

EFECTO DE LA HUMEDAD Y DEL GLICEROL EN LAS TRANSICIONES DE FASE DE BIOPOLÍMEROS: PROTEÍNA DE GUISANTE Y QUITOSANO

Cristian Albacete, Amparo Chiralt^a, Chelo González-Martínez^a

^a Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la humedad (muestras almacenadas a 11,3; 32,8; 43,2; 57,6; 68,9 y 75,3% de humedad relativa) y del contenido en glicerol (0 y 30% p/p respecto al biopolímero) en el comportamiento térmico de aislado de proteína de guisante (PPI) y de quitosano (Q), caracterizado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los termogramas obtenidos para el PPI mostraron la presencia de endotermos, relacionados con la desnaturalización/agregación de la proteína, eliminación de agua y fusión, y de exotermos, correspondientes a la descomposición del biopolímero. Los termogramas obtenidos para el Q presentaron dos endotermos y un exotermo, relacionados con la eliminación de agua libre, la desacetilación y la descomposición del quitosano, respectivamente. El PPI con glicerol (PPI-Gly) no mostró endotermo de fusión, observándose un salto en el termograma entorno 190°C relacionado con la transición vítrea. Los resultados muestran que el PPI podría ser empleado en procesos de termoformado como la extrusión, dada la elevada temperatura de descomposición del PPI (>300 °C) que permite el ablandamiento del biopolímero antes de su descomposición.

Palabras clave: Aislado de proteína de guisante, Calorimetría diferencial de barrido, Extrusión, Isotermas de sorción, Quitosano, Termoformado.

ABSTRACT

This paper has studied the effect of humidity (samples stored at 11.3, 32.8, 43.2, 57.6, 68.9 and 75.3% relative humidity) and glycerol content (0 and 30% w / w respect to the biopolymer) on the thermal behavior of pea protein isolate (PPI) and chitosan (Q), characterized by differential scanning calorimetry (DSC). Thermograms obtained for the PPI showed the presence of endotherms related to the denaturation / aggregation of the protein, water removal and fusion, and exotherm, corresponding to the decomposition of the biopolymer. Thermograms obtained for the Q had two endotherms and an exotherm related to the elimination of free water, deacetylation and decomposition of chitosan, respectively. The PPI with glycerol (PPI-Gly) showed no melting endotherms, showing a jump in the thermogram about 190 ° C related to the glass transition. The results show that the PPI could be

used in thermoforming processes such as extrusion, because of the high decomposition temperature PPI ($> 300^{\circ} \text{C}$) allows the softening of the biopolymer prior to decomposition.

Keywords: Chitosan, Differential Scanning Calorimetry, Extrusion, Pea protein isolate, Sorption isotherms, Thermoforming.

RESUM

En aquest treball s'ha estudiat l'efecte de la humitat (mostres emmagatzemades a 11,3; 32,8; 43,2; 57,6; 68,9 i 75,3% d'humitat relativa) i del contingut en glicerol (0 i 30% p/p respecte al biopolímer) en el comportament tèrmic d'aïllat de proteïna de pèsol (PPI) i de quitosano (Q), caracteritzat mitjançant calorimetria diferencial d'escombratge (DSC). Els termogrames obtinguts pel al PPI van mostrar la presència de endoterms, relacionants amb la desnaturalització/agregació de la proteïna, eliminació d'aigua i fusió i de exoterms corresponents a la descomposició del biopolímer. Els termogrames obtinguts per al Q van presentar dues endoterms i un exoterm, relacionats amb l'eliminació d'aigua lliure, la acetificació i la descomposició del quitosa respectivament. La presència de glicerol va modificar lleugerament el comportament tèrmic de la proteïna del pèsol. Així en el PPI amb glicerol (PPI-Gly) no va mostrar endoterm de fusió, observant-se un salt en el termograma entorn 190°C relacionat amb la transició vítre. Els resultats mostren que el PPI podria ser emprat en procesos de termoformat com l'extrusió, donada l'elevada temperatura de descomposició del PPI ($>300^{\circ}\text{C}$) que permet l'estovament del biopolímer abans de la seva descomposició.

Paraules clau: Aïllat de proteïna de pèsol, Calorimetria diferencial d'escombratge, Extrusió, Isotermes de sorción, Quitosano, Termoformato.

1. INTRODUCCIÓN

El creciente interés en alternativas competitivas, sostenibles y biodegradables a los plásticos derivados del petróleo ha impulsado el desarrollo de plásticos a base de biopolímeros (Verbeek y Van der berg, 2010). La creciente demanda de envases desechables contribuye al rápido aumento en la cantidad de residuos de envases en los vertederos. Los envases individuales, utilizados sobre todo en alimentos perecederos, es una de las principales fuentes de dichos residuos. La aspiración mundial de reducir el impacto de los envases sintéticos en el medioambiente se manifiesta en el aumento del interés del uso de envases biodegradables. En los últimos 20 años, los polímeros naturales, como el almidón, celulosa y proteínas, han recibido un interés creciente desde el punto de vista del desarrollo económico y por la preocupación medioambiental que rodea a los plásticos sintéticos. El interés de estos materiales es debido principalmente a su suministro sostenible y a su biodegradabilidad. Estos biopolímeros se

pueden obtener fácilmente como subproductos de la industria agrícola, hortícola y/o pesquera. Debido a ello y a su bajo coste, su disponibilidad e integración en procesos de fabricación de plásticos mediante las técnicas comunes de procesamiento, como son la extrusión y el moldeo por inyección, se ha hecho muy deseada. Sin embargo, la viabilidad comercial es, de momento, el punto débil de estos plásticos obtenidos de biopolímeros respecto a los plásticos sintéticos.

Existen dos procedimientos generales para la obtención de biofilms plásticos: el proceso en húmedo y el proceso en seco. El proceso en húmedo o también llamado "casting" consiste en dispersar y solubilizar el polímero en una gran cantidad de disolvente. Seguidamente se vierte en una placa antiadherente y se deja secar para que se elimine el disolvente, resultando en la formación de una red entrecruzada (film). Este método, muy sencillo, tiene la desventaja de ser muy complicado de escalar a procesos industriales (Orliac et al. 2003). El proceso en seco implica la mezcla del polímero con otros aditivos en condiciones de baja humedad, seguido del termoformado utilizando el moldeo por comprensión, la extrusión o el moldeo por inyección.

El proceso de extrusión es ampliamente utilizado en la industria del plástico y puede permitir el uso de biopolímeros para fabricar materiales plásticos (Verbeek y Van der berg, 2010). Un extrusor consta de una cámara cilíndrica con temperatura controlada. En su interior hay un tornillo sin fin que gira concéntricamente a la cámara y fuerza a la materia prima a salir por una boquilla. El material es alimentado por medio de una tolva desde un extremo de la máquina. El empuje del tornillo sobre el polímero en la cámara calefactada induce fuerzas de cizalla y una creciente presión a lo largo de ésta. Debido a dicha acción de empuje el material polimérico se funde, fluye y sale por la boquilla con un perfil geométrico preestablecido. Las variables que afectan al proceso son la composición del material en la alimentación, velocidad del tornillo, perfil de temperatura de la cámara, velocidad de avance y el tamaño y forma de la boquilla. La extrusión requiere el ablandamiento del biopolímero, lo que implica trabajar entre la temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (T_m) del biopolímero pero sin llegar a la descomposición (T_d) del mismo ($T_m < T_d$). Este rango de temperaturas es conocido como punto de ablandamiento. Durante la extrusión, el calentamiento juega un papel muy importante en el procesado de materiales a base proteínas porque afecta a su conformación molecular, a su estado polimérico y a sus interacciones moleculares. Dicho proceso, hace que las cadenas del biopolímero se alineen favoreciendo las interacciones entre cadenas. Las proteínas permiten una amplia gama de interacciones intermoleculares que reducen la movilidad molecular y aumentan la viscosidad, dando como resultado un elevado punto de ablandamiento, a menudo por encima de la temperatura de descomposición. La agregación de proteínas por puentes disulfuro se facilita por el incremento de temperatura y el contenido en humedad. Por otro lado, el entrecruzamiento de las cadenas por puentes disulfuro da lugar a altas temperaturas de transición vítrea (Sun et al. 2008). El principal inconveniente del uso de proteínas es que generalmente la temperatura de

