

ESTUDIO DE LOS LIPIDOS POLARES DE LOS AISLADOS PROTEINICOS DEL GIRASOL

F. MILLAN, E. VIOQUE y M.P. de la MAZA*

INTRODUCCION

El desarrollo creciente de modernas tecnologías ha originado la aparición en el mercado de nuevos tipos de productos alimenticios a base de concentrados y aislados proteínicos obtenidos a partir de harinas desengrasadas de semillas oleaginosas. De entre las más utilizadas, con gran diferencia, se encuentra la harina de semilla de soja de la cual se obtienen muy diversos preparados de uso normal en el mercado.

El girasol ocupa actualmente en el mercado el segundo lugar entre las semillas productoras de aceite y su cultivo en España tiene un valor económico e industrial indudable. Por ello hemos creído de especial interés el profundizar en el estudio de las posibilidades de aprovechamiento de los residuos de extracción del aceite de la semilla de girasol para la obtención de aislados proteínicos de posible utilización como complemento en diferentes tipos de alimentos.

Conocido es el papel que las grasas altamente insaturadas juegan en la inestabilidad de los alimentos que las contienen, aún presentes en pequeña cantidad. Es lógico pensar que los aislados proteínicos obtenidos a partir de las semillas oleaginosas incluyan entre sus componentes no proteínicos sustancias lipídicas de distinta naturaleza.

La autoxidación de los lípidos insaturados produce distintos intermediarios químicamente activos: radicales libres, hidroperóxidos, epoxicompuestos, compuestos carbónicos, etc. Estos intermediarios, altamente reactivos por su parte, son capaces de reaccionar con uno o más grupos funcionales presentes en las moléculas de las proteínas.

* Instituto de la Grasa y sus Derivados, Sevilla, España.

Como consecuencia, es de esperar una variedad de reacciones entre las proteínas y los productos de degradación de los lípidos autooxidados bajo condiciones apropiadas y que en la mayoría de los casos producirán en los productos alimenticios efectos indeseables.

El objetivo fundamental de nuestras investigaciones es el estudio de las posibles alteraciones que se puedan producir en las proteínas contenidas en los aislados obtenidos de la harina desengrasada de semillas de girasol como consecuencia de las interacciones de aquellas con productos lipídicos alterados.

El conocimiento previo de los lípidos presentes en aquellos aislados es absolutamente necesario.

La presente comunicación incluye el estudio, desde un punto de vista tanto cualitativo como cuantitativo, de los lípidos polares, glucolípidos y fosfolípidos, de los aislados mencionados.

AISLADOS PROTEINICOS Y SUS CARACTERISTICAS

El material de partida utilizado para todo el trabajo desarrollado consiste en harina desengrasada de semillas de girasol, parcialmente descascarillada, procedente de la industria.

Se han estudiado, desde el punto de vista de los lípidos polares, tanto el producto original (10), como los dos tipos siguientes de aislados proteicos:

Aislado proteínico Tipo IA: Este aislado fue obtenido utilizando solución acuosa de hidróxido sódico al 0,2%. La relación de harina a solución alcalina en la primera extracción fue de 1:10. Después de agitación mecánica, durante una hora, se centrifuga y el residuo es extraído del mismo modo con solución alcalina en la relación 1:5. Tras nueva centrifugación el residuo es extraído de nuevo. Los sobrenadantes de las tres extracciones se reúnen y se obtiene el aislado proteínico mediante precipitación con ácido clorhídrico 1N al punto isoeléctrico, determinado previamente, pH 4.3.

El aislado obtenido se lava tres veces con aproximadamente cinco veces su volumen de agua a pH 4.3. Después de filtrar en un büchner el aislado es secado al aire durante una noche y a continuación en estufa de vacío y a 50°C de temperatura. El color del aislado es pardo muy oscuro.

Aislado proteínico Tipo II: La diferencia entre este tipo de aislado y el anterior consiste en que las extracciones alcalinas se llevan a

cabo con solución acuosa de sulfito sódico al 0.25%, a pH 11.0. Asimismo el aislado final se lava sucesivamente con agua a pH 4.3, etanol del 98% y acetona. Finalmente el aislado es secado al aire y estufa de vacío a 50° C. El color del producto obtenido es crema claro.

La presencia del sulfito sódico en la solución alcalina de extracción impide la oxidación de los compuestos fenólicos, principalmente ácido clorogénico, presentes en la harina de girasol. Caso contrario los productos quinónicos formados en la oxidación alcalina de aquellos compuestos se asocian a las proteínas, de un modo irreversible, dando complejos de color verde oscuro.

ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS LÍPIDOS

Aunque el interés del presente trabajo se centra en el estudio de los lípidos asociados, se han obtenido, al mismo tiempo, los *lípidos libres*, para determinar su porcentaje y estudiarlos cualitativamente. Estos lípidos se obtienen por tratamiento con hexano, a temperatura ambiente, del aislado mediante agitación durante seis horas. El extracto llevado a sequedad es pesado y llevado a solución para su análisis. Los *lípidos asociados* se obtienen por tratamiento a temperatura ambiente de los aislados con etanol, del 86%, durante 32 horas y con agitación continua. El extracto, llevado a sequedad se pesa y disuelve en cloroformo lavándolo con solución salina al 0,5%, para la eliminación de las sales minerales. El extracto se evapora hasta un volumen de aproximadamente un tercio del original con lo que los proteolípidos se precipitan y separan por filtración. Eliminado el disolvente, el residuo, una vez pesado, se disuelve en un volumen determinado de cloroformo. Esta solución es utilizada en todas las determinaciones cualy cuantitativas indicadas en lo sucesivo.

Los resultados obtenidos, tanto del material de partida como de los dos tipos de aislados proteínicos indicados, se reúnen en la Tabla 1.

TABLA 1

Muestra	Lípidos libres (%)	Lípidos asociados (%)
IO	0,04	1,04
IA	0,04	0,36
II	0,02	0,04

El análisis cualitativo de los lípidos libres y asociados es similar respecto a sus componentes. Los resultados que se describen a continuación se refieren a los lípidos asociados.

SEPARACION PREVIA DE LOS DISTINTOS TIPOS DE COMPONENTES

Se lleva a cabo mediante una cromatografía en columna (2 x 23 cm.) de Florisil, lavado al ácido según Carroll (1), de 80-100 mallas. La solución de los lípidos en cloroformo introducida en la columna se desarrolla con distintos solventes obteniéndose los tipos de compuestos que se indican a continuación (Tabla 2):

TABLA 2

Fracción	Solvente	Tipo de compuesto eluido
1	Cloroformo	Lípidos neutros
2	Cloroformo:Acetona (1:1)	Glucolípidos
3	Metanol	Fosfolípidos

El objeto del presente trabajo es el estudio de las dos fracciones últimas obtenidas, es decir los lípidos polares, glucolípidos y fosfolípidos.

GLUCOLIPIDOS

Dos tipos de glucolípidos se obtienen en la fracción 2 de la columna de Florisil: Esterol glucósidos esterificados y esterol glucósidos.

La identificación de los *esterol glucósidos* se basa en los siguientes ensayos:

1. Por cromatografía en capa fina, de gel de sílice G, y desarrollando con la mezcla cloroformo-metanol-amoniaco (7N) en la relación 100:15:2, revelando mediante rociado con ácido sulfúrico al 50% y calentando a unos 250° C. Simultáneamente se cromatografía una muestra patrón de esterol glucósido obtenido de la patata siguiendo el método indicado por Lepage (2). Estos compuestos dan un color rojo-violáceo durante el calentamiento antes de pasar a negro.

2. Mediante hidrólisis ácida, según el método de Lepage (2),

obteniéndose esteroides libres, identificados mediante cromatografía en capa fina y patrones, así como azúcares. La determinación cuantitativa de los esteroides y azúcares se lleva a cabo por cromatografía gaseosa, previa la inyección de patrones conocidos.

Esteroides: Los esteroides encontrados y su proporción relativa en las distintas muestras se incluyen en la Tabla 3.

TABLA 3

Esteroides de los Esterol Glucósidos (%)

Muestra	Colesterol	Brassicasterol	Campesterol	Estigmaterol	Beta-Sitosterol
IO	6,0	3,4	—	8,6	82,6
IA	3,5	3,2	6,8	7,6	78,8
II	19,4	—	2,1	—	73,1

La muestra II acusa también la presencia, entre sus componentes esteroides, de un 5,4% de delta 7- estigmasterol.

Azúcares: Los azúcares, aislados del hidrolizado mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice G, se transforman en sus respectivos alditoles para eliminar la aparición de varios picos de enantiomorfos de los azúcares en el cromatograma. Los azúcares identificados y sus proporciones relativas se indican en la Tabla 4.

