proteínas iniciales en el método tradicional.....	67
Figura 15. Distribución de proteínas en la etapa de solubilización de proteínas en el método alternativo con extracción ácida inicial.....	69
Figura 16. Distribución de proteínas en las etapas de concentración por ultrafiltración y de precipitación isoeléctrica del método alternativo con extracción ácida inicial.....	69

Figura 17. Distribución de proteínas del extracto ácido concentrado por ultrafiltración del método alternativo con extracción ácida inicial.....	70
Figura 18. Electroforesis SDS-Page de las muestras, A: HDA, CPA2, Suero, RAl, EAC, RAc y PAc; B: CPA1 y patrones electroforéticos	73
Figura 19. Electroforesis SDS-Page-Tricina de la CPA2, RAl y CPA1.....	78
Figura 20. Electroforesis SDS-PAGE-Tricina del EA, EAC, RAc, PAc y Suero.	20
Figura 21. Perfiles HPLC de exclusión molecular de la HDA, RAl, CPA2 y CPA1.....	80
Figura 22. Perfiles HPLC de exclusión molecular de: HDA, CPA2 y Suero.....	81
Figura 23. Perfiles HPLC de exclusión molecular de: HDA, EAC, RAc y PAc.....	82
Figura 24. Porcentajes de diferencia del contenido de cada aminoácido en el CPA1, CPA2, RAl y Suero con respecto a la HDA.	91
Figura 25. Porcentajes de diferencia del contenido de cada aminoácido en el EA, EAC, RAc y PAc con respecto a la HDA.	93
Figura 26. Correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos acuosos y la concentración de proteínas de los mismos.	98
Figura 27. Correlación entre el contenido de compuestos fenólicos de las muestras y sus respectivas actividades antioxidantes.....	107
Figura 28. Correlación entre el porcentaje de proteínas en el extracto acuoso de las muestras y sus respectivas actividades antioxidante.	107
Figura 29. Perfiles de BackScattering y Transmitancia de una espuma típica de proteínas de amaranto.....	113
Figura 30. Cinética de drenaje de líquido de las espumas: altura relativa de líquido drenado en función del tiempo. Espumas de CPA1, CPA2 y WPI	115
Figura 31. Cinética de drenaje de líquido de las espumas: altura relativa de líquido drenado	

en función del tiempo. Espumas de CPA 2, RA1 y RAc.....	116
Figura 32. Cinéticas de drenaje de líquido de las espumas: altura relativa de líquido drenado en función del tiempo. Espumas de CPA1, H1 y H2.....	116
Figura 33. Cinética de desproporción de burbujas de CPA1, CPA2 y WPI.....	119
Figura 34. Cinética de desproporción de burbujas de CPA2, RA1 y RAc.....	119
Figura 35. Cinética de desproporción de burbujas de CPA1 y los hidrolizados H1 y H2.	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido proteico y PPI de las muestras.....	66
Tabla 2. Índice de hidrofobicidad y porcentaje de solubilidad en el buffer de espumado de las muestras proteicas.....	82
Tabla 3. Composición aminoacídica y escore químico de la HDA en comparación con el patrón de aminoácidos esenciales de la FAO/WHO y datos bibliográficos.....	88
Tabla 4. Composición aminoacídica del CPA 1, CPA 2, Suero, RAI, EA, EAC, RAc y PAc.....	90
Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos metanólicos y acuosos de las distintas muestras. Concentración proteica en los extractos acuosos.....	96
Tabla 6. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos metanólicos y acuosos de las distintas muestras.....	101
Tabla 7. Valores de Overrun de las espumas preparadas con las distintas muestras proteicas.....	110
Tabla 8. Parámetros correspondientes a la cinética de drenaje determinados por el método óptico (Turbiscan Classic).....	114
Tabla 9. Parámetros correspondientes a la cinética de desproporción determinados por el método óptico (Turbiscan Classic).....	118
Tabla 10. Porcentaje de volumen de espuma que se mantiene luego de una hora (%VE).....	121

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<i>A</i>	Absorbancia
a	Parámetro de desproporción
<i>A</i> [·]	Radical estable formado por el antioxidante
AAAB	Ácido alfa - aminobutírico
AA _M	Concentración del aminoácido en la muestra
AA _{HDA}	Concentración del aminoácido en la HDA
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolina-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AH	Antioxidante
AIDS	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
Alb-1	Albúmina 1
Alb-2	Albúmina 2
ANS	1-anilinaftaleno-8-sulfonato
AOAC	Asociación de Química Analítica Oficial
ArOH	Antioxidante fenólico
ArO [·]	Radical estable formado por el antioxidante fenólico
b	Parámetro de desproporción
BS	Back Scattering o Retrodispersión
BS _{0max}	Back Scattering inicial
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CA, USA	California, Estados Unidos
CELSS	Sistema Soporte de la Vida Ecológica Controlada

CPA1	Concentrado proteico de amaranto obtenido por método tradicional
CPA2	Concentrado proteico de amaranto obtenido por método alternativo de precipitación isoelectrica
d.i.	Diámetro interno
D.S.	Desviación Estándar
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EA	Extracto ácido
EAC	Extracto ácido clarificado
EAG	Equivalentes de ácido gálico
Ec.	Ecuación
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ET	Equivalentes de Trolox
FAO	Organización de Agricultura y Alimentos
WHO	Organización de la Salud Mundial
FRAP	Ensayo de Poder de Reducción Férrico
GH	Grado de hidrólisis
h	Altura de líquido medida con el equipo Turbiscan Classic
h_0	Altura que corresponde al tapón del tubo del Turbiscan Classic
$h_{d(t)}$	Altura relativa de líquido drenado en tubo del Turbiscan en función del tiempo
h_{max}	Altura máxima de líquido drenado en 60 minutos
H1	Hidrolizado de proteínas de amaranto, 8,08 % de GH
H2	Hidrolizado de proteínas de amaranto, 16,8 % de GH
H \cdot	Radical hidrógeno

HDA	Harina desgrada de amaranto
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
HPLC-SEC	Cromatografía líquida de alta performance de exclusión molecular
IF	Intensidad de Fluorescencia
k	Parámetro de desproporción
kDa	Unidad de peso molecular kilo-Dalton
LDLs	Lipoproteínas de baja densidad
L_f	Altura inicial de espuma medida en el tubo de Turbiscan Classic
LSD	Mínima diferencia significativa
M	Patrones electroforéticos
n	Parámetro de carácter sigmoideo de la ecuación cinética de drenaje
N.D.	No Determinado
NAS	Academia de Ciencias de los Estados Unidos de Norte América
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NO^\cdot	Radical óxido nítrico
N.S.I.	Índice de Solubilidad de Nitrógeno
OH^\cdot	Radical hidroxilo
ONOO^\cdot	Peroxinitrito
ORAC	Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno
P	Probabilidad ($<0,05$)
P. Eb.	Punto de ebullición
p/v	Peso en volumen
PAC	Permeado ácido
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida

P.D.I.	Índice de Dispersabilidad de la Proteína
pI	Punto Isoeléctrico de la proteína
PITC	Fenilisotilcianato
PM	Peso molecular
PP _i	Porcentaje de proteína con respecto a la harina desgrasada de amaranto
RH	Lípido
R [·]	Radical lipídico alquilo
RO [·]	Radical lipídico alcoxilo
RO ₂ [·]	Radical lipídico peroxilo
ROO [·]	Radical lipídico peroxilo
ROH	Hidróxido lipídico
ROOH	Hidroperóxido lipídico
ROOR	Éster
R-R	Alcano
R1, R2	Reacciones
R ²	Coefficiente de correlación al cuadrado
RAc	Retenido ácido
RAI	Concentrado proteico de amaranto obtenido por método alternativo de ultrafiltración
Rf	Movilidad de la proteína relativa al frente de migración
RFI	Intensidad relativa de fluorescencia
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
S ₀	Índice de hidrofobicidad superficial de la proteína

SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
S.Q.	<i>Score</i> químico
T	Transmitancia
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media de drenado
TACC	Trigo Avena Centeno Cebada
TAH	Reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TE	Reacciones de transferencia de electrón
TEAC	Ensayo de la Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox
TFA	Ácido Trifluoroacético
TRIZMA	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UV	Ultra Violeta
V_1	Volumen de líquido inicial a espumar
V_e	Volumen de espuma obtenido inmediatamente luego del batido, medido en el recipiente de obtención de la espuma
V_{Ei}	Volumen de espuma inicialmente trasvasado al tubo de medida del equipo Turbiscan Classic
V_{Ef}	Volumen de espuma final que se mantiene luego de 60 minutos, medido en el tubo del equipo Turbiscan Classic
$\%V_E$	Porcentaje de espuma que se mantiene luego de 1 hora
WPI	Aislado de proteínas de suero lácteo

RESUMEN

En los últimos años se ha incrementado el interés por el cultivo de amaranto dado su alto contenido de proteína, como también sus ventajas agronómicas (alto rendimiento, resistencia a la sequía y contra período de producción). Las proteínas de amaranto tienen interés nutricional por su particular balance de aminoácidos esenciales, con importante contenido de lisina y azufrados, resultando especialmente útiles para complementar proteínas de cereales y leguminosas. En general la mayoría de los trabajos de aislamiento de proteínas alimenticias se basan en el método tradicional de extracción a pH alcalino con la posterior precipitación isoelectrica de las mismas. En este trabajo, se caracterizaron distintas muestras proteicas de *Amaranthus mantegazzianus*, obtenidas utilizando la metodología tradicional de aislamiento de proteínas a nivel de planta piloto y métodos alternativos de separación: extracción ácida inicial y extracción alcalina de proteínas combinadas con precipitación isoelectrica o ultrafiltración. Por otro lado, también se obtuvieron dos hidrolizados de diferentes grados de hidrólisis a partir del concentrado del método tradicional. Se determinó el contenido proteico de las muestras, los balances de masas y sólidos totales para cada etapa de separación, y se analizó el rendimiento en proteína de los distintos métodos de separación aplicados. En este sentido, con el método tradicional se obtuvo el mayor rendimiento de extracción (19,1%) y la menor concentración proteica (50,9%); con el método alternativo con precipitación isoelectrica se obtuvo la mayor concentración de proteínas (73,1%) y un rendimiento más bajo (7,4%) respecto al método tradicional, mientras que con la ultrafiltración se obtuvo menor concentración proteica (52,5%) y el menor rendimiento (6,3%). La caracterización fisicoquímica de las

muestras se llevo a cabo con distintos métodos y técnicas: electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-Page) y con Tricina para separación de proteínas de bajo peso molecular, cromatografía de exclusión molecular (HPLC-SEC), determinación de solubilidad de proteínas e hidrofobicidad superficial. Además se cuantificó el contenido de aminoácidos de las muestras, el contenido de compuestos fenólicos en extractos acuosos y metanólicos y sus actividades antioxidantes. Por último se evaluaron las propiedades de espumado: capacidad de espumado y estabilidad de las espumas. En los resultados encontrados se puede mencionar que la harina de *A. mantegazzianus* mostró que es deficiente en leucina y lisina de acuerdo a lo requerido por la FAO/WHO (1991), y presentó un mayor contenido de metionina, histidina y tirosina respecto a datos bibliográficos de otras variedades con los que se comparó. Se destaca en esta variedad un alto contenido de compuestos fenólicos y con buena capacidad antioxidante. En el perfil electroforético y HPLC se observaron diferencias de bandas y picos entre las muestras. Los concentrados obtenidos por precipitación isoelectrica presentaron agregados de elevado peso molecular que no aparecieron en el perfil del concentrado por ultrafiltración. Este último, se destaca por su contenido de lisina que se concentró 80 % respecto a la harina desgrasada. El Suero de la precipitación isoelectrica se destacó entre las muestras por su alta concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Los compuestos fenólicos se lograron extraer mayoritariamente en la extracción ácida inicial resultando fracciones con alto contenido de estas sustancias y actividad antioxidante. La muestra con mejores propiedades de espumado fue el retenido de ultrafiltración obtenido del extracto ácido inicial. La hidrólisis enzimática aumentó la solubilidad, el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del concentrado, aunque fue excesiva para mejorar las propiedades de espumado.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas desempeñan un papel esencial en la alimentación humana por su aporte de aminoácidos a la dieta y por sus propiedades funcionales, las que aportan características específicas en los alimentos.

En general, las proteínas con mejores propiedades pertenecen a fuentes animales debido a que cumplen con los requerimientos nutricionales para humanos y presentan funcionalidades adecuadas pero debido al alto costo de las mismas, las proteínas vegetales son el principal componente dietario para gran parte de la población mundial.

Así también, en los últimos años, han aumentado en la población mundial los casos de intolerancia a la leche y de alergia a productos animales, lo que resultó en un interés por dietas que no contengan proteínas animales (Salcedo-Chávez et al., 2002).

En países en desarrollo, los cereales y las legumbres son la fuente más importante de proteínas alimentarias, ya que comprenden el 95 % de su dieta. Por su parte los granos de cereales proveen el 50 % del requerimiento proteico básico del hombre (Marcone y Yada, 1991). Las proteínas de las legumbres (ej. soja) están disponibles en gran medida y son de buena calidad pero son deficientes en aminoácidos azufrados y también se han presentado casos de alergias a estas proteínas. En años recientes, el crecimiento de la población mundial impulsó el interés por proteínas de menor costo y de buena calidad nutricional que complementen a las de cereales y legumbres. Esto incrementó la investigación de nuevas fuentes alternativas de proteínas (Segura-Nieto et al., 1992; Drzewiecki et al., 2003; Barba de la Rosa et al., 2008).

El grano de amaranto es uno de los 36 cultivos alimenticios más prometedores del mundo según la US National Academy of Science (Konishi y Yoshimoto, 1989), teniendo un gran potencial para convertirse en una importante fuente de proteínas dietarias.

El cultivo de amaranto es de gran interés para la nutrición humana, la comunidad científica, la industria de alimentos y los consumidores por sus características agronómicas de adaptabilidad, nutricionales, funcionales y tecnológicas. El conocimiento de sus componentes, los procesos de obtención, su caracterización fisicoquímica y sus propiedades funcionales constituye un factor clave en el desarrollo de nuevos procesos y alimentos.

1.1. Aspectos generales del Amaranto

El amaranto o Kiwicha es una planta originaria de América Central, muy común en la dieta pre-colombina (Tosi et al., 2001; Marcílio et al., 2003). En las últimas décadas, no sólo se ha cultivado en México y América Central sino también se expandió por América Latina, Asia, Europa y algunos países de África (Escudero et al., 2004). Actualmente el principal productor es China con 150 mil has. cultivadas, seguida por India y Perú (1.800 has.), México (900 has.) y Estados Unidos (500 has).

En Argentina su cultivo se practicaba originalmente en Jujuy (Purmamarca, Humahuaca), Salta (Pampa Grande), Tucumán y Catamarca, en pequeñas parcelas cerca de viviendas de agricultores. En la actualidad la siembra se ha concentrado en las provincias de Córdoba y San Luis, siendo su producción relativamente baja ocupando cerca de 50 has. a nivel nacional. En la provincia de Santa Fe existe una pequeña producción en la localidad de Reconquista.

El amaranto pertenece a la clase de las dicotiledóneas y familia de las *amarantáceas*. Comprende plantas anuales o perennes de origen tropical, crece en tierras poco fértiles y con una mínima cantidad de agua. Es un cultivo altamente eficiente que puede prosperar en condiciones agroclimáticas adversas, tales como la sequía, altas temperaturas; es resistente a las plagas y es un buen transformador de energía solar. Presenta un rápido crecimiento y habilidad de producir gran cantidad de biomasa en espacios reducidos (Bressani, 1989; Guillen-Portal et al., 1999; Coelho, 2006). Todo esto gracias a que posee un metabolismo C4 que le permite aumentar la productividad y hacer un eficiente uso del agua (Becker, 1989; Aphalo et al., 2004). De acuerdo a su variedad, puede alcanzar alturas de 0,5 a 3 metros; posee hojas anchas y abundantes de color brillante, espigas y flores púrpuras, naranjas, rojas y doradas. Además, se puede aprovechar de múltiples formas, como grano, verdura o forraje (Becerra, 2000, Escudero et al., 2004; Martirosyan et al., 2007).

El grano de amaranto (Figura 1), es considerado como un pseudocereal, debido a sus características y propiedades semejantes a la de los cereales (Becker, 1989; Breene, 1991; Tosi et al., 2001; Marcílio et al., 2003). Su principal componente es el almidón, que representa entre el 50 % y el 66 % de su peso (Becker, 1989; Breene, 1991; Tosi et al., 2001; Escudero et al., 2004); con características especiales. El diámetro del granulo oscila entre 0,8 a 2,5 μm con forma esférica o poligonal (López et al, 1994) y con una baja proporción de amilosa lo que lo hace un almidón waxy, de baja o nula retrogradación.

Sin embargo, el aspecto que destaca en su composición nutricional son las proteínas y los lípidos. El contenido de lípidos es de 3,1 a 11,5 % (Becker, 1989; Breene, 1991; Tosi et al., 2001; Marcílio et al., 2003). Las cantidades de fibras alimentarias encontradas es de 14,2%, donde el 8,1 % corresponde a fibras insolubles y el 6,1 % a las fibras solubles. El

amaranto también posee altos niveles de calcio (187 mg/100 g), fósforo (455 mg/100 g), hierro (10 mg/100 g), potasio (420 mg/100 g), magnesio (288 mg/100 g), zinc (3,8 mg/100 g), cobre (0,9 mg/100 g), sodio (32 mg/100 g) y riboflavina (0,21 mg/100 g) comparados con los encontrados en cereales (Becker, 1989). Su contenido de proteínas es de 12 a 22 %, mayor al que presenta el trigo (12 - 14 %), el arroz (7 - 10 %) y el maíz (9 - 10 %) (Becker, 1989; Breene, 1991; Barba de la Rosa et al., 1992; Segura-Nieto et al., 1992; Tosi et al., 2001; Escudero et al., 2004). Además, las proteínas del amaranto presentan un apreciable valor biológico ya que contienen en buena proporción aminoácidos esenciales, como son la lisina, valina, metionina, fenilalanina y treonina (Becker, 1989; Marcone y Yada, 1991). Destacándose un alto contenido de lisina (3,2 - 6,4%) comparado con aquellos encontrados en los cereales más comunes (2,2 - 4,5 %) (Gorinstein et al., 1998). La concentración de amino ácidos azufrados (2,6 - 5,5 %) es mayor al que presentan las legumbres de mayor importancia tales como arvejas, frijoles y soja (1,4 %).

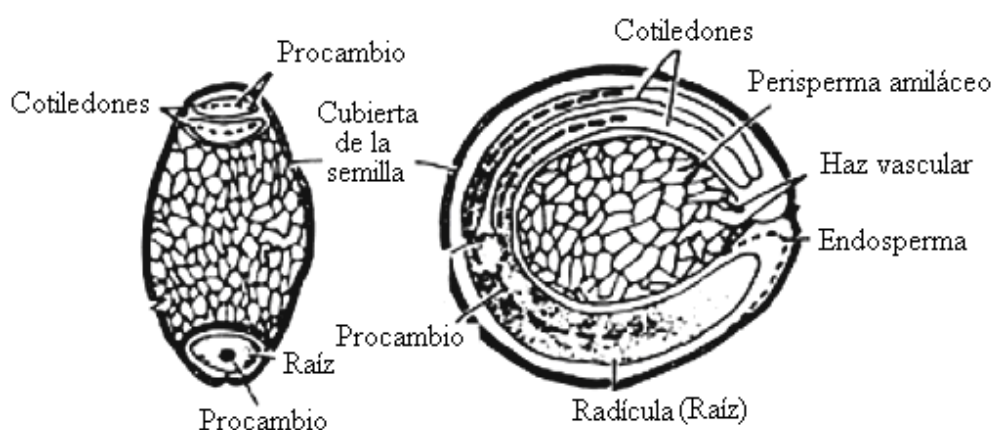


Figura 1. Estructura del grano de amaranto

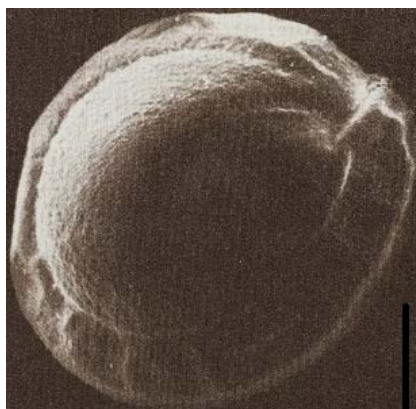


Figura 2. Foto del grano de amaranto.

Los granos de amaranto son un complemento nutricional óptimo y "balanceado" en comparación con los cereales convencionales. Por estas características, desde 1979 la Academia de Ciencias de los Estados Unidos de Norte América (NAS, por sus siglas en inglés) y la Organización para la Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) consideran al amaranto, como uno de los cultivos en el mundo con un elevado potencial para su explotación económica y nutricional a gran escala (Konishi y Yoshimoto, 1989). Así mismo, lo calificaron como uno de los mejores alimentos de origen vegetal para consumo humano. También el amaranto fue seleccionado por la NASA para alimentar a los astronautas por su alto valor nutritivo, por su aprovechamiento integral, por la brevedad de su ciclo de cultivo y por su capacidad de crecer en condiciones adversas. Por todo ello, fue calificado como un cultivo CELSS (Controlled Ecological Life Support System: la planta remueve el dióxido de carbono de la atmósfera y, al mismo tiempo, genera alimentos, oxígeno y agua para los astronautas), o sea un sistema de apoyo para la vida con control ecológico (Asociación mexicana de amaranto, 2003).

Las harinas de amaranto pueden presentar diferente composición en función del grado de extracción, debido a la mayor concentración de nutrientes en el pericarpio y en el germen comparado con el grano entero. El grano entero está compuesto por 18,5 % de proteínas, 7,4 % de lípidos, 3,3 % de fibras y 3,2 % de cenizas, en cuanto al pericarpio y/o al germen contienen 42,0 % de proteínas, 19,2 % de lípidos, 7,7 % de fibras y 7,0 % de cenizas. El perispermo tiene básicamente almidón en forma de amilopectina con el 7,7 % de proteínas, 2,3 % de lípidos, 0,9 % de fibras y 1,2 % cenizas (Betschart et al., 1981).

1.1.2. Características fisicoquímicas de las proteínas del amaranto

Las proteínas de amaranto son consideradas una excelente alternativa o complemento de los cereales y legumbres debido a su composición bien balanceada de aminoácidos esenciales. La concentración de aminoácidos presentes en las proteínas de amaranto puede considerarse próxima al patrón de la FAO/WHO-1973 (Becker, 1989; Marcone y Yada, 1991).

Una característica importante de las proteínas de amaranto es que han sido utilizadas en dietas para personas con la enfermedad celíaca. Esta dolencia es caracterizada por una sensibilidad a las fracciones de prolaminas de los cereales, particularmente hipersensibilidad a las gliadinas del trigo. El contenido de prolamina en las proteínas de amaranto es menor al 0,01 % en algunas especies, y estas prolaminas son distintas a las de los cereales TACC (trigo, avena, cebada y centeno) lo que torna al amaranto con un gran potencial para la producción de alimentos para celíacos (Becker, 1989; Tosi et al., 2001).

Por otro lado, la calidad de las proteínas no depende sólo de la composición de aminoácido sino también de la biodisponibilidad (digestibilidad). La digestibilidad proteica,

la disponibilidad de lisina y la utilización proteica neta de las proteínas de amaranto son definitivamente superiores a las de los cereales y similares a las de la caseína (Salcedo-Chávez et al., 2002).

Las principales fracciones proteicas en el grano de amaranto son las albúminas, globulinas y glutelinas, las cuales difieren en sus solubilidades. Existe una controversia sobre cual de estas fracciones es el principal componente. La proporción de las diferentes fracciones en un aislado proteico de amaranto y sus propiedades funcionales y nutricionales particulares depende del método de preparación utilizado (Martínez y Añón, 1996).

Bressani y Garcia-Vela (1990) evaluaron las tres especies más difundidas de amaranto (*A. caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*). Cuando se utilizó una solución de NaCl como primer solvente de extracción y luego agua, la fracción de globulinas fue predominante en el grano, siendo 41 % del total de proteínas, seguida de glutelinas (31 %), prolaminas (10 %) y albúminas (8,4 %). En tanto, si el orden de extracción fuera invertido, la fracción albúmina pasa a ser un 20 % de las proteínas y las globulinas un 19 %.

Con el uso de otras metodologías de extracción, como la descrita por Duarte- Correa et al. (1986), usando una compleja técnica de fraccionamiento, se obtuvo la siguiente distribución: 65 % de albúminas, 17 % de globulinas, 11 % de prolaminas y 7 % de glutelinas. Estas mismas proporciones fueron obtenidas por Breene (1991).

Otros autores concuerdan que las mayores fracciones son de albúmina y globulinas y que la menor fracción proteica es de prolaminas (Barba de la Rosa et al., 1992; Lehmann, 1996). Respecto a la variedad *Amaranthus mantegazzianus* no se han reportado muchos estudios y la información disponible acerca de su composición y características es escasa.

Las albúminas han sido citadas como proteínas de baja masa molecular (133,4 kDa), involucradas en diferentes funciones biológicas (Avanza et al., 2005b; Avanza y Añón,

2007). Se han descrito dos tipos de albúminas en el amaranto: albúminas -1, extraída de la harina con soluciones acuosas o sales, y albúmina - 2, obtenida por extracción acuosa después de la extracción de la albúmina – 1 y las globulinas (Gorinstein et al., 1996; Martínez et al., 1997).

La fracción de globulinas está compuesta de globulina– 11S (amarantina), globulina– P (globulina I o albúmina – 2) y cantidades pequeñas de globulina– 7S (conamarantina) (Avanza y Añón, 2007). La globulina– 11S presenta una masa molecular (389 kDa) y características moleculares semejantes a las globulinas de las leguminosas (Marcone y Yada, 1991 y 1992; Castellani et al., 2000), con una estructura cuaternaria dodecamérica formada por subunidades ácidas (peso molecular de 30 a 40 kDa) y subunidades básicas (peso molecular alrededor de 20 kDa) unidas por enlace disulfuro (Segura Nieto et al., 1994). La globulina– P está compuesta de moléculas unitarias con masa molecular y composición de polipéptidos (polipéptido A, B y subunidades polipeptídicas M) semejante a la globulina– 11S. En tanto que la globulina- P posee alta entalpía de desnaturalización, baja solubilidad en solución acuosa neutra, tiende a polimerizar y contiene mayor proporción de subunidades monoméricas de 54 kDa que la globulina– 11S (Martínez et al., 1997). La globulina- 7S de amaranto ha sido caracterizada como un hetero- oligómero con masa molecular de 186 kDa formada por ocho subunidades unidas por enlaces no covalentes (Marcone, 1999). Según Segura- Nieto et al. (1994), las glutelinas presentaron características moleculares semejantes a la globulina-11S

1.2. Métodos de concentración de proteínas

Las proteínas vegetales pueden ser extraídas y procesadas para obtener aislados proteicos. El uso de éstos ha aumentado en la industria alimenticia debido a su alto valor nutricional, su buena funcionalidad, su alto nivel proteico (mayor del 90 % en base seca en el caso de algunos aislados de legumbres) y su bajo contenido de factores antinutricionales (Cordero de los Santos et al., 2005). En este sentido, los aislados proteicos influyen en el valor nutricional de los productos alimenticios y las propiedades funcionales de los mismos, determinan su uso final y colaboran en el diseño, innovación, formulación de productos nutritivos.

Para ser usadas en la industria alimenticia, las proteínas aisladas deben poseer un amplio rango de propiedades funcionales, las cuales están estrechamente relacionadas a su estructura. Las principales fracciones proteicas de los granos de amaranto parecen ser buenas candidatas para alcanzar este fin debido a su variedad en propiedades estructurales y fisicoquímicas (Scilingo et al., 2002).

Se han publicado varios estudios sobre distintos procedimientos para obtener concentrados y aislados proteicos de amaranto y sobre la obtención de distintas fracciones proteicas y el efecto de las condiciones utilizadas en la preparación sobre las propiedades funcionales, fisiológicas y tecnológicas de los aislados (Marccone y Yada, 1991; Martínez y Añón, 1996; Fidantsi y Doxastakis, 2001; Scilingo et al., 2002; Salcedo-Chávez et al., 2002; Cordero de los Santos et al., 2005; Avanza et al., 2005a). Todos estos estudios han investigado la concentración de proteínas a nivel laboratorio, siendo escaso o inexistente el estudio de obtención de concentrados a escala piloto. Esta etapa es clave como un salto de escala intermedio para llegar a establecer el “know how” de un proceso industrial.

1.2.1. Precipitación isoelectrica

La metodología tradicional de extracción alcalina y precipitación isoelectrica, es la elegida por diversos autores para la obtención de aislados proteicos de amaranto (Paredes-López et al., 1988; Martínez y Añón, 1996; Salcedo-Chávez et al., 2002).

Según Paredes-López et al. (1988), el mayor rendimiento posible para la producción de aislados proteicos de amaranto (*A. hypochondriacus*) se obtiene cuando se emplea pH 11,0 para la extracción y pH entre 4,5 y 5,0 para la precipitación.

Por su parte, Martínez y Añón (1996) evaluaron el efecto de las condiciones de extracción y la estabilidad térmica de los aislados proteicos de amaranto. De acuerdo a sus resultados, la composición de las principales fracciones proteicas del grano de amaranto y el grado de desnaturalización de los aislados proteicos dependen y pueden ser controlados eligiendo diferentes combinaciones de pH de extracción y precipitación. Estos autores encontraron un óptimo de extracción a pH 9,0 y de precipitación a pH 5,0.

Más recientemente, Salcedo-Chávez et al. (2002), optimizaron el proceso de precipitación isoelectrica para la producción de aislados proteicos de *Amaranthus cruentus* empleando diferentes pH de extracción y precipitación y analizando los aislados resultantes en cuanto a su contenido proteico, temperatura y entalpía de desnaturalización así como un índice de color como criterios de optimización. Las mejores condiciones de procesamiento para las variables evaluadas fueron a pH de extracción de 9,2 u 8,0 y precipitación a pH 5,7.

1.2.2. Ultrafiltración

El empleo de membranas semipermeables en laboratorio y equipos de ultrafiltración a escala planta piloto o industrial ha sido propuesto para la separación de componentes y particularmente para la concentración y purificación de proteínas de oleaginosas (Lawhon et al., 1978 y 1981). La ultrafiltración preserva las propiedades nativas de las proteínas en mayor extensión que la precipitación (Fuhrmeister y Meuser, 2003), porque no son empleados reactivos químicos que pueden provocar una desnaturalización proteica. Además de eso, la ultrafiltración no precisa ser seguida por diálisis, etapa necesaria para remover sales y otras sustancias utilizadas o formadas durante la precipitación. Por esto, utilizar un método de concentración de proteínas de amaranto por ultrafiltración como proceso alternativo de la precipitación isoelectrica, podría resultar provechoso para aumentar el rendimiento en proteínas y pureza de los aislados, así como para mejorar sus funcionalidades.

1.2.3. Otros métodos

Otros métodos de extracción han sido estudiados, como ser la utilización de diálisis como proceso de concentración de proteínas de amaranto. Fidantsi y Doxastakis (2001), compararon este método con la precipitación isoelectrica. Observaron que los aislados preparados con precipitación isoelectrica contenían principalmente globulinas y una considerable cantidad de polisacáridos pero no albúminas, mientras que los aislados preparados por el método de diálisis contenían todas las fracciones de globulinas y albúminas. A la vez, ambos aislados resultaron efectivos agentes estabilizantes de espumas y emulsiones.

La micelación fue otro método alternativo utilizado por Cordero de los Santos et al. (2005) para producir aislados proteicos de amaranto. En su estudio, obtuvieron mayor rendimiento proteico (56,4 %) y contenido de proteína (93,1 %) con la precipitación isoelectrica que con la micelación (15,9 y 80,2 %, respectivamente). Los tratamientos a pH extremos en la precipitación isoelectrica ocasionaron desnaturalización parcial de las proteínas. En cambio, los tratamientos moderados en la micelación implicaron una menor desnaturalización proteica y el mejoramiento de algunas propiedades funcionales.

1.3. Hidrólisis de proteínas

Una desventaja de las proteínas de amaranto es que muestran una solubilidad bastante baja en solventes acuosos, que limitan su uso en la industria alimenticia (Konishi y Yoshimoto, 1989; Segura-Nieto et al., 1994). Una alternativa para mejorar la solubilidad es la hidrólisis enzimática controlada, ampliamente usada para alterar las propiedades funcionales de las proteínas (Adler-Nissen, 1976; Castellani et al., 2000; Scilingo et al., 2002). Luego de la hidrólisis, las proteínas disminuyen su tamaño, conformación y también la fuerza de los enlaces intra- e inter- moleculares. Las modificaciones dependen fuertemente de la enzima proteolítica utilizada, las condiciones de hidrólisis y el grado de hidrólisis alcanzado. Estas condiciones deben ser cuidadosamente seleccionadas para su aplicabilidad en la formulación de alimentos.

1.4. Actividad antioxidante de compuestos vegetales

La evaluación de la actividad antioxidante de diferentes fuentes naturales está siendo objeto de investigación por los diversos beneficios que se obtienen al incorporar sustancias

con capacidad antioxidante en la dieta humana. Estudios epidemiológicos demostraron que el consumo de dietas ricas en alimentos y bebidas de origen vegetal está asociado a la reducción de la aparición de enfermedades crónico- degenerativas. Tales alimentos son fuentes de sustancias como carotenoides y polifenoles que pueden actuar como agentes antioxidantes, reduciendo los daños causados por especies reactivas de oxígeno, formadas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Por otro lado, los antioxidantes sintéticos han levantado sospechas de ser cancerígenos, dirigiéndose las investigaciones a los antioxidantes naturales, principalmente a los encontrados en plantas (Singh et al., 2002). El objetivo de estos estudios es identificar extractos o fracciones de materiales naturales que posean sustancias con actividad antioxidante y que puedan ser incorporadas en la dieta, ya sea constituyendo parte del alimento, sustituyendo a los antioxidantes artificiales utilizados o actuando en conjunto con los mismos, reduciendo su concentración (Soares, 2002). La capacidad antioxidante de los extractos o fracciones de plantas es, en general, el efecto complementario de dos o más compuestos antioxidantes actuando de acuerdo a diferentes mecanismos de acción. Por esta razón es mayor el interés práctico en extractos y fracciones vegetales como aditivos alimenticios, que en los compuestos aislados (Klimczak y Pacholek, 2002).