descomposición está por debajo del punto de ablandamiento, lo que implica que carezcan de propiedades termoformables y no puedan emplearse en la extrusión. Para evitar este fenómeno, se puede usar plastificantes para modificar el punto de ablandamiento. Así, suele ser necesaria la utilización de un material plastificante para conferir propiedades termoplásticas a las proteínas y hacerlas procesables mediante el proceso de extrusión. El plastificante actúa reduciendo las interacciones entre las cadenas proteicas, principalmente por puentes de hidrógeno, y aumentando la movilidad de dichas cadenas. Existen agentes plastificantes de alto peso y bajo peso molecular con componentes hidrófilos que interactúan con los grupos polares de las proteínas. Ejemplos de éstos son el glicerol, sorbitol, sacarosa, almidón y derivados de la celulosa, entre otros. De este modo, Braüer et al. (2007) demostraron que la adición de un 10 % de glicerol puede mejorar la procesabilidad y las propiedades mecánicas de diferentes proteínas vegetales. El glicerol se caracteriza por tres grupos $-OH$ y una estructura asimétrica; consecuentemente las interacciones con las cadenas polipeptídicas llegan a ser complejas, dando lugar a una red poco ordenada. Esto tiene su efecto en el comportamiento mecánico (Gueguen et al., 1998).

Además de la caracterización térmica de los biopolímeros, también es necesario conocer el potencial de éstos para formar plásticos, es decir, han de presentar unas propiedades físicas y mecánicas adecuadas para tal fin. En un material plástico se buscan unas determinadas propiedades como son unas adecuadas permeabilidades al vapor de agua y a los gases, resistencia al agua y cierta resistencia mecánica, principalmente. El empleo de plastificantes afecta también a estas propiedades y por ello, su efecto debe ser estudiado. Según algunos autores, el uso de plastificantes puede mejorar el comportamiento mecánico de los films (Gueguen et al. 1998; Orliac et al. 2003; Sun et al. 2008). Sin embargo, normalmente afecta negativamente a la permeabilidad al vapor de agua y a la resistencia al agua. La incorporación de sustancias apolares pueden mejorar estas propiedades.

Para conocer el comportamiento térmico de los biopolímeros en los tratamientos térmicos se pueden utilizar diversas técnicas termoanalíticas. Dichas técnicas han sido y siguen siendo en la actualidad ampliamente utilizadas en la caracterización de materiales. El análisis térmico abarca todos los métodos de medida basados en el cambio con la temperatura, de una propiedad física o mecánica del material. Ejemplos de estos métodos analíticos son la calorimetría diferencial de barrido (DSC), el análisis termogravimétrico (TGA) y el análisis termomecánico (TMA). La DSC es una de las técnicas más utilizadas para determinar las transiciones de fase de los materiales. Varios autores (Kittur et al. 2002; Mucha y Pawlak, 2005; Neto et al. 2005) han demostrado la capacidad de la DSC para suministrar información útil sobre la estructura y el comportamiento térmico de los biopolímeros. Por otro lado, el TGA es el mejor método para estudiar la estabilidad térmica de los polímeros (Sakurai et al. 2000). Para proporcionar información sobre la temperatura de transición vítrea y la reología de la fusión de los biopolímeros se ha desarrollado recientemente una técnica en el contexto de la extrusión conocida como análisis de transición de fases (PTA, Phase Transition Analyser) (Bengoechea et al. 2007).

En la bibliografía se pueden encontrar diversos estudios acerca del empleo de proteínas de origen vegetal (gluten de trigo, soja, girasol, maíz), de origen animal (gelatina, queratina, caseínas y suero de leche) y de polisacáridos (quitosano, almidón) en la fabricación de plásticos biodegradables. El gluten de trigo y la proteína de soja han sido las proteínas que más ampliamente se han estudiado para la fabricación de materiales termoformados. No ha ocurrido lo mismo con la proteína de guisante, de la cual se conoce a priori que presenta buenas propiedades formadoras de films. En la actualidad, el mercado mundial de las proteínas vegetales está dominado por la proteína de soja, disponible comercialmente en harina de soja, concentrado de soja, y aislado de soja. El bajo precio, calidad y versatilidad en sus aplicaciones hacen difícil competir con ella. Solo unos pocos estudios han tratado las propiedades de films de proteína de guisante (Choi y Han, 2001; Gueguen et al., 1998; Viroben et al., 2000; Kowalczyk y Baraniak, 2011). Entre ellos, en el trabajo publicado por Choi y Han (2001) se muestra que la proteína de guisante puede ser utilizada para preparar recubrimientos comestibles y films con permeabilidad al vapor de agua y propiedades físicas similares a los preparados con proteína de soja, proteína de suero, o de maíz. Estos mismos autores hicieron una comparación del precio de aislado de proteína de suero (\$13.5–27/kg), de aislado de proteína de soja (\$3–3.8/kg) y concentrado de proteína de guisante (\$2.5–2.8/kg), indicando que la utilización de proteína de guisante en la producción de alimentos, incluyendo los recubrimientos comestibles y films podría suponer ventajas económicas. La ausencia de modificaciones genéticas en derivados de guisante comercializados (Directive, 2001/18/EC) deja a la proteína de guisante como una gran alternativa a los productos de proteína de soja, ya que la gran mayoría son obtenidas a partir de plantas transgénicas. Además, la proteína de guisante no está incluida en la lista de productos que causan alergias o intolerancias alimentarias (Commission Directive, 2007/68/EC), a diferencia de la soja y otros cereales que contienen gluten, huevos, pescado y leche.

La variedad de guisante principalmente cultivada es *Pisum Sativum L.* El guisante deshidratado se compone generalmente de hidratos de carbono (35 %), proteínas (27 %), fibras (27 %) y una muy pequeña cantidad de lípidos (Choi y Han, 2001). La fracción proteica está constituida por albúmina (21%) globulinas (66%) y glutelina (12%) (Gómez-Villalba, 2005). Las globulinas están clasificadas generalmente como proteínas 11S (legumina) y 7S (vicilina), de acuerdo a sus coeficientes de sedimentación. Estas difieren entre sí en su tamaño, peso molecular, estructuras de sus subunidades y contenido sulfúrico. El contenido en aminoácidos azufrados es importante por los efectos que las interacciones por puentes disulfuro tienen en la movilidad molecular y en el punto de ablandamiento de las proteínas. Según Gómez-Villalba (2005), la proteína de guisante posee un bajo contenido de aminoácidos azufrados.

