

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**ESTUDIO CINÉTICO TERMODINÁMICO DE LA INTERACCIÓN
INTERMOLECULAR DE ANTOCIANINAS CON GOMA DE
MEZQUITE Y SUS FRACCIONES**

T E S I S

para obtener el grado de
Doctora en Biotecnología

P R E S E N T A

M. en BT. Angélica Román Guerrero

Director

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Enero 2012

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana
está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y
además cuenta con apoyo del mismo Consejo.

AGRADECIMIENTOS

México, D.F. a 30 de Enero de 2012

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis

ESTUDIO CINÉTICO TERMODINÁMICO DE LA INTERACCIÓN INTERMOLECULAR DE ANTOCIANINAS CON GOMA DE MEZQUITE Y SUS FRACCIONES

Que presentó:

Angélica Román Guerrero

Comité Tutorial

Director: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter.
Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. César Pérez Alonso.
Universidad Autónoma del Estado de México

Asesor: Dr. Juan Orozco Villafuerte.
Universidad Autónoma del Estado de México

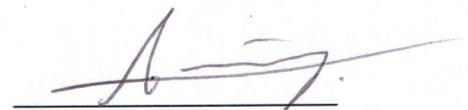
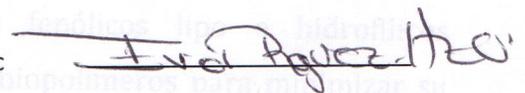
Comité de evaluación:

Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana

Secretario: Dra. María Eva Rodríguez Huevo
Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

Vocal: César Pérez Alonso
Universidad Autónoma del Estado de México

Vocal: Dr. Rubén Jiménez Alvarado
Universidad de la Cañada



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. E. Jaime Vernon Carter, por haber depositado en mí su confianza y sus conocimientos, por haber guiado mis esfuerzos y alcanzado de manera compartida éste triunfo con paciencia. Gracias por brindarme su amistad y sus consejos.

A los miembros del comité tutorial y miembros del jurado, Dr. César Pérez Alonso con quien he formado una bonita relación de amistad y trabajo; Dr. Juan Orozco Villafuerte, Dra. María Eva Rodríguez Huevo, Dr. Rubén Jiménez Alvarado y al Dr. Francisco Cruz Sosa por su valiosa colaboración y observaciones emitidas en la vigilancia y terminación satisfactoria de una etapa más en mi vida.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino por el gran apoyo que me ha brindado para la conclusión de este trabajo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de los estudios de doctorado y por la beca otorgada para la conclusión de esta tesis, a través del proyecto U-81157-Z de nombre "Acomplejamiento-desacomplejamiento intermolecular de compuestos fenólicos lipo e hidrofílicos incorporados en emulsiones dobles estabilizadas con biopolímeros para minimizar su degradación y maximizar sus propiedades funcionales".

DEDICATORIA

A mi pequeña Cecilia quien ha sido el motor y la razón de culminar esta etapa, gracias por esas lindas sonrisas que me das cada día y que me alientan a seguir adelante.

A mis padres Antonio Román Rodríguez y Felisa Guerrero Mendoza, porque siempre me han apoyado en todos los proyectos de mi vida, por su gran amor, paciencia, sabiduría y comprensión, por seguir siendo el soporte en mi vida.

A mi mejor amigo y esposo Rubén, gracias por tu amor, respeto, confianza y aliento constante, gracias por los consejos que me brindaste al revisar este trabajo.

A mis hermanos Adriana, Claudia, Raúl y Araceli, por estar a mi lado y compartir momentos tan agradables y porque sé que cuento con ustedes. Gracias por todos sus consejos y su apoyo incondicional.

A todos mis amigos del lab. T-166 de la UAM-Iztapalapa por haberme brindado su amistad, consejos y su apoyo incondicional y que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo. En especial a mi querido amiguito Eristeo por su amistad, apoyo y consejos los cuales fueron de gran utilidad para la realización de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

Índice General	<i>i</i>
Índice de Figuras	<i>iv</i>
Índice de Tablas	<i>vi</i>
1. Capítulo 1	
Resumen	1
Abstract	4
2. Capítulo 2	
Antecedentes	7
2.1 <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	7
2.2 Antocianinas	9
2.2.1 Estabilidad de las antocianinas	11
2.2.2 Efecto del solvente y la concentración de antocianinas	11
2.2.3 Efecto del pH	11
2.2.4 Efecto de la temperatura	13
2.2.5 Efecto de la luz	13
2.2.6 Presencia de enzimas	13
2.3 Estabilización de las antocianinas	14
2.3.1 Técnicas de encapsulación	14
2.3.2 Reacciones de asociación	15
2.3.4 Copigmentación	15
2.4 Goma de mezquite	16
2.4.1 Fraccionamiento de la Goma de Mezquite	17
2.4.1.a Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC)	17
2.4.2 Reología Interfacial	18
2.4.3 Pruebas de capacidad de fluencia (Creep compliance)	19
2.5 Interacción Proteína-Ligante	21
2.5.1 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)	21
3. Capítulo 3	
Justificación.	24
4. Capítulo 4	
Objetivos	25

4.1 Objetivo General.	25
4.2 Objetivos Particulares.	25
5. Capítulo 5	
Hipótesis	26
6. Capítulo 6	
Materiales y Métodos	27
6.1 Materiales	28
6.2 Fraccionamiento de la goma de mezquite por HIC	29
6.3 Distribución de peso molecular de GM y sus fracciones por GPC	29
6.4 Caracterización de la GM y sus fracciones	30
6.4.1 Contenido de humedad	30
6.4.2 Contenido de cenizas	30
6.4.3 Contenido de azúcares	31
6.4.3.a Azúcares totales	31
6.4.3.b Contenido de ácido glucurónico	31
6.4.3.c Composición de monosácaridos	31
6.4.4 Proteínas totales en GM y sus fracciones	32
6.4.4.a Contenido de proteína total	32
6.4.4.b Composición de aminoácidos	33
6.4.5 Análisis Elemental	34
6.5 Obtención de extractos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	34
6.5.1 Extracción de antocianinas	34
6.5.1.a Determinación cuantitativa de antocianinas monoméricas totales (AMT)	34
6.5.1.b Contenido de Fenoles Totales	35
6.5.1.c Actividad antioxidante por ABTS	36
6.5.2 Aislamiento de antocianinas	36
6.5.3 Determinación cualitativa de antocianinas por CCF	37
6.5.4 Identificación de antocianinas por HPLC	37
6.6 Formación de los complejos intermoleculares	38
6.6.1 Determinación del potencial zeta	38
6.6.2 Determinación del número de equivalentes iónicos	38

6.6.3 Determinación de los parámetros cinéticos y termodinámicos	39
6.6.4 Caracterización de los complejos intermoleculares	40
6.6.4.a Análisis elemental	40
6.6.4.b Resonancia magnética nuclear (H^1 - RMN)	40
6.7 Funcionalidad de los complejos intermoleculares	40
6.7.1 Reología interfacial	40
6.7.2 Viscosidad Interfacial	41
6.7.3 Determinación de las propiedades de fluencia interfacial (Creep compliance)	42
6.8 Análisis Estadístico	42
7. Capítulo 7	
Resultados	43
7.1. Fraccionamiento de GM por HIC	43
7.2 Distribución de pesos moleculares de GM y sus fracciones	44
7.3 Caracterización fisicoquímica de la GM y sus fracciones	47
7.4 Extracción de los extractos de flor de Jamaica	51
7.4.1 Caracterización de los extractos de flor de Jamaica	52
7.4.2 Fraccionamiento del extracto crudo de flor de Jamaica	54
7.5 Formación de los complejos intermoleculares	56
7.5.1 Condiciones de interacción biopolímero-antocianina.	56
7.5.2 Propiedades cinéticas y termodinámicas de la interacción intermolecular.	57
7.6 Caracterización de los complejos	63
7.6.1 Funcionalidad de los complejos	65
8. Capítulo 8	
Conclusiones	71
9. Capítulo 9	
Perspectivas	73
10. Capítulo 10	
Referencias	74
Anexo I	
Cromatografía de Filtración en Gel	83
Anexo II	
Publicación	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Imagen de la flor de Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	7
Figura 2.2. Principales aplicaciones industriales de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	8
Figura 2.3. Formas químicas de las antocianinas dependiendo del pH y reacción de degradación. Donde R ₁ =H o sacárido, R ₂ y R ₃ = H o metil (Tomado de Castaneda-Ovando y col., 2009).	12
Figura 2.4. (a) Diagrama de la interacción en la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (las esferas pequeñas representan la muestra, esferas grandes representan la matriz hidrofóbica) y (b) Elución de biomoléculas por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.	18
Figura 2.5. Curva modelo de las pruebas de capacidad de fluencia (Creep compliance).	20
Figura 2.6. (a) Datos típicos de la ITC utilizando inyecciones continuas; (b) Isotherma de interacción después de la normalización de datos.	23
Figura 6.1. Protocolo experimental utilizado para el desarrollo de este trabajo.	27
Figura 7.1. Cromatograma del fraccionamiento de GM por HIC.	43
Figura 7.2. Perfiles de elución de: a) F1, b) F2 y c) F3 para la determinación de la distribución de pesos moleculares por GPC.	45
Figura 7.3. Distribución de diámetro hidrodinámico de: a) GM, b) F1 y c) F2	46
Figura 7.4. Perfiles de elución de extractos de flor de Jamaica: a) Datos experimentales, b) Datos reportados por Sukwattanasinit y col. (2007)	53
Figura 7.5. Perfiles cromatográficos de las fracciones de antocianinas (F _i A) después del proceso de purificación.	55
Figura 7.6. Ventana de interacción entre los biopolímeros y las antocianinas en función del pH.	56
Figura 7.7. Experimento de titulación de Prolina con el ligante F ₅ A mediante ITC en fosfato-citrato 10 mM, pH 3.0 a 30 °C. (a) Termograma de titulación formado por el flujo de calor liberado tras la inyección del ligando sobre el aminoácido. (b) Isotherma de unión correspondiente al experimento en (a), obtenida después de normalizar los calores de titulación y corregir los calores de dilución. Los datos experimentales se	58

representan como viñetas, mientras que la línea continua corresponde al mejor ajuste para el modelo de “n” sitios de unión idénticos e independientes.

Figura 7.8. Perfiles de titulación de GM (azul) y F1 (rojo): a) Termograma de titulación formado por el flujo de calor liberado tras la inyección del ligando sobre el biopolímero. (b) Isotherma de unión correspondiente al experimento en (a), obtenida después de normalizar los calores de titulación y corregir los calores de dilución. 59

Figura 7.9. Espectro de RMN-1H para : a) GM, b) F3, c) F2 y d) F1. 63-64

Figura 7.10. Perfiles de viscosidad interfacial de: a) GM entera, b) F1, c) F2 y d) F3. Donde las líneas continuas representan la solución de biopolímero en la interfase aceite-agua sin F₅A, y las líneas punteadas representan el comportamiento de los mismos biopolímeros pero en presencia de F₅A. 67

Figura 7.11. Perfiles de Fluencia de las interfases aceite mineral- : a) GM, b) F1, c) F2 y d) F3 68

Figura A1.1 Diagrama del proceso de separación de las moléculas dentro de una columna de GPC. 84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Identificación estructural de las antocianinas (agliconas).	10
Tabla 7.1. Propiedades fisicoquímicas de la GM y sus fracciones.	48
Tabla 7.2. Composición de monosacáridos, aminoácidos y análisis elemental (C, H y N) en la GM y sus fracciones.	49
Tabla 7.3. Antocianinas monoméricas totales (AMT), fenoles totales y actividad antioxidante por ABTS del extracto crudo de flor de Jamaica.	52
Tabla 7.4. Relaciones teóricas de los aminoácidos respecto a F ₅ A.	57
Tabla 7.5. Parámetros termodinámicos obtenidos mediante ITC para la interacción de los biopolímeros (GM, F1, F2, F3 y aminoácidos) con el ligante F ₅ A del extracto de flor de Jamaica.	60
Tabla 7.6. Datos obtenidos por análisis elemental de los complejos de GM y sus fracciones con F ₅ A.	65
Tabla 7.7. Parámetros viscoelásticos obtenidos de las películas formadas con GM y sus fracciones.	69
Tabla A1. Pesos moleculares y tiempos de elución de los estándares utilizados para la determinación del peso molecular de GM y sus fracciones.	84

CAPÍTULO 1

1. RESUMEN

La goma de mezquite es un polisacárido altamente ramificado que ha demostrado poseer una gran semejanza con la goma Arábiga e incluso ha presentado mejores propiedades funcionales. En este trabajo se encontró que la goma de mezquite está compuesta por tres fracciones principales con pesos moleculares y composiciones químicas distintas, obteniendo una fracción rica en polisacáridos (F1) y dos fracciones con una concentración de proteína mayores al encontrado para la goma de mezquite sin fraccionar (F2 y F3). Los pesos moleculares de estas fracciones se encontraron entre 1.81×10^4 a 5.23×10^5 Da, siendo menor para la fracción con el mayor contenido de proteína. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos para el diámetro hidrodinámico de estos biopolímeros en solución, donde conforme el contenido de proteína aumenta, el diámetro hidrodinámico tiende a disminuir. Las concentraciones de proteína variaron de manera creciente desde un 0.76 hasta un 46.21% de acuerdo con el siguiente orden $F1 < GM < F2 < F3$. Se realizó el perfil de carbohidratos y aminoácidos para estos biopolímeros, encontrando que las mayores concentraciones de estos grupos bioquímicos fueron de Arabinosa y de Prolina e Hidroxiprolina, respectivamente.

Por otra parte, se realizó el aislamiento y purificación de antocianinas a partir de cálices de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Se encontró que el extracto crudo presentó una concentración de $28.52 \text{ mg}_{\text{antocianinas monoméricas totales}}/\text{g}_{\text{sólidos}}$ utilizando la cianidina-3-glucósido como patrón con un coeficiente de extinción molar de $\epsilon=26,900 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$, una absorbancia característica entre 490-550 nm y un peso molecular de 449.2 g/mol. Se encontró que este extracto presentó una actividad antioxidante de 0.59 mM equivalente a Trolox correspondiente a un 44.7% de inhibición del radical ABTS*. Las pruebas de cromatografía mostraron que este extracto se compone de dos principales antocianinas glicosiladas: cianidina y delfinidina. Sin embargo, para verificar la interacción de antocianinas con biopolímeros que contienen una fracción proteica se decidió trabajar únicamente con delfinidina. Durante su proceso de aislamiento se obtuvieron seis fracciones con diferentes concentraciones y proporciones de las dos

antocianinas registradas en el extracto crudo, y aunque en todas las fracciones ambas antocianinas se encontraron presentes, se decidió trabajar con la fracción F₅A, debido a que ésta presentaba el contenido de delphinidina con más del 90% de concentración respecto a la segunda antocianina.

Tanto las fracciones de la goma de Mezquite como la goma sin fraccionar se sometieron a una interacción electrostática con la fracción F₅A aislada de un extracto de flor de Jamaica. Se determinaron las condiciones de pH, proporciones y concentraciones adecuadas para llevar a cabo dicha interacción a través de la estimación de la ventana de interacción de pH contra potencial zeta, en los cuales tanto los biopolímeros como las antocianinas presentaban la mínima diferencia estequiométrica de sus cargas. Bajo estas condiciones se estudiaron las propiedades cinéticas y termodinámicas de dicha interacción utilizando la técnica de calorimetría isotérmica de titulación. Estas pruebas también se realizaron utilizando los principales aminoácidos presentes en los biopolímeros con la finalidad de verificar si estos son los responsables de las interacciones electrostáticas, y de esta manera elucidar los posibles sitios de interacción existentes entre ambas especies químicas.

Los resultados encontrados a partir de la calorimetría mostraron que algunos aminoácidos, que se encontraron en mayor cantidad en los biopolímeros, presentaron alta afinidad por las antocianinas, mientras que algunos otros como el ácido glutámico y la glicina no resultaron favorecidos por dicha interacción. De igual forma puede observarse que el parámetro estequiométrico (n) de este análisis para los biopolímeros muestra que la cantidad de antocianinas requeridas incrementa conforme la concentración de proteína también incrementa, dando pie a asegurar que sí existe interacción entre ambas especies químicas y que existe una relación con las interacciones entre antocianina-aminoácidos. Por tanto, puede decirse que los residuos expuestos de estos aminoácidos en las estructuras moleculares tanto de la goma de mezquite sin fraccionar como en sus fracciones sí tienen participación; sin embargo, el gran tamaño de estas macromoléculas representa un impedimento para optimizar las condiciones de interacción, resultando en una labor titánica la elucidación “exacta” de qué y cuántos residuos de aminoácidos interactúan.

Por otra parte, se encontró que la caracterización reológica interfacial de estos biopolímeros no mostró diferencias significativas cuando las interfases aceite-agua están en presencia de antocianinas, lo cual nos permite decir que las propiedades funcionales de las fracciones de la goma de mezquite, así como de la goma sin fraccionar se mantuvieron constantes aún para los complejos con antocianinas.

Lo anterior llevó a concluir que es posible aprovechar las propiedades fisicoquímicas de ambas especies (GM y antocianinas) para hacerlas interaccionar y formar complejos intermoleculares estables, capaces de mantener sus propiedades funcionales. Estos resultados abren la posibilidad para profundizar en dicha investigación, utilizando otro tipo de técnicas de fraccionamiento y aislamiento de la fracción proteica de cada una de las fracciones hasta un tamaño razonable, de manera que por técnicas como RMN en 1D y 2D sea posible determinar los sitios exactos de unión así como poder evaluar las propiedades funcionales de las antocianinas en el complejo y su estabilidad.

ABSTRACT

Mesquite gum is a highly branched polysaccharide that has demonstrated a great similarity with Arabic gum and even it has shown better functional properties than the latter. In this work it was found that mesquite gum is composed by three principal fractions with different molecular weights and chemical compositions, getting a rich polysaccharide fraction (F1) and two more fractions (F2 and F3) with higher protein content than that determined for the whole mesquite gum. Molecular weight of these fractions ranged from 1.81×10^4 to 5.23×10^5 Da; being the smallest for the fraction with the highest protein content. These results are in accordance with the hydrodynamic diameter data for the biopolymer solutions, in which as higher the protein content, a shorter hydrodynamic diameter was obtained. Protein contents ranged from 0.76 to 46.21% in the following order $F1 < GM < F2 < F3$. The carbohydrate and amino acid profiles contents were done for each biopolymer. It was found that the highest contents of these both groups were the saccharide Arabinose and the amino acids Proline and Hydroxyproline respectively.

On the other hand, through the isolations and purification of the anthocyanins extracted from Roselle calyces, it was found that the raw extract displayed a concentration of total monomeric anthocyanins of $28.52 \text{ mg/g}_{\text{solids}}$ using the cyanidin-3-glucoside as standard with a molar extinction coefficient $\epsilon=26,900 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$, a characteristic absorbance between 490-550 nm and a molecular weight of 449.2g/mol. Also it was found that this extract showed an antioxidant activity equivalent to Trolox of 0.59 mM, which corresponds to an inhibition of 44.7% of the ABTS* radical. Chromatographic assays shown that Roselle raw extract is composed by two main anthocyanins: glycosilates of cyanidin and delphinidin. Nevertheless, because this work focuses to the anthocyanins – protein rich fraction biopolymers interaction, in order to avoid interferences, it was decided to work only with one anthocyanins. In the antocyanin isolation process, six fractions with different concentrations of both anthocyanins were obtained, and even when in all the fraction the presence of both anthocyanins remained, fraction F₅A was chosen as the anthocyanin fraction rich in delphinidin with more than 90% respect the second one.

Not only the mesquite gum fractions but also the whole mesquite gum, were subjected to an electrostatic interaction with the isolated anthocyanins, for these compounds the pH, ratio and concentration conditions were determined in order to establish the interaction window in function of pH to find the minimum stoichiometric electrostatic charge difference, and under these conditions the kinetic and thermodynamic properties were carried out. In these interaction assays, the main amino acids found in the biopolymers were used in order to determine if their residues in the backbone structure of the biopolymers are the responsible of such interactions, and by this way elucidate the possible interaction sites.

Results from calorimetric studies displayed that some aminoacids shown high affinity for the anthocyanins, while some like glutamic acid and glycine did not provide a favorable result. In the same way, it can be seen that the stoichiometric parameter (n) when the biopolymers were used showed that the anthocyanins content required to interact with the protein fraction increases when the protein content increases, giving rise to ensure the existence of an interaction between flavonoids and protein fractions. So, it can be concluded that some exposed amino acid residues found in the whole mesquite gum and in its fractions take part in the complex formation. Nonetheless, the great molecular weight of these macromolecules represents an impairment for the interaction conditions optimization, resulting in a titanic labor the “exact” elucidation of which and how many aminoacids participate in these reactions.

Also it was found that the interfacial rheological characterization of these biopolymers did not display significant differences when the oil-water interfases in presence or absence of anthocyanins, this lead us to establish that the functional properties of the whole mesquite gum and its fractions remained constants.

This led to conclude that it is possible to take advantage of the physicochemical properties of both chemical species to make them interact and to form stable intermolecular complexes, which are able to maintain their functional properties and in the case of mesquite gum fractions, to improve their properties respect to the whole gum. These results open the possibility to deepen this investigation, using other

techniques for fractionation and isolation of the protein fraction in the biopolymers to a reasonable size so that techniques such as 1D and 2D NMR would be possible to determine the exact sites of binding and also assessing the functional properties of anthocyanins in the complex and its stability.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1 *Hibiscus sabdariffa* L.

Hibiscus sabdariffa L. también conocida como flor de Jamaica, es un hibisco de la familia de las malváceas. Es una planta malvácea anual que puede alcanzar de 1 a 3 metros de altura. Su flor es de color rojo, de 3 a 4 cm. de largo, formada por 4 ó 5 pétalos, y tiene una forma cónica, asemejando una pequeña amapola (Figura 2.1). Es originaria de África tropical, desde Egipto y Sudán hasta Senegal, y debido a sus propiedades medicinales, se cultiva con éxito en México, América Central y en el sur y sudeste asiático (Ramirez-Rodriguez y col., 2011).



Figura 2.1. Imagen de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Esta planta posee una gran variedad de aplicaciones (Figura 2.2), las cuales van desde fines decorativos, pasando por el sector agroindustrial hasta el farmacéutico. Dentro de las principales aplicaciones se puede mencionar la obtención de fibra a partir de sus tallos, colorantes para alimentos a partir de los cálices secos, y debido a sus características organolépticas, el extracto de dichos cálices puede utilizarse como corrector del sabor de otras bebidas o de medicamentos (Vanaclocha y Cañigual, 2003).

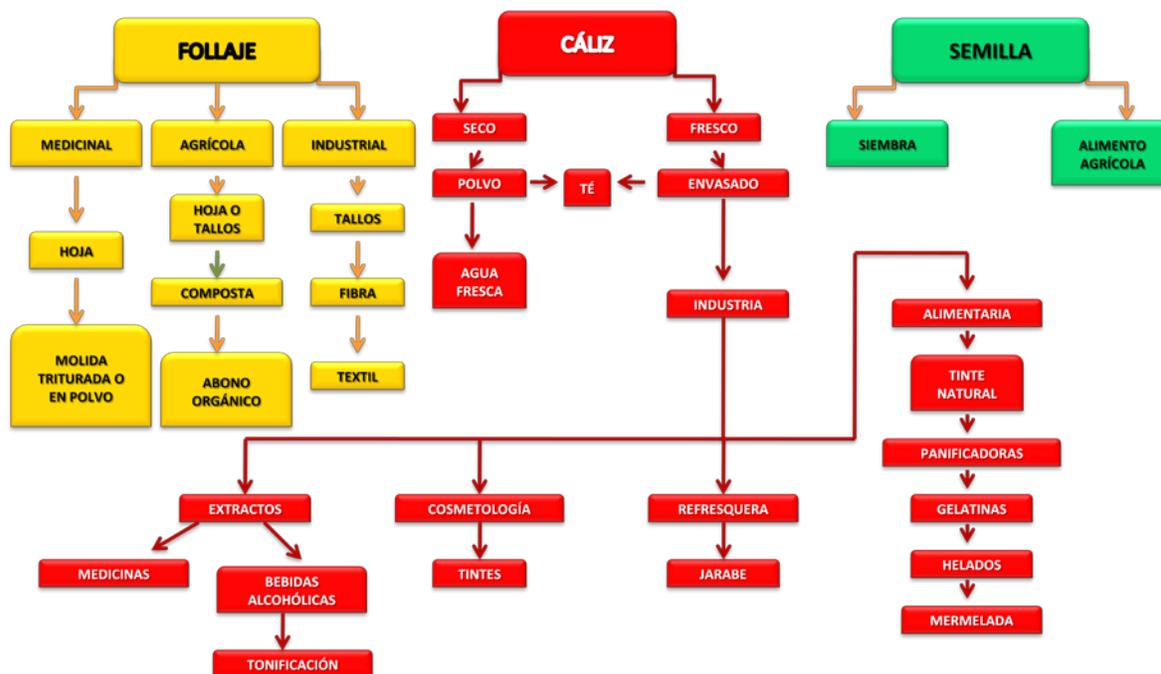


Figura 2.2. Principales aplicaciones industriales de *Hibiscus sabdariffa* L.

A esta planta se le atribuyen diversas propiedades fisiológicas. Se ha reportado que los cálices son ricos en ácidos orgánicos (2.42 g de ácido málico/100 g de cáliz fresco), β -caroteno (1.88 mg/100 g), hierro (833 mg/100 g), ácido ascórbico (141.1 g/100 g; Wong y col., 2002; Nnam y Onyeke, 2003); los cuales se ha encontrado que pueden presentar efectos diuréticos y coleréticos reducen la viscosidad de la sangre, estimulan el movimiento peristáltico intestinal (Josiah y col., 2010; Mahadevan y Pradeep, 2009; Herrera-Arellano y col., 2004), y se ha reportado su uso como antihipertensivo, antioxidante, anti-cancerígeno, anticlastrogénico, hipolipidémico, hepatoprotectivo, anti-estrés, antiespasmódico, antidiarreico, entre otros (Anokwuru y col., 2011; Prasongwatana y col., 2008; Tseng y col., 2000). Sin embargo, la importancia de estos cálices reside en su contenido de antocianinas (2.52 g / 100 g; Wong y col., 2002), dos de las principales antocianinas encontradas en esta planta son delfinidina-3-xilosilglucósido y cianidina-3-xilosilglucósido y una pequeña cantidad de glucósidos de estos dos compuestos: delfinidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido (Du y Francis, 1973). Debido a la presencia de dichos compuestos, la flor de Jamaica no sólo puede ser considerada para fines nutrimentales, sino además como alimento funcional.

2.2 Antocianinas

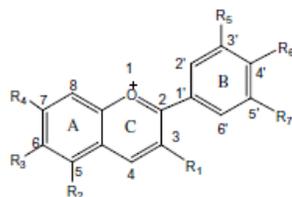
Las antocianinas forman parte del mayor grupo de pigmentos solubles en agua y se encuentran ampliamente distribuidas en todo el reino vegetal. Estos pigmentos naturales son responsables de los colores de muchas flores y frutos rojos, y en pocas ocasiones están presentes en vegetales, raíces, legumbres y cereales (Mazza y Miniati, 1993).

Químicamente, las antocianidinas son las estructuras básicas de las antocianinas (Tabla 1). Las antocianidinas (o agliconas) consisten de un anillo aromático (A) unido a un anillo heterociclíco (C) que contienen una molécula de oxígeno, y el cual está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático (B) (Tabla 2.1; Konczak y Zhang, 2004). Cuando dichas antocianidinas se encuentran en su forma glicosilada (es decir, unidas a una fracción de azúcar), se denominan antocianinas. Existe una gran variedad de antocianinas distribuidas en la naturaleza, la principal diferencia entre ellas reside en el número de grupos hidroxilados, la naturaleza y el número de azúcares unidos a su estructura, los grupos carboxilados alifáticos o aromáticos unidos a la fracción carbohidrato unido a la molécula, así como la posición de dichas uniones (Kong y col., 2003).

Hasta la fecha se han reportado más de 500 antocianinas diferentes y 23 antocianidinas (Andersen y Jordheim, 2006; Kong y col., 2003; Rein, 2005), de las cuales únicamente seis son las más comunes en plantas y las más importantes debido a su uso en alimentos, las cuales son: pelargonidina (Pg), peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delfinidina (Dp) (Clifford, 2000). Su distribución en frutas y vegetales es: Cy 50%, Dp 12%, Pg 12%, Pn 12%, Pt 7% y Mv 7%.

Las principales fracciones de carbohidratos presentes en las antocianinas son: glucosa, ramnosa, galactosa o arabinosa, y éstas pueden ser mono o disacáridos y estar aciladas con ácidos fenólicos o alifáticos. Estos factores estructurales influyen el color de estos pigmentos (Tabla 2.1) además de otorgar mayor estabilidad y solubilidad a la molécula (Harborne, 1994).