Un antioxidante biológico es definido como “cualquier sustancia, que presente en bajas concentraciones en relación al sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación de este sustrato” (Benzie y Strain, 1996). Así, los antioxidantes actúan como protectores de la oxidación de biomoléculas por radicales libres e impiden la propagación de la reacción oxidativa en cadena provocada por los mismos (Halliweell y Gutteridge, 1998; Fang et al., 2002). Para ser consideradas antioxidantes las sustancias tienen que presentar por lo menos una de las tres propiedades: supresión de la formación de radicales

libres (por quelación de metales o por inhibición de las enzimas generadores de radicales libres), eliminación o desactivación de radicales libres con formación de un producto estable, o participación en procesos de reparación de daños oxidativos (Bourne y Rice-Evans, 1999; Ribeiro, 2005).

En alimentos la oxidación causa variaciones indeseables que pueden llevar tanto a cambios en las características sensoriales como a la reducción del valor nutricional. Por esta razón, los antioxidantes poseen un importante papel en el procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Klimczak y Pacholek, 2002).

En organismos vivos existen dos importantes sustancias generadoras de radicales libres: el oxígeno en estado fundamental (O_2) y el óxido nítrico (NO) (Rover Junior, 2001). Durante el metabolismo tales sustancias pueden generar componentes altamente reactivos denominados especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN).

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) (Ej. radical superóxido (O_2^{\bullet}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y oxígeno singlete (1O_2)) son producidas continuamente en las células como consecuencia tanto del metabolismo aeróbico normal (reacciones bioquímicas oxidativas) como por factores externos (compuestos carcinogénicos y radiaciones ionizantes) (Russo et al. 2002; Mendis, 2005). Estas especies reactivas de oxígeno o radicales libres reaccionan con biomoléculas como proteínas y lípidos, causando daño celular por la peroxidación de lípidos de la membrana, inactivación de las enzimas sulfidrilas, ligación entrecruzada de proteínas o ruptura del ADN (Russo et al. 2002).

Las especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Ej. radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) y peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$)) también son producidas por procesos metabólicos normales del

organismo, como ser la acción de la enzima oxido nítrico sintetasa a partir del aminoácido L-arginina que genera el NO[•] y a partir de la oxidación de éste se produce el peroxinitrito (Marletta, 1988). El potencial tóxico de éstos está relacionado con reacciones que llevan a la formación del radical hidroxilo (HO[•]).

El cuerpo humano posee un sistema de defensa capaz de remover o inactivar *in vivo* las EROs y las ERN por acción enzimática y no enzimática (Nordberg y Arner, 2001). El sistema de defensa enzimático incluye la actividad de enzimas con acción antioxidante, como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa (Sies, 1993; Bonnefoy et al., 2002). El sistema antioxidante no enzimático está compuesto por moléculas de bajo peso molecular como glutatión, ácido úrico, tocoferoles, ácido ascórbico y polifenoles (Nagai et al 2001; Issa et al., 2006). Tales moléculas pueden tener origen endógeno o ser incorporadas a través de la dieta (Sies, 1993).

El estrés oxidativo se refiere al desequilibrio entre la producción de los EROs y la detoxificación de los mismos (Issa et al., 2006). Es en estas condiciones que los radicales libres se tornan dañinos al ser producidos en exceso bajo ciertas circunstancias anormales como inflamación, isquemia, la presencia de iones catalíticos (Ej. Fe⁺²), etc., o cuando disminuyen los niveles de enzimas antioxidantes, o por ambos procesos simultáneamente. Hay evidencias que relacionan el daño oxidativo en células y tejidos con la etiología de varias enfermedades, incluyendo ciertos tipos de cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis), inflamatorias y neurodegenerativas (Parkinson y Alzheimer) (Benzie y Strain, 1996; Rimm, 2002; Russo et al., 2002; Madhujith y Shahidi, 2005; Mendis et al., 2005) (Figura 3). Estudios epidemiológicos ya demostraron una correlación inversa entre el desarrollo de estas enfermedades crónico-degenerativas y el consumo de dietas ricas en frutas y vegetales. Los efectos protectores de estos alimentos

están asociados a la presencia de sustancias antioxidantes. Por ello la ingestión de antioxidantes a través de la dieta tiene una importante función en la prevención de estas enfermedades (Berg et al., 1999).

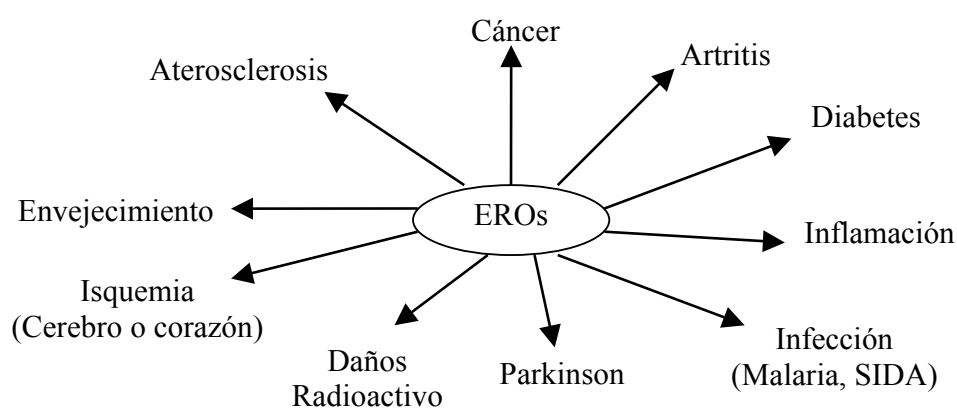


Figura 3. Daños y enfermedades causadas por las especies reactivas de oxígeno (EROs)
(Adaptado de Madhujith y Shahidi, 2005).

1.4.1. Mecanismo de acción de los antioxidantes

La autoxidación es un proceso natural que ocurre entre el oxígeno molecular y los lípidos insaturados presentes en el medio. El mecanismo de autoxidación lipídica es una reacción en cadena, que ocurre en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Reacciones 1 a 6, Figura 4). La reacción puede ser iniciada por la presencia de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), metales de transición, o por la exposición a la luz (Shahidi et al., 1992). Los antioxidantes actúan reduciendo agentes (radical libre terminal), quelando minerales y secuestrando al oxígeno singlete.

Los antioxidantes son clasificados, según su mecanismo de acción, en dos categorías: los antioxidantes preventivos y los que interrumpen la reacción en cadena (Klimczak y Pacholek, 2002). Los preventivos, como las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa y la transferrina, inhiben la formación de los EROs imposibilitando la etapa de iniciación.

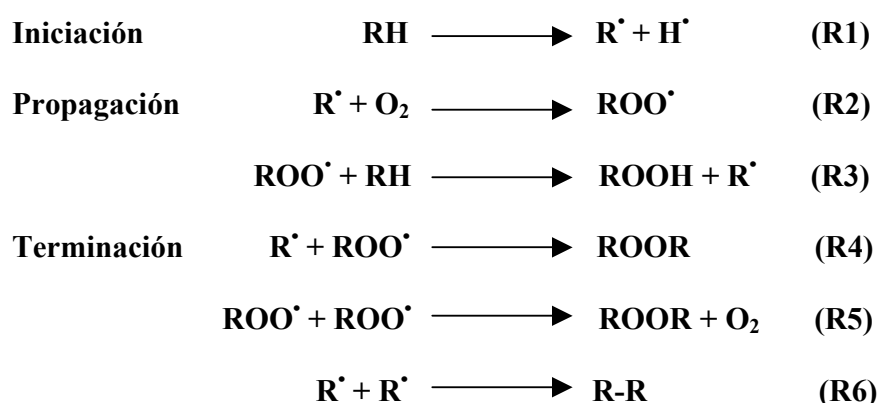


Figura 4. Mecanismo de autoxidación lipídica (Rojano et al., 2008).

Los antioxidantes que interrumpen la reacción oxidativa en cadena (*chain-breaking*), secuestran los radicales importantes en la etapa de propagación, como el radical alcoxilo (RO^\bullet) y peroxilo (RO_2^\bullet), inhibiendo esta etapa del proceso oxidativo. Los antioxidantes *chain-breaking* mas conocidos son: las vitaminas C y E, ácido úrico, bilirrubina, compuestos fenólicos, entre otros (Matthäus, 2002).

Los compuestos capaces de interrumpir la autoxidación pueden actuar por dos vías: la primera involucra la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) (R7, Figura 5), el radical libre capta el átomo de hidrógeno del antioxidante, resultando en la formación de un radical

estable, y así se interrumpe la reacción en cadena; la segunda está basada en la transferencia de un electrón (TE) (Ou et al., 2002).



Figura 5. Mecanismo de interrupción de la autoxidación.

Dentro de los oxidantes incorporadas por la dieta están incluidas macromoléculas lipofílicas e hidrofílicas, con capacidad de actuar en compartimientos biológicos, apolares y polares, respectivamente. Las principales sustancias de este grupo son: tocoferoles, ascorbato, carotenoides y los compuestos fenólicos.

1.4.2. Compuestos fenólicos

Los principales antioxidantes naturales son los compuestos fenólicos extraídos de plantas (Shahidi et al., 1992); éstos constituyen una clase de sustancias representadas por más de 8 mil compuestos diferentes (Martínez-Valverde et al., 2000). Son considerados metabolitos secundarios de las plantas, producidos en respuesta a agentes agresores como la radiación ultravioleta, temperatura, patógenos, etc. (Nsimba et al., 2008). Químicamente son sustancias que poseen en su estructura anillos bencénicos asociados a grupos hidroxilos en diferentes posiciones (Cheynier, 2005). De acuerdo al número de anillos aromáticos y a los elementos ligados a estos, los compuestos fenólicos se dividen en diferentes grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y ligninas.

Los flavonoides, también conocidos como polifenoles son los antioxidantes naturales más ingeridos en la dieta humana, siendo encontrados en las más variadas fuentes como cereales, chocolates, té, café, frutas y productos derivados. Su consumo puede llegar a niveles de 1,0 g/día, sobretodo en las poblaciones de regiones tropicales y subtropicales. Diversos estudios sugieren que la prevención de enfermedades degenerativas, sobretodo cardiovasculares y cáncer, están asociadas a la acción antioxidante de los compuestos fenólicos en los alimentos (Manach et al., 2004).

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades reductoras y estructura química. Estas características desempeñan un papel importante en la reducción o secuestro de radicales libres y quelación de metales de transición, actuando tanto en la etapa de iniciación como en la etapa de propagación del proceso oxidativo (Shahidi et al., 1992). Los antioxidantes fenólicos interfieren en la oxidación lipídica por la rápida donación de átomos de hidrógeno a los radicales libres (R8 y R9, Figura 6).

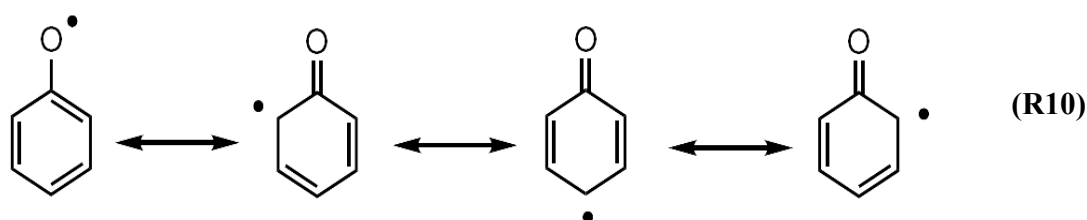
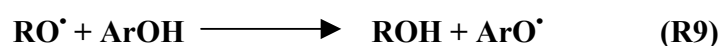


Figura 6. Acción de los antioxidantes fenólicos

Además de excelentes donadores de electrones, los radicales intermediarios formados por la acción antioxidante de los fenólicos son relativamente estables, debido a la resonancia del anillo aromático presente en la estructura de estas sustancias (R10, Figura 6). (Shahidi et al., 1992).

Las investigaciones también apuntan a que los polifenoles pueden interactuar con receptores y/o enzimas relacionadas con las señales de transducción celular (Williams et al., 2004; Sousa et al., 2007).

Un gran número de estudios han encontrado una relación directa entre la capacidad antioxidante de diferentes fuentes naturales y su contenido de compuestos fenólicos, sugiriendo que el contenido total de éstos es un buen indicador de la actividad antioxidante *in vitro* (Velioglu et al., 1996; Kähkönen et al., 1999; Zieliński y Kozłowska, 2000). Czerwinski et al. (2004) analizaron la correlación entre el contenido de compuestos antioxidantes y la actividad antioxidante de harinas de avena y de *A. hypochondriacus*; al respecto, obtuvieron la mejor correlación entre fenoles totales y actividad antioxidante, menores niveles de correlación para antiocianinas, flavonoides y la más baja correlación para las fibras solubles. Gorinstein et al. (2007) compararon la composición y la capacidad antioxidante de algunos cereales y pseudocereales (trigo, soja, *Amaranthus hybridus*, *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, quinoa, arroz); las correlaciones encontradas mostraron que la contribución a la actividad antioxidante de la fibra dietaria es mínima, de los taninos es moderada y de los fenoles totales es decisiva. También Carrasco y Encina-Zelada (2008) y Paško et al. (2009) encontraron una fuerte correlación lineal entre el contenido de compuestos fenólicos totales en semillas de quinoa y amaranto y su actividad antioxidante, lo que indicaría la contribución de los compuestos fenólicos en la capacidad antioxidante de los granos en forma directamente proporcional.

En cambio, otros autores no encontraron justificación para esa asociación. Klimczak y Pacholek (2002) obtuvieron resultados similares para el índice de capacidad antioxidante de dos especies de amaranto (*A. caudatus* y *A. paniculatus*), aunque tanto la composición como el contenido de compuestos fenólicos de las mismas fueron diferentes. Ismail et al. (2004) determinaron el contenido de fenólicos totales y la actividad antioxidante de ciertos vegetales (col, repollo, chalote, espinaca, *Amaranthus spp.*) y sus resultados no mostraron ninguna relación entre estos parámetros. Nsimba et al. (2008) encontraron una correlación muy baja entre el contenido de compuestos fenólicos de semillas de amaranto y quinoa y la actividad antioxidante determinada por diferentes métodos. Según Ozsoy et al. (2009), el contenido total de fenólicos no sería un buen indicador de la actividad antioxidante potencial de un extracto, debido a que la actividad total va a depender del tipo de fenólicos extraídos y posiblemente a algunos antioxidantes no identificados.

Diferentes autores destacan que la contribución de los compuestos fenólicos a la actividad antioxidante dependerá del tipo y concentración de los compuestos fenólicos que estén presentes en la muestra (Ismail et al., 2004; Nsimba et al., 2008; Ozsoy et al., 2009). Cada compuesto fenólico aislado presenta una actividad antioxidante particular y ésta puede estar comprometida (favorecida o disminuida) por la presencia de otros componentes de la muestra (Fernández-Pachón et al., 2006; Villaño et al., 2007). Por otro lado, los compuestos fenólicos pueden estar libres o ligados a otros compuestos lo que también influiría en su capacidad antioxidante (Subba Rao y Muralikrishna, 2002; Kumar et al., 2006). Nsimba et al. (2008) también observó que al determinar la actividad antioxidante con diferentes métodos se obtienen diferentes resultados y la correlación con el contenido de compuestos fenólicos cambia de forma contradictoria.

Los compuestos fenólicos se localizan principalmente en las capas externas de los granos, actuando como protectores contra patógenos y plagas. Por esta razón el contenido de fenoles de las harinas depende del grado de extracción. Los principales fenólicos presentes en los cereales son en general los ácidos fenólicos y en menor medida los taninos y flavonoides.

En los granos de amaranto la presencia y concentración de diferentes compuestos fenólicos varía según las distintas especies y variedades. Se ha detectado diferentes concentraciones de flavonoides como la rutina, isoquercitina y nicotiflorina, y de ácidos fenólicos como el ácido 4-hidroxibenzoico, siríngico y vinílico, en distintas variedades de *A. hypochondriacus* (Barba de la Rosa et al., 2008). En *A. paniculatus* y *A. caudatus* se encontraron, en diferentes concentraciones, la forma libre de los ácidos fenólicos: protocatéquico, p- hidroxibenzoico, cafeico, p-cumárico, ferúlico y salicílico; los ácidos gálico y sináptico fueron detectados en la especie *A. paniculatus* pero no en *A. caudatus* (Klimczak y Pacholek, 2002).

1.4.3. Capacidad antioxidante de proteínas, péptidos y aminoácidos

Las proteínas e hidrolizados proteicos de diversas fuentes han mostrado tener actividad antioxidante contra la peroxidación de lípidos y/o ácidos grasos (Chen et al., 1996 y 1998; Wang y Xiong, 2005; Sakanaka et al., 2004; Je et al., 2005; Mendis et al., 2005). Por ejemplo, los hidrolizados de albúmina de huevo, yema de huevo (Sakanaka et al., 2004), caseína (Suetsuna et al., 2000), suero lácteo (Peña-Ramos et al., 2004), elastina, gelatina de pescado (Kim et al., 2001), gluten de trigo (Zhu et al., 2006), quinoa (Aluko y Monu, 2003), lupín (Yoshie-Stark et al., 2004), soja y proteína miofibrilar han inhibido la

oxidación de lípidos y ácidos grasos insaturados en diferentes sistemas modelos (Wang y Xiong, 2005). A partir de esto se ha investigado la actividad antioxidante de aminoácidos y péptidos para comprender el mecanismo antioxidante.

Los aminoácidos son conocidos como efectivos antioxidantes primarios y sinergistas (Sakanaka et al., 2004). Varios aminoácidos, como tirosina, metionina, histidina, lisina y triptofano son generalmente aceptados como antioxidantes a pesar de sus efectos prooxidativos en algunos casos (Peña-Ramos et al., 2004). Según Wang y Xiong (2005) los residuos de cisteína y triptofano presentes en la proteína de papa y liberados luego de la hidrólisis, podrían actuar como antioxidantes. Se ha observado que la presencia de algunos aminoácidos como leucina, histidina, tirosina y metionina mejoran la actividad secuestrante de radicales libres de ciertos péptidos (Park et al., 2001).

A partir de estudios con péptidos sintéticos diseñados se ha demostrado que la histidina y prolina juegan un rol importante en la actividad antioxidante de péptidos (Peña-Ramos et al., 2004). Especialmente la histidina presenta una fuerte actividad secuestrante de radicales libres, debido a su habilidad de donar protones del grupo imidazol (Mendis et al., 2005 y Wang et al., 2006). La carnosina es un péptido antioxidante muy conocido de las proteínas musculares, habiéndose sugerido que esta propiedad se debe a la actividad secuestrante de radicales y a la inactivación de especies oxígeno singlete por la histidina presente (Mendis et al., 2005 y Wang et al., 2006). Chen et al. (1998) diseñaron péptidos sintéticos conteniendo histidina para examinar la relación entre este residuo y la actividad antioxidante. Estos autores concluyeron que la presencia de histidina en el péptido es decisiva para la actividad antioxidante.

De acuerdo con Cumby et al. (2008), la presencia de aminoácidos aromáticos afecta la capacidad antioxidante de un péptido, en particular en la tirosina el grupo hidroxilo es capaz de donar hidrógeno y estabilizar radicales libres.

Además se puede esperar que un péptido con mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos presente una mayor potencia antioxidante debido a la mayor interacción con el ácido graso (Mendis et al., 2005).

En muchos trabajos, se han obtenido y aislado péptidos bioactivos a partir de diferentes fuentes proteicas, y se ha determinado la secuencia de aminoácidos responsables por la actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante del hidrolizado de soja fue atribuida a péptidos con secuencia Leu-Leu-Pro-His-His (Peña-Ramos et al., 2004). Péptidos diseñados a partir de éste presentaron diferentes actividades antioxidantes, destacándose la importancia tanto de la composición, principalmente en histidina, como de la secuencia del péptido (Chen et al., 1998).

A partir de caseína hidrolizada se separó un péptido con una fuerte actividad sucestrante de radicales libres con secuencia: Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu; evaluando distintas secuencias a partir de ésta, se concluyó que la terminación Glu-Leu es importante para la actividad antioxidante (Suetsuna et al., 2000).

En consecuencia se puede destacar que tanto la composición de aminoácidos como la secuencia de los péptidos son críticas para su actividad antioxidante.

Por otro lado, el tamaño de los péptidos liberados en la hidrólisis también parece estar relacionado a la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos.

La actividad antioxidante de hidrolizados de proteínas de papa se vió que aumentaba marcadamente luego de la hidrólisis y este hecho fue relacionado a la capacidad de

reducción y secuestro de radicales de los péptidos de bajo peso molecular (< 6 kDa) y los aminoácidos liberados (Wang y Xiong, 2005).

En otro trabajo, el hidrolizado obtenido a partir de gluten de trigo fue separado a través de membranas de ultrafiltración con poder de corte 5 kDa; la actividad antioxidante del permeado obtenido (con fracciones concentradas en 4,2 kDa) fue superior a la del retenido (Wang et al., 2006). Similarmente, el hidrolizado proteico de quinoa fue fraccionado por ultrafiltración con membranas de corte en 10 y 5 kDa; la mayor actividad antioxidante se obtuvo del permeado de menor peso molecular (< 5 kDa) (Aluko y Monu, 2003).

Je et al. (2005) fraccionaron de acuerdo a los pesos moleculares un hidrolizado proteico de pescado (Alaska pollak); al estudiar la actividad antioxidante de los distintas fracciones obtenidas observaron que la fracción de menor peso molecular (< 1 kDa) presentaba la mayor capacidad.

Según Chen et al. (1998) los péptidos antioxidantes pueden actuar como quelantes de iones metálicos, inhibidores de oxígeno singlete o secuestrador de radicales hidroxilos. La secuencia primaria de los péptidos sería muy importante para que los mismos presenten esta actividad.

1.4.4. Reacción entre compuestos fenólicos y proteínas

Los polifenoles han sido citados como responsables del color de los aislados proteicos de vegetales debido a los productos de la reacción proteína-fenol, que resulta en polímeros altamente coloreados (Marcone y Kakuda, 1999; Xu y Diosady, 2002). La interacción proteína-fenol, además tiene efectos en la desnaturalización térmica, solubilidad y

digestibilidad de las proteínas (Rubino et al., 1996; Bejosano y Corke, 1998; González-Pérez et al., 2002). Otra consideración importante es el papel de los compuestos fenólicos en la extracción y propiedades funcionales de las proteínas.

Los compuestos fenólicos pueden ligarse a las proteínas por varios mecanismos en medio acuoso, incluyendo enlaces de hidrógeno, enlaces covalentes, interacciones hidrofóbicas y enlaces iónicos. Los anillos polares de la estructura de los compuestos fenólicos tienen potencial de interactuar con la proteína a través de asociaciones hidrofóbicas (Rubino et al., 1996; Prigent et al., 2003). En condiciones alcalinas, los compuestos fenólicos sufren una rápida oxidación formando quinonas que luego reaccionan con las proteínas lo que resulta en una solución de color marrón oscuro (Sosulski, 1979). La reacción proteína- fenol es influenciada por el pH, el nivel de oxígeno, el tiempo y la temperatura (Bejosano y Corke, 1998).

En un estudio comparativo entre aislados proteicos de globulinas de amaranto y soja, se ha visto que los aislados de amaranto fueron significativamente más oscuros, lo que sugirió la presencia de taninos indeseables del tegumento de amaranto, co-precipitados con la proteína en la extracción (Marcone y Kakuda, 1999). Los mismos resultados de color fueron observados en aislados proteicos de amaranto obtenidos por precipitación isoeléctrica y micelación (Cordero de los Santos et al., 2005).

Para evitar los inconvenientes se han evaluado varios procesos para la remoción de compuestos fenólicos de las proteínas, tales como: diafiltración, tratamiento con NaCl 0,05 mol/L y la combinación de éstos (Xu y Diosady, 2002). Estos tratamientos presentaron remoción incompleta, pérdida de proteínas y costo excesivo.

En procesos de extracción proteica de girasol se han usado sales de magnesio y Na_2SO_3 , que resultaron en extractos con menor pigmentación (INRA, 1979). La remoción

de compuestos fenólicos libres de aislados proteicos de canola fue realizada por diafiltración del extracto alcalino previo a la precipiación isoelectrica. Para reducir los efectos de la oxidación sobre el flavour del producto, se agregó, a la solución de extracción, Na_2SO_3 0,1 % como agente reductor. El uso combinado de estos tramientos redujo el contenido de fenólicos un 80 a 90 % (Xu y Diosady, 2002).

Los aislados proteicos de soja obtenidos por tratamiento ácido (lavado ácido previo a la extracción proteica) presentaron mayor solubilidad en comparación con el tratamiento control, atribuyendo este hecho a la eliminación parcial de compuestos fenólicos durante el proceso de extracción (L'Hocine et al., 2006).

Por otro lado, el lavado ácido puede promover que los compuestos fenólicos formen pequeñas cantidades de proantocianidinas, caracterizadas por no presentar color (Hoseney et al., 1981).

1.4.5. Evaluación *in vitro* de la capacidad antioxidante

La evaluación *in vitro* de la capacidad antioxidante es aplicada como una rápida estimación de la posible actividad que una muestra tendrá *in vivo* o al formar parte de un alimento. Existen numerosos métodos para evaluar la capacidad antioxidante *in vitro*, y según la reacción que involucran, pueden ser ensayos que incluyen reacciones en las que se transfiere un electrón (TE) o un átomo de hidrógeno (TAH).

En los ensayos basados en TE se produce una reacción de reducción en la que un sustrato toma un electrón del compuesto antioxidante (agente reductor). La reducción del sustrato causa en éste una alteración de color que se usa como medida del avance de la reacción y de la capacidad antioxidante de la muestra. Algunos de los ensayos que se basan

en esta reacción son: el ensayo de la capacidad secuestrante del radical ABTS, también llamado ensayo de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC); el ensayo del poder reductor del ión férrico (FRAP); ensayo de la capacidad reductora del Cu (II); y el método de la capacidad secuestrante del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

Los métodos basados en reacciones de TAH utilizan un generador sintético de radicales libres, un sustrato oxidable (marcador) y un antioxidante donador de átomos de hidrógeno, por lo que se produce una competencia entre el antioxidante y el sustrato por los radicales libres. De este modo, la oxidación del sustrato es inhibida o retardada y esto se relaciona con la capacidad antioxidante del compuesto. Incluidos en estos métodos están el ensayo de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), el ensayo de decoloración de la crocina, entre otros (Huang et al., 2005).

Por otro lado, también existen métodos que cuantifican los productos formados durante la peroxidación lipídica, los que en presencia de un antioxidante disminuyen. Algunos de estos métodos son el ensayo de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDLs) y el ensayo del ácido tiobarbiturico (TBARS).

Debido a las particularidades de los métodos es extremadamente difícil comparar los resultados entre los diferentes ensayos (Huang et al., 2005).

1.4.5.1. Método del DPPH

El método de la capacidad de secuestrar el radical DPPH es uno de los más comunes para determinar la capacidad antioxidante de modo práctico, rápido y sensible. Este método utiliza un radical cromóforo que simula las especies reactivas de oxígeno (ROS), y que en la presencia de un compuesto antioxidante se reduce y cambia de coloración.

El radical libre DPPH es un radical orgánico de nitrógeno, estable y comercialmente disponible, que posee absorción máxima a 515 nm en medio metanólico y su solución posee una coloración violeta intenso (Arnao, 2000). Se puede observar en la estructura del DPPH (Figura 7), que el compuesto puede aceptar un electrón o radical hidrógeno para tornarse una molécula estable. Una vez reducido por un antioxidante su coloración disminuye y el progreso de la reacción puede ser monitoreado por un espectrofotómetro (Brand-Williams et al., 1995).

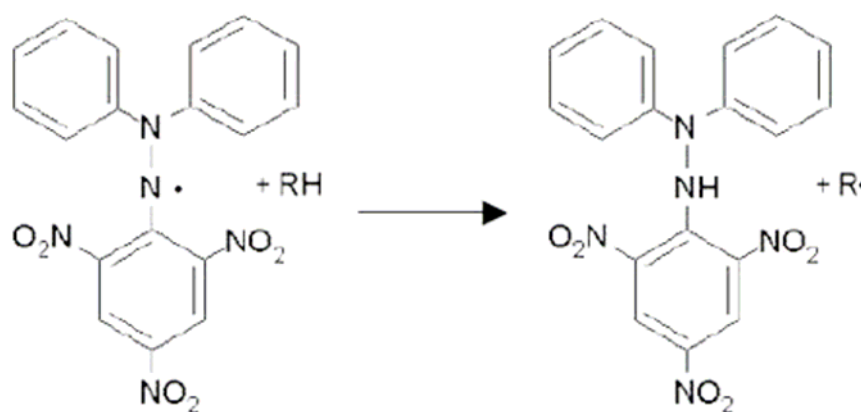


Figura 7. Ecuación de reducción del radical libre DPPH.

1.5. Propiedades funcionales de las proteínas

Las proteínas además de su aporte nutricional en los alimentos, contribuyen con determinadas propiedades funcionales. Hermanson (1979), define las propiedades funcionales, como aquellas características que proporcionan información del comportamiento físico-químico de las proteínas en un sistema alimenticio. Dichas propiedades denotan características fisicoquímicas que afectan el comportamiento de las proteínas en la preparación, procesamiento, almacenamiento y consumo de los alimentos.

Así pues se observa que no sólo son importantes en determinar la calidad del producto final, sino que también son útiles en el proceso. Por lo tanto, para ser empleadas como ingredientes es necesario estudiar las propiedades funcionales de las mismas y que puedan impartir las características deseadas en una determinada formulación (Damodaran y Paraf, 1997).

Las propiedades funcionales de las proteínas pueden clasificarse en tres grupo de acuerdo a la interacción de las moléculas proteicas entre sí o con el agua: Propiedades dependientes de interacciones proteína - agua (retención de agua, solubilidad, viscosidad, etc.); Propiedades dependientes de interacciones proteína – proteína (gelificación, precipitación, etc.) y Propiedades dependientes de la interacción proteína – interfase (emulsificación, espuma, etc.). Estas propiedades dependen fundamentalmente de factores intrínsecos propios de la molécula (conformación, relación y disposición de los aminoácidos, hidrofobicidad, carga eléctrica, forma, peso molecular, etc.), así como de factores extrínsecos del medio que los rodea, y que en ocasiones pueden modificarse (pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica, etc.) (Pilosof y Bartholomai, 2000). Así también las propiedades varían si las proteínas se encuentran en su estado nativo ó desnaturalizadas, por ejemplo debido a un fuerte tratamiento térmico. Por esta razón, es muy importante considerar el método de obtención de las proteínas, puesto que si éste implica tratamientos severos, dichas propiedades se modificarán notoriamente.

En relación a las proteínas de amaranto se han estudiado en mayor o menor profundidad las propiedades de solubilidad, absorción de agua y aceite, formación y estabilidad de espumas y emulsiones, viscosidad y gelificación (Cordero de los Santos et al., 2005; Avanza et al., 2005a, 2005b). Marcone y Kakuda (1999) reportaron que aislados de globulinas de amaranto presentaron mayor solubilidad que aislados de globulinas de

soja, principalmente alrededor del punto isoeléctrico. La solubilidad de las globulinas de amaranto fue nueve veces mayor que las de soja en la región de pH 5 a 6. Cordero de los Santos et al. (2005) observaron mayor solubilidad de aislados proteicos de amaranto obtenidos por precipitación isoeléctrica que los obtenidos por micelación. Se ha comprobado que las proteínas de amaranto son capaces de formar geles con diferentes propiedades reológicas dependiendo de los requerimientos para su aplicabilidad (Avanza et al., 2005b). Por otro lado, Konishi y Yoshimoto (1989) estudiaron la capacidad emulsionante de las globulinas de *A. hypochondriacus* encontrando que las mismas son buenos agentes emulsionantes. Fidantsi y Doxastakis (2001), evaluaron la capacidad emulsionante y espumante de aislados de proteínas de amaranto obtenidos por precipitación isoeléctrica y diálisis. Ambos aislados fueron buenos agentes estabilizantes de emulsiones. En tanto que para la propiedad espumante, el aislado preparado por precipitación isoeléctrica presentó alta capacidad espumante pero baja estabilidad, mientras que el aislado obtenido por diálisis mostró baja capacidad como estabilidad. El agregado de polisacáridos (goma xántica o arábica) aumentó la estabilidad de las emulsiones y espumas producidas.

1.5.1. Propiedad de espumado

1.5.1.1. Rol de las proteínas en la formación y estabilización de espumas

Muchos alimentos procesados tales como la crema batida, los helados, las tortas, los merengues y el mouse, son espumas o sistemas mixtos. En todos estos productos las

proteínas son uno de los principales agentes tensoactivos que ayudan en la formación y estabilidad de la fase gaseosa dispersa (Damodaran y Paraf, 1997)

Las espumas se pueden considerar como dispersiones de burbujas de gas en una fase continua que puede ser líquida o semisólida; la función de las proteínas, al igual que en las emulsiones, es reducir la tensión interfacial orientando sus grupos hidrofílicos hacia el exterior de la burbuja en contacto con el agua, y los hidrofóbicos hacia el interior, con el aire (Murria y Ettelaie, 2004).

Las proteínas son indudablemente los principales agentes espumantes en muchos productos alimentarios, debido a que son fuertemente adsorbidas en la interfase agua-gas, brindan una buena estabilización estérica y electrostática, y la película adsorbida presenta cierta coherencia estructural evitando la coalescencia y desproporción de la estructura. Sin embargo sus propiedades de formación y estabilidad de espumas pueden ser modificadas por diversos factores. Se pueden mencionar, los factores dependientes del medio como la concentración y solubilidad proteica, el pH, la concentración y tipo de sales e hidratos de carbono y los factores intrínsecos de la proteína como la hidrofobicidad total y superficial, la carga neta y superficial, la flexibilidad, la conformación molecular y la susceptibilidad al trabajo mecánico durante el espumado.

1.5.1.2. Fundamentos de la obtención y estabilidad de espumas

Cuando se formula una espuma, el interés primordial es el aumento de volumen respecto al volumen inicial y la estabilidad de la misma a lo largo del tiempo (Cheftel et al., 1989). El tamaño de las burbujas también es de gran importancia para las propiedades de

las espumas, ya que influyen en la textura, palatabilidad y estabilidad de los productos aireados (Balerin et al., 2007).

En el proceso de formación de espumas a partir de una dispersión proteica, la proteína tiene que ser rápidamente adsorbida (difundir, penetrar, reordenarse) en la interfase para ejercer acción tensoactiva. Por ello es indispensable que sea soluble y flexible, que tenga un relativamente bajo peso molecular o sea disociable y que posea un adecuado balance lipofílico-hidrofílico dado por la relación hidrofobicidad superficial/ carga superficial.

