

## CAPÍTULO 4

### **Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocoloides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (*Delonix regia*) y Proteínas de Leguminosas (*Phaseolus Lunatus* y *Vigna Unguiculata*), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional**

M<sup>a</sup>. Eugenia Ramírez-Ortiz<sup>1,2</sup>, Wilbert Rodríguez-Canto<sup>1</sup>, Luis Jorge Corzo-Rios<sup>3</sup>, Santiago Gallegos-Tintoré<sup>1</sup>, David Betancur-Ancona<sup>1</sup>, Luis Chel-Guerrero<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ingeniería Química. Campus de Ciencias Exactas e Ingenierías, Periférico Norte Km 33.5, Chuburná de Hidalgo Inn. Mérida, México.

<sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Departamento de Ingeniería y Tecnología, Av. 1° de Mayo S/N, Sta. María las Torres, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México.

<sup>3</sup>Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIB-IPN), Av. Acueducto s/n, Col. Barrio la Laguna Ticomán CP. 07340 Del. Gustavo A. Madero, México D.F.

\*[cguerrer@correo.uady.mx](mailto:cguerrer@correo.uady.mx)

M.E. Ramírez-Ortiz, W. Rodríguez-Canto, L.J. Corzo-Rios, S. Gallegos-Tintoré,  
D. Betancur-Ancona, L. Chel-Guerrero

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.289>

### **Referenciar este capítulo**

Ramírez-Ortiz, M.E., Rodríguez-Canto, W., Corzo-Rios, L.J., Gallegos-Tintoré, S., Betancur-Ancona, D., & Chel-Guerrero, L. (2015). *Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocolooides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (Delonix regia) y Proteínas de Leguminosas (Phaseolus lunatus y Vigna unguiculata), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional*. En Ramírez-Ortiz, M.E. (Ed.). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. Barcelona, España: OmniaScience. 91-138.

## **Resumen**

---

En este trabajo se estudiaron las propiedades funcionales de dos sistemas hidrocoloides mixtos (SHM) formados con goma de flamboyán extraída por precipitación con etanol e hidrolizados proteicos de *Phaseolus lunatus* y *Vigna unguiculata* con un grado de hidrólisis de 19.1% y 32.87%, respectivamente, los cuales se obtuvieron por precipitación isoelectrica para concentrar la proteína y posterior hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina. Se realizaron las curvas de flujo y se determinó el porcentaje de estabilidad (%EE) de emulsión mediante un diseño factorial  $2^3$  con los factores y niveles: pH 3 y 7, temperatura 30°C y 70°C y concentración de goma 0.5% y 1.5% (p/v), manteniendo en 2.5% p/v la concentración del hidrolizado. Se obtuvo que los ácidos aspártico y glutámico fueron los mayoritarios en los hidrolizados. Los SHM de *P. lunatus* y *V. unguiculata* con 1.5% (p/v) de goma a 30°C, presentaron la mayor viscosidad ajustándose al modelo de Cross, mientras que los demás sistemas se ajustaron a la ley de la potencia. Los valores de viscosidad estuvieron en el rango de 0.045 hasta 1.76 Pa\*s. El %EE (porcentaje de estabilidad de la emulsión) alcanzó valores de 100 para ambos sistemas a 1.5% de goma y 30°C, el fenómeno de desestabilización fue el cremado, mientras que la emulsión con solo goma presentó coalescencia. Se determinó la capacidad anticariogénica a los sistemas que mejores propiedades funcionales presentaron. La capacidad anticariogénica fue de una reducción de la desmineralización de 59.75% y 50.21% para los SHM de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, respectivamente. Por lo anterior, los SHM podrían ser usados en la industria alimentaria ya sea como

*M.E. Ramírez-Ortiz, W. Rodríguez-Canto, L.J. Corzo-Rios, S. Gallegos-Tintoré,  
D. Betancur-Ancona, L. Chel-Guerrero*

aditivos alimenticios, incorporarlo en cremas, bebidas y una variedad de aplicaciones, debido a las versatilidad de propiedades funcionales y capacidad anticariogénica que presentaron.

## **Palabras clave**

Sistemas mixtos de hidrocoloides, flamboyán, *Phaseolus lunatus*, *Vigna unguiculata*, reología, actividad anticariogénica.

---

## 1. Antecedentes

### 1.1. Leguminosas

Las leguminosas son una fuente importante de proteína, grasa, carbohidratos complejos, compuestos minerales, fibra y vitaminas. Superan a otras verduras en su contenido de fósforo, potasio, calcio y magnesio, también es rico en hierro y vitamina B, como la tiamina y riboflavina (Filipiak-Florkiewicz, Florkiewicz, Cieilik, Walkowska, Walczycka, Leszczyńska et al. 2011). En la península de Yucatán se cultivan el *P. lunatus* y la *V. unguiculata* conocidos regionalmente como frijol Ib y X'pelón, respectivamente.

### 1.2. Características Nutritivas y Funcionales del *Phaseolus Lunatus*

El *P. lunatus*, conocido en Latino América como frijol lima, frijol de luna y en el sureste de México como “Ib”, es nativo de la zona tropical de América, existen por lo menos dos centros de domesticación: El mesoamericano (México y Guatemala) con tipos de semillas pequeñas (Figura 1) y el andino (Perú y Ecuador) con tipos de semillas grandes. El mesoamericano tiene una amplia distribución desde México hasta Argentina, mientras que el andino está restringido a su zona nativa, actualmente se cultiva en todas las zonas tropicales y subtropicales incluyendo África, Sur Asiático y el Pacífico.



Figura 1. Semillas de *Phaseolus lunatus* (Baby lima bean)

La semilla madura presenta por cada 100 g: 20.62 g de proteína, 62.83 g de carbohidratos, aporta 335 kcal. Se han extraído la proteína y el almidón de las semillas del *P. lunatus* por fraccionamiento húmedo con una relación 1:6 de harina de *P. lunatus* y agua, pH 11 y 1 hora de extracción, obteniendo una recuperación de 18.82% en

proteína y 28.84% de almidón. La composición proximal del concentrado proteico muestra un valor de 65.97% de proteína, 23.31% de Extracto Libre de Nitrógeno (ELN) y 7.3% de fibra además de 2.61% de cenizas (Betancur, Gallegos & Chel, 2004).

El perfil aminoacídico del concentrado del *P. lunatus* tiene un aporte mayor de los aminoácidos esenciales que el recomendado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO por sus siglas en inglés), mientras que la harina es deficiente en los aminoácidos azufrados metionina y cisteína. Por otro lado, contiene todos los aminoácidos polares y no polares siendo los polares: Gli, Ser, Tr, Cis, Tir, Asp, Glu, Lis, Arg e His y los no polares: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Fen, Trp y Met. Entre los factores antinutricios, el *P. lunatus* contiene lectinas, inhibidores de proteasas, ácido fítico, polifenoles, oligosacáridos y glucósidos cianogénicos. El fósforo del ácido fítico se estima que es el 28.2% del fósforo total de la semilla, y al igual que los polifenoles son conocidos quelantes, por lo cual disminuyen la absorción de metales por el organismo.

### 1.3. Características Nutritivas y Funcionales de la *Vigna unguiculata*

En la península de Yucatán, México, se encuentra una gran variedad de semillas de leguminosas, las cuales están bien adaptadas a las condiciones regionales, incluyendo al *P. lunatus*, *Canavalia ensiformis* y la *V. unguiculata* (Chel, Maldonado, Burgos, Betancur & Castellanos, 2011). La *V. unguiculata* (Figura 2) pertenece a



Figura 2. Semillas de la *V. unguiculata* (Frijol X'pelón)

la familia de las fabáceas, en América Latina se le conoce por el nombre de frijol caupí, frijol de vaca y en México como frijol pelón.

Por cada 100 g de semilla madura, se tienen 23.53 g de proteína, 60.03 g de carbohidratos, aporta 336 kcal. El frijol pelón (X'pelón) es una variedad de la *V. unguiculata* en México, la cual se cultiva en la Península de Yucatán; Chel et al. (2011) reportaron una concentración de proteína del 82.8% presente en la semilla, además de contener los aminoácidos esenciales, sobrepasando la cantidad mínima que debe presentar por 100 g de proteína, con excepción de los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y el triptófano, presenta también 14.1% de ELN, cenizas y grasa en 1.2% (Chel et al., 2011)

Las propiedades funcionales evaluadas al concentrado proteico de la *V. unguiculata* fueron investigadas por Chel et al. (2011) obteniendo una alta retención de agua (245%) y aceite (231%), la máxima capacidad de formar espuma fue a pH extremos tanto alcalino como ácido (133-190%), mientras que a pH neutro o cercano al punto isoeléctrico (pH 6) fue muy bajo; también observaron baja estabilidad de estas espumas independientemente del pH. Asimismo, se evaluó la capacidad emulsificante, siendo del 45% e independiente del pH mientras que la estabilidad mejoró significativamente a pH de 9.

#### **1.4. Estructura y Propiedades de la Goma de Semilla del Árbol Flamboyán (*Delonix Regia*)**

Las gomas o hidrocoloides son polisacáridos de alto peso molecular, los galactomananos presentes en algunas semillas, son polisacáridos heterogéneos, ampliamente distribuidos en la naturaleza y generalmente poseen cadenas principales formadas por enlaces  $\beta$ -(1,4) de D-manopiranosas. Estas cadenas tienen ramificaciones de enlaces  $\alpha$ -(1,6) de D-galactopiranosas (Srivastava & Kapoor, 2005). Debido que tienen alta viscosidad e interacciones sinérgicas con otros polisacáridos, como la xantana y la agarosa, son usados a menudo como agentes espesantes y estabilizantes en la industria alimentaria (Tamaki, Teruya & Tako, 2010).

La semilla del *D. regia* contiene un galactomanano, el cual ha sido estudiado para la variedad de Japón, de la cual se obtuvo un rendimiento del 28% con base en el peso de la semilla y del 73% con base en el polisacárido contenido en

el endospermo, siendo éste de 90% en la semilla. La masa molecular del galactomanano del *D. regia* es de  $2.5 \times 10^5$  UMA aproximadamente y una relación de manosa y galactosa de 3.9:1, como se puede observar en el monómero del polisacárido (Figura 3) (Tamaki et al., 2010). Un estudio toxicológico (Krishnaraj, Joghi, Chandrasekar, Muralidharan & Manikandan, 2012), reforzó la evidencia de ausencia de toxicidad de esta goma, ya que encontraron una dosis letal media ( $DL_{50}$ ) mayor a 2g/kg proponiendo ser usada como agente liberador de fármacos, debido a su carácter hidrófilo y lenta solubilidad.