Tabla 2.1. Identificación estructural de las antocianidinas (agliconas)



Estructura general de las antocianidinas

Nombre	Abreviatura	Patrón de sustitución							Color
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
Apigenidina	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	
Arrabidina	Ab	H	H	OH	OH	H	OH	OMe	NR
Auratinidina	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	
Capensinidina	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Azul-Rojo
Carajurina	Cj	H	H	OH	OH	H	OMe	OMe	NR
Cianidina	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Naranja-Rojo
Delfinidina	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Azul-Rojo
Europinidina	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Azul-Rojo
Hirsutidina	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Azul-Rojo
3'-HydroxyAb	3'OH Ab	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe	NR
6-HydroxyCy	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Rojo
6-HydroxyDp	6OHDp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Azul-Rojo
6-HydroxyPg	6OHPg	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	NR
Luteolina	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	
Malvidina	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Azul-Rojo
5-MethylCy	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Naranja-Rojo
Pelargonidina	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	
Peonidina	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Naranja-Rojo
Petunidina	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Azul-Rojo
Pulchellidina	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Azul-Rojo
Riccionidina A	RiA	OH	H	OH	OH	H	OH	H	NR
Rosinidina	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Rojo
Tricetinidina	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Rojo

NR= No Reportado. Tomado de Castañeda-Ovando y col. (2009).

Respecto a las fuentes naturales de este tipo de pigmentos, las uvas son la mejor fuente de antocianinas, dentro de una larga lista que incluyen bayas rojas (moras, zarzamoras, frambuesas, etc.) (Gao y Mazza 1995; Rein, 2005).

Debido a la gran cantidad de proyectos asociados con la industria de los alimentos, las antocianinas se han convertido en el grupo de compuestos polifenólicos más estudiado.

2.2.1 Estabilidad de las antocianinas

Diversos estudios han demostrado que las antocianinas poseen alta actividad antioxidante *in vitro* (Kähkönen y Heinonen, 2003; Robards y col., 1999), debido a que estos compuestos donan fácilmente un electrón libre o átomos de hidrógeno para reaccionar con los radicales libres. Sin embargo, estos compuestos son altamente inestables y susceptibles de degradación (Giusti y Wrolstad, 2003). Su estabilidad se encuentra afectada por diversos factores como el pH, la temperatura de almacenamiento, la estructura química, la concentración, luz, oxígeno, solventes, la presencia de enzimas, flavonoides, proteínas e iones metálicos, y su estabilización química es uno de los principales focos de atención debido a su abundancia y gran variedad de aplicaciones, así como a sus efectos benéficos y su uso alternativo como fuente de colorantes naturales (Rein, 2005). A continuación se dará una breve explicación para entender el efecto de dichos parámetros sobre la estabilidad de las antocianinas.

2.2.2 Efecto del solvente y la concentración de antocianinas

Ito y col. (2002) encontraron que soluciones de sales flavilo con diferentes solventes presentaron cambios en el color de la solución resultante dependiendo del tipo de solvente usado y la concentración de la sal utilizada, resultando que en presencia de solventes próticos las soluciones mostraban coloraciones rojizas mientras que con solventes apróticos las soluciones se tornaban amarillas; y al incrementar la concentración de las sales la coloración roja se favorece.

2.2.3 Efecto del pH

Las antocianinas pueden encontrarse en diferentes formas químicas que dependen del pH de la solución (Figura 2.3). A pH 1, el catión flavilo (color rojo) es la especie predominante y contribuye a los colores púrpura y rojo (Figura 2.3 A). A valores de pH entre 2 y 4 las especies quinoidales (azules) predominan (Figura 2.3 B-D). A valores de pH entre 5 y 6 sólo dos especies incoloras se observan, y son consideradas una

pseudobase carbinol (Figura 2.3 E) y una chalcona (Figura 2.3 F) respectivamente. Valores de pH superiores a 7 generan la degradación de las antocianinas dependiendo de sus grupos sustituyentes (Figura 2.3, reacción de degradación) (Castañeda-Ovando y col., 2009). Para valores de pH entre 4 y 6, las cuatro estructuras de las antocianinas coexisten en equilibrio.

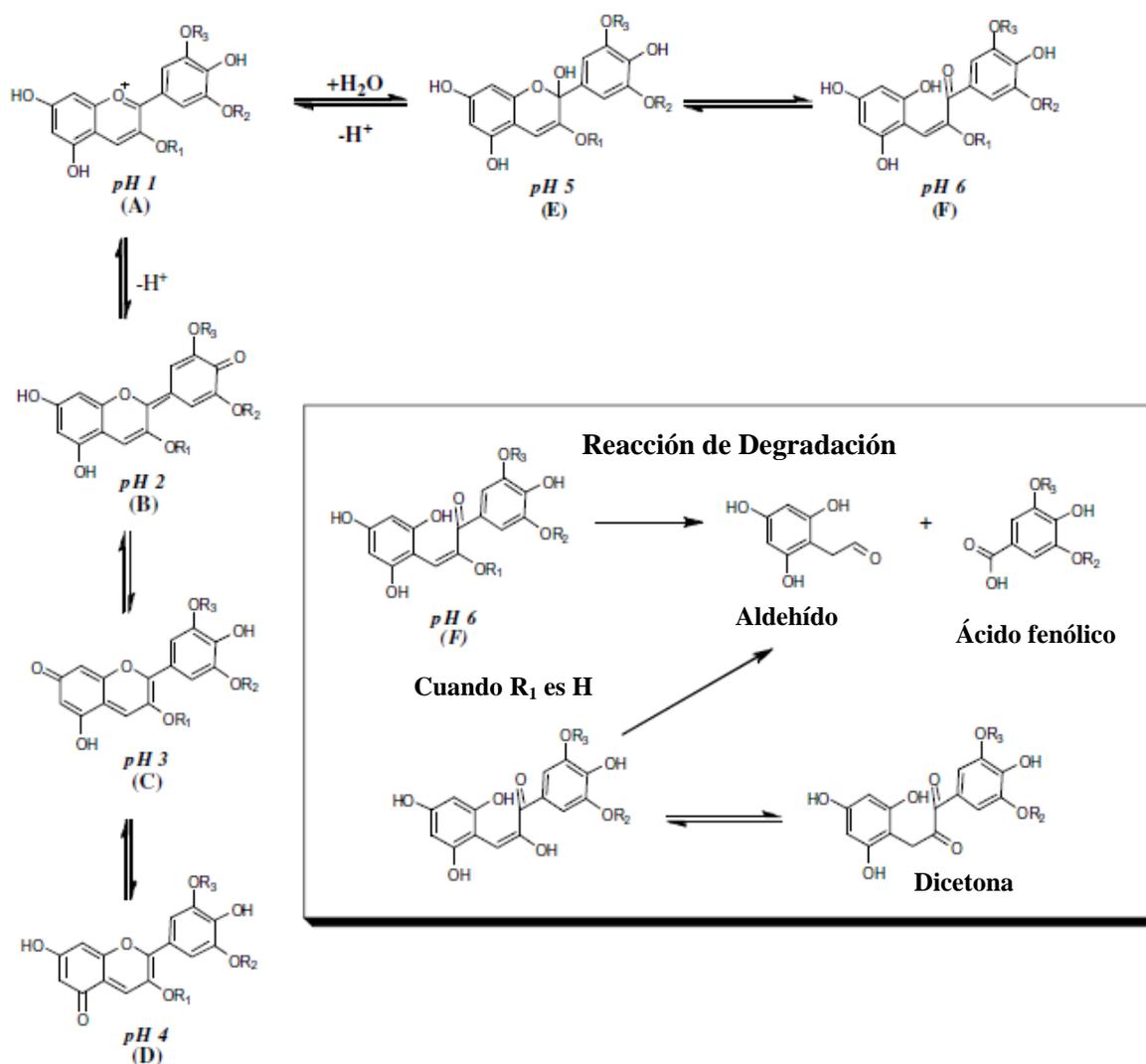


Figura 2.3. Formas químicas de las antocianinas dependiendo del pH y reacción de degradación. Donde R₁=H o sacárido, R₂ y R₃ = H o metil (Tomado de Castañeda-Ovando y col., 2009).

En este caso, la estabilidad de las antocianinas está influenciada por los sustituyentes del anillo B y la presencia de grupos hidroxilo o metilo, los cuales alteran la estabilidad de la aglicona en un medio neutro. En contraste con las agliconas, los monoglicósidos y la mayoría de los diglicósidos son estables en condiciones de pH neutro, debido principalmente a que las moléculas de carbohidrato evitan la degradación de los intermediarios en ácidos fenólicos y compuestos aldehídos (Figura 2.3, Reacción de degradación). Diversos reportes indican que la estabilidad de las antocianinas y su cambio de color con la variación de pH es más significativa en la región alcalina debido a su inestabilidad (Castañeda-Ovando y col., 2009).

2.2.4 Efecto de la temperatura

La estabilidad de las antocianinas y de la mayoría de los colorantes presentes en los alimentos sufre una reducción debida principalmente al incremento en las temperaturas de proceso y de almacenamiento (Bobbio y Mercadante, 2008). Dicha degradación térmica genera el oscurecimiento de los productos, especialmente en presencia de oxígeno, teniendo un efecto negativo sobre la estabilidad y contenido de antocianinas independientemente de la fuente vegetal utilizada para la extracción de dichos compuestos (Ikeda y col., 2009; Jiménez y col., 2010; Lin y Chou, 2009; Ochoa y col., 1999; Rodrigues y col., 2009; Sadilova y col., 2009).

2.2.5 Efecto de la luz

La luz afecta a las antocianinas de dos maneras, ya que ésta es esencial para la biosíntesis de las antocianinas, sin embargo también acelera su degradación. Diversos estudios han reportado que estos compuestos conservan su color por más tiempo cuando son almacenados en oscuridad, encontrando diferencias significativas después de 24 horas de almacenamiento cuando éstas también son almacenadas expuestas a la luz (Maier y col., 2009; Inami y col., 1996).

2.2.6 Presencia de enzimas

Las principales enzimas responsables de la degradación de las antocianinas son las fenolasas (polifenol oxidasa) y las glicosidasas, las cuales rompen los enlaces covalentes

entre los residuos glucosil y la aglicona en una antocianina, resultando en su degradación, por esta razón la inactivación enzimática mejora la estabilidad de las antocianinas (Cavalcanti y col., 2011).

2.3 Estabilización de las antocianinas

Debido a la alta reactividad que presentan estos compuestos, su protección contra su degradación es de suma importancia, de tal forma que al aplicar dichos compuestos en un producto éste sea estable y ofrezca las mismas propiedades funcionales que un extracto fresco, aun cuando éste haya pasado por un período de almacenamiento. Por este motivo, la protección del catión favilo contra el ataque nucleofílico del agua se hace necesaria y de esta manera mantener no sólo la coloración de las soluciones sino además su actividad antioxidante. Existen diversos métodos de estabilización de antocianinas, siendo los más comunes los que involucran su encapsulación y su asociación o acomplejamiento.

2.3.1 Técnicas de encapsulación

Las técnicas de encapsulación tienen como objetivo inmovilizar y entrapar un compuesto biológicamente activo dentro de partículas sólidas (microcápsulas) o bien dentro de vesículas líquidas (emulsiones) con la finalidad de estabilizar, estructurar y proteger dichos compuestos activos, permitiendo su liberación controlada (Fang y Bandhari, 2011; Robert y col., 2010; Ersus y Yurdagel, 2007). Estas técnicas de microencapsulación permiten que moléculas lábiles a la luz y la temperatura, como es el caso de las antocianinas, mantengan su estabilidad y mejoren su vida de anaquel y su funcionalidad. Dentro de las técnicas utilizadas para este fin se encuentran: el secado por aspersión, la coacervación simple y compleja, la inclusión molecular, emulsionamiento por polimerización, gelación térmica e iónica, cocrystalización, etc. (Martín y col., 2007; Desai y Park, 2005; Malien-Aubert, Dangles y Amiot, 2001; Lewis, Walker y Lancaster, 1995; Gibbs y col., 1999; Yamada, Komiya y Akaki, 1980). De esta manera, la conservación del color de las antocianinas puede lograrse a través de la eliminación de las moléculas de agua y el desplazamiento del equilibrio hidratación-deshidratación en las especies coloreadas (Lewis, Walker y Lancaster, 1995).

2.3.2 Reacciones de asociación

Se ha encontrado que las asociaciones entre antocianinas y otros compuestos sólo afectan su color sino además su estabilidad. Existen tres tipos de reacciones de asociación: (1) autoasociación, (2) copigmentación intra e intermolecular y (3) asociación con metales. Independientemente del tipo de asociación, en todos los casos se ha encontrado que la estabilidad de las antocianinas se ve favorecida, y los principales factores involucrados en este tipo de reacciones son el solvente, la luz, pH, temperatura, estructura y concentración de los copigmentos y de las antocianinas, entre otros (Cavalcanti y col., 2011). De estos tres tipos de reacciones de asociación, en este trabajo sólo se abordaron aquellas interacciones entre las antocianinas y otras especies químicas.

2.3.4 Copigmentación

La copigmentación es un fenómeno en el cual los pigmentos y otros compuestos orgánicos incoloros, iones metálicos, complejos moleculares, entre otros, generan un cambio o incremento en la intensidad del color (Boulton, 2001). Se ha sugerido que la copigmentación es el principal mecanismo para estabilizar el color en las plantas (Davies y Mazza, 1993; Mazza y Brouillard, 1990). Los copigmentos son sistemas ricos en electrones π los cuales son capaces de asociarse con los iones flavilo, pobres de electrones. Esta asociación brinda protección contra el ataque nucleofílico del agua en la posición 2 del catión flavilo (Matsufuji y col., 2003) y otras especies como peróxidos y dióxidos de azufre (García-Viguera y Bridle, 1999). Los copigmentos generalmente son incoloros, pero al mezclarse con la solución antociánica, la interacción produce un efecto hipercrómico y un cambio batocrómico en el espectro de absorción (Región UV-Vis). Los copigmentos pueden ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, metales u otra antocianina y/o polisacáridos (Rein, 2005).

En este trabajo se propuso llevar a cabo la formación de complejos intermoleculares entre antocianinas con polisacáridos como la goma de mezquite con la finalidad de brindarle protección a estos compuestos funcionales. Actualmente no existen reportes

acerca de este tipo de interacción, y para ello es necesario hablar acerca de la goma de mezquite y sus propiedades funcionales.

2.4 Goma de mezquite

La goma de mezquite (GM) es el exudado en forma de lágrima producida por el árbol de mezquite (*Prosopis laevigata*). Esta goma ha sido propuesta y utilizada como un sustituto al uso racional de la goma Arábiga; encontrándose que es un excelente agente encapsulador de aceites esenciales dentro de un amplio intervalo de actividades acuosas y un agente emulsionante y estabilizante de colorantes naturales, proveyéndoles de una mayor protección en comparación con la goma Arábiga (Beristain y col., 2001, 2002; Pérez-Alonso y col., 2003; Rodríguez-Huezo y col., 2004). Las emulsiones formuladas con GM se estabilizan a través de la formación de una membrana interfacial gruesa (interacciones estéricas) y con carga negativa (interacciones electrostáticas).

La goma de mezquite químicamente es una sal neutra de un polisacárido, aniónico, ramificado; es considerada como una arabinogalactano-proteína (AGP, polisacárido unido covalentemente a proteína). El componente polisacárido se ha descrito como una cadena central de unidades de D-galactosa, enlazadas por uniones (1→3) y β (1→6) a la cual se le unen cadenas laterales en el O (6) de algunos de los residuos de D-galactosa. Estas ramificaciones consisten en mono u oligosacáridos de D-galactosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico y ácido 4-O-metil-glucurónico (White, 1946, 1947a, b, 1948; Cuneen y Smith, 1948a, b). Esta estructura ramificada genera una conformación molecular, con alta solubilidad en agua. Además de los componentes polisacáridos, la goma de mezquite tiene una fracción proteica que oscila entre 2 y 4.8 % (Goycoolea y col., 1998; Orozco-Villafuerte y col., 2003; López- Franco y col., 2004) la cual se encuentra relacionada con sus propiedades funcionales, permitiéndole tener una buena actividad superficial; además la gran masa molecular del componente polisacárido le provee a los sistemas dispersos una estabilidad a largo plazo, debido a factores estéricos (Vernon-Carter y col., 2000).

2.4.1 Fraccionamiento de la goma de mezquite

Estudios recientes han demostrado que el fraccionamiento de polisacáridos como la goma Arábica y la goma de mezquite a través de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC), permite la obtención de tres fracciones principales con composiciones químicas distintas. Una fracción arabino-galactana proteica (AGP), una fracción arabino-galactana y una fracción glicoproteínica, sugiriendo que la funcionalidad de las fracciones aplicadas en la formulación de emulsiones varía directamente con el contenido de proteína (Randall, Phillips y Williams, 1989; Ray y col., 1995; Orozco-Villafuerte y col., 2003; Lopez-Franco 2004, 2008; Vázquez-Ortíz y col., 2006). Para entender el método de fraccionamiento aplicado para este tipo de muestras, a continuación se detalla el principio de la técnica.

2.4.1.a Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC)

Actualmente la cromatografía de interacción hidrofóbica, HIC por sus siglas en inglés, se ha convertido en una útil herramienta para el fraccionamiento, separación y purificación de biomoléculas. Esta técnica se basa en la separación de proteínas con diferentes grados de hidrofobicidad a través de la interacción reversible entre una proteína y la superficie hidrofóbica, principalmente grupos hidrofóbicos como fenil, octil o butil unidos a la fase estacionaria del medio cromatográfico. En este caso, las proteínas pasan a través de la columna exponiendo las superficies hidrófobas de sus cadenas de aminoácidos promoviendo su interacción con los grupos hidrofóbicos de la fase estacionaria. Dicha interacción se favorece en presencia de altas concentraciones de sal (fuerza iónica alta) en la fase móvil, ya que ésta reduce la solvatación de las muestras promoviendo la exposición de las regiones hidrófobas y mejorando su adsorción en la matriz hidrófoba. La separación se lleva a cabo a través de la reducción de la fuerza iónica en el eluyente con la finalidad de disminuir las interacciones hidrofóbicas e incrementar la hidrofiliidad del medio (Figura 2.4).

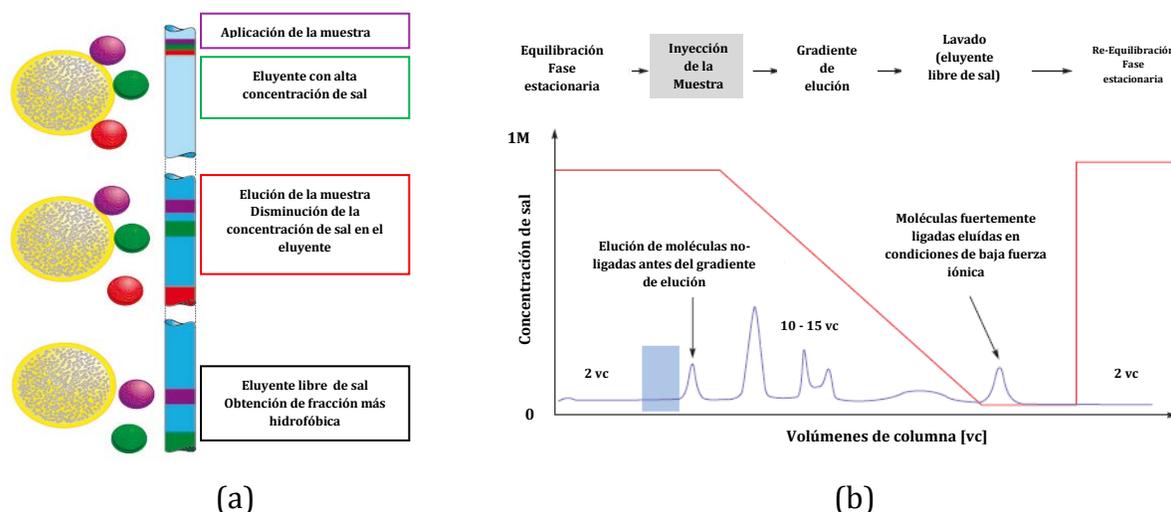


Figura 2.4. (a) Diagrama de la interacción en la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (las esferas pequeñas representan la muestra, esferas grandes representan la matriz hidrofóbica) y (b) Elución de biomoléculas por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (Diogo y col., 2000)

Esta técnica permite mantener la integridad estructural de las biomoléculas debido al uso de una fase estacionaria suave y al efecto estabilizante de la sal en el eluyente sobre las moléculas (Diogo y col., 2000). Las condiciones de operación de esta técnica dependen de la hidrofobicidad de la proteína y su solubilidad, así como de la hidrofobicidad de la matriz y su resolución. Los principales factores a considerar para esta técnica son la matriz y el ligante, el tipo de sal (Na_2SO_4 , K_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , NaBr y NaSCN) y su concentración, el pH, la temperatura y el uso de algunos aditivos como metanol, etanol, isopropanol, acetona, dodecil sulfato de sodio (SDS), urea y cloruro de guanidino.

2.4.2 Reología Interfacial

Debido a que se ha mencionado que la funcionalidad de las fracciones de goma de mezquite en la formulación de sistemas dispersos como las emulsiones se ve influenciado por el contenido de proteína presente, una técnica que provee información valiosa respecto a la forma de interacción de dichas fracciones en presencia de una interfase agua-aceite es la reología interfacial, ya que se considera como un buen indicador de su adsorción e interacción en interfases así como de su actividad superficial (Burgess y Sahin, 1997).

Existen dos tipos de deformación interfacial importantes: cambios en el área, ya sea por dilatación o compresión (reología interfacial dilatacional); cambios debido a un movimiento de corte manteniendo el área constante (reología interfacial de corte). Mientras que las propiedades interfaciales de corte contribuyen a la estabilidad a largo plazo de los sistemas dispersos, las propiedades interfaciales dilatacionales presentan una influencia importante en la estabilidad a corto plazo, que tiene que ver con los mecanismos de adsorción/desorción de las moléculas con actividad superficial en las interfases cuando éstas se están formando (Rodríguez-Patino y col., 2001; Martin y col., 2002). Ambos métodos reológicos son complementarios ya que se enfocan en diferentes aspectos de la membrana interfacial (Maldonado-Valderrama y Rodríguez-Patino, 2010), y éstos serán tomados en cuenta para la caracterización de las fracciones de goma de mezquite.

2.4.3 Pruebas de capacidad de fluencia (Creep compliance)

La capacidad de fluencia es una herramienta reológica que estudia las propiedades de flujo de los materiales viscoelásticos. Cuando un material se somete a una fuerza repentina, la respuesta a esta deformación expuesta en las curvas obtenidas de estas pruebas se caracterizan por una curva exponencial de primer orden la cual puede ser subdividida en tres regiones características (Figura 2.5):

- (a) La región de fluencia instantánea J_0 (A– B), en la cual las bandas de las moléculas adsorbidas en la interfase son sujetadas a un estiramiento elástico. Si la deformación no continúa después de este punto, la recuperación de la estructura en la película es completa.
- (b) La región de fluencia de relajación o retardo J_R (B –C), en la cual las uniones entre las moléculas adsorbidas son rotas y reformadas.
- (c) La región de fluencia Newtoniana J_N (C–D). En este punto, las uniones de las moléculas adsorbidas en la interfase son rotas, el tiempo requerido para su reestructuración es mucho mayor que el tiempo de análisis del experimento, por lo que se establece un perfil de flujo en la interfase.

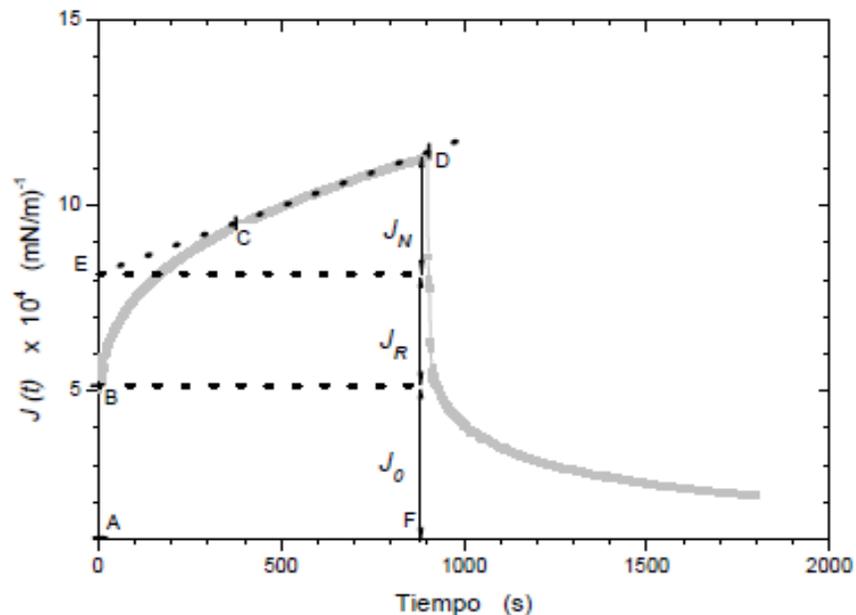


Figura 2.5. Curva modelo de las pruebas de capacidad de fluencia (Creep compliance). Tomado de Pérez-Orozco (2006)

Para el análisis de las propiedades de capacidad de fluencia, se utilizó el modelo que contempla un tiempo de relajación (región de relajación; Ecuación 1):

$$J(t) = J_0 + J_m \left(1 - e^{-t/t_m}\right) + J_N \quad (1)$$

donde

$J_0 = 1/E_0$ es evaluado directamente del gráfico y corresponde a la intersección de la curva con el eje de las coordenadas adyacentes (Punto B).

$J_N = t/\eta_N$ donde η_N es la viscosidad interfacial Newtoniana y es evaluada gráficamente mediante la relación de los segmentos $\frac{AF}{ED}$.

Los parámetros J_m y t_m son determinados mediante el ajuste de la Ec. 1 a los datos experimentales (Pérez-Orozco y col., 2004).

2.5 Interacción Proteína-Ligante

Una vez que se ha establecido la gran importancia de las antocianinas debido a sus propiedades antioxidantes, que es posible realizar interacciones intermoleculares con diversos compuestos como aminoácidos y/o proteínas que pueden promover la estabilidad de estos compuestos alargando su vida de anaquel, y que la goma de mezquite puede fraccionarse por técnicas cromatográficas y obtener fracciones ricas en proteína, este trabajo propone estudiar la interacción de estas fracciones de goma de mezquite con antocianinas y una de las técnicas novedosas que permite estimar los parámetros cinéticos y termodinámicos de dicha interacción es la calorimetría isotérmica de titulación, la cual abordaremos a continuación.

2.5.1 Calorimetría Isotérmica de Titulación (ITC)

La calorimetría isotérmica de titulación, ITC por sus siglas en inglés, se ha convertido en una herramienta poderosa para el estudio de las interacciones proteína-ligante, ya que esta técnica es capaz de medir la fuerza y estequiometría de una interacción en solución sin involucrar modificaciones químicas de los reactantes o su inmovilización en algún sustrato. Debido a que todas las interacciones biomoleculares reversibles involucran cambios entálpicos; por ejemplo, la liberación o absorción de energía calorífica (Frazier y col., 2003), los cuales incluyen no sólo las contribuciones propias de la interacción, sino además los efectos del solvente y cambios conformacionales que pudieran presentarse (Abdessamad y Ladbury, 2006).

La interacción molecular entre dos ligantes puede definirse utilizando la siguiente Ecuación (2), la cual es la base del análisis de la ITC:

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T \Delta S \quad (2)$$

La primer parte de la ecuación implica que el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) se correlaciona con la constante de asociación K_A , donde R, constante de los gases y T,

temperatura absoluta, son constantes. La constante de disociación (K_D), es utilizada para la cuantificación de la afinidad entre dos ligantes, y es el inverso de K_A . La segunda parte de la ecuación corresponde a la suma de los cambios de entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) definida como energía libre (ΔG) y en consecuencia como la afinidad de la interacción. La ventaja de utilizar esta técnica para caracterizar interacciones intermoleculares reside en que es posible medir K_A y ΔH en un solo experimento, y con estas propiedades las variables restantes (ΔG y ΔS) pueden obtenerse por sustitución en la Ecuación (2).

Esta técnica consiste en colocar la macromolécula en la celda del calorímetro y titular con el ligante a temperatura constante hasta conseguir la saturación de la macromolécula. Durante este procedimiento de titulación, los cambios de calor son registrados obteniendo un perfil como el de la Figura 2.6 a. Cada pico representa el cambio de calor causado por la inyección de una alícuota de ligante, posteriormente estos datos se integran, normalizan y someten al ajuste de un modelo de interacción (Figura 2.6 b), del cual se obtienen los valores de K_A , obtenida de la pendiente en el punto medio de saturación, y ΔH , que para altas afinidades de unión, ésta se obtiene de la intersección de la curva en el eje Y.

De manera general, este trabajo contempla el aprovechamiento de las diferentes técnicas disponibles para el estudio de las interacciones intermoleculares de compuestos antioxidantes altamente susceptibles de degradación como las antocianinas, con macromoléculas como la goma de mezquite y sus fracciones a través de su fracción proteica, con la finalidad de brindarles protección contra su degradación, además de estimar la energía involucrada en dichas interacciones y su influencia en las propiedades funcionales de estos biopolímeros.