El quitosano es un polisacárido lineal de unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-Glucosamina unidas por enlace β 1-4. Se obtiene comercialmente por N-desacetilación de la quitina, que es una sustancia procedente del exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos y camarones). Está clasificado

como un polímero natural porque se degrada por la enzima quitosanasasa (Sakurai, et al. 2000). La quitina y el quitosano han sido ampliamente estudiados en las últimas dos décadas por sus propiedades para uso industrial y médico. Se conoce bien que los films de quitosano son biodegradables, flexibles, duraderos, resistentes mecánicamente, tienen valores moderados de permeabilidad al vapor y al oxígeno, y tienen propiedades antimicrobianas. Las propiedades mecánicas y permeables del quitosano pueden ser controladas seleccionando el peso molecular, un sistema disolvente adecuado, y la adición de agentes plastificantes y dispersantes (Martínez-Camacho et al., 2010). A pesar de que hay muchos estudios que tratan sobre la caracterización térmica de quitosano, no se ha podido concluir que tenga propiedades termoformables, ya que existen dificultades para encontrar un acuerdo unánime en la caracterización de las propiedades térmicas del quitosano. Si bien la caracterización de su temperatura de descomposición está bien establecida, no ocurre lo mismo con la temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión. Respecto a la T_g existe una gran controversia. Distintos autores han documentado diferentes T_g . Parece que tanto el grado de acetilación, peso molecular medio, cristalinidad y el pH son factores que pueden afectar a las propiedades térmicas de quitosano (Neto et al. 2005) y lo que explicaría las discrepancias entre los distintos trabajos. Así, Ratto et al. (1995) observó la T_g a 30°C para un rango de humedad de 8 a 30%. Sakurai et al. (2000) encontraron una T_g de 203°C. Mucha y Pawlak observaron la T_g entre 170 y 180 °C. Kittur et al (2000) mostraron en sus trabajos con este polímero que su determinación estuvo impedida por la descomposición del mismo. Por otro lado, Neto et al. (2005) argumentaron que la evaporación de agua del quitosano obstaculizó la determinación de su T_g . Lewandowska (2009) propuso que la DCS convencional no proporciona la alta sensibilidad necesaria para la determinación de las transiciones vítreas débiles en materiales altamente cristalinos, por lo que recurrió a la Hyper DSC. En cuanto a la temperatura de fusión no se presentan datos para quitosano de forma aislada, sino para mezclas de quitosano con otros polímeros sintéticos.

Aunque existen datos en la bibliografía que caracterizan las transiciones de fase de algunos biopolímeros en aras a optimizar su utilización en la obtención de materiales termoformados (tabla 1), existe muy poca bibliografía sobre la caracterización térmica de proteína de guisante, así como del efecto del glicerol y la humedad en el comportamiento térmico de proteína de guisante y de quitosano. Este tipo de estudios es necesario para determinar si cualquier biopolímero nativo o combinado con un plastificante presenta propiedades termoformables y, en caso afirmativo, establecer las condiciones más idóneas para extrapolar al proceso de extrusión.

Tabla 1. Referencias de trabajos que han caracterizado transiciones de fase en biopolímeros con la finalidad de su uso en la obtención de materiales termoformados.

Biopolímero	Autor
Proteína de soja	Kumar et al., 2002
Quitosano	Neto et al., 2005
Proteína de soja, gluten y caseínas	Bengoechea et al., 2007
Proteína de soja, de maíz, de guisante y gluten de trigo	Braüer et al., 2007
Gluten de trigo-glicerol	Sun et al., 2007 y Sun et al., 2008
Almidón y quitosano	Chiono et al., 2009
Celulosa y quitosano	Almeida et al., 2010
Quitosano	Martínez-Camacho et al., 2010
Proteína de soja, de maíz, gluten de trigo y caseínas	Verbeek y Van der berg, 2010

El objetivo de este trabajo fue la caracterización de las transiciones de fase por calorimetría diferencial de barrido de la proteína de guisante y el quitosano, dos biopolímeros de interés actual para la fabricación de films y materiales termoformados y analizar el efecto del contenido de humedad y del glicerol sobre las mismas. En la proteína de guisante también se estudió el efecto de un tratamiento térmico previo. Para esta caracterización, los biopolímeros se equilibraron a distintas humedades relativas, determinándose sus isothermas de sorción de agua.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Se utilizó un aislado de proteína de guisante “Pisane®” (PPI: del inglés Pea Protein Isolate) suministrado por Cosucra Groupe Warcoing, Belgica. Pisane® es extraído de la variedad de guisante amarillo (*Pisum Sativum*) mediante un procedimiento físico. Contiene 90% de proteína.

El quitosano con peso molecular medio y grado de desacetilación >75% fue suministrado por A. Aldrich Chemistry, Ireland.

2.2. Preparación de las disoluciones de proteína de guisante y de quitosano.

Se prepararon disoluciones al 5 % de PPI en agua destilada con proporciones de PPI:Glicerol 100:0 (PPI) y 100:30 (PPI-Gly). El pH de ambas disoluciones fue de 7,50. Para ello se disolvieron 5 gramos de PPI en agua destilada, con la correspondiente proporción de glicerol utilizando un agitador magnético a 700 rpm durante 15 minutos. A una de las disoluciones de proteína de guisante (PPI) se le aplicó un tratamiento térmico (PPI-T) de 80 °C durante 15 minutos.

Las disoluciones al 1 % de quitosano se prepararon disolviendo 1 g de quitosano en agua destilada (98,5 g) con 0,5 g de ácido acético 0,1 M, con incorporación de glicerol en proporciones Quitosano:Glicerol 100:0 (Q) y 100:30 (Q-Gly), agitando constantemente hasta su completa disolución (unas 24 h). El pH de las disoluciones fue de 3,54.

Por otro lado, se preparó una disolución con 10,5 % de proteína de guisante (PPI:Glicerol 100:0) siguiendo el procedimiento de las anteriores. Esta disolución se utilizó para analizar el grado de desnaturalización de la proteína del PPI Pisane®.

2.3. Isotermas de sorción

Las disoluciones de proteína de guisante y de quitosano obtenidas fueron liofilizadas, después de su congelación a -25°C, en un liofilizador (Freezone 4.5, Argentina), durante 24 horas. Posteriormente, los liofilizados se llevaron a una cámara de vacío a -1 bar de presión y 50 °C durante 3 días o hasta peso constante, para obtener muestras de contenido en humedad 0%. Después, éstas se introdujeron en cámaras herméticas con humedad relativa (HR) controlada mediante la presencia de disoluciones sobresaturadas de LiCl, MgCl₂, K₂CO₃, NaBr, KI y NaCl, a 25 °C (± 1 °C), resultando en una humedad relativa de equilibrio de 11,3; 32,8; 43,2; 57,6; 68,9 y 75,3%, respectivamente. Las muestras de proteína de guisante y quitosano a humedad 0% se controlaron en su peso hasta alcanzar peso constante (± 0,05 %). El contenido de humedad de equilibrio se calculó a partir del incremento de masa de las muestras secas después de alcanzar el equilibrio en una determinada humedad relativa. La actividad de agua (a_w) de cada una de las disoluciones saturadas de sal fue calculada como %HR/100. Una vez alcanzado el equilibrio, se consideró que las muestras liofilizadas alcanzaron la misma actividad de agua que la de la disolución saturada de la cámara correspondiente.

Los valores de la isoterma de sorción fueron ajustados a los modelos de Guggenheim–Anderson-de Boer (GAB) (ec. 1) y de Brunauer, Emmett y Teller (B.E.T) (ec. 2).

$$w_e = \frac{w_o \cdot C \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 + (C - 1) \cdot K \cdot a_w)} \quad (1)$$

$$w_e = \frac{w_o \cdot C \cdot a_w}{(1 - a_w) \cdot (1 + (C - 1) \cdot a_w)} \quad (2)$$

donde w_e es el contenido de humedad en base seca para una determinada a_w . w_o corresponde a la llamada humedad de la capa monomolecular, C (ec. 1) es la constante de Guggenheim, K es un factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapas, y C (ec. 2) es una constante característica del material relacionada con el calor desprendido en el proceso de sorción. Los parámetros de la ecuación de GAB y de la ecuación de BET se calcularon en una hoja de cálculo (Excel 2003, Microsoft).

2.4. Calorimetría diferencial de barrido.

Los termogramas de las muestras de proteína de guisante y de quitosano, acondicionadas a diferentes humedades y con o sin glicerol, se obtuvieron con un DSC6200 (Seiko Instrument, USA), tomando como referencia un crisol vacío. El equipo utilizó el programa EXTAR6000 Thermal Analysis Software.

En una primera serie experimental se pesaron aproximadamente 7 mg de muestra en crisoles de acero herméticos, previamente pesados, para evitar la pérdida de agua durante el calentamiento de las muestras. El rango de temperaturas del barrido fue de 20 a 250 °C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Se anotó el peso de la muestra tras el análisis para conocer la pérdida de masa. Las medidas se hicieron por duplicado.