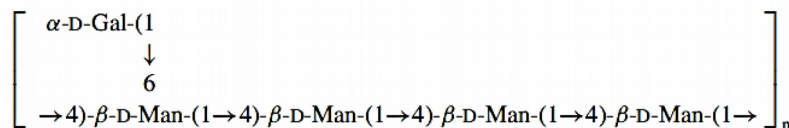


Figura 3. Monómero del galactomanano de la semilla de flamboyán (Tamaki et al., 2010)

La goma extraída de las semillas de los árboles del *D. regia* en Yucatán se caracterizó por su composición proximal, Pacheco, Rosado, Betancur y Chel (2010), encontraron que el valor del extracto libre de nitrógeno (E.L.N.) es mayor al 90%; este valor se considera que está compuesto por el total de los polisacáridos presentes en la muestra, en este caso el galactomanano. Un contenido de fibra de 1.8 % y 2.16% de proteína. Se observó una temperatura de transición vítrea a 95.2°C, lo cual manifiesta que se encuentra una estructura cristalina en la goma y tiene enlaces de tipo débil (electrostáticos, puentes de hidrógeno, Van der Waals) pero por su gran número mantienen fuertemente unidas las cadenas, lo cual provoca su rigidez y difícil solubilidad (Pacheco, Rosado, Chel & Betancur, 2008).

Los polisacáridos de tipo galactomananos pueden ser usados para el consumo humano, incluyéndolos en productos para impartir cuerpo y textura.



Éstos difieren de unos a otros por su relación entre manopiranososa y galactopiranososa. Las diferentes propiedades químicas de éstos los hacen versátiles, pudiendo desarrollar: retención de agua, espesamiento, gelificación, emulsificación, estabilización de suspensiones y la formación de películas. Estas propiedades pueden mejorarse al interactuar con otros monómeros o polímeros (Srivastava & Kapoor, 2005) tales como gomas carragenina con xantana, agar con galactomananos, o bien, con otras de naturaleza proteica (Rodríguez & Pilosof, 2011).

### **1.5. Interacción de Proteínas y Polisacáridos**

Las interacciones producidas por la atracción entre polisacáridos y proteínas, dependiendo de las condiciones del medio, pueden conducir a la formación de complejos solubles o insolubles (Figura 4). La formación de complejos insolubles produce un fenómeno de separación de fases llamado coacervación (Figura 4a) conocida también como separación asociativa de fases (Rodríguez & Pilosof, 2011). Otro fenómeno que se puede presentar es la segregación (Figura 4d) en la cual el polisacárido y la proteína se separan en fases diferentes debido a la repulsión entre estas moléculas.

Si las proteínas y polisacáridos muestran una atracción mayor, usualmente a través de interacciones electrostáticas, ocurre la coacervación de complejos o separación asociativa de fases (Figura 4b). La formación de complejos entre proteínas y polisacáridos suele ocurrir a valores de pH por debajo del punto isoelectrico (pI) de la proteína y valores bajos de fuerza iónica. Este complejo se forma en un rango de pH entre el pK de los grupos aniónicos de los polisacáridos y el pI de las proteínas. Se ha observado que polisacáridos sulfatados son capaces de formar complejos solubles a valores de pH por debajo del pI de la proteína y presentar interacciones no electrostáticas, como son las hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y enlaces coordinados, lo que conduce a este acomplejamiento irreversible (Ye, 2008).

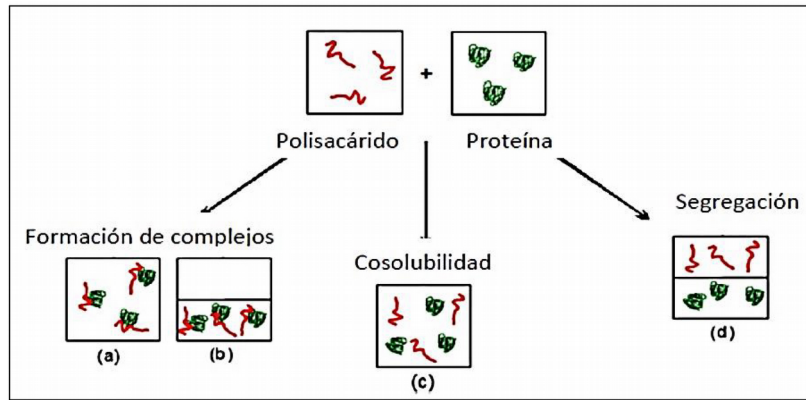


Figura 4. Comportamiento de mezclas proteína con polisacáridos (Rodríguez & Pilosof, 2011)

Se conoce menos acerca del papel que tienen las interacciones de baja energía en los complejos de proteína y polisacárido. Sin embargo, se ha demostrado previamente que los complejos inducidos electrostáticamente de proteína de suero/goma xantana pueden ser estabilizados a través de calentamiento moderado, indicando un posible rol de las interacciones hidrofóbicas (Turgeon, Beaulieu, Schmitt & Sanchez, 2003). En el complejo de  $\beta$ -lactoglobulinas y pectinas metiladas al aumentar la temperatura se observó una disminución en la concentración del complejo, este comportamiento se debe a la presencia de puentes de hidrógeno en la estabilidad del mismo (Girard, Turgeon & Gauthier, 2002). Se ha estudiado el sinergismo entre la goma de algarrobo (una goma neutra) e hidrolizados de concentrado proteico de suero a diferentes grados de hidrólisis de este último, obteniendo que a bajas concentraciones de goma de algarrobo disminuyó el tiempo de gelificación (Rocha, Teixeira, Hilliou, Sampaio & Gonçalves, 2009).

## **1.6. Sistemas Hidrocoloides en Alimentos**

La investigación de los coloides en alimentos se refiere a la fisicoquímica de sistemas complejos formados por macromoléculas y partículas dispersas que estabilizan las emulsiones, dispersiones, geles y espumas alimenticias. El objetivo es entender las propiedades de los sistemas en términos de la interacción entre proteínas, polisacáridos y lípidos, tanto en el seno de la fase como en las interfaces (Dickinson & Vélchez, 2011).

La mayoría de los hidrocoloides son estabilizantes de emulsiones de agua y aceite, pero pocos pueden actuar como emulsificantes, requiriendo generalmente alguna modificación. Esta funcionalidad requiere actividad en la superficie de la interfase aceite: agua; por lo tanto, la habilidad para facilitar la formación y estabilización de pequeñas gotas durante y después de la emulsificación está dada por la capacidad de disminuir la tensión interfacial que proporcionaría el polisacárido. Los polisacáridos con capacidad emulsificante en alimentos son la goma arábica, almidones modificados, celulosas modificadas, algunas tipos de pectinas y algunos galactomananos. La actividad en la superficie de estos hidrocoloides tiene su origen de dos maneras: i) el carácter no polar de algunos grupos unidos a la cadena hidrofílica del polisacárido, ii) la presencia de proteína unida al polisacárido, ya sea por enlaces covalentes o físicamente (Dickinson, 2009). Algunos estudios (Bouyer, Mekhloufi, Le Potier, de Kerdaniel, Grossiord, Rosilio et al., 2011; Klein, Aserin, Svitov & Garti, 2010) se han realizado para mezclar las ventajas de usar proteínas e hidrocoloides, los cuales formen y estabilicen las emulsiones, como ejemplo la  $\beta$ -lactoglobulina y la goma de arábica, ovoalbúmina con goma arábica, entre otros.

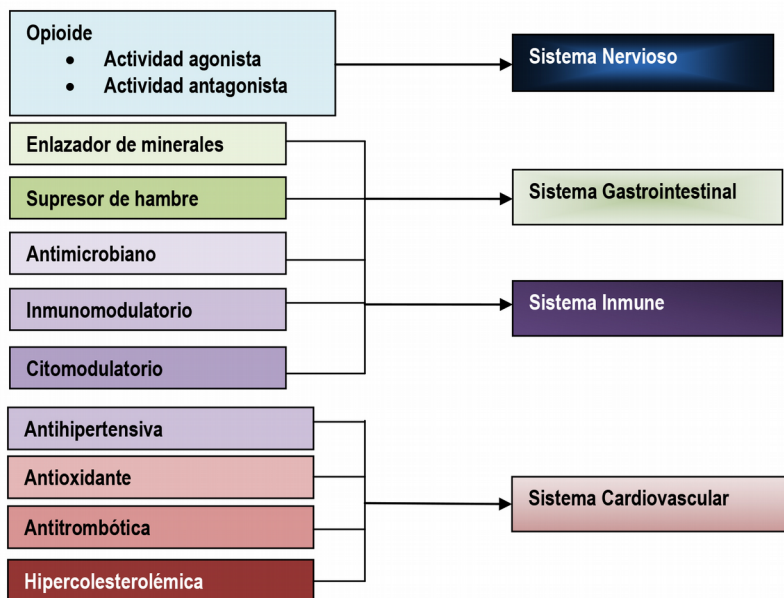
## **1.7. Alimentos con Péptidos Bioactivos**

El uso de péptidos en los alimentos debido a su aporte bioactivo, ha sido investigado en varias fuentes de proteínas, así como diversos métodos enzimáticos para su obtención (Aimutis, 2004; Kitts & Weiler, 2003; Korhonen & Pihlanto, 2006). Debido al proceso de hidrólisis (al que se ve sometida para la obtención de cadenas polipeptídicas), las propiedades funcionales como la capacidad de formar geles y espesante entre otras se ven reducidas. Para regular esta disminución, se están investigando sistemas mixtos entre proteínas o péptidos con hidrocoloides, de tal manera que cada uno de estos aporte ciertas características benéficas; entre los estudios que se realizan, se pueden mencionar sistemas de concentrados proteicos de suero de leche con goma arábiga e hidrolizados de proteínas de suero de leche con goma de algarrobo (Rocha et al., 2009; Valim, Cavallieri & Cunha, 2008).

Los péptidos bioactivos se definen como fragmentos específicos de proteína, los cuales tienen un impacto positivo en la función o condición del cuerpo, y en última instancia, pueden influir en la salud (Kitts & Weiler, 2003). Pueden tener un tamaño de 2 a 20 residuos; sin embargo, se han encontrado péptidos bioactivos con hasta 27 residuos de aminoácidos. Son derivados de proteínas y se pueden encontrar como ingredientes en alimentos funcionales (Korhonen, 2002). Las funcionalidades bioactivas se pueden clasificar según en el sistema que actúen (Figura 5) y ésta estará dada por la secuencia de aminoácidos presentes. Una actividad funcional de los péptidos en particular, la anticariogénica es de gran interés, ya que este padecimiento se encuentra en un alto número de personas.

La caries dental es uno de los mayores problemas de salud, está presente en todos los países del mundo. Los países industrializados controlaron el problema administrando agua enriquecida con fluoruro y productos de higiene dental. En México, según los resultados del sistema de vigilancia epidemiológica de patologías bucales (Mejía, González & Lomelí, 2010) en el total de la población examinada, la prevalencia de caries dental fue de 95.7%.

En este mismo estudio, se encontró que entre la población de 20 a 24 años se tiene una prevalencia de 89.5% y en la población de 45 a 74 años fue mayor.