Por otra parte, la estabilidad de una espuma está determinada por la tensión superficial y viscosidad de la fase continua, las propiedades de la película, la distribución del tamaño de burbuja, la temperatura y el movimiento al que se somete y la naturaleza de la fase gaseosa dispersa. Los tres primeros factores tienen relación directa con la naturaleza de los solutos presentes en la fase acuosa (proteínas, azúcares, polisacáridos, sales). Para que se forme una película estable que rodee a la burbuja de gas, con determinadas propiedades reológicas (viscoelasticidad), las moléculas de proteínas adsorbidas tienen que asociarse entre sí (ya sea por interacción hidrofóbica o puentes disulfuro) para formar agregados de gran tamaño, mínima carga superficial y alta capacidad de absorción de agua (Pilosof y Bartholomai, 2000).

1.5.1.3. Desestabilización de las espumas

El proceso de desestabilización de una espuma consiste en la tendencia de la fase gaseosa discontinua a formar una fase continua por aproximación y fusión de las burbujas, a fin de alcanzar un área superficial mínima (mínima energía libre). A este proceso se

opone la película proteica superficial, que como barrera mecánica es más efectiva cuando mayores son su viscoelasticidad y su rigidez (Pilosof y Bartholomai, 2000).

Los mecanismos de desestabilización de una espuma son:

1) *Drenaje de líquido por:*

- Efecto de la gravedad;
- Pasaje de líquido de la lamela inter-burbuja por succión capilar (Figura 8), al borde de Plateau, impulsado por la diferencia de presión;
- Pasaje de líquido del borde de Plateau a la fase continua.

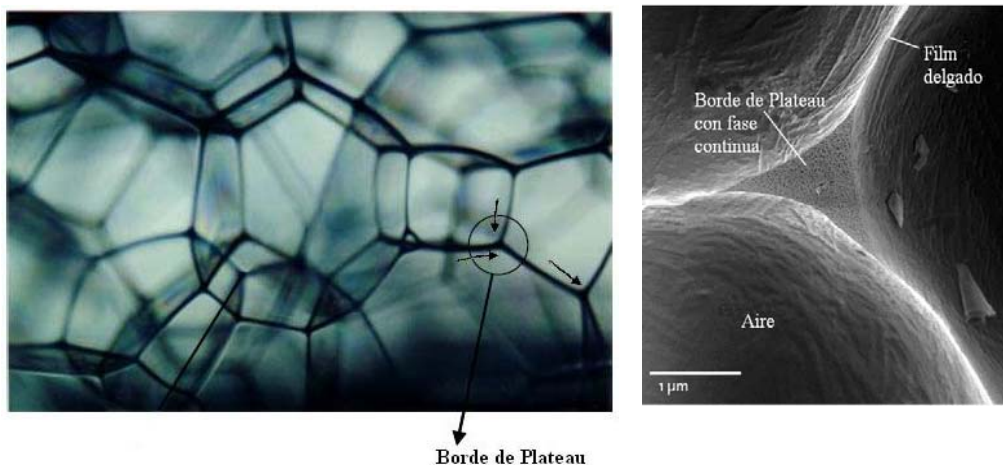


Figura 8. Succión capilar del líquido del centro de la película hasta los bordes de Plateau.

2) *Flotación de las burbujas* (Figura 9), causando una acumulación de las mismas en la parte superior.

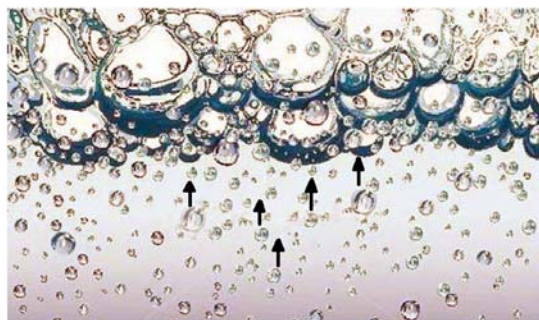


Figura 9. Flotación de las burbujas y acumulación en la parte superior.

3) *Desproporción o maduración de Ostwald*, donde las burbujas grandes crecen a expensas de las pequeñas por difusión de gas a través de la lamela (Figura 10), debido a la diferencia de presión entre ellas. Esto conduce además a que las burbujas asuman una forma poliédrica por compresión de unas contra otras, como se muestra en la Figura 10.

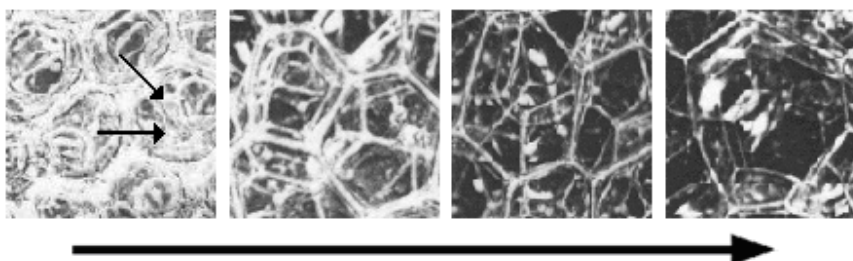


Figura 10. Aspecto de la evolución de una espuma por difusión gaseosa intra-burbuja.

4) *Colapso de la espuma por ruptura de lamelas*, al debilitarse las mismas por disminución de su espesor (por drenado o evaporación de líquido), o por presencia de partículas. Esto provoca un aumento de tamaño de las burbujas por coalescencia y conduce, en definitiva, a la disminución de volumen de la espuma.

Todos estos mecanismos de desestabilización ocurren simultánea y sinérgicamente. En las espumas recién formadas y diluidas, predominan los mecanismos de drenaje y flotación, en tanto que en las espumas poliédricas predominan la desproporción y el colapso.

A medida que la película se hace más fina la rapidez de drenaje disminuye, típicamente de manera proporcional al cubo del espesor de la película e inversamente proporcional a la viscosidad de la fase continua y al área de la película. El drenaje por lo tanto, puede ser muy lento si la fase continua contiene sustancias que aumentan la viscosidad y si las burbujas poliédricas son de gran dimensión.

Si el espesor de las películas intra-burbuja llega a disminuir por debajo del décimo de micrones (200 Å), aparecen nuevos fenómenos que corresponden a las interacciones “coloidales” (es decir a muy poca distancia) entre las superficies. En esta situación aparecen dos efectos que se oponen: a) las fuerzas intermoleculares atractivas de Van der Waals, que actúan a corta distancia y tienden a atraer las burbujas vecinas y por lo tanto a producir drenaje de la película. b) diversas fuerzas repulsivas que se oponen al acercamiento de las burbujas y por tanto al drenaje de las películas. Estas últimas se deben a la presencia de una capa adsorbida de tensoactivos sobre cada una de las superficies de una parte y de la otra de la película delgada (Salager et al., 2003).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Estudiar la separación de proteínas de amaranto variedad *Amaranthus mantegazzianus* por distintos procesos a escala de planta piloto y caracterizar las muestras proteicas de las distintas corrientes de producción.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar métodos de obtención de aislados/concentrados proteicos: Precipitación isoeléctrica y Ultrafiltración.
- Analizar el efecto de una extracción ácida previa de compuestos fenólicos, sobre las características y propiedades de aislados/concentrados proteicos
- Estudiar el efecto de la hidrólisis enzimática sobre algunas propiedades de los aislados/concentrados proteicos.
- Caracterizar las muestras proteicas obtenidas a través de técnicas fisicoquímicas.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de las muestras proteicas.
- Estudiar la propiedad de espumado de las muestras proteicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de concentrados proteicos por diferentes procesos de separación y determinación de la composición centesimal

3.1.1. Obtención de la harina desgrasada de amaranto (HDA)

Las semillas de *A. mantegazzianus* cosecha 2006 fueron molidas en un molino Bühler Miag MLGV Variostuhl (Alemania) hasta pasar por una malla número 20. La fracción lipídica fue extraída en cuatro etapas sucesivas con solvente tipo éter de petróleo (P. Eb. 60-90 °C) en una relación de 3:1 de solvente: sólido. Esta harina se desolventizó a temperatura ambiente y fue denominada como HDA. Posteriormente se llevó a cabo una caracterización respecto a su composición centesimal, determinando los porcentajes de grasas, proteínas, humedad y cenizas, utilizando métodos estandarizados (AOAC, 1995). Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado.

3.1.2. Concentración de proteínas por precipitación isoelectrica

Se partió de la HDA obtenida y se siguieron los siguientes pasos de extracción:

- a) Solubilización de proteínas a pH 9,0 a una temperatura de 40 °C, relación sólido/líquido inicial 1/10 (2,8 kg de HDA en 28 litros de agua en un tanque de 50 litros de capacidad), por 60 minutos, bajo agitación (asegurando la suspensión de partículas y homogeneidad de la fase líquida).
- b) Separación del residuo insoluble en centrifuga filtrante, obteniéndose el Extracto I y el Residuo I.
- c) Segunda extracción del Residuo I, en iguales condiciones que el paso (a).

- d) Segunda separación de insolubles, obteniéndose el Extracto II y el Residuo II.
- e) Mezcla de los Extractos I y II y separación del material insoluble fino en centrífuga de platos autodeslodante Westfalia SAOOH 205 (Alemania), obteniéndose el Extracto Mezcla Centrifugado y el Residuo Fino.
- f) Precipitación isoeléctrica de las proteínas a partir del Extracto Mezcla Centrifugado a pH 4,5, por 30 minutos, bajo agitación.
- g) Separación de la proteína precipitada en centrífuga de platos autodeslodante (Westfalia SAOOH 205) obteniéndose un Precipitado isoeléctrico y el Suero.
- h) Neutralización y solubilización del Precipitado isoeléctrico a pH 6,9 – 7,1.
- i) Deshidratación del Precipitado neutralizado en secadero spray Niro Atomizer (Denmark), con una temperatura de entrada 170-190 °C y temperatura de salida 80-90 °C. Este concentrado se denominó como **Concentrado Proteico de Amaranto 1 (CPA1)**.

3.1.3. Obtención de muestras proteicas de amaranto por métodos alternativos

Extracción ácida y precipitación isoeléctrica (Figura 11)

Se partió de la HDA utilizada para la obtención del CPA1 y se realizó una extracción a pH 4,5; 25 °C; en una proporción harina/ agua inicial de 1/10 (2,8 kg de HDA en 28 litros de agua en un tanque de 50 litros de capacidad), con agitación por 60 minutos, según Pearce (1984) con modificaciones. Con este tratamiento se pretendió separar polifenoles, tratando de evitar la posterior formación de complejos proteínas-polifenoles en la extracción de proteínas a pH alcalino. Estos complejos se arrastran e influyen en el color, sabor y propiedades funcionales del producto final (Xu y Diosady, 2000, 2002).

Se separó en centrífuga filtrante un **Extracto ácido (EA)** (fracción soluble) y un Residuo ácido (fracción insoluble). A partir de este Residuo ácido se siguió el siguiente procedimiento para la obtención de muestras proteicas por el método de precipitación isoeléctrica:

- a) El Residuo ácido fue disuelto en agua en relación sólido/ líquido de 1/10 y se realizó una extracción de proteínas a pH 9,0 por adición de NaOH 2M a 40 °C, con agitación por 60 minutos.
- b) Se separó la fracción insoluble en centrífuga filtrante, obteniéndose un extracto I (fracción soluble) y un residuo insoluble I (fracción insoluble).
- c) El residuo insoluble I se disolvió en agua y se realizó una segunda extracción de proteínas en las mismas condiciones de la anterior.
- d) Se separó la fracción insoluble en centrífuga filtrante, obteniéndose un extracto II (fracción soluble) y un residuo insoluble II (fracción insoluble). Los residuos I y II fueron descartados.
- e) Se mezcló los extractos I y II, y se separó el material insoluble fino en centrífuga de platos autodeslodante Westfalia SAOOH 205, obteniéndose un extracto alcalino clarificado y un residuo fino que fue descartado.
- f) El extracto alcalino clarificado se dividió en dos porciones iguales.
- g) Una de las porciones del extracto clarificado se ajustó a pH 4,5 para precipitación de las proteínas y se agitó por 30 minutos.
- h) Se separó la fracción precipitada por centrifugación en una centrífuga de platos autodeslodante Westfalia SAOOH 205, obteniéndose un precipitado isoeléctrico y un suero.
- i) El **Suero** fue neutralizado a pH 6,9 – 7,1 y liofilizado.

- j) El precipitado isoeléctrico fue lavado con agua a pH 4,5.
- k) Se centrifugó en centrífuga de laboratorio (MSE Mistral 4L) a 2500 rpm (1875 g) por 30 minutos.
- l) El precipitado centrifugado se neutralizó a pH 6,9 – 7,1 y se deshidrató en liofilizador para su almacenaje a – 4° C. Esta muestra se llamó **Concentrado Proteico de Amaranto 2 (CPA2)**.

Tratamientos por ultrafiltración

- a) La porción restante del extracto clarificado se ajustó a pH 6,9 – 7,1.
- b) Se ultrafiltró en un equipo DDS- RO Lab unit UF 35- 2.25, a 50 °C, con poder de corte de 20.000 Da, realizándose tres diafiltraciones sucesivas, obteniéndose un retenido de proteínas y un permeado.
- c) El retenido proteico se secó en spray Niro Atomizer, temperatura de entrada de 170 – 190° C y temperatura de salida de 80–90 °C. Esta muestra se llamó **Retenido Alcalino (RAI)**. El permeado se descartó.
- d) Por otra parte el **Extracto Ácido (EA)**, se centrifugó en centrífuga de platos autodeslodante Westfalia SAOOH 205, para la remoción del material insoluble fino, obteniéndose un **Extracto Ácido Clarificado (EAC)** y un residuo fino (almidón).

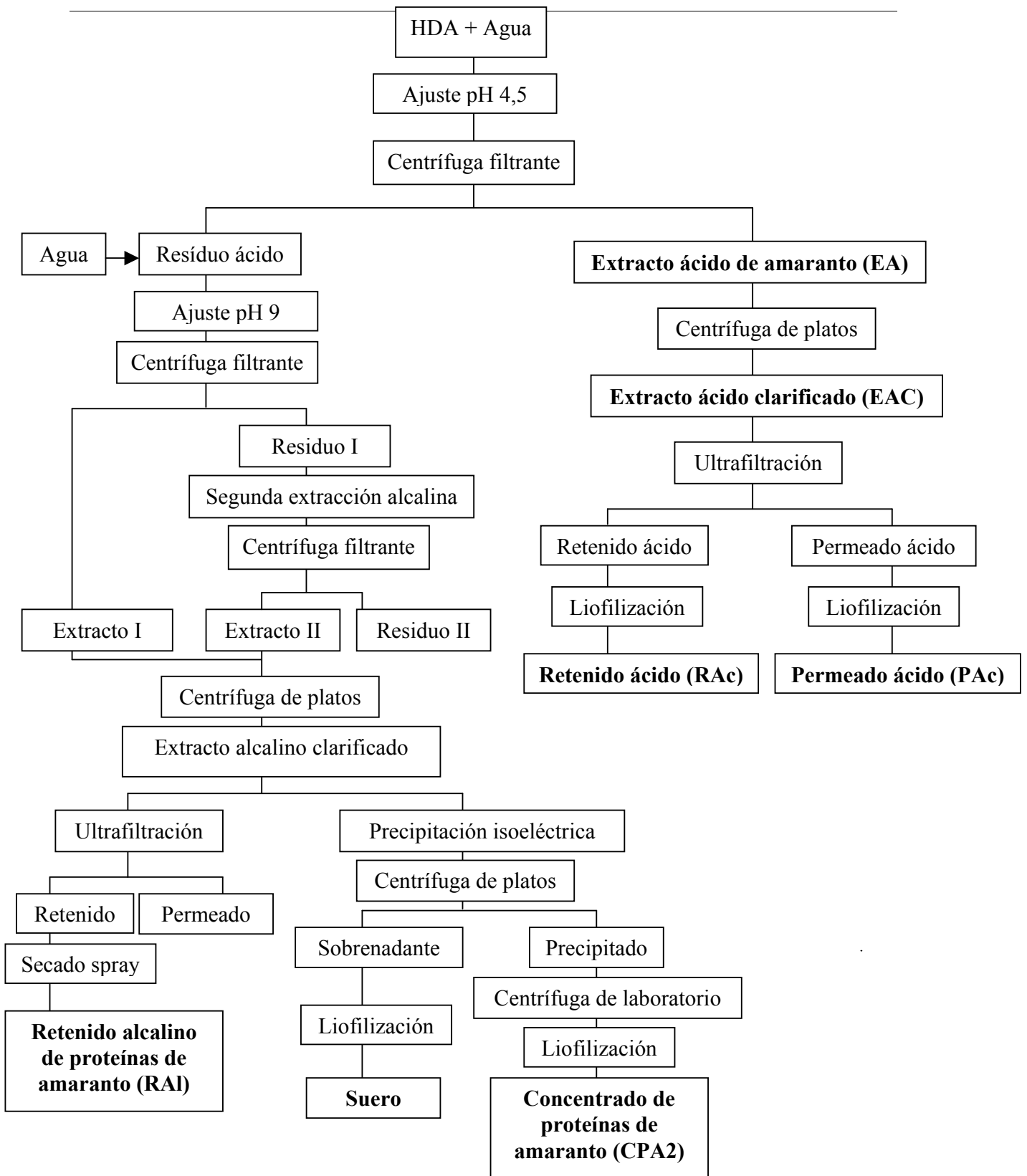


Figura 11. Diagrama de obtención de concentrado proteico de amaranto.

- e) El EAC se ultrafiltró en un equipo DDS- RO Lab unit UF 35- 2.25, a 50 °C, con poder de corte de 20.000 Da, realizándose dos diafiltraciones sucesivas, obteniéndose un retenido ácido de proteínas y un permeado ácido.
- f) El retenido ácido de proteínas se liofilizó obteniéndose un **Retenido Ácido (RAc)**.
- g) El **Permeado Ácido (PAc)** se liofilizó.

3.1.4. Obtención de hidrolizados a partir de los concentrados proteicos

Los ensayos de hidrólisis enzimática fueron llevados a cabo en un reactor discontinuo de 800 ml de capacidad, agitado, con control de pH y temperatura por camisa de circulación de agua. La concentración inicial de sustrato (CPA1) utilizada fue S_0 : 4,5 g/100 g y las concentraciones inicial de enzima en relación a la concentración de sustrato fueron E_0/S_0 (g/g): 0,025 y 0,080. Una vez verificada la total disolución del CPA1, se llevó la temperatura y el pH de esta disolución a los óptimos para la actividad de la enzima utilizada, Multifect P-3000 (endopeptidasa alcalina), 55 °C y pH= 8,5. El pH se ajustó por adición de una solución de NaOH 2,0 M. Luego se agregó la enzima y para mantener el pH constante se adicionó la cantidad necesaria de una solución 2,0 M de NaOH mediante una microbureta mecánica Metrohm E485, registrándose el volumen adicionado en función del tiempo.

El Grado de Hidrólisis (GH%) alcanzado en cada ensayo se determinó por el método de pH Stat. Este método se basa en la valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a pH alcalino cuando se mantiene constante el pH en el medio de reacción y el GH se calcula con los volúmenes de base adicionados y mediante la siguiente ecuación (Adler-Nisen, 1986):

$$GH = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100\% \quad \text{Ec.1}$$

Donde B es el consumo de base en ml, N_b es la normalidad de la base, α es el grado de disociación de los grupos amino que depende de la temperatura y el pH, para el caso de la hidrólisis con Multifect P-3000 su valor es de 0,969, M_p es la masa de proteína que es hidrolizada, y h_{tot} es el número total de uniones peptídicas en el sustrato proteico, siendo para las proteínas de amaranto igual a 7,729 eq/kg de proteína (Adler-Nissen, 1986; Spellman et al., 2003). Se obtuvieron dos hidrolizados con 8,08 % y 16,8 % de GH.

3.1.5. Determinación de humedad

Las muestras se pesaron en cápsulas de aluminio secas y previamente taradas, se calentaron en una estufa a 105 °C por 2 horas. La humedad se calculó por diferencia de peso inicial y final de la muestra (AOAC, 1995). Esta determinación como las siguientes de composición centesimal se realizaron por triplicado para informar el valor medio y la desviación estándar (\pm D.S.).

3.1.6. Determinación del contenido graso

La determinación de grasas se realizó por extracción con hexano mediante el método Soxhlet (AOAC 1995), empleando aproximadamente 15 g de muestra.

3.1.7. Determinación de cenizas

Las muestras se pesaron en crisoles de porcelana secos y previamente tarados. Se llevó a mufla a 540 °C por 4 horas. El contenido de cenizas se obtuvo en base al peso seco de la muestra (AOAC, 1995).

3.1.8. Determinación de proteínas totales

El porcentaje de proteínas se obtuvo por el método Kjeldahl, utilizando 5,85 (Scilingo et al., 2002) como factor de conversión de nitrógeno a proteínas. La HDA fue analizada por Macro Kjeldahl y el CPA1, CPA2, RAl, RAc y PAc por Semi Micro Kjeldahl (AOAC, 1995).

En los casos en que se tenía poca masa de muestra (EA, EAC, y Suero) por ser muestras muy diluidas, el contenido proteico se determinó en un principio a partir de las muestras líquidas por Macro Kjeldahl y estos valores fueron ajustados a los datos de aminoácidos por gramo de muestra obtenidos en la cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (White et al., 1986 y Hagen et al., 1989).

El porcentaje de proteínas con respecto a la HDA o rendimiento de la fracción (PP_i), se determinó por el siguiente cálculo.

$$PP_i = \frac{\text{g Proteína en la fracción}}{\text{g Proteína en la harina inicial}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

3.2. Caracterización fisicoquímica

Las determinaciones se realizaron por triplicado para informar el valor medio y la desviación estándar (\pm D.S.).

3.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-Page)

Los análisis del perfil electroforético de las muestras estudiadas fueron realizados según lo descrito por Laemmli (1970), utilizando un sistema Mini-Protean II con fuente de voltaje de Bio-Rad.

Las muestras fueron disueltas en tampón reductor con dodecil sulfato de sodio (SDS): 62,5 mM Tris-HCl, 20 % de glicerol, 2% de SDS, 5% de β - mercaptoetanol, azul de bromofenol, pH 6,8, en una concentración de 0,4% de proteína, y calentadas a 95° C por 4 minutos.

Se realizaron geles de 12% de acrilamida y 0,75 mm de espesor, donde se aplicaron 5 μ l de las muestras y de proteínas marcadoras de peso molecular de Bio-Rad: Fosforilasa b (97,4 kDa), Albúmina sérica (66,2 kDa), Ovalbúmina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (31 kDa), Inhibidor de tripsina (21,5 kDa) y Lisozima (14,4 kDa), usadas para la calibración del gel (log PM en función del Rf). Se utilizó el buffer de corrida Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 0,1 % SDS, pH 8,3 y se aplicó un voltaje de 120 Volts para todas las corridas. Luego, los geles fueron teñidos en una solución de Comassie Brilliant G-250, en ácido acético/metanol/agua (10:40:50) y decolorados en ácido acético/metanol/agua (1/4/5), hasta que las bandas quedaron bien definidas.

3.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-Page-Tricina para separación de proteínas de bajo peso molecular

Para el análisis de proteínas y péptidos de bajo peso molecular se utilizó el sistema descrito por Schagger y Von Jagow (1987), utilizando un sistema Mini-Protean II con fuente de voltaje de Bio- Rad.

Las muestras fueron diluidas en tampón reductor con SDS: 62,5 mM Tris-HCl, 20% de glicerol, 2 % SDS, 5 % β - mercaptoetanol, pH 6,8, en una concentración de 1 % p/v de proteínas, calentadas a 40° C por 30 minutos y almacenadas congeladas hasta su uso.

Los geles utilizados estaban constituidos por un gel de separación de 15% de acrilamida, un gel espaciador de 10% de acrilamida y un gel superior de 4% de acrilamida, con espesores de 1,5 mm. Se aplicaron 20 μ l de las muestras y de una solución de proteínas marcadoras de peso molecular de SIGMA con las siguientes proteínas: Isomerasa Triosefosfato del músculo de conejo (26,6 kDa), Mioglobina de corazón de caballo (17,0 kDa), α - Lactalbúmina de leche bovina (14,2 kDa), Aprotinina bovina (6,5 kDa), Cadena b de la insulina oxidada bovina (3,496 kDa) y Bradikinina (1,060 kDa), las que luego se usaron para la calibración del gel (log PM en función del Rf). Se utilizó el sistema de buffers: ánodo: buffer Tris 0,2 M pH 8,9 y cátodo: buffer Tris 0,1 M - Tricina 0,1 M, SDS 0,1 %, pH 8,25. Se aplicó un voltaje de 75 Volts en todos los ensayos.

Luego de las corridas, los geles fueron fijados 24 horas en solución de metanol/ácido/agua (5/1/4), coloreados por 48 horas en solución de Coomassie Blue G250 0,04 % en ácido acético 10 %, y decolorados en ácido acético 10 % con agitación hasta que quedaron transparentes.

3.2.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia de exclusión molecular (HPLC-SEC).

El perfil de distribución de masa molar aparente de las muestras estudiadas fue determinado por HPLC- SEC, según Kalapathy et al. (1997) con algunas adaptaciones. Se utilizó un cromatógrafo Varian (bomba modelo 9012 - serie 04824 y detector de absorbancia de doble haz Varian 9050 – serie 02570, California- USA) y el software Star Chromatography Workstation (Varian, Walnut Creek, CA, USA) para el procesamiento de los datos.

Las muestras fueron diluidas en tampón fosfato de sodio 50 mM (0,15 M NaCl, pH 6,8) en una concentración de 1,0 % p/v de proteínas, centrifugadas. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0,45 μ m (Millipore) y luego sonicado. Se aplicaron 20 μ l de esas soluciones filtradas a una columna RESULT-SEC 3000 (300 x 7,75 mm d.i.) (Varian, Palo Alto, CA, USA), se eluyeron con el mismo tampón en el que fueron disueltas las muestras a un flujo de 0,4 ml/min, a una temperatura de 30°C y se monitoreó la absorbancia a 214 nm.

Se utilizaron como patrones de peso molecular las proteínas: tiroglobulina bovina (670 kDa), gama globulina bovina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobulina (17 kDa) y vitamina B-12 (1,35 kDa) (Bio-Rad, Hercules, CA. USA). Se construyó una curva de calibración a partir de la cual se estimó la masa molecular aparente correspondiente a los picos eluidos.

3.2.4. Determinación de solubilidad de proteínas

Las distintas muestras fueron disueltas en buffer TRIZMA 0,05 M, pH 7,0 (Sigma) a una concentración de 1,0 % p/v de proteína, durante 30 minutos a 20°C con agitación. Se

centrifugó cada disolución a 1000 g durante 30 minutos a 15 °C; se tomó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Biuret. El mismo procedimiento se utilizó para la determinación de solubilidad en buffer fosfato de potasio (H₂KPO₄) 0,1 M pH 7,0 previo a la determinación de hidrofobicidad. Luego se determinó el porcentaje de solubilidad relacionando este valor con el de proteínas totales para cada muestra (Foschiatti, 2009).

La concentración de proteínas en solución se determinó por el método Biuret que posee una sensibilidad de 0,1 a 10 mg de proteína/ml (Layne, 1957).

El reactivo Biuret se preparó disolviendo 1,5 g de CuSO₄ y 6 g de tartrato de Na y K en 500 ml de agua destilada, luego se agregó lentamente y agitando 300 ml de NaOH 10%. Se completó a 1000 ml.

Se preparó una solución 10 mg de BSA/ml de agua o de la solución en la que se solubilizó la muestra como patrón de Albúmina (BSA). De esta solución se hizo una dilución 1:10 a la que se midió la absorbancia (A) a 280 nm (UV) por duplicado, obtenido este valor, se calculó la concentración exacta de la solución de albúmina mediante el siguiente cálculo:

$$\left[\text{mg / ml}_{\text{albúm. patrón}} \right] = \frac{A \cdot 10}{0,63} \quad \text{Ec. 3}$$

donde 0,63 representa la pendiente de la regresión realizada variando la concentración de BSA, con ordenada al origen igual a cero y leyendo la absorbancia a 280 nm y 10 representa el factor de la dilución realizada. Se construyó una curva de calibración utilizando la albúmina patrón, a partir de cantidades decrecientes de la solución de albúmina desde 0,5 a 0,0 ml y completando el volumen de 0,5 ml con agua destilada. A las

diluciones de albúmina se les agregó 2 ml de la solución de Biuret, se mezcló, se dejó en reposo por 30 minutos y se determinó la absorbancia a 550 nm por duplicado. La curva de calibración se construyó como absorbancia en función de la concentración de proteína. Para la determinación de la concentración de proteínas de las muestras disueltas tanto en el buffer fosfato de potasio (H_2KPO_4) 0,1 M pH 7,0 (determinación de hidrofobicidad) como en el buffer TRIZMA 0,05 M, pH 7,0 (determinación de solubilidad), se tomaron 0,5 ml de las diluciones y se procedió igual que para las diluciones de albúmina; luego a partir de la curva de calibración se determinó la concentración de las muestras.

3.2.5. Determinación de la hidrofobicidad superficial (S_0)

La S_0 se determinó con la porción proteica soluble de cada fracción, como la pendiente inicial de la gráfica de intensidad relativa de fluorescencia (RFI) en función de la concentración de proteínas solubles (mg/ml). Se llevó a cabo utilizando como sonda el 1-anilinaftaleno-8-sulfonato (ANS) (Procedimiento estandarizado de acuerdo a Kato et al., 1984; Pilosof y Bartholomai, 2000; Molina-Ortiz et al., 2003).

Las muestras se disolvieron en buffer fosfato de potasio (H_2KPO_4) 0,1 M pH 7,0 regulando la concentración de proteínas a 4 mg/ml, luego se realizaron diluciones seriadas en el buffer de disolución de la muestra, en concentraciones comprendidas entre 0,05 – 0,4 mg/ml.

La determinación de la hidrofobicidad superficial consistió en tomar 2 ml de cada dilución y agregarle 10 μl de ANS (8,0 mM en buffer fosfato 0,01 M, pH 7,0), se midió el valor de la intensidad de fluorescencia (IF) excitando con una longitud de onda de 390 nm y midiendo a 468 nm con un espectrofluorómetro. La pendiente inicial de la gráfica de la IF

en función de la concentración de proteína soluble (mg/ml) se calculó por análisis de regresión lineal y se la utilizó como índice de hidrofobicidad superficial (S_0) de la proteína.

3.3. Cuantificación de aminoácidos de las muestras proteicas por HPLC

Se cuantificó el perfil aminoacídico de las muestras según lo descrito por White et al. (1986) y Hagen et al. (1989).

Las distintas muestras fueron hidrolizadas en HCl 6 N con fenol durante 24 horas para la obtención de aminoácidos libres. Luego los aminoácidos liberados fueron derivatizados con Fenilisotilcianato (PITC), separados por HPLC en fase reversa y detectados por U.V. a 254 nm.

La cuantificación fue realizada por calibración interna multinivel, utilizando el ácido α -aminobutírico (AAAB) como patrón interno.

Se calculó la diferencia relativa de cambio o de concentración de cada aminoácido como:

$$\% \text{ relativo respecto a HDA} = \frac{AA_M - AA_{HDA}}{AA_{HDA}} \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

Siendo AA_M la concentración del aminoácido en la muestra y AA_{HDA} la concentración del aminoácido en la HDA.

3.4. Determinación de compuestos con actividad bioquímica con potencial fisiológico

3.4.1. Extracción metanólica (para la determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante).

La extracción metanólica fue realizada según la metodología utilizada por Tsaliki et al. (1999) con modificaciones. Se diluyeron las muestras en metanol (calidad HPLC) en la proporción 1:5 (p/v) en tubos con rosca y se agitaron en mezclador por 10 minutos. Luego los tubos se colocaron en un baño maría a 50° C por 1 hora, luego se elevó la temperatura a 65° C a la que se mantuvieron por 5 minutos más. Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente y se filtraron los sobrenadantes a través de una membrana de 0,45 µm, Millipore, conservando los extractos fenólicos en tubos ependorfs.

3.4.2. Extracción acuosa (para la determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante)

Para la extracción acuosa se siguió la metodología utilizada por Eberhardt et al. (2005) con modificaciones.

Se diluyeron las muestras en agua destilada 50 mg/ml y se agitaron con agitador magnético por 30 minutos. Se centrifugaron a 1700 rpm (35735 x g) por 15 minutos a temperatura ambiente, se filtraron a través de papel Whatman n° 1 y se completó el volumen del filtrado al inicial de extracción.

3.4.3. Determinación de compuestos fenólicos en extractos metanólicos y acuosos

La concentración de compuestos fenólicos fue medida de acuerdo con el método descrito por Gamel et al. (2006). A 100 µl de los extractos se le agregaron 2 ml de una solución acuosa de carbonato de sodio 2%. Después de dos minutos, se agregaron 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu disuelto en agua (1:1), se agitó vigorosamente en Vortex y se dejó en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 750 nm

contra el blanco de reacción en un espectrofotómetro Beckman Coulter, DU 640 (Beckman Instruments Inc., USA).

La curva de calibración fue realizada con ácido gálico disuelto en agua en concentraciones de 0,002 - 0,12 g/ml y la concentración de compuestos fenólicos fue expresada en equivalentes de ácido gálico (mg EAG/g de muestra seca).

3.4.4. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* en extractos metanólicos y acuosos

La actividad antioxidante en extractos metanólicos y acuosos fue medida contra el radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), según lo descrito por Thaipong et al (2006).

Se preparó una solución stock de DPPH (24 mg de DPPH/100mL de metanol) que se almacenó a -20 °C hasta su uso. A partir de esa solución se preparó una solución de trabajo mezclando 8,6 ml de solución stock con 50 ml de metanol. Los extractos metanólicos (150 µl) reaccionaron con 2,9 ml de la solución de trabajo de DPPH por 24 horas en oscuridad. La absorbancia a 515 nm fue medida en espectrofotómetro Beckman Coulter, DU 640 (Beckman Instruments Inc., USA). Los análisis fueron realizados por triplicado.

Se realizó una curva padrón con Trolox ((R)-(+)-6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxylic acid, 98 %) disuelto en metanol en concentraciones de 25 a 1558 µM. La actividad antioxidante se expresó en mg equivalente de Trolox (ET)/ g de muestra.