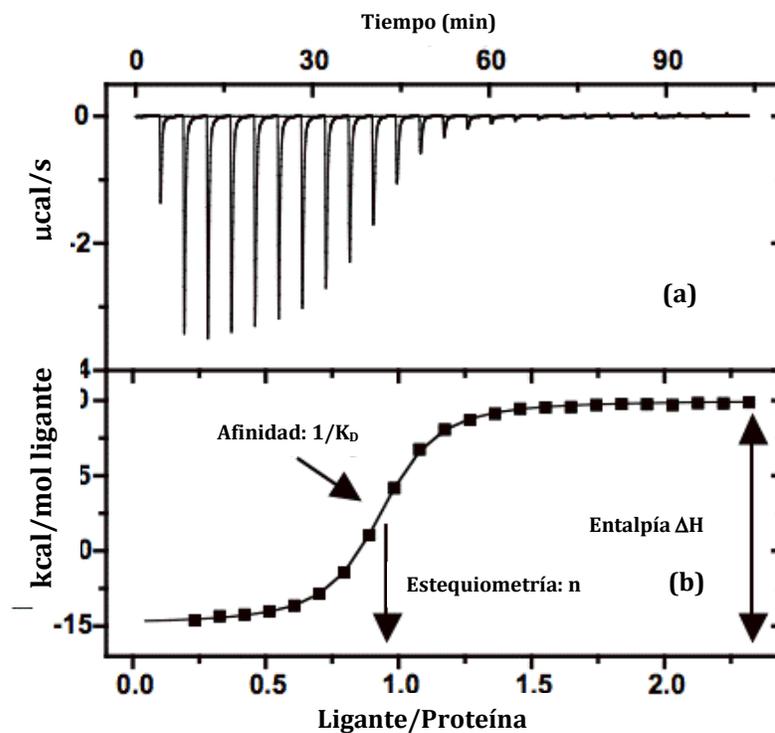


Figura 2.6. (a) Datos típicos de la ITC utilizando inyecciones continuas; (b) Isotherma de interacción después de la normalización de datos.

CAPÍTULO 3

3. JUSTIFICACIÓN

Las antocianinas son compuestos antioxidantes altamente lábiles debido a la presencia de factores ambientales deteriorativos como la luz y la presencia de oxígeno principalmente. Por otra parte la goma de mezquite posee una estructura muy semejante a la de la goma Arábica, lo cual representa una forma de sustituir este producto de importación por uno de producción nacional sin depender de las variaciones en los costos de importación. Por otra parte, se ha reportado que el fraccionamiento de ambas gomas por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica, genera fracciones con diferentes concentraciones de proteína y carbohidratos, quedando sin discusión si estas fracciones poseen la misma funcionalidad de las gomas o incluso pueden mejorarla.

Una forma de verificar lo anterior y al mismo tiempo contrarrestar los efectos ambientales sobre la estabilidad de las antocianinas extraídas a partir de cálices de flor de Jamaica es haciendo uso del conocimiento que se tiene acerca de la formación de complejos intermoleculares proteína-flavonoide; por lo que este proyecto pretende comprobar que es posible sobrellevar el inconveniente de la alta reactividad de las antocianinas de flor de Jamaica sin perjudicar las propiedades funcionales de la goma de mezquite, además de que al fraccionarla y realizar el acomplejamiento con las fracciones ricas en proteínas, éstas formarán complejos con mejores propiedades funcionales.

CAPÍTULO 4

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Establecer cinética y termodinámicamente la interacción intermolecular entre antocianinas - goma de mezquite o sus fracciones, en la formación de complejos intermoleculares como forma de estabilización de las antocianinas.

4.2 Objetivos Particulares

- ✓ Fraccionar hidrofóbicamente la goma de mezquite.
- ✓ Caracterizar fisicoquímicamente la goma de mezquite y sus fracciones.
- ✓ Extraer y caracterizar las antocianinas obtenidas a partir de cálices de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.).
- ✓ Determinar las propiedades termodinámicas (energía de formación de enlaces, estequiometría, entalpía de formación, etc.), presentes durante la formación de complejos intermoleculares entre antocianina-goma de mezquite y antocianina-fracciones de goma de mezquite.
- ✓ Caracterizar los complejos obtenidos de la interacción entre las antocianinas con la goma de mezquite o sus fracciones.

CAPÍTULO 5

5. HIPÓTESIS

Es posible aprovechar las interacciones de la goma de mezquite y sus fracciones con antocianinas para la formación de complejos intermoleculares conservando las propiedades funcionales de ambos compuestos.

CAPÍTULO 6

6. Materiales y Métodos

El protocolo experimental seguido para la realización de este trabajo fue de acuerdo con el siguiente diagrama de flujo (Figura 6.1).

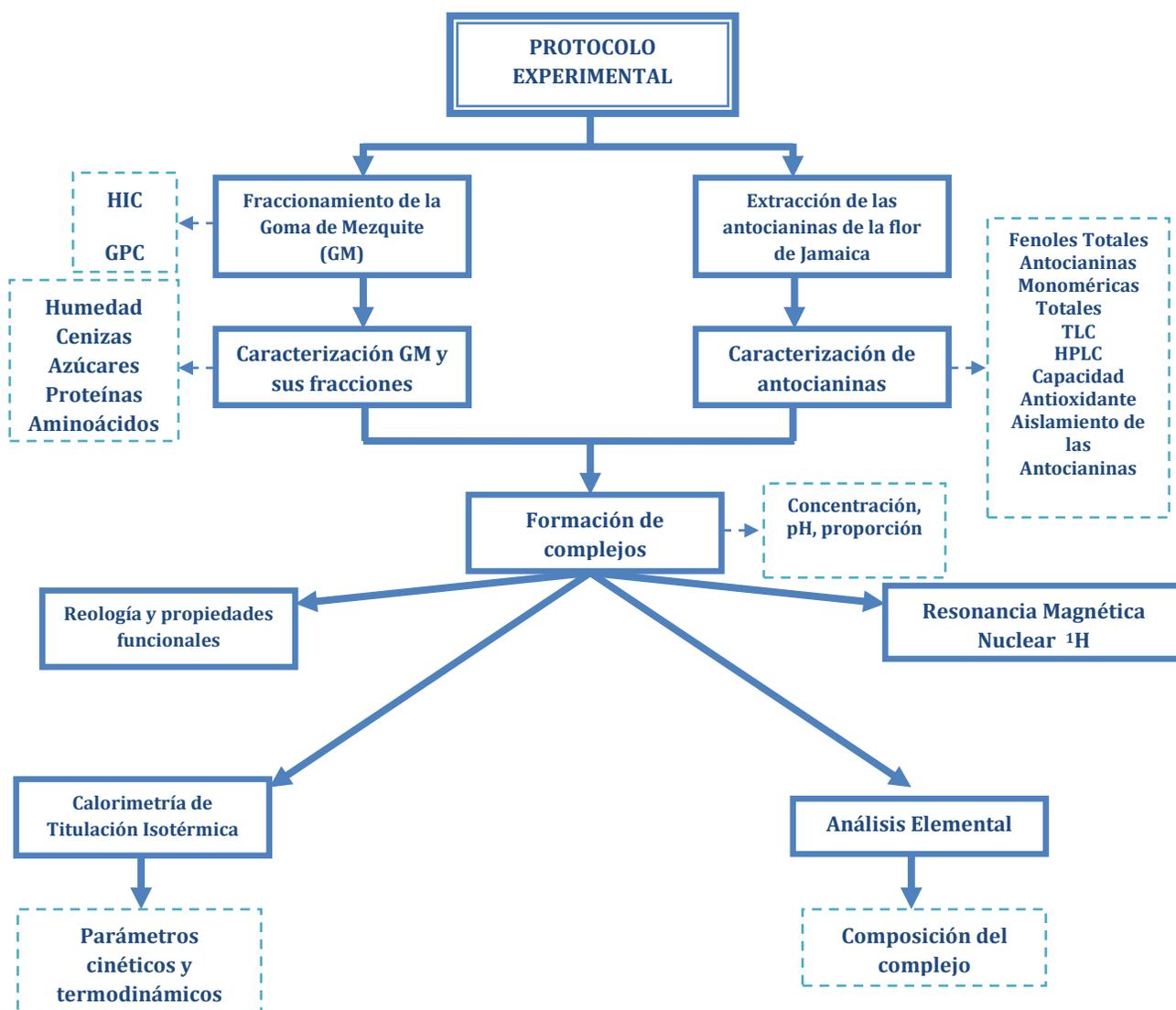


Figura 6.1. Protocolo experimental utilizado para el desarrollo de este trabajo.

6.1 Materiales

Goma de mezquite (GM), la cual fue recolectada en forma de lágrima en el estado de San Luis Potosí, México, pulverizada en un molino Bicor y, para detener la actividad enzimática, se disolvió en agua a 70°C por una hora en un recipiente enchaquetado marca Polinox utilizando un agitador de propela, posteriormente fue filtrada la solución y secada por aspersión con una temperatura de entrada de 175°C (Vernon-Carter y col., 1996).

La flor de Jamaica deshidratada (*Hibiscus sabdariffa* L.) con un contenido de humedad menor al 3% se compró en la Central de Abastos de la Ciudad de México, D.F., México. Los cálices fueron triturados y almacenados en un frasco ámbar a 4 ° C hasta su uso.

Los principales reactivos y compuestos de alta pureza (estándares) utilizados para las diferentes técnicas utilizadas se enumeran a continuación:

Sales: Cloruro de sodio (NaCl), Tetraborato de sodio (Na₂B₄O₇), Carbonato de sodio (Na₂CO₃), Cloruro de potasio (KCl), Carbonato de bario (BaCO₃), Hidróxido de sodio (NaOH), Acetato de sodio (CH₃COONa) de la marca J.T. Baker (México); Persulfato de potasio (K₂S₂O₈) adquirido en Sigma Aldrich Química S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México).

Estándares: Azúcares como Glucosa, Ramnosa, Sacarosa, Arabinosa y Lactosa; Kit de estándares de proteínas y dextran de pesos moleculares conocidos (Albúmina de suero bovino, 66,000 Da; Alcohol deshidrogenasa de levadura, 150,000 Da; β-amilasa de papa dulce, 200,000 Da; Azul dextran, 2, 000,000 Da; Tiroglobulina bovina, 669,000 Da); Kit de aminoácidos (20 aminoácidos), Ácido gálico, Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX), comprados a Sigma Aldrich Química S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México). Antocianinas como Malvidina, Delfinidina y Cianidina de la marca Genay (Francia).

Solventes: Ácido clorhídrico (HCl), Acetonitrilo (CH₃CN, grado HPLC), Metanol (MeOH, grado analítico y HPLC), Etanol (EtOH, grado analítico y HPLC), ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido acético glacial (CH₃COOH), 2-Propanol (Grado HPLC), Acetona (CH₃(CO)CH₃, grado analítico), ácido fosfórico (H₃PO₄) fueron comprados a Tecsiquim. 2-mercaptoetanol (BME) comprado a Sigma Aldrich Química S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México). Se utilizó agua desionizada para todos los experimentos.

Otros reactivos: Carbazol (C₁₂H₉N), Fenol (C₆H₅OH), 2,2-azino-bis-3-ethylbenzotiazolina 6-sulfonato (radical ABTS*) comprados a Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México), Reactivo Folin-Ciocalteau (Hycel de México, Zapopan, Jalisco, México) y Mezcla reactiva de selenio para la determinación de Nitrógeno (N₂) de la marca Merck. O-ftaldialdehído (C₈H₆O₂), Polioxietilen lauril éter (Brij 35),

6.2 Fraccionamiento de la goma de mezquite por HIC.

El fraccionamiento de la goma de mezquite se realizó a través de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) reportada por Randall y col. (1989). Se utilizó una columna empacada con un gel de interacción hidrofóbica llamado Phenyl-sepharose CL-4B, (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N.J., E.U.A.). La columna se acopló a un sistema cromatográfico de baja presión (Biologic LP, Bio-Rad, CA, E.U.A), monitoreando el eluyente a 280 nm. Se inyectaron soluciones al 9 % (p/v) de GM empleando como fases móviles soluciones de NaCl 4.2M y 2M, y agua desionizada a un flujo de 40 mL/h. Las diferentes fracciones obtenidas (F1, F2 y F3) fueron recuperadas, dializadas, liofilizadas y almacenadas hasta el momento de ser requeridas.

6.3 Distribución de peso molecular de GM y sus fracciones por GPC

Soluciones al 8% (p/v) de GM y de sus fracciones se sometieron a un fraccionamiento cromatográfico de filtración o permeación en gel (GPC por sus siglas en inglés) siguiendo la metodología descrita por Orozco-Villafuerte y col. (2003), para determinar la distribución del peso molecular de cada una de las fracciones de GM. Se utilizó una columna empacada con el gel Sephacryl S-500-HR (40-20,000 kDa, Amersham Pharmacia

Biotech, Inc., Piscataway, N.J., E.U.A.), acoplada al cromatógrafo de líquidos de baja presión (Biologic LP, Bio-Rad, CA, E.U.A). Se utilizó un kit de estándares de proteínas y dextran de pesos moleculares conocidos (Albúmina de suero bovino, 66,000 Da; Alcohol deshidrogenasa de levadura, 150,000 Da; β -amilasa de papa dulce, 200,000 Da; Azul dextran, 2, 000,000 Da; Tiroglobulina bovina, 669,000 Da) para realizar la curva de calibración de peso molecular en función del tiempo de elución. Se utilizó una solución 0.5 M de NaCl como fase móvil a un flujo de 34.5mL/h y se registró la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones de GM, incluyendo los estándares de proteína.

6.4 Caracterización de la GM y sus fracciones

6.4.1 Contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad remanente en las fracciones y GM liofilizadas se colocó 1g de muestra en un crisol, el cual se encontraba a peso constante, y posteriormente la muestra se situó dentro de una estufa (SW-17TA, Blue-M, New Columbia, PA, USA) a 90°C hasta alcanzar peso constante. El contenido de humedad fue determinado por la diferencia de pesos debido a la pérdida de agua durante el secado isotérmico.

6.4.2 Contenido de cenizas

1 g de muestras libres de humedad fueron colocadas en un crisol y fueron llevadas a peso constante de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Posteriormente las muestras fueron colocadas en una mufla a 550 °C durante 5 h. Transcurrido este tiempo, los crisoles fueron almacenados en un desecador, permitiéndoles enfriarse y alcanzar nuevamente peso constante. La determinación de cenizas, referida como el análisis de residuos inorgánicos que quedan después de la ignición u oxidación completa de la materia orgánica de un alimento, fue determinada por la diferencia de peso de los crisoles con las cenizas y el del crisol vacío sobre el peso de la muestra, expresándose como porcentaje.

6.4.3 Contenido de azúcares

6.4.3.a Azúcares totales

El contenido de azúcares totales fue determinado usando el método de fenol-sulfúrico (Dubois y col., 1956). Por este método se pueden determinar azúcares simples, reductores, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados. En un tubo de ensayo con tapón de rosca, se colocaron 2 mL de una solución de GM y/o de sus fracciones (0.2 mg/mL) y se adicionó 1 mL de una solución de fenol al 5%, la mezcla se agitó perfectamente y se agregó rápidamente y por la pared del tubo, 5 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se dejó reposar durante 10 min a temperatura ambiente (25 °C), posteriormente las muestras se colocaron en un baño a 30°C durante 20 min y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectronic Genesys2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA., E.U.A) a 480 nm. Se realizó una curva estándar con sacarosa con un intervalo de concentraciones de 0 a 100 mg/L.

6.4.3.b Contenido de ácido glucurónico

El contenido de ácido glucurónico es determinado mediante el método de carbazol (Randall y col., 1989). Se colocó 1mL de una solución 0.2 mg/mL de muestra en un tubo de ensayo y se le agregaron 5 mL de una solución de Na₂B₄O₇ en H₂SO₄, la mezcla se mantuvo en un baño de hielo durante la adición de Na₂B₄O₇. Posteriormente la mezcla se colocó en un baño a 85 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo la muestra se colocó en un baño de hielo y se agregaron 0.2 mL de una solución de carbazol en EtOH. La muestra se volvió a colocar en un baño a 85 °C durante 15 min. Las muestras se dejaron reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente (25 °C). La determinación del contenido de ácido glucurónico se realizó por espectrofotometría a 530nm, utilizando una curva patrón de ácido glucurónico.

6.4.3.c Composición de monosacáridos

La composición de monosacáridos presentes en las muestras biopoliméricas fue determinada por HPLC utilizando estándares externos de azúcares conocidos. Muestras

de 0.03 – 0.05 g de GM y/o de sus fracciones, fueron hidrolizadas durante 4 h a 100 °C con una solución de H₂SO₄ al 4%. Transcurrido este tiempo las soluciones fueron neutralizadas con BaCO₃ (Randall y col., 1989). Alícuotas de 50 µL de muestra fueron inyectados en un sistema de cromatografía líquida de alta presión Agilent serie 1100, acoplado a un detector de índice de refracción Agilent modelo G1362A, integrados a un software Agilent Chem Station. Se utilizó una columna Zorbax (4.6 X 250 mm; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, E.U.A.). Las muestras se eluyeron utilizando una mezcla de acetonitrilo:agua (75:25) como fase móvil, con un flujo de 1.0 mL/min a una temperatura de 50 °C.

6.4.4 Proteínas totales en GM y sus fracciones

6.4.4.a Contenido de proteína total

El contenido de proteína total fue determinado a través del método de Kjeldhal, el cual determina Nitrógeno total ($N_2 \text{ total}$) tanto proteico (Nitrógeno amino y amido) como Nitrógeno no proteico (urea, entre otros) 0.5 g de muestra fueron colocados en un matraz micro-Kjeldahl, posteriormente se agregaron 12 mL de H₂SO₄ concentrado. A la mezcla resultante se adicionaron 2 g de la mezcla reactiva de selenio para la determinación de Nitrógeno. La muestra se llevó a digestión durante un periodo de 5 a 6 h. Posteriormente la solución resultante se destiló y tituló con una solución valorada de HCl. El $N_2 \text{ total}$ se calculó utilizando la Ecuación (3) y el contenido de proteína total a través de la Ecuación (4)

$$N_2 \text{ total} = \frac{(B-A) \times N \times meq}{\text{Peso de la muestra}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{Proteína total} = N_2 \text{ total} \times FC \quad (4)$$

donde A = mL gastados de HCl en la muestra del blanco, B= mL gastados de HCl en la muestra, N = normalidad del HCl, meq = miliequivalentes de NaOH obtenidos de la titulación, FC= Factor de conversión a proteína en gomas de *Prosopis* igual a 6.53 (propuesto por Anderson y Farquhar, 1982).

6.4.4.b Composición de aminoácidos

Para la determinación de la composición de aminoácidos presentes en la GM y en sus fracciones se utilizó el método reportado por Walter y col. (1992). Se utilizó un sistema cromatográfico HPLC acoplado a un detector de fluorescencia. Las muestras fueron hidrolizadas y derivatizadas previo a su inyección en el cromatógrafo. Se colocaron 100 mg de muestra en un tubo con tapa de rosca purgando con gas N₂; posteriormente se adicionaron 5 mL de HCl 6 N en presencia de fenol (40 - 50 mL en 10 mL de HCl 6 N) y se mantuvieron en un baño de aceite a 105 °C durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, las muestras fueron concentradas en un rotavapor llevando casi a sequedad a presión reducida a 60 °C. Las muestras se rehidrataron 2 veces con 5 mL de agua desionizada. De esta solución se tomaron 7.3 mL en un matraz aforado de 100 mL completando este volumen con agua desionizada. Esta solución se centrifugó y filtró a través de una membrana millipore (0.22 µm) y se usó directamente en la derivatización.

El procedimiento de derivatización consistió en colocar 100 µL de la muestra en un vial bajo atmósfera de N₂, posteriormente se adicionaron 200 µL del reactivo OPA (formulado como O-ftaldialdehído, Brij 35, MeOH, BME y Na₂B₄O₇, ajustado a pH 10.4) y exactamente 60 segundos después, se adicionaron 500 µL de una solución buffer 0.4 M de Na₂B₄O₇ ajustada a pH 10, inmediatamente se selló, agitó e inyectó en el cromatógrafo.

Las condiciones de operación consistieron de una fase móvil A (50 mM de fosfato monosódico pH 7.2) y B (MeOH 70% (v/v) en una solución amortiguadora de fosfato monosódico pH 7.2) en un gradiente de concentraciones (t - %B - curva): (0 - 10 - cóncava); (35 - 65 - cóncava); (45 - 90 - convexa) con un flujo de 2 mL/ min a 25 °C. La detección se realizó por medio de fluorescencia con un filtro 1.5 y atenuación, con una λ de excitación de 340 nm y una λ de emisión de 455 nm.

6.4.5 Análisis Elemental

Se determinó el porcentaje de Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno en las muestras de GM y de sus fracciones. Se colocaron entre 2 y 4 mg de muestra en una celda de medición y se sometieron a oxidación térmica (980 °C) en ambiente de Oxígeno puro en un equipo de análisis elemental PE2400 series II CHNS/O Analyzer (Perkin Elmer, Whaltam, MA, E.U.A.). Los productos de la combustión incluyen al CO₂, H₂O y N₂. Los gases resultantes fueron homogeneizados y controlados en condiciones exactas de presión, temperatura y volumen en el interior del equipo. Posteriormente se pasaron a través de una columna donde fueron separados y detectados en función de sus conductividades térmicas. El porcentaje total de Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno fueron determinados con una precisión de 0.1 µg por el software del equipo.

6.5 Obtención de extractos de *Hibiscus sabdariffa* L.

6.5.1 Extracción de antocianinas

La extracción de las antocianinas a partir de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) se realizó mediante la maceración de pequeñas cantidades de cálices deshidratados en agua acidificada con HCl (0.01%) durante 12 h a 4 °C. Posteriormente los cálices fueron removidos y la solución con el pigmento fue filtrada a través de un papel filtro Whatman No. 1 para eliminar los sólidos suspendidos y precipitados. Las soluciones fueron concentradas en un rotavapor Buchi (R-114, Buchi Labor Technik AG, Essen, Alemania) a no más de 35°C y bajo presión reducida.

6.5.1.a Determinación cuantitativa de antocianinas monoméricas totales (AMT)

Para la obtención de la concentración de la antocianina se utilizó el método de pH diferencial. La antocianina experimenta una transformación reversible con los cambios de pH manifestado por un cambio en la absorbancia. La forma oxonium predomina a pH

1 y el hemiacetal a pH 4.5. El pH diferencial es un método basado en esta reacción, y permite una rápida y exacta medida de la antocianina total, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y de otros compuestos interferentes (Liu y col., 2002). Para la obtención de la concentración de antocianina se utiliza la expresión de pH diferencial (Ecuación 5):

$$A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda 700})_{pH1} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda 700})_{pH4.5} \quad (5)$$

Donde $A_{vis-max}$ es la absorbancia del pico más alto a pH 1 y pH 4.5 en el espectro visible ($\lambda = 400-700$ nm), $A_{\lambda 700}$, es la absorbancia a 700nm para pH 1 y pH 4.5. Para calcular la concentración en la muestra original se utiliza la siguiente Ecuación (6):

$$\text{Antocianina monomérica (mg/L)} = (A \cdot \text{Peso molecular} \cdot FD \cdot 1000) / (\epsilon \cdot 1) \quad (6)$$

A = Absorbancia antes calculada.

FD= Factor de dilución.

ϵ = Coeficiente de extinción molar.

Una vez realizado esto, se evaluaron nuevamente las antocianinas con UV-VIS para saber si todavía se encontraban en su forma monomérica. Para esto se comparó el patrón típico del espectro de antocianinas en donde a pH 4.5 el pico predominante para cianidina-3-glucósido en 506 o cercano no debe aparecer. Si aparece significa que las antocianinas se encuentran en su forma polimerizada y no se degradan a pH básico (Giusti y Wrolstad, 2003). La cianidina-3-glucósido tiene un $\epsilon = 26,900 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$, con una absorbancia característica entre 490-550 nm y un peso molecular de 449.2 g/mol.

6.5.1.b Contenido de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se realizó de acuerdo al método propuesto por Singleton y Rossi (1965) utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se colocaron 1.58 mL

de agua destilada en un tubo de ensayo con rosca y se añadieron 20 μ L del extracto de Jamaica (Antocianinas) junto con 100 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, mezclando vigorosamente en un vortex y se dejó reposar por 8 min. Posteriormente se añadieron 300 μ L de una solución de carbonato de sodio 20% (p/v), los tubos se colocaron en un baño a 40 °C durante 30 min. Se realizaron las lecturas de absorbancia a una $\lambda=765$ nm. Se generó una curva de calibración con ácido gálico como estándar, reportando los resultados como equivalentes de ácido gálico (EAG).

6.5.1.c Actividad antioxidante por ABTS

Se preparó una solución 7 mM del radical ABTS* y se mezcló con una solución de $K_2S_2O_8$ 2.45 mM (concentración final) y se dejaron reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h antes de su uso. La solución de ABTS fue diluida en EtOH hasta alcanzar una absorbancia de 0.70 ± 0.01 UA a una $\lambda=730$ nm. Se colocó 1 mL de solución etanólica estándar y/o de extracto y se agregaron 3.9 mL de la solución diluida de ABTS*. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar en un baño a 40 °C durante 30 min. Posteriormente se leyeron las absorbancias a $\lambda=730$ nm (Pellegrini y col., 2000). Se utilizó Trolox para la realización de la curva patrón, reportando la actividad antioxidante como Actividad Equivalente a Trolox (TEAC).

6.5.2 Aislamiento de antocianinas

El extracto acuoso concentrado fue sometido a un proceso de separación por cromatografía en columna utilizando la resina Amberlite XAD-16 para la purificación de compuestos polares. La resina fue activada a través de dos lavados consecutivos con agua y MeOH acidificado respectivamente. Posteriormente se hizo un lavado con una cantidad excesiva de MeOH acidificado (fase móvil) y se procedió a colocar la resina desgasificada en una columna de vidrio de 2.5 d.i. x 50 cm. 5 mL del extracto concentrado fue colocado cuidadosamente con ayuda de una varilla de vidrio sobre la parte superior de la resina, ajustando un flujo de elución de 1 mL/min. El material adsorbido fue eluido con la misma fase móvil hasta que el eluyente fue incoloro, se colectaron fracciones de 5 mL y se les determinó la absorbancia a 520 nm. Se obtuvo una fracción rica en

antocianinas la cual fue concentrada en un rotavapor a 40 °C bajo presión reducida hasta sequedad y redisuelta en una pequeña cantidad de MeOH acidificado. Este extracto fue almacenado a 4°C durante 2 días o hasta observar la formación de un precipitado rojo en condiciones de atmósfera de N₂ y oscuridad. Posteriormente, cada precipitado fue sometido a un nuevo fraccionamiento por filtración en gel para compuestos polares utilizando una columna empacada con el gel Sephadex LH20, empleando EtOH como fase móvil. Las fracciones eluidas fueron colectadas en frascos ámbar y monitoreadas por Cromatografía en Capa Fina (CCF) y HPLC.

6.5.3 Determinación cualitativa de antocianinas por CCF

El análisis cualitativo de las antocianinas consistió en la separación de los compuestos fenólicos de acuerdo a su polaridad. Se utilizó un cromatofolio de sílica gel 60F₂₅₄ (Merck) de 6 cm x 3 cm. Se aplicaron aproximadamente 30 µL del extracto de Jamaica y de los estándares de Cloruro de cianidina, Delfinidina y Malvidina (Extrasynthese, Genay, Francia) a 1 cm del borde inferior de la placa. La fase móvil utilizada fue 2-propanol-acetona - agua (70:10:20 v/v) (Cimpoi, 2006), permitiendo la saturación de la cámara cromatográfica (diámetro: 2.42 cm, altura: 6.71 cm). Posteriormente la placa cromatográfica se colocó en la cámara, donde permaneció hasta que la fase móvil recorrió aproximadamente 5 cm a partir del origen. La placa desarrollada se secó con aire caliente y se visualizó con luz visible, y se determinó el valor del factor de retención (R_f), definido como la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación respecto a la distancia que recorre el solvente hasta el frente del eluyente de cada componente.

6.5.4 Identificación de antocianinas por HPLC

Se utilizó el método reportado por Sukwattanasinit, Burana-osot y Sotanaphum (2007) para la identificación de las antocianinas presentes en el extracto de flor de Jamaica purificado. Alícuotas de 25µL fueron inyectados en un sistema HPLC Agilent serie 1100, con detector de arreglo de diodos, integrados a un software Agilent Chem Station. Se utilizó una columna Econosil C18 5u (Alltech Associates, Inc., Deerfield, Il.,

E.U.A.). Las muestras se eluyeron utilizando una fase móvil de 4% H₃PO₄ (A) y 100% CH₃CN (B) utilizando condiciones isocráticas con 6% de B de 1-10min, posteriormente un gradiente lineal hasta 20% de B de 10-55 min, y finalmente una elución isocrática a 20% de B de 55-60 min. El flujo de operación fue de 1mL/min a 30°C y la detección se realizó a 520nm.