*Figura 5. Clasificación de la funcionalidad bioactiva de los péptidos según el sistema humano en el que actúen (Korhonen & Pihlanto, 2006)*

### **1.8. Actividad Anticariogénica**

La caries es la manifestación química de un proceso patogénico, que puede haber sido efectuada en una serie de interacciones en la superficie del diente por meses o años. La placa es una biopelícula sobre el esmalte dental compuesto de bacterias viables y no viables, mucopolisacáridos y otros residuos celulares y metabolitos. El primer paso en la cariogénesis es el comienzo del decaimiento de la sustancia protectora del diente (enamel) debido al efecto de los microorganismos que crecen por el metabolismo de los constituyentes de la alimentación (como la sacarosa) que sustituyen a las

bacterias orales nativas. La primera evidencia clínica de esta interacción, es la aparición de la placa dental en el esmalte del diente. La placa bacteriana metaboliza los azúcares de los alimentos para producir ácidos orgánicos que solubilizan el esmalte dental, el cual está compuesto por hidroxiapatita que son cristales de fosfato de calcio. Cuando el esmalte es expuesto a los ácidos orgánicos, el fosfato de calcio sólido es solubilizado a calcio libre y es removido de la boca por los movimientos salivales (Aimutis, 2004). Después de la desmineralización inicial, la cual crea pequeñas cavidades, tiene lugar el deterioro del diente ocasionado por la microflora presente en la placa; si la cavidad es profunda, las bacterias pueden llegar a la pulpa o nervio del diente, provocando dolor intenso y la posible pérdida de éste (Canseco, 2001).

Se han propuesto métodos para prevenir la caries, los cuales están basados en la formación de una “barrera física” por la adsorción de algún péptido bioactivo en la superficie del diente y así brindar protección contra la acción directa de los ácidos. También se ha sugerido que estos péptidos en la superficie del diente pueden actuar como “una zona de buffer” que neutralice los ácidos, previniendo de esta manera la desmineralización. En general, estos péptidos pueden actuar de diferentes formas para evitar la desmineralización y así prevenir la formación de caries (Warner, Kanekanian & Andrews, 2001). Se tienen reportes de que la actividad anticariogénica del hidrolizado de *P. lunatus* tuvo como resultado reducir la desmineralización de calcio en la hidroxiapatita en un 50% en pruebas *in vitro* (Córdova, Ruiz, Segura, Betancur & Chel, 2012) lo que representa un alto valor comparable con los obtenidos en suero lácteo proveniente de la elaboración de queso cottage y suero lácteo ácido, que fueron de 44% y 48.5%, respectivamente (Warner et al., 2001).

Este estudio tuvo como objetivo estudiar la funcionalidad tecnológica de los sistemas hidrocoloides mixtos en diversas condiciones fisicoquímicas, formulados a partir de goma de flamboyán (*Delonix regia*) e hidrolizados proteicos extensivos de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, así como su actividad anticariogénica.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Materia Prima**

Se emplearon semillas de flamboyán recolectadas de árboles de la zona norte de Mérida, Yucatán, México, en los meses de enero a marzo del 2012. Las semillas de *P. lunatus* y *V. unguiculata* se compraron en los meses de febrero y mayo, respectivamente, en la Central de Abastos de la ciudad, estas semillas son de la cosecha de 2013.

### **2.2. Obtención de la Goma de Flamboyán**

Se obtuvo el endospermo de la semilla de flamboyán por medio de una modificación del método de Pacheco et al. (2010), la cual consistió en la hidratación de la semilla por 12 h en agitación con una relación 10:1 (volumen de agua: peso semillas) y calentamiento a 80°C. Se cortaron las semillas longitudinalmente y se obtuvo el endospermo separando manualmente del resto de la semilla. El endospermo se lavó con agua destilada y se licuó en húmedo para la obtención de la goma. La goma de flamboyán se obtuvo por medio de una adaptación al método reportado por Azero y Andrade (2006). Se preparó una dilución 1:5 v/v del endospermo licuado con agua destilada. Dicha dispersión se calentó y agitó durante 30 minutos a 60°C. Se tamizó y precipitó con etanol al 96% en una relación de 1:3. La goma obtenida se secó, molió y almacenó.

### **2.3. Caracterización Proximal de la Goma Nativa de Flamboyán**

Después de la obtención de la goma nativa de flamboyán, se procedió a realizar el análisis proximal por los métodos establecidos por la AOAC (1997). Humedad (Método 925.10) por secado en estufa a 105°C por 4 horas. Cenizas (Método 923.03), residuo inorgánico resultante de la incineración a 550°C durante 4 horas. Grasa cruda o extracto etéreo (Método 920.39), extracción 4

horas con hexano en un sistema Soxhlet. Proteína cruda (Método 954.01), por el método Kjeldahl, usando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína. Fibra cruda (Método 962.09), residuo orgánico combustible e insoluble que se obtiene después de que la muestra fue sometida a digestiones ácida y alcalina. Carbohidratos totales. Se estimaron por diferencia al 100% como el extracto libre de nitrógeno (ELN).

#### **2.4. Obtención de la Harina y Concentrado Proteico del *Phaseolus Lunatus* y *Vigna Unguiculata***

Cinco Kg de semillas de *P. lunatus*, se trituraron y molieron en un equipo de martillos pasando por malla 20 (0.833 mm). Para *Vigna unguiculata* se lavó y se separaron los granos dañados. Los granos en buen estado se secaron al sol y quebraron empleando un molino de mano, se separó la cáscara del grano con aire comprimido. Los granos de *P. lunatus* además se molieron en un molino de impacto; la harina resultante en ambos casos, se pasó por tamices malla 80 (0.173 mm) y 100 (0.147 mm), respectivamente.

La harina se tamizó a través de una malla 80. Para obtener el concentrado se realizó empleando el método descrito por Chel, Pérez, Betancur y Dávila (2002), la harina se dispersó en agua en proporción 1:6 p/v (harina: agua), se ajustó el pH a 11 con NaOH 1N. Se agitó durante 1 hora. Posteriormente, la suspensión se filtró de manera secuencial a través de mallas 80 y 100 para eliminar la fibra. El residuo sólido se lavó cinco veces con agua, recuperando y mezclando el agua de lavado con el sobrenadante de la suspensión inicial. Después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora para la precipitación del almidón. El sobrenadante rico en proteína se recuperó por decantación. El pH del sobrenadante con la proteína solubilizada se ajustó con HCl 1N a 4.5, la solución resultante se centrifugó a 2500 rpm por 15 minutos, eliminando el sobrenadante. Se determinó proteína y humedad. Con estos valores se calculó, pesó y congeló la cantidad necesaria del concentrado proteico húmedo para preparar 1 litro de dispersión al 4% de proteína para su hidrólisis.



## **2.5. Obtención de Hidrolizados Proteicos**

Los hidrolizados proteicos se obtuvieron con un tiempo total de reacción de 10 minutos (Ruiz, 2011) para *P. lunatus* y 90 minutos para *V. unguiculata* (Chel, Domínguez, Martínez, Dávila & Betancur, 2012). Se prepararon suspensiones al 4% p/v en relación al contenido de proteína presente en cada concentrado y la relación enzima-sustrato fue 1:10% (v/v). Se emplearon las proteasas Pepsina<sup>MR</sup> y Pancreatina<sup>MR</sup> (P-P), ajustando: temperatura a 37°C, pH 2 para la Pepsina<sup>MR</sup> y pH 7.5 para la Pancreatina<sup>MR</sup>. Las concentraciones enzimáticas empleadas para hidrolizar los concentrados de *P. lunatus* y *V. unguiculata* fueron al 4% (p/v). La hidrólisis con este sistema se realizó a la mitad del tiempo con la primera enzima. Posteriormente se ajustó el pH, se agregó la segunda proteasa y se completó el tiempo seleccionado. Las proteasas se inactivaron por calentamiento en un baño a 80°C por 20 minutos. Posteriormente, los hidrolizados fueron centrifugados a 2500 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se liofilizó a -47°C y  $13 \times 10^{-3}$  mbar.

## **2.6. Determinación del Grado de Hidrólisis**

El grado de hidrólisis (GH) se determinó empleando la técnica de Orto-fenilftaldialdehido (OPA) reportada por Nielsen, Petersen y Dambmann (2001), que está basada en la determinación de grupos aminos libres. Se preparó una solución madre de L-serina en agua (1 mg/ml); con 10 mg de L-Serina en 10 ml de agua. De dicha solución se preparó una solución estándar de serina de 0.1 mg/ml. Se realizó una curva de calibración, empleando como estándares diferentes volúmenes (0, 50, 100, 150 y 200 µl) obtenidos de la solución de L-serina y 1.5 ml del reactivo OPA. Los estándares con reactivo de color se agitaron durante 5 segundos y se midió su absorbancia a 340 nm luego de 2 minutos de reacción. Las muestras se diluyeron hasta una concentración final de 1 mg/ml (se hizo el ajuste en relación a la proteína de la fracción soluble e insoluble) y para su lectura, se tomaron 200 µl de cada hidrolizado diluido, se le adicionaron 1.5 ml de

reactivo OPA, se agitó por 5 segundos y después de 2 minutos se midió su absorbancia a 340 nm. Con la curva de calibración de L-serina se evaluó el GH del hidrolizado de *P. lunatus* obtenido.

Los aminos totales en el concentrado se determinaron mediante una hidrólisis ácida total del mismo, donde se utilizó HCl 6N a 100°C durante 24 horas en estufa. La relación de ácido empleado fue de 6 ml por cada 4 mg de proteína presentes en el concentrado. Luego de la hidrólisis total, el ácido residual fue evaporado empleando una estufa de vacío a 90°C y 600 mbar de presión durante 24 horas. El residuo obtenido se resuspendió en una solución de SDS al 1% generando una coloración amarilla. Esta solución (200 µl) fue empleada para determinar el total de aminos libres al ser leída en el espectrofotómetro a 340 nm, luego de añadirle 1.5 ml de OPA, se agitó y se esperó 2 minutos de reacción. Finalmente, se estimó el % GH mediante la siguiente fórmula:

$$GH = \frac{\text{Aminos libres en hidrolizado enzimático}}{\text{Aminos libres en hidrolizado ácido}} \times 100$$

## 2.7. Preparación de los Sistemas Hidrocoloides

Los sistemas hidrocoloides se estudiaron mediante un diseño factorial 2<sup>3</sup> con 4 réplicas de los puntos centrales, teniendo como variables el pH (3 a 7), la temperatura (30 y 60°C) y la concentración de goma (%p/v) de 0.5 y 1.5. (Ver Tabla 1).

Se agregó una solución de azida de sodio al 0.02%. A la goma de acuerdo con la concentración respectiva del sistema, se agitó durante 2 horas a 60°C con un imán en una placa de agitación; disuelta la goma se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se le adicionó el hidrolizado para tener una concentración de 2.5%. Para el diseño experimental, se mantuvo constante la concentración de hidrolizado en los tratamientos (2.5% (p/v)).

*Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocoloides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (*Delonix regia*) y Proteínas de Leguminosas (*Phaseolus Lunatus* y *Vigna Unguiculata*), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional*

Con este modelo de regresión se analizaron los resultados para determinar los tratamientos (Tabla 1) que tuvieron una mayor viscosidad y mayor estabilidad de la emulsión para cada SHM, siendo las variables de respuesta que se utilizaron posteriormente en la prueba bioactiva.

*Tabla 1. Condiciones experimentales para la preparación de los sistemas hidrocoloides con base en el diseño experimental 2<sup>3</sup> con puntos centrales*

| <b>Tratamiento</b>       | <b>pH</b> | <b>Temperatura (°C)</b> | <b>Concentración de goma (%p/v)</b> |
|--------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------------------|
| <b>1</b>                 | 3         | 30                      | 0.5                                 |
| <b>2</b>                 | 7         | 30                      | 0.5                                 |
| <b>3</b>                 | 3         | 60                      | 0.5                                 |
| <b>4</b>                 | 7         | 60                      | 0.5                                 |
| <b>5</b>                 | 3         | 30                      | 1.5                                 |
| <b>6</b>                 | 7         | 30                      | 1.5                                 |
| <b>7</b>                 | 3         | 60                      | 1.5                                 |
| <b>8</b>                 | 7         | 60                      | 1.5                                 |
| <b>Punto central (4)</b> | 5         | 45                      | 1                                   |

## **2.8. Determinación del Comportamiento al Flujo**

Se realizaron las curvas de flujo con un reómetro rotacional AR-2000 para los sistemas hidrocoloides mixtos del diseño (Tabla 1), posteriormente se usaron las concentraciones del sistema que presentó una mayor viscosidad y se realizaron las curvas a las dispersiones de los hidrolizados y de la goma de flamboyán individualmente. La curva de flujo se realizó de 0.1 a 1000 s<sup>-1</sup>; a 30, 45 y 60°C y con una geometría de placa y cono de 4 cm de diámetro, 2° de ángulo y un volumen de muestra aproximado a 0.59 ml.

Se ajustó la curva de flujo al modelo reológico que menor error estándar presentó, el cual se calculó utilizando el software TA data analysis. Por otro lado, se calculó el valor de la viscosidad por el reómetro a una velocidad de deformación de  $55 \text{ s}^{-1}$ , la cual es el equivalente usado para determinar la percepción de la viscosidad por los seres humanos (Rao, 2007).

## **2.9. Estabilidad de la Emulsión**

Se evaluó la estabilidad de las emulsiones formadas con los SHM con una adaptación del método reportado por Liu, Elmer, Low y Nickerson (2010). Se prepararon 20 ml de una emulsión al 40% v/v de aceite de maíz (marca Patrona®) en los SHM, en un homogeneizador de vidrio; agitando durante 3 minutos a 2100 rpm con un pistilo de teflón utilizando un agitador mecánico. Se vertieron 9ml de emulsión probetas de 10 ml. se mantuvieron durante 3 días a temperatura constante (30, 45 y 60°C) y se midió la separación de fase cada 24 horas. La estabilidad de la emulsión se determinó con la siguiente ecuación:

$$\%E.E. = \frac{V_1 - V_2}{V_1} * 100$$

Donde  $V_1$  es el volumen inicial de la emulsión (tiempo 0) y  $V_2$  es el volumen de la fase desestabilizada el tercer día. De los sistemas que presentaron una mayor estabilidad, se realizó la misma prueba a los hidrolizados y la goma por separado a las condiciones del mejor tratamiento.

## **2.10. Análisis de Aminoácidos del Hidrolizado Proteico**

La determinación de aminoácidos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Alaiz, Navarro, Girón & Vioque, 1992). Las muestras (3.5 mg) se hidrolizaron con 4 ml de HCl 6 N a 110°C durante 24 horas. Tras la hidrólisis, las muestras se evaporaron en un rotavapor y se redisolviaron en regulador de borato sódico 1 M, pH 9.0, llevándolas a un

*Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocoloides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (Delonix regia) y Proteínas de Leguminosas (Phaseolus Lunatus y Vigna Unguiculata), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional*

volumen final de 25 ml. La derivatización de los aminoácidos se efectuó a 50°C, durante 50 minutos, con un exceso de etoximetilenmalonato de dietilo. La separación de los aminoácidos se llevó a cabo con una columna Nova Pack C18 4 µm de fase reversa (Waters) de 300 × 3.9 mm a 18°C, usándose un sistema de gradiente binario con acetato sódico 25 mM, azida de sodio 0.02% pH 6.0 (A) y acetonitrilo (B) como disolventes. El flujo fue de 0.9 ml/min y el gradiente de elución usado: tiempo 0-3 minutos, gradiente lineal desde A:B (91:9) hasta A:B (86:14); tiempo 3-13 minutos, elución con A:B (86:14); tiempo 13-30 minutos, gradiente lineal desde A:B (86:14) hasta A:B (69:31); tiempo 30-35 minutos elución con A:B (69:31). Como patrón interno se utilizó ácido D,L-α-aminobutírico, calculándose el contenido de cada aminoácido a partir de rectas de calibrado construidas para cada uno de ellos. Los resultados se expresaron en g/kg de proteína.

El triptófano se determinó mediante HPLC con una columna Nova Pack C18 4 µm de fase reversa (Waters) de 300 × 3.9 mm a una temperatura controlada de 18°C leyendo a 280 nm, las muestras se trataron con una hidrólisis básica (Yust, Pedroche, Girón, Vioque, Millán & Alaiz, 2004) en la cual 6 mg de muestras se disolvió en 3 ml de NaOH 4 N, se sellaron en tubos para hidrólisis con atmósfera de nitrógeno y se incubaron a 100°C por 4 horas. Los hidrolizados fueron enfriados en hielo, neutralizados a pH 7 usando HCl 12 N y se diluyó a 25 ml con buffer de borato de sodio 1 M (pH 9). Alícuotas de estas soluciones fueron filtradas a través de filtros Millex (Millipor) 0.45 µm antes de la inyección. Soluciones estándar de triptófano fueron preparadas diluyendo una solución madre triptófano (0.51 mg/ml hidróxido de sodio 4 N). Estas fueron diluidas a 3 ml con hidróxido de sodio 4 N y se incubaron igual que las muestras. Se inyectaron 20 µl de muestra a la columna. Se usó una elución isocrática que consistió en una solución de acetato de sodio 25 mM con 0.02% de azida de sodio a pH 6/acetonitrilo (91:9) con un flujo de 0.9 ml por minuto.

### **2.11. Determinación de Actividad Biológica *In Vitro***

Se seleccionaron los SHM que presentaron una mayor respuesta con base en el análisis de las regresiones realizadas en las pruebas funcionales, esto para la prueba bioactiva *in vitro*.

### **2.12. Capacidad Anticariogénica**

La determinación de la actividad anticariogénica se realizó siguiendo la metodología descrita por Warner et al., (2001), es una determinación *in vitro* basada en el uso de la hidroxiapatita (HA). Consistió en hacer una suspensión de HA (2 mg/ml) en un buffer 0.1 M de Tris-HCl (pH 7), como reemplazo del esmalte dental. También se usó un buffer de acetato de sodio 0.4 M (pH = 4.2), utilizado para representar los ácidos orgánicos que se encuentran en la boca. Para el estudio del efecto protector, se prepararon los SHM (tratamiento 6, 1.5%), la dispersión de la goma de flamboyán y las dispersiones de los hidrolizados (a las condiciones del tratamiento 6m pH 7, temperatura 30°C). Se añadieron 4 ml de la muestra a 10 ml de la solución de HA y se mezclaron durante 20 minutos. Posteriormente, se le agregó 10 ml de la solución de acetato de sodio 0.4M y se mezcló durante 10 minutos. La mezcla resultante se centrifugó a 4500 rpm por 5 minutos. Al sobrenadante se le determinó los niveles de calcio y fósforo disueltos en la HA por acción del buffer de acetato de sodio, usando para el primero la metodología descrita en las normas NMX-AA-029-SCFI-2001 y NMX-100-SCFI-2004; mientras que para el calcio se determinó con titulación usando EDTA y azul de hidroxinaftol (Itoh & Ueno, 1970).

### **2.13. Análisis Estadístico**

Los resultados de las mediciones de las variables de respuesta para las pruebas tecnofuncionales se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) para modelos 2<sup>k</sup> y la regresión según los métodos de Montgomery

(2009), para conocer la significancia de los factores y sus interacciones de acuerdo al siguiente modelo:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{123}X_1X_2X_3$$

Posteriormente, las comparaciones de medias se realizaron por el método de Tukey con un nivel de significancia de 5%.

### **3. Resultados y Discusiones**

#### **3.1. Obtención de la Goma de Flamboyán**

Se obtuvieron 3.5 kg de semillas de flamboyán, de árboles en la zona norte de la ciudad de Mérida, Yucatán, México. Se extrajeron 337 g de goma de flamboyán a partir de 750 g de semilla, alcanzando un rendimiento promedio de 9.64% en peso de goma seca con respecto a la semilla. Este resultado es similar al 10% reportado por Corzo, Betancur y Chel (2012). La goma presentó un 8.85% de humedad y (Tabla 2) el valor de E.L.N. (extracto libre de nitrógeno) que se obtuvo fue de 97.82%, mayor que el reportado por Pacheco et al. (2010) y Medina (2012), los cuales fueron 95.31% y 93.93%, respectivamente; esto probablemente porque la extracción del endospermo fue manual, por lo que presentó una menor cantidad de impurezas. Sandoval (2013) utilizó una varilla metálica, presionando la semilla para la extracción del germen, liberando al endospermo de la cáscara, probablemente la presión ejercida propició la contaminación de aceites del germen hacia el endospermo; sin embargo, al no moler la semilla integral, obtuvo una menor cantidad de proteína en la goma. Esta goma presentó un mayor contenido de E.L.N. (97.72%) que el reportado para la goma Guar (Sabahelkheir, 2012), la cual tuvo un valor de 85.3%. Esta goma se comercializa con valores máximos de 6% de proteína y un mínimo de goma del 78% (MG Ingredient, 2011), el valor del E.L.N. es en su mayoría carbohidratos, por lo cual debido al proceso de extracción se

puede correlacionar este valor con la cantidad de goma galactomanana extraída de la semilla.