3.5. Evaluación de las propiedades de espumado

3.5.1. Preparación de muestras

Se produjeron espumas a partir de diluciones de las distintas muestras proteicas y un aislado de proteínas de suero lácteo (WPI) con un 90 % (base húmeda) de proteínas provisto por ITAL, Campinas, Brasil, el cual es usualmente citado en la literatura para este tipo de ensayo (Sorgentini y Wagner, 2002). El método de obtención de las espuma fue por batido y consistió en: una alícuota de 4,0 ml de suspensión proteica a una concentración de proteína del 1,0 % p/v (Fidantsi y Doxastakis, 2001) a una temperatura de 25 °C y condiciones definidas de fuerza iónica y pH (Buffer TRIZMA 0,05 M pH 7,0), fue colocada dentro de un recipiente graduado de las siguientes dimensiones: diámetro 2,6 cm y altura 5,0 cm. Este recipiente fue colocado dentro de un baño de agua a temperatura ambiente para prevenir el calentamiento y se batió por 3 minutos con un homogeneizador (Omni Mixer) a una velocidad de 20.000 rpm (Foschiatti, 2009). Una vez obtenida la espuma, se removió el homogeneizador cuidadosamente para minimizar la destrucción de la espuma, se midió el volumen de líquido y espuma; y se trasvasó por volcado a un tubo de medida del equipo Turbiscan Classic, donde se registraron valores puntuales cada 4 min de retrodispersión y transmitancia en función de la altura del tubo (3.5.4) en un lapso de tiempo de 1,0 hora. También se registraron los valores iniciales y finales de volumen de líquido y espuma en este tubo.

3.5.2. Determinación de la capacidad de espumado (Overrun)

Con el volumen de espuma medido en el recipiente de obtención de la espuma, se calculó la espumabilidad u overrun como:

$$\text{Overrun (\%)} = \frac{(V_e - V_l)}{V_l} \times 100 \quad \text{Ec. 5}$$

Donde V_e es el volumen de espuma obtenido inmediatamente luego del batido y V_l es el volumen de líquido inicial (4 ml) (Wagner, 2000).

3.5.3. Medida de estabilidad de espumas con el método volúmetrico

Con los valores de iniciales y finales de volumen de espuma registrados en el tubo de medida del equipo Turbiscan Classic se calculó el porcentaje de volumen de espuma que se mantiene al final de la experiencia ($\% V_E$) como:

$$\%V_E = \frac{V_{Ef}}{V_{Ei}} \times 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Donde V_{Ei} es el volumen de espuma inicialmente trasvasado al tubo de medida del equipo Turbiscan Classic y V_{Ef} es el volumen de espuma final que se mantiene luego de 60 minutos.

3.5.4. Medida de estabilidad de espuma. Funcionamiento del equipo Turbiscan Classic MA 2000

El equipo Turbiscan Classic MA 2000 (Formulation, Francia) permite analizar la estabilidad de dispersiones coloidales. El principio de funcionamiento es el siguiente: una

fuelle de luz la cual se compone de un diodo electro luminiscente en el infrarrojo cercano ($\lambda_{\text{air}} = 850 \text{ nm}$) incide sobre el tubo que contiene la muestra y dos sensores ópticos sincronizados reciben respectivamente la luz transmitida a través de la muestra (180° de la luz incidente, sensor de Transmisión), y la luz retrodispersada por la muestra (45° de la radiación incidente, detector de backscattering o retrodispersión) como se muestra en la Figura 12. Este equipo trabaja en modo de escaneo (scanning): la cabeza de lectura óptica escanea a lo largo del tubo (el cual contiene la muestra) hasta 70 mm, adquiriendo los datos de transmisión y retrodispersión cada 40 μm . Las curvas correspondientes proporcionan el flujo de luz transmitida y retrodispersada en porcentaje relativo a un estándar (suspensión de esferas monodispersas y aceite de silicona) como una función de la longitud de la muestra (en mm).

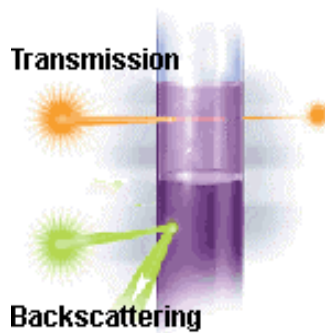


Figura 12. Principio de funcionamiento del Turbiscan Classic.

Las muestras de espuma pueden sufrir dos fenómenos principales de inestabilidad, i) el drenado o pérdida de líquido por gravedad, por diferencia de presión y/o evaporación y ii) la maduración de las burbujas de gas debido a la rotura de la película líquida que

estabiliza el sistema. Estos dos fenómenos ocurren simultáneamente y pueden ser monitoreados por el equipo, a través del software como:

Evolución de la retrodispersión o backscattering (BS), permite obtener el valor medio de BS en función de la longitud del tubo en cada escaneo realizado a distintos tiempos, dichos datos proporcionan una medida de variación del tamaño de partícula que se corresponde con la desproporción y aumento de tamaño de las burbujas durante el almacenamiento de las espumas. El software también permite visualizar esto como Delta de BS según sea conveniente.

El espesor del pico de drenaje: con este análisis se puede obtener la evolución del pico de drenaje de líquido en la parte inferior del tubo, registrándose en el equipo perfiles en transmisión o en backscattering dependiendo de si se trata de una muestra translúcida u opaca, respectivamente.

Para estudiar estos fenómenos se siguió la metodología de Sceni y Wagner (2007). Se diferenciaron dos zonas: una correspondiente al drenaje de líquido (inferior) y otra que represente la espuma, donde se analizó la desproporción.

En la zona inferior del perfil de backscattering (BS) se observa un aumento del espesor del pico de drenaje en función del tiempo, como resultado del aumento de volumen de líquido drenado en las espumas; en este trabajo resultó conveniente analizar esto con el perfil de Delta de BS. Se determinó la sección entre la altura 0 y h_0 que corresponde al tapón del tubo, y luego a partir de h_0 se midió la evolución del pico de drenaje (corrimiento del perfil de BS) que corresponde a la altura del líquido (h) en función del tiempo. La altura relativa de líquido drenado en cada tiempo se definió como:

$$h_d(\%) = \frac{h}{L_f} \times 100 \quad \text{Ec. 7}$$

Donde L_f es la altura inicial de espuma. Finalmente, se graficó h_d en función del tiempo como la cinética de drenado. Los datos obtenidos con la Ec. 7 se ajustaron con la Ec. 8 (Carp et al., 1997), donde $h_d(t)$ es la altura del líquido drenado en función del tiempo, h_{max} es la máxima altura de líquido drenado en 60 minutos, n describe el carácter sigmoideo de la curva y $t_{1/2}$ es tiempo de vida media de drenado (tiempo requerido para que drene la mitad de la altura máxima de drenado). Los parámetros h_{max} , n y $t_{1/2}$ fueron determinados por regresión no lineal.

$$h_d(t) = h_{max} \frac{t^n}{t^n + t_{1/2}^n} \quad \text{Ec. 8}$$

La cinética de desproporción se obtuvo como BS (%) en función del tiempo y se ajustó a un modelo de decaimiento exponencial según la Ecuación 9:

$$BS(t) = a + b \cdot \exp\left(\frac{-t}{k}\right) \quad \text{Ec. 9}$$

Donde BS (t) es la retrodispersión en función del tiempo, $(a+b)$ es una aproximación del máximo BS (%) y k es inversamente proporcional a la tasa de decaimiento del BS (%). En la Figura 13 se muestran las cinéticas de desproporción y drenado y los parámetros correspondientes.

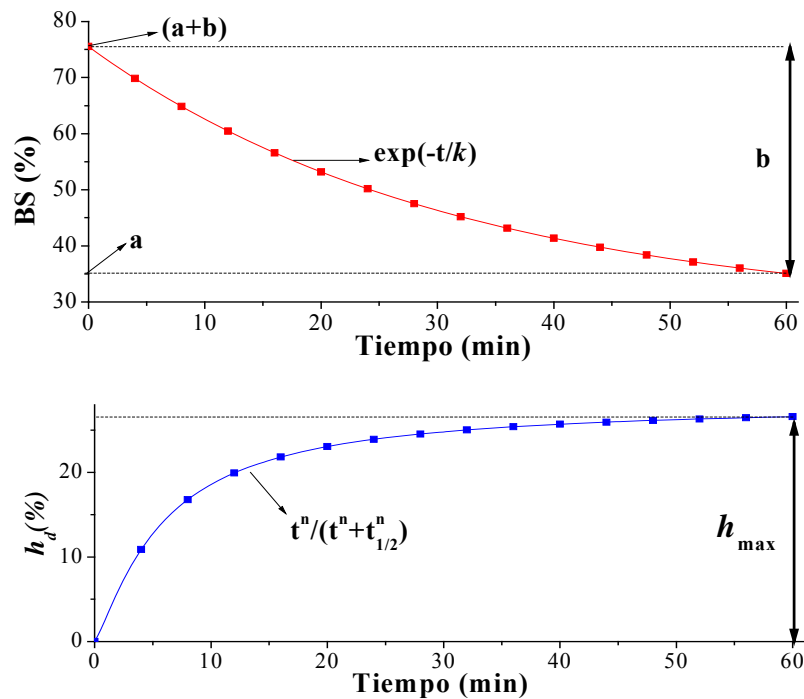


Figura 13. Cinéticas y parámetros de la desproporción (rojo) y el drenaje (azul) representados por las Ecuaciones 8 y 9.

3.6. Análisis estadístico y herramientas gráficas

Los análisis de regresión simple y otros cálculos se realizaron con la planilla de cálculo de Microsoft EXCEL (Office XP); también se utilizó el programa Origin 8.0 para la construcción de gráficas y regresiones no lineales; y para el análisis estadístico el software Statgraphics 3.0. Para digitalizar las imágenes de los cromatogramas se utilizó el programa Winding 2.0 y para el análisis de los geles de electroforesis previamente escaneados se utilizó el programa Image Tool 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Procesos de separación: Contenido proteico y rendimiento

La composición centesimal de la harina desgrasada de las semillas de amaranto variedad de *A. mantegazzianus* cosecha 2006, presentó los siguientes valores: Humedad $13,4 \pm 0,1$ %, Proteínas $14,7 \pm 0,2$ % (17,0 % en base seca), Grasa $0,35 \pm 0,08$ % y Cenizas $2,74 \pm 0,01$ %.

El contenido proteico de esta variedad es similar al de otras especies de este pseudocereal, como las analizadas por Juan et al. (2007) que determinó este contenido para 11 variedades de amaranto silvestre. Para *A. hypochondriacus* se han reportado harinas de 15,0% de proteínas (Cordero de los Santos et al., 2005), 17,0 % (Martínez et al., 1997; Castellani et al., 2000; Aphalo et al., 2004), 18,7 % (Scilingo et al., 2002) y 24,7 % (Avanza et al., 2005a). Para *A. cruentus* 15,0 % de proteínas (Salcedo- Chávez et al. 2002), 16,6 % (Escudero et al., 2004) y de 15,3 a 18,2 % (Becker et al., 1981); y de granos de *A. caudatus*, harinas de 16,6 % de proteínas (Gorinstein et al., 1998). Cabe aclarar que todos estos trabajos utilizaron como factor de conversión de nitrógeno a proteínas de 5,85 (Scilingo, 2002) al igual que en este trabajo. La variación del porcentaje de proteínas en las harinas depende por un lado, de la composición proteica del grano de cada variedad y también de las condiciones de molienda utilizadas (equipo, mallas, etc.). Al encontrarse mayor concentración de proteínas en la cáscara y germen (42 %) que en el perisperma (8 %) (Betschart et al., 1981), una harina con más restos de cáscara y germen puede presentar mayor contenido de proteínas.

En la Tabla 1 se muestran el contenido de proteínas para cada muestra resultante de las separaciones aplicadas (descrita en el punto 3.1) y el rendimiento en proteínas en la separación respecto al contenido inicial de harina tratada (PP_i).

El porcentaje de proteína en base seca del CPA2 obtenido por precipitación isoelectrica (73,10 %) es mayor al del RAI (52,50 %) obtenido por ultrafiltración y mayor al CPA1 (50,90 %), obtenido por el método tradicional sin extracción ácida inicial. La concentración de proteínas de las otras muestras es marcadamente inferior a estos valores. El resultado obtenido puede compararse con el trabajo de Findantsi y Doxastakis (2001), quienes prepararon concentrados de proteínas de amaranto por precipitación isoelectrica (pH 10,0 para extracción y pH 4,6 para precipitación) y por diálisis a través de una membrana con poder de corte de 12 – 14 kDa. En este caso, llegaron a un concentrado de mayor porcentaje de proteínas con la separación por diálisis (67 %) que con la precipitación isoelectrica (36 %) (N x 6,25).

El poder de corte de la membrana puede ser causante de la diferencia del concentrado por diálisis con el RAI, sin embargo, se evidencia baja recuperación en el método de precipitación. El factor de conversión de nitrógeno a proteína utilizado por estos autores también dificulta la comparación. Por otro lado, en trabajos donde se han utilizado las mismas condiciones que en este trabajo para la precipitación isoelectrica (pH 9,0 para extracción y pH 4,5 para precipitación), se han obtenido concentrados proteicos de amaranto con 83,4 % y 93,1 % de proteínas (Salcedo-Chavéz et al., 2002; Cordero de los Santos et al., 2005, respectivamente). Al variar el pH de precipitación isoelectrica a pH 5,0, se obtuvieron concentrados de 80,0; 85,5 y 92 % (N x 5,85) (Scilingo et al., 2002; Avanza et al., 2005; Avanza y Añón, 2007, respectivamente). Escudero et al. (2004) utilizaron pH 11,0 para la extracción y pH 4,5 para la precipitación y obtuvieron un concentrado con menos

concentración de proteínas (52,6 %) que el CPA2 obtenido en este trabajo. Con otra técnica de separación, la micelación, Cordero de los Santos et al. (2005) obtuvieron un concentrado de 80,2 % de proteínas.

Tabla 1. Contenido proteico y PP_i de las muestras. Los datos se expresan como la media de tres determinaciones \pm desviación estándar (D.S.).

Muestras	Proteína (%) (\pm D.S.)	PP_i (%)
HDA	14,70 (\pm 0,20)	-
CPA1	50,90 (\pm 0,02)	19,1
CPA2	73,10 (\pm 0,20)	7,4
Suero	29,26 (\pm 0,07)	18,0
RAI	52,50 (\pm 0,80)	6,3
EA	17,06 (\pm 0,91)	16,5
EAC	21,62 (\pm 0,22)	10,3
RAc	21,40 (\pm 0,40)	3,5
PAc	18,60 (\pm 0,20)	5,3

En la Figura 14 se muestra la distribución de proteínas correspondientes a las distintas etapas del método tradicional (sin extracción ácida inicial). La principal pérdida de proteínas del proceso total (43,8 %) corresponde al Residuo alcalino. Se estima que la misma está constituida por las fracciones proteicas insolubles en las condiciones de extracción y en la fase líquida retenida (extracto) en dicho residuo. Luego se pierde otro 10% en la clarificación de este suero. La segunda pérdida importante corresponde al Suero (27,1 % de las proteínas iniciales y más de la mitad de las proteínas presentes en el Extracto clarificado). La elevada

solubilidad de las proteínas de amaranto a pH 4,5, determinó que finalmente el porcentaje de recuperación sólo fuera del 19,1 % de proteínas. Andrich et al. (2007) determinaron solubilidades proteicas del 19 y 23 % para suero ácido en ensayos de extracción proteica a baja velocidad (N.S.I. modificado) y alta velocidad (P.D.I. modificado) de la harina desengrasada de amaranto a pH 4,5. Por su parte, Salcedo-Chávez et al. (2002) determinaron la curva de solubilidad para una harina desengrasada con una solubilidad mínima del 15 % a pH 4,0. Teniendo en cuenta que la solubilidad de las proteínas de soja a pH 4,5 es del 8 a 10 % se puede concluir que las proteínas de amaranto son dos a tres veces más solubles en iguales condiciones.

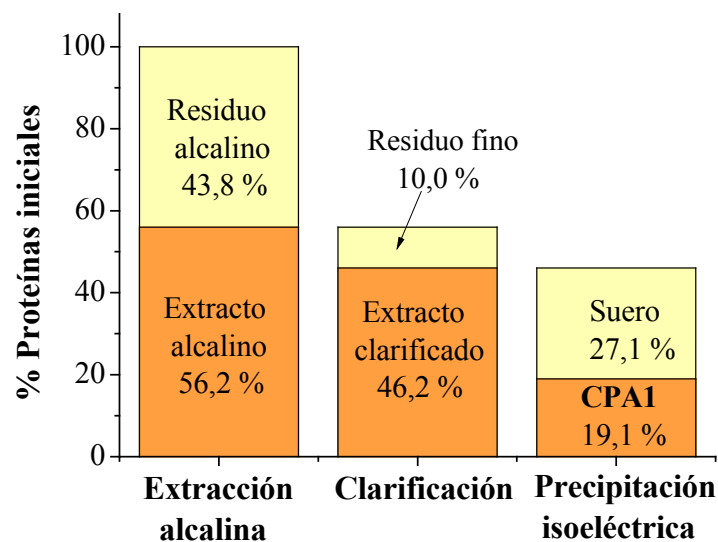


Figura 14. Distribución de proteínas en las distintas etapas respecto a las proteínas iniciales en el método tradicional.

En la Figura 15 se muestra la distribución de proteínas correspondientes a las etapas iniciales de extracción y separación de sólidos del método alternativo con extracción ácida inicial. En el EA se separa el 16,5% de las proteínas presentes en la harina inicial. Al igual

que en el método tradicional, la mayor pérdida de proteínas del proceso se produce en la extracción alcalina donde el 49,7% de las proteínas iniciales quedan en el residuo alcalino. Esta pérdida es algo superior a la ocurrida en el mismo paso del método tradicional.

En la Figura 16 se comparan los porcentajes de proteínas relativos a los valores iniciales de la harina utilizada para los tratamientos de precipitación isoelectrica y de ultrafiltración. Los rendimientos por ambos métodos fueron similares (CPA2: 7,4 % y RAI: 6,3 %) y significativamente menores al obtenido por el método de precipitación isoelectrica tradicional (CPA1: 19,1 %) lo que se explica por las proteínas perdidas en la extracción ácida inicial y el porcentaje de proteínas del residuo alcalino en este proceso fue mayor al del proceso tradicional. En el Suero obtenido en la precipitación isoelectrica, se separan el 18,0 % de las proteínas que no precipitan a pH 4,5. Este valor es semejante al del permeado de ultrafiltración (21,4 % de las proteínas iniciales); en este caso las mismas serían proteínas retenidas por la membrana de acuerdo a su peso molecular de corte. Estos valores de separación son menores al porcentaje separado en el Suero obtenido por el método tradicional (27,3 %), y a la vez son marcadamente superiores a los encontrados en la precipitación isoelectrica de proteínas de soja y de girasol (aproximadamente 10-15 % en ambos casos).

Como se mencionó, en el EA se separa 16,5 % de las proteínas presentes en la harina inicial, lo que indica que una importante cantidad de proteínas son solubles a pH 4,5. En el EAC (21,62 % de proteínas) se han concentrado las proteínas con respecto al EA (17,06 %), debido a la eliminación de los componentes finos (en parte almidón) pero a la vez se observa una pérdida de proteínas junto a éstos, ya que el PPI disminuye un 6 % en el paso de clarificación (Figura 17).

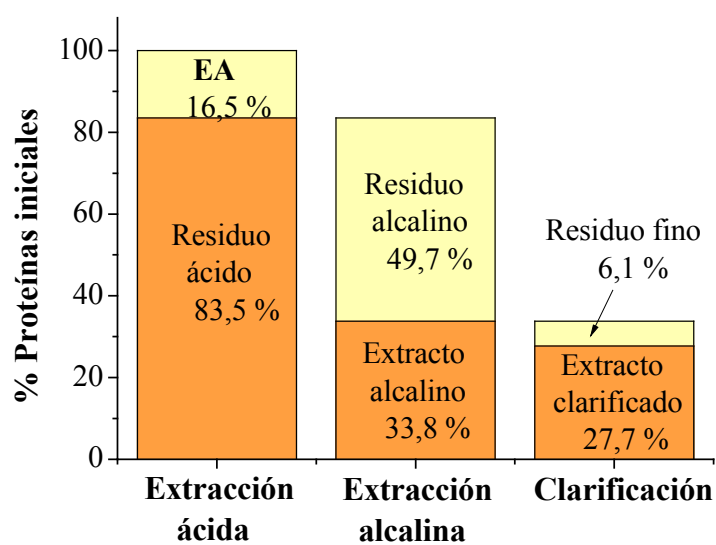


Figura 15. Distribución de proteínas en la etapa de solubilización de proteínas en el método alternativo con extracción ácida inicial.

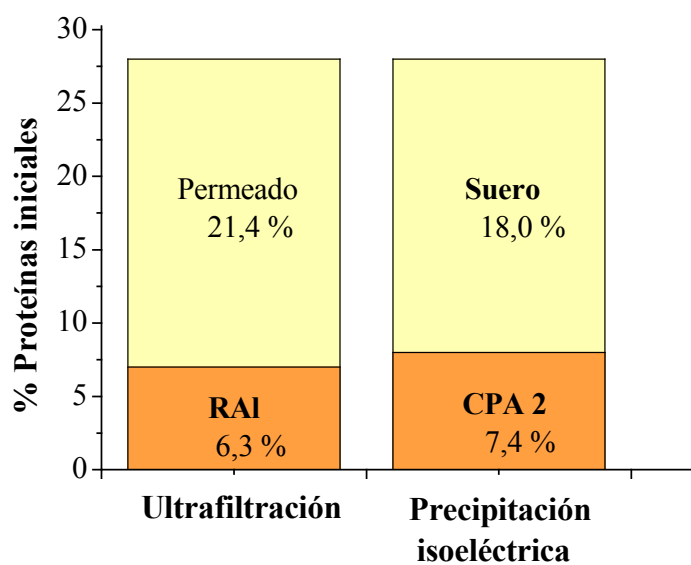


Figura 16. Distribución de proteínas en las etapas de concentración por ultrafiltración y de precipitación isoeléctrica del método alternativo con extracción ácida inicial.

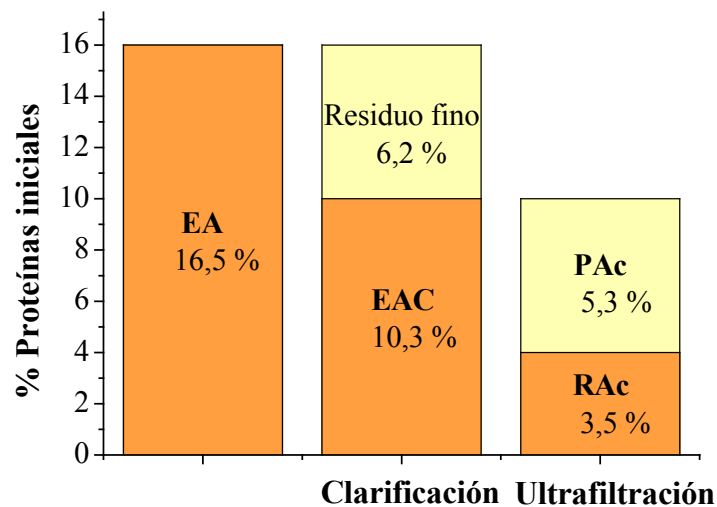


Figura 17. Distribución de proteínas del extracto ácido concentrado por ultrafiltración del método alternativo con extracción ácida inicial.

Los productos de ultrafiltración del EAC son semejantes en concentración de proteínas (RAc 21,4 % y PAc 18,60 %), pero el rendimiento en proteínas del PAc es superior al del RAc, lo que muestra que gran proporción de proteínas han permeado por la membrana en la ultrafiltración.

En general pocos trabajos presentan los valores de recuperación (rendimientos) de proteína en los concentrados, y la mayoría de éstos son a escala laboratorio. Bejosano y Corke (1998), informan un rendimiento de 37,6 % de proteína para concentrados de amaranto obtenidos por precipitación isoelectrica. Salcedo-Chávez et al. (2002) obtuvieron rendimientos proteicos de 53,4 % a 61,0 % al variar las condiciones de extracción y precipitación en la obtención de concentrados de *A. cruentus*. Cordero de los Santos et al. (2005) obtuvieron recuperaciones de 56,4 % en aislados proteicos de *A. hypochondriacus* obtenidos por precipitación isoelectrica y de 15,9 % en aislados obtenidos por micelación. En un trabajo a escala planta piloto, D'Agostina et al. (2006) realizaron un procedimiento de

extracción similar al método alternativo de este trabajo para la obtención de concentrados proteicos de lupin. A partir de hojuelas de lupin desgrasadas se realizó una extracción ácida (pH 4,5) donde se separó un extracto ácido, que se concentró por ultrafiltración, y un residuo del cual se obtuvo un concentrado de proteínas por precipitación isoelectrica. Los rendimientos de proteínas obtenidos fueron de 39 a 52 % en los concentrados por precipitación isoelectrica y de 3,6 a 10,9 % en los concentrados por ultrafiltración.

Conclusiones parciales de la sección 4.1.

La HDA de *A. mantegazzianus* presentó un contenido proteico similar al de otras especies reportadas en bibliografía.

El CPA1 presentó mayor rendimiento proteico que el CPA2 y RAI, aunque menor concentración de proteínas que éstos. El mayor rendimiento del CPA1 con respecto al CPA2 y RAI se explica por la pérdida extra sufrida por estos últimos durante la extracción ácida inicial y en el residuo alcalino. La diferencia entre CPA1 y CPA2 también se puede deber a la diferencia en el paso final de concentración, ya que una se hizo por centrífuga de laboratorio (MSE Mistral 4L). La concentración proteica de CPA2 resultó mayor en virtud de la separación de solubles y sólidos finos suspendidos ocurrida en la extracción ácida inicial.

Cuando se compara el CPA2 con el RAI resulta evidente que la precipitación isoelectrica es más eficiente en la separación coágulo proteico isoelectrico/almidón suspendido, ya que la membrana concentra en el retenido las proteínas que no pasan por la membrana y el almidón.

En general, se obtuvieron bajos rendimientos proteicos y no se logró alcanzar concentraciones de proteínas al nivel de un aislado proteico. Las causas de ello podrían

encontrarse en la alta solubilidad de las proteínas a pH 4,5, que en la extracción alcalina buen porcentaje de ellas queda asociado al residuo o no se solubiliza y que el pequeño tamaño del gránulo de almidón de amaranto dificulta su separación en los procesos de clarificación y centrifugación.

4.2. Caracterización fisicoquímica

4.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-Page)

Los perfiles electroforéticos (SDS- Page) de la HDA, CPA2, Suero, RAI, EAC, RAc, PAc y CPA 1 se muestran en la Figura 18.

La HDA presenta bandas mayoritarias de 56,4; 37,2; 35,3; 28,6; 27,2 y 26,2 kDa, bandas menores de 87,9; 51,8; 40,5; 33,1; 23,1 y 21,5 kDa, y un gradiente de bandas indefinidas de 20 a 14 kDa. De forma general, el perfil de la HDA de *A. mantegazzianus* presentado en este trabajo es semejante a los reportados en la bibliografía para otras especies de amaranto. Gorinstein et al. (2005) encontraron para distintas especies de amaranto (*A. hybridum*, *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*) perfiles electroforéticos de 28 a 39 bandas en el rango de 14 a 97 kDa resueltas en patrones distinguibles entre las especies.

La baja resolución de bandas en la región de bajo peso molecular (< 20 kDa) está en concordancia con Gorinstein et al. (2005), que reporta que los perfiles SDS-Page en esa región son difusos y poco discernibles para las proteínas de las distintas especies de amaranto. Gamel et al. (2005) encontraron polipéptidos de pesos moleculares en el rango de

14 a 94 kDa en los perfiles electroforéticos de proteínas de *A. cruentus* y *A. caudatus*, con bandas principales de 78, 55, 43, 36, 27 y 17 kDa.

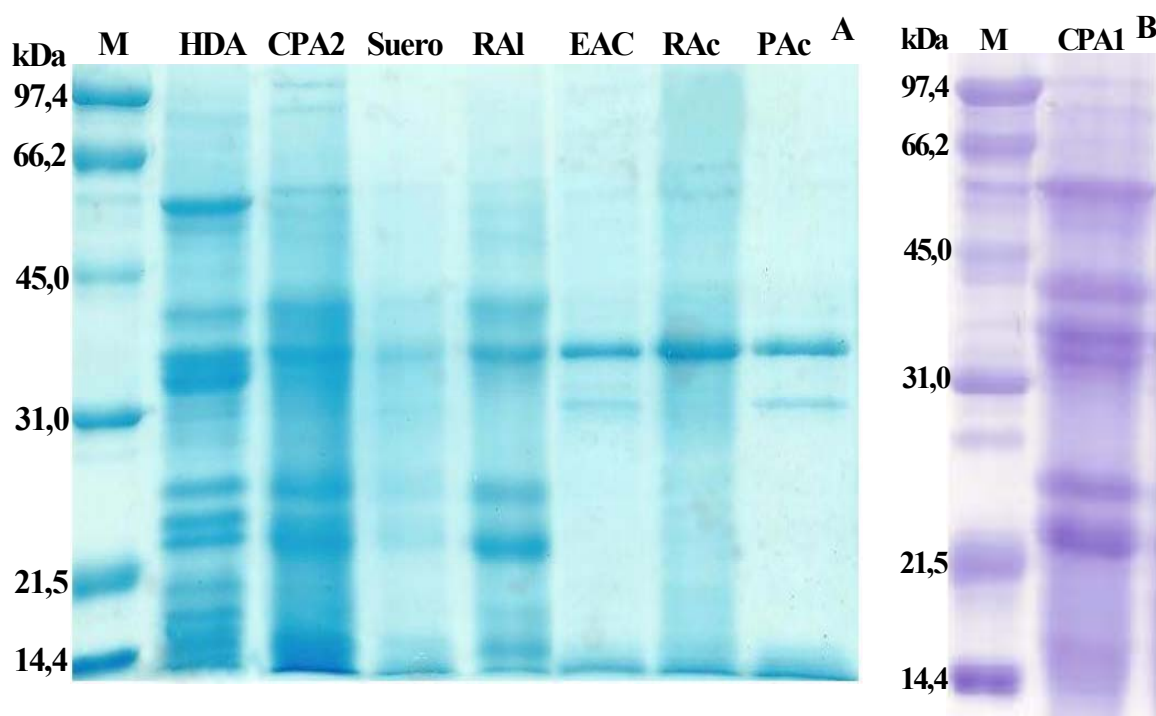


Figura 18. Electroforesis SDS-Page de las muestras, A: HDA, CPA2, Suero, RAI, EAC, RAc y PAc; B: CPA1 y patrones electroforéticos (M).

Por otra parte, varios autores han reportado los perfiles electroforéticos de las principales fracciones proteicas de amaranto. De acuerdo a Segura-Nieto et al. (1992), las albúminas de *A. hypochondriacus* son una fracción proteica de polipéptidos de tamaños muy heterogéneos, siendo los componentes de bajo peso molecular (< 30 kDa) los más abundantes, mientras que Barba de la Rosa et al. (1992) observaron una banda principal de 34 kDa y varias bandas menores de 28 a 14 kDa para la misma fracción. Konishi et al. (1991) en su trabajo separaron las fracciones de albúmina-1 y albúmina-2 de *A. hypochondriacus* y analizaron los perfiles SDS-Page de las mismas. En la fracción de

albúmina-1 predominaron los péptidos de 56, 36, 26, 22 kDa y otros de más bajo peso molecular. En la fracción de albúmina-2 se les incorpora un péptido de 31 kDa y no hay cambios cuando se trata la muestra con 2-ME. Otros autores han obtenido resultados semejantes (Segura-Nieto et al., 1994; Marcone y Yada, 1992; Martínez y Añón, 1996). Según lo reportado por Gorinstein et al. (2005), las fracciones de albúmina-1 de *A. hybridum*, *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* presentaron una banda principal de 34 kDa y bandas menores de peso molecular menor a 30 kDa y las de albúmina-2 presentaron una banda principal de peso molecular mayor a 42,7 kDa y polipéptidos de 52,3; 54 y 56 kDa.

Las globulinas de *A. hypochondriacus* presentan componentes de alto peso molecular (72 kDa y mayores de 80 kDa), polipéptidos intermedios (67; 52; 42; 38; 36 y 25 kDa) y otros de bajo peso molecular (≤ 20 kDa), con pequeñas diferencias al tratar la muestra con 2-ME (Barba de la Rosa et al., 1992). Mora-Escobedo et al. (1990) observaron bandas de peso molecular por encima de 50 kDa en el perfil electroforético de globulinas de *A. hypochondriacus* y sugirieron que esas fracciones podrían corresponder a proteínas no agregadas. Otros autores relatan que la fracción globulina de amaranto contiene algunos heteroligómeros de alta masa molar del tipo 7S (conamarantina) en el rango de 50 a 73 kDa (Barba de la Rosa et al., 1992; Marcone y Yada, 1992; Segura-Nieto et al., 1994; Gorinstein et al., 1991 y 1996). Martínez et al. (1997) relataron que las globulinas de amaranto, una de las proteínas de reserva más abundante, pueden estar presentes en diferentes estados de agregación dentro de la semilla, llevando a diferentes solubilidades en solventes acuosos.

Las prolaminas presentan el número más bajo de bandas, en la mayoría de los casos se detectaron 4 bandas de 10, 12, 18 y 22 kDa; también se observaron polipéptidos menores en la región de 30 a 40 kDa para *A. hypochondriacus* (Segura- Nieto et al., 1992).

El perfil de las glutelinas es similar a la combinación del perfil de las globulinas y albúmina-2; presenta bandas de 52 y 57 kDa, de valores intermedios (30 a 45 kDa) y de peso molecular mayor a 80 kDa (Martínez y Añón, 1996).

La identificación de bandas correspondientes a las fracciones proteicas principales en el perfil proteínico total de la HDA se dificulta debido a la superposición de bandas comunes entre las distintas fracciones. Aún en trabajos donde se separó las distintas fracciones, el análisis también resultó dificultoso (Martínez y Añón, 1996).

El perfil electroforético del CPA1 se presenta también en la Figura 18; se observan bandas proteicas principales correspondientes a los pesos moleculares de: 23,0; 25,9; 33,7; 37,2; 40,1 y 56,4 kDa; bandas difusas de 66,0; 90,6 y 112,3 kDa y un gradiente difuso de bandas entre 14 y 16 kDa.

El CPA2 presenta un perfil muy similar al del CPA1, con bandas principales de peso moleculares aproximados de 40,5; 37,2; 28,9; 26,8 kDa y un gradiente de bandas indefinidas de 20 a 14 kDa. Estas bandas son similares a la del perfil de la HDA y CPA1, pero la banda de 56,4 kDa se ve atenuada y desaparecen algunas bandas como las de 33 y 23 kDa. También aparecen bandas difusas de pesos moleculares elevados (124,7 y 101,8 kDa), así como se observan en el CPA1.

El Suero de la precipitación isoelectrica, muestra un perfil electroforético similar al CPA2 aunque las bandas aparecen más difusas en este caso, destacándose una banda al final del gel que indicaría la presencia predominantemente de proteínas de muy bajo peso molecular (< 14 kDa).