En una segunda serie, se pesaron aproximadamente 7 mg de muestra en crisoles no herméticos de acero previamente pesados, que fueron agujereados con una aguja antes de introducir en el DSC para facilitar la salida del agua de la muestra. En este caso sólo se analizaron las muestras acondicionadas a HR 11, 3%, 43,2% y 75,3%. Una vez que se analizó la muestra se pesó de nuevo para conocer la pérdida de masa. El rango de temperatura del barrido fue de 20 °C a 350 °C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Las medidas se tomaron por duplicado.

Se realizó una tercera serie de experimentos para determinar la temperatura y entalpía de desnaturalización del PPI Pisane®. En este experimento se vertieron 60 µl de disolución de PPI (10,5% p/p) en crisoles de acero herméticos. Se anotó el peso del crisol antes y después de sellarlo con la muestra en su interior para conocer el peso de ésta. La muestra fue calentada en el rango de 30 a 120 °C. El termograma se obtuvo a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La medida se realizó por duplicado.

Finalmente, en una cuarta serie de experimentos, se realizó un doble barrido a 10 °C/min pesando unos 7 mg de muestra de proteína de guisante acondicionada a 11,3 % de HR empleando crisoles no herméticos y agujereados. El primer barrido fue en un rango de calentamiento de 20 a 160 °C; en el segundo barrido se calentó la muestra desde 30 a 240 °C.

2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando Statgraphics 5.1. Para determinar el efecto de los factores a_w , glicerol y tratamiento térmico (éste último en el caso de PPI-T) se realizó un ANOVA factorial con un nivel de confianza de 95,0%. En él se llevó a cabo un contraste múltiple de rangos para detectar las diferencias significativas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se comentan los resultados de los distintos ensayos llevados a cabo en este trabajo.

Le Graaf (2000) expuso que la solubilización/dispersión de la proteína (en polvo) en agua y otros plastificantes podía romper enlaces disulfuro y provocar interrupciones de las interacciones dando lugar a cambios estructurales. Tras verter la disolución en una superficie las moléculas tenderán a ser alargadas. En la etapa final, tras la evaporación de agua, las moléculas pueden llegar a estar más estructuradas produciéndose interacciones (hidrofóbicas, iónicas,) que aumentan la cohesión del material y conlleva la fijación o vitrificación de la muestra por medio de la disminución de la movilidad molecular, por ejemplo mediante la formación de estructuras β -laminar (Le Graaf, 2000). Cabe señalar que el hecho de haber formado films pudo influir en la capacidad de retención de agua porque la adsorción no ocurre solo en la superficie de las cadenas del polímero, sino que también queda agua retenida dentro de la red formada por las cadenas poliméricas (Gochoa et al. 2000).

3.1. Isotermas de sorción

La figura 1 muestra las isotermas de sorción de las muestras PPI, PPI-Gly (ratio 100:30) y PPI tratado térmicamente (PPI-T) (datos experimentales y modelo de GAB ajustado). Los datos de adsorción de humedad de las muestras de fueron ajustados a los modelos de GAB y de BET, cuyos parámetros se dan en las tabla 2. Se observó un mejor ajuste aplicando el modelo de GAB. Las diferencias en el comportamiento de adsorción aumentaron entre los tres materiales conforme se incrementó la a_w . El PPI-T fue el que presentó menor adsorción de humedad en todo el intervalo de actividad de agua estudiado. Esto puede ser debido a que el tratamiento

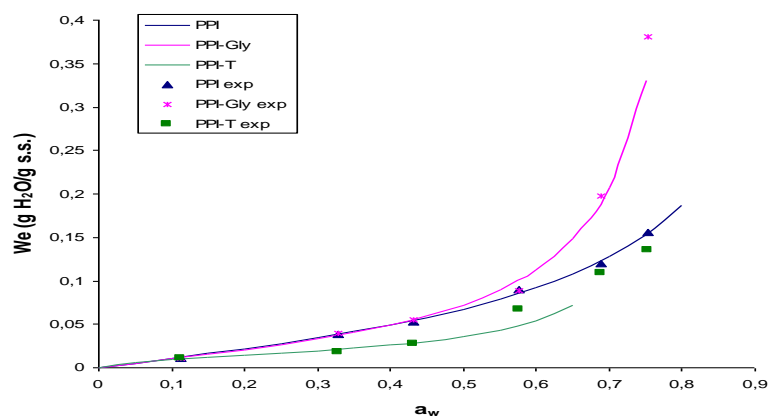


Figura 1. Isotermas de sorción de proteína de guisante (PPI), de la mezcla proteína de guisante-glicerol (PPI:Gly 100:30) y de proteína de guisante tratada térmicamente (PPI-T). Datos experimentales (puntos) y predichos (líneas) mediante la ecuación de GAB.

térmico produce cambios en la estructura terciaria de la proteína, desplegándose la cadena polipeptídica. Así, grupos sulfhídricos internos y cadenas hidrofóbicas internas en la proteína nativa quedan expuestas al exterior (Mohammed et al., 2000). De este modo, se promueven las

interacciones intermoleculares mediante enlaces covalentes S-S, no covalentes (puentes de H) e interacciones hidrofóbicas, resultando en una red proteica de mayor cohesión que puede dejar menos espacio para la adsorción de moléculas de agua. Las muestras de PPI-Glicerol experimentaron un aumento exponencial del contenido de humedad a partir de $a_w = 0,46$. Por debajo de este valor de a_w , la capacidad de retención de agua fue similar a la del PPI. Esto se explica por el nivel de interacciones proteína-agua, glicerol-agua y proteína-glicerol y por el bajo peso molecular y carácter hidrofílico del glicerol. El glicerol es una molécula de bajo peso molecular que penetra fácilmente en la red proteica, dando lugar a una discontinuidad en las interacciones de las cadenas proteicas, en consecuencia se da una mayor difusión de agua en el interior del polímero (Kowalczyk and Baraniak, 2011). Así mismo su presencia favorece las interacciones soluto-solvente con el agua a partir de un nivel de humedad, las cuales permiten la adsorción de grandes cantidades del solvente sin cambios tan grandes en la a_w a partir de un determinado valor de esta variable. A bajas a_w , los efectos solventes no son relevantes y la isoterma de de PPI y PPI-glicerol son por ello muy similares.

La Tabla 2 muestra los parámetros del modelo de BET (ajustado hasta a_w 0,6) y GAB y los coeficientes de determinación (R^2) para las diferentes isotermas analizadas. Los parámetros reflejan una mayor retención de agua en la monocapa (w_0) en el PPI y por otro lado, una mayor energía de adsorción del agua (relacionada con C) en la proteína tratada térmicamente (PPI-T) (Tabla 2). Esto puede ser debido a la mayor cohesión de la red proteica que presentaría el PPI-T por efecto del tratamiento térmico.

En la figura 2 se muestran las isotermas de sorción de quitosano (Q) y de quitosano con glicerol (Q-Gly).

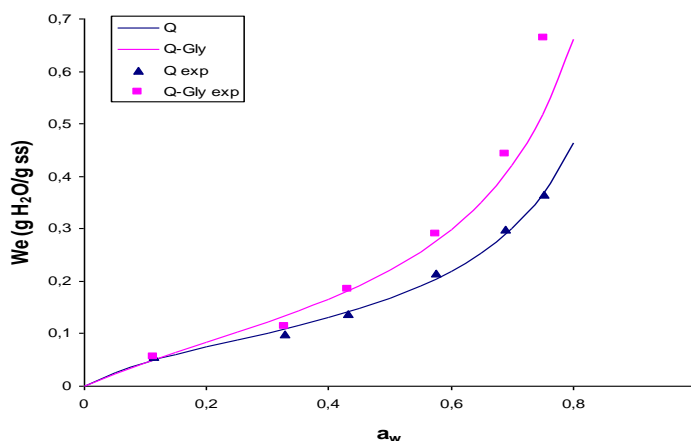


Figura 2. Isotermas de sorción de quitosano (Q) y de la mezcla quitosano-glicerol (Q:Gly 100:30). Datos experimentales (puntos) y predichos (líneas) mediante la ecuación de BET.