Tabla 2. Análisis proximal de la goma de Flamboyán

| Componente (%)  |              | (Sandoval, 2013) | (Pacheco et al., 2010) | (Medina, 2012) |
|-----------------|--------------|------------------|------------------------|----------------|
| <b>Ceniza</b>   | 0.70 ± 0.065 | 0.30             | 0.19                   | 1.0            |
| <b>Fibra</b>    | 0.28 ± 0.05  | 0.53             | 1.8                    | 1.69           |
| <b>Proteína</b> | 1.25 ± 0.043 | 1.05             | 2.16                   | 2.53           |
| <b>Grasa</b>    | 0.05 ± 0.003 | 0.28             | 0.54                   | 0.29           |
| <b>E.L.N.</b>   | 97.72        | 97.84            | 95.31                  | 93.93          |

### 3.2. Obtención de la Harina y Concentrado de *Phaseolus Lunatus* y *Vigna Unguiculata*

Se molieron 5 kg de semillas de *P. lunatus* y tamizados para obtener la harina. A esta se le realizó el análisis proximal, obteniéndose un 12.64% de humedad y un 23.65% de proteína en la harina (Tabla 3). Betancur, Martínez, Corona, Castellanos, Jaramillo y Chel (2009) realizaron el análisis proximal de la harina de *P. lunatus*, obteniendo valores similares de proteína y E.L.N. siendo 23.7% y 63.4%, respectivamente.

Por otra parte, se obtuvo la harina a partir de 5 kg de granos de *V. unguiculata* molidos y tamizados, a la cual se le realizó el análisis proximal, presentando un valor de humedad del 8.46%, y proteína del 25.04%, como se puede observar en la Tabla 3. Odedeji y Oyeleke (2011) realizaron el análisis proximal de semillas de *V. unguiculata* y obtuvieron valores similares, proteína de 23.12% y 62.86% de E.L.N.

El concentrado proteico (C.P.) húmedo extraído de las harinas del *P. lunatus* y de *V. unguiculata* presentaron una humedad del 88.09% y



84.30% respectivamente. Con respecto a la cantidad de proteína el *P. lunatus* tuvo un 74.06% y la *V. unguiculata* 68.29% en base seca. Comparando los valores del porcentaje de proteína entre la harina y el concentrado proteico de las leguminosas; se puede observar que el proceso de precipitación isoelectrica es efectivo para este tipo leguminosas, ya que logra una buena separación entre el almidón y la proteína presentes originalmente en la semilla, por lo cual estas son materias primas adecuadas para la obtención de aislados proteicos.

*Tabla 3. Composición proximal de las harinas y concentrados de P. lunatus y V. unguiculata (b.s. \*)*

| <b>Componentes %</b> | <b>Harina de <i>P. lunatus</i></b> | <b>Harina de <i>V. unguiculata</i></b> | <b>C.P. de <i>P. lunatus</i></b> | <b>C.P. de <i>V. unguiculata</i></b> |
|----------------------|------------------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Proteína</b>      | 23.65 ± 0.11                       | 25.04 ± 0.62                           | 74.06 ± 0.30                     | 68.29 ± 0.73                         |
| <b>Fibra</b>         | 4.68 ± 0.27                        | 1.77 ± .1                              | 0.11 ± 0.00                      | 0.08 ± 0.00                          |
| <b>Grasa</b>         | 1.19 ± 0.11                        | 1.16 ± .07                             | 3.84 ± 0.21                      | 2.97 ± 0.18                          |
| <b>Cenizas</b>       | 4.30 ± 0.08                        | 4.16 ± .04                             | 2.99 ± 0.01                      | 5.72 ± 0.18                          |
| <b>E.L.N.</b>        | 66.18                              | 67.87                                  | 13.03                            | 19.29                                |

\*(b.s.) Base seca.

### **3.3. Obtención de los Hidrolizados Proteicos y Perfil de Aminoácidos de *Phaseolus Lunatus* y *Vigna Unguiculata***

Los concentrados húmedos proteicos fueron hidrolizados secuencialmente con pepsina-pancreatina, obteniendo un grado de hidrólisis (GH) para el *P. lunatus* de 19.1 ± 1.7% con un tiempo de reacción de 10 minutos y 32.87 ± 0.66% con 90 minutos de reacción para *V. unguiculata*. Estos valores son similares al 16.54% y 35.7% de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, respectivamente, reportados por Córdova (2011) y Segura, Chel y Betancur (2010). Comparando la diferencia entre los grados de hidrólisis de la

*V. unguiculata* y *P. lunatus* se observa (Figura 6) como el tiempo de reacción es un parámetro clave para la hidrólisis. Comparando los valores obtenidos con otros sistemas enzimáticos (Figura 6), se ve que el grado de hidrólisis de los hidrolizados con pepsina 10 minutos, flavorzima 10 minutos y pepsina pancreatina (todos de *P. lunatus*) tienen valores muy similares.

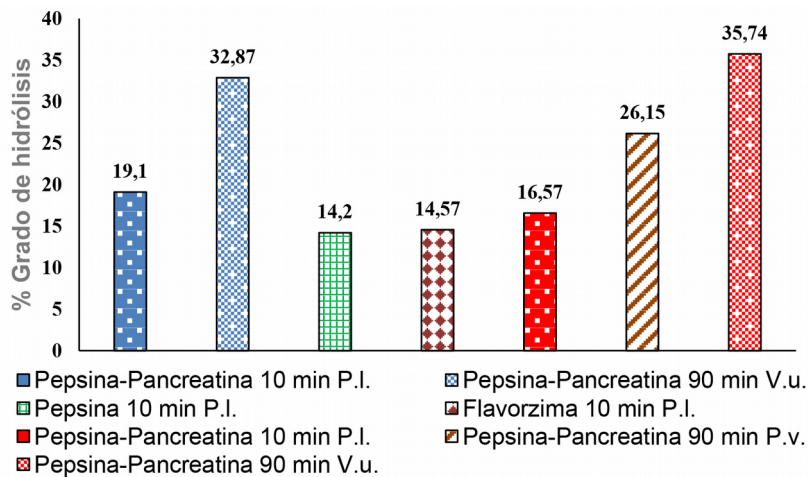


Figura 6. Grado de hidrólisis de leguminosas con diferentes enzimas y sustratos

Esto se podría deber a que la pepsina y la pancreatina son endopeptidasas y la flavorzima tiene comportamiento tanto exo como endo peptidasa por lo que los sitios de corte son diferentes (Aehle, 2007). Los hidrolizados obtenidos con un grado de hidrólisis del 19.1% y 32.87% para el *P. lunatus* y *V. unguiculata*, se pueden considerar hidrolizados extensivos, debido a que presentaron un grado de hidrólisis mayor a 10% (Benítez, Ibarz & Pagan, 2008); Korhonen y Pihlanto (2006) sugieren que los péptidos generados en sistemas extensivos pueden presentar bioactividades, tienen una estructura de entre 3 a 20 aminoácidos, los cuales pueden ser absorbidos por el organismo y según su secuencia aportar un beneficio a la salud. Por otra parte, con respecto a la funcionalidad, la hidrólisis extensiva de las proteínas disminuye la viscosidad de sus suspensiones; además de que al fragmentarse la proteína

en polipéptidos y péptidos, quedan expuestos los grupos hidrófobos y polares, por lo cual la capacidad emulsificante incrementa; sin embargo, al tratarse de moléculas pequeñas, la estabilidad de la emulsión se ve reducida, por la disminución de la viscosidad (Betancur et al., 2009).

La composición proximal de los hidrolizados proteicos de *P. lunatus* y *V. unguiculata* presenta valores altos de proteína  $56.2 \pm 0.44$  y  $61.59 \pm 0.28$ , respectivamente, lo cual las hace idóneas para la hidrólisis proteica. Por otra parte, debido a que el hidrolizado utilizado es la parte soluble, la ceniza aumentó ( $13.05 \pm 0.07$  para *P. lunatus* y  $13.6 \pm 0.87$  *V. Unguiculata*) en comparación con el concentrado, lo cual se debió a las sales disueltas en el proceso de extracción e hidrólisis; por lo tanto, al ser liofilizado se concentraron. Los hidrolizados proteicos liofilizados de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, tuvieron una humedad de 5.02% y 5.03%, respectivamente.

El perfil de aminoácidos realizado a los hidrolizados de *P. lunatus* y *V. unguiculata* se muestra en la Tabla 4. Agrupando los aminoácidos según su polaridad, se obtuvo que el 34.71% y 35.5% de los aminoácidos son no polares para *P. lunatus* y *V. unguiculata*, respectivamente, y un 65.29% en *P. lunatus* y 64.49% para la *V. unguiculata* de aminoácidos polares. Esta distribución de aminoácidos polares y no polares en las leguminosas de estudio es similar a la reportada para el concentrado proteico de la soya, el cual presentó un 35.05% de aminoácidos no polares y un 64.95% de polares (Gan, Cheng, Azahari, y Easa, 2009), esta similitud es debida a que tanto la soya como el *P. lunatus* y *V. unguiculata* pertenecen a la familia de las leguminosas. Es importante conocer esta distribución, ya que muchas de las propiedades de las proteínas (solubilidad, capacidad emulsificante, punto isoeléctrico, entre otras) se deben a esta relación, así como a su conformación. Por otra parte, en la Tabla 4 se puede observar que los hidrolizados de *P. lunatus* y *V. unguiculata* tienen su mayor diferencia en el porcentaje del ácido glutámico, por lo cual se puede esperar un comportamiento diferente entre ellas.

Tabla 4. Perfil de aminoácidos en hidrolizados de *P. lunatus* y *V. unguiculata*

| Aminoácidos<br>Esenciales | FAO<br>(1991)<br>(g/Kg) | Hidrolizado<br><i>P. lunatus</i><br>(g/Kg) | Hidrolizado<br><i>V. unguiculata</i><br>(g/Kg) | Aminoácidos<br>No esenciales | Hidrolizado<br><i>P. lunatus</i><br>(g/Kg) | Hidrolizado<br><i>V. unguiculata</i><br>(g/Kg) |
|---------------------------|-------------------------|--|--|------------------------------|--|--|
| Lis                       | 58                      | 69.8 <sup>a</sup> ± 2.8                    | 67.9 <sup>a</sup> ± 0.1                        | Asp                          | 121.8 <sup>a</sup> ± 0.1                   | 120.5 <sup>b</sup> ± 0.2                       |
| Tri                       | 11                      | 13.0 <sup>a</sup> ± 0.4                    | 13.2 <sup>a</sup> ± 0.5                        | Glu                          | 146.7 <sup>a</sup> ± 0.6                   | 177.7 <sup>b</sup> ± 0.4                       |
| Fen+Tir                   | 63                      | 92.4 <sup>a</sup> ± 2.4                    | 96.1 <sup>a</sup> ± 0.4                        | Ser                          | 61.1 <sup>a</sup> ± 0.3                    | 45.8 <sup>b</sup> ± 1.3                        |
| Met+cis                   | 25                      | 15.7 <sup>a</sup> ± 3.7                    | 14.4 <sup>a</sup> ± 1.4                        | His                          | 26.3 <sup>a</sup> ± 0.4                    | 31.2 <sup>b</sup> ± 0.2                        |
| Tre                       | 34                      | 41.5 <sup>a</sup> ± 0.1                    | 37.0 <sup>b</sup> ± 0.1                        | Gli                          | 51.3 <sup>a</sup> ± 0.7                    | 40.7 <sup>b</sup> ± 0.4                        |
| Leu                       | 66                      | 93.4 <sup>a</sup> ± 2.0                    | 87.9 <sup>a</sup> ± 0.1                        | Arg                          | 96.4 <sup>a</sup> ± 0.1                    | 88.8 <sup>b</sup> ± 0.3                        |
| Ile                       | 28                      | 54.0 <sup>a</sup> ± 1.0                    | 47.5 <sup>b</sup> ± 0.4                        | Ala                          | 29.4 <sup>a</sup> ± 0.9                    | 36.7 <sup>b</sup> ± 0.1                        |
| Val                       | 35                      | 58.9 <sup>a</sup> ± 0.9                    | 57.6 <sup>a</sup> ± 0.5                        | Tri                          | 1.30 <sup>a</sup> ± 0.4                    | 1.32 <sup>a</sup> ± 0.5                        |

<sup>a-b</sup>Letras diferentes en una misma fila representan una diferencia significativa a un nivel de P < 0.05.