En concentrados proteicos de *A. hypochondriacus* (Martínez y Añón, 1996) obtenidos por precipitación isoelectrica (pH 9,0 para la extracción y pH 4,0 y 5,0 para la precipitación) se observaron todas las bandas de las 4 fracciones proteicas principales del amaranto, sin

preponderancia de ninguna, semejante a los perfiles del CPA2 y CPA1. Asimismo, se observó que extrayendo las proteínas a pH 8,0 los extractos contienen mayor proporción de albúmina-1, a pH > 8,0 se extraen principalmente albúmina-2, globulinas y glutelinas; y a pH > 10,0 el extracto está compuesto mayormente por agregados de alto peso molecular. En tanto que al precipitar a pH 6,0 y 7,0 preferentemente se concentra la fracción albúmina-2, y a pH \leq 5,0 se concentran principalmente albúmina-1 y globulinas. Estos resultados se correlacionan con los valores publicados de pI=5,0 para globulinas (Konishi et al., 1985 y Marcone y Yada, 1991) y pI= 5,8 para albúmina-2 (Konishi et al., 1991).

Avanza y Añón (2007) obtuvieron perfiles electroforéticos similares al del CPA2 y CPA1 en concentrados proteicos de *A. hypochondriacus*, obtenidos por precipitación isoeléctrica (pH 9,0 para extracción y pH 5,0 para precipitación), con bandas de 56; 41; 31-33; 29 y 20 kDa y una cantidad significativa de péptidos de bajo peso molecular (< 20 kDa).

Por otro lado, la electroforesis del RA1 obtenido por ultrafiltración presenta un perfil de fracciones proteicas similar al del CPA2 y CPA1, donde también se conservan bandas presentes en la HDA. Las bandas principales son de 37,2 y 26,8 kDa y se observan bandas más difusas de 40,5 y 28,6 kDa. A diferencia del CPA2 y CPA1, no se observan bandas de alto peso molecular, la banda de 56,4 kDa es prácticamente imperceptible y disminuyen las bandas en el rango de 20 a 14 kDa. Estos resultados indicarían que en la ultrafiltración no se forman los agregados de alto peso molecular como se vio en la precipitación isoeléctrica.

Las muestras de EAC, RAc y PAc presentan perfiles electroforéticos similares, con bandas de 37,2 y 33,5 kDa y proteínas de bajo peso molecular (< 14 kDa) al final del gel. El RAc también presenta dos bandas difusas de 61,84 y 56,8 kDa, que se insinúan en el EAC. En el PAc, no aparecen bandas por encima de 37,2 kDa, siendo este el peso molecular real de corte con que estaría funcionando el equipo de ultrafiltración.

4.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-Page-Tricina para separación de proteínas de bajo peso molecular

En la Figura 19 se observan los perfiles electroforéticos SDS-PAGE-Tricina de la HDA, CPA2, RAl y CPA1.

El perfil electroforético de la HDA presenta dos bandas al principio del gel que corresponden a polipéptidos de alto peso molecular y un gradiente de bandas indefinidas que comienza por arriba de los 26,6 kDa hasta el final del gel. Dentro del gradiente se destacan con mayor intensidad bandas de pesos moleculares aproximados de 18,8; 16,4; 13,5 y entre 9 y 5 kDa. El CPA2, el RAl y CPA1 presentan perfiles similares con gradientes aún más indefinidos de péptidos. Se observa que en estos, se destaca la banda de 18,8 kDa.

Los perfiles electroforéticos del EA, EAC, RAc, PAc y del Suero se presentan en la Figura 20. En el perfil del EA se observan dos bandas principales, una de 26,6 kDa y otra por arriba de este peso, dos bandas difusas de 22,4 y 19,2 kDa, y un gradiente difuso de bandas entre 7,1 y 5,3 kDa.

El RAc y el EAC presentan un perfil muy similar con un gradiente de bandas indefinidas que comienza por arriba de los 26,6 kDa hasta 17 kDa aproximadamente. Por otro lado, el PAc presenta una banda de 26,6 kDa y otra de mayor peso molecular, similar al EA, y un gradiente de bandas indefinidas a partir de los 10 kDa aproximadamente hasta el final del gel. Se puede distinguir el predominio de bandas al principio del gel en el perfil RAc, y la mayor cantidad de bandas que presenta el PAc al final del gel lo que sería producto de la separación por ultrafiltración.

En el perfil del Suero de la precipitación isoelectrica se observan bandas con pesos moleculares de 32,3 a 22,4 kDa, una banda destacable de 18,7 kDa y un gradiente de bandas

entre 15,9 y 3,2 kDa. La gran cantidad de bandas del perfil del Suero observadas en este gel a diferencia de las pocas observadas en el gel sin Tricina (Figura 18), indicarían el predominio de proteínas de bajo peso molecular en esta muestra.

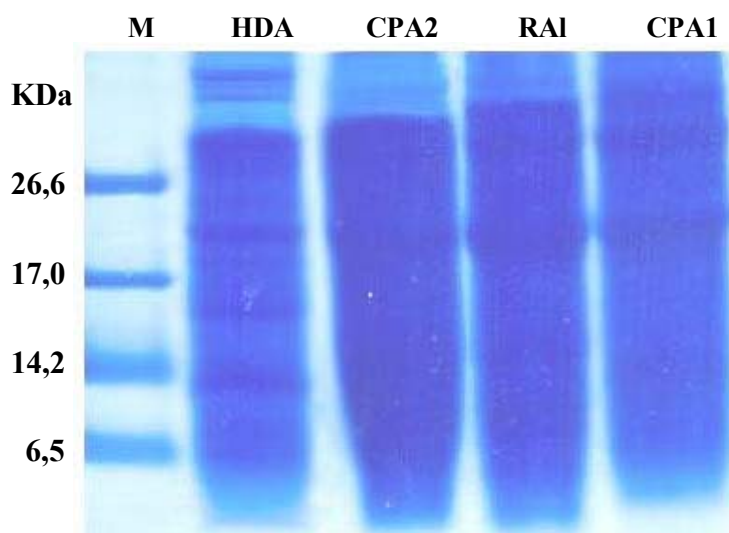


Figura 19. Electroforesis SDS-Page-Tricina de la HDA, CPA2, RAI, CPA1 y patrones electroforéticos (M).

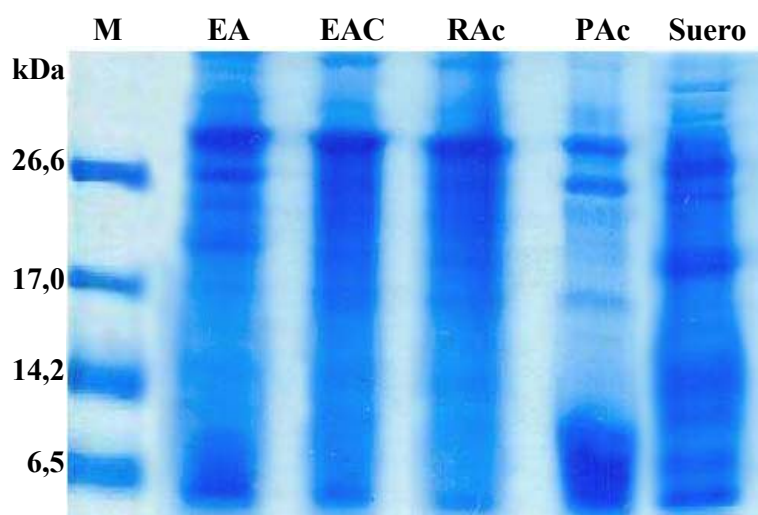


Figura 20. Electroforesis SDS-PAGE-Tricina del EA, EAC, RAc, PAc, Suero y patrones electroforéticos (M).

4.2.3. Cromatografía líquida de alta eficiencia de exclusión molecular (HPLC-SEC)

En las Figuras 21 a 23 se presentan los cromatogramas de las fracciones proteicas solubles en el tampón fosfato utilizado (50 mM, 0,15 M NaCl, pH 6,8) midiendo la absorbancia a 214 nm, también se indican los tiempos de retención de los pesos moleculares patrones.

En la Figura 21 se pueden observar los cromatogramas correspondientes a las muestras de HDA, CPA2, CPA1 y RA1. La HDA presenta picos poco definidos de masas moleculares aparentes de 52,8; 4,4; 2,3 y 0,3 kDa.

El CPA2 presenta en general un cromatograma similar al de la HDA, aunque el pico de 0,3 kDa disminuye y aparece uno de 0,7 kDa, se conserva el pico de 4,4 kDa y se concentran fracciones de alta masa molecular (aproximadamente 136 kDa). También aparece un pico a corto tiempo de elución, que correspondería a una fracción masa molar aparente de 1400 kDa. El CPA1 obtenido por el método tradicional, presenta aproximadamente los mismos picos del CPA2 en su perfil cromatográfico, con el pico de 1400 kDa y una diferenciación de dos picos de alta masa molecular (237 y 170 kDa) kDa. Cordero de los Santos et al. (2005) en el perfil cromatográfico de un concentrado proteico de *A. hypochondriacus* obtuvo un pico similar de 1380 kDa. Estos autores proponen la formación de agregados provocados por una parcial desnaturalización y asociación/disociación de las proteínas a los pH de extracción y precipitación. Castellani et al. (1999) reportaron fracciones de elevado peso molecular (3000 y 650 kDa) en preparaciones de globulinas de amaranto, que corresponderían a polímeros de amarantina estabilizados por uniones disulfuro intra- e inter- moleculares. Otros autores observaron la asociación reversible de unidades de amarantina con pesos entre 300 y 350 kDa (Osuna-Castro et al., 2000; Marcone, 1999; Barba de la Rosa et al., 1996).

Los complejos proteicos de alta masa molecular podrían estar estabilizados por interacciones tanto covalentes (puentes disulfuros) como no covalentes.

En el RAI no se observan fracciones de masa molecular elevada como en el CPA2 y CPA1, lo que podría indicar que la ultrafiltración no provoca la formación de agregados de elevado peso molecular (> 1000 kDa). Asimismo, el perfil electroforético SDS-Page del RAI no mostró bandas de alto peso molecular. La fracción de 278 kDa en el RAI podría ser un agregado proteico formado por los sucesivos lavados (diafiltraciones). Esto es comparable a lo analizado por Cordero de los Santos et al. (2005) en concentrados proteicos de *A. hypochondriacus* obtenidos por micelación, donde se observaron picos de 905 y 190 kDa. Estos autores atribuyen las diferencias de masas moleculares entre los concentrados por precipitación isoelectrónica y micelación a las condiciones de pH en la obtención. En ambos casos proponen que los agregados formados podrían ser el resultado de asociaciones reversibles de unidades de amarantina con pesos moleculares de 300 a 350 kDa.

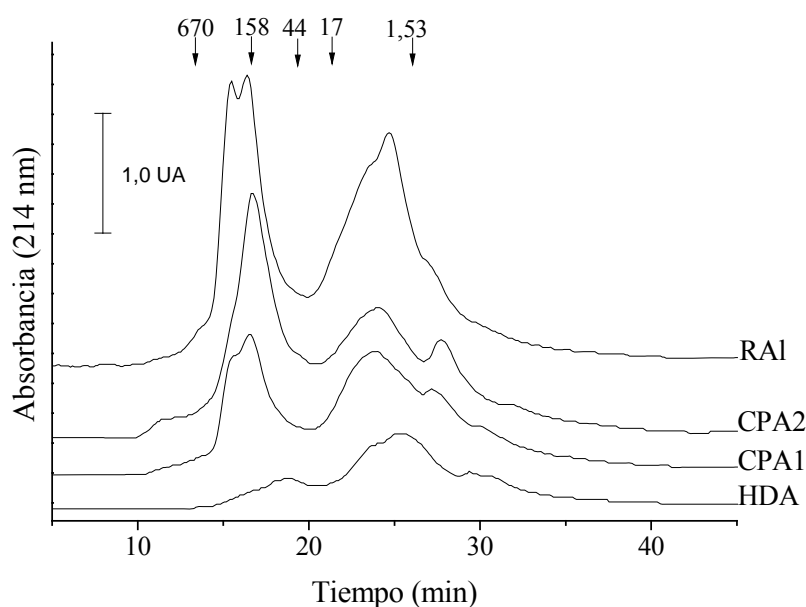


Figura 21. Perfiles HPLC de exclusión molecular de la HDA, RAI, CPA2 y CPA1.

El cromatograma de exclusión molecular del Suero de la precipitación isoeléctrica se presenta en la Figura 22, en comparación con el de la HDA y CPA2. Se observa que en el Suero se concentran las fracciones de baja masa molecular que aparecen en la HDA, que son solubles al pH isoeléctrico ya que no alcanzan a tener una masa crítica para precipitar. En tanto que en el CPA2 se concentran fracciones de alto peso molecular que se observan en la HDA, y aparecen otras fracciones de masa más elevada como se dijo anteriormente.

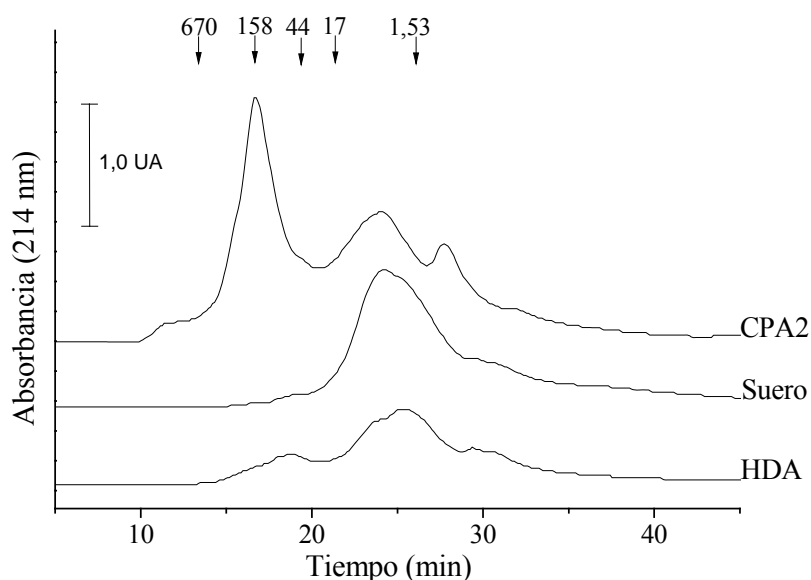


Figura 22. Perfiles HPLC de exclusión molecular de: HDA, CPA2 y Suero.

En la Figura 23 se muestran los perfiles de distribución de masa molar de la HDA, EAC, RAc y PAc. El perfil cromatográfico del EAC presenta un perfil similar al del HDA con un incremento en la intensidad de todos los picos. El cromatograma del RAc presenta picos con masas moleculares aparentes de aproximadamente 204 y 76,5 kDa, indicando la concentración de fracciones de alto peso molecular. Se observa que en el PAc se han concentrado fracciones de baja masa molecular por pico más ancho (polipéptidos) y aparece

una contaminación con una fracción de aproximadamente 62,9 kDa que ha permeado por la membrana de la ultrafiltración o es resultado de agregaciones por la fuerza iónica del buffer de solubilización.

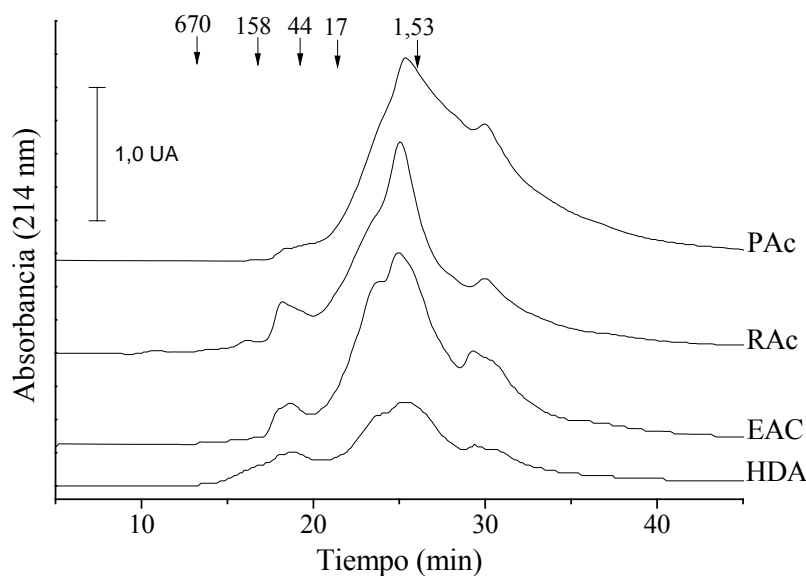


Figura 23. Perfiles HPLC de exclusión molecular de: HDA, EAC, RAc y PAc.

4.2.4. Hidrofobicidad superficial y solubilidad

En la Tabla 2 se muestran los valores obtenidos de índice de hidrofobicidad superficial (S_0) y solubilidad de las muestras de amaranto y de un aislado de proteínas de suero lácteo (WPI). La S_0 se refiere a cambios de energía libre de la unión de sondas fluorescentes no polares tales como 1-anilinaftaleno-8-sulfonato (ANS) o ácido *cis*-parinámico a parches o cavidades hidrofóbicas sobre la superficie de la proteína. Esta propiedad está relacionada con el anclaje inicial de la molécula en las interfases aire/agua y aceite/agua.

En este trabajo los valores de S_0 que presentaron todas las muestras fueron mucho menores al valor que se determinó con la proteína de referencia (BSA). La muestra que presentó mayor hidrofobicidad superficial fue el CPA2, siendo este valor cercano al del WPI.

El valor del CPA1 fue algo menor aunque relativamente alto comparando con las demás muestras.

Tabla 2. Índice de hidrofobicidad y porcentaje de solubilidad en el buffer de espumado de las muestras proteicas \pm D.S.

Muestras	Índice de hidrofobicidad ^a	Solubilidad (%) ^b
	(S ₀)	
CPA1	26,9	46,0 \pm 3,0 ^A
CPA2	28,9	52,3 \pm 4,5 ^A
RAI	12,7	86,5 \pm 3,7 ^C
RAc	2,8	73,6 \pm 3,8 ^B
PAC	1,8	100,0 \pm 3,1 ^D
H 1	10,0	100,0 \pm 3,7 ^D
H 2	10,9	100,0 \pm 2,1 ^D
WPI ^c	29,8	92,8 \pm 1,8 ^C

^a Índice de hidrofobicidad de la albúmina sérica bovina (BSA) 763,8, tomado como proteína de referencia.

^b Buffer TRIZMA 0,05M, pH 7,0

^c Porcentaje de proteínas 90%.

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ($P < 0,05$), test LSD.

Valores similares se encuentran registrados en la literatura por Gorinstein et al. (2001), para dos fracciones de albúminas obtenidas por diferentes procesos de extracción, Alb-1 y Alb-2 (S₀: 25 y 50, respectivamente), y una fracción de globulina (S₀: 15), estos valores fueron obtenidos a partir de fracciones proteicas de semillas de amaranto variedad A. hypochondriacus.

La fracción identificada como RAI obtenida por ultrafiltración presenta una S₀ menor a la mitad de la hidrofobicidad del CPA2, lo que indicaría que la mayoría de los péptidos y

proteínas con características de mayor hidrofobicidad superficial atraviesan la membrana de ultrafiltración utilizada.

Por otro lado, las fracciones obtenidas de la ultrafiltración ácida, el RAc y el PAc, presentaron los valores más bajos de S_0 .

Los hidrolizados H1 y H2 obtenidos a partir del CPA1 presentan valores de S_0 menores a los de este concentrado. Resultados similares fueron obtenidos por Molina-Ortiz y Wagner (2002) en hidrolizados de BSA y de aislados proteicos de soja tratados térmicamente. La S_0 de los hidrolizados de ambos fue menor a la de las proteínas de partida. Estos autores explican este hecho sobre la base de la pérdida de la estructura proteica con la generación de péptidos hidrofílicos de baja masa molecular con poca afinidad por el ANS.

La solubilidad es una propiedad de suma importancia que gobierna el comportamiento funcional de las proteínas y su potencial aplicación en alimentos procesados. Describe la capacidad de formar soluciones coloidales. La misma depende del estado fisicoquímico de las moléculas que puede ser alterado por el calentamiento, procesamiento, secado y condiciones del almacenamiento. A su vez depende del pH, fuerza iónica, temperatura y presencia de solventes orgánicos (Pilosoph y Bartholomai, 2000). Generalmente, las proteínas solubles poseen mayores atributos funcionales para su aplicación en alimentos. Bigelow (1967) propuso dos características estructurales, la densidad de carga y la hidrofobicidad, como los factores de control más relevantes para la solubilidad de las proteínas. Una alta densidad de carga y baja hidrofobicidad, genera una mayor solubilidad. Las muestras de amaranto CPA1 y CPA2 que tienen altos S_0 presentan baja solubilidad, mientras que las demás muestras que presentan baja S_0 tienen alta solubilidad (Tabla 2).

El PAc y los hidrolizados son los que presentan los valores más altos de solubilidades en el buffer de espumado. La alta solubilidad del PAc se relacionaría con la solubilidad de

las proteínas de bajo peso molecular solubles a pH ácido que atraviesan la membrana de ultrafiltración. En tanto que la mayor solubilidad de los hidrolizados estaría relacionada con los péptidos generados en la hidrólisis en concordancia con otros autores (Molina-Ortiz y Wagner, 2002; Scilingo et al., 2002; Aluko y Monu, 2003). La hidrólisis de proteínas disocia agregados insolubles, produce péptidos más pequeños, aumenta la exposición de grupos hidrofílicos y facilita la interacción de aminoácidos hidrofílicos con el medio acuoso, lo que lleva a un aumento de solvatación y solubilidad de los concentrados proteicos (Aluko y Monu, 2003). En este caso se observó un aumento del 54 % de solubilidad en los hidrolizados con respecto al CPA1 del cual se obtuvieron.

El CPA2 presenta mayor solubilidad que el CPA1, aunque ambos valores son relativamente bajos comparados con las demás muestras. En cambio, el RAI de la ultrafiltración presenta alta solubilidad, cercana al WPI. Esta diferencia podría deberse a cambios conformacionales que se producirían en la precipitación isoelectrica (formación de agregados proteicos como se vió en la electroforesis, sección 4.2) y que disminuyen la solubilidad de las proteínas.

Conclusiones parciales de la sección 4.2

La muestra de HDA de *A. mantegazzianus* analizada por electroforesis presentó bandas similares a la de otras variedades de amaranto citadas en la bibliografía. Los perfiles electroforéticos de los concentrados obtenidos por precipitación isoelectrica, CPA1 y CPA2, no presentan diferencias notorias entre ellos y son semejantes a los perfiles de concentrados estudiados por otros autores. El concentrado obtenido por ultrafiltración RAI presenta un perfil similar al CPA1 con desaparición de las bandas de alto peso molecular (124 y 102 kDa) y disminución de intensidad de las correspondientes a 56,4 kDa y 20-14 kDa. En la

electroforesis de derivados por ultrafiltración del extracto ácido, RAc y PAc se puede observar que a través de la membrana pasan proteínas de mayor peso molecular (37,2 kDa) al peso molecular de corte (20 kDa) de la membrana. En el Suero de la precipitación isoeléctrica principalmente se concentran proteínas de bajo peso molecular (menor a 36 kDa).

Al comparar los resultados obtenidos por electroforesis y HPLC, estos presentan diferencias debido a los buffers de disolución de las muestras. En HPLC en general se observaron agregados de elevado peso molecular. Por otro lado, el poder de resolución de la columna es inferior a la de las distintas electroforesis, lo que llevó en este caso a una baja resolución de picos pudiéndose sólo comparar los perfiles de los cromatogramas. Se puede destacar que en los concentrados CPA1, CPA2 y RA1 se forman agregados de peso molecular alrededor de 158 kDa y mayores, mientras que el Suero, PAc y RAc están constituidos por proteínas y péptidos de bajo peso molecular.

Respecto a la hidrofobicidad y solubilidad de las fracciones, en general las muestras presentan baja S_0 con respecto a la BSA, pero algunas de ellas, CPA1 y CPA2, están en el orden del WPI tomado como referencia. Además presentan alta solubilidad (> 73%), salvo los concentrados obtenidos por precipitación isoeléctrica (CPA1 y CPA2).

4.3. Contenido de aminoácidos de las muestras proteicas por HPLC

La composición aminoacídica de la HDA de *A. mantegazzianus*, de *A. cruentus*, de las proteínas de soja y los respectivos *scores* químicos, así como el requerimiento de aminoácidos esenciales recomendados por la FAO/WHO (1991) se presentan en la Tabla 3.

En la HDA los aminoácidos más abundantes son ácido aspártico, glutamina, serina, glicina, arginina y leucina en concordancia a lo reportado por Duarte-Correa et al. (1986)

para *A. mantegazzianus* y por Juan et al. (2007) en la evaluación de otras once especies del género amaranto.

Los aminoácidos limitantes en la HDA de *A. mantegazzianus* con respecto a lo recomendado por la FAO/WHO resultaron ser leucina y lisina, además el contenido de lisina (5,03 g /100 g de proteína) resulta inferior a lo reportado para las proteínas de soja (6,86 g /100 g de proteína) (Smith y Circle, 1972) y superior a las proteínas de cereales como arroz (3,2 g /100 g de proteína), trigo (3,6 g /100 g de proteína), avena (3,6 g /100 g de proteína) y maíz (2,3 g /100 g de proteína). Sin embargo, el contenido de aminoácidos azufrados de la HDA de *A. mantegazzianus* obtenida en este trabajo (3,3 g /100 g de proteína= metionina + cisteína) cumple con el requerimiento de la FAO/WHO (E.Q.= 1,36) y es mayor al contenido encontrado en *A. cruentus* (1,6 g/ 100 g de proteína), en proteínas de soja (3,14 g/ 100 g de proteína), y en cereales como avena (2,0 g/100 g de proteína) y arroz (3,1 g/ 100 g de proteína) (Sgarbieri, 1996). El alto contenido de lisina y aminoácidos azufrados es una característica de interés en alimentos de origen vegetal para complementar la deficiencia de leguminosas y cereales.

La HDA de *A. mantegazzianus* en este estudio presentó en general un equilibrio aminoacídico más próximo a lo requerido por la FAO que la harina de *A. cruentus* (Juan et al., 2007) que presentó deficiencia de cinco aminoácidos (tirosina, metionina+cisteína, leucina y lisina).

Duarte-Correa et al. (1986) reportaron para la harina de *A. mantegazzianus* mayor contenido de cisteína (59 %), lisina (23 %) y serina (21 %) y menor contenido de metionina (16 %) que los obtenidos en este trabajo para la harina desgrasada. El aminoácido limitante en ese estudio fue solamente leucina y no lisina como en este trabajo.

Tabla 3. Composición aminoacídica (g de aminoácido/100 g de proteína) y *score* químico de la HDA en comparación con el patrón de aminoácidos esenciales de la FAO/WHO y datos bibliográficos. Los datos son promedio de dos determinaciones \pm desviación estándar.

	HDA <i>A. mantegazzianus</i>	S. Q. ^a	<i>A. cruentus</i> ^b	S. Q.	Proteínas de soja ^c	S. Q.	FAO/WHO ^d
ASP	7,96 (\pm 0,04)	-	12,5	-	12,0	-	-
GLN	17,04 (\pm 0,02)	-	17,7	-	21,0	-	-
SER	5,85 (\pm 0,01)	-	10,5	-	5,97	-	-
GLY	7,59 (\pm 0,02)	-	11,2	-	4,52	-	-
HIS	3,30 (\pm 0,01)	1,74	2,0	1,05	2,55	1,34	1,9
ARG	10,20 (\pm 0,07)	-	8,8	-	8,24	-	-
THR	3,98 (\pm 0,02)	1,17	4,2	1,24	4,67	1,37	3,4
ALA	4,01 (\pm 0,03)	-	4,2	-	4,51	-	-
PRO	4,35 (\pm 0,06)	-	N.D.	-	6,28	-	-
TYR	3,95 (\pm 0,00)	1,29	2,3	0,94	3,90	-	6,3**
VAL	4,29 (\pm 0,01)	1,22	4,0	1,14	5,38	1,54	3,5
MET	2,14 (\pm 0,02)	1,36	0,2	0,64	1,56	1,26	2,5*
CYS	1,26 (\pm 0,01)	-	1,4	-	1,58	-	-
ILE	3,61 (\pm 0,01)	1,29	2,9	1,04	5,10	1,82	2,8
LEU	5,71 (\pm 0,03)	0,87	6,4	0,97	8,91	1,35	6,6
PHE	4,18 (\pm 0,02)	-	3,6	-	5,01	1,41	-
LYS	5,03 (\pm 0,01)	0,87	5,3	0,91	6,86	1,18	5,8
TRP	N. D.	-	2,7	2,45	1,28	1,16	1,1

^a S.Q. *Score* químico calculado utilizando como referencia las recomendaciones para aminoácidos esenciales de la FAO/WHO (1991).

^b Juan et al., 2007.

^c Smith y Circle, 1972.

^d Requerimientos en aminoácidos esenciales (mg/g de proteína), propuestos por la FAO/WHO (1991) (Juan et al., 2007).

* Metionina + Cisteína, ** Tirosina + Fenilalanina.

N. D. = No determinado.

El contenido de proteína y perfil aminoacídico de la harina depende en primer lugar del genotipo y condiciones de cultivo (Gorinstein et al., 2001), así como del proceso de obtención de la harina. Marcilio et al. (2003) reportaron una reducción de aminoácidos entre el 39,6 y 67,2 % en el proceso de refinamiento de la harina. También es esperada una pérdida de prolaminas (proteínas solubles en alcohol) en el caso que se desgrase la harina con alcohol etílico, perdiéndose lisina que es abundante en esa fracción.

En la Tabla 4 se presenta la composición aminoacídica del CPA1, CPA2, Suero, RAI, EA, EAC, RAc y PAc y en las Figuras 24 y 25 se grafican el porcentaje de diferencia relativa del contenido de cada aminoácido en los concentrados con respecto a la HDA.

En general, al comparar el contenido de aminoácidos de la HDA con los concentrados, puede observarse un aumento del contenido de algunos aminoácidos entre 1 a 113 % en los concentrados y disminución de otros.

En el CPA1 obtenido por precipitación isoelectrica sin extracción ácida inicial, se observa principalmente un aumento de fenilalanina (43 %), metionina (40 %), treonina (34%) e histidina (32 %); y una disminución del 17 % de glicina y 10 % de cisteína.

En el CPA2 obtenido por precipitación isoelectrica con extracción ácida inicial, el aumento de las concentraciones de aminoácidos fue menor y puede destacarse el contenido de isoleucina y fenilalanina (aumento del 31 y 38 % respectivamente); por otro lado, se observa una disminución de serina y una pérdida considerablemente mayor de glicina que en el CPA1 en este concentrado (31 %).

El Suero obtenido de la precipitación isoelectrica, presenta una disminución del contenido de la mayoría de los aminoácidos y un aumento destacado de metionina (45 %) y cisteína (56 %), lo que podría indicar que se ha concentrado en el Suero la fracción de albúminas (hidrosolubles), ricas en estos aminoácidos (Segura-Nieto et al., 1992).

Tabla 4. Composición aminoacídica (g de aminoácido/100 g de proteína) del CPA1, CPA2, Suero, RAI, EA, EAC, RAc y PAc. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar.

AA	CPA1	CPA2	Suero	RAI	EA	EAC	RAc	PAc
ASP	9,19 (\pm 0,27)	8,54 (\pm 0,01)	6,39 (\pm 0,00)	9,87 (\pm 0,13)	6,51 (\pm 0,10)	6,57 (\pm 0,04)	3,97 (\pm 0,01)	6,18(\pm 0,00)
GLN	19,44(\pm 0,29)	18,24(\pm 0,25)	20,23(\pm 0,03)	19,39(\pm 0,62)	16,71(\pm 0,20)	17,67(\pm 0,17)	10,75 (\pm 0,06)	14,46(\pm 0,08)
SER	6,19 (\pm 0,27)	5,48 (\pm 0,15)	4,90 (\pm 0,04)	5,44 (\pm 0,09)	4,37 (\pm 0,06)	4,72 (\pm 0,06)	5,33 (\pm 0,03)	3,92(\pm 0,01)
GLY	6,28 (\pm 0,23)	5,20 (\pm 0,11)	6,63 (\pm 0,00)	5,26 (\pm 0,04)	9,55 (\pm 0,10)	10,04(\pm 0,01)	8,43 (\pm 0,02)	9,38(\pm 0,02)
HIS	4,35 (\pm 0,22)	3,99 (\pm 0,15)	3,74 (\pm 0,01)	3,78 (\pm 0,18)	2,90 (\pm 0,05)	3,15(\pm 0,07)	2,59 (\pm 0,01)	2,55(\pm 0,02)
ARG	12,29(\pm 0,35)	10,80(\pm 0,23)	12,63(\pm 0,02)	10,28(\pm 0,02)	10,35(\pm 0,11)	10,85(\pm 0,02)	7,71 (\pm 0,00)	8,98(\pm 0,01)
THR	5,31 (\pm 0,01)	4,45 (\pm 0,06)	4,08 (\pm 0,01)	4,35 (\pm 0,09)	3,55 (\pm 0,02)	3,63(\pm 0,04)	5,02 (\pm 0,01)	2,85(\pm 0,01)
ALA	4,65 (\pm 0,01)	4,07 (\pm 0,12)	3,88 (\pm 0,01)	3,90 (\pm 0,00)	4,02 (\pm 0,02)	4,02(\pm 0,00)	4,07 (\pm 0,00)	3,09(\pm 0,02)
PRO	4,95 (\pm 0,03)	4,78 (\pm 0,09)	3,88 (\pm 0,01)	4,48 (\pm 0,08)	3,22 (\pm 0,03)	3,17(\pm 0,01)	3,76 (\pm 0,01)	2,39(\pm 0,01)
TYR	4,64 (\pm 0,10)	4,32 (\pm 0,12)	3,90 (\pm 0,00)	4,13 (\pm 0,13)	3,08 (\pm 0,02)	3,31(\pm 0,06)	6,73 (\pm 0,01)	2,47(\pm 0,00)
VAL	4,84 (\pm 0,12)	4,73 (\pm 0,09)	3,86 (\pm 0,01)	4,63 (\pm 0,07)	3,34 (\pm 0,03)	3,49(\pm 0,02)	4,58 (\pm 0,01)	2,37(\pm 0,01)
MET	3,00 (\pm 0,04)	2,46 (\pm 0,02)	3,11 (\pm 0,00)	2,38 (\pm 0,08)	2,08 (\pm 0,02)	2,78(\pm 0,01)	2,17 (\pm 0,01)	1,64(\pm 0,01)
CYS	1,13 (\pm 0,02)	1,31 (\pm 0,01)	1,97 (\pm 0,01)	1,46 (\pm 0,01)	1,70 (\pm 0,00)	2,50(\pm 0,00)	1,40 (\pm 0,00)	1,26(\pm 0,01)
ILE	4,52 (\pm 0,03)	4,71 (\pm 0,12)	3,66 (\pm 0,01)	5,03 (\pm 0,03)	2,55 (\pm 0,04)	2,57(\pm 0,02)	3,83 (\pm 0,01)	1,64(\pm 0,01)
LEU	7,03 (\pm 0,04)	6,89 (\pm 0,16)	4,75 (\pm 0,03)	7,27 (\pm 0,15)	3,75 (\pm 0,04)	3,86(\pm 0,02)	5,56 (\pm 0,00)	2,58(\pm 0,00)
PHE	5,98 (\pm 0,45)	5,79 (\pm 0,11)	3,91 (\pm 0,02)	8,90 (\pm 0,14)	6,51 (\pm 0,03)	2,71(\pm 0,02)	4,02 (\pm 0,01)	1,94(\pm 0,01)
LYS	5,34 (\pm 0,00)	5,08 (\pm 0,01)	5,50 (\pm 0,01)	9,14 (\pm 0,16)	16,71(\pm 0,04)	6,91(\pm 0,04)	5,30 (\pm 0,01)	5,16(\pm 0,00)

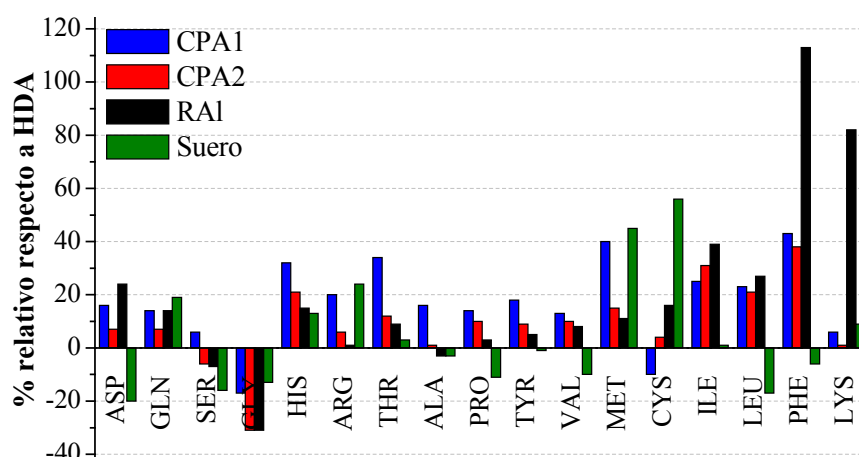


Figura 24. Porcentajes de diferencia del contenido de cada aminoácido en el CPA1, CPA2, RAI y Suero con respecto a la HDA.