La isoterma de quitosano muestra la forma sigmoideal característica de los biopolímeros (Gochoa et al. 2000). Sin embargo, la isoterma de quitosano con glicerol presentó un tramo fuertemente ascendente, coherente con el efecto de los solutos polares de bajo peso molecular y la potenciación de los

efectos solventes del agua. El efecto plastificante del glicerol, que actuaría introduciéndose entre las cadenas de quitosano, obstaculizando la ordenación de sus cadenas en redes cristalinas podría reducir también su grado de cristalinidad, modificando el comportamiento del polímero a la adsorción de agua. Esto explica las diferencias en el contenido de humedad entre ambas muestras que se agudiza al aumentar a_w , y potenciarse los efectos solventes.

Los parámetros del ajuste de las isothermas (Tabla 2) reflejan una mayor retención de agua en la monocapa (w_0) en el quitosano con glicerol y una mayor energía de adsorción del agua (relacionada con C) en el quitosano.

Tabla 2. Parámetros del modelo de BET y GAB y coeficientes de determinación (R^2) para las diferentes muestras.

	Q	Q-Gly	PPI	PPI-Gly	PPI-T
BET (*)					
w_0	0,096	0,141	0,052	0,053	0,017
C	6,624	3,566	1,876	1,888	9,345
R^2	0,946	0,837	0,944	0,940	0,912 (**)
GAB					
w_0	0,083	0,103	0,057	0,038	0,015
C	10,134	5,860	2,006	2,299	8,781
K	1,054	1,138	0,920	1,190	1,240
R^2	0,903	0,915	0,984	0,977	0,818

(*) Ajustado hasta a_w 0,6

(**) Ajustado hasta a_w 0,43

Las isothermas obtenidas permite conocer la diferente afinidad de los polímeros (con o sin glicerol) por el agua y la cantidad de agua que ligan para una determinada humedad relativa, lo que ayuda a justificar la mayor o menor movilidad del biopolímero y por tanto entender mejor el comportamiento térmico.

3.2. Transiciones de fase en proteína de guisante

El análisis de proteína de guisante mediante DSC mostró un primer pico endotermo comprendido entre 59 y 80 °C. La tabla 3 muestra los resultados obtenidos para el PPI para el primer pico endotérmico, considerado como de desnaturalización de la proteína. Existen diferencias significativas entre las temperaturas de transición de fase en función del nivel de a_w ($p < 0,05$). Puede observarse el incremento de la temperatura de transición de fase con el aumento de humedad. Cabría esperar el mismo efecto con la entalpía de este proceso, sin embargo disminuyó a partir de valores de a_w comprendidos entre 0,576 y 0,689. La causa de esto podría ser que al aumentar el contenido en humedad de la muestra el segundo endotermo registrado tendía a disminuir su temperatura de inicio, aproximándose al primero y enmascarándolo parcialmente por lo que hay mayor error en la integración, al no recuperar el termograma la línea base al finalizar el primer endotermo.

Tabla 3. Temperatura y entalpía del primer pico endotermo registrado mediante DSC para el PPI.

a_w	T (°C)	ΔH (J/g muestra)
0,113	59,00 ^a	--
0,328	64,40±0,78 ^b	--
0,432	66,53±0,17 ^b	1,5±0,13
0,576	69,37±0,57 ^c	2,1±0,3
0,689	77,73±0,58 ^d	1,5±0,5
0,753	76,63±3,30 ^d	1,00±0,01

a, b, c, d: Representan las diferencias significativas entre grupos.

En el PPI-Gly y PPI-T sólo se registró esta transición de fase en algunas de las muestras, predominando la no aparición del endotermo. Este primer endotermo puede interpretarse como el resultado de la agregación de cadenas peptídicas, que ya de por sí se encuentran formando una red. No obstante, varios autores han mostrado que la temperatura de desnaturalización de las proteínas disminuye con el aumento de humedad (Navarrete et al. 1998; Le Graaf, 2000; Bengoechea et al. 2007), lo cual no se observa en los resultados obtenidos. No obstante, esto podría también atribuirse al solapamiento parcial creciente con el endotermo de vaporización del agua, que puede provocar el desplazamiento del pico.

Por otro lado, algunos autores han demostrado que los aislados de proteína de guisante comerciales pueden presentar una desnaturalización parcial o completa de los principales tipos de proteínas de dicho producto (Shand et al. ,2007; Sun y Arntfield, 2010). Así pues, en este trabajo se llevó a cabo un ensayo para determinar el grado de desnaturalización de las proteínas del PPI Pisane® procediendo según la metodología llevada a cabo por Sun y Arntfield (2010). Se observaron cuatro diferentes picos endotermos entorno 68; 78,5; 84 y 90 °C y pequeños valores de entalpía (0,286; 4,638; 4,333 y 3,905 J/g proteína, respectivamente) (Figura 3). Sun y Arntfield (2010) observaron un pico endotermo a 67 °C y lo relacionaron con la transición de

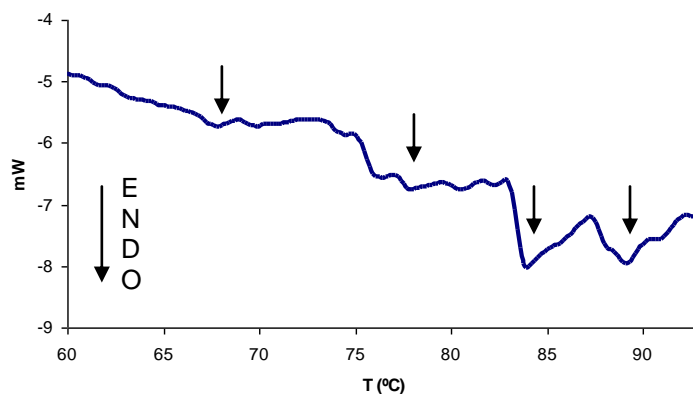


Figura 3. Termograma DSC de Pisane®. Las flechas indican los picos endotérmicos señalados.

fase de fibra o gelatinización del almidón, ya que con sus investigaciones concluyeron que los aislados comerciales de proteína de guisante podían tener una fracción de almidón residual que gelatinizaría entorno a dicha temperatura. Los otros dos endotermos pueden corresponder a la desnaturalización de globulinas (11S y 7S). La entalpía de desnaturalización observada en el trabajo de Sun y Arntfield (2010) en proteína de guisante, extraída mediante un procedimiento especial, fue de 15,81 J/g proteína, por lo que se concluye que el PPI utilizado en este trabajo presenta un grado de desnaturalización parcial. Los procesos industriales de obtención de aislados de proteína de guisante tienden a formar productos ricos en globulinas, por lo que la heterogeneidad en leguminas y vicilinas podría explicar la variación en la temperatura de desnaturalización y los múltiples endotermos (Sun y Arntfield, 2010). Todos estos aspectos conducen a pensar que el primer endotermino registrado en las muestras equilibradas a distintas humedades relativas no se debe a la mera desnaturalización de las proteínas, sino a la agregación de las cadenas proteicas mediante interacciones hidrófobas favorecidas a menor contenido de humedad, las cuales se intensifican a mayores temperaturas. Esto explicaría también el aumento de la temperatura del pico de la transición de fase con el incremento en humedad. Como se comentó al principio de este epígrafe, el procedimiento aplicado para obtener las muestras provoca cambios en la estructura de las proteínas. La liofilización de las disoluciones dio lugar a la formación de films, por lo que las muestras presentarían una red semi-estructurada de proteínas (desnaturalizadas y nativas). En la rehidratación de las muestras, las moléculas de agua, en primer lugar, se adsorben a los grupos polares de la superficie de la proteína. Conforme mayor es el contenido en humedad, otra parte de las moléculas de agua quedarían retenidas en los espacios de la red proteica, lo cual dificultaría la interacción entre grupos hidrófobos.