Además de la importancia de la funcionalidad de las proteínas y sus hidrolizados, es importante conocer el valor nutritivo de estos. Los hidrolizados de *P. lunatus* y *V. unguiculata* satisfacen la ingesta diaria recomendada por la FAO (Organización para la Alimentación y la Agricultura) de los aminoácidos esenciales (Tabla 4), excepto en los azufrados Metionina y Cisteína, ya que se tienen valores menores a 25 g/kg en conjunto. La deficiencia de estos aminoácidos se presenta desde la proteína del *P. lunatus* y *V. unguiculata* (Betancur et al., 2004; Chel et al., 2011), por lo cual no se puede atribuir su deficiencia al proceso de hidrólisis al que fueron sometidas. Para compensar esta deficiencia, normalmente se mezclan con alguna otra fuente de proteínas, por ejemplo cereales como el maíz, ya que aunque es deficiente en lisina (33.25 g/kg) y triptófano (4.3 g/kg) es alto en metionina (20.6 g/kg) y cisteína (68.8 g/kg) (Bressani & Mertz, 1958; Ping, Yu, Xiao, Zheng, & Yi, 2011).

### **3.4. Comportamiento al Flujo**

Los valores de viscosidad obtenidos en ambos SHM de las leguminosas oscilaron en el rango de 0.045 a 1.76 Pa\*s, los cuales estuvieron en el intervalo de las gomas comerciales empleadas en la industria alimenticia; por ejemplo, una dispersión de goma guar al 1% presentó una viscosidad aproximada de 0.5 Pa\*s a una velocidad de deformación de 55 s<sup>-1</sup> y una temperatura de 20°C (Torres, Gadala & Wilson, 2013); esto pudo deberse a la similitud estructural entre la goma guar y la de flamboyán, ya que ambas son galactomananos, por lo cual los SHM podrían ser empleados como agentes espesantes.

Con los datos de viscosidad obtenidos a 55 s<sup>-1</sup> (Tabla 5), se realizó el análisis de regresión y del ANOVA a los SHM del *P. lunatus* y *V. unguiculata* que muestran que las variables que tienen un efecto significativo (P < 0.05) son el porcentaje de goma de flamboyán, la temperatura y la interacción entre estos dos, siendo los modelos ajustados:

Para el *P. lunatus*

$$V = 0.614368 + 0.600827 \times G - 0.181166 \times T - 0.156492 \times G \times T$$

Para la *V. unguiculata*

$$V = 0.636529 + 0.618287 \times G - 0.114506 \times T - 0.097577 \times G \times T$$

Donde  $V$  es viscosidad (Pa\*s),  $G$  concentración de goma (%p/v) y  $T$  temperatura (°C).

Haciendo un análisis de estas ecuaciones, se concluyó que para aumentar la viscosidad del sistema, se requiere una alta concentración de la goma de Flamboyán y una temperatura baja, por otra parte se observó que el pH no tiene influencia significativa. Por lo cual para las pruebas bioactivas se usaron

los SHM a 1.5% de goma de flamboyán, temperatura de 30°C y pH 7, este pH debido a que el pH natural de los SHM es de aproximadamente 6.8. Debido a que el pH no es un factor significativo en la viscosidad, se agruparon los resultados de los sistemas sin incluir al pH, de estos se calculó la viscosidad promedio obteniendo la Tabla 6.

Tabla 5. Valores de viscosidad determinados a una velocidad de deformación de  $55s^{-1}$  en las curva de flujo de los SHM de *P. lunatus* y *V. unguiculata*

| <b>% Goma</b> | <b>pH</b> | <b>T(°C)</b> | <b>Viscosidad<br/><i>P. lunatus</i> (Pa*s)</b> | <b>Viscosidad<br/><i>V. unguiculata</i> (Pa*s)</b> |
|---------------|-----------|--------------|--|--|
| <b>0.5</b>    | 3         | 30           | 0.090  | 0.082  |
| <b>0.5</b>    | 7         | 30           | 0.112  | 0.083  |
| <b>0.5</b>    | 3         | 60           | 0.050  | 0.045  |
| <b>0.5</b>    | 7         | 60           | 0.053  | 0.051  |
| <b>1.5</b>    | 3         | 30           | 1.446  | 1.436  |
| <b>1.5</b>    | 7         | 30           | 1.769  | 1.566  |
| <b>1.5</b>    | 3         | 60           | 0.878  | 0.886  |
| <b>1.5</b>    | 7         | 60           | 0.951  | 1.053  |
| <b>1</b>      | 5         | 45           | 0.456  | 0.430  |
| <b>1</b>      | 5         | 45           | 0.426  | 0.482  |
| <b>1</b>      | 5         | 45           | 0.443  | 0.473  |
| <b>1</b>      | 5         | 45           | 0.426  | 0.470  |

*Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocoloides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (*Delonix regia*) y Proteínas de Leguminosas (*Phaseolus Lunatus* y *Vigna Unguiculata*), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional*

Tabla 6. Valores de viscosidad medida en curvas de flujo a una velocidad de deformación de  $55 \text{ s}^{-1}$  para los sistemas hidrocoloides mixtos excluyendo el factor pH

| <b>% Goma<br/>(p/v)</b> | <b>Temp (°C)</b> | <b>Viscosidad<br/><i>V. unguiculata</i> (Pa*s)</b> | <b>Viscosidad<br/><i>P. lunatus</i> (Pa*s)</b> |
|-------------------------|------------------|--|--|
| 1.5                     | 30               | 1.439  | 1.608  |
| 0.5                     | 30               | 0.085  | 0.101  |
| 1                       | 45               | 0.447  | 0.438  |
| 1.5                     | 60               | 0.985  | 0.915  |
| 0.5                     | 60               | 0.049  | 0.052  |

Se observó que los sistemas hidrocoloides mixtos no fueron diferentes en sus valores de viscosidad ( $P > 0.05$ ), por lo cual se puede decir que el hidrolizado empleado en la preparación de estos dos sistemas no afecta la capacidad espesante de ellos. Se realizaron las curvas de flujo a la dispersión de goma de flamboyán al 1.5%, a los hidrolizados de *P. lunatus* y *V. unguiculata* a un 2.5%, todos a 30°C de temperatura y pH de 7, para comparar con los SHM. Los valores obtenidos anteriormente y los del tratamiento 6 se presentan en la Tabla 7, se observó que las dispersiones de *P. lunatus* y *V. unguiculata* se ajustaron a un modelo de la ley de la potencia, con índices de flujo cercanos a la unidad, por lo que se acercaron al modelo Newtoniano.

Estas mismas dispersiones presentaron viscosidades bajas comparadas con las de la goma de flamboyán y los SHM de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, estos tres últimos sistemas se ajustaron a un modelo de Cross teniendo valores de viscosidad en el rango de 1.6 Pa\*s, por lo que los valores de las dispersiones de hidrolizados fueron despreciables en comparación los de la goma. Los SHM así como la dispersión de goma de flamboyán tuvieron un comportamiento reológico y valores de viscosidad similar, por lo que la viscosidad está

determinada por la incorporación de la goma (Figura 7) y puede decirse que no se encontró sinergia entre ellos. Webb, Naeem y Schmidt (2002) determinaron la viscosidad aparente a  $44\text{s}^{-1}$  en dispersiones de caseinato de sodio y concentrado proteico de soya obteniendo valores de 0.00212 y 0.00211 Pa\*s, estos valores tan bajos de viscosidad son debidos a que las proteínas no aumentan la viscosidad del medio, ya que su estructura tiene grupos hidrofóbicos e hidrofílicos (ver Tabla 4), esta composición provoca que los aminoácidos hidrófobos se acomoden en el centro de la estructura y los grupos hidrofílicos en la parte externa (disminuyendo su radio posible de hidratación); aunado a esto, los péptidos generados por la hidrólisis tienen un tamaño menor que la proteína nativa, lo cual reduce la fricción entre moléculas disminuyendo así la viscosidad.

Tabla 7. Valores de viscosidad, modelo reológico y parámetros de los modelos para los SHM e individuales a 1.5% de goma, 2.5% de Hidrolizado y pH 7

|                               | Hidrolizado de <i>P. lunatus</i> | Hidrolizado de <i>V. unguiculata</i> | Goma de Flamboyán  | SHM <i>P. lunatus</i> | SHM <i>V. unguiculata</i> |
|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------|
| Modelo reológico              | Ley de la potencia               |                                      | Cross              |                       |                           |
| $\eta$ ( $55\text{ s}^{-1}$ ) | 0.009                            | 0.006                                | 1.615              | 1.439                 | 1.608                     |
| <b>n</b>                      | 0.984                            | 0.970                                | 0.646              | 0.668                 | 0.691                     |
| <b>K</b>                      | 0.013                            | 0.014                                | 0.392              | 0.487                 | 0.256                     |
| $\eta_0$                      | –                                | –                                    | 12.206             | 14.154                | 11.169                    |
| $\eta_\infty$                 | –                                | –                                    | $1 \times 10^{-7}$ | $4 \times 10^{-7}$    | $8 \times 10^{-8}$        |

De estos resultados, se puede explicar por qué los componentes peptídicos del SHM no afectaron significativamente el comportamiento reológico (Tabla 7), dado que en los dos sistemas evaluados se usó la misma cantidad de goma de flamboyán; ésta, a diferencia de los péptidos, posee una estructura



hidrofílica; por lo cual, puede formar puentes de hidrógeno con el agua del medio. Como se observa en la Figura 7 la viscosidad aumenta, debido a que la estructura del galactomanano es una cadena prolongada, que al hidratarse se extiende permitiendo rozamientos entre diversas cadenas. El comportamiento de los SHM y de la dispersión de goma de flamboyán se asemejó al comportamiento de la goma guar, el cual se ajustó a un modelo de Cross como en trabajos realizados por otros investigadores (Koliandris, Morris, Hewson, Hort, Taylor & Wolf, 2010; Mannarswamy, Munson & Andersen, 2010), similitud que puede explicarse porque ambas gomas son galactomananas, y sus estructuras al ser sometida a velocidades de deformación altas, tienden a ordenarse disminuyendo los choques entre cadenas, esto se ve reflejado en una disminución de la viscosidad (Figura 7) para los SHM, igualmente se observa que al inicio (cuando la velocidades de deformación es baja) la viscosidad es mayor, esto debido a que existen colisiones y fricciones entre las moléculas.