6.6 Formación de los complejos intermoleculares

6.6.1 Determinación del potencial zeta

Se prepararon soluciones acuosas al 1% (p/p) de GM y de sus fracciones, soluciones al 0.5 % (p/p) de los principales aminoácidos encontrados en estos polisacáridos y se almacenaron a 4°C durante 24 h para permitir su completa hidratación. De la misma manera, se prepararon soluciones acuosas de los extractos purificados de antocianinas. El potencial zeta de las soluciones acuosas de los biopolímeros así como del extracto de antocianinas se determinó a diferentes valores de pH usando un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). El pH de las soluciones acuosas de los biopolímeros fue ajustado mediante la adición HCl 0.1N y/o NaOH 0.1N. Se construyeron gráficas de potencial zeta contra pH y a partir de éstas se determinó el valor de pH donde existe la máxima diferencia estequiométrica de cargas electrostáticas entre los polisacáridos y las antocianinas.

6.6.2 Determinación del número de equivalentes iónicos

Se generaron curvas de titulación de las soluciones de biopolímeros (1.5% p/p) y de las fracciones de extracto purificado de flor de Jamaica mediante la adición de alícuotas de 0.5 mL de NaOH 0.1N, y registrando el cambio de pH con un potenciómetro Vernier pH-BTA (Beaverton, OR, EUA). El punto de equivalencia fue determinado a partir del punto de inflexión de la curva del cambio de pH en función del cambio de volumen de NaOH agregado ($\Delta\text{pH}/\Delta V$).

6.6.3 Determinación de los parámetros cinéticos y termodinámicos

Se colocaron soluciones 1 mM de aquellos aminoácidos que se encontraron en mayor concentración en GM, de igual manera se prepararon soluciones de GM y de sus fracciones. De las fracciones de extracto purificado, se eligió aquella que presentó la presencia de una sola antocianina para llevar a cabo la interacción con los aminoácidos y con los biopolímeros, y se preparó una solución 10 mM en un buffer fosfato-citrato ajustado al valor de pH donde se encontró la mínima diferencia estequiométrica de carga debida al potencial zeta de cada una de las mezclas.

Se utilizó un calorímetro de titulación isotérmica Nano ITC (TA Instruments, Delaware, E.U.A) para la determinación de los cambios entálpicos asociados con las interacciones proteína (entiéndase como GM y sus fracciones, y/o aminoácidos) – antocianina a 30 °C, debido a que pruebas preliminares demostraron que a esta temperatura se obtuvieron los mejores ajustes de los modelos de interacción. En cada experimento realizado se colocó 1 mL de la solución de proteína (GM, Fi, aminoácido) en la celda de medición del instrumento y la solución de antocianinas se colocó en una jeringa de inyección de 250 μ L. La solución de biopolímero fue titulada en la celda de la muestra con una secuencia de 15 inyecciones de alícuotas de 15 μ L. Cada inyección tuvo un intervalo de reposo de 5 min para alcanzar el equilibrio, con una velocidad de agitación de 400 rpm para asegurar un mezclado adecuado.

Los datos crudos se obtienen con un gráfico de flujo de calor (μ cal/s) vs tiempo (min), como se describió en el Capítulo 2. Estos datos se integraron y normalizaron para obtener un gráfico del cambio de entalpía por mol de inyectante (ΔH_{obs} , kJ mol⁻¹) en función de la relación (antocianina/proteína). Valores negativos de ΔH_{obs} representan cambios exotérmicos, y positivos representan cambios endotérmicos. Para la integración, normalización de los picos y la determinación de los parámetros cinéticos, se utilizó el software de análisis del equipo (Nano ITC Run, TA instruments, E.U.A). Para propósitos de normalización se consideraron los pesos moleculares obtenidos por GPC

para los biopolímeros y los reportados en la literatura para cada uno de los aminoácidos y de la antocianina seleccionada.

6.6.4 Caracterización de los complejos intermoleculares

6.6.4.a Análisis elemental

Se determinó el análisis elemental del complejo obtenido de acuerdo con el procedimiento mencionado en la sección 6.4.5.

6.6.4.b Resonancia magnética nuclear (H^1 - RMN)

Todos los experimentos de H^1 - RMN fueron realizados a 25 °C usando un espectrómetro Bruker AMX-500. Los espectros fueron procesados utilizando el software Spin Works (versión 3.1.0, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Departamento de Química, Universidad de Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canadá). Los espectros unidimensionales fueron obtenidos de 0.5 mL de soluciones de GM y sus fracciones (~0.2 mM) disueltas en mezclas de agua deuterada $H_2O/[^2H_6]$ dimetil sulfóxido ($[^2H_6]$ DMSO) (9:1) ó $2H_2O/[^2H_6]$ DMSO (9:1) en 12 mM PBS a pH 7.4. Para la investigación de los complejos intermoleculares proteína-antocianina se utilizaron las mismas condiciones. Todas las muestras se dejaron hidratar por 24 h para asegurar su solubilidad total.

6.7 Funcionalidad de los complejos intermoleculares

6.7.1 Reología interfacial

Para la determinación de las propiedades funcionales de las fracciones de GM se les determinaron sus propiedades interfaciales, ya que como se ha mencionado, la GM sin fraccionar posee propiedades emulsionantes semejantes y aún superiores a las de la goma arábiga, por tal motivo los estudios de reología interfacial son útiles como una forma de corroborar que el fraccionamiento y el acomplejamiento no tiene influencia negativa sobre las propiedades funcionales.

Se utilizó un reómetro modular compacto Paar Physica MCR 300 (Anton Paar, Ostfildern Alemania) que trabaja bajo control de esfuerzo y/o deformación, al cual se le adaptó una geometría tipo bicono, con dimensiones de radio R_b de 15 mm y doble ángulo (2α) de 10° . Para el control de temperatura, se utilizó un baño refrigerante de acrílico con radio R_c de 27 mm y una profundidad H de 34 mm a una temperatura de 30°C . Una vez que el equipo fue montado y puesto en marcha, se procedió a formar la interfase aceite-agua. Se adicionaron 30 mL de una solución acuosa de biopolímeros (1% p/p) sobre el baño refrigerante, posteriormente la geometría del bicono se bajó lentamente hasta ubicarse en la interfase agua-aire. Para formar la interfase agua-aceite, se adicionaron cuidadosamente 30 mL de la fase oleosa goteando cuidadosamente sobre la geometría hasta cubrir completamente la fase acuosa. La verificación de la posición del bicono en la interfase agua-aceite se realizó observando que no se formaran anillos alrededor del bicono cuando un haz de luz se hizo pasar en forma tangencial a través de la interfase (Pérez-Orozco y col., 2004)

6.7.2.a Viscosidad interfacial

Para la determinación de la viscosidad interfacial se hizo girar el bicono a una velocidad angular constante (Ω) de 1.27×10^{-3} rad/s; se midieron el ángulo de desplazamiento del bicono en función del tiempo ($\theta(t)$) y el momento de fuerza (M) necesario para mantener dicha velocidad, cada 10 s durante 15 min. Estos valores fueron utilizados para evaluar la viscosidad aparente interfacial (η^{int}), la deformación de la interfase (γ^{int}) y el esfuerzo de cizallamiento interfacial (σ^{int}) mediante las siguientes expresiones:

$$\eta^{int} = \frac{M}{4\pi\Omega} \left(\frac{1}{R_b^2} - \frac{1}{R_c^2} \right) \quad (7)$$

$$\gamma^{int}(t) = \frac{2R_b^2}{(R_c^2 - R_b^2)} \Omega t \quad (8)$$

$$\sigma^{int} = \frac{M}{2\pi r^2} \quad (9)$$

donde r es la posición radial en la interfase con $R_b \leq r \leq R_c$, y $\Omega t = \theta(t)$ es el desplazamiento angular del bicono determinado por el equipo.

6.7.2.b Determinación de las propiedades de fluencia interfacial (Creep compliance)

Una vez establecida la interfase agua-aceite o agua-aire, se aplicó un momento de fuerza constante de 0.5 μNm durante 15 min, y posteriormente se aplicó un momento de fuerza de magnitud cero (15 min). Se midió el ángulo de desplazamiento del bicono cada 10 s y se evaluó la deformación y esfuerzo de cizallamiento interfacial con las Ecuaciones 8 y 9, con estos valores se calcularon los parámetros de capacitancia del sistema ($J(t)$) mediante las siguientes expresiones:

$$J(t) = \frac{\gamma^{int}(t)}{\sigma^{int}} \quad (10)$$

$$J(t) = J_0 + J_m \left(1 - e^{-t/t_m}\right) + J_N \quad (11)$$

6.8 Análisis Estadístico

Los resultados experimentales fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey de comparación de medias, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, utilizando el software estadístico SPSS (IBM Co., EUA, 2001).

CAPÍTULO 7

7. RESULTADOS

7.1 Fraccionamiento de GM por HIC

El fraccionamiento de GM por HIC mostró que esta goma está constituida por tres fracciones principales como se muestra en la Figura 7.1.

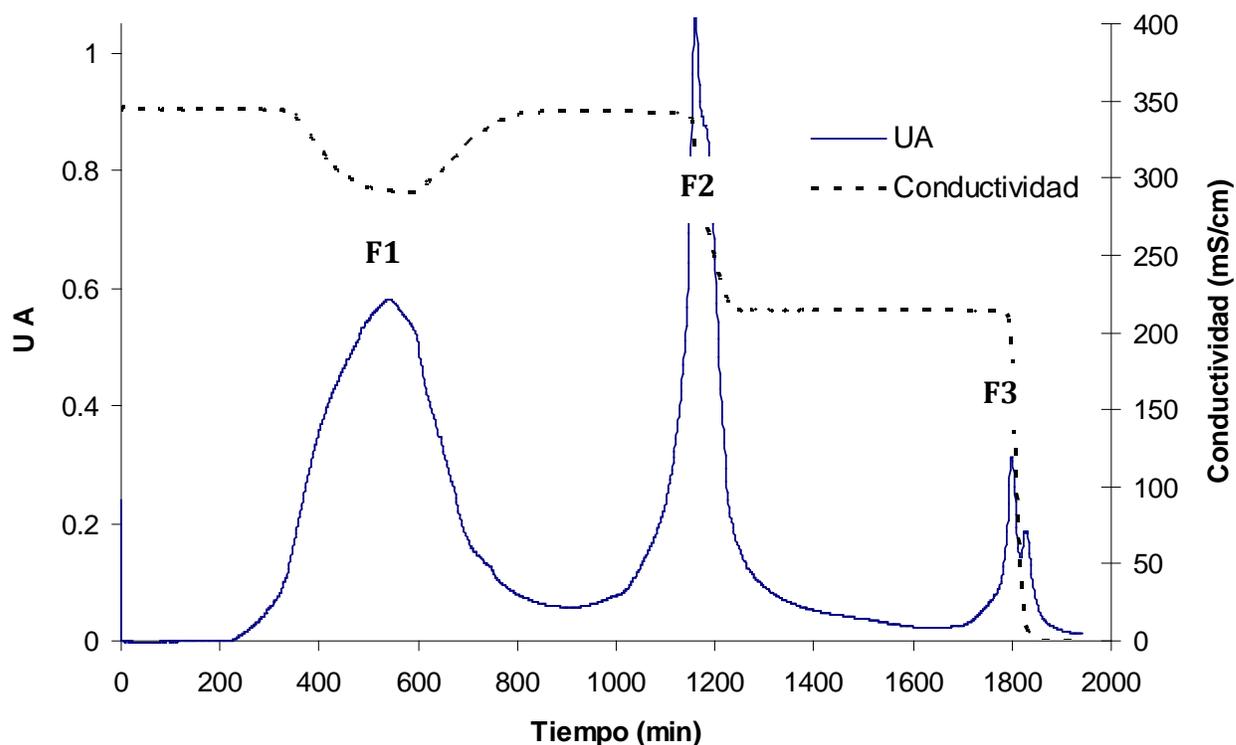


Figura 7.1. Cromatograma del fraccionamiento de GM por HIC.

Los resultados obtenidos presentan un comportamiento semejante al reportado para la goma Arábica (Randall y col., 1995; Ray y col., 1989) y para la goma de mezquite (Orozco-Villafuerte y col., 2003; Vázquez-Ortíz y col., 2006; López-Franco y col., 2008).

La elución de cada una de las fracciones de GM dependió de su carácter hidrófobo de manera creciente de acuerdo con la fase móvil utilizada: 4.2 M NaCl para F1 con la menor

hidrofobicidad debido a un mayor contenido de polisacáridos, 2 M NaCl para F2 con una hidrofobicidad intermedia debido a un incremento en el contenido de proteína y finalmente agua desionizada para F3 con un carácter predominantemente hidrofóbico debido a su alto contenido de proteína. La recuperación total de cada una de las fracciones fue de 85 , 11 y 3.7 % (p/p), del material originalmente aplicado a la columna, para F1, F2 y F3 respectivamente.

7.2 Distribución de pesos moleculares de GM y sus fracciones

Las fracciones de GM fueron sometidas a una cromatografía de filtración en gel para la estimación de sus pesos moleculares. El fraccionamiento de cada una de las fracciones originó diferentes perfiles, F1 mostró tres fracciones con un peso molecular dentro del intervalo de $2.27 - 5.23 \times 10^5$ g/mol (Figura 7.2 a). La segunda fracción de GM presentó un perfil cromatográfico con menor resolución que para F1, al presentar un pico principal y la presencia de un hombro a tiempos de elución relativamente cortos y la sobreposición de un segundo pico a tiempos mayores (Figura 7.2 b), el peso molecular de F2 se encontró entre $2.29 - 6.03 \times 10^5$ g/mol. Finalmente, F3 tuvo un fraccionamiento completamente diferente a los presentados por F1 y F2, debido a la presencia de un pico máximo a tiempos largos (pesos moleculares más pequeños), un hombro y un pico menor traslapados a tiempos cortos (pesos moleculares grandes) como se muestra en la Figura 7.2 c, su peso molecular se encontró entre $1.81 - 6.40 \times 10^5$ g/mol. Este tipo de técnica es muy útil sobre todo por la gran variedad y alto peso molecular que este tipo de biopolímero presenta. En el Anexo 1 se detalla el principio de esta técnica.

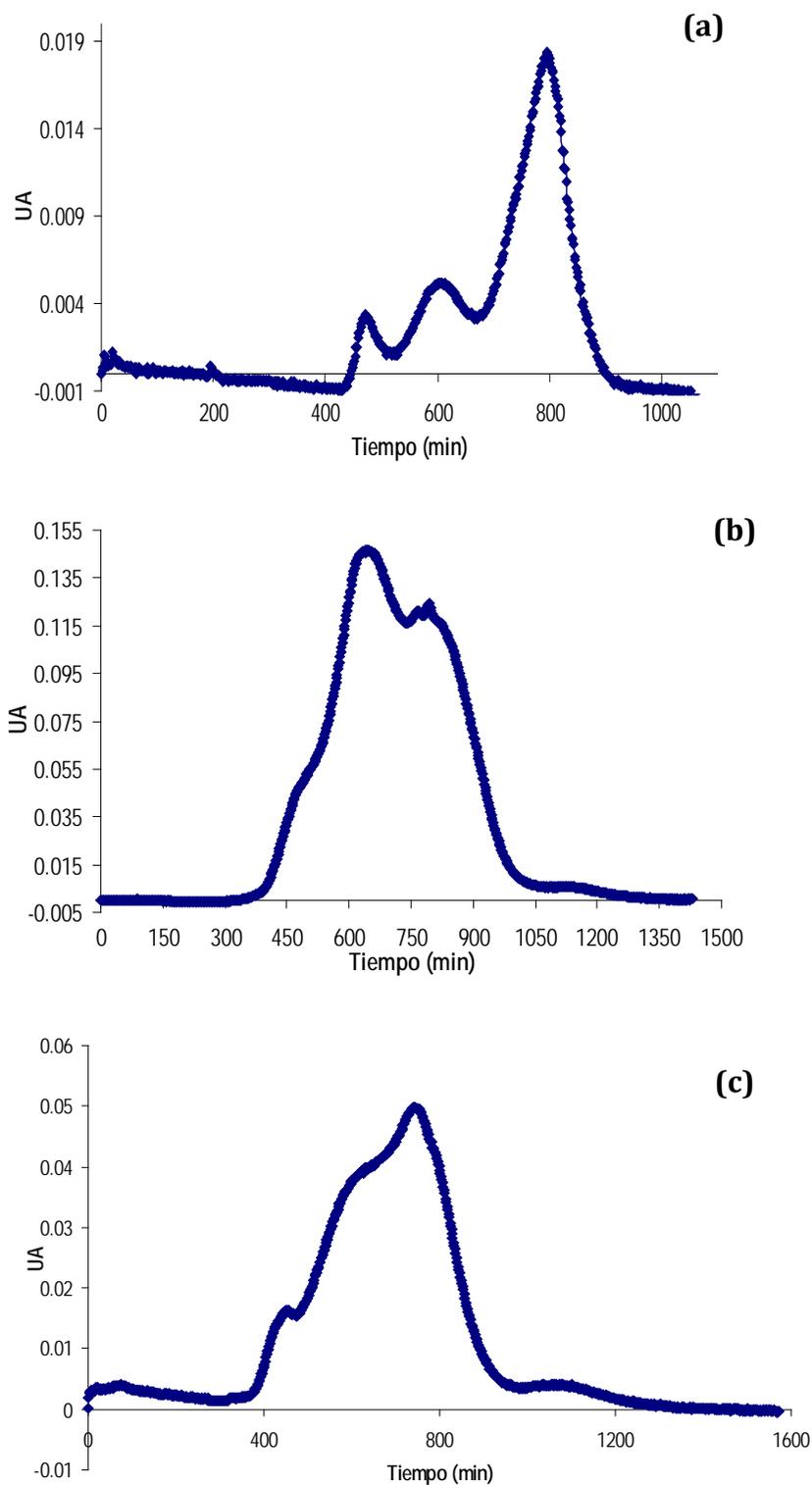


Figura 7.2. Perfiles de elución de: a) F1, b) F2 y c) F3 para la determinación de la distribución de pesos moleculares por GPC.

Cabe mencionar que al determinar el diámetro hidrodinámico por difracción de rayo láser a la GM y a las dos fracciones mayoritarias se encontraron perfiles semejantes los obtenidos por GPC (Figura 7.3 a – c). En los cuales se puede apreciar que por ambas técnicas, las fracciones de GM mostraron tamaños promedio tanto en peso molecular por GPC como en su diámetro hidrodinámico, menores que los obtenidos para GM.

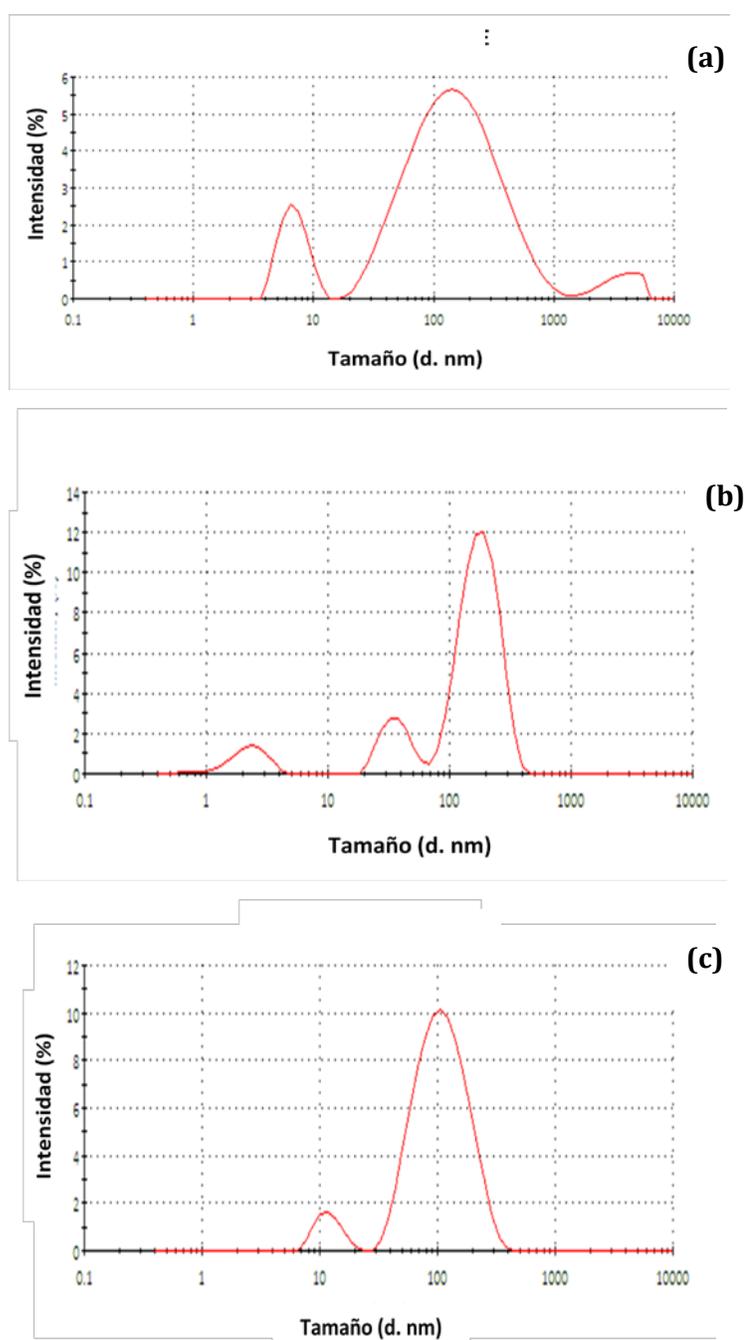


Figura 7.3. Distribución de diámetro hidrodinámico de: a) GM, b)F1 y c) F2

Los diámetros hidrodinámicos encontrados para GM fueron $d_{1GM} = 6.99$ nm, $d_{2GM} = 194.80$ nm y $d_{3GM} = 3371.02$ nm; para F1 $d_{1GM} = 2.29$ nm, $d_{2GM} = 37.44$ nm y $d_{3GM} = 183.80$ nm y F2 con $d_{1GM} = 12.06$ nm, $d_{2GM} = 119.08$ nm. Cada uno de estos valores representa el valor medio de cada pico encontrado en las distribuciones de diámetro hidrodinámico de la Figura 10.

7.3 Caracterización fisicoquímica de la GM y sus fracciones

En la Tabla 7.1 se muestran los resultados obtenidos para el análisis fisicoquímico de la GM y sus fracciones. De esta Tabla puede observarse que el fraccionamiento de la GM por HIC no sólo generó tres fracciones con peso molecular y distribución de diámetro hidrodinámico diferentes, sino además de composición química distinta. Se encontró que F1 posee un alto contenido de azúcares y el más bajo contenido de proteína con una relación Carbohidrato/Proteína (CH/Pr) de 123.00, mientras que F2 al igual que F1 presenta mayor contenido de fracción carbohidrato, sin embargo con un CH/Pr de 4.84. Por otra parte, F3 presentó el mayor contenido de proteína y la relación CH/Pr fue de 1.26, comparados con la CH/Pr de la GM de 18.64.

El contenido de humedad no presentó diferencias significativas entre las muestras, el contenido de ácido glucurónico disminuyó significativamente conforme el contenido de proteína iba aumentando.

Los resultados obtenidos son comparables con los reportados por Orozco-Villafuerte y col. (2003) y Randall y col. (1989) para la GM y GA respectivamente. En ambos casos se observa una tendencia semejante donde el contenido de azúcares decrece de F1 a F3 y el de proteína aumenta.

Tabla 7.1. Propiedades fisicoquímicas de la GM y sus fracciones.

	GM	F1	F2	F3
Datos Experimentales				
Peso Molecular por GPC (g/mol)	2.12x10 ⁶	5.23x10 ⁵	3.82 x10 ⁵	1.81x10 ⁴
Humedad (g/100g)	7.16 ± 2.16 a	9.23 ± 1.28 a	7.68 ± 1.76 a	8.32 ± 1.15 a
Cenizas (g/100g)	1.88 ± 0.02 a	1.98 ± 0.19 a,b	2.43 ± 0.33 b	ND
Azúcares totales (g/100g)	90.96 ± 6.89 a	93.49 ± 6.82 a	78.85 ± 4.52 b	58.16 ± 7.57 b
Ácido Glucurónico (g/100g)	23.27 ± 0.16 a	22.19 ± 2.04 a	14.54 ± 0.92 b	10.60 ± 0.52 c
Proteína (g/100g)	4.88 ± 0.52 c	0.76 ± 0.16 d	16.29 ± 0.01 b	46.21 ± 3.34 a
Datos reportados por Orozco – Villafuerte y col. (2003)				
Azúcares totales (g/100g)	87.3 ± 6.3	99.9	a 99.9 b 94.9	a 86.1 b 69.1
Ácido Glucurónico (g/100g)	16.2 ± 1.3	NR	NR	NR
Proteína (g/100g)	2.70 ± 0.06	0.04	a 0.01 b 5.01	a 13.8 ± 0.1 b 30.8 ± 1.6

ND. Datos no determinados. NR. Datos no reportados.

Todos los resultados están expresados en base seca.

Letras diferentes en la misma fila representan diferencia significativa entre las medias.

El análisis de monosacáridos y aminoácidos presentes en la GM y sus fracciones se muestra en la Tabla 7.2. Puede notarse que los valores obtenidos para los contenidos de los diferentes monosacáridos en la GM mantienen una relación Arabinosa/Galactosa (Ara/Gal) que oscila entre 2.8 y 3.1, mientras que los valores reportados para GA por Vázquez-Ortíz y col. (2006) son superiores para Galactosa pero menores para Arabinosa y con una relación Arabinosa/Galactosa menor a 1.

Tabla 7.2. Composición de monosacáridos, aminoácidos y análisis elemental (C, H y N) en la GM y sus fracciones.

Monosacáridos recuperados (%)					
	GA*	GM	F1	F2	F3
Galactosa	36.2	26.57 a	26.40 a	23.78 c	24.58 b
Arabinosa	30.5	73.19 a	73.28 a	72.76 b	71.87 c
Glucosa	NR	0.03 a	0.14 b	1.6 c	2.27 d
TOTAL		99.79	99.82	98.14	98.72
Ara /Gal	0.84	2.75	2.78	3.06	2.92
Aminoácidos recuperados (#residuos/1000 residuos)					
Alanina	28.0	35.0	13.6	55.7	1371.4
Arginina	5.0	16.0	23.5	12.8	501.3
Ac. Aspártico	50.0	50.0	8.8	125.0	278.0
Cisteína	0.0	3.0	3.4	0.0	14.9
Ac. Glutámico	29.0	26.0	13.0	30.2	1358.7
Glicina	41.0	33.0	9.6	95.8	1107.1

Histidina	44.0	35.0	4.8	202.8	525.0
Hidroxi prolina	328.0	376.0	53.2	2668.7	2090.9
Isoleucina	12.0	20.0	7.0	26.0	840.0
Leucina	67.0	35.0	5.8	148.8	875.0
Lisina	23.0	23.0	4.3	53.0	898.6
Metionina	1.0	2.0	0.5	0.0	0.0
Fenilalanina	22.0	12.0	0.7	1.2	76.5
Prolina	88.0	79.0	17.6	74.6	1238.8
Serina	136.0	113.0	27.7	145.0	2135.2
Treonina	76.0	49.0	10.6	59.3	829.9
Tirosina	10.0	32.0	4.8	7.9	233.8
Valina	36.0	61.0	14.5	21.3	1085.3

Análisis elemental (%)

C	ND	40.70	40.73	40.56	39.89
N	ND	0.94	0.68	1.77	2.64
H	ND	6.01	5.55	5.39	5.32

ND. Datos no determinados. NR. Datos no reportados. * Datos tomados de Vázquez-Ortíz y col. (2006).

El perfil de aminoácidos de la GM, F1, F2 y F3 mostró que de los aminoácidos monitoreados, sólo 7 fueron los que presentaron una mayor concentración (aquellos que aparecen sombreados en la Tabla 7.2), dentro de los cuales se encuentran cuatro aminoácidos de carácter predominantemente aniónico como la lisina, alanina, prolina e hidroxiprolina. Se ha reportado que estos últimos tienen una fuerte interacción con

diversos tipos de compuestos fenólicos (Cordoniu-Hernández y col., 2003; 2007), siendo ésta una razón que nos permite asegurar la interacción de estos biopolímeros con compuestos como las antocianinas para la formación de complejos intermoleculares. Por otra parte cabe mencionar que la concentración de aminoácidos encontrados en la GM y en la GA fue semejante, sin embargo se encontraron diferencias entre las diferentes fracciones de GM. Cabe mencionar que F2 presentó el mayor contenido de hidroxiprolina comparada con GM, GA y el resto de las fracciones, en algunos casos como alanina y ácido aspártico el contenido fue el doble del encontrado en la goma entera y en algunos otros como la Fenilalanina y la Treonina la concentración se vio desfavorecida. Estas variaciones pueden deberse a la disponibilidad de los residuos de aminoácidos expuestos durante el fraccionamiento por interacción hidrofóbica, y al rearrreglo molecular de GM debido a las diferentes fuerzas iónicas (diferentes concentraciones de NaCl).