En el caso de las muestras PPI-Gly, la ausencia de este endotermino podría ser debida a que el glicerol dificulta el establecimiento de estas interacciones por situarse entre los huecos de las cadenas. Finalmente, en el PPI-T, el tratamiento térmico provoca la desnaturalización de las proteínas, por consiguiente ocurre el desplegamiento de la proteína favoreciendo las interacciones (hidrofóbicas, iónicas, puentes de hidrogeno, Van der Waals, puentes disulfuro). En esta situación el calentamiento en el calorímetro no induce nuevas interacciones en la red proteica con un mayor grado de agregación que en el PPI, por lo que no se observa dicha transición.

La figura 4 muestra las transiciones de fase detectadas en PPI, PPI-Gly y PPI-T acondicionadas a humedades relativas de 11,3; 43,2 y 75,3 % y analizadas en crisoles no herméticos. En este caso no se pudo detectar el primer endotermino asignado a la agregación de las cadenas proteicas debido a la gran magnitud del endotermino de vaporización del agua que enmascara al anterior. La primera transición de fase registrada corresponde precisamente a esta vaporización, con un amplio endotermino comprendido entre los 70 y 140 °C (endotermino 1). Para demostrarlo, se realizó un segundo barrido a una muestra de PPI con $a_w=0,113$ (muestra j en figura 4),

reflejándose la desaparición del endotermo de vaporización, al haberse eliminado el agua de la muestra en el primer barrido.

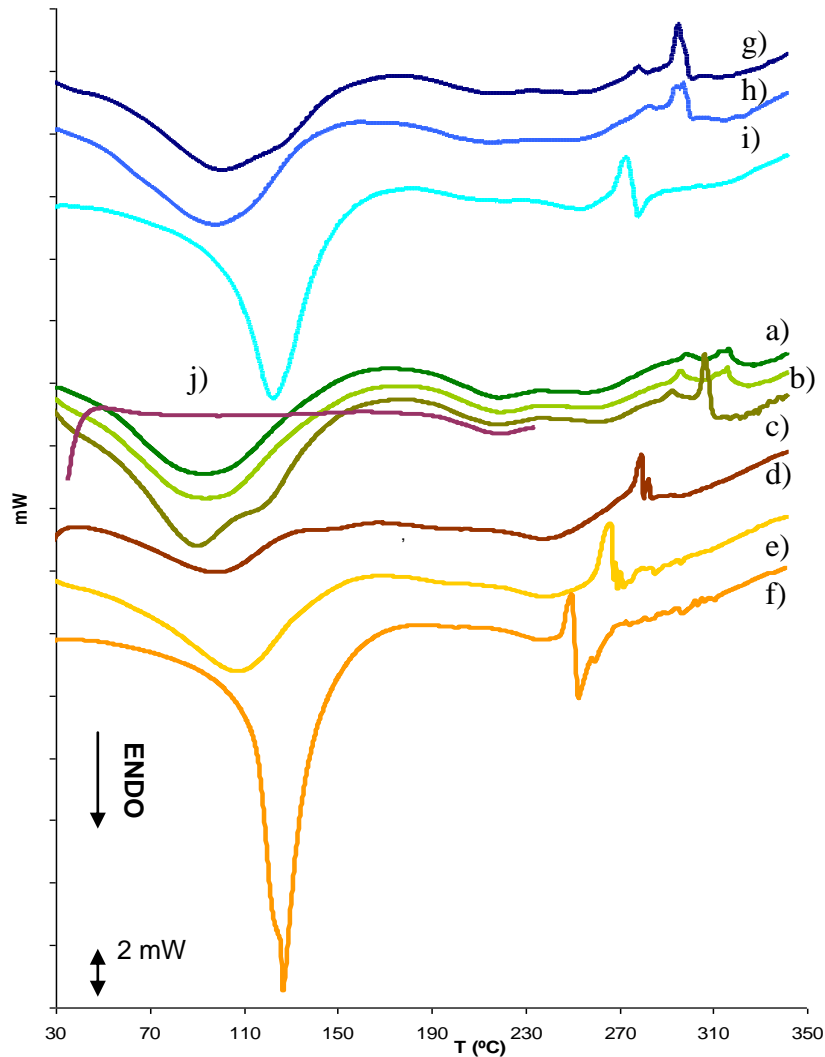


Figura 4. Termogramas DSC en crisoles no herméticos de a) PPI $a_w=0,113$; b) PPI $a_w=0,432$; c) PPI $a_w=0,753$; d) PPI-Gly $a_w=0,113$; e) PPI-Gly $a_w=0,432$; f) PPI-Gly $a_w=0,753$; g) PPI-T $a_w=0,113$; h) PPI-T $a_w=0,432$; i) PPI-T $a_w=0,753$ y j) 2º barrido en PPI $a_w=0,113$.

La tabla 4 da los valores de la temperatura de los picos y la entalpía de los endotermos observados en la figura 4. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la temperatura del pico del primer endotermo de las muestras de PPI-Gly y PPI-T con $a_w=0,753$ respecto al resto de muestras. Esta diferencia podría ser debida a la gran presión generada en el interior de los crisoles por la acumulación de vapor de agua, al tener estas muestras un mayor contenido en humedad y, sobre todo, al efecto de acoplamiento de la velocidad de evaporación con la velocidad de calentamiento de la muestra, que puede comportar desplazamientos del pico. La entalpía por gramo de muestra aumentó con el incremento en

humedad del material (p -valor $<0,05$) debido al mayor contenido en agua y a su mayor vaporización. La entalpía de esta transición en PPI-Gly y PPI-T fue menor (p -valor $< 0,05$) respecto a la de PPI. Esto podría ser debido en el primer caso al efecto del soluto (glicerol) que eleva la temperatura de evaporación del agua, reduciéndose su calor de vaporización. En el segundo caso, los menores valores de entalpía pueden relacionarse el menor contenido en agua de las muestras para una determinada a_w , como se observa en las isotermas de sorción.

La segunda transición registrada en las muestras de la figura 4 corresponde a un pequeño endoterma que abarcaba entre 200 y 230 °C, estando el pico del endoterma entorno a los 219 °C. Este endoterma podría asignarse a la fusión del polímero, que no mostró diferencias significativas entre los distintos niveles de a_w para cada tipo de muestra. No obstante, se observaron diferencias significativas ($p <0,05$) entre PPI, PPI-Gly y PPI-T. El PPI-T mostró una menor entalpía lo que podría ser debido a la diferente estructura alcanzada en la red polimérica cuando las proteínas han sido desnaturalizadas. En el PPI-Gly no se observó tal endoterma sino la aparición de un salto en el calor específico de la muestra, atribuible a una transición vítrea en el material. Esta transición ocurre en las muestras PPI-Gly entorno a 190 °C (T_g) (figura 5) y supondría también el ablandamiento del biopolímero. La presencia de glicerol limita las interacciones entre cadenas de proteína, dificultando la ordenación semicristalina de la matriz por lo que el material presenta solo transición vítrea. Braüer et al. (2007) mostró que para conseguir una efectiva reducción del punto de ablandamiento de proteínas vegetales es necesario la adición de al menos un 50% de glicerol. Sin embargo, aquí se observa que para un contenido en glicerol de 30% se consigue reducir el punto de ablandamiento de proteína de guisante a niveles de temperatura adecuados para el procesado mediante extrusión.

Tabla 4. Transiciones de fase detectadas en PPI, PPI-Gly y PPI-T acondicionadas a diferentes humedades relativas: 11,3; 43,2 y 75,3% (Temperatura del pico y entalpía). También se muestra la pérdida de masa total (ΔM %) tras el barrido hasta 350°C.