Con estos resultados, queda claro que la goma de flamboyán fue el componente que aumentó la viscosidad del sistema, debido a que no hay interacción química entre esta y los péptidos, ya que se esperaría que su interacción aumente la viscosidad. Esto pudo deberse a que se presentó una cosolubilidad entre los compuestos del sistema (Figura 4).

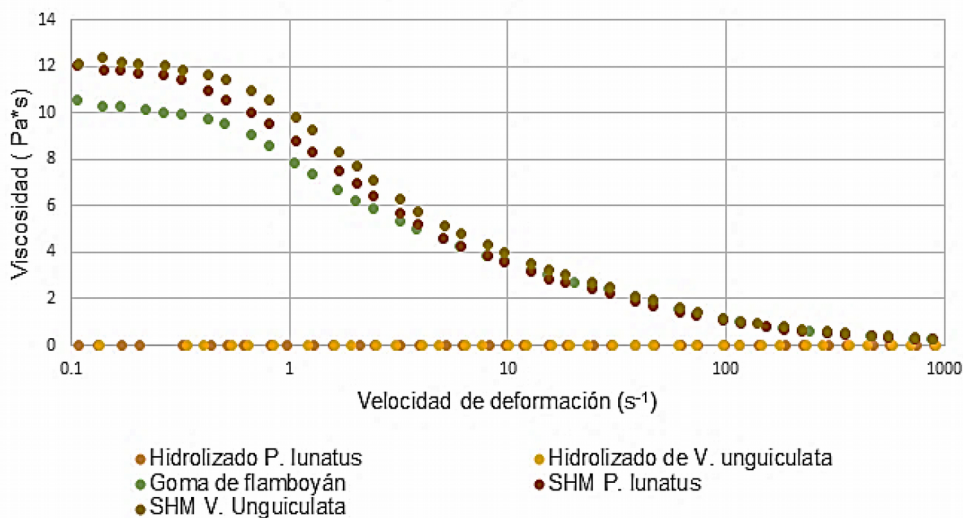


Figura 7. Reogramas de los SHM con 1.5% de goma y 2.5% de hidrolizado, hidrolizado de *P. lunatus* al 2.5% p/v, hidrolizado de *V. unguiculata* al 2.5% p/v y goma de flamboyán al 1.5% p/v; todos a 30°C y pH de 7

### 3.5. Estabilidad de la Emulsión

Los resultados de la estabilidad de la emulsión para los SHM se muestran en la Tabla 8, donde se observa que la estabilidad de la emulsión en ambos SHM de *P. lunatus* y *V. unguiculata* tuvieron un valor de 100% en el tratamiento 6 (goma de flamboyán 1.5% p/v, 30°C y pH 7) sin que el valor del pH influya, mientras que a estas mismas condiciones pero a una temperatura de 60°C el SHM de *V. unguiculata* presentó una diferencia en la estabilidad con respecto al pH.

El análisis estadístico para identificar los factores que tienen efectos significativos, dio como resultado que para el SHM de *P. lunatus*, el porcentaje de goma, la temperatura y la interacción entre la goma y temperatura fueron significativos, no siendo significativo el pH; por lo cual, se ajustó una ecuación de regresión con estos factores, la cual es:

*Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocoloides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (*Delonix regia*) y Proteínas de Leguminosas (*Phaseolus Lunatus* y *Vigna Unguiculata*), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional*

$$\%EE = 92.41 + 8.49 \times G - 7.62 \times T + 7.65 \times G \times T$$

De la misma forma, se determinaron los factores significativos para el SHM de *V. unguiculata*, los cuales fueron la temperatura, concentración de goma y pH, de tal forma que la ecuación de regresión para este sistema fue:

$$\%EE = 85.71 + 10.74 \times G + 4.7 \times \text{pH} - 6.68 \times T$$

Donde  $\%EE$  es el porcentaje de la estabilidad de la emulsión,  $G$  concentración de goma (%p/v) y  $T$  temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

El análisis de los factores demuestra que el pH en el SHM de *V. unguiculata* es significativo y que a pH bajos la estabilidad disminuye. Este comportamiento fue observado por Chel et al. (2011) en estudios de estabilidad de emulsiones y espumas formadas con concentrado proteico de *V. unguiculata*, obteniendo los valores más altos de estabilidad en un intervalo de pH entre 7 y 9, mientras que la más baja fue a un pH de 3 y 4. Este comportamiento pudo deberse al balance de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos ya que la composición aminoacídica del hidrolizado de *V. unguiculata* presentó una mayor cantidad de ácido glutámico comparado con el valor que presentó el hidrolizado de *P. lunatus*, esto se puede observar en la Tabla 8. Esta diferencia pudo influir, ya que este aminoácido presenta carga, la cual modifica el valor del pH para el punto isoeléctrico de los péptidos. El menor  $\%EE$  se tuvo a la menor concentración y mayor temperatura como se observa en la Tabla 8.

El efecto de la concentración de goma es debida a la viscosidad que esta genera en el medio; como se observa, a mayor concentración mayor estabilidad (100%) y viceversa (58.45%), esto debido a que la viscosidad es una barrera física para el movimiento de las gotículas de aceite en el medio, retrasando la separación de fases; la temperatura tiene dos efectos desestabilizantes, el primero es el aumento de la energía cinética de las partículas; lo cual, genera

un mayor movimiento y colisiones entre ellas, otro efecto es la disminución de la viscosidad del medio por efecto de la temperatura. Por otra parte, en los estudios realizados por Chel et al. (2002) observaron que la estabilidad de las emulsiones formadas con concentrado proteico de *P. lunatus* tuvieron un mismo valor de estabilidad a valores de pH en 3 y 7; sin embargo, entre estos dos valores existió una desestabilización hasta valores de 20% de EE, al pasar por el punto isoelectrico del concentrado proteico.

Tabla 8. Valores de % estabilidad de la emulsión (%EE) calculada para los SHM de *P. lunatus* y *V. unguiculata* a las condiciones del diseño experimental

| % Goma | pH | T  | % EE                     |                              |
|--------|----|----|--------------------------|------------------------------|
|        |    |    | SHM<br><i>P. lunatus</i> | SHM<br><i>V. unguiculata</i> |
| 1.5    | 3  | 30 | 100.00%                  | 100.00%                      |
| 1.5    | 7  | 30 | 100.00%                  | 100.00%                      |
| 0.5    | 3  | 30 | 97.79%                   | 78.44%                       |
| 0.5    | 7  | 30 | 98.91%                   | 84.59%                       |
| 1      | 5  | 45 | 98.89%                   | 100.00%                      |
| 1      | 5  | 45 | 98.89%                   | 100.00%                      |
| 1      | 5  | 45 | 98.89%                   | 100.00%                      |
| 1      | 5  | 45 | 99.44%                   | 100.00%                      |
| 1.5    | 3  | 60 | 100.00%                  | 82.32%                       |
| 1.5    | 7  | 60 | 100.00%                  | 100.00%                      |
| 0.5    | 3  | 60 | 65.56%                   | 58.45%                       |
| 0.5    | 7  | 60 | 70.04%                   | 71.85%                       |

Analizando las ecuaciones de ajuste al modelo, se pudo concluir que para maximizar el %EE del SHM de *P. lunatus*, se requiere una baja temperatura y una mayor concentración de goma e independiente del pH, mientras que para el SHM del *V. unguiculata* una baja temperatura, mayor concentración de goma y pH cercano a 7; por lo cual, para la prueba biológica se seleccionó el tratamiento 6 para ambos sistemas (1.5% p/v de goma, 30°C y pH 7). Con respecto al SHM de *P. lunatus* se decidió trabajar a pH 7, ya que el pH original del sistema fue muy cercano a 7.

Por otra parte, se midió el %EE a los componentes individuales de los SHM a estas mismas condiciones, los comportamientos se observan en la Figura 8. En esta se puede ver como la combinación de un agente emulsificante (hidrolizado proteico) y un agente espesante (goma de flamboyán) lograron formar una emulsión estable (sin formación de fases diferentes), mientras que individualmente cada uno de los componentes de los SHM no formó una emulsión estable.

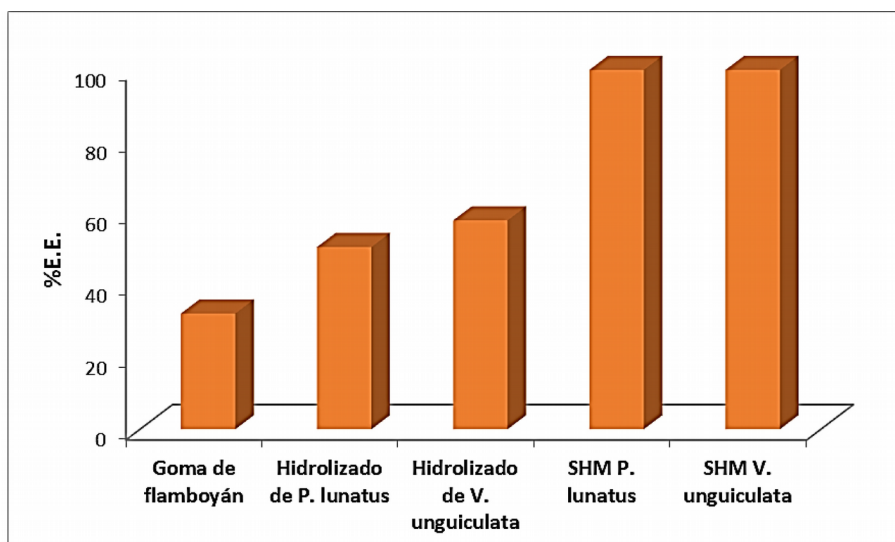


Figura 8. Estabilidad de la emulsión medida a 30°C, pH7, 2.5 % de hidrolizado y 1.5% de goma de Flamboyán

La desestabilización observada en emulsiones preparadas con goma de flamboyán al 1.5 % p/v se presentó como coalescencia, ya que se formaron dos fases, una superior de aceite y otra inferior con la dispersión de goma de flamboyán. Este resultado se debió a que esta goma presenta una estructura sin grupos con carga (Tamaki et al., 2010) además de que el análisis proximal realizado a esta goma presentó un 1.25% de proteína; por lo tanto, no tiene los suficientes grupos hidrofóbicos, los cuales interaccionen con el aceite y permitan la formación de una emulsión. Los sistemas con hidrolizados al 2.5 % p/v, presentaron una desestabilización por cremado. Se formaron dos fases, la superior donde se encuentra una alta concentración de gotículas emulsificadas por los hidrolizados y en la parte inferior una fase acuosa.