De acuerdo con el análisis elemental de la GM, F1, F2 y F3, se encontró que los contenidos de C y H permanecieron casi constantes, siendo el contenido de N donde se encontró la mayor variación. F1 presentó el menor contenido y F3 la mayor cantidad de N elemental. Estos resultados están perfectamente relacionados con los encontrados en el análisis bromatológico al obtener un mayor contenido de proteína, y por ende de aminoácidos, y que se relacionan directamente con el principio físico del método de fraccionamiento utilizado, en el cuál las últimas fracciones en eluir son aquellas ricas en fracciones hidrófobas, y que en el caso específico de GM se refiere a fracciones ricas en proteína.

7.4 Obtención de los extractos de flor de Jamaica

Como resultado de la extracción de antocianinas a partir de cálices deshidratados de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), se obtuvo una solución de color rojo brillante,

típica de los compuestos antocianos y de las infusiones de esta planta. De esta manera se procedió a la purificación y caracterización del extracto.

7.4.1 Caracterización de los extractos de flor de Jamaica

El contenido de antocianinas monoméricas totales, fenoles totales equivalentes a ácido gálico y la actividad antioxidante de los extractos crudos se muestran en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3. Antocianinas monoméricas totales (AMT), fenoles totales y actividad antioxidante por ABTS del extracto crudo de flor de Jamaica.

Fuente	AMT (mg _{AMT} /g _{sólidos})	Fenoles Totales (mg _{EAG} /g _{sólidos})	Actividad Antioxidante
Extracto crudo de flor de jamaica	28.52 ± 0.15	70.56 ± 0.01	0.59 ± 0.01 mM _{TEAC} 44.72 ± 0.62% inhibición _{ABTS}
Extracto de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.*	NR	66.10	0.33 ± 0.40
Té negro**	NA	62.08	0.64

NR = No reportado, NA= No Aplica. * Datos reportados por Lee y col. (2003). ** Datos reportados por Sáyago-Ayerdi y col. (2007).

Como puede observarse los contenidos de fenoles totales y actividad antioxidante que presentó el extracto crudo son superiores a los valores reportados para extractos acuosos de la misma fuente vegetal y por una de las fuentes más reconocidas por sus propiedades antioxidantes como es el té negro. Cabe mencionar que pruebas preliminares demostraron que estas propiedades funcionales se pierden en un tiempo relativamente corto (24 h).

La identificación de las antocianinas presentes en el extracto crudo se realizó por cromatografía en capa fina, de acuerdo con el factor de retención (R_f) obtenido para cada estándar probado, se encontraron dos bandas en el extracto con un R_f de 0.26 y 0.34

respectivamente, donde la primera correspondió al valor reportado por Sukwattanasinit y col. (2007). Los valores de R_f para los estándares de cloruro de cianidina y cloruro de delphinidina fueron de 0.87 y 0.84 respectivamente. Estas diferencias con la muestra y con el extracto pueden deberse a la mejor y más rápida difusión de los compuestos aglicona respecto a los compuestos que están unidos a una molécula glicosilada sobre la placa de sílica. Por lo que para corroborar qué tipo de moléculas estaban presentes en los extractos, éstos fueron llevados a un análisis de HPLC.

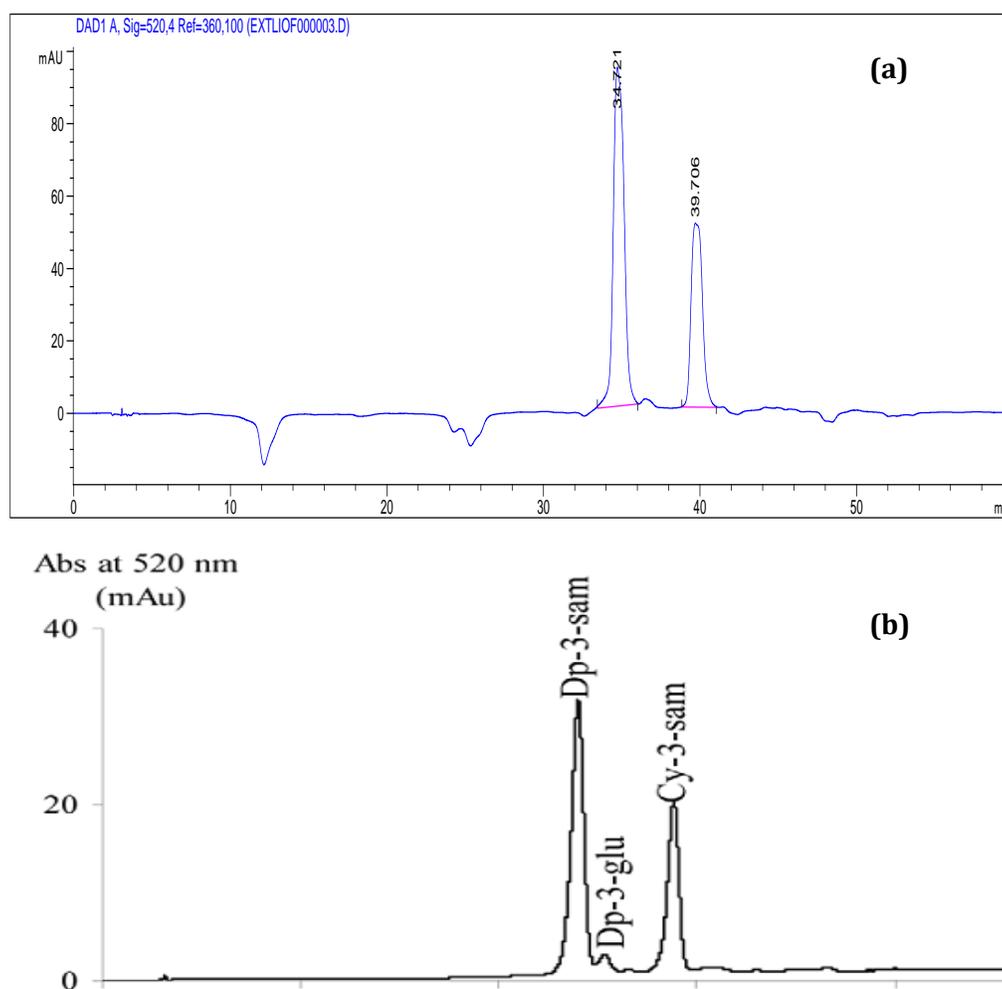


Figura 7.4. Perfiles de elución de extractos de flor de Jamaica: a) Datos experimentales, b) Datos reportados por Sukwattanasinit y col. (2007)

La Figura 7.4a muestra el cromatograma del extracto crudo donde puede apreciarse que dicho extracto está constituido por dos compuestos mayoritarios, los cuales al

compararlos con los reportados por Sukwattanasinit y col. (2007) presentan el mismo perfil de elución (Figura 7.4 b).

Debido a la gran semejanza de ambos perfiles, se puede asumir que los principales componentes en el extracto crudo de la flor de Jamaica corresponden a las antocianinas glicosiladas Delfinidina-3-sambubiósido y Cianidina-3-sambubiósido respectivamente. Debido a la gran semejanza estructural que presentan ambos compuestos, y que el propósito de este trabajo es formar complejos intermoleculares, se hace necesaria la purificación y el aislamiento de cualquiera de estas antocianinas con la finalidad de reducir interferencias o reacciones de competencia entre ellas al estar en contacto con las fracciones proteicas de la GM, F1, F2, F3 y los aminoácidos libres y de esta manera tener un mejor entendimiento del tipo de interacciones existentes.

7.4.2 Fraccionamiento del extracto crudo de flor de Jamaica

La purificación del extracto crudo de flor de Jamaica para la obtención de una fracción rica en una sola antocianina fue realizado al hacer pasar el extracto crudo a través de un fraccionamiento cromatográfico en serie, como primer paso se utilizó una columna empacada con Amberlite XAD para realizar la separación de las antocianinas del resto de los compuestos fenólicos presentes en el extracto, mientras que el segundo paso correspondió al aislamiento de las antocianinas delfinidina- y cianidina-3-sambubiósido al pasar por la columna empacada con Sephadex LH20. Al finalizar el segundo fraccionamiento se colectaron 6 fracciones eluidas, a las cuales se les analizó el perfil cromatográfico de antocianinas (Figura 7.5).

Del total de las fracciones colectadas, únicamente la fracción 5 (F_{5A}) fue elegida para realizar las pruebas de interacción, debido principalmente a que presentó una mayor concentración de delfinidina-3-sambubiósido sobre la concentración de cianidina-3-sambubiósido, con lo cual se pretende apreciar de una mejor manera su interacción con las fracciones proteicas de los biopolímeros y con los aminoácidos.

Puede observarse que la fracción F_{2A} presenta el comportamiento opuesto a la fracción F_{5A}, sin embargo las relaciones de concentración entre ambas moléculas son

menores. Cabe mencionar que si se deseara trabajar con una fracción donde la concentración de las dos antocianinas se encuentren presentes y corroborar si hay reacciones de competencia, la fracción F_{3A} sería la ideal para tal propósito.

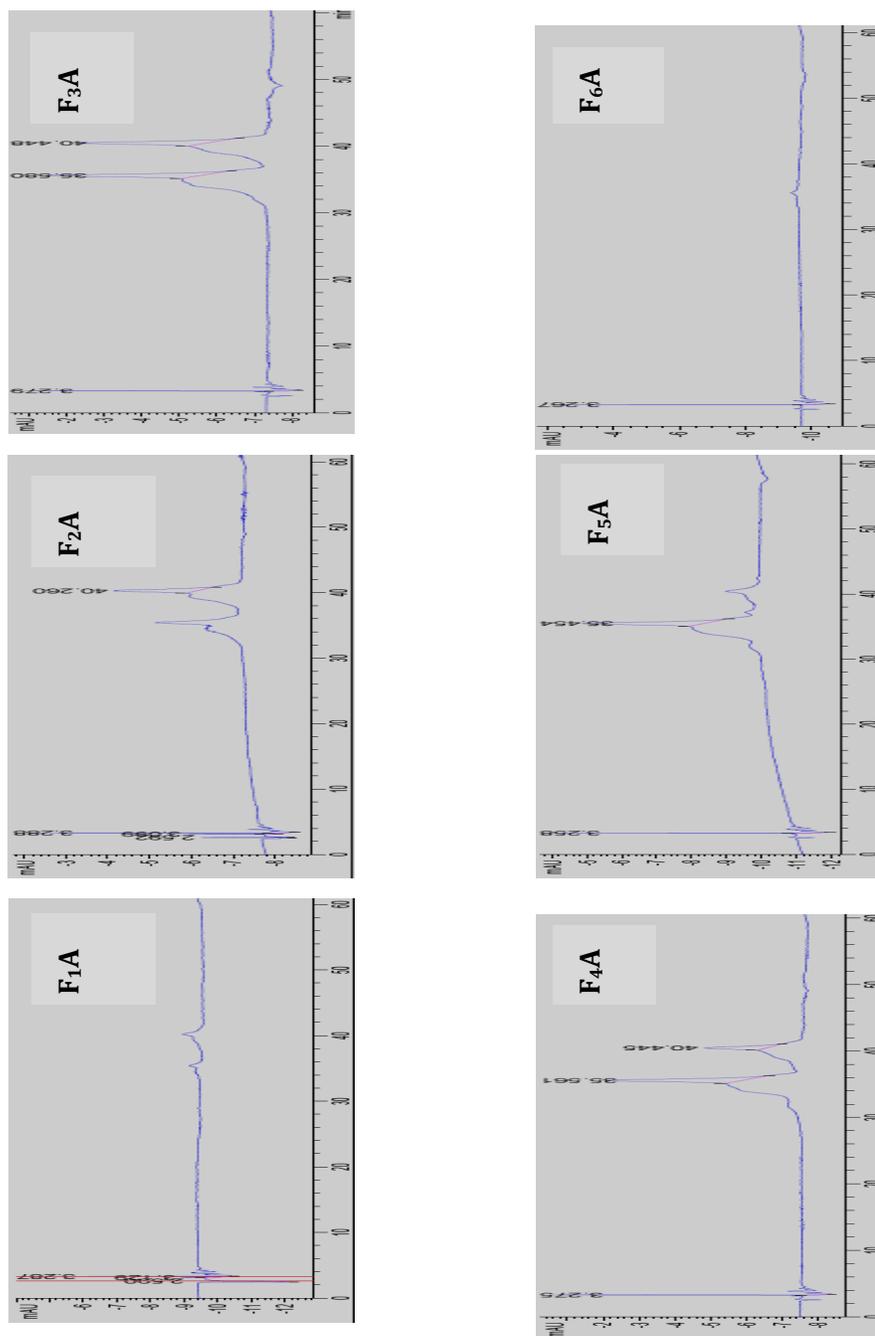


Figura 7.5. Perfiles cromatográficos de las fracciones de antocianinas (F_{iA}) después del proceso de purificación.

Puesto que ya se han caracterizado tanto los biopolímeros a estudiar, como los compuestos antocianos con los que van a dar lugar a interacciones intermoleculares, es momento de establecer las condiciones bajo las cuales se pudo realizar la estimación de los parámetros cinéticos y energéticos que gobiernan dicho fenómeno.

7.5 Formación de los complejos intermoleculares

7.5.1 Condiciones de interacción biopolímero-antocianina.

Debido a que se pretende que los complejos intermoleculares entre la GM, sus fracciones y las antocianinas se formen a través de interacciones electrostáticas, el procedimiento para determinar las condiciones bajo las cuales se pueden favorecer dichas interacciones es por medio de la obtención de la ventana de interacción de pH y del número de equivalentes iónicos que cada especie química presenta.

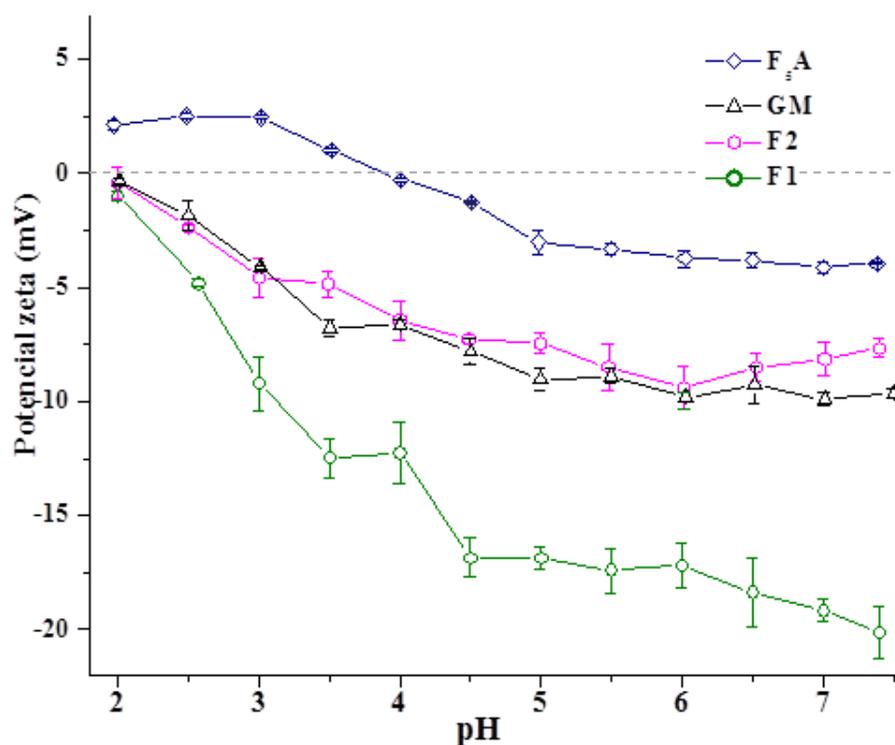


Figura 7.6. Ventana de interacción entre los biopolímeros y las antocianinas en función del pH.

En la Figura 7.6 se muestran los perfiles de potencial zeta vs pH para diferentes soluciones de biopolímeros, encontrándose que el pH donde se encuentra la mínima diferencia estequiométrica de grupos ionizables es alrededor del pH 3. Cabe mencionar que el perfil de F3 no aparece debido al bajo rendimiento de obtención y a la gran demanda de muestra que esta prueba requiere. Por otra parte se realizó la determinación del número de equivalentes químicos presentes en antocianinas y aminoácidos a través de una valoración ácido-base, encontrando las relaciones biopolímero-antocianina que se muestran en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4. Relaciones teóricas de los aminoácidos respecto a F₅A.

AMINOACIDO	# Equivalentes	Relación aa/F ₅ A
Prolina	56.4	4.8
Hidroxiprolina	57.3	4.9
Serina	44.3	3.8
Valina	93.7	7.9
Alanina	58.6	5.0
Treonina	80.5	6.8
Ac. Glutámico	150.1	12.7
Glicina	107.2	9.1
F₅A	11.8	1.0

Con estos resultados es posible determinar las relaciones teóricas entre los principales aminoácidos de GM y las antocianinas, lo cual puede permitir elucidar si los residuos de aminoácidos expuestos en la estructura molecular de GM y de las fracciones tienen o no interacción con F₅A.

7.5.2 Propiedades cinéticas y termodinámicas de la interacción intermolecular

La determinación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de la interacción intermolecular entre la GM, sus fracciones y las antocianinas, se realizó a través del uso de la técnica de calorimetría isotérmica de titulación (ITC). Como se mencionó en el capítulo anterior, se utilizaron las condiciones de pH y relaciones obtenidas durante la

determinación de la ventana de pH y número de equivalentes iónicos para cada una de las especies químicas involucradas.

La Figura 7.7 muestra los perfiles típicos obtenidos a partir de la interacción intermolecular entre los aminoácidos en presencia del ligando F₅A del extracto de flor de Jamaica.

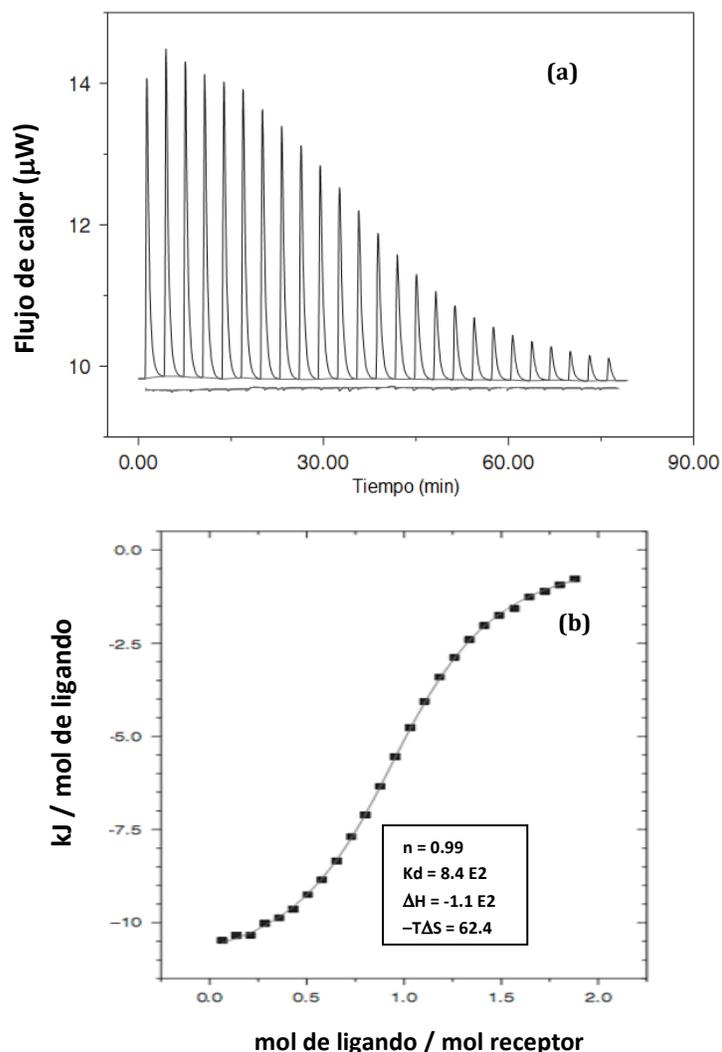


Figura 7.7. Experimento de titulación de Prolina con el ligando F₅A mediante ITC en fosfato citrato 10 mM, pH 3.0 a 30 °C. (a) Termograma de titulación formado por el flujo de calor liberado tras la inyección del ligando sobre el aminoácido. (b) Isotherma de unión correspondiente al experimento en (a), obtenida después de normalizar los calores de titulación y corregir los calores de dilución. Los datos experimentales se representan como viñetas, mientras que la línea continua corresponde al mejor ajuste para el modelo de “n” sitios de unión idénticos e independientes.

Los perfiles obtenidos para cada una de las muestras receptoras (aminoácidos) de F₅A presentaron comportamientos muy similares al de la Figura 7.6. Cabe mencionar que incluso para la GM, F2 y F3 mostraron comportamientos similares a las curvas de titulación de los aminoácidos (Figura 7.8 a). De acuerdo con la Figura 7.8 b, F1 mostró flujos de calor casi constantes para cada inyección (Figura 7.8 b), lo cual nos indica que la interacción entre F1 y F₅A no resultó ser favorable como para el resto de las muestras, lo cual se atribuye a su bajo contenido proteico.

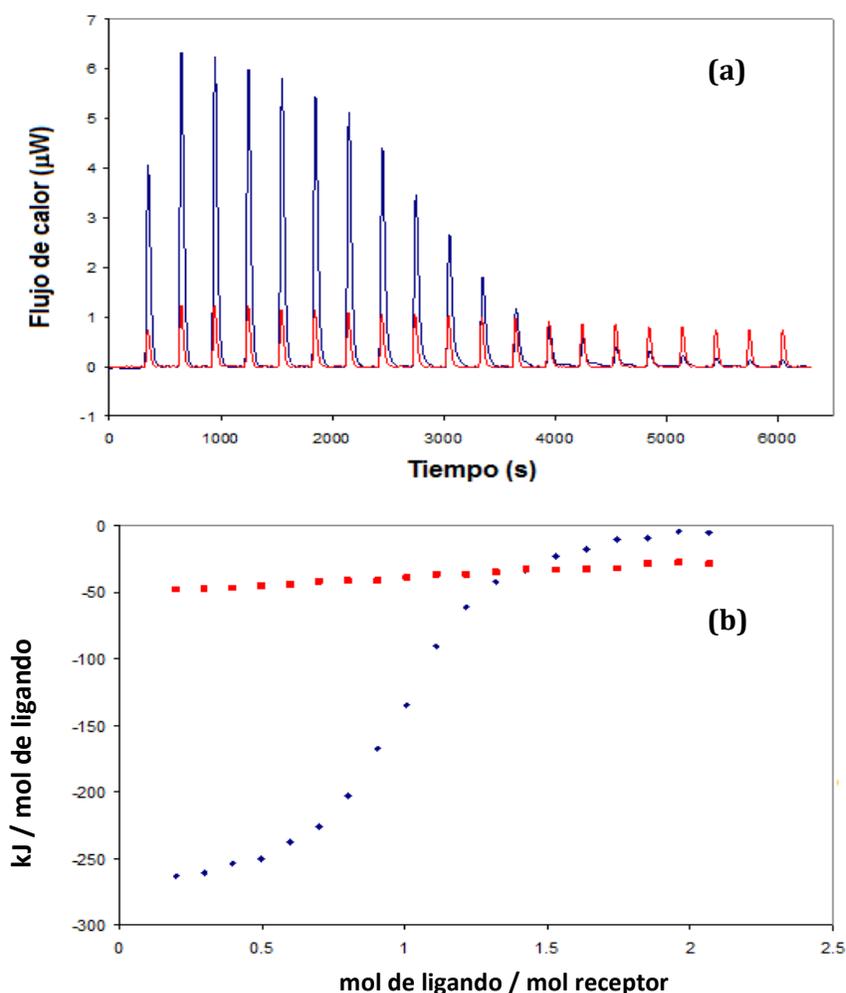


Figura 7.8. Perfiles de titulación de GM (azul) y F1 (rojo): a) Termograma de titulación formado por el flujo de calor liberado tras la inyección del ligando sobre el biopolímero. (b) Isotherma de unión correspondiente al experimento en (a), obtenida después de normalizar los calores de titulación y corregir los calores de dilución.

A pesar de que la ITC es una herramienta muy poderosa para estudiar la termodinámica de las interacciones proteína-ligando, las isothermas obtenidas deben ser interpretadas cuidadosamente, ya que los cambios entálpicos pueden deberse a la combinación de diferentes fenómenos como uniones de ligandos a proteínas, agregación de los complejos formados, cambios conformacionales del ligando y/o de la proteína, así como la auto- asociación/disociación de la proteína y/o del ligando (Frazier y col., 2003; Pascal y col., 2007).

De las curvas de titulación mostradas anteriormente, se determinaron las propiedades cinéticas y termodinámicas utilizando el modelo de 1 sitio de reacción para cada interacción aminoácido-F₅A y biopolímero-F₅A, los valores se muestran en la Tabla 7.5.

Tabla 7.5. Propiedades termodinámicas obtenidos mediante ITC para la interacción de los biopolímeros (GM, F1, F2, F3 y aminoácidos) con el ligando F₅A del extracto de flor de Jamaica.

	n	K _d (M ⁻¹)	ΔH _{ap} (kJ/mol)	-TΔS _{ap} (kJ/mol)	ΔG _{ap} (kJ/mol)
PROLINA	0.99	8.40x 10 ²	-110.10	62.40	-47.60
HIDROXIPROLINA	1.67	1.63x 10 ²	-90.45	58.75	-31.70
SERINA	1.09	1.30x 10 ²	-50.76	14.50	-36.26
VALINA	1.25	0.32x 10 ²	-20.22	9.76	-10.46
ALANINA	0.99	1.70x 10 ²	-90.12	57.95	-32.17
TREONINA	1.5	0.02x 10 ²	-95.74	59.63	-36.11
AC. GLUTAMICO	1.15	0.01 x 10 ²	-87.67	46.13	-41.54
GLICINA	0.79	0.98x 10 ²	-23.56	14.58	-8.98
GM	530	0.24 x 10 ²	-69.50	44.10	-25.4
F1	190	0.05 x 10 ²	ND	ND	ND
F2	640	0.35 x 10 ²	-91.74	-59.50	-151.24
F₃	790	0.51 x10 ²	-76.38	-47.56	-123.94

ND = No determinado

De acuerdo con estos resultados, se observa que tanto los aminoácidos como tres de los cuatro biopolímeros utilizados son capaces de formar complejos estables con la F₅A del extracto de flor de Jamaica.

Desde el punto de vista termodinámico, se puede observar que en todos los casos, el proceso de unión está gobernado por un valor de entalpía favorable (negativo) al que se opone parcialmente una contribución entrópica desfavorable (positiva). Como era de esperarse, los aminoácidos Prolina e Hidroxiprolina se unieron con mayor facilidad a su ligando F₅A, lo cual confirma la existencia de diferencias de especificidad en la unión de antocianinas y aminoácidos.

El cambio en energía libre de Gibbs resulta de la suma de un término entálpico y un término entrópico (Ecuación 12). Donde las contribuciones entrópicas en este tipo de sistemas de reacción generalmente se relacionan con interacciones hidrófobas, pérdida de moléculas de agua, pérdida de iones y cambios conformacionales, mientras que las contribuciones entálpicas se atribuyen principalmente a enlaces por puentes de hidrógeno así como a la protonación de las moléculas. Generalmente se considera que el acomplejamiento intermolecular entre compuestos fenólicos y proteínas ricas en prolina involucra ambos fenómenos de protonación (interacción electrostática) y puentes de hidrógenos (debidos a las estructuras bencénicas de los fenoles) (Poncet-Legrand y col., 2007).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (12)$$

En este caso en particular, esta expresión muestra que la afinidad de las moléculas de biopolímeros y de las antocianinas está relacionada con el cambio de la energía libre, de manera que una alta afinidad entre estas biomoléculas implica una importante reducción de energía libre después de su unión. A su vez, dicha energía libre de Gibbs puede relacionarse con la constante de equilibrio a través de la expresión $\Delta G = -RT \cdot \ln K$.

La información que se puede obtener de este tipo de pruebas da indicio de la especificidad de las interacciones. Qiu y Barteau (2007), reportaron que para el caso de soluciones iónicas la acumulación de contraiones alrededor de una molécula

polielectrolítica en un medio acuoso puede ser considerada como una interacción no específica debido a que ésta es originada por un potencial y a su vez también puede ser considerada específica si la densidad de carga en la molécula es muy grande.