Polímero	endoterma 1		endoterma 2		ΔM (%)
	T (°C)	ΔH (J/g muestra)	T (°C)	ΔH (J/g muestra)	
PPI 11	90,65±6,57 ^a	173,28±20,55	218,95±1,27	8,94±1,29 ^d	-46,22±3,59
PPI 43	95,15±3,43 ^a	192,27±19,98	220,15±0,1	8,4±0,55 ^d	-44,59±0,96
PPI 75	91,9±2,16 ^a	272,2±2,34	218,7±0,59	9,43±0,63 ^d	-48,64±0,28
PPI-Gly 11	99,15±0,69 ^b	82,34±34,90	--	--	-51,78±2,15
PPI-Gly 43	107,8±0,98 ^b	163,09±35,21	--	--	-53,68±0,94
PPI-Gly 75	138±21,56 ^c	258,51±24,29	--	--	-60,59±1,87
PPI-T 11	103,2±4,31 ^b	157,46±2,11	216,35±3,04	5,24±0,29 ^e	-45,17±1,1
PPI-T 43	99,65±1,27 ^b	148,69±10,92	217,5±1,96	5,96±0,5 ^e	-45,44±0,54
PPI-T 75	127,2±5,78 ^c	222,54±6,10	217,6±2,16	3,19±0,02 ^e	-50,01±0,54

^{a, b, c, d, e} Representan diferencias significativas.

No se detectó transición vítrea en PPI y PPI-T, lo que podría justificarse por la mayor interacción entre las cadenas del biopolímero, aunque esta

podría estar solapada con el endotermino de fusión, a mayor temperatura, ocurriendo a la vez el ablandamiento de la fracción cristalina y amorfa del material. Bengoechea et al. (2007) demostraron que las interacciones que contribuyen a una menor movilidad del polímero, como la cristalización, presencia de estructura secundaria (β -lamina, α -hélice), uniones covalentes (puentes disulfuro) y otras interacciones no covalentes, pueden dar lugar a mayores valores de T_g .

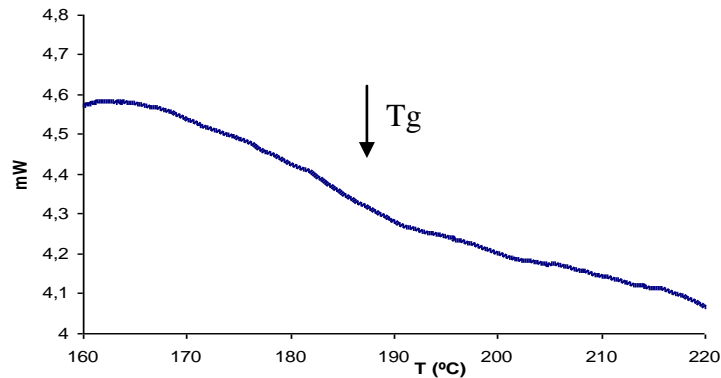


Figura 5. Termograma DSC de PPI-Gly con $a_w=0,432$.

La siguiente transición térmica observada corresponde a un exotermo, que en la mayoría de los casos presenta varios picos consecutivos entre 300-320 °C y estaría relacionado con la descomposición de la proteína de guisante. No se observaron diferencias significativas en la temperatura de descomposición de de PPI y PPI-T, excepto para la muestra de PPI-T con $a_w=0,753$ que mostró el pico exotermo a 273 °C seguido de un pequeño endotermino. La aparición de varios picos en la transición, incluso endotermos, está relacionada con la complejidad de los fenómenos de descomposición térmica, con liberación de agua y gases. El PPI-Gly mostró los picos exotermos a 280, 267 y 250 °C para las muestras acondicionadas a a_w de 0,113; 0,432 y 0,753; respectivamente. Este efecto conduce a pensar que la mayor movilidad molecular otorgada por el glicerol y el mayor contenido en humedad facilitan la descomposición de la proteína de guisante. No obstante, en todos los casos la temperatura ablandamiento (fusión o transición vítrea) es inferior a la temperatura de descomposición, lo que demuestra las aptitudes de la PPI para el termoformado.

3.3. Transiciones de fase en quitosano

El análisis DSC mostró un primer endotermino entorno 120 – 140 °C debido a la eliminación de agua libre (Kittur et al., 2002) (Figura 6). Las muestras de quitosano (Q) y de quitosano con glicerol (Q-Gly) presentaron también un pico endotermino alrededor de 255 °C. La entalpía de este endotermino fue significativamente menor ($p<0,05$) en las muestras con $a_w=0,753$. Este pico podría ser debido a la desacetilación del quitosano, según apuntan Almeida et al. (2010). Se detectó un pico exotermo cerca de 300 °C que podría ser debido a la descomposición de las cadenas de quitosano. Almeida et al. (2010) observaron en films de quitosano ambos picos de desacetilación y

descomposición a 225 y 275 °C respectivamente. La causa de las diferencias puede estar en que las propiedades térmicas de quitosano dependen del grado de acetilación, cristalinidad y peso molecular medio.

En la tabla 5 puede observarse que la entalpía de eliminación del agua libre aumentó, lógicamente, cuanto mayor fue la humedad de la muestra. La entalpía de este proceso fue mayor ($p < 0,05$) para las muestras de quitosano que para las que contienen glicerol, a pesar del mayor contenido en humedad de estas últimas, a una determinada a_w . Esto podría ser debido a un menor valor de la entalpía de sorción en estas últimas, ya que el agua retenida por efectos solventes en las moléculas de bajo peso molecular tiene un valor del calor neto de sorción prácticamente cero. No se detectó transición vítrea en ninguna de las muestras.

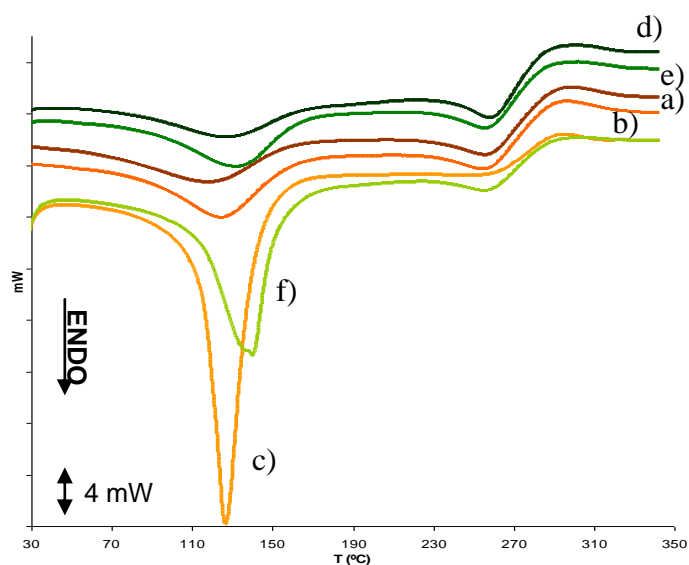


Figura 6. Termogramas DSC de a) Q $a_w=0,113$; b) Q $a_w=0,432$; c) Q $a_w=0,753$; d) Q-Gly $a_w=0,113$; e) Q-Gly $a_w=0,432$; f) Q-Gly $a_w=0,753$.

Tabla 5. Transiciones de fase (temperatura del pico y entalpía) detectadas en las muestras Q y Q-Gly acondicionadas a diferentes humedades relativas: 11,3; 43,2 y 75,3%. También se muestra la pérdida de masa total (ΔM %) tras el barrido hasta 350°C.