En el RAI obtenido por ultrafiltración, es importante el aumento de fenilalanina (113 %) y lisina (82 %) con respecto a la HDA, y se observa la disminución de glicina (31 %) y serina (7 %). El alto contenido de lisina es una característica nutricional importante para complementar la deficiencia de los cereales y legumbres. En este trabajo puede observarse que con la utilización de la ultrafiltración para la concentración de proteínas, se logra, ya sea, enriquecer el producto final con fracciones proteicas ricas en este aminoácido, o bien, disminuir la pérdida de las mismas en el proceso.

Las diferentes condiciones a las que se exponen las proteínas presentes en la HDA en los diferentes procesos de obtención de los concentrados pueden, por un lado, alterar la composición de las proteínas separadas, y por otro, pueden llevar a la extracción y/o exclusión selectiva de diferentes fracciones proteicas. Consecuentemente, se obtienen productos finales con diferentes perfiles aminoacídicos, por lo que a su vez, pueden presentar diferentes funcionalidades y calidades nutricionales. Uno de los efectos de la concentración de proteínas es la degradación de aminoácidos de acuerdo al proceso y las

condiciones aplicadas. Una de estas degradaciones es conocida como beta-eliminación, que es favorecida por condiciones de pH alcalino ($> 8,0$) y temperaturas elevadas (principalmente por encima de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esta ocasiona pérdidas nutricionales y alteración de digestibilidad de la proteína (Damodaran y Paraf, 1997). Sarwar et al. (1999) informaron que la formación de lisinoalanina en la beta-eliminación fue acompañada de la pérdida de cisteína (73-77 %), treonina (35-45 %), serina (18-30 %) y lisina (19-20 %) en aislados proteicos producidos por extracción alcalina a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$. En este trabajo, no se han detectado pérdidas considerables de estos aminoácidos en los concentrados, indicando que la reacción de beta-eliminación no ocurre de forma importante; el hecho de que los concentrados han sido procesados a temperaturas iguales o menores a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ corrobora esta observación. Por otro lado, Lindeboon (2005) encontró pérdidas significativas de lisina durante la producción de aislados proteicos de quinoa, de forma semejante por precipitación isoelectrónica y por ultrafiltración, lo que tampoco ha sido observado en este trabajo.

El *score* químico, calculado utilizando como referencia las recomendaciones para aminoácidos esenciales de la FAO/WHO (1991), indicó que, tanto para el CPA1, CPA2 y el Suero los aminoácidos limitantes fueron leucina (0,91; 0,88 y 0,59 respectivamente) y lisina (0,92; 0,88 y 0,95 respectivamente) como se observó para la HDA. En cambio, para el RAI ningún aminoácido resultó limitante, por lo que el perfil aminoacídico de éste concentrado es convenientemente equilibrado con respecto a aminoácidos esenciales según lo recomendado por la FAO/WHO.

En cuanto al contenido de aminoácidos azufrados, se observa un aumento de metionina con respecto a la HDA en todos los concentrados, destacándose el aumento de 40 % en el CPA1 y 45 % en el Suero; el contenido de cisteína aumenta en el CPA2 y RAI,

destacándose el aumento de 56 % en el Suero, sin embargo en el CPA1 se observa una disminución de este aminoácido.

El contenido de lisina aumenta en todos los concentrados, especialmente en el RAl obtenido por ultrafiltración como se indicó anteriormente.

En la Figura 25 se grafican los porcentajes de diferencia relativa del contenido de cada aminoácido en el EA, EAC, RAc y PAc con respecto a la HDA.

En el EA se observa la disminución de todos los aminoácidos con respecto a la HDA a excepción de la glicina, cisteína y lisina. Luego de la clarificación, se observa en el EAC que aumentan aún más los valores de cisteína (98 %), lisina (37 %) y glicina (32 %) y además aumenta la metionina (30 %).

En la ultrafiltración, se separa, por un lado, el RAc en el que se destaca un aumento de 71 % de tirosina y 26 % de treonina; y por otro lado, el PAc en el que se observan los valores más bajos en los diferentes aminoácidos.

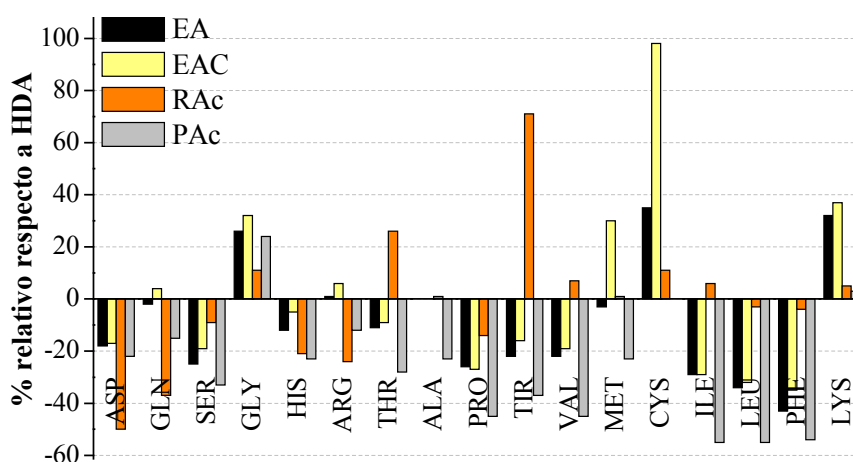


Figura 25. Porcentajes de diferencia del contenido de cada aminoácido en el EA, EAC, RAc y PAc con respecto a la HDA.

Conclusiones parciales de la sección 4.3.

El análisis de composición de aminoácidos de las proteínas de *A. mantegazzianus* mostró que es deficiente en leucina y lisina al compararlo con el patrón de la FAO/WHO (1991). Al compararlo con los datos bibliográficos de *A. cruentus*, en general presenta un perfil similar, destacándose un mayor contenido de metionina, histidina y tirosina, y levemente menor contenido de leucina.

Respecto a las distintas fracciones separadas se puede destacar que en los concentrados CPA1, CPA2 y RAI aumenta la concentración de la mayoría de los aminoácidos destacándose los valores de fenilalanina, isoleucina y metionina. El concentrado obtenido por ultrafiltración RAI no tiene ningún aminoácido limitante con respecto a lo requerido por la FAO, destacándose que el mismo se enriqueció especialmente en fenilalanina y lisina.

En las fracciones derivadas del EA es notoria la disminución relativa en general de todos los aminoácidos y aumentando en cambio el porcentaje de glicina, cisteína y lisina.

4.4. Contenido de compuestos con actividad bioquímica con potencial fisiológico

4.4.1. Contenido de compuestos fenólicos en extractos metanólicos y acuosos

El contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos metanólicos y acuosos de las distintas muestras se presenta en la Tabla 5.

Los extractos acuosos y metanólicos de la HDA de *A. mantegazzianus* presentan valores superiores a los de otras variedades informadas en la literatura. Carrasco y Encina-

Zelada (2008) reportaron contenidos de compuestos fenólicos en el rango de 0,19 a 0,30 mg EAG /g de muestra en extractos metanólicos de harinas de seis variedades de *A. caudatus*. Czerwinski et al. (2004) informaron valores de 0,149 y 0,147 mg EAG/g de muestras de harinas de dos variedades de *A. hypochondriacus*. Gorinstein et al. (2007) encontraron valores mucho menores (entre 0,011 y 0,034 μ g EAG/g muestra) en extractos acuosos y acetónicos de *A. cruentus*, *A. hybridum* y *A. hypochondriacus*. Por otro lado, los valores reportados por Paško et al. (2009) para extractos con metanol-HCl de dos variedades de *A. cruentus* resultaron superiores a los obtenidos en este trabajo (2,95 y 3,0 mg EAG/g muestra). La extracción metanol-ácido produce una hidrólisis ácida que libera compuestos fenólicos ligados a proteínas y aumenta la extracción de los mismos (Gorinstein et al., 2007). Al respecto, varios autores resaltan la importancia del método de extracción y del solvente utilizado (Gorinstein et al., 2007; Nsimba et al., 2008; Ozsoy et al., 2009). La utilización de solventes con diferentes polaridades lleva a diferencias en el contenido de fenólicos como en la capacidad antioxidante (Matthäus, 2002; Gorinstein et al., 2007).

En comparación con la harina desgrasada de soja también analizada en este trabajo, la HDA presentó menor contenido de fenólicos en ambos extractos.

Los extractos acuosos y metanólicos de las muestras derivadas de la HDA presentan mayor contenido de fenólicos que esta misma (a excepción del extracto metanólico del RAI), por lo que puede decirse que las distintas condiciones y procesos de obtención han logrado concentrar los compuestos fenólicos respecto a la materia prima.

Entre los extractos metanólicos, los que presentan mayor contenido de compuestos fenólicos son los extractos del Suero (6,89 mg de EAG/ g de muestra), del EA (7,10 mg de EAG/ g de muestra) y del EAC (6,97 mg de EAG/ g de muestra). Esto muestra que los

compuestos fenólicos se han concentrado en las fracciones solubles de la extracción ácida inicial y de la precipitación isoelectrónica.

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos metanólicos y acuosos de las distintas muestras. Concentración proteica en los extractos acuosos. Los datos se expresan como la media de tres determinaciones \pm D.S.

Muestras	Compuestos fenólicos totales (mg EAG/g muestra)		Proteína (mg/ml)
	Extractos metanólicos	Extractos acuosos	Extractos acuosos
	HDA	0,98 \pm 0,07 ^{a, b, A}	1,12 \pm 0,02 ^{a, B}
CPA1	2,51 \pm 0,06 ^{d, A}	3,85 \pm 0,07 ^{e, B}	5,83 \pm 0,10 ^d
CPA2	1,16 \pm 0,04 ^{b, A}	5,50 \pm 0,08 ^{h, B}	7,07 \pm 0,14 ^{e, f}
Suero	6,89 \pm 0,12 ^{h, i, j, B}	6,47 \pm 0,05 ^{i, B}	14,54 \pm 0,04 ^h
RAI	0,88 \pm 0,05 ^{a, A}	3,94 \pm 0,07 ^{e, B}	9,39 \pm 0,12 ^g
EA	7,10 \pm 0,10 ^{j, B}	4,36 \pm 0,02 ^{f, A}	6,85 \pm 0,09 ^e
EAC	6,97 \pm 0,01 ^{i, j, B}	5,09 \pm 0,09 ^{g, A}	7,19 \pm 0,06 ^f
RAc	4,43 \pm 0,16 ^{g, B}	2,84 \pm 0,09 ^{c, A}	5,31 \pm 0,09 ^c
PAc	6,71 \pm 0,08 ^{h, i, B}	2,47 \pm 0,08 ^{b, A}	4,85 \pm 0,06 ^b
H1	4,09 \pm 0,06 ^{f, B}	3,52 \pm 0,01 ^{d, A}	5,03 \pm 0,10 ^b
H2	6,71 \pm 0,14 ^{h, B}	5,15 \pm 0,02 ^{g, A}	7,07 \pm 0,10 ^{e, f}
Harina de soja	2,23 \pm 0,02 ^{c, A}	2,35 \pm 0,04 ^{b, B}	5,92 \pm 0,12 ^d

Letras minúsculas diferentes en la misma columna y letras mayúsculas diferentes en la misma línea indican diferencia estadística ($P < 0,05$), test LSD. Significados de las siglas se presentan en la lista de abreviaturas.

Asimismo, el contenido de fenólicos totales del CPA1 (2,51 mg de EAG/ mg de muestra) es mayor al del CPA2 (1,16 mg de EAG/ mg de muestra), lo que demostraría que la extracción ácida inicial implementada en el método alternativo logra separar y concentrar gran cantidad de compuestos fenólicos en la fracción soluble (EA).

Por otro lado, el extracto metanólico del RAI, obtenido por ultrafiltración, presentó menor contenido de compuestos fenólicos que los concentrados obtenidos por precipitación isoelectrica, y hasta menor que el contenido de la HDA, lo que indicaría que en este caso la mayoría de los compuestos fenólicos han permeado por la membrana de ultrafiltración.

Del mismo modo, en la ultrafiltración ácida el permeado (PAc) presenta mayor contenido de compuestos fenólicos que el retenido (RAc), siendo nuevamente evidente que gran cantidad de compuestos fenólicos atraviesan la membrana de ultrafiltración.

Los hidrolizados H1 y H2 obtenidos a partir del CPA1, con 8,08 y 16,80 % de grado de hidrólisis respectivamente, presentan concentraciones de fenoles entre 1,5 y 2,5 superiores a la del concentrado. Se observa que a mayor grado de hidrólisis aumenta el contenido de compuestos fenólicos medido. Estos valores indican que la hidrólisis enzimática, con Multifect P- 3000, ha liberado compuestos fenólicos que estarían ligados a diferentes compuestos de la matriz alimenticia. Según Michalska et al. (2007), los fenoles se encuentran generalmente ligados covalentemente a polímeros de la pared celular y pueden ser liberados por tratamientos con álcalis, ácidos o enzimas. Otros compuestos fenólicos presentes pueden estar glicosilados o complejados a otros componentes de la muestra como las proteínas, dificultando su detección. De acuerdo con Jeong et al. (2004), los compuestos fenólicos pueden ligarse de forma diferente a los compuestos presentes en los alimentos, por esta razón los procesos efectivos de liberación pueden ser distintos en diferentes matrices. Galher et al. (2003) observaron el aumento de fenoles totales de las semillas de tomate en aproximadamente 300 % como consecuencia de la hidrólisis alcalina.

Los extractos acuosos de HDA, CPA1, CPA2, RAI y de la harina desgrasada de soja presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos que los correspondientes extractos metanólicos. Esto podría deberse a una reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con otros

componentes del extracto, lo que sobreestima este contenido en extractos acuosos (Gahler et al, 2003). Este reactivo no es específico para los compuestos fenólicos y puede ser reducido por compuestos no fenólicos como aminas alifáticas terciarias, vitamina C, Cu (I), azúcares, aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina y tirosina), entre otros. En este caso, evaluando la posibilidad de que los aminoácidos libres y/o los que forman parte de proteínas y péptidos presentes en las muestras estén reaccionando con el reactivo de Folin-Ciocalteu, se analizó la relación entre el contenido de compuestos fenólicos determinado por este método y la concentración de proteínas en el extracto acuoso (Figura 26). Se obtuvo una correlación significativa entre estas determinaciones ($R^2 = 0,7718$), apoyando esta hipótesis.

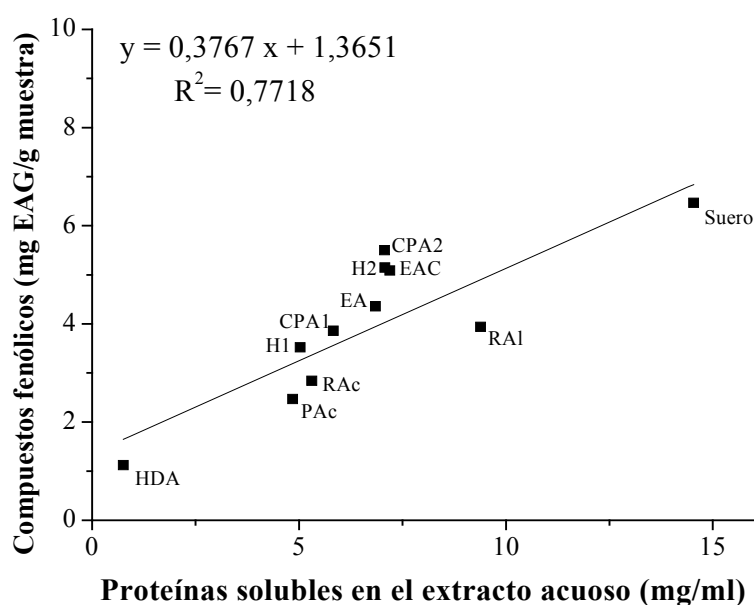


Figura 26. Correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos acuosos y la concentración de proteínas de los mismos.

Las mayores concentraciones de compuestos fenólicos entre los extractos acuosos se encuentran en el Suero y el CPA2 (6,47 y 5,50 mg de EAG/ g de muestra, respectivamente), siendo superior la concentración en el Suero como se observó para los extractos metanólicos de los mismos. Por otro lado, el extracto acuoso del Suero es el que presenta mayor concentración de proteínas. Esto concuerda con el hecho de que los péptidos y proteínas presentes en el Suero son los de mayor solubilidad a pH isoelectrico debido a su bajo peso molecular, y por tanto son fácilmente extraídos en la extracción acuosa.

El extracto acuoso del CPA2 presenta mayor contenido de fenólicos que el CPA1, contrario a lo obtenido para los extractos metanólicos. El RAl que presentó el menor contenido de fenoles en su extracto metanólico, presenta una concentración muy superior en su extracto acuoso, y a su vez, la concentración de proteínas es significativamente alta. Como se explicó anteriormente esto puede ser causado por la reacción del reactivo de Folin con las proteínas.

Los extractos acuosos del EA y EAC presentan concentraciones elevadas de compuestos fenólicos como en sus respectivos extractos metanólicos.

El contenido de fenólicos del extracto acuoso del RAc resultó similar al del PAc, y así también fueron sus concentraciones de proteínas.

En los extractos acuosos de los hidrolizados se mantiene la relación anterior, a mayor grado de hidrólisis mayor concentración de compuestos fenólicos detectada, siendo estos valores menores a los obtenidos para los extractos metanólicos. La concentración de proteínas solubles también es mayor en el extracto del hidrolizado con mayor grado de hidrólisis.

4.4.2. Actividad antioxidante *in vitro* en extractos metanólicos y acuosos

La actividad antioxidante de los extractos metanólicos y acuosos de las distintas muestras proteicas de *A. mantegazzianus* y de una harina desgrasada de soja se presentan en la Tabla 6. Todas las muestras analizadas fueron capaces de reaccionar con los radicales libres DPPH.

La harina desgrasada de *A. mantegazzianus* (HDA) presentó mayor capacidad antioxidante en su extracto metanólico (0,71 mg ET/g muestra) que en su extracto acuoso (0,16 mg ET/g muestra). Este resultado fue contrario a lo reportado por Pazinato (2008) para la harina desgrasada de *A. cruentus*. Este autor obtuvo mayor capacidad antioxidante en el extracto acuoso (0,49 mg ET/g muestra) que en el extracto metanólico (0,37 mg ET/g muestra). Paško et al. (2009) obtuvieron resultados semejantes a los de este trabajo con extractos metanólicos ácidos (metanol-HCL-agua) de harinas de *A. cruentus* variedad Astek y Rawa (1,1 mg ET/g muestra y 0,7 mg ET/g muestra, respectivamente). Carrasco y Encina-Zelada (2008) reportaron valores de actividad antioxidante en el rango de 0,56 a 0,66 mg ET/g de muestra en extractos hidrofílicos (acetona: agua: ácido acético) de harinas de seis variedades de *A. caudatus*, los que resultan ser mayores a los obtenidos en este estudio para los extractos acuosos de la HDA.

La harina desgrasada de soja analizada en este trabajo presentó en el extracto metanólico actividad antioxidante semejante al de la HDA, en cambio, en el extracto acuoso el valor fue superior. Por otro lado, la capacidad antioxidante de la HDA fue superior a los valores informados para extractos metanólicos de harina de soja y aislado proteico de soja (0,17 y 0,14 mg ET/g muestra) (Barbosa et al., 2006).

Tabla 6. Actividad antioxidante *in vitro* de los extractos metanólicos y acuosos de las distintas muestras. Los datos se expresan como la media de tres mediciones \pm D.S.

Muestras	Actividad Antioxidante (mg ET/g de muestra)	
	Extractos metanólicos	Extractos acuosos
HDA	0,71 \pm 0,01 ^{b, B}	0,16 \pm 0,06 ^{a, A}
CPA1	1,56 \pm 0,05 ^{c, B}	1,44 \pm 0,01 ^{c, A}
CPA2	0,08 \pm 0,02 ^{a, A}	0,89 \pm 0,01 ^{b, B}
Suero	3,32 \pm 0,04 ^{f, A}	3,47 \pm 0,05 ^{g, B}
RAI	0,83 \pm 0,03 ^{b, A}	1,82 \pm 0,02 ^{d, B}
EA	2,72 \pm 0,05 ^{e, B}	1,90 \pm 0,02 ^{d, A}
EAC	2,14 \pm 0,04 ^{d, A}	2,77 \pm 0,04 ^{f, B}
RAc	1,61 \pm 0,03 ^{c, B}	1,35 \pm 0,01 ^{c, A}
PAc	2,79 \pm 0,23 ^{e, B}	0,84 \pm 0,06 ^{b, A}
H1	2,28 \pm 0,08 ^{d, B}	1,44 \pm 0,04 ^{c, A}
H2	3,12 \pm 0,05 ^{f, B}	2,10 \pm 0,09 ^{e, A}
Harina de soja	0,90 \pm 0,04 ^{b, B}	0,83 \pm 0,04 ^{b, B}

Letras minúsculas diferentes en la misma columna y letras mayúsculas diferentes en la misma línea indican diferencia estadística ($P < 0,05$), test LSD. Significados de las siglas se presentan en la lista de abreviaturas.

Entre las muestras analizadas la mayor actividad antioxidante se observó en los extractos acuosos y metanólicos del Suero de la precipitación isoelectrica (3,32 y 3,47 mg ET/ g de muestra, respectivamente). Esta muestra presenta las concentraciones más altas de compuestos fenólicos y proteínas en sus extractos (Tabla 5). Además las proteínas de esta muestra se destacan por su alto porcentaje de cisteína y metionina, conocidas por su poder antioxidante. Por su lado, el CPA2 resultante de esa precipitación isoelectrica presenta en su extracto metanólico la menor actividad antioxidante (0,08 mg ET/ g de muestra), aún

menor a la de la HDA, indicando que la mayoría de los compuestos antioxidantes se separan en la fracción soluble a pH isoelectrico.

La actividad antioxidante del extracto metanólico del RA1 supera diez veces a la del CPA2, por lo que se podría decir que en este caso los compuestos antioxidantes se reparten entre el retenido y permeado de la ultrafiltración en forma diferente a lo que ocurre en la precipitación isoelectrica.

El CPA1, obtenido por el método tradicional sin extracción ácida, presentó mayor capacidad antioxidante en su extracto metanólico que los respectivos extractos del CPA2 y del RA1. En relación al contenido de compuestos fenólicos totales, el CPA1 presenta mayor concentración de fenoles que el CPA2 y el RA1, lo que muestra una posible relación entre el contenido de fenólicos y la actividad antioxidante.

Los extractos ácidos, EA y EAC, presentan altas actividades antioxidantes y concentraciones de fenólicos. Podría decirse entonces que la extracción ácida inicial separa compuestos con actividad antioxidante, en su mayoría fenoles, que son solubles a pH ácido, y por tanto en el CPA2 y RA1 estos se ven disminuidos a diferencia del CPA1.

Luego, en la ultrafiltración ácida, el permeado (PAc) que contendría mayor proporción de péptidos y proteínas de bajo peso molecular, y que presentó mayor contenido de compuestos fenólicos que el retenido (RAc) (Tabla 5), muestra una actividad antioxidante mayor a este último, evaluando sus extractos metanólicos. Algo equivalente fue observado por Wang et al. (2006) al separar un hidrolizado de proteínas de gluten por ultrafiltración; el permeado con fracciones menores a 5 kDa presentó mayor capacidad secuestrante del radical DPPH que el retenido. En otro trabajo, el hidrolizado de proteínas de quinoa no presentó actividad secuestrante del DPPH, pero las fracciones de bajo peso molecular separadas a partir de éste por ultrafiltración si mostraron alta capacidad

secuestrante, y la mayor actividad se obtuvo en el permeado de menor peso molecular (< 5 kDa) (Aluko y Monu, 2003). La ultrafiltración también fue usada para fraccionar un hidrolizado proteico de pescado y el permeado obtenido con la membrana de poder de corte menor (1 kDa) fue el que presentó mayor actividad antioxidante (Je et al., 2005).

Para la mayoría de las muestras, los extractos metanólicos y acuosos presentaron valores diferentes de la capacidad secuestrante del DPPH.

El CPA2, el Suero, el RAI y el EAC muestran mayor actividad antioxidante en sus extractos acuosos que en los metanólicos, y el resto de las muestras lo contrario. En cambio la harina desgrasada de soja analizada no presentó diferencias significativas en la actividad de sus extractos. Estas diferencias pueden ser explicadas por las diferentes interacciones entre los compuestos antioxidantes y el solvente de extracción, que determinan la solubilidad y grado de extracción de los mismos en el solvente. Es de esperar que los extractos acuosos contengan proteínas, péptidos y aminoácidos, que presentan alta solubilidad en agua (Mahmoud, 1994; Yim y Lee, 2000). Anteriormente se vio que las proteínas presentes en el Suero, RAI y EAC, son ricas en aminoácidos conocidos como antioxidantes primarios y sinergistas: el Suero es rico en cisteína y metionina, el RAI se destaca por su contenido en lisina y el EAC tiene alta concentración de cisteína, metionina y lisina. La presencia de estos aminoácidos en el extracto acuoso podría ser la causa de la mayor actividad antioxidante. Por otro lado, se espera que los extractos metanólicos sean ricos en compuestos de carácter hidrofóbico tales como los compuestos fenólicos y eventualmente aminoácidos o péptidos hidrofóbicos.

También hay que tener en cuenta las posibles interferencias del solvente en la medida de actividad antioxidante. Algunos estudios dan idea que los ensayos de actividad antioxidante basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno dependen del

solvente de extracción (Prior et al., 2005). En solventes polares, el enlace de hidrógeno produciría cambios en la capacidad de donar átomos de hidrógeno de los antioxidantes fenólicos, reduciendo la actividad antioxidante de los mismos. Según Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2006), entre los métodos más usados, el método de secuestro del radical DPPH es el menos afectado por la influencia del solvente, y aún así encontraron que el valor de actividad medido con este método para una solución metanólica de compuestos fenólicos es 20 % mayor a la de una solución acuosa.

Por otro lado, se ha demostrado que ciertos compuestos no antioxidantes presentes en el material de análisis interfieren en el ensayo de la capacidad antioxidante (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006). Al medir la capacidad antioxidante con el método del DPPH se observó una clara interacción entre los polifenoles y componentes comunes en los alimentos, siendo que estos componentes no producen efecto por sí mismos pero alteran la capacidad original de los polifenoles. Compuestos glucosídicos, como glucosa, ácido galacturónico y pectina, se ha visto que incrementan el valor de actividad antioxidante, mientras que otros compuestos lo disminuyen.

Los extractos metanólicos y acuosos de los hidrolizados obtenidos a partir del CPA1 presentaron valores superiores a los de este concentrado. El H1 con 8,08 % de GH presentó un valor 34 % mayor y el H2 con 16 % de GH superó la actividad antioxidante del concentrado en un 85 %. Se puede decir entonces que la hidrólisis enzimática aumenta significativamente la capacidad antioxidante y a mayor porcentaje de GH mayor es la actividad antioxidante. Similarmente, se observó que la hidrólisis a 12 % de GH con Alcalasa aumentó 2 veces la actividad antioxidante (DPPH) de harinas de *A. cruentus* y de 3 a 5 veces la de los concentrados (Pazzinato, 2008). La hidrólisis de proteína de papa con Alcalasa a distintos porcentajes de GH (0,7; 1,9 y 2,3 %) aumentó drásticamente la

capacidad secuestrante del radical ABTS y la mayor capacidad se observó para el hidrolizado de 1,9 % de GH (Wang y Xiong, 2005). Yoshie-Stark et al. (2004) también observaron aumento de la capacidad secuestrante de DPPH de la proteína de *Lupinus albus* después de la hidrólisis con pepsina, y un aumento aún mayor si la hidrólisis se realizaba con pepsina y pancreatina. Chen et al. (1998) observaron que fragmentos peptídicos de proteínas de soja presentaron mayor actividad antioxidante que la proteína nativa y relacionaron este hecho con la hidrofobicidad de los mismos. Es importante destacar que en este trabajo la hidrólisis con la enzima fúngica Multifect P-3000 tuvo efecto en la liberación de compuestos fenólicos (Tabla de fenólicos). Los principales compuestos estudiados por su actividad antioxidante son los fenólicos y péptidos de bajo peso molecular (Madhujith y Shahidi, 2005; Peña-Ramos et al., 2004), lo que explicaría la mayor capacidad de los hidrolizados.

Siendo los compuestos fenólicos los principales compuestos antioxidantes en los alimentos, se analiza la correlación entre el contenido de fenólicos de las muestras y la capacidad antioxidante evaluada con el método del DPPH (Figura 27). La correlación obtenida para extractos metanólicos fue de $R^2 = 0,9104$ y para los extractos acuosos, $R^2 = 0,947$. Estas correlaciones sugieren una fuerte influencia de los compuestos fenólicos en la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos y acuosos. Gorinstein et al. (2007) calcularon esta correlación para extractos acuosos y acetónicos de harinas de cereales y pseudocereales (*A. cruentus*, *A. hybridum* y *A. hypochondriacus*), y obtuvieron menor relación para los extractos acuosos ($R^2 = 0,7433$) que para los acetónicos ($R^2 = 0,9957$). Carrasco y Encina-Zelada (2008) relacionaron el contenido de compuestos fenólicos de extractos metanólicos de harinas de *A. caudatus*, *Chenopodium quinoa* y *Chenopodium pallidicaule* y la actividad antioxidante de los mismas, y obtuvieron una correlación de

0,99. Paško et al. (2009) informaron una correlación fenoles-actividad antioxidante de $R^2 = 0,98$ evaluando los extractos (metanol-ácido) de harinas de *A. cruentus* variedad Astek y Rawa. En concordancia con estos autores, se puede decir que la contribución de los compuestos fenólicos en la capacidad antioxidante es directamente proporcional.

Las proteínas también ejercen un importante papel en la actividad antioxidante, con efecto en la inhibición de la peroxidación lipídica y actuando contra los radicales libres. Debido a la baja solubilidad de las mismas en metanol, su presencia es más importante en los extractos acuosos. Por tanto, también se estudió la correlación entre el contenido de proteínas de los extractos acuosos y la capacidad antioxidante de los mismos (Figura 28). Se obtuvo una correlación de $R^2 = 0,9141$, indicando que las proteínas presentes en los extractos acuosos también producen un efecto importante sobre la actividad secuestrante del DPPH.

Finalmente, los resultados sugieren que tanto los compuestos fenólicos, como las proteínas y péptidos, especialmente de bajo peso molecular derivados del procesamiento separativo o de la hidrólisis enzimática, son importantes antioxidantes conforme a lo evaluado por el método del radical libre DPPH. La contribución relativa de la capacidad antioxidante de los polifenoles y las proteínas estaría dada por la mayor pendiente de la correlación de los polifenoles (0,595) frente a la correspondiente a las proteínas (0,2319). Según Gorinstein et al. (2007), la mayoría de los antioxidantes en pseudocereales son polifenoles, en tanto que las proteínas también ejercen un importante papel en la actividad antioxidante, con efectivo efecto en la inhibición de la peroxidación lipídica y actuando contra los radicales libres.

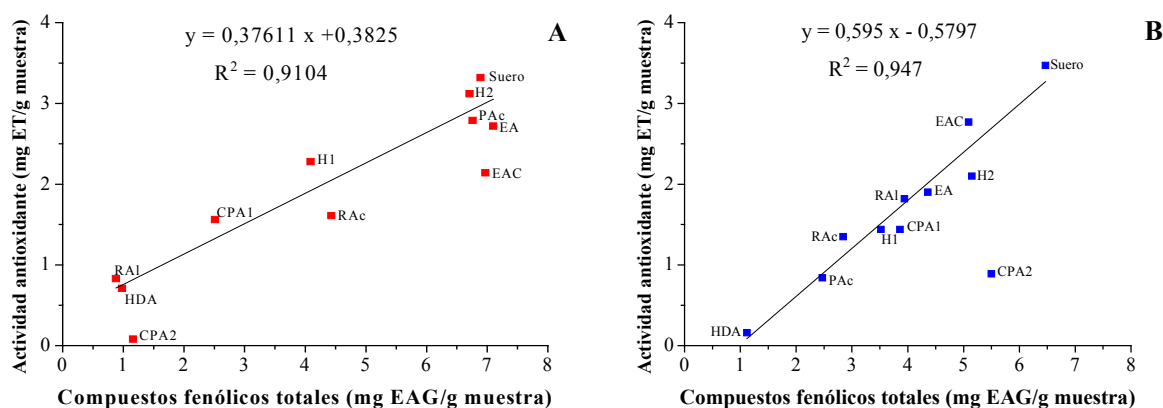


Figura 27. Correlación entre el contenido de compuestos fenólicos de las muestras y sus respectivas actividades antioxidantes. A: evaluación en extractos metanólicos; B: evaluación en extractos acuosos.