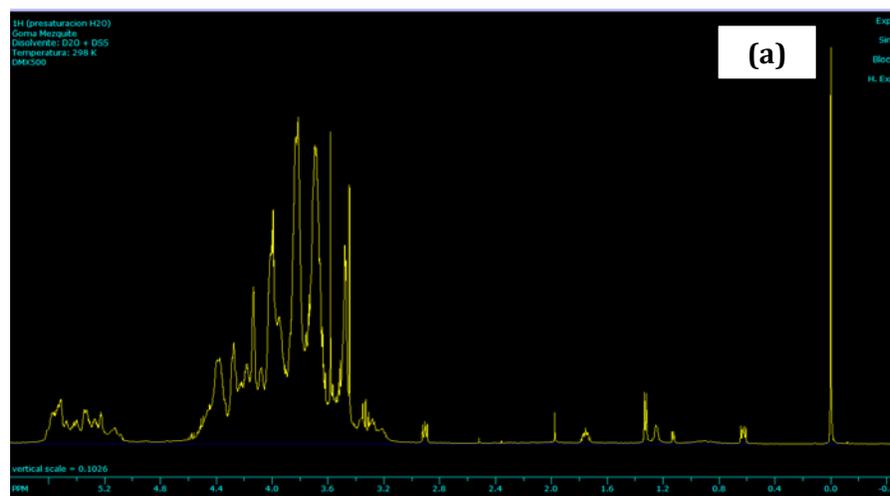
Cabe mencionar que muchos procesos de unión de tipo no específico, como podría pensarse que es la interacción entre GM, F1, F2 y F3 con las antocianinas, sí tienen una estequiometría bien definida, lo cual se debe principalmente a fenómenos de adsorción o uniones iónicas en la superficie de las macromoléculas, las cuales pueden llegar a alcanzar un nivel de saturación (Ball y Maechling, 2009). Esta saturación puede definirse como un proceso de adsorción en el cual la cantidad máxima de uniones entre moléculas o iones se localiza en los sitios activos de la superficie de una macromolécula, dando así una estequiometría. Lo anterior sugiere que los valores de estequiometría (n) obtenidos de las titulaciones isotérmicas para las interacciones entre los biopolímeros y las antocianinas proveen un indicio de dicha saturación. Este tipo de valores tan altos ($n < 100$) de estequiometría han sido encontrados en sistemas proteicos de albúmina de suero bovino (proteína globular) en presencia de taninos, en los cuales se presume no sólo la presencia de interacciones específicas, sino que además se lleva a cabo un fenómeno de agregación de los complejos formados (Frazier y col., 2003).

Debido a que tanto las moléculas receptoras como los ligandos mostraron poseer una carga electrostática en función del pH, y a la naturaleza de las interacciones entre ambas especies, la formación de los complejos intermoleculares se puede atribuir a interacciones electrostáticas entre ambos compuestos, principalmente debidas a los residuos amino de los biopolímeros que quedan expuestos y que son capaces de interactuar y permitir la adsorción de las antocianinas extraídas a partir de cálices de flor de Jamaica. A pesar de que el análisis de interacción entre aminoácido-antocianina fue realizado con la finalidad de poder justificar si en la fracción proteica de la GM y sus fracciones se lleva a cabo dicha interacción, y con qué residuos dicha interacción se favorece, aún es complicado poder asegurar que la interacción entre las antocianinas y los biopolímeros se lleva en la misma magnitud que con los aminoácidos libres, ya que en este punto entra un factor muy importante que puede llegar a limitar dicha interacción, el cual está controlado por la misma estructura ramificada de la GM y por la

baja o alta compatibilidad geométrica entre el receptor y el ligando. Sin embargo, el estudio de estas compatibilidades representa un gran reto debido al gran tamaño (peso molecular) de los biopolímeros comparado con el peso de molecular de las antocianinas y a la complejidad que estos sistemas presentan, ya que las interacciones no son puramente electrostáticas, debido a que los coloides o macromoléculas con carga se encuentran rodeados de una doble capa eléctrica así como contraiones fuertemente ligados. A pesar de estos posibles inconvenientes, se ha reportado que para algunas interacciones entre biopolímeros de alto peso molecular (oligonucleótidos), la técnica de ITC resulta una herramienta confiable y directa para la determinación de los cambios entálpicos (Ball y Maechling, 2009).

7.6 Caracterización de los complejos

Como se mencionó en la sección anterior, la determinación de los puntos exactos de anclaje de las antocianinas sobre los diferentes biopolímeros es una tarea titánica, y prueba de ello son los espectros obtenidos por RMN-¹H que se muestran en la Figura 7.9.



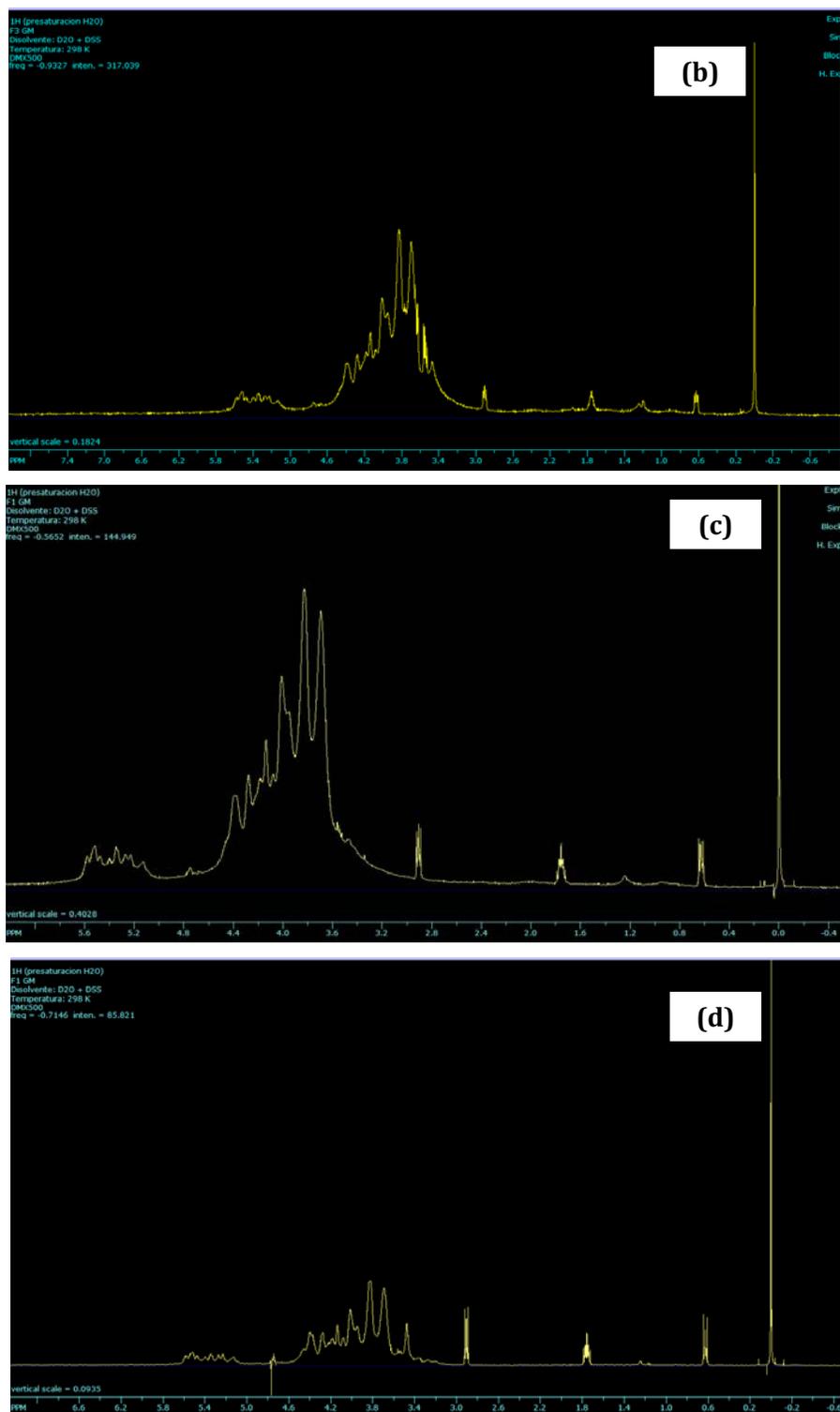


Figura 7.9. Espectro de RMN-1H para: a) GM, b) F3, c) F2 y d) F1.

Como puede observarse de la figura anterior, GM, F3 y F2 presentaron perfiles muy semejantes con desplazamientos químicos que van desde 0.6 hasta las 4 ppm. Sin embargo la integración de las áreas de estas señales se convirtió en un gran problema, debido a que algunas señales están constituidas por lo que coloquialmente se conoce como “montonetes” que son señales constituidas de más de 4 picos donde cada uno de ellos se constituye por combinaciones de dobles de dobles, o triples, etc. Lo rescatable de estos espectros es que a grandes rasgos pueden observarse diferencias estructurales entre las fracciones de GM y la goma entera, cambios de desplazamiento químico que pueden ser atribuidos al contenido de las fracciones de proteína y azúcares. Siendo así que a la misma amplificación de la señal, F1 con menor contenido de proteína presente una menor cantidad de señales y con señales más separadas y mejor definidas que las obtenidas con el resto de las fracciones y con la GM entera. Cabe mencionar que cuando se sometieron los complejos a este tipo de pruebas, no hubo un desplazamiento químico significativo de las señales. Al hacer la comparación de ambos espectros (con y sin F₅A), estos fueron idénticos. Por lo que se decidió realizar una prueba de análisis elemental para corroborar la presencia de las antocianinas, encontrando que los contenidos de C, N e H sólo variaron entre un 0.1-0.15% para cada elemento (Tabla 7.6), lo cual aunado con los resultados de ITC demuestran la presencia de las antocianinas en los complejos.

Tabla 7.6. Datos obtenidos por análisis elemental de los complejos de GM y sus fracciones con F₅A.

Elemento	GM-F ₅ A	F1-F ₅ A	F2-F ₅ A	F3-F ₅ A
C	40.74	40.77	40.60	39.91
N	0.94	0.68	1.77	2.64
H	6.02	5.58	5.42	5.37

7.6.1 Funcionalidad de los complejos

Debido a que el objetivo de este trabajo no sólo se encuentra enfocado a la protección de las antocianinas a través de la formación de complejos intermoleculares, sino que además busca que dichos complejos sean funcionales, se evaluaron las propiedades interfaciales de los complejos

formados con las fracciones de GM con el fin de compararlos con los biopolímeros libres, los cuales tienen la capacidad de estabilizar interfases agua-aceite.

La Figura 7.10 muestra los perfiles de viscosidad interfacial de las películas formadas en la interfase aceite mineral – biopolímero, en los cuales se observa que las fracciones de GM, F2 y F3 respectivamente, mostraron perfiles de viscosidad mayores al de GM, esto se relaciona principalmente con el incremento del contenido de proteína en las fracciones, dando origen a una mayor adsorción en la interfase aceite-agua, y por lo tanto esto nos provee información acerca de la funcionalidad superior de las fracciones de GM, respecto a la GM entera. Por otra parte, también se realizaron estas pruebas para las soluciones de biopolímero cuando se hicieron interaccionar con F₅A, encontrando que la presencia de las antocianinas no afecta significativamente la viscosidad interfacial de F2, F3 y de la GM entera (Figura 7.10 líneas punteadas).

Cabe mencionar que F1 mostró un perfil horizontal de su viscosidad durante el tiempo de envejecimiento de la interfase, lo cual se atribuye al bajo contenido de proteína y por tanto a la también baja capacidad de adsorberse en una interfase, haciéndola no útil como agente estabilizante de emulsiones.

Estos resultados indican que la presencia de una alta cantidad de residuos aminoácidos permiten un mejor anclaje de los biopolímeros en la interfase, mientras que una relativamente alta concentración de carbohidratos expuesta hacia la fase acuosa permiten un incremento en las interacciones de las capas de biopolímero adsorbidas en la interfase, llevando así a la conclusión de que un balance Pr/CH apropiado es más importante cuando el contenido de proteína es mayor, ya que facilita la estabilización de las interfases agua-aceite.

Por otra parte, las pruebas de fluencia que se realizaron a las diferentes indicaron que F1 no presentó un comportamiento de reestructuración, debido a que al aplicar el esfuerzo a la membrana interfacial ésta no soportó la deformación aplicada, y por ende ésta no tuvo el comportamiento de recuperación que el resto de las fracciones e incluso que la GM entera presentaron. En la Figura 7.11 se muestran los perfiles de fluencia (Creep compliance) para los biopolímeros que sí presentaron reestructuración en la

membrana interfacial y por tanto que fueron capaces de reestructurarse debido a su comportamiento viscoelástico.

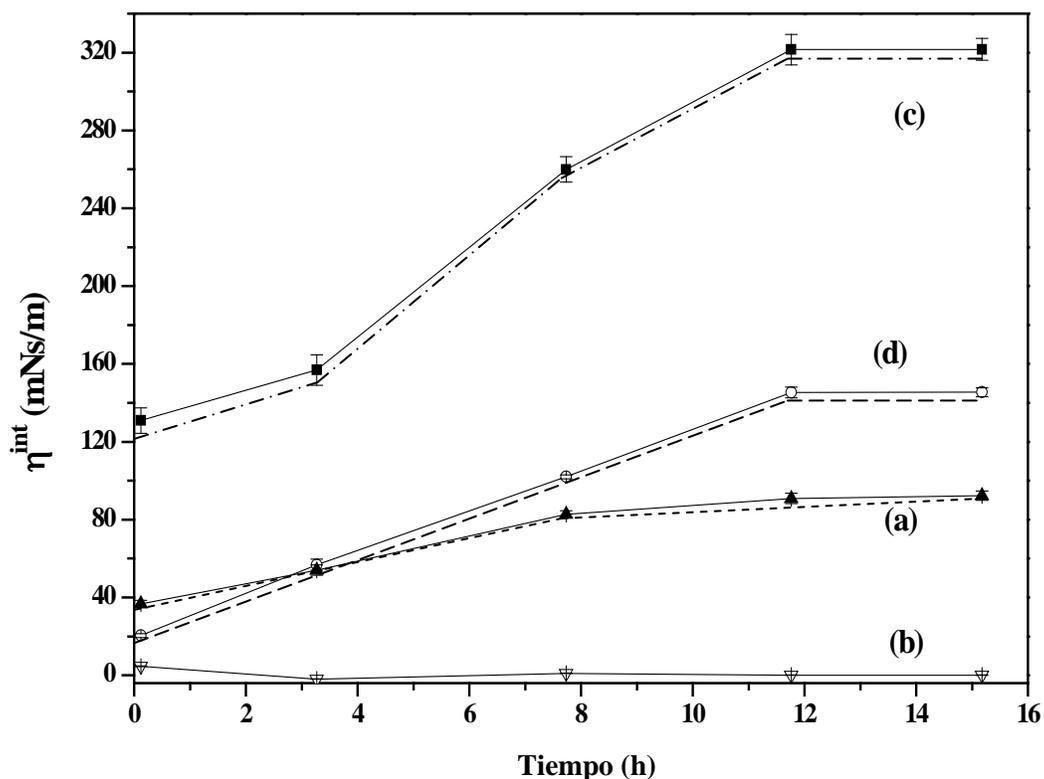


Figura 7.10. Perfiles de viscosidad interfacial de: a) GM entera, b) F1, c) F2 y d) F3. Donde las líneas continuas representan la solución de biopolímero en la interfase aceite-agua sin F₅A, y las líneas punteadas representan el comportamiento de los mismos biopolímeros pero en presencia de F₅A.

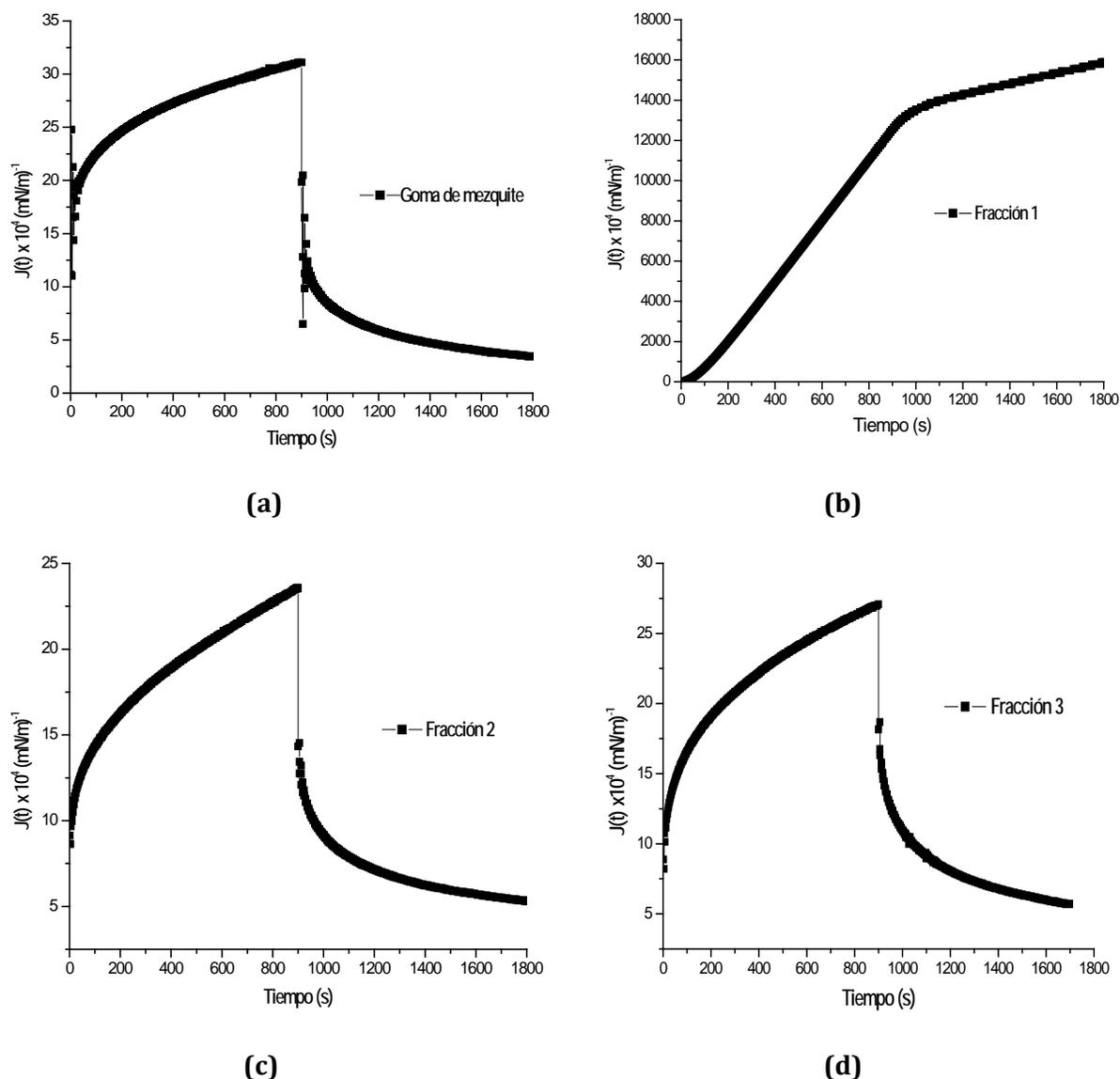


Figura 7.11. Perfiles de Fluencia de las interfaces aceite mineral - : a) GM, b) F1, c) F2 y d) F3

El análisis de los parámetros viscoelásticos de las películas biopoliméricas se muestra en la Tabla 7.7. En esta tabla se puede observar que la fluencia interfacial instantánea (J_0) está relacionado con la deformación reversible debida a la deformación aplicada a la película e indica que un balance Pr/CH en las macromoléculas produce incrementos en el valor de E_0 , el cual es una medida de la fuerza elástica de los enlaces que conforman la estructura interfacial de las películas formadas (Lobato-Calleros y col., 2000), los cuales fueron mayores para las fracciones F2 que para F3 y para la GM entera, y esto corrobora lo que se mencionó anteriormente.

Tabla 7.7. Parámetros viscoelásticos obtenidos de las películas formadas con GM y sus fracciones.

Muestra	$J_0 \times 10^4$ (mN/m) ⁻¹	$J_N \times 10^4$ (mN/m) ⁻¹	$\eta_N \times 10^4$ (mNs/m) ⁻¹	λ_m (s)	$J_m \times 10^4$ (mN/m) ⁻¹	$E_0 \times 10^{-4}$ (mN/m)
MG	11.18±0.56 ^c	6.09±0.30 ^a	147.76±1.50 ^d	344.03±5.72 ^a	12.86±0.60 ^a	0.089 ^c
F ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F ₂	8.88±0.07 ^a	7.90±0.39 ^c	113.99±1.07 ^b	520.56±6.60 ^c	14.23±0.70 ^b	0.113 ^a
F ₃	9.13±0.06 ^b	7.69±0.38 ^c	117.03±0.60 ^c	388.66±5.94 ^b	15.66±0.68 ^c	0.109 ^b

ND = No determinado.

Los valores de fluencia de retardo J_m y λ_m , indican que el rompimiento y reestructuración de los enlaces en la interfase no se presentan con la misma frecuencia, por lo que valores de λ_m grandes indican que la deformación de la película interfacial ocurre lentamente, siendo así que de acuerdo con los resultados de la Tabla 7.7, F2 presenta valores mayores que los obtenidos para F3 y para la GM entera. Estos resultados nuevamente dan indicio de que para la obtención de películas interfaciales bien estructuradas debe existir un adecuado balance Pr/CH de manera que exista suficiente cantidad de proteína que se adsorba en la interfase, así como suficiente cantidad de residuos de carbohidratos para que pueda darse la formación de una estructura multicapa que brinde estabilidad a dicha interfase. Los valores de fluencia de la fracción F1 no fueron reportados debido a que esta fracción no presentó ningún comportamiento de reestructuración, sino que después de haber aplicado el esfuerzo de deformación, su estructura se colapsó y siguió fluyendo (Figura 7.11 b).

Por otra parte, los valores de J_N indican el tiempo que requieren los enlaces de las películas para reformarse después de que se ha aplicado un esfuerzo, y se encontró que no existe diferencia en los valores de J_N para F2 y F3, sin embargo sí para la GM. Lo anterior indica que la estructura en las fracciones proteicas de la GM entera es más

compleja y estructurada por lo que su recuperación hacia su estructura original lleva más tiempo.

Al igual que en las pruebas de viscosidad interfacial, no se encontraron diferencias significativas con los valores encontrados para las fracciones de GM solas, esto puede deberse a que las concentraciones utilizadas de GM comparadas con las concentraciones requeridas de F₅A (de acuerdo con datos de ITC) no representan una gran contribución al cambio en propiedades funcionales.

CAPÍTULO 8

8. Conclusiones

El fraccionamiento de la goma de mezquite generó tres fracciones con composiciones químicas distintas y diferentes distribuciones de peso molecular. Estas fracciones representan una alternativa al uso generalizado no sólo de la goma arábiga, sino que además poseen mejores propiedades funcionales y por lo tanto puede dárseles un valor agregado. La primera fracción eluída de la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica debido a su bajo contenido de proteína y alto contenido de polisacáridos no presentó actividad superficial ni buena interacción con las antocianinas, sin embargo esta fracción puede ser utilizada como una fuente rica de fibra dietética.

Las fracciones 2 y 3 de la goma de mezquite presentaron mejores propiedades funcionales que las que presentó la goma entera, lo cual puede deberse a un mejor balance Proteína/Carbohidrato, el cual es responsable de las mejores propiedades interfaciales de estos biopolímeros, donde las propiedades viscoelásticas son mejores que las de la goma entera.

El análisis de calorimetría isotérmica de titulación mostró que la GM entera, F2 y F3 fueron capaces de interactuar con las antocianinas, donde la relación molar entre estos biopolímeros y las antocianinas incrementó conforme el contenido de proteína incrementó. Lo anterior puede justificarse con lo que diversos reportes indican acerca de la afinidad de compuestos flavonoides con ciertos aminoácidos, indicando que estas especies químicas son capaces de formar complejos con proteínas. Bajo este supuesto, el análisis de la interacción entre los aminoácidos presentes en la goma de mezquite y las antocianinas fue utilizado para confirmar si existe algún comportamiento selectivo, encontrando que la Prolina, uno de los aminoácidos más concentrados en GM y sus fracciones, fue el que tuvo la mayor afinidad para formar complejos con las antocianinas. Aunque una forma de corroborar esta hipótesis es a través de estudios de Resonancia Magnética Nuclear en 2D, debido a la gran diferencia de tamaños y pesos moleculares entre los biopolímeros y las antocianinas, los cambios estructurales no son tan obvios como pudiera esperarse. Este

mismo comportamiento se encontró al tratar de determinar las diferencias de la funcionalidad debidas a la interacción intermolecular.

Debido a que cada uno de los compuestos involucrados en la formación de los complejos intermoleculares presentó cambios en el potencial zeta y dada la magnitud de las interacciones, se puede inferir que dichas interacciones son principalmente de tipo electrostáticas, aunque no se descarta la idea de la presencia de puentes de hidrógeno.

La reducción en la constante cinética de la reacción obtenida para GM y sus fracciones, respecto a la obtenida con los aminoácidos, puede ser debida a la disponibilidad de aminoácidos libres en la macromolécula, y a algunos efectos estéricos.

De esta manera, la obtención de complejos intermoleculares no presentó cambios significativos en las propiedades funcionales de la goma de mezquite y aunque debido a la baja concentración de antocianinas en el complejo no permitió estimar las propiedades funcionales de éstas, cabe resaltar que con las fracciones de la goma de mezquite se pueden obtener moléculas con mejores propiedades superficiales (para el caso de F2 y F3) así como una fuente rica en fibra dietética (F1).

Por lo tanto, en este trabajo se establece la metodología y procedimientos generales para lograr llevar a cabo la interacción intermolecular entre un polisacárido como la goma de mezquite y sus fracciones y un compuesto fenólico como las antocianinas, encontrando que es posible preservar las propiedades funcionales de ambos compuestos aún después de haber interaccionado.

CAPÍTULO 9

9. Perspectivas

A la luz de los resultados obtenidos en el presente trabajo, surgen nuevas preguntas e ideas las cuales podrían perseguirse en futuras investigaciones, ya sea con el objetivo de utilizar los complejos de goma de mezquite – antocianinas como agentes emulsionantes-estabilizantes o bien como utilizar las fracciones de esta goma como sustitutos de la goma entera, de manera que al poseer mejores propiedades funcionales, se requiera de una menor cantidad de material para llevar a cabo la misma acción. Aunque la alta especificidad de estas especies es reconocida, sería conveniente llevar a cabo estudios de liberación o disociación del complejo así como evaluar la biodisponibilidad de las antocianinas liberadas. El estudio de la estabilidad térmica de las antocianinas en el complejo cuando son sometidas a altos esfuerzos de corte para la preparación de sistemas dispersos como las emulsiones, de manera que se pueda asegurar que después de dicho proceso aún se conservan las propiedades funcionales de los compuestos fenólicos involucrados. A partir de este tema de trabajo se pueden derivar estudios relacionados con la caracterización fisicoquímica de dichos complejos, tratar de encontrar los verdaderos sitios de unión entre ambas especies, aunque ello implique la aplicación de otras técnicas de fraccionamiento diferentes con la finalidad de obtener fracciones pequeñas y así poder elucidar cambios estructurales debidos a dicha interacción a través de RMN en 2D y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

CAPÍTULO 10

10. Referencias

- Abdessamad, A. y Ladbury, J.E. (2006) Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry. *Journal of Molecular Recognition* 19:79-89.
- Andersen, O. M. y Jordheim, M. (2006). The anthocyanins. En O. M. Andersen y K. R. Markham (Eds.), *Flavonoids* (2da ed.. Chemistry, biochemistry and applications, pp. 452–471). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Anderson, D.M.W. y Farquhar, J.G.K. (1982). Gum exudates from the genus *Prosopis*. *The International Tree Crops Journal*, 2: 15-24.
- Angulo, J.L. (1999). *Caracterización Físicoquímica de Polímeros*. LIMUSA. México. pp. 85-90.
- Anokwuru, C. P., Esiaba, I., Ajibaye, O. y Adesuyi, A. O. (2011). Polyphenolic content and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* calyx. *Research Journal of Medicinal Plant* 5: 557-566.
- Ball, V. y Maechling, C. (2009). Isothermal microcalorimetry to investigate non specific interactions in biophysical chemistry. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 3283-3315.
- Beristain, C.I., García, H.S. y Vernon-Carter, E.J. (2001). Spray-dried encapsulation of cardamom (*Ellearia cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*. 34, 398-401.
- Beristain, C.I., Azuara, E. y Vernon-Carter, E.J. (2002). Effect of water activity on the stability to oxidation of spray-dried encapsulated orange peel oil using mesquite gum (*Prosopis juliflora*) as wall material. *Journal Food Science* 67, 206-211.
- Bobbio, F.O. y Mercadante, A.Z. (2008). Anthocyanins in foods: Occurrence and physicochemical properties. En F. O. Bobbio, y A. Z. Mercadante (Eds.), *Food colorants: Chemical and functional properties*, Vol. 1. (pp. 241–276) Boca Raton, FL: CRC Press.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 67–87.
- Burgess, D.J. y Sahin, N.O. (1997). Interfacial rheology and tension properties of proteins films. *Journal of Colloid and interface Science* 189: 74–82.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A. y Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113: 859-871.