Biopolímero	endotermo1		endotermo2		exotermo	
	T (°C)	ΔH (J/g muestra)	T (°C)	ΔH (J/g muestra)	T (°C)	ΔM (%)
Q 11	118,65±1,47	158,29±10,54	254,45±2,25	21,36±0,99 ^a	298,45±1,27	-61,69±2,1
Q 43	124,50±0,0	198,21±0,19	255,35±1,27	20,63±1,88 ^a	297,5±1,37	-62,34±0,26
Q 75	127,2±0,39	504,39±23,61	246,9±1,37	1,09±0,54 ^b	295,2±1,18	-62,52±1,26
Q-Gly 11	130,5±7,64	134,1±11,1	258,10±0,0	21,56±0,87 ^a	301,25±1,27	-64,46±0,44
Q-Gly 43	134,5±3,53	186,28±14,12	255,65±0,69	20,8±1,88 ^a	302,7±1,57	-64,71±1
Q-Gly 75	129,1±21,76	343,93±28,02	252,65±6,37	8,45±8,89 ^b	300,05±7,74	-70,25±1,29

^{a, b} muestran diferencias significativas

4. CONCLUSIONES

El quitosano presenta una mayor capacidad de sorción de agua que el PPI debido a su carga positiva que le confiere un fuerte carácter hidrofílico. La incorporación de glicerol en ambos polímeros incrementó esta capacidad de sorción a partir de un valor dado de actividad del agua (menor en el quitosano) al potenciar el espaciado entre cadenas de polímero y los efectos solventes con el agua. El proceso de desnaturalización de PPI supuso una reducción en su capacidad para adsorber agua probablemente por el mayor grado de agregación de las cadenas que reduce el número de puntos activos para la adsorción en mono y multicapas. En proteína de guisante se observaron transiciones de fase endotérmicas relacionadas con la desnaturalización/agregación de las cadenas poliméricas, la eliminación de agua libre, fusión y la descomposición de la proteína (exotermo). En presencia de glicerol, la matriz no mostró fusión sino transición vítrea a una temperatura algo más baja. En quitosano las transiciones de fase observadas correspondieron a la eliminación de agua libre, la desacetilación y la descomposición del quitosano. En la proteína de guisante se consigue el ablandamiento antes de descomposición térmica de la proteína lo que permitiría su termoformado y aplicación en procesos de extrusión. En el quitosano no fue posible confirmar si se produce la fusión del polímero antes de su descomposición por lo que habría que recurrir al análisis termomecánico para comprobar su ablandamiento a temperaturas del orden de 225°C, a la cual se ha asignado por otros autores la desacetilación.

5. REFERENCIAS

- Almeida, E.V.R., Frollini, E., Castellan, A., Coma, V. 2010. Chitosan, sisal cellulose, and biocomposite chitosan/sisal cellulose films prepared from thiourea/NaOH aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 80, 655 – 664.
- Bengochea, C., Arrachidb, A., Guerreroa, A., Hillb, S. E., Mitchellb, J. R. 2007. Relationship between the glass transition temperature and the melt flow behavior for gluten, casein and soya. *Journal of Cereal Science*, 45, 275 – 284.
- Braüer, S., Meister, F., Gottlöber, R.-P., Nechwatal, A. 2007. Preparation and Thermoplastic Processing of Modified Plant Proteins. *Macromolecular Materials and Engineering*, 292, 176 – 183.
- Chiono, V., Vozzi, G., D'Acunto, M., Brinzi, S., Domenici, C., Vozzi, F., Ahluwalia, A., Barbani, N., Giusti, P., Ciardelli, P. 2009. Characterisation of blends between poly(ϵ caprolactone) and polysaccharides for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 29, 2174 – 2187.
- Choi, W. S. y Han, J. H. 2001. Physical and Mechanical Properties of Pea-Protein-based Edible Films. *Journal of Food Science*, 66, 319 – 322.
- Commission Directive 2007/68/EC of 27 November 2007 amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients. *Official Journal of the European Union*: L 310/11. Disponible en: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:310:0011:0014:EN:P DF>>. [Consulta: 25 Agosto 2011].
- De Graaf, L. A. 2000. Denaturation of proteins from a non-food perspective. *Journal of Biotechnology*, 79, 299 – 306.
- Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and

- repealing Council Directive 90/220/EEC. Official Journal of the European Communities: L 106/1. Disponible en: <<http://www.eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:106:0001:0038:EN:PDF>>. [Consulta: 25 Agosto 2011].
- FAOSTAT, 2010. Disponible en: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. [Consulta: 25 Agosto 2011].
- Gocho, H., Shimizu, H., Tanioka, A., Chou, T.-J., Nakajima, T. 2000. Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 41, 87 – 90.
- Gómez-Villalba, E. 2005. Transformación y mejora del valor nutritivo de la harina de guisante mediante la adición de enzima fitasa. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Gueguen, J., Viroben, G., Noireaux, P., Subirade, M. 1998. Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins. *Industrial Crops and Products*, 7, 149–157.
- Kittur, F.S., prashanth, K.V.H., Sankar, K.U., Tharanathan, R.N. 2002. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 49, 185 – 193.
- Kowalczyk, D., Baraniak, B. 2011. Effects of plasticizers, pH and heating of film-forming solution on the properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Engineering*, 105, 295 – 305.
- Kumar, R., Choudhary, V., Mishra, S., Varma, I.K. Mattiason, B., 2002. Adhesives and plastics based on soy protein products. *Industrial Crops and Products*, 16, 155 – 172.
- Lewandowska, K. 2009. Miscibility and thermal stability of poly(vinyl alcohol)/chitosan mixtures. *Thermochimica Acta*, 493, 42 – 48.
- Martínez-Camacho, A.P., Cortez-Rocha, M.O., Ezquerra-Brauer, J.M., Graciano-Verdugo, A.Z., Rodríguez-Félix, A.Z., Castillo-Ortega, M.M., Yépiz-Gómez, M.S., Plascencia-Jatomea, M. 2010. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82, 305 – 315.
- Martinez-Navarrete, N., Andrés, A. M., Chiralt, A., Fito, P. 1998. Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno. Ed. U.P.V.
- Mohammed, Z.H., Hill, S.E., Mitchell, J.R., 2000. Covalent crosslinking in heated protein systems. *J. Food Sci.* 65, 221–226.
- Mucha, M., Pawlak, A. 2005. Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta*, 427, 69 – 76.
- Neto, C.G.T., Giacometti, J.A., Job, A.E., Ferreira, F.C., Fonseca, J.L.C., Pereira, M.R. 2005. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydrate Polymers*, 62, 97 – 103.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F., Rigal, L. 2003. Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Industrial Crops and Products*, 18, 91 – 100.
- Ratto, J., Hatakeyama, T., & Blumstein, R. B. 1995. Differential scanning calorimetry investigation of phase transition in water/chitosan systems. *Polymer*, 36, 2915–2919.
- Sakurai, K., Maegawa, T., Takahashi, T. 2000. Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. *Polymer*, 41, 7051 – 7056.
- Shand, P.J., Ya, H., Pietrasik, Z., Wanasundara, P.K.J.P.D. 2007. Physicochemical and textural properties of heat induced pea protein isolate gels. *Food Chemistry*, 102, 1119–1130.
- Sun, S., Song, Y., Zheng, Q. 2007. Morphologies and properties of thermo-molded biodegradable plastics based on glycerol-plasticized wheat gluten. *Food Hydrocolloids*, 21, 1005 – 1013.
- Sun, S., Song, Y., Zheng, Q. 2008. Thermo-molded wheat gluten plastics plasticized with glycerol: Effect of molding temperature. *Food Hydrocolloids*, 22, 1006 – 1013.
- Sun, X. D., Arntfield, S. D. 2010. Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat treatment. *Food Research International*, 43, 509 – 515.
- Verbeek, C. J. R., Van den Berg, L. E. 2010. Extrusion Processing and Properties of Protein-Based Thermoplastics. *Macromolecular Materials and Engineering*, 295, 10 – 21.
- Viroben, G., Barbot, J., Mouloungui, Z., Guéguen, J. 2000. Preparation and Characterization of Films from Pea Protein. [Journal of Agricultural and Food Chemistry](#), 48, 1064 – 1069.