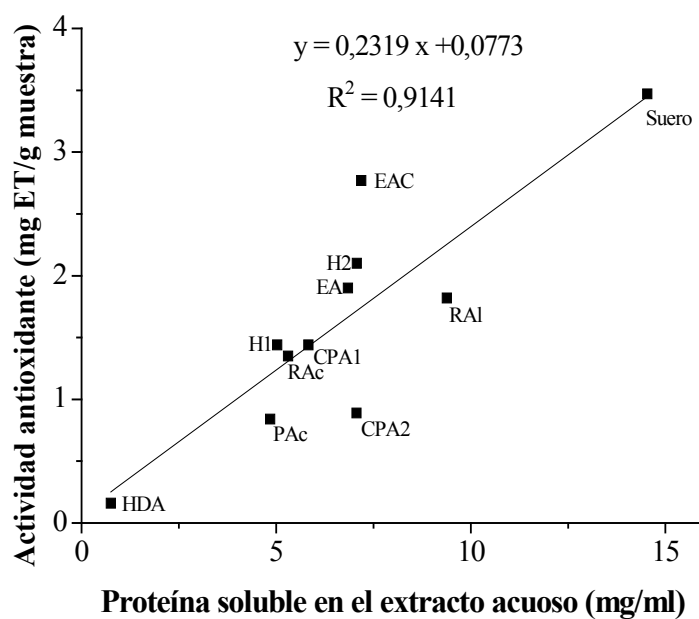


Figura 28. Correlación entre el porcentaje de proteínas en el extracto acuoso de las muestras y sus respectivas actividades antioxidantes.

Conclusiones parciales de la sección 4.4.

La HDA de *A. mantegazzianus* presentó mayor contenido de compuestos fenólicos que los encontrados en bibliografía para otras variedades.

Las muestras que presentaron mayor contenido de compuestos fenólicos, Suero y EA, son las que presentan a su vez mayor actividad antioxidante. Se puede decir entonces que los compuestos fenólicos se lograron extraer mayoritariamente en el EA y también han quedado concentrados en el Suero de la precipitación isoeléctrica. Además se puede ver que el CPA2 tiene menor contenido de fenólicos que el CPA1, y a su vez menor actividad antioxidante. En cuanto al proceso de ultrafiltración se ve que los compuestos fenólicos atraviesan la membrana, por lo que el RA1 presenta bajo contenido de fenólicos y el RAc presenta menor contenido que el PAc, así también estos presentaron menor actividad antioxidante.

La correlación entre contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante resultó alta para ambos extractos (metanólico y acuoso), y así también fue la relación entre el contenido proteico y dicha actividad.

Se observó también que la hidrólisis enzimática liberó compuestos fenólicos y aumentó la actividad antioxidante del concentrado.

En cuanto al análisis en los extractos acuosos, se vió que las interferencias de diferentes compuestos así como del solvente mismo en las pruebas de determinación de fenólicos y actividad antioxidante dificultan el análisis de los resultados.

El reactivo de Folin- Ciocalteau al no ser específico para compuestos fenólicos reacciona con otros componentes de los extractos acuosos, esto influiría en la cuantificación de fenólicos en dichos extractos. En este estudio se obtuvo una alta

correlación entre el contenido de compuestos fenólicos en el extracto acuoso y el contenido de proteínas de los mismos, lo que podría explicar el mayor contenido de compuestos fenólicos encontrado en los extractos acuosos.

4.5. Propiedades de espumado

4.5.1. Capacidad de espumado

La capacidad de espumado de las distintas muestras se analizó preparando espumas con soluciones de 1,0 % (p/v) de proteína según Fidantsi y Doxastakis (2001) con algunas modificaciones determinando el porcentaje overrun de las mismas; los valores obtenidos se presentan en la Tabla 7.

Los mayores overruns son presentados por las espumas del RAl y RAc. Este comportamiento sería debido al tamaño molecular de estas fracciones proteicas (bajos e intermedios, sin presencia de agregados), así como a una buena solubilidad como se observó anteriormente (Tabla 2). El WPI produjo prácticamente el mismo overrun que estas muestras.

Las espumas producidas con el CPA1 y CPA2 no presentan diferencias significativas de overrun; siendo estos valores menores a los de RAl y RAc. Como se vió en el perfil de electroforético del CPA1 y CPA2 (sección 4.2.1), la precipitación isoeléctrica produciría formación de agregados de elevado peso molecular (> 100 kDa) y consecuentemente la menor solubilidad de estas muestras (Tabla 2). La naturaleza globular de las proteínas y/o el alto peso molecular de las mismas o sus agregados disminuye su flexibilidad y capacidad

de formar un film interfacial alrededor de las burbujas de aire lo que podría explicar el bajo overrun de estas muestras (Aluko y Monu, 2003).

Tabla 7. Valores de Overrun de las espumas preparadas con las distintas muestras proteicas. Los datos se expresan como la media de tres determinaciones \pm D.S.

Muestras	Overrun (%)
CPA1	159 \pm 9 ^{a, b}
CPA2	161 \pm 8 ^{a, b}
RAI	192 \pm 19 ^b
RAc	185 \pm 9 ^b
H1	130 \pm 8 ^a
H2	143 \pm 8 ^{a, b}
WPI	179 \pm 0 ^b

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ($P < 0,05$), test LSD. Significados de las siglas se presentan en la lista de abreviaturas.

Los hidrolizados obtenidos a partir del CPA1, producen menor overrun que éste, indicando que las hidrólisis de 8,08 y 16,8 % de GH fueron demasiadas elevadas para mejorar la capacidad de espumado. Esto resulta consistente con los resultados encontrados por otros autores (Bernardi Don et al., 1991; Martínez et al., 2005 y 2006). La hidrólisis enzimática limitada de proteínas puede substancialmente mejorar la espumabilidad, debido a la mayor exposición de áreas hidrofóbicas y flexibilidad molecular de los polipéptidos, lo que mejora su afinidad por la interfase y aumenta la velocidad de adsorción (Martínez et al., 2006). Esto se ha visto en hidrolizados de soja con GH de 2 a 5,4 % (Bernardi Don et al., 1991; Molina-Ortiz y Wagner, 2002) o girasol con porcentaje de GH de 1,5 a 9,8 % (Martínez et al. 2005), entre otras proteínas. La hidrólisis de un concentrado proteico de

quinoa aumentó su espumabilidad, mientras los permeados de ultrafiltración obtenidos a partir de estos hidrolizados presentaron menor espumabilidad (Aluko y Monu, 2003). Según los autores, los péptidos de peso molecular mayor a 10 kDa son capaces de formar films interfaciales más fuertes que los péptidos de menor peso molecular. Similarmente, otro estudio mostró que la capacidad de formación de espumas de hidrolizados de proteínas de suero fue mejor con péptidos de altos pesos molecular ($> 3,0$ kDa) que con péptidos de bajos pesos moleculares (van der Ven et al., 2002). Sin embargo, es difícil comparar estos resultados debido al hecho que los parámetros de la hidrólisis varían mucho entre los diferentes estudios (ej. pre-tratamiento del sustrato, enzima usada, método de determinación de GH, fuerza iónica y temperatura).

4.5.2. Análisis de estabilidad de espumas con Turbiscan Classic (TSC). Cinéticas de drenaje y desproporción.

Los datos que genera el equipo Turbiscan son gráficas de retrodispersión BS (%) o transmitancia T (%) en función de la altura del tubo (Figura 29). Un primer paso para el análisis de los datos consistió en separar el gráfico en zonas para poder analizar los distintos fenómenos que ocurren simultáneamente en la desestabilización de una espuma.

La evolución del pico de drenaje se analizó a partir de los perfiles de Delta BS en el rango de 0 hasta donde llega el último pico (30 mm aproximadamente), midiendo el BS medio de este último pico (Figura 29). En este caso, la solución proteica es opaca y produce una retrodispersión de la luz que puede ser observada como un pico de BS que va corriéndose a medida que aumenta la altura del líquido drenado. En casos donde el líquido

drenado es una solución transparente este fenómeno puede ser medido por transmitancia (Sceni y Wagner, 2007).

La desproporción de las burbujas se determinó por seguimiento de la disminución del perfil de BS de las espumas, en un rango comprendido aproximadamente entre 30-60 mm de la altura del tubo, según Figura 29. El límite inferior corresponde a la altura del tubo donde llega el último pico de drenaje (aproximadamente 30 mm), y como la mayoría de las muestras presentaron colapso por encima de los 60 mm, se estableció esta altura como el límite superior para medir el fenómeno de desproporción. Durante el almacenamiento de la espuma, las películas inter-burbujas se debilitan debido al drenaje del líquido, incrementando su tamaño medio, esto se visualiza como una disminución de los perfiles de BS en función del tiempo. La cinética de desproporción se correlacionó al modelo usado por Sceni y Wagner (2007), según la Ec. 9.

Al mismo tiempo que se produce la desproporción se produce una pérdida de auto-soporte conocida como colapso. Como resultado de este proceso, aparecen burbujas grandes y disminuye el volumen de la espuma, esto se evidencia por picos de BS que aparecen al final del perfil (por arriba de los 60 mm). En este caso, el colapso no pudo ser analizado utilizando los datos del Turbiscan, ya que los picos de BS obtenidos por arriba de los 60 mm son muy irregulares (Figura 29). Por tanto el fenómeno de colapso se analizó en forma volumétrica, teniendo en cuenta el volumen inicial y final de la espuma.

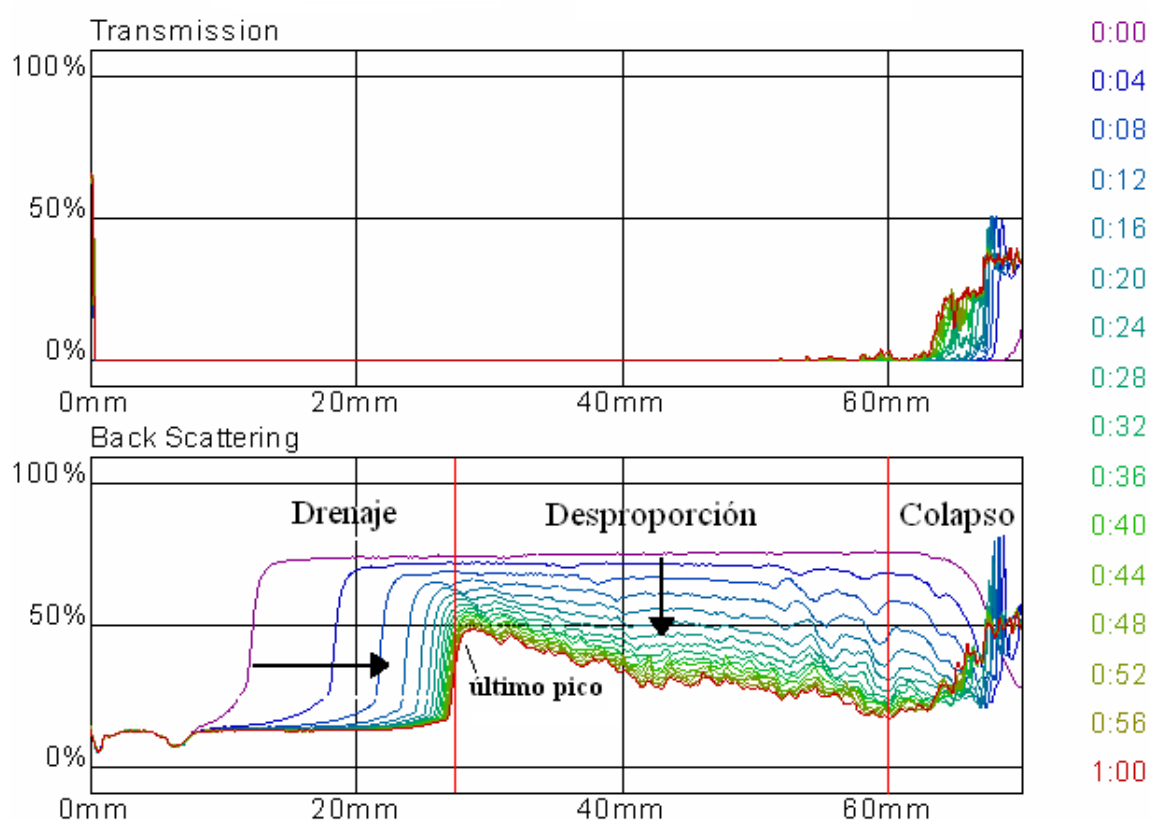


Figura 29. Perfiles de BackScattering y Transmitancia de una espuma típica de proteínas de amaranto.

Cinética de drenaje

La Figura 30 muestra las cinéticas de drenaje de las espumas del CPA1, CPA2 y WPI, y en la Figura 31 se observan las cinéticas de drenaje de las espumas de CPA2, RA1 y RAc, todas éstas producidas con una solución de 1 % (p/v) de proteína.

En la Tabla 8 se muestran los parámetros de ajuste a la Ecuación 8. En general los valores de los coeficientes de regresión, R^2 , obtenidos en el ajuste fueron buenos a excepción de las muestras en las que la dispersión de datos fue mayor (H2). El ajuste al modelo propuesto (Ec. 8) se realizó a partir de los datos de las tres determinaciones

realizadas y no del valor promedio, esto podría causar una baja correlación al modelo en las muestras con menor reproducibilidad entre repeticiones. El CPA1 y el RAI presentan el mismo valor de h_{max} , aunque el $t_{1/2}$ es mayor para el RAI, indicando una mayor estabilidad al drenado. El CPA2 presenta un $t_{1/2}$ menor y un h_{max} mayor a los del CPA1 y RAI, lo que indica que las espumas de CPA2 serían más inestables al drenado. El $t_{1/2}$ del WPI es menor al de los concentrados de amaranto y el h_{max} es mucho menor, lo que indicaría que las espumas de WPI se desestabilizan más rápido con respecto al drenado que las espumas de concentrados de amaranto.

La espuma del RAc presenta el mayor $t_{1/2}$ observado entre las muestras drenado indicando que la cinética de drenado de esta espuma es la más lenta, aunque también presentó el mayor volumen de líquido.

Tabla 8. Parámetros correspondientes a la cinética de drenaje determinados por el método óptico (Turbiscan Classic).

Muestras	h_{max} (%)	n	$t_{1/2}$ (min)	R^2
CPA1	26,71	1,21	6,56	0,90
CPA2	28,10	1,23	5,81	0,94
RAI	26,72	1,01	7,96	0,86
RAc	34,00	1,48	11,54	0,93
H1	26,48	1,58	3,18	0,94
H2	24,83	1,51	3,85	0,78
WPI	31,13	1,11	4,41	0,82

La Figura 32 muestra las cinéticas de drenado de los hidrolizados (H1 y H2) en comparación con la del CPA1. Se observa que H1 y H2 presentan una mayor velocidad de drenado inicial pero luego tienden a un volumen final de líquido drenado similar al CPA1. Estas observaciones se verifican a través de bajos $t_{1/2}$ y valores semejantes de h_{max} , indicando que estas espumas tienen las mayores velocidades de desestabilización.

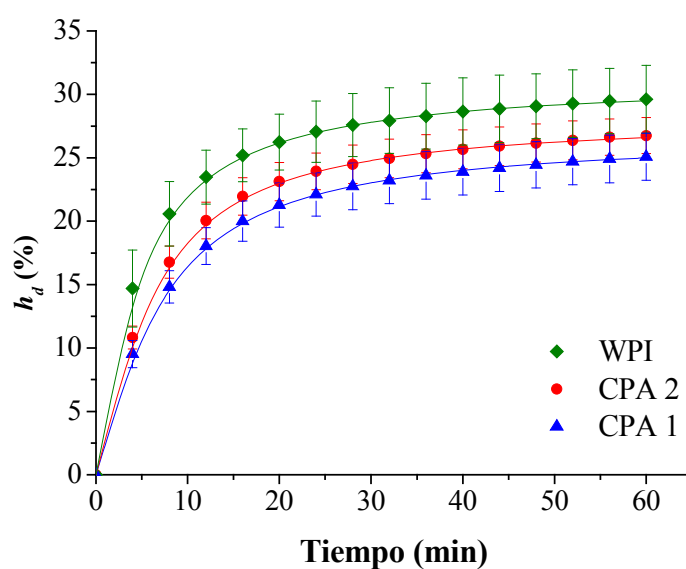


Figura 30. Cinética de drenaje de líquido de las espumas: altura relativa de líquido drenado en función del tiempo. Espumas de CPA1 (\blacktriangle), CPA2 (\bullet) y WPI (\blacklozenge), promedio de tres determinaciones de $h_d \pm D.S.$ Líneas continuas: ajuste al modelo propuesto (Ec. 8).

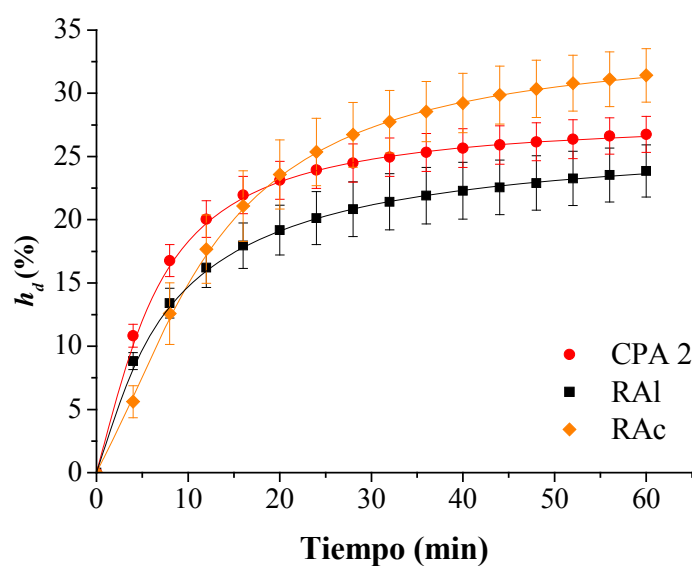


Figura 31. Cinética de drenaje de líquido de las espumas: altura relativa de líquido drenado en función del tiempo. Espumas de CPA2 (●), RAl (■) y RAc (▼), promedio de tres determinaciones de $h_d \pm D.S.$ Líneas continuas: ajuste al modelo propuesto (Ec. 8).

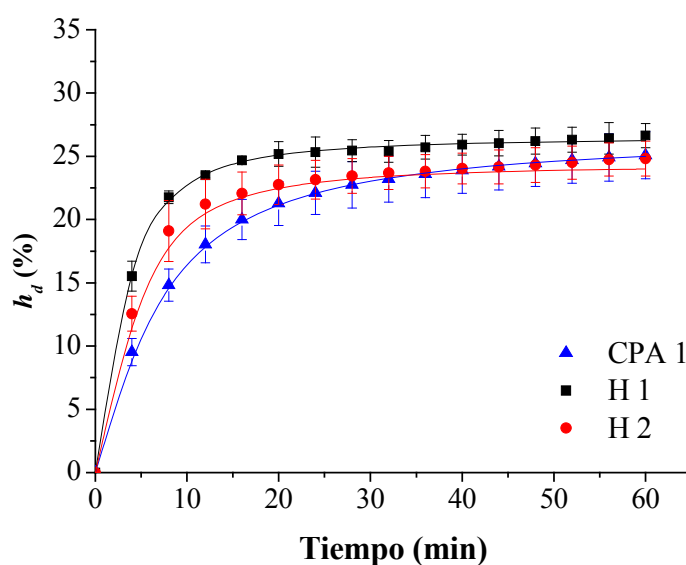


Figura 32. Cinéticas de drenaje de líquido de las espumas: altura relativa de líquido drenado en función del tiempo. Espumas de CPA1 (▲), H1 (■) y H2 (●), promedio de tres determinaciones de $h_d \pm D.S.$ Líneas continuas: ajuste al modelo propuesto (Ec. 8).

Cinética de desproporción

En la Tabla 9 se muestran los parámetros obtenidos por regresión no lineal para la cinética de desproporción de burbujas para las distintas muestras de espumas, según la Ec. 9. De acuerdo a la misma el parámetro $\mathbf{a+b}$ es el valor del BS a tiempo cero, por lo que representa el tamaño de burbuja inicial o BS_{0max} . La diferencia de BS entre tiempo igual a cero y el final de la experiencia es el parámetro \mathbf{b} que indica la variación de tamaño de burbuja. El parámetro \mathbf{k} es inversamente proporcional a la tasa de decaimiento del BS, por lo que un mayor valor de \mathbf{k} corresponde a una mayor estabilidad de la espuma.

Las espumas del retenido ácido (RAc) presentaron los mayores valores de \mathbf{k} indicando una menor tasa de desproporción y el menor tamaño de burbuja inicial ($\mathbf{a+b}$) comparada con las de las otras muestras. Este resultado sería consecuencia de una alta solubilidad de las proteínas, ausencia de agregados de alto peso molecular que causaría mayor actividad interfacial de las proteínas y la formación de un film más resistente. Por otro lado, esta muestra presentó un alto contenido de compuestos fenólicos que podrían tener un efecto estabilizante de espumas. Según Damodaran y Paraf (1997), la adición de polifenoles, como la catequina, a una solución espumante mejora la capacidad de formación y estabilización de espumas. Esto es atribuido a la propiedad de los polifenoles de inducir uniones cruzadas entre las proteínas adsorbidas en la interfase, lo que mejora las propiedades viscoelásticas del film.

Tabla 9. Parámetros correspondientes a la cinética de desproporción determinados por el método óptico (Turbiscan Classic).

Muestras	k (min⁻¹)	a+b (%)	b (%)	R²
CPA1	30,12	77,39	45,00	0,96
CPA2	31,46	75,53	47,51	0,99
RAI	23,48	74,03	44,17	0,98
RAc	46,36	70,98	46,78	0,99
H 1	2,21	77,08	33,24	0,67
H 2	7,14	73,08	32,06	0,91
WPI	11,18	79,51	39,60	0,94

El CPA1 y CPA2 a 1,0 % produjeron espumas de parámetros muy similares. En la Figura 33 se observa que las cinéticas de desproporción se aproximan considerablemente, siendo algunos valores puntuales de ambas muy similares. En consecuencia, se puede decir que las espumas de éstos no mostraron diferencias.

Por otro lado, el RAI presenta un perfil de desproporción que se encuentra un poco por debajo al de los otros dos concentrados (Figura 34) y los parámetros determinados resultaron menores. Las burbujas presentaron menor tamaño inicial que las del CPA1 y CPA2 y la velocidad de desproporción resultó mucho mayor para el RAI (23,48 min⁻¹).

Las espumas de los hidrolizados obtenidos a partir del CPA1, muestran perfiles diferentes al de este concentrado (Figura 35), ambos hidrolizados presentan alta velocidad de desproporción (**k** menores) a pesar de que los tamaños iniciales de burbujas de estas espumas (**a+b**) son similares. Estos resultados indicarían que el film interfacial sería menos resistente, lo que sería debido a la disminución del peso molecular de las proteínas por la hidrólisis.

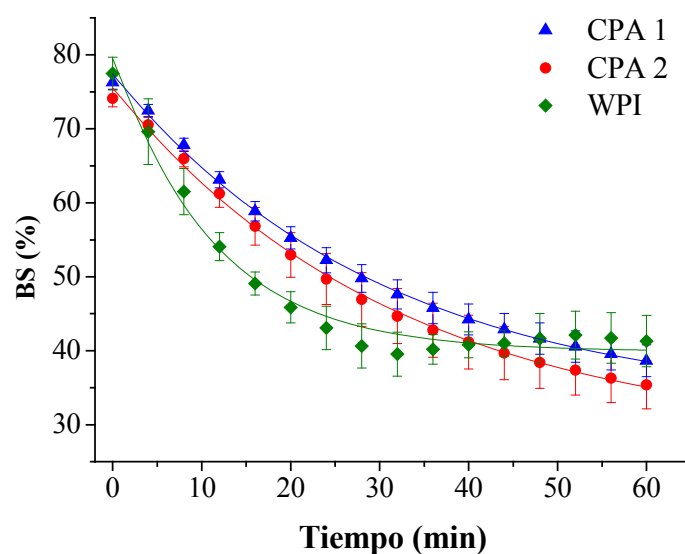


Figura 33. Cinética de desproporción de burbujas de CPA1 (▲), CPA2 (●) y WPI (◆). Valores promedios de tres determinaciones de BS (%) ± D.S. tomados por el Turbiscan Classic en función del tiempo. Líneas continuas: ajuste al modelo propuesto (Ec. 9).

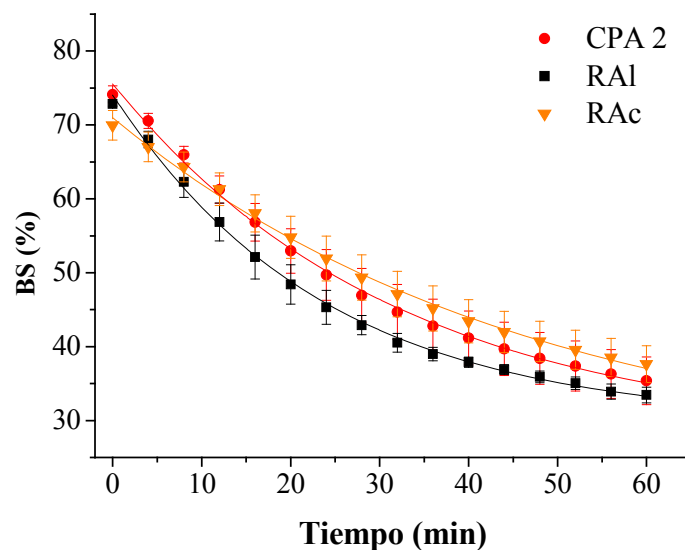


Figura 34. Cinética de desproporción de burbujas de CPA2 (●), RAI (■) y RAc (▼). Valores promedios de tres determinaciones de BS (%) ± D.S. tomados por el Turbiscan Classic en función del tiempo. Líneas continuas: ajuste al modelo propuesto (Ec. 9).

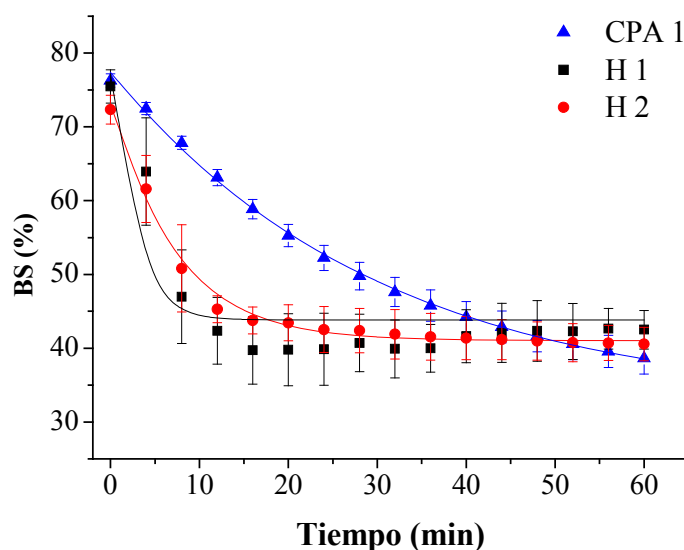


Figura 35. Cinética de desproporción de burbujas de CPA1 (▲) y los hidrolizados H1 (■) y H2 (●). Valores promedio de tres determinaciones de $BS \pm D.S.$ tomados por el Turbiscan Classic en función del tiempo. Líneas continuas: ajuste al modelo propuesto (Ec. 9).

4.5.3. Análisis de estabilidad de espumas con el método volumétrico. Fenómeno de colapso.

Los resultados obtenidos por el método volumétrico se muestran en la Tabla 10, donde el % V_E es el porcentaje de volumen de espuma que se mantiene luego de una hora con respecto al volumen de espuma inicialmente formado.

El colapso ocurre mayoritariamente en la parte superior de la espuma, y en menor medida en la espuma media. En este caso se estudia este fenómeno analizando la disminución del volumen de espuma o el porcentaje de espuma al final de la experiencia, % V_E .

El CPA1, CPA2 y RAc no presentan diferencias significativas en el % V_E , siendo estas espumas de alta estabilidad al colapso (mayores % V_E).

Las espumas del RAI y WPI presentan una estabilidad intermedia al compararlas con las demás muestras

Tabla 10. Porcentaje de volumen de espuma que se mantiene luego de una hora (% V_E).

Muestras	% V_E
CPA1	64,6 ± 3,8 ^c
CPA2	65,0 ± 3,1 ^c
RAI	38,9 ± 2,1 ^b
RAc	63,1 ± 2,3 ^c
H1	10,9 ± 2,0 ^a
H2	13,5 ± 4,3 ^a
WPI	33,8 ± 0,9 ^b

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia estadística ($p < 0,05$), test LSD.

Las espumas del H1 y H2 presentan muy baja estabilidad, logrando mantener sólo alrededor del 10 % del volumen inicial por lo que se puede decir que en este caso la hidrólisis enzimática no favoreció la estabilidad de espumado. El grado de hidrólisis alcanzado puede haber sido excesivo en lo que respecta a esta propiedad y los péptidos obtenidos resultaron muy pequeños. Similarmente, en otro estudio, los hidrolizados de proteínas de quinoa aunque presentaron mayor espumabilidad que el concentrado proteico, la estabilidad de sus espumas fue baja, y las fracciones separadas por ultrafiltración con pesos moleculares menores a 10 y 5 kDa fueron totalmente inestables (Aluko y Monu, 2003). Las moléculas de menor tamaño se adsorben mas fácilmente en la interfase, sin embargo en muchos casos no pueden sostener la estructura de la espuma produciéndose una rápida desestabilización (Aluko y Monu, 2003; Martínez et al., 2005, 2006 y 2009). A altos

GH, puede esperarse que la disminución del tamaño molecular reduzca la habilidad de los polipéptidos de interaccionar en la interfase causando menor viscoelasticidad del film y una menor estabilidad de la espuma (Martínez et al., 2005, 2006 y 2009). Varios autores sugieren el uso de polisacáridos como estabilizantes para aumentar la estabilidad en las espumas de los hidrolizados de proteínas.

Conclusiones parciales de la sección 4.5.

El RAc a 1 % p/v de proteína fue la muestra que produjo las espumas con las mejores características con respecto al WPI como a los otros concentrados de amaranto: alto overrun y la mayor estabilidad al drenado y desproporción, o sea, una menor velocidad de desestabilización, manteniendo el 63 % de volumen de espuma luego de 60 minutos. Estas espumas además presentaron el menor tamaño de burbuja inicial (**a+b**) lo que sería producto de proteínas solubles a pH 4,5 de peso molecular intermedio (sin formación de agregados de elevados peso molecular), y buena solubilidad. Las mismas serían capaces de acomodarse convenientemente en la interfase formando un film interfacial resistente. Además, el alto contenido de compuestos fenólicos en esta muestra podría tener un efecto estabilizante de espumas.

Los hidrolizados han presentado baja capacidad de espumado y baja estabilidad en relación al CPA1 a partir del cual fueron obtenidos. Esto se puede atribuir a un grado de hidrólisis excesivo.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Se estudió la separación de proteínas de amaranto variedad *Amaranthus mantegazzianus* a través de distintos procesos de separación analizando posteriormente las propiedades de las muestras obtenidas.

Esta variedad presentó un contenido proteico similar a lo reportado para otras variedades. El análisis de aminoácidos mostró que es deficiente en leucina y lisina de acuerdo a lo requerido por la FAO/WHO (1991), y presentó un mayor contenido de metionina, histidina y tirosina respecto a datos bibliográficos de otras variedades con los que se comparó. Se destaca en esta variedad un alto contenido de compuestos fenólicos, con buena capacidad antioxidante.

El método de extracción alcalina y precipitación isoelectrica tradicional aplicado en planta piloto resultó en un concentrado (CPA1) de bajo contenido proteico (50,9 %) y de bajo rendimiento (19,1 %) de extracción. La baja concentración de proteína se debería fundamentalmente a una separación deficiente proteína isoelectrica-almidón por el pequeño tamaño de gránulo de este último. El bajo rendimiento se debería a la alta proporción de proteínas solubles a pH isoelectrico (27,3 %).

El proceso de extracción ácida inicial fue efectivo en la separación de compuestos fenólicos, obteniéndose una fracción (EA) con bajo contenido proteico pero una importante concentración de fenólicos y actividad antioxidante.

El residuo resultante de dicha extracción ácida inicial fue sometido a extracción alcalina, precipitación isoelectrica agregándose un lavado y centrifugación discontinua. El producto resultante, CPA2, presentó una mayor concentración proteica y menor rendimiento que el CPA1. La mayor concentración de proteína (73 %) se debería a la etapa final de centrifugación discontinua y el menor rendimiento (7,4 %) a la pérdida proteica producida en la extracción ácida inicial. Asimismo la extracción ácida inicial resultó en la disminución de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de este concentrado con respecto al CPA1.

El Suero de esta precipitación isoelectrica se destacó por el contenido de proteínas de bajo peso molecular, la mayor concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante entre las muestras obtenidas por los distintos procesos de separación aplicados.

Paralelamente el extracto resultante de la extracción ácida inicial y extracción proteica alcalina fue concentrado por ultrafiltración, resultando el concentrado RAI con concentración de proteínas (52,5 %) menor al CPA2 y rendimiento similar. Este concentrado no presentó agregados de elevado peso molecular (> 1000 kDa) a diferencia de los obtenidos por precipitación isoelectrica; la concentración de compuestos fenólicos fue muy baja mientras que su actividad antioxidante fue diez veces mayor al del CPA2 y produjo espumas con alto overrun pero baja estabilidad. El RAI se destaca entre los otros concentrados por el importante aumento de ciertos aminoácidos que lo hacen especialmente balanceado con respecto al requerimiento de la FAO/WHO (1991) y no presentó aminoácidos limitantes.