- Cavalcanti, R.N., Santos, D.T. y Meireles, M.A.A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems – An overview. *Food Research International* 44: 499-509.
- Cimpoi C. (2006). Analysis of some antioxidants by Thin-Layer Chromatography and High Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29: 1125-1142.
- Clifford, M.N. (2000). Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1063-1072.
- Cordoniu-Hernández, E., Mesa-Ibirico, A., Montero-Cabrera, L.A., Martínez-Luzardo, F., Borrmann, T. y Stohrer, W.D. (2003). Theoretical study of flavonoids and proline interactions. Aqueous and gas phases. *Journal of Molecular Structure:THEOCHEM*, 623: 63-73.
- Cordoniu-Hernández, E., Rolo-Naranjo, A. y Montero-Cabrera, L.A. (2007). Theoretical affinity order among flavonoids and amino acid residues: An approach to understand flavonoid – protein interactions. *Journal of Molecular Structure:THEOCHEM*, 819: 121-129.
- Cuneen, J.I. y Smith, F. (1948a). The constitution of mesquite gum. Part I. Isolation of 6- and 4- glucuronosidogalactose. *Journal of the Chemical Society* 227: 1141-1146.
- Cuneen, J.I. y Smith, F. (1948b) The constitution of mesquite gum. Part II. Methylated mesquite gum. *Journal of the Chemical Society* 228: 1146-1157.
- Davies, A.J. y Mazza, G. (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 716–720.
- Desai, K.G.H. y Park, H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology* 23: 1361–1394.
- Diogo, M.M., Queiroz, J.A., Monteiro, G.A., Ferreira, G.N.M., Martins, S.A.M. y Prazeres, D.M.F. (2000). Purification of a cystic fibrosis plasmid vector for gene therapy using hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 68: 576-583.
- Du, C.T. y Francis, F.J. (1973). Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa*. L.). *Journal of Food Science* 38: 810–812.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.

- Ersus, S. y Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering* 80: 805-812.
- Fang, Z. y Bandhari, B. (2011) Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry* 129: 1139-1147.
- Frazier, R.A., Papadopoulou, A., Mueller- Harvey, I., Kissoon, D. y Green, R. J. (2003) Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *Journal of Food Agricultural and Food Chemistry* 51: 5189-5195.
- Gao, L. y Mazza, G. (1995) Characterization, quantitation and distribution of anthocyanins and colourless phenolics in sweet cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 343-346.
- Garcia-Viguera, C. y Bridle, P. (1999). Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chemistry* 64:21-26.
- Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I. y Mulligan, C.N. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition* 50: 213-224.
- Giusti, M.M., y Wrolstad, R.E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14: 217-225.
- Goycoolea, F.M., Calderón de la Barca, A.M., Valderrama, J.G., Valenzuela, J.R. y Hernández, G. (1998) Processing and functional behaviour of low-tannin mesquite gum. En *Gums and Stabilizers for the food industry* 9. Williams P. A. y Phillips G. O. (Eds.). Royal Society of Chemistry. Cambridge. 305-313.
- Harborne, J.B. (1994). *The flavonoids. Advances in research since 1986*. En J.B. Harborne (Ed), Gran Bretaña, Inglaterra, Chapman & Hall.
- Herrera-Arellano, A., Flores-Romero, S., Chávez-Soto, M.A. y Tortoriello, J. (2004). Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine* 11: 375-382.
- Ikeda, T., Yamazaki, K., Kumakura, H. y Hamamoto, H. (2009). Effect of high temperature on fruit quality of pot-grown strawberry plants. *Acta Horticulturae* 842: 679-682.
- Inami, O., Tamura, I., Kikuzaki, H. y Nakatani, N. (1996). Stability of anthocyanins of *Sambucus canadensis* and *Sambucus nigra*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3090-3096.

- Ito, F., Tanaka, N., Katsuki, A. y Fujii, T. (2002). Why do flavylum salts show so various colors in solution?: Effect of concentration and water on the flavylum's color changes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 150(1-3): 153-157.
- Jiménez, N., Bohuon, P., Lima, J., Dornier, M., Vaillant, F. y Pérez, A. M. (2010). Kinetics of anthocyanin degradation and browning in reconstituted blackberry juice treated at high temperatures (100-180 °C). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:2314-2322.
- Josiah, S.J., Omotuyi, O., Oluyemi, K.A., Ezea, U.I. y Uhunmwangho, E.S. y col. (2010). Protective role of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calyx against potassium bromated induced tissue damage in winster rats. *Africam Journal of Biotechnology*, 9: 3218-3222.
- Kähkönen, M. y Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 628-663.
- Konczak, I. y Zhang, W. (2004). Anthocyanins-more than nature's colours (2004). *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2004: 239-240.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F. y Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J. y Lee, C.Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7292-7295.
- Lewis, C.E., Walker, J.R.L. y Lancaster, J.E. (1995). Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. *Food Chemistry* 54: 315-319.
- Lin, Y.C. y Chou, C.C. (2009). Effect of heat treatment on total phenolic and anthocyanin contents as well as antioxidant activity of the extract from *Aspergillus awamori*-fermented black soybeans, a healthy food ingredient. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60: 627-636.
- Liu, M, Li X.Q., Weber, C., Lee, C.Y., Brown, J. y Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2926-2930.
- Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Vernon-Carter, E.J. y Sánchez-García, J. (2000). Viscoelastic properties of White fresh cheese filled with sodium caseinate. *Journal of Texture Studies* 31: 379-390.

- López-Franco, Y.L., Valdez, M.A., Hernández, J., Calderón de la Barca, A.M., Rinaudo, M. y Goycoolea F.M. (2004) Macromolecular dimensions and mechanical properties of monolayer films of Sonora mesquite gum. *Macromolecular Bioscience* 4: 865-874.
- López-Franco, Y.L., Calderón de la Barca, A.M., Valdez, M.A., Peter, M. G., Rinaudo, M., Chambat, G. y Goycoolea, F.M. (2008). Structural Characterization of Mesquite (*Prosopis velutina*) Gum and its Fractions. *Macromolecular Bioscience* 8 : 749-757.
- Mahadevan, N.S. y Pradeep, K. (2009). *Hibiscus sabdariffa*: An overview. *Natural Products Radiance*, 8: 77-83.
- Maier, T., Fromm, M., Schieber, A., Kammerer, D.R. y Carle, R. (2009). Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. *European Food Research and Technology* 104:732-739.
- Maldonado-Valderrama, J. y Rodríguez-Patino, J.M. (2010). Interfacial rheology of protein-surfactant mixtures. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 15: 271-282.
- Malien-Aubert, C., Damgles, O. y Amiot, M.J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 170-176.
- Martin, A.H., Grolle, K., Bos, M.A., Cohen, M.A. y van Vliet, T. (2002) Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 254: 175-183.
- Martín, A., Mattea, F., Gutierrez, L., Miguel, F. y Cocero, M. J. (2007). Co-precipitation of carotenoids and biopolymers with the supercritical anti-solvent process. *Journal of Supercritical Fluids* 41: 138-147.
- Matsufuji, H., Otsuki, T., Takeda, T., Chino, M. y Takeda, M. (2003). Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3157-3161.
- Mazza, G. y Brouillard, R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* 29: 1097-1102.
- Mazza, G. Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. London, UK: CRC Press.
- Nnam, N.M. y Onyeke, N.G. (2003). Chemical composition of two varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces and the drinks made from them. *Plants Food for Human Nutrition* 58: 1-7.

- Ochoa, M.R., Kessler, A.G., Vullioud, M.B. y Lozano, J.E. (1999). Physical and chemical characteristics of raspberry pulp: Storage effect on composition and color. *LWT - Food Science and Technology* 32: 149–153.
- Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Ponce-Alquicira, E. y Vernon-Carter, E.J. (2003) Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. *Carbohydrate Polymers* 54: 327-333.
- Pascal, C., Poncet-Legrand, C., Imberty, A., Gautier, C., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. y Vernhet, A. (2007). Interactions between a non glycosylated human proline-rich protein and flavan-3-ols are affected by protein concentration and polyphenol/protein ratio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4895-4901.
- Pellegrini, N., Simonetti, P., Gardana, C., Brenna O, Brighenti, F. y Pietta, P. (2000). Polyphenol content and total antioxidant activity of *Vini Novelli* (Young red wines). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 732-735.
- Pérez-Alonso, C., Báez-González, J.G., Beristain, C.I., Vernon-Carter, E.J. y Vizcarra-Mendoza, M.G. (2003) Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray dried microcapsules. *Carbohydrate Polymers* 53: 197-203.
- Perez-Orozco, J.P., Beristain, C.I., Espinosa-Paredes, G., Lobato-Calleros, C. y Vernon-Carter, E.J. (2004). Interfacial shear rheology of interacting carbohydrate polyelectrolytes at the water-oil interface using an adapted conventional rheometer. *Carbohydrate Polymers*. 57: 45-54.
- Pérez-Orozco, Juan Pablo. (2006). Estudio de la adsorción competitiva entre polielectrolitos y tensoactivos: efecto en la microestructura, propiedades reológicas interfaciales y estabilidad de las emulsiones $W_1/O/W_2$. (Tesis de doctorado – Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, México). [En línea] Disponible en <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=12815&docs=UAM112815.pdf>. [Consulta: 17 Enero 2012].
- Poncet-Legrand, C., Gautier, C., Cheynier, V. e Imberty, A. (2007). Interactions between flavan-3-ols and poly(L-proline) studied by isothermal titration calorimetry: Effect of the tannin structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 9235-9240.
- Prasongwatana, V., Woottisin, S., Sriboonlue, P. y Kukongviriyapan, V. (2008). Uricosuric effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in normal and renal-stone former subject. *Journal of Ethnopharmacology* 117: 491–495.
- Qiu, T. y Barteau, M.A. (2007). STM study of glycine on TiO₂ (110) single crystal surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303: 229-235.

- Ramirez-Rodrigues, M.M., Plaza, M.L., Azeredo, A., Balaban, M. O. y Marshall, M.R. (2011). Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Food Science* 76: C428-C435.
- Randall, R.C., Phillips, G.O. y Williams, P.A. (1989). Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloids* 3:65-75.
- Ray, A.K., Bird, P.B. Iacobucci, G.A. y Clark, Jr. B.C. (1995). Functionality of gum Arabic. Fractionation, characterization and evaluation of gum fractions in citrus oil emulsions and model beverages. *Food Hydrocolloids* 9: 123-131.
- Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Helsinki: University of Helsinki. pp. 10-14.
- Robards, K., Prenzer, P., Tucker, G., Swatsitang, P. y Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66: 401-436.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J. y Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology* 45: 1386-1394.
- Rodrigues, A.S., Pérez-Gregorio, M.R., García-Falcón, M.S. y Simal-Gándara, J. (2009). Effect of curing and cooking on flavonols and anthocyanins in traditional varieties of onion bulbs. *Food Research International* 42: 1331-1336.
- Rodríguez-Huezo, M.E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L.A., Beristain, C.I. y Vernon-Carter, E.J. (2004) Microencapsulation by spray-drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal Food Science* 69: E351-E359.
- Rodríguez-Patino, J.M., Carrera-Sánchez, C.; Rodríguez-Niño, M.R. y Cejudo-Fernández, M. (2001) Structural and dynamic properties of milk proteins spread at the air-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science* 242: 141-151.
- Sadilova, E., Stintzing, F.C., Kammerer, D.R. y Carle, R. (2009). Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research International* 42: 1023-1033.
- Sáyago-Ayerdi, S., Arranz, S., Serrano, J. y Goñi, I. (2007). Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7886-7890.
- Singleton, V. L., Rossi J. A. Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic - phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.

- Sukwattanasinit, T., Burana-osot, J. y Sotanaphun. (2007). Spectrophotometric method for quantitative determination of total anthocyanins and quality characteristics of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Planta Medica*, 73: 1517-1522.
- Tseng, T., Kao, T., Chu, C., Chou, F., Lin, W. y Wang, C. (2000). Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukaemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochemical Pharmacology* 60: 307-315.
- Vanaclocha, B. y Cañigüeral, S. (2003). *Fitoterapia: vademécum de prescripción*. España: Elsevier.
- Vázquez-Ortíz, F.A., López-Franco, Y. y Goycoolea, F.M. (2006). Fractionation and characterization of the monosaccharides from Mesquite *Prosopis* spp. And Arabic gum by normal bonded phase, HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 29: 1991-1999.
- Vernon-Carter, E.J., Gómez, S.A., Beristain, C.I., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R., Moreno-Terrazas, R.C. (1996). Color degradation and coalescence kinetics of Aztec marigold oleoresin - in - water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. *Journal of Texture Studies* 27: 625-641.
- Vernon-Carter, E.J., Beristain, C.I., y Pedroza-Islas, R. (2000). Color Mesquite gum (*Prosopis gum*). En: *Novel macromolecules in food systems*. Doxastakis G. y Kiosseoglou V. (Ed) Amsterdam: Elsevier. 217-238.
- Walter, J., Wolf, R., Peterson, E. y Schaer, M.L. (1992). Preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography of soybean proteins and characterization of fractions by gel electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1809-1816.
- White, E.V. (1946). The constitution of mesquite gum. I. The methanolysis products of methylated mesquite gum. *Journal of the American Chemical Society* 68: 272-275.
- White, E.V. (1947a). The constitution of mesquite gum. II. Partial hydrolysis of mesquite gum. *Journal of the American Chemical Society* 69, 622-623.
- White, E.V. (1947b). The constitution of mesquite gum. III. Hexamethyl-3-glucuronosido-methylgalactoside methyl ester. *Journal of the American Chemical Society* 69, 2264-2266.
- White, E.V. (1948). The constitution of mesquite gum. IV. 4-Methoxy-D-glucuronic acid. *Journal of the American Chemical Society* 70: 367-369.
- Wong, P.K., Yusof, S., Ghazali, H.M. y Che-Man, Y.B. (2002). Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition & Food Science*, 32: 68-73.

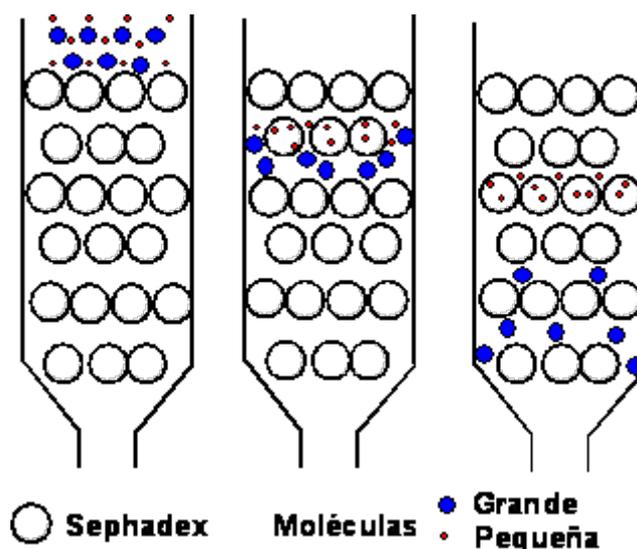
Yamada, T., Komiya, T. y Akaki, M. (1980). Formation of an inclusion complex of anthocyanin with cyclodextrin. *Agricultura and Biological Chemistry* 44: 1411-1413.

ANEXO I

Cromatografía de Filtración en Gel

La cromatografía de filtración en gel (GPC) es un método que se utiliza para separar, purificar y analizar las mezclas de sustancias. Se emplea, principalmente en la determinación de pesos moleculares (Angulo, 1999). Esta técnica se originó en la década de 1960 con el trabajo de Moore, quien en 1964 describió el procedimiento para la obtención de geles con tamaño de poro controlado; también mostró la utilidad de la técnica de separación para determinar pesos moleculares. Actualmente existe toda una gama de materiales para analizar polímeros con diferentes características de solubilidad y peso molecular.

El proceso de separación dentro de las columnas empacadas con el material poroso es el resultado de las diferencias en tamaño y, consecuentemente, en el grado de penetración de las moléculas en solución a los poros del empaque. Las moléculas de tamaño superior al del poro del gel no tienen acceso a éste y pasan a través de la columna por el espacio que ocupa el disolvente entre las partículas del empaque; las moléculas pequeñas penetran en el gel en un grado mayor o menor, dependiendo de su tamaño (Figura A1.1). Por consiguiente, las moléculas más grandes eluirán de la columna antes que las pequeñas, con lo que es posible determinar la curva de distribución de pesos moleculares de la muestra, así como los diferentes promedios de peso molecular obtenidos por otros métodos. Para analizar los cromatogramas y calcular los pesos moleculares se necesita construir una curva de calibración que relacione el peso molecular con el volumen de elución. Para esto se requiere de estándares de peso molecular y del uso de diferentes relaciones o parámetros de calibración para una adecuada interpretación de resultados (Angulo, 1999).



A1.1 Diagrama del proceso de separación de las moléculas dentro de una columna de GPC.

Puede observarse que las moléculas pequeñas penetran en los pequeños conductos que presentan las esferas de gel, donde la velocidad de flujo de solvente es menor. De esta manera las moléculas grandes, incapaces de penetrar en los pequeños conductos de las esferas de gel se mueven entre ellas donde la velocidad del flujo es superior. Como consecuencia, las moléculas de mayor peso molecular son eluidas antes que las de menor peso molecular. A continuación se muestran los tiempos de elución experimentales obtenidos para los diferentes estándares utilizados (Tabla A1).

Tabla A1. Pesos moleculares y tiempos de elución de los estándares utilizados para la determinación del peso molecular de GM y sus fracciones.

Proteína estándar	Peso molecular (Da)	Tiempo de elución (min)
Tiroglobulina	669 000	382.07
Ferritina	440 000	386.51
Catalasa	232 000	627.86
Aldolasa	158 000	652.40
Albumina	67 000	704.61
Quimiotripsina	25 000	751.42
Azul		374.53

ANEXO II

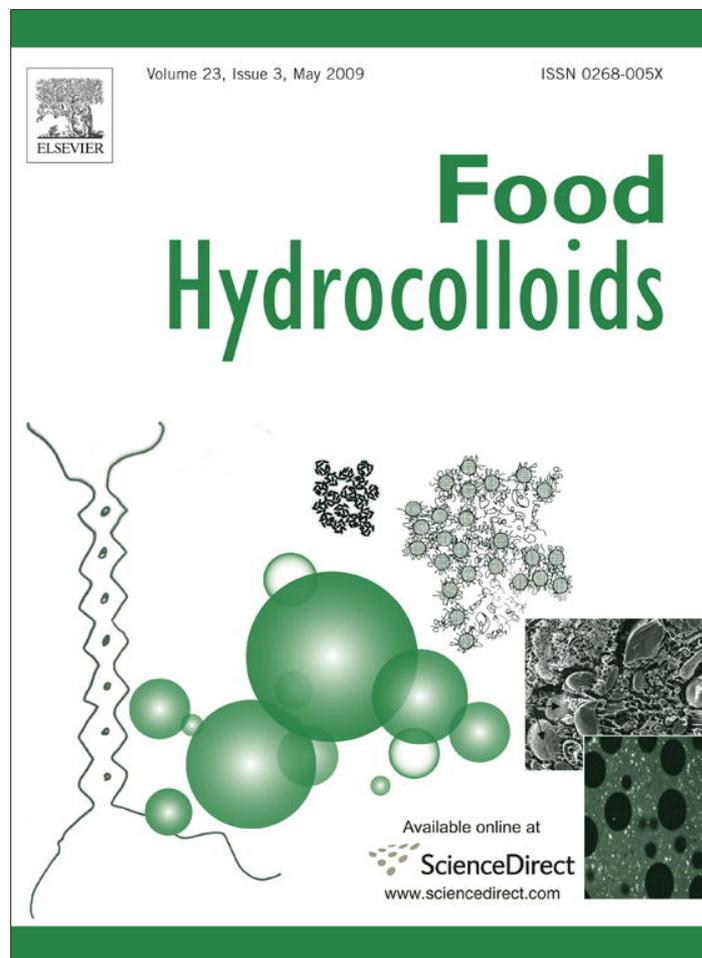
Publicación

Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil.

A. Román-Guerrero, J. Orozco-Villafuerte, J.P. Pérez-Orozco, F. Cruz-Sosa, R. Jiménez-Alvarado, E.J. Vernon-Carter.

Food Hydrocolloids 23: 708-713

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

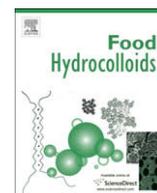
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Food Hydrocolloids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodhyd

Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel-oil

A. Román-Guerrero^a, J. Orozco-Villafuerte^b, J.P. Pérez-Orozco^c, F. Cruz-Sosa^a,
R. Jiménez-Alvarado^a, E.J. Vernon-Carter^{d,*}

^aDepartamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340 México, DF, México

^bDepartamento de Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón esq. Paseo Tollocan s/n, Col. Residencial Colón, C.P. 50120 Toluca, Edo. México

^cDepartamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Zacatepec, CP 62780 Zacatepec, Mor., México

^dDepartamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina Edificio T-247, C.P. 09340 México, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2008

Accepted 12 June 2008

Keywords:

Mesquite gum
Mesquite gum fractions
Interfacial rheology
Orange peel emulsions
Rate of coalescence

ABSTRACT

Mesquite gum was fractionated using hydrophobic interaction chromatography, yielding three fractions (F_1 , F_2 , F_3) whose average molecular masses ranged from 1.81×10^4 to 5.23×10^5 Da; F_1 had 90% polysaccharide and 1% protein contents, while F_2 and F_3 contained 16 and 46% of protein, respectively. Fractions' ability to form oil–water interfacial films and to stabilize orange peel–oil emulsions was evaluated. The highest interfacial viscosity (321 mNm^{-1}) and highest instantaneous elastic modulus ($E_0 = 0.113 \times 10^{-4} \text{ mNm}^{-1}$) were exhibited by F_2 and these values were significantly higher than those exhibited by the whole mesquite gum. F_1 did not exhibit viscoelastic properties. Emulsions made with F_2 , F_3 , and the whole mesquite gum had coalescence rates of the order of 10^{-8} s^{-1} , indicating that these emulsions were very stable. Nevertheless, emulsions made with F_2 were significantly more stable than those made with F_3 and whole mesquite gum, and emulsions made with F_1 broke after 1 day aging. These results indicate that there is a close correlation between emulsion stability, interfacial rheological properties, and an adequate relatively high protein/high polysaccharide balance in the fractions.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Natural gums are extensively used in a variety of industrial applications due to their emulsifying, microencapsulating, thickening and stabilizing properties, among others. Mesquite gum (MG) is a natural polysaccharide exuded by the bark of *Prosopis* spp. trees. Previous studies have demonstrated that the functionality of mesquite gum (*Prosopis* spp.) is comparable and even superior, in certain conditions, to that of gum arabic (*Acacia senegal*) (GA) (Goycoolea, Calderón de la Barca, Balderrama, & Valenzuela, 1997; Goycoolea, Morris, Richardson, & Bell, 1995; Pedroza-Islas, Macías-Bravo, & Vernon-Carter, 2002; Vernon-Carter, Beristain, & Pedroza-Islas, 2000; Vernon-Carter et al., 1996; Vernon-Carter & Sherman, 1980), which is considered a benchmark emulsifying, encapsulating, and film forming agent (Garti & Leser, 2001). Chemically, MG is very similar to GA, both gums are highly branched complex heteropolyelectrolytes formed principally by L-arabinose and D-galactose, and minor proportions of 4-O-methyl-D-glucuronate, and

L-rhamnose, differing only in the ratio between these residues, being of 2:4:1:1 for MG, and 4:2:1:1 for GA, respectively. MG and GA have been reported as containing a small amount of protein, being from 2.0 to 4.8% for MG, and from 1.0 to 2.0% for GA, which are complex mixtures of distinct fractions with different chemical structures (Goycoolea, Calderón de la Barca, Balderrama, & Valenzuela, 1998; Orozco-Villafuerte, Cruz-Sosa, Ponce-Alquicira, & Vernon-Carter, 2003; Ray, Bird, Iacobucci, & Clark, 1995; Vernon-Carter et al., 2000). This protein fraction is responsible for the emulsifying properties of MG and GA, where an adsorbed layer of protein at the oil–water interface provides the primary stabilizing structure in many food colloids (Dickinson, 1994). Both gums have been fractionated by hydrophobic interaction chromatography (HIC) or gel permeation chromatography (GPC), and results indicate that they consist of several principal fractions, in which protein content varied greatly (Orozco-Villafuerte et al., 2003; Randall, Philips, & Williams, 1989; Ray et al., 1995; Vázquez-Ortiz, López-Franco, & Goycoolea, 2006). Ray et al. (1995) found that GA fractions with higher molecular mass and higher protein content increased citrus oil emulsion stability applied into model beverages. The study of emulsifying properties of MG has been increased in the last years,

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5804 4648; fax: +52 55 5804 4900.
E-mail address: jvc@xanum.uam.mx (E.J. Vernon-Carter).

because of its ability forming viscoelastic films at the oil–water interface, and due to the supposition that the emulsifying mechanism is closely related with the protein content (Vernon-Carter & Sherman, 1980; Vernon-Carter, Pedroza-Islas, & Beristain, 1998).

In disperse systems, rheological properties are closely related with adsorption dynamics, and molecular structure of their components. Because of this adsorption, interface shows resistance to deformation. Interfacial rheology investigates deformations occurring at fluid interfaces; many practical problems may involve interfacial rheological phenomena: formation, stability and processing of foams and emulsions; spraying and atomization; selection of surfactants; and film formation (Steffe, 1996). The interfacial rheology of adsorbed biopolymers appears to be sensitive to the detailed macromolecular structure and to the nature of the intermolecular interactions of the adsorbed layer (Rodríguez-Patiño & Niño, 1999).

The objectives of this work were three-fold: (1) to fractionate and chemically characterize whole MG and its fractions; (2) to determine the interfacial shear viscosity and interfacial static viscoelastic properties (creep compliance–time studies) at the mineral oil–water interface; and (3) to evaluate the stability imparted to orange peel-oil-in-water emulsions by MG and its fractions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Mesquite gum (MG) tears from trees from *Prosopis laevigata* were hand collected in the Mexican state of San Luis Potosi, Mexico, and purified as reported by Vernon-Carter et al. (1996). Orange peel-oil and brominated vegetable oil were purchased from Saframex S.A. de C.V. and mineral oil was purchased from Droguería Cosmopolitana, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). All reagents were of analytical grade and were purchased from Sigma, USA. The water used for all the experiments was double distilled and deionized.

2.2. Fractionation

2.2.1. Hydrophobic affinity chromatography

A defined volume of 9% MG solutions in 4.2 M NaCl was applied to a phenyl-Sepharose CL-4B column (Pharmacia) with an inner diameter of 2.54 cm and 50 cm length. Elution was carried out using 4.2 M NaCl, 2.0 M NaCl, and deionized water successively using a flow rate of 40.0 cm³ h⁻¹. The eluent was monitored at 280 nm using a low-pressure chromatographic system (Biologic LP, Bio-Rad, CA, USA). The recovered fractions were exhaustively dialyzed against deionized water and then freeze-dried. Protein and sugar contents were determined for each fraction (Randall et al., 1989; Ray et al., 1995).

2.2.2. Molecular mass distribution

The molecular mass distributions were determined by GPC using a packed column with Sephacryl S-500-HR (Pharmacia) with an inner diameter of 2.54 cm and 100 cm length. For eluent 0.5 M NaCl at a flow rate of 34.5 cm³ h⁻¹ was used. Elution was monitored by UV absorption at 280 nm using a low-pressure chromatography system (Biologic LP, Bio-Rad, CA, USA). The volume of sample injected was 1 cm³ at a concentration of 80 mg cm⁻³. The column was calibrated using protein and dextran standards (Pharmacia Biotech) in the range of 13,700–669,000 Da (Orozco-Villafuerte et al., 2003).

2.3. Analytical methods

2.3.1. Nitrogen, ash, moisture, and total sugar content determinations

The percentage nitrogen in the gum and its fractions was determined by Kjeldahl method using a Büchi system (Scrubber 412,

Digestion unit 426 and Distillation unit K-314). The protein content was calculated using a conversion factor of 6.25 as proposed by Anderson and Farquhar (1982). The moisture content was estimated by heating at 105 °C until constant weight was achieved. Ash content was estimated by heating (muffle furnace) at 550 °C until constant weight was achieved. Total sugar content was determined using phenol–sulfuric method (Dubois, Giles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956). Determination of glucuronic acid content was done using the carbazole method, and D-glucuronic acid (free acid) was used as standard (Randall et al., 1989).

2.4. Interfacial rheology

The interfacial rheological measurements were done using a Physica MCR 300 (Physica Meßtechnik GmbH, Stuttgart, Germany) modular compact rheometer, with a stainless steel biconical disk (radius of disk, R_b , of 15 mm and disk double angle, 2α , of 10°). A thermostated acrylic vessel (inner radius, R_c , of 27 mm) was inserted in the measuring plate of the rheometer, the aqueous solutions (MG and its fractions (1%w/w)) were carefully spilled into the vessel, afterwards the rheometer motor drive was lowered until stainless steel biconical disk was placed at the polysaccharide solution surface. Then the oil phase (mineral oil) was carefully poured with help of a glass rod unto the vertical wall of the vessel until the oil formed a layer above the polysaccharide solution (Pérez-Orozco, Beristain, Espinosa-Paredes, Lobato-Calleros, & Vernon-Carter, 2004).