TABLA 4

Azúcares de los Esterol Glucósidos (%)

Muestra	Xilosa	Galactosa	Glucosa	Isositol
IA	0,1	6,8	38,7	54,6
II	6,5	30,1	12,4	51,1

La identificación de los *Esterol Glucósidos Esterificados* se lleva a cabo de un modo similar a la de los esteroides glucósidos con la diferencia de que en la hidrólisis ácida de aquellos aparecen ácidos grasos libres junto a los esteroides y azúcares.

Las Tablas 5 y 6 incluyen la composición de los esteroides y azúcares obtenidos en la hidrólisis de aquellos compuestos.

TABLA 5

Esteroles de los Esterol Glucósidos Esterificados (%)

Muestra	Colesterol	Campesterol	estigmasterol	Beta-Sitosterol	Delta 7-Avenasterol
IO	18,3	—	3,6	78,1	—
IA	6,0	1,1	—	53,8	39,1
II	—	—	34,8	28,3	36,8

TABLA 6

Azúcares de los Esterol Glucósido Esterificados (%)

Muestra	Xilosa	Galactosa	Glucosa	Inositol
IA	0,4	15,6	47,3	37,0
II	15,9	18,9	37,4	27,8

Los ácidos grasos, analizados por cromatografía gaseosa, muestran una gran diferencia en insaturación en la muestra original (IO) y los aislados del tipo IA con respecto a los del aislado tipo II como se pone de manifiesto en el resumen que se incluye en la Tabla 7.

TABLA 7

Acidos Grasos de los Esterol Glucósido Esterificados

%	IO	IA	II
Saturados	55,2	53,0	97,0
Insaturados	44,8	47,0	3,0

FOSFOLIPIDOS

Los fosfolípidos, eluidos de la columna de Florisil con metanol, son identificados mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice G, con el líquido de desarrollo Butanol normal- Acido acético-Agua, en las proporciones 40: 7: 32, y el uso simultáneo de patrones. Los fosfolípidos se revelan con el reactivo de Vaskovsky (3) dando manchas azules sobre un fondo blanco. Posterior identificación se logra mediante hidrólisis con ácido clorhídrico 1,7N en metanol, e

identificación de los restos nitrogenados liberados (etanolamina, colina y serina).

Los fosfolípidos presentes en las tres muestras estudiadas han sido las siguientes: Fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y esfingomielina. La composición en ácidos grasos, en cuanto a su grado de insaturación, se resume en la Tabla 8.

TABLA 8

	IO	IA	II
<i>Fosfatidiletanolamina</i>			
% Saturados	41,4	37,8	34,3
% Insaturados	58,6	62,2	65,7
<i>Fosfatidilserina</i>			
% Saturados	51,6	35,6	38,9
% Insaturados	48,4	64,4	61,1
<i>Fosfatidilcolina</i>			
% Saturados	29,8	35,2	39,7
% Insaturados	70,2	64,8	60,3
<i>Esfingomielina</i>			
% Saturados	35,1	39,8	38,9
% Insaturados	64,9	60,2	61,1

CONCLUSIONES

De los seis componentes polares identificados y determinados cuantitativamente, dos glucolípidos y cuatro fosfolípidos, los más abundantes son la fosfatidilcolina y fosfatidilserina. Los ácidos grasos presentes en todos los fosfolípidos son insaturados en una proporción aproximada de un 50%, lo que hace a aquellos componentes asociados a las proteínas como posibles iniciadores de la oxidación de los lípidos y posterior reacción de los productos de oxidación con los grupos funcionales de las proteínas.

Aunque en menor proporción en la totalidad de los lípidos polares y, al mismo tiempo, con un menor grado de insaturación en cuanto a sus ácidos grasos, se encuentran los esterol glucósido esterificados, que, del mismo modo, pueden ser oxidados, dando lugar a posteriores interacciones con las proteínas.

Estudios posteriores se llevarán a cabo con objeto de investigar los posibles efectos que los productos de alteración de los distintos componentes lipídicos identificados puedan tener sobre las proteínas presentes en las semillas de girasol.

BIBLIOGRAFIA

1. CARROLL, K. K., *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 40 (1963) 413.
2. LEPAGE M., *J. LIPID Res.* 5 (1964) 587.
3. VASKOVSKY, V. E., KOSTETSKY, E. Y. y VASENDIN, I. M., *J. CHROMATOGR.* 114 (1975) 129.