En el proceso de ultrafiltración del extracto ácido (EA) se obtuvo un permeado (PAc) con mayor contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante que el retenido (RAc). Por su parte, el RAc presentó las mejores características de espumado (capacidad y estabilidad), lo que sería resultado de proteínas de peso molecular intermedio y bajo, buena solubilidad y la presencia de compuestos fenólicos.

Se realizaron dos hidrólisis enzimáticas del concentrado CPA1, alcanzando 8,08 y 16,8 % de GH. Este proceso favoreció la liberación de compuestos fenólicos, aumento la actividad antioxidante y la solubilidad con respecto al CPA1; mientras que fue excesivo para mejorar las propiedades de espumado.

Finalmente, se puede decir que la aplicación de diferentes métodos de extracción y concentración de proteínas dió como resultado una variedad de productos con diferentes características que podrían ser útiles en diversas aplicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen J.** (1976). "Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 24, p. 1090-1093.
- Adler-Nissen, J.** (1986). "Enzymic Hydrolysis of food proteins". London: *Elsevier Applied Science*. p.427.
- Aluko R.E. y Monu E.** (2003). "Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates". *Food Chemistry and Toxicology*. v. 68, n. 4, p.1254-1258.
- Andrich O., Carrara C., Castel V., Netto F. M. y Santiago L.** (2007). Concentración de proteínas de amaranto por ultrafiltración. Trab.: 5-26, XI Congreso CYTAL, Buenos Aires, 12-14 de septiembre de 2007. ISBN 978-987-22165-2-8.
- AOAC.** (1995). Association of official methods analytical chemists. "Official Methods of Analysis of the Association Chemistry". 16 ed. Arlington: AOAC.
- Aphalo, P.; Castellani, O.F.; Martínez, E.N. y Añón, M.C.** (2004). "Surface Physicochemical Properties of Globulin- P Amaranth Protein". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 52, p. 616-622.
- Arnao, M.B.** (2000). "Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case". *Trends in Food Science & Technology*. v.11, n.11, p. 419-421.
- Asociación mexicana de amaranto.** (2003). "Salud y Nutrición. Amaranto, el mejor alimento de origen vegetal". México D.F. <http://www.amaranto.com.mx>

-
- Avanza, M. V.; Puppo M.C. y Añón, M. C.** (2005 b). “Structural characterization of amaranth protein gels”. *Journal of Food Science*. Chicago. v. 70, p. 223-229.
- Avanza, M. V.; Puppo, M.C. y Añón, M.C.** (2005 a). “Rheological characterization of amaranth protein gels”. *Food hydrocolloids*. v. 19, p. 889-898.
- Avanza, M.C. y Añón, M.C.** (2007). “Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Hoboken. v. 87, n. 4, p. 616-623.
- Balerin, C., Aymard, P., Ducept, F., Vaslin, S. y Cuvelier, G.** (2007). “Effect of formulation and processing factors on the properties of liquid food foams”. *Journal of Food Engineering*. v. 78, p. 802–809.
- Barba de la Rosa, A.P.; Fomsgaard, I.S.; Laureen, B.; Mortensen, A.G.; Olvera-Martínez, L.; Silva-Sánchez, C.; Mendoza-Herrera, A.; González-Castañeda, J. y De León-Rodríguez, A.** (2008). “Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potencial impact on its nutraceutical quality”. *Journal of Cereal Science*. v.49, p.117-121.
- Barba de la Rosa, A.P.; Herrera, A.; Utsumi, S. y Paredes-López, O.** (1996). “Molecular characterization, cloning and structural análisis of a cDNA encoding an amaranth globulin”. *Journal of Plant Physiology*. v. 194, n. 5, p. 527-532.
- Barba de la Rosa, A.P; Gueguen, J.; Paredes-López, O. y Viroben, G.** (1992). “Fractionation procedures, eletrophoretic characterization, and amino acid

composition of amaranth seed proteins”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.40, p.931-936.

Barbosa, A.C.L.; Hassimoto, N.M.A.; Lajolo, F.M. y Genovese, M.I. (2006). “Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e productos derivados”. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. v. 26, n. 4, p. 921-926.

Becerra, R. (2000). “El amaranto: nuevas tecnologías para un nuevo cultivo”. *Diversitas*, Año 5, n. 30. (<http://www.conabio.gob.mx/>).

Becker R. (1989). “Preparation, composition, and nutritional implications of amaranth seed oil”. *Cereal Foods World*. v. 34, n.11, p. 950-953.

Becker, R.; Wheeler, E.L.; Lorenz, K.; Stafford, A.E.; Grosjean, O.K.; Betschart, A.A. y Saunders R.M. (1981). “A Compositional Study of Amaranth Grain”. *Journal of Food Science*. v. 46, p. 1175-1180.

Bejosano, F.P. y Corke, H. (1998). “Protein quality evaluation of Amaranthus whole meal flours and protein concentrates”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Hoboken. v. 76, n.1, p. 100-106.

Benzie, I. F. F. y Strain, J. J. (1996). “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay”. *Analytical Biochemistry*. v. 239, p. 70-76.

Berg, R.; Haenen, G.R.M.M.; Berg, H. y Bast, A. (1999). “Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures”. *Food Chemistry*. v. 66, p. 511- 517.

- Bernardi Don, L.S., Pilosof, A.M.R. y Bartholomai, G.B.** (1991). "Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases". *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v. 68, p. 102-105.
- Betschart, A.A.; Irving, D.W.; Shepherd, A.D. y Saunders, R.M.** (1981). "Amaranthus cruentus: milling characteristics, distribution of nutrients within seeds components, and the effects of temperature on nutrition quality". *Journal of Food Science*. v. 46, n. 4, p. 1181-1187.
- Bigelow, C.C.** (1967). "On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure". *Journal of Theoretical Biology*. v. 16, n. 2, p. 187-211.
- Bonnefoy, M.; Drai, J. y Kostka, T.** (2002). "Antioxidants to slow aging, facts and perspectives". *Presse Medicale*. Paris. v. 31, n. 25, p. 1174-1184.
- Bourne, L. C. y Rice-Evans, C.A.** (1999). "Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid". *Methods in Enzimology*. San Diego. v. 299, p. 91-106.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E. y Berset C.** (1995). "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity". *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.* v. 28, p. 25-30.
- Breene, W.M.** (1991). "Food uses of grain amaranth". *Cereal Foods World*. v. 36, p. 5, p. 426-430.
- Bressani, R.** (1989). "The proteins of grain amaranth". *Food Review Internacional*. v.5. n.1, p.13-38.

- Bressani, R. y Garcia-Vela, L.A.** (1990). "Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 38, p. 1205-1209.
- Carp, D.J.; Bartholomai G.B. y Pilosof A.M.R.** (1997). "A kinetic model to describe liquid drainage from soy protein foams over an extensive protein concentration range". *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*. v. 30, p. 253-258.
- Carrasco, R.R. y Encina-Zelada, C.R.** (2008). "Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinoa (*Chenopodium quinoa*), kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*)". *Revisión de la Sociedad Química de Perú*. v. 74, n. 2, p. 85-99.
- Castellani, O.F.; Martínez, E.N. y Añón, M.C.** (1999). "Role of Disulfide Bonds upon the Structural Stability of an Amaranth Globulin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 47, p. 3001-3008.
- Castellani, O.F.; Martínez, E.N. y Añón, M.C.** (2000). "Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 48, n. 11, p. 5624-5629.
- Cheftel, J. C.; Cuq, J. L. y Lorient, D.** (1989). "Proteínas alimentarias". *Propiedades funcionales*. Ed. Acribia S.A. p. 5-13.
- Chen, H.M.; Muramoto, K.; Yamauchi, F. y Nokihara, K.** (1996). "Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digest of a soybean protein". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 44, n. 1, p. 2619-2623.

-
- Chen, H.M.; Muramoto, K.; Yamauchi, F.; Fujimoto, K. y Nokihara, K.** (1998). “Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 46, p. 49-53.
- Cheynier, V.** (2005). “Polyphenols in foods are more complex than often thought”. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Bethesda. v. 81, n.1, p. 223-229S.
- Coelho, K.D.** (2006). “Desenvolvimento e avaliação de aceitação de cereais matinais e barras de cereais à base de amaranto (*Amaranthus cruentus* L.)”. Disertación de Maestría en Salud Pública – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Cordero-de-los-Santos, M. Y.; Osuna-Castro, J. A.; Borodaneenko, A. y Paredes-López, O.** (2005). “Physicochemical and Functional Characterisation of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Protein Isolates Obtained by Isoelectric Precipitation and Micellisation.” *Food Science and Technology International*. v. 11, n. 4, p. 269-280.
- Cumby, N.; Zhong, Y.; Nacz, M. y Shahidi, F.** (2008). “Antioxidant activity and waterholding capacity of canola protein hydrolysates”. *Food Chemistry*. Oxford. v.109, n.1, p.144-148.
- Czerwinski, J.; Bartnikowska, E.; Leontowicz, H.; Lange, E.; Leontowicz, M.; Katrich, E.; Traktenberg, S. y Gorinstein, S.** (2004). “Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*A. hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed

cholesterol containing diets”. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. v.15, n.10, p: 622-629.

D'Agostina, A.; Antonioni, C.; Resta, D.; Arnoldo, A.; Bez, J.; Knauf, U. y Wäsche, A. (2006). “Optimization of a Pilot-Scale Process for Producing Lupin Protein Isolates with Valuable Technological Properties and Minimum Thermal Damage”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 54, p. 92-98.

Damodaran, S. y Paraf, A. (1997). “Food Proteins and Their Applications”. Marcel Dekker, Inc. New York

Drzewiecki, J.; Delgado-Licon, E.; Haruenkit, R.; Pawelzik, E.; Martin-Belloso, O.; Park, Y.; Jung, S.; Trakhtenberg, S.; Gorinstein, S. (2003). “Identification and Differences of Total Proteins and Their Soluble Fractions in Some Pseudocereals Based on Electrophoretic Patterns”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 51, p. 7798-7804.

Duarte-Correa, A.; Jokl, L. y Carisson, R. (1986). “Amino acid composition of some *Amaranthus sp.* Grain proteins and its fractions”. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. v. 26, n. 3, p. 466-476.

Eberhardt, M.V.; Kobira, K.; Keck, A.S.; Juvik, J.A.; Jeffery, E.H. (2005). “Correlation analysis of phytochemical composition, chemical, and cellular measures of antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea L. Var. italica*)”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 53, n. 19, p. 7421-7431.

Escudero, N.L.; Arellano, M.L.; Luco, J.M.; Gimenez, M.S. y Mucciarelli, S.I. (2004). “Comparison of the chemical composition and nutritional value of *Amaranthus cruentus*

flour and its protein concentrate”. *Plant Food for Human Nutrition*. v. 59, n. 1, p. 15-21.

Fang, Y. Z.; Yang, S. y Wu, G. W. (2002). “Free radicals, antioxidants, and nutrition”. *Nutrition*. Nueva York. v. 18, n. 10, p. 872-879.

FAO/WHO. (1991). “Protein quality evaluation”. Report of a join FAO/WHO expert consultation. FAO Food and Nutrition Paper n° 5, 66 p. *Food and Agriculture organization of the United Nations*. Rome.

Fernández-Pachón, M.S.; Villaño, D.; Troncoso, A.M. y García-Parrilla, M.C. (2006). “Determination of the phenolic composition of sherry and table whites wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity”. *Analytica Chimica Acta*. v. 563, p. 101-108.

Fidantsi, A. y Doxastakis, G. (2001). “Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 21, p. 119-124.

Foschiatti, M. L.; Perduca, M.; Santiago, L.; Rubiolo, A. y Carrara, C. (2009). “Estudio de formación y estabilidad de espumas formuladas con WPI y un galactomanano”. *XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XII CYTAL)*, 2009, Concordia, Entre Ríos.

Fuhrmeister, H. y Meuser, F. (2003). “Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled pea”. *Journal of Food Engineering*. 56:119-129.

Galher, S.; Otto, K. y Böhm, V. (2003). “Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago v. 51, n. 27, p. 7962-7968.

-
- Gamel, T. H.; Linssen, J. P.; Mesallam, A.S.; Damir, A.A. y Shekib, L.A.** (2006). “Effect of seed treatments on the chemical composition of two amaranth species: oil, sugars, fibres, minerals and vitamins”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 86, p. 82-89.
- Gamel, T.H.; Linssen, J.P.; Mesallen, A.S.; Damir, A.A.; Shekib, L.A.** (2005). “Effect of seed treatments on the chemical composition and properties of two amaranth species: starch and protein”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Hoboken. v. 85, n. 2, p. 319-327.
- González-Pérez, S.; Merck, K.B.; Vereijken, J.M.; Koningsveld, G.A.; Gruppen, H., Voragen, A.G.J.** (2002). “Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 50, p. 1713-1719.
- Gorinstein, S.; Delgado-Licon, E.; Pawelzik, E.; Heriyati Permady, H. y Trakhtenberg, S.** (2001). “Characterization of Soluble Amaranth and Soybean Proteins Based on Fluorescence, Hydrophobicity, Electrophoresis, Amino Acid Analysis, Circular Dichroism, and Differential Scanning Calorimetry Measurements”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 49, p. 5595-5601.
- Gorinstein, S.; Drzewiecki, J.; Delgado-Licon, E.; Pawelzik, E.; Martinez Ayala, A. L.; Medina, O.J.; Haruenkit, R. y Trakhtenberg, S.** (2005). “Relationship between dicotyledone-amaranth, quinoa, fagopyrum, soybean and sorghum and rice

based on protein analyses and their use as substitution of each other”. *European Food Research Technology* v. 221, p. 69-77.

Gorinstein, S.; Nue, I.A. y Arruda, O. (1991). “Alcohol-soluble and total proteins from amaranth seeds and their comparison with other cereals”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 33, p. 848-850.

Gorinstein, S.; Vargas, O.J.M.; Jaramillo, N.O.; Salas, I.A.; Ayala, A.L.M.; Arancibia-Avila, P.; Toledo, F.; Katrich, E. y Trakhtenberg, S. (2007). “The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals”. *European Food Research and Technology*. New York. v. 225, n. 3-4, p. 321-328.

Gorinstein, S.; Zemser, M.; Fliess, A.; Shnitman, I.; Paredes-Lopez, O.; Yamamoto, K.; Kobayashi, S. y Taniguchi, H. (1998). “Computational análisis of the Amino Acid Residue Sequences of Amaranth and Some Other Proteins”. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v. 62, n. 10, p. 1845-1851.

Gorinstein, S.; Zemser, M.; Friedman, M.; Rodrigues, W.A.; Martins, P.S.; Vello, N.A.; Tosello, G.A. y Paredes-Lopez, O. (1996). “Physicochemical characterization of the structural stability of some plant globulins”. *Food Chemistry*. v. 56, p. 131-138.

Guillen-Portal, F.R.; Baltensperger, D.D. y Nelson, L.A. (1999). “Plant population influence on yield and agronomic traits in plainsman grain amaranth”. In: Janick (ed.), *Perspectives on new crops and new uses*. Alexandria, VA., ASHS Press, p. 190-193.

- Hagen, S.; Frost, B. y Augustin, J.** (1989). "Precolumn Phenylisothiocyanate Derivatization and Liquid-Chromatography of amino-acids in food". *Journal of the association of Official analytical Chemists*. v. 72, n. 6, p. 912-916.
- Halliweel, B. y Gutteridge, J. M. C.** (1998). "Free Radicals in Biology and Medicine". 2^a ed. Oxford University Press.
- Hermannson, S.** (1979). "Methods of Studying Functional Characteristics of Vegetable Proteins". *J.AM Chemists' Society*. v. 56, p.272.
- Hoseney, R. C.; Varriano-Marston, E.; Densy, D. A. V.** (1981). "Sorghum and millet". In: *Advances in cereal science and technology*. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, v. 4, p. 71.
- Huang, D.; Ou, B. y Prior, R. L.** (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 53, n. 6, p. 1841-1856.
- INRA: Inst. Nat. Rech. Agronomique.** (1979). "Purifying proteins extracts from sunflower kernels-by processing from suspension containing alkaline earth or magnesium salts and sodium sulphite". n. US4174313-A, 13 nov.
- Ismail, A.; Marjan, Z.M. y Foong, C.W.** (2004). "Total antioxidant and phenolic content in selected vegetables". *Food Chemistry*. v. 87, n. 4, p. 581-586.
- Issa, A.Y.; Volate, S.R. y Wargovich, M.J.** (2006). "The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives". *Journal of Food Composition and Analysis*. v. 19, n. 5, p. 405-419.

- Je, J.Y.; Park, P.J. y Kim, S.K.** (2005). “Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate”. *Food Research International*. v. 38, n. 1, p. 45-50.
- Jeong, S.M.; Kim, S.Y.; Kim, D.R.; Jo, S.C.; Nam, K.C.; Ahn, D.U. y Lee, S.C.** (2004). “Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 52, n.11, p. 3389-3393.
- Juan, R., Pastor, J., Alaiz, M.; Megías, C. y Vioque, J.** (2007). “Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto”. *Grasas y Aceites*. v. 58, n. 1, p. 49-55.
- Kähkönen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S. y Heinonen M.** (1999). “Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 47, n.10, p. 3954–3962.
- Kalapathy, U.; Hettiarachchyn, N.S. y Rhee, K.C.** (1997). “Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins”. *Journal of American Oil Chemistry Society*. v. 74, n. 3, p. 195-199.
- Kato, A.; Matsuda, T. y Matsudomi, N.** (1984). “Determination of protein hydrophobicity using a sodium dodecyl sulfate binding method”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 32, p. 284-288.
- Kim, S.K.; Byun, H.G.; Park, P.J. y Shahidi, F.** (2001). “Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 49, n. 6, p. 2992-2997.
- Klimczak, M.M. y Pacholek, B.** (2002). “Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds”. *Nahrung*. v. 46, n. 3, p. 184-186.

- Konishi Y. y Yoshimoto N.** (1989). "Amaranth Globulin as a Heat- stable Emulsifying Agent". *Agricultural and Biological Chemistry*. v. 53, n. 12, p. 3327-3328.
- Konishi, Y.; Fumita, Y.; Ikeda, K.; Okuno, K. y Fuwa, H.** (1985). "Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. ". *Agricultural and Biological Chemistry*. v. 49, p. 1453.
- Konishi, Y.; Horikawa, K.; Oku, Y.; Azumaya, J. y Nakatani, N.** (1991). "Extraction of Two Albumin Fractions from Amaranth Grains: Comparison of Some Physicochemical Properties and the Putative Localization in the Grains". *Agricultural and Biological Chemistry*. v. 55, n. 11, p. 2745-2750.
- Kumar, G.S.; Nayaka, H.; Dharnesh S.M. y Salimath, P.V.** (2006). "Free and bound phenolic antioxidants in amla (*Embllica officinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*)". *Journal of Food Composition and Análisis*. v. 19, p. 446-452.
- L'Hocine, L.; Boye, Y.I.; Arcand, Y.** (2006). "Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures". *Journal of Food Science*. v. 71, n. 3, p. C137-C145.
- Laemmli, U.K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. v. 227, n. 15, p. 685-689.
- Lawhon, J.T.; Hensley, D.W.; Mulsow, D. y Mattil, K.F.** (1978). *Journal of Food Science*. V. 43, n. 2, p. 361-364,369.
- Lawhon, J.T.; Rhee, K.C. y Lusas, E.W.** (1981). *Journal of the American Oil Chemists Society*. v. 58, n. 3, p. 377-384.
- Layne, E.** (1957). *Methods in enzymology*. vol III. Intersci. Pub. Inc., NY, 447-454.

- Lehmann, J.W.** (1996). "Case history of grain amaranth as an alternative crop". *Cereal Foods World*. v. 41, n. 5, p. 399-411.
- Lindeboon, N.** (2005). "Studies on the characterization, biosynthesis and isolation of starch and protein from quinoa". PhD Thesis- University of Saskatchewan.
- López, M. G., Bello-Pérez, L. A., and Paredes-López, O.** (1994). Amaranth Carbohydrates. in *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology*. O. Paredes-López, ed. CRC Press: Boca Raton, FL, p. 107-131
- Madhujith, T. y Shahidi, F.** (2005). "Antioxidant potencial of pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.)". *Journal of Food Science*. v. 70, n. 1, p. 85-90.
- Mahmoud, M.I.** (1994). "Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products". *Food Technology*. Chicago. v. 48, n. 10, p. 89-95.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. y Jiménez, L.** (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability". *The American Journal of Clinical Nutrition*. Bethesda. v. 79, n. 5, p. 727-47.
- Marcílio, R.; Amaya-Farfán, J.; Ciacco, C.F. y Spehar, C.R.** (2003). "Fracionamento do grão de *Amaranthus cruentus* brasileiro por moagem e suas características composicionais". *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. v. 23, n. 3, p. 511-516.
- Marcone, M. F. y Yada, R. Y.** (1991). "Isolation, Purification, and Characterization of the Oligomeric Seed Globulin from *Amaranthus hypochondriacus*." *Agricultural and Biology Chemistry*. v. 55, n. 9, p. 2281-2289.

- Marcone, M.F.** (1999). "Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed". *Food Chemistry*. v. 65, p. 533-542.
- Marcone, M.F. y Kakuda, Y.** (1999). "A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates". *Nahrung*. v. 43, n.6, p. 368-373.
- Marcone, M.F. y Yada, R.Y.** (1992). "Study of the charge profile and covalent subunit association of oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 40, n. 3, p. 385-389.
- Marletta, M.A.** (1988). "Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate". *Biochemistry*. Washington. v. 27, n. 24, p. 8706-8711.
- Martínez, E. N. y Añón, M. C.** (1996). "Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 44, n. 9, p. 2423-2430.
- Martínez, E.N.; Castellani, O.F. y Añón, M.C.** (1997). "Common molecular features among amaranth storage proteins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v.45, n.10, p.3832-3839.
- Martínez, K.D.; Baeza, R.I.; Millán, F. y Pilosof, A.M.R.** (2005). "Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams". *Food Hydrocolloids*. v. 19, p. 361-369.
- Martínez, K.D.; Carrera Sánchez, C.; Pizones Ruíz-Henestrosa, V.; Rodríguez Patino, J.; Pilosof, A.M.R.** (2006). "Effect of limited hydrolysis of soy protein on the interactions with polysaccharides at the air-water interface". *Food Hydrocolloids*. 10.1016/j.foodhyd.2006.09.008.

-
- Martínez, K.D.; Carrera Sánchez, C.; Rodríguez Patino, J.M.; Pilosof, A.M.R.** (2009). “Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates”. *Food Hydrocolloids*. 10.1016/j.foodhyd.2009.03.015.
- Martínez-Valverde, L.; Periagro, M.J. y Ros, G.** (2000). “Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta”. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Caracas. v. 50, n. 1, p. 5-18.
- Martirosyan, D.M.; Miroshnichenko, L.A. y Kulakova, S.N.** (2007). “Amaranth oil application for coronary heart disease and hipertensión”. *Lipids Research and Disease*. v. 6, n. 1, p. 1-12.
- Matthäus, B.** (2002). “Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 50, n.12, p. 3444-3452.
- Mendis, E.; Rajapakse, N. y Kim, S.K.** (2005). “Antioxidant properties of a radicalscavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 53, n. 3, p. 581-587.
- Michalska, A.; Ceglinska, A.; Zielinski, H.** (2007). “Bioactive compounds in rye flours with different extraction rates”. *European Food Research and Technolog*. Berlín. v. 225, n. 3-4, p. 545-551.
- Molina-Ortiz, S.E. y Wagner, J.R.** (2002). “Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties”. *Food Research International*. v. 35, p. 511-518.

- Molina-Ortiz, S.E.; Carrera-Sánchez, C.; Rodríguez-Niño, M.R.; Añon, M.C. y Rodríguez-Patino, J.M.** (2003). “Structural characterization and surface activity of spread and adsorbed soy globulin films at equilibrium”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 32, p. 57-67.
- Mora-Escobedo, R.; Paredes-López, O.; Ordorica-Falomi, C.** (1990). “Characterization of albumins and globulins from amaranth”. *LWT-Food Science and Technology*. v. 23, p. 484-487.
- Murria, B. y Ettelaie, R.** (2004). “Foam stability: proteins and nanoparticles”. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. v. 9, p. 314–320.
- Nagai, T.; Sakai, M.; Inoue, R.; Inoue, H. y Suzuki, N.** (2001). “Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis”. *Food Chemistry*. v. 75, p. 237-240.
- Nordberg, J. y Arner, E. S.** (2001). “Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System”. *Free Radical Biology and Medicine*. Nueva York. v. 31, n. 11, p. 1287-1312.
- Nsimba, R.Y.; Kikuzaki, H. y Konishi, Y.** (2008). “Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds”. *Food Chemistry*. v. 106, p. 760-766.
- Osuna-Castro, J.; Rascón-Cruz, Q.; Napier, J.; Fido, R.J.; Shewry, P.R.; Paredes-López, O.** (2000) “Overexpression, purification and in vitro refolding of the 11S globulin from amaranth seed in *Escherichia coli*”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 48, p. 5249-5255.

- Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A. y Deemer, E.K.** (2002). “Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 50, n. 11, p. 3122-3128.
- Ozsoy, N., Yilmaz, T., Kurt, O. y Can, A.** (2009). “*In vitro* antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L”. *Food Chemistry* v. 116, p. 867-872.
- Paredes-López, O.; Mora-Escobedo, R. y Ordorica-Falomir, C.** (1988). “Isolation of amaranth protein”. *Lebensm Wis U-Technol*. v. 21, n. 1, p. 59-61.
- Park, P. J.; Jung, W. K.; Nam, K. S.; Shahidi, F.; Kim, S. K.** (2001). “Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk”. *Journal of American Oil Chemistry Society*. v. 78, p. 651-656.
- Paśko, P., Barton, H., Zagrodzki, P., Gorinstein, S. y Folta, M.** (2009). “Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth”. *Food Chemistry*. 10.1016/j.foodchem.2009.01.037.
- Pazinatto, C.** (2008). “Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante de grãos de amaranto (*Amaranthus cruentus*)”. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Fac. de Eng. de Alimentos.
- Pearce, R.J.** (1984). “Preparation of protein isolate from sunflower seed”. *United States Patent*. 4.435.319.

- Peña-Ramos, E.A.; Xiong, Y.L. y Arteaga, G.E.** (2004). "Fractionation and characterization for antioxidant activity of hydrolyzed whey protein". *Journal of Science Food and Agricultural*. v. 84, n. 14, p. 1908-1918.
- Pérez- Jiménez, J. y Saura- Calixto, F.** (2006). "Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays". *Food Research Internacional*. v. 39, p. 791-800.
- Pilosof, A. M. y Bartholomai, G.B.** (2000). "Caracterización funcional estructural de proteínas". Buenos Aires, Ed. Cyted-Eudeba.
- Prigent, S.V.; Gruppen, H.; Visser, A.J.W.G.; Koningsveld, G.; Jong, G.A.H.; Voragen, A.G.J.** (2003). "Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 51, p. 5088-5095.
- Prior, R.; Wu, X. y Schaich, K.** (2005). "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 53, p. 4290-4302.
- Ribeiro, S. M. R.** (2005). "A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico". *Bioscience Journal*. Uberlândia. v. 21, n. 3, p. 133-149.
- Rimm, E. B.** (2002). "Fruit and vegetables: building a solid foundation". *American Journal of Clinical Nutrition*. Bethesda. v.76, n. 1, p.1-2.
- Rojano, B.A.; Gaviria, C.A. y Sáez, J.A.** (2008). "Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el

- isoespintanol”. *Vitae. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. v.15., n. 2, p. 212-218.
- Rover Junior, L.** (2001). “Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo”. *Química Nova*. São Paulo. v. 24, n. 1, p. 112-119.
- Rubino, M.I.; Arntfield, S.D.; Nadon, C.A. y Bernatsky, A.** (1996). “Phenolic protein interactions in relation to the gelation properties of canola protein”. *Food Research International*. v. 29, p. 653-659.
- Russo, A.; Longo, R. y Vanella, A.** (2002). “Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin”. *Fitoterapia*. v. 73, p. S21-S29.
- Sakanaka, S.; Tachibana, Y.; Ishihara, N. y Juneja, L.R.** (2004). “Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in linoleic acid oxidation system”. *Food Chemistry*. Oxford. v. 86, n. 1, p. 99-103.
- Salager, J. L ; Anderez, J. M. y Forgiarini, A.** (2003). “Influencia de la formulación sobre las espumas”. *Laboratorio de Formulaciones, Interfase, Reología y Procesos*. Cuaderno FIRP N° 263.
- Salcedo-Chávez, B.; Osuna- Castro J. A.; Guevara- Lara F.; Domínguez- Domínguez J. y Paredes-López O.** (2002). “Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V. 50, p. 6515-6520.

- Sarwar, G.; L'Abbe, M.; Trick, K.; Botting, H. y Ma, C.** (1999). "Influence of feeding alkaline/heat processed proteins on growth and protein and mineral status of rats". *Adv Exp Med. Biol.* v. 459, p. 161-177.
- Sceni, P. y Wagner, J. R.** (2007). "Study on sodium caseinate foam stability by multiple light scattering". *Food Science and Technology International*. V. 13, n. 6, p. 461-468.
- Schagger, H. y Von Jagow, G.** (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa". *Analytical Biochemistry*. v. 166, p.368-379.
- Scilingo, A. A.; Molina Ortiz, S. E.; Martínez, E. N. y Añón, M. C.** (2002). "Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility". *Food Research Internatinal*. v. 35, p. 855-862.
- Segura-Nieto, M.; Barba de la Rosa, A.P.; Paredes-López, O.** (1994). "Biochemistry of amaranth proteins". In: *Amaranth: Biology Chemistry and Technology*; CRC Press: Boca Raton, FL, Cap. 5, p 75-106.
- Segura-Nieto, M.; Vázquez-Sánchez, N.; Rubio-Velázquez, H.; Olguin-Martínez, H.; Rodríguez-Nester C.E. y Herrera-Estrella L.** (1992). "Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 40, n. 9, p. 1553-1558.
- Sgarbieri V.** (1996). "Proteínas em Alimentos Protéicos". 1 ed. São Paulo: Varela. p. 229.
- Shahidi, F.; Janitha, P.K. y Wanasundara, P.D.** (1992). "Phenolic antioxidants". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Filadelfia, v. 32, n. 1, p. 67-103.

- Sies, H.** (1993). "Strategies of antioxidant defense". *European Journal of Biochemistry*. Oxford. v. 215, n. 2, p. 213-219.
- Singh, R.P.; Murthy, K.N.C. y Jayaprakasha, G.K.** (2002). "Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 50, p. 81-86.
- Smith, A. y Circle, S.** (1972). "Soybeans: Chemistry and Technology". v. 1, p. 72.
- Soares, S.E.** (2002). "Ácidos fenólicos como antioxidantes". *Revista de Nutrição*. Campinas. v. 15, n. 1, p. 71-81.
- Sorgentini, D. y Wagner, J.** (2002). "Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins". *Food Research International*. v. 35, p. 721-729.
- Sosulski, F.W.** (1979). "Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products: a review". *Journal of the American Oil Chemists Society*. v. 56, p. 711- 714.
- Sousa, C.M.M.; Silva, H.R.; Vieira-Jr, G.M.; Ayres, M.C.C.; Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brândao, M.S. y Chaves, M.H.** (2007). "Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais". *Química Nova*. São Paulo. v. 30, n. 2, p. 351-355.
- Spellman, D.; McEvoy, E.; O'Cuinn, G. y Fitz Gerald, R.J.** (2003). "Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH-stat methods of quantification of degree of hydrolysis". *Bioresource Technology*. v. 90, p. 249-254.

-
- Subba Rao, M.V.S.S.T. y Muralikrishna, G.** (2002). "Evaluation of the Antioxidant Properties of Free and Bound Phenolic Acids from Native and Malted Finger Millet (Ragi, *Eleusine coracana* Indaf-15) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 50, n. 4, p. 889–892.
- Suetsuna, K.; Ukeda, H. y Ochi, H.** (2000). "Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein". *The Journal of Nutritional Biochemistry*. v. 11, n. 3, p. 128-130.
- Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L. y Burne, D.H.** (2006). "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays forestimating antioxidant activity from guava fruit extracts". *Journal of food composition and analysis*. v. 19, p. 669-675.
- Tosi, E.A.; Ré, E.; Lucero, H. y Masciarelli, R.** (2001). "Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain by diferencial milling". *Food Chemistry* v. 73, n. 4, p. 441-443.
- Tsaliki, E.; Lagouri, V. y Doxastakis, G.** (1999). "Evaluation of the antioxidant activity of lupin seed flour and derivatives (*Lupinus albus ssp. Graecus*)". *Food Chemistry*. v. 65, p. 71-75.
- van de Ver, C; Gruppen, H.; de Bont, D.B.A. y Voragen A.G.J.** (2002). "Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and –stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 50, p. 2938-29346.

- Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L. y Oomah B.D.** (1996). "Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 46, n. 10, p. 4113-4117.
- Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Moyá, M.L.; Troncoso, A.M. y García-Parrilla, M.C.** (2007). "Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical". *Talanta*. v. 71, p. 230-235.
- Wagner, J. R.** (2000). "Propiedades superficiales". En Pilosof A.M.R. y Barthollomai G.B. (eds). *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Buenos Aires: Editorial Universitaria de Argentina. p. 41-74.
- Wang, J.S.; Zhao, M.M.; Zhao, Q.Z. y Jiang, Y.M.** (2006). "Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems". *Food Chemistry*. Oxford. v. 101, n. 4, p.1658-1663.
- Wang, L.L. y Xiong, Y.L.** (2005). "Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolysed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 53, n. 23, p. 9186-9192.
- White, J.; Hart, R. y Fry, J.** (1986). "An Evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. *Journal of Automatic chemistry*. v. 8, n. 4, p. 170-177.
- Williams, R. L.; Spencer, J. P. E. y Rice-Evans, C.** (2004). "Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules?" *Free Radical Biology Medicine*. Nueva York, v. 36, n. 7, p. 838-849.

-
- Xu, L. y Diosady, L.** (2000). “Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media”. *Food Research International*. v. 33, p. 725-731.
- Xu, L. y Diosady, L.** (2002). “Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates”. *Food Research International*. v. 35, p. 23–30.
- Yim, M.H. y Lee, J.H.** (2000). “Functional properties of fractionated soy protein isolates by proteases from Meju”. *Food Science and Biotechnology*. v. 9, n. 4, p. 253-257.
- Yoshie-Stark, Y.; Bez, J.; Wada, Y. y Wäsche, A.** (2004). “Functional properties, lipoxygenase activity and health aspects of *Lupinus albus* protein isolates”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 52, n. 25, p. 7681-7689.
- Zhu, K.; Zhou, H. y Qian, H.** (2006). “Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase”. *Process Biochemistry*. v. 41, n. 6, p. 1296-1302.
- Zieliński, H. y Kozłowska, H.** (2000). “Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 48, n. 6, p. 2008–2016.