2.4.1. Interfacial shear viscosity

The films were submitted to a constant disk angular velocity (Ω) of 1.27×10^{-3} rad s⁻¹. Necessary torque (M) required for maintaining the steady rotational speed and angular displacement of the disk with time (θ_b) were monitored every 10 s for 15 min with the rheometer software. Interfacial shear strain (γ^{int}) and interfacial shear stress (σ^{int}) were calculated using Eqs. (1) and (2).

$$\sigma^{\text{int}} = \frac{M}{2\pi r^2} \quad (1)$$

$$\gamma^{\text{int}} = \frac{2R_b^2}{R_c^2 - R_b^2} \theta_b \quad (2)$$

where r is the radial location between the disk and the vessel ($R_b \leq r \leq R_c$). Plots of σ^{int} versus γ^{int} were obtained in order to determine the region in which the torque and/or interfacial stress at the interface attains steady-state behaviour (data not shown), which was used in the calculation of the interfacial shear viscosity (η^{int}) with Eq. (3) (Pérez-Orozco et al., 2004). η^{int} was determined at different aging times of the films. All measurements were done at 25 °C.

$$\eta^{\text{int}} = \frac{M}{4\pi\Omega} \left(\frac{1}{R_b^2} - \frac{1}{R_c^2} \right) \quad (3)$$

2.4.2. Interfacial static viscoelastic properties (creep compliance)

The interfacial creep compliance was carried out by subjecting the film to a constant σ^{int} of 0.3535 mN m⁻¹ during 15 min, after which σ^{int} was withdrawn, and the stress relaxation of the film was followed for further 15 min. The change in θ_b was monitored every 2 s with the rheometer software and γ^{int} as function of time was calculated with Eq. (2). The interfacial compliance of the films as function of time was obtained with the following equation:

$$J(t) = \frac{\gamma^{\text{int}}(t)}{\sigma^{\text{int}}} \quad (4)$$

where σ^{int} was evaluated at the disk radius (R_b). Plots of $J(t)$ versus t for MG and its fractions films were obtained. The experimental data were non-linearly adjusted to the following equation (Sherman, 1969) using a Polymath software release 5.0 (Cache Corporation, Austin, TX, USA):

$$J(t) = J_0 + J_m \left(1 - e^{-(t/\lambda_m)}\right) + J_N \quad (5)$$

where $J_0 (=1/E_0; E_0$ is the interfacial instantaneous elastic modulus) is the instantaneous interfacial elastic compliance in which bonds between the primary structural units are stretched elastically, $J_m (=1/E_R; E_R$ is the interfacial retarded elastic modulus) is the interfacial mean retarded compliance of all the bonds involved, $\lambda_m (=J_m/\eta_m; \eta_m$ is the interfacial mean viscosity associated with retarded elasticity) is the interfacial mean retardation time, and $J_N (=t/\eta_N)$ is the interfacial Newtonian compliance, which is characterized by an interfacial Newtonian viscosity η_N . All measurements were carried out at 25 °C.

2.5. Emulsions formation and stability

Measured amounts of MG and the fractions F_1 , F_2 and F_3 were dispersed in water and let to hydrate for 12 h before their use. To prepare 25 cm³ of emulsion, appropriate amounts of orange peel-oil and weighing agent (brominated vegetable oil) were pre-mixed in a 2:1 ratio with continuous stirring until homogenous mixture with density = 1.01 g cm⁻³ was obtained. The oil phase was then dispersed into each of the polysaccharide solutions with a VCX130 sonicator (SONICS VIBRA CELL, USA) for 5 min with 40% amplitude, and emulsions E_{MG}, E_{F_1}, E_{F_2} , and E_{F_3} were produced, respectively. All of the emulsions had a volume disperse phase (φ) of 0.1 and the weight ratio of the oil phase to MG or its fractions was 1:1 in dry weight. Emulsions were droplet size measured with a Master Sizer 2000 (Malvern Instruments, UK) at different time intervals during 37 days.

The stability of the emulsions was evaluated by determining the rate of droplet coalescence. Droplet coalescence largely follows first order kinetics (Sherman, 1969; Walstra, 1987) and can be represented as:

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-K_c t} \quad (6)$$

where N_t is the number concentration of droplets at time t , N_0 is the number concentration of freshly droplets (time = 0), and K_c is the rate constant, which is related to the probability to the interdroplet film (interfacial layer) rupturing in time t (Sherman, 1969). When the volume of emulsion droplets remains constant, that is, no oiling-off occurs in the emulsions, the relationship between the emulsion droplet number, N , and the mean volume average droplet diameter, d_{30} , is given by

$$\frac{4}{3}\pi \left(\frac{d_{30}}{2}\right)^3 N = \text{constant} \quad (7)$$

The relative number of emulsion droplets can then be obtained from (Ye, Hemar, & Singh, 2004)

$$\frac{N_t}{N_0} = \left[\frac{(d_{30})_{t=0}}{(d_{30})_{t=t}}\right]^3 \quad (8)$$

If the kinetic plots of $\ln(N_t/N_0)$ versus t for the emulsions give a straight line, then the slope is K_c (Ruíz-Ramos et al., 2006).

2.6. Statistical analysis

All quantitative data were expressed as means \pm standard deviation. Statistical analysis was performed with analysis of variance

(ANOVA) and Tukey's test of NCSS statistical software (2001). Significance was determined with a value of $\alpha \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Fractionation and characterization

MG was fractionated by HIC and it was made up by three principal fractions (Fig. 1). Fraction 1 (F_1) represented 85.5% of the whole MG, whereas fraction 2 (F_2) accounted for 11.1% and fraction 3 (F_3) for 4.0% of the whole gum. These results are in close agreement with those found by Orozco-Villafuerte et al. (2003) for mesquite gum collected from *P. laevigata*.

Each MG fraction was then re-fractionated in order to estimate its molecular weight (MW) by GPC. In this case, the elution is in order of decreasing molecular size rather than by increasing hydrophobicity as in HIC. Fig. 2 shows the chromatograms obtained for each fraction and the average molecular mass of each fraction is shown in Table 1. The molecular mass intervals for the different fractions were: F_1 from 2.29×10^5 to 5.23×10^5 Da; F_2 from 2.27×10^5 to 3.82×10^5 Da; and F_3 from 1.81×10^4 to 3.47×10^5 Da. These molecular masses are substantially lower than the reported average molecular mass for whole MG obtained from *P. laevigata* which is about 2.12×10^6 Da (Vernon-Carter et al., 1998, 2000).

The chemical analysis showed that the polysaccharide content between the fractions decreased significantly from F_1 to F_2 to F_3 , but F_1 sugar content was non-significantly different from that for the whole MG (Table 1). On the other hand, protein content was significantly different among all the samples being higher for F_3 , and followed in descending order by F_2 , whole MG, and F_1 , respectively (Table 1). The values quoted for total sugars and protein in whole MG and the three fractions are comparable with those reported by Orozco-Villafuerte et al. (2003).

3.2. Interfacial shear viscosity

Fig. 3 shows the tendencies of η^{int} versus aging time for the interfacial films from MG, F_1 , F_2 and F_3 at the water–mineral oil interface. The curves showed that whole MG, F_2 and F_3 films experienced an increase in η^{int} with aging time, whereas F_1 presented η^{int} values close to zero which did not vary with aging time. The initial η^{int} value and its rate of increase over time were closely related to the relative protein/polysaccharide contents of MG and its fractions. F_2 , with 16.29% protein and 78.85% polysaccharide

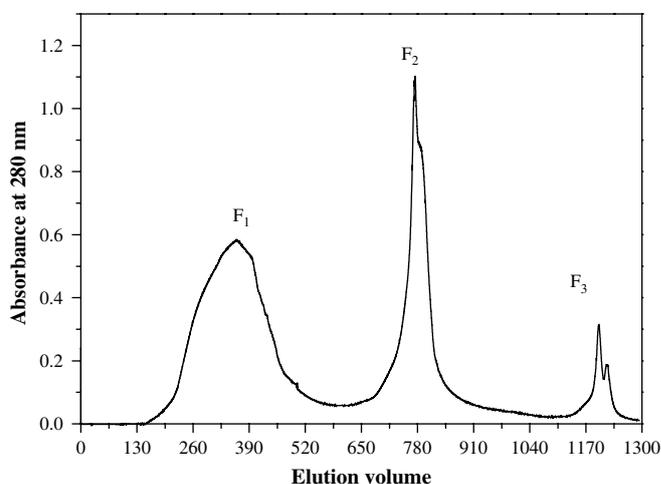


Fig. 1. Profile of the mesquite gum fractionation by hydrophobic interaction chromatography.

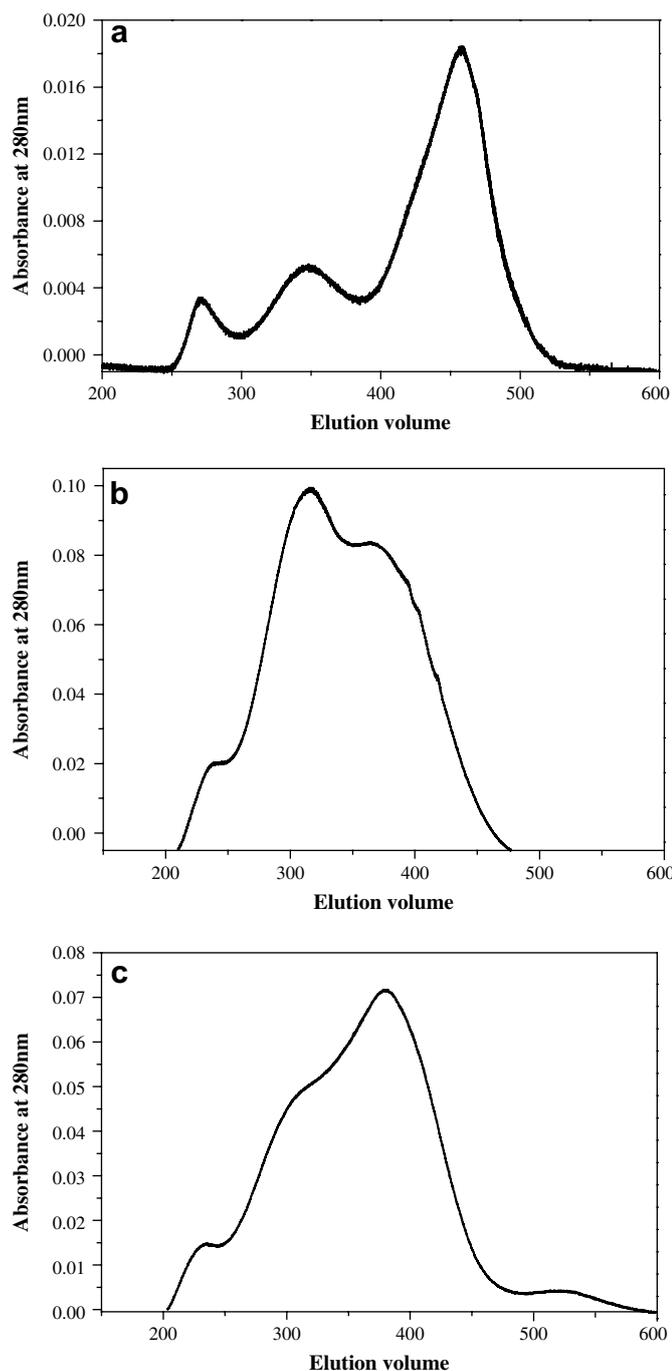


Fig. 2. Gel permeation chromatograms of mesquite gum fractions: (a) F_1 , (b) F_2 and (c) F_3 .

contents, presented much higher η^{int} than F_3 , which contained a higher amount of protein (46.21%) but a lower amount of polysaccharide (58.16%), and that F_1 , which contained the highest amount of polysaccharide (93.49%) but the lowest protein content (0.76%). So it seems that a relatively high amount of hydrophobic amino acid residues allowed for an effective anchoring of the biopolymers at the interface, whilst a relatively high amount of hydrophilic carbohydrate blocks extending out into the aqueous phase allowed for increased interactions of the adsorbed biopolymer layers. Thus, an adequate relatively high protein/high polysaccharide balance is more important than when this balance is poor in protein or rich in polysaccharide. As time provided for

Table 1
Chemical analysis of whole MG and its fractions

	Whole MG	F_1	F_2	F_3
Average molecular mass (Da)	2.12×10^6 ^a	5.23×10^5	3.82×10^5	1.81×10^4
Moisture (%)	7.16 ± 0.20 ^a	9.23 ± 0.17 ^d	7.68 ± 0.19 ^c	8.32 ± 0.20 ^b
Ash (550 °C, %)	1.88 ± 0.12 ^a	1.98 ± 0.19 ^a	2.43 ± 0.33 ^b	2.35 ± 0.23 ^b
Total sugars (%)	90.96 ± 6.89 ^a	93.49 ± 6.82 ^a	78.85 ± 4.52 ^b	58.16 ± 7.57 ^b
Glucuronic acid (%)	23.27 ± 0.16 ^a	22.19 ± 2.04 ^a	14.54 ± 0.92 ^b	10.60 ± 0.52 ^c
Protein ($N_{Kjeldahl} \times 6.25$, %)	4.88 ± 0.52 ^c	0.76 ± 0.16 ^d	16.29 ± 0.01 ^b	46.21 ± 3.34 ^a

Data are mean of three replicates per sample. Values with the same letter within the same row are not significantly different.

^a Data obtained from Vernon-Carter et al. (1998). All percentages expressed in dry basis.

film formation was longer, reconfiguration of adsorbed molecules at the interface proceeded to a greater extent, allowing new molecules to reach the interface and for new interactions with neighbouring molecules to take place, thus giving rise to an increase in interfacial viscosity.

3.3. Interfacial static viscoelastic properties

The interfacial creep compliance–time study is a non-destructive test permitting the determination of rheological parameters under conditions that approach the state of the sample at rest; this allows elucidating a more precise picture of the actual film (Muñoz & Sherman, 1990). Under adequate experimental conditions, all of the interfacial films, except that obtained with F_1 , exhibited typical interfacial creep compliance–time curves (Fig. 4), indicating that whole MG, F_2 and F_3 exhibited viscoelastic behaviour. The viscoelastic parameters characterizing each film are given in Table 2. Analysis of instantaneous interfacial compliance modulus (J_0), which is related with the instantaneous reversible deformation suffered by the strain applied to the film, indicates that an adequate relatively high protein/high polysaccharide balance in the macromolecules produced a significant increase in the value E_0 of the films. Thus, E_0 , which provides a measure of elastic strength on the bonds making up the interfacial network structure (Lobato-Calleros, Aguirre-Mandujano, Vernon-Carter, & Sánchez-García, 2000) was significantly higher for F_2 than for F_3 and for MG because of its protein/polysaccharide balance as previously explained. The retarded interfacial elastic compliance region parameters J_m and λ_m

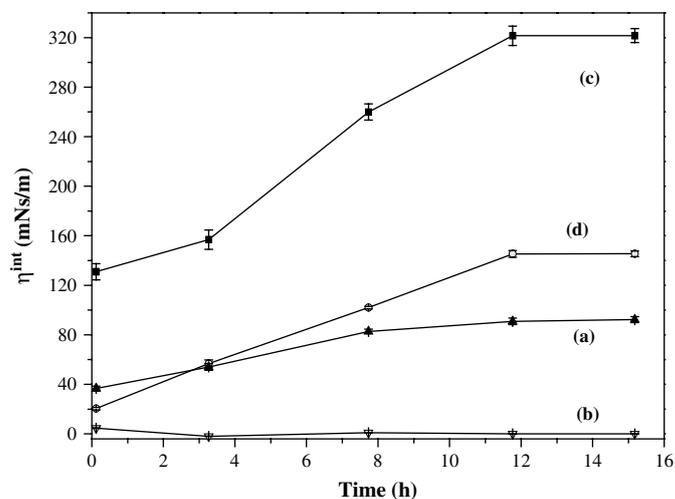


Fig. 3. Changes in the apparent surface shear viscosity at the mineral oil–water interface with aging time for: (a) whole mesquite gum, (b) F_1 , (c) F_2 and (d) F_3 .

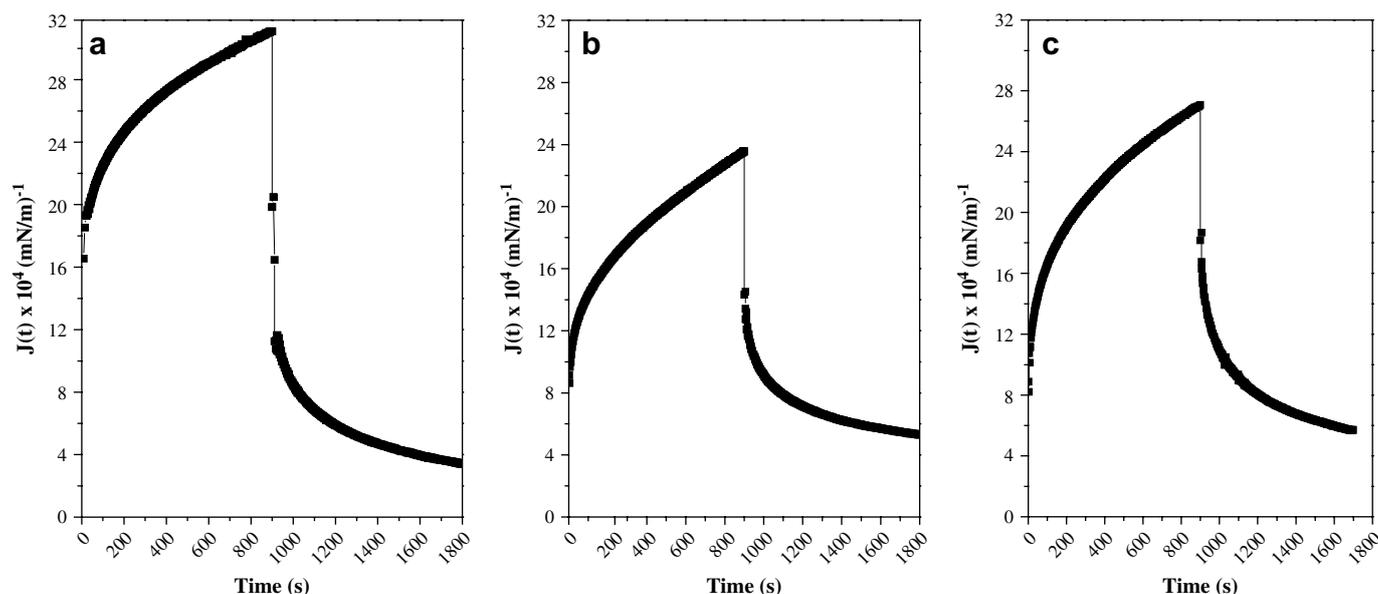


Fig. 4. Creep compliance–time ($J(t)$) curves for: (a) whole mesquite gum, (b) F_2 , and (c) F_3 . F_1 did not exhibit creep compliance behaviour.

(J_m/η_m), where bonds break and reform but not at the same rate, can provide more detailed information regarding the nature of the system under study (Sherman, 1969), and in particular λ_m , which is the time taken for the delayed strain to reach approximately 63.2% ($1 - 1/e$) of the final value. Materials with a large retardation time reach full deformation slowly (Steffe, 1996). The λ_m exhibited by our films was significantly higher for F_2 than for F_3 and for MG (Table 2). These results presumably indicate that a balanced proportion must exist between the protein and the sugar residues contents in the macromolecule so that enhanced viscoelastic properties can be developed at the water–mineral oil interface, i.e., sufficient protein must be available for it to act as anchoring moiety at the interface, but on the other hand, a sufficiently large amount of polysaccharide groups must be projected into the aqueous phase, where multilayer interactions and cross-linking take place, eventually giving rise to three-dimensional gel-like structures. J_N indicates that when bonds have ruptured, i.e., the time required for them to reform is longer than the test period, individual fragments of the broken structure flow past one another (Sherman, 1969). The J_N values shown by F_2 and F_3 were non-significantly different between themselves, but significantly higher than those for MG, which indicated that the film structure for F_2 and F_3 was more complex than that for MG as its structure recovery takes longer.

3.4. Stability of emulsions formed with MG and its fractions

The relative change in droplet size of the emulsions with aging time was also mainly affected by an adequate relatively high protein/high polysaccharide balance of the macromolecules. Thus, the stability of E_{F_1} was very short term as the emulsion broke within few hours after its formation. The very low protein content in F_1 ,

hindered the anchoring of the molecules of this fraction at the interface, and thus the emulsion droplets devoid of an adsorbed polymeric layer. Emulsions E_{MG} , E_{F_2} and E_{F_3} showed very good overall stabilities against droplet coalescence which were of the order of 10^{-8} s^{-1} , although a significantly best stability was shown by E_{F_2} followed by E_{MG} and E_{F_3} (Table 3), respectively. Seemingly in these three cases a fine interplay between protein content and the extent of projected polysaccharide moieties into the aqueous continuous phase determine the stability of the emulsion. These results are in close agreement with the results given above for the interfacial films rheological properties. Thus, fraction F_2 seems to form a robust macromolecular barrier at the interface that prevents the droplets from aggregating or coalescing by a combination of steric stabilization and electrostatic stabilization mechanisms (Dickinson, 2003).

4. Conclusions

In this work, it was shown that mesquite gum consisted at least of three fractions with different chemical composition, molecular mass distribution, interfacial rheological properties, and emulsifying properties. The fractions of mesquite gum can provide alternative uses that provide better functionality and added value compared to the whole gum. Thus, fraction F_1 which did not present surface activity, but possessed the highest polysaccharide content among all the fractions, could be a potential excellent source of dietary fibre. Fraction F_2 was shown to be an excellent emulsifier agent, probably to its more adequate relatively high protein/high polysaccharide balance than that for the whole mesquite gum. This more adequate balance provided a better adsorption at the interface, and the formation of an interfacial film with

Table 2
Viscoelastic parameters obtained for films formed with MG and its fractions

Sample	$J_0 \times 10^4 \text{ (mN/m)}^{-1}$	$J_N \times 10^4 \text{ (mN/m)}^{-1}$	$\eta_N \times 10^4 \text{ (mNs/m)}^{-1}$	$\lambda_m \text{ (s)}$	$J_m \times 10^4 \text{ (mN/m)}^{-1}$	$E_0 \times 10^{-4} \text{ (mN/m)}$
MG	11.18 ± 0.56^c	6.09 ± 0.30^a	147.76 ± 1.50^c	344.03 ± 5.72^a	12.86 ± 0.60^a	0.089^c
F_1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F_2	8.88 ± 0.07^a	7.90 ± 0.39^b	113.99 ± 1.07^a	520.56 ± 6.60^c	14.23 ± 0.70^b	0.113^a
F_3	9.13 ± 0.06^b	7.69 ± 0.38^b	117.03 ± 0.60^b	388.66 ± 5.94^b	15.66 ± 0.68^c	0.109^b

ND = Not determined.

Data are mean of three replicates per sample. Values with the same letter within the same column are not significantly different.

Table 3

Changes in droplet size (d_{30}) and apparent rate of coalescence for the emulsions: E_{MG} , E_{F_1} , E_{F_2} , and E_{F_3} , after 37 days

Sample	K_c (s^{-1})	Correlation of determination R^2	Initial d_{30} (μm)	Final d_{30} (μm)
E_{MG}	2.79E-08b	0.9108	0.497d1	0.680c2
E_{F_1}	ND	ND	0.320a ^a	Broken ^a
E_{F_2}	1.86E-08a	0.9434	0.410c1	0.550a2
E_{F_3}	2.87E-08c	0.9215	0.390b1	0.670b2

ND = Not determined.

^a Broken within 24 h of formation. Values with the same letter within the same column or the same number within the same row are not significantly different.

enhanced viscoelastic properties and good steric repulsion energy that increased the stability of emulsions. Fraction F_3 could be used in combination with fraction F_2 hoping to achieve a synergist effect in the stabilization of emulsions.

Acknowledgements

The authors are grateful for the partial financial support provided to this research by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) through grant U45992-Z and by the Universidad Autónoma del Estado de México through project 2431/2007U.

References

- Anderson, D. M. W., & Farquhar, J. G. K. (1982). Gum exudates from the genus *Prosopis*. *The International Tree Crops Journal*, 2, 15–24.
- Dickinson, E. (1994). Protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Engineering*, 22, 59–74.
- Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25–39.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Garti, N., & Leser, M. E. (2001). Emulsification properties of hydrocolloids. *Polymers for Advanced Technologies*, 12, 123–135.
- Goycoolea, F. M., Calderón de la Barca, A. M., Balderrama, J. R., & Valenzuela, J. R. (1997). Immunological and functional properties of the exudate gum from northwestern Mexican mesquite (*Prosopis* spp.) in comparison with gum arabic. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 29–36.
- Goycoolea, F. M., Calderón de la Barca, A. M., Balderrama, J. R., & Valenzuela, J. R. (1998). Processing and functional behaviour of low tannin mesquite gum. In P. A. Williams, & G. O. Phillips (Eds.), *Gums and stabilisers for the food industry*, Vol. 9 (pp. 305–313). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Goycoolea, F. M., Morris, E. R., Richardson, R. K., & Bell, A. E. (1995). Solution rheology of mesquite gum in comparison with gum arabic. *Carbohydrate Polymers*, 27, 37–45.
- Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Vernon-Carter, E. J., & Sánchez-García, J. (2000). Viscoelastic properties of white fresh cheese filled with sodium caseinate. *Journal of Texture Studies*, 31, 379–390.
- Muñoz, J., & Sherman, P. (1990). Dynamic viscoelastic properties of some commercial salad dressings. *Journal of Texture Studies*, 21, 411–426.
- Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Ponce-Alquicira, E., & Vernon-Carter, E. J. (2003). Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. *Carbohydrate Polymers*, 54, 327–333.
- Pedroza-Islas, R., Macías-Bravo, S., & Vernon-Carter, E. J. (2002). Oil thermo-oxidative stability and surface oil determination of biopolymer microcapsules. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1, 37–44.
- Pérez-Orozco, J. P., Beristain, C. I., Espinosa-Paredes, G., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Interfacial shear rheology of interacting carbohydrate polyelectrolytes at the water–oil interface using an adapted conventional rheometer. *Carbohydrate Polymers*, 57, 45–54.
- Randall, R. C., Phillips, G. O., & Williams, P. A. (1989). Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. *Food Hydrocolloids*, 3, 65–75.
- Ray, A. K., Bird, O. B., Iacobucci, G. A., & Clark, B. C., Jr. (1995). Functionality of gum Arabic. Fractionation, characterization and evaluation of gum fractions in citrus oil emulsions and model beverages. *Food Hydrocolloids*, 9, 123–131.
- Rodríguez-Patiño, J. M., & Niño, M. R. (1999). Interfacial characteristics of food emulsifiers (proteins and lipids) at the air–water interface. *Colloid and Surface: Biointerfaces*, 15, 235–252.
- Ruiz-Ramos, J. O., Pérez-Orozco, J. P., Báez-González, J. G., Bósquez-Molina, E., Pérez-Alonso, C., & Vernon-Carter, E. J. (2006). Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum–chitosan complexes. *Carbohydrate polymers*, 64, 355–363.
- Sherman, P. (1969). Rheology of emulsions. In P. Sherman (Ed.), *Emulsion science* (pp. 237–243). London/New York: Academic Press.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. East Lansing, USA: Freeman Press. pp. 304–310.
- Vázquez-Ortiz, F. A., López-Franco, Y., & Goycoolea, F. M. (2006). Fractionation and characterization of the monosaccharides from mesquite *Prosopis* spp. and Arabic gum by normal, bonded phase, HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29, 1991–1999.
- Vernon-Carter, E. J., Beristain, C. I., & Pedroza-Islas, R. (2000). Mesquite gum (*Prosopis* gum). In G. Doxastakis, & V. Kiosseoglou (Eds.), *Novel macromolecules in food systems* (pp. 217–235). Amsterdam: Elsevier.
- Vernon-Carter, E. J., Gomez, S. A., Beristain, C. I., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R., & Moreno-Terrazas, R. C. (1996). Color degradation and coalescence kinetics of aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. *Journal of Texture Studies*, 27, 625–641.
- Vernon-Carter, E. J., Pedroza-Islas, R., & Beristain, C. I. (1998). Stability of *Capsicum annum* oleoresin-in-water emulsions containing *Prosopis* and *Acacia* gums. *Journal of Texture Studies*, 29, 553–567.
- Vernon-Carter, E. J., & Sherman, P. (1980). Rheological properties and applications of mesquite tree (*Prosopis juliflora*) gum 2. Rheological properties and stability of O/W emulsions containing mesquite gum. *Journal of Texture Studies*, 11, 351–355.
- Walstra, P. (1987). Physical principles of emulsion science. In J. M. V. Blanshard, & P. Lillford (Eds.), *Food structure and behaviour* (pp. 87–106). London, England: American Press.
- Ye, A., Hemar, Y., & Singh, H. (2004). Influence of polysaccharides on the rate of coalescence in oil-in-water emulsions formed with highly hydrolyzed whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5491–5498.