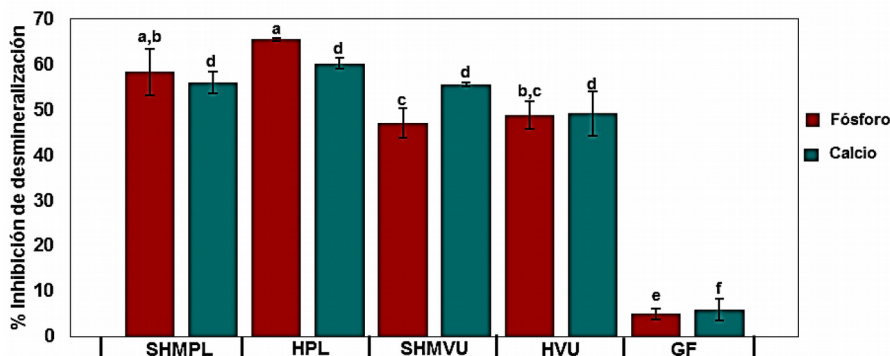
Esta desestabilización fue la que se presentó en los tratamientos de la Tabla 8, y probablemente se debe a que las gotículas de aceite rodeadas por los péptidos del hidrolizado son menos densas que el medio en el que están dispersos, por lo cual tendieron a ascender. Por otra parte, en los SHM con 1.5% de goma de flamboyán y 2.5% de hidrolizados, opusieron una mayor resistencia al movimiento de las gotículas, por lo cual disminuyó el cremado; de tal manera que se mantuvieron dispersas en todo el medio debido a la mayor concentración de goma, la cual aumentó la viscosidad del medio. Desplanques, Renou, Grisel y Malhiac (2012) propusieron que esto podría deberse a la formación de una red en la cual las gotículas quedan atrapadas impidiendo que se formen dos fases.

Los resultados obtenidos con respecto al %EE están de acuerdo a los reportados en un estudio similar, el cual se realizó formando emulsiones usando un 4.4 % p/p de aceite de canola, concentrado proteico de suero de leche (0.22 % p/p) y diferentes tipos de goma tragacanto (0.5 % p/v), el control (aceite y concentrado proteico) dio un 40% EE, mientras que con las gommas se obtuvo desde un 67% hasta un 100%. La desestabilización que obtuvieron fue debido al cremado, la cual disminuyó debido al aumento de la viscosidad del medio (Gavlighi, Meyer, Zaidel, Mohammadifar & Mikkelsen, 2013).

Con base en los valores obtenidos de las propiedades funcionales de estabilidad de emulsión y capacidad espesante, se seleccionó el tratamiento 6 para realizarle la prueba bioactiva, ya que se obtuvieron los mayores valores en ambos SHM a estas condiciones, lo cual es deseable para poder ser usada en la industria alimentaria.

### 3.6. Actividad Anticariogénica

Los resultados de la actividad anticariogénica presentados en la Figura 9 muestran que la reducción de desmineralización usando el SHM de *P. lunatus* y el hidrolizado de *P. lunatus* son iguales, también el SHM de *V. unguiculata* y el hidrolizado de ésta resultaron iguales ( $P > 0.05$ ).



<sup>a-f</sup> Letras diferentes entre las columnas del mismo elemento químico presentan diferencia significativa con  $P < 0.05$ .

Figura 9. Inhibición de la desmineralización presentada por calcio y fósforo de los sistemas hidrocoloides mixtos de *P. lunatus* (SHMPL) y *V. unguiculata* (SHMVU), hidrolizado de *P. lunatus* (HPL), hidrolizado de *V. unguiculata* (HVU) y goma de flamboyán (GF)

Por otra parte, se observó que no hubo diferencia entre la reducción de la desmineralización del fósforo y el calcio para cada sistema ( $P > 0.05$ ). El porcentaje de reducción de la desmineralización en promedio en los sistemas con *P. lunatus* (SHMPL y HPL) fue de 59.75%, mientras que para los

sistemas con *V. unguiculata* (SHMVU y HVU) se obtuvo un 50.21%; estos valores son similares a los obtenidos por Córdova et al. (2012) el cual fue de 52.9%, para hidrolizados de *P. lunatus* con pepsina, pero menores que los que obtuvo con la fosforilación de este hidrolizado, ya que obtuvo un 77.1% de reducción. Igualmente Warner et al. (2001) obtuvieron un 80 % de reducción de la desmineralización con caseino fosfopéptidos obtenidos a partir de hidrolizados de leche.

En el estudio realizado por Córdova et al. (2012), se pudo observar cómo el aumento de los grupos fosfatos debido a la fosforilación del hidrolizado aumentó la actividad anticariogénica. Este mismo comportamiento se vio en el estudio de Warner et al. (2001), ya que además de los caseino fosfopéptidos, usó también suero de queso cottage, obteniendo una protección cercana al 30%, que es menor a la obtenida con los sistemas de este trabajo. La goma de flamboyán presentó una bioactividad prácticamente de cero. Esta diferencia entre el efecto de la reducción de desmineralización se puede deber a la diferencia de cargas de los péptidos en diferentes hidrolizados (Ruiz, Segura, Betancur & Chel, 2013), ya que los caseino fosfopéptidos tienen una mayor carga negativa debido a los grupos fosfato que presentan, pudiendo quelatar minerales y estabilizar la desmineralización, Adamson y Reynolds (1995) hablan de que los caseino fosfopéptidos tienen un cluster con una secuencia de tres serinas fosfatadas y dos ácidos glutámicos; este complejo estabiliza el fosfato de calcio amorfo y actúa como un buffer en la zona liberando iones fósforo y calcio.

Dada la composición aminoacídica de los hidrolizados de *P. lunatus* y *V. unguiculata*, se observó un alto contenido de ácido glutámico, por lo que probablemente el mecanismo de estos hidrolizados sea parecido al de los caseino fosfopéptidos. En contraste, la prueba con solo goma de flamboyán no presentó esta actividad, pudiendo ser que al tener una estructura neutra, ésta no interacciona con los iones liberados, permitiendo así la desmineralización.



#### **4. Conclusiones**

- La viscosidad de los SHM de *P. lunatus* y *V. unquiculata* dependen de la concentración de la goma y temperatura, no del pH del medio, aumentando la concentración y reduciendo la temperatura se alcanzan viscosidades de hasta 1.769 Pa\*s para el SHMPL y 1.566 Pa\*s para el SHMVU, además se observó que no hay sinergia entre los componentes de los sistemas hidrocoloides. Los sistemas se ajustaron un modelo reológico de la ley de la potencia, con excepción de los tratamientos con 1.5% de goma y temperatura de 30°C que se modelaron con la ecuación de Cross.
- La estabilización de emulsiones alcanzó valores hasta de 100% en ambos sistemas hidrocoloides mixtos con 1.5% de goma de flamboyán y temperatura de 30°C, la desestabilización observada fue debida principalmente al cremado en el sistema. Los factores que influyen en la estabilización del sistema con *P. lunatus* fueron la concentración de la goma, la temperatura y la interacción entre estos factores; por otra parte, para los sistemas de *V. unquiculata* fueron la concentración de goma, la temperatura y el pH.
- Para la prueba biológica se seleccionaron los tratamientos a 1.5% de goma de flamboyán, pH 7 y 30°C por presentar las más altas funcionalidades. La capacidad anticariogénica presentada por los sistemas seleccionados fue de 59.75% y 50.21% para los sistemas con *P. lunatus* y *V. unquiculata* respectivamente, no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los sistemas hidrocoloides mixtos y las dispersiones de sus hidrolizados correspondientes.
- Los sistemas hidrocoloides mixtos podrían ser usados como agentes que aumenten la viscosidad de bebidas como néctares, cubiertas de productos de repostería, cremas y emulsiones, así como una gran variedad de aplicaciones donde se requieran las características funcionales encontradas y con la ventaja de una baja carga calórica. Por

otro lado reduciendo la formación de caries dental, por lo que se tendría la posibilidad de formular alimentos funcionales anticariogénicos como por ejemplo mermeladas con una baja cantidad de azúcar.

## Agradecimientos

Se agradece al CONACYT por las becas de estancia posdoctoral (Ramírez Ortiz, M.E.) y maestría (Rodríguez Canto, W.) así como el financiamiento parcial a través del proyecto con N<sup>o</sup>. de convenio 106605 y a la FIQ-UADY por el apoyo interno recibido de la convocatoria 2015. También se agradece el apoyo del Programa UNAM-DGAPA-PAPIME PE04614.

## Referencias

- Adamson, N.J., & Reynolds, E.C. (1995). Characterization of multiply phosphorylated peptides selectively precipitated from a pancreatic casein digest. *Journal of Dairy Science*, 78(12), 2653-2659.  
[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76895-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76895-3)
- Aehle, W. (Ed.) (2007). *Enzymes in industry: production and applications*. Weinheim: Wiley-VCH.  
<http://dx.doi.org/10.1002/9783527617098>
- Aimutis, W.R. (2004). Bioactive Properties of Milk Proteins with Particular Focus on Anticariogenesis. *The Journal of Nutrition*, 14, 989-995.
- Alaiz, M., Navarro, J.L., Girón, J., & Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, 591(1-2), 181-186.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)80236-N](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(92)80236-N)
- AOAC (1997). *Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 16<sup>th</sup> Ed. Washington D.C. Association of Official Analytical Chemists.
- Azero, E.G., & Andrade, C.T. (2006). Characterisation of Prosopis juliflora seed gum and the effect of its addition to kappa-carrageenan systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(5), 844-850.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532006000500005>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica*, 42(2), 227-237.

*Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocoloides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (Delonix regia) y Proteínas de Leguminosas (Phaseolus Lunatus y Vigna Unguiculata), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional*

- Betancur, D., Martínez, R., Corona, A., Castellanos, A., Jaramillo, M.E., & Chel, L. (2009). Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *International Journal of Food Science y Technology*, 44(1), 128-137.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01690.x>
- Betancur, D., Gallegos, S., & Chel, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1193-1201.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1804>
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Le Potier, I., de Kerdaniel, T.D.F., Grossiord, J.L., Rosilio, V. et al. (2011). Stabilization mechanism of oil-in-water emulsions by  $\beta$ -lactoglobulin and gum arabic. *Journal of Colloid and Interface Science*, 354(2), 467-477.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.11.019>
- Bressani, R., & Mertz, E.T. (1958). Studies on corn protein. IV. Protein and amino acid content of different corn varieties. *Cereal Chemistry*, 35, 227-235.
- Canseco, J. (2001). Caries dental. La enfermedad oculta. *Boletín Médico Del Hospital Infantil Mexicano*, 58, 673-676.
- Chel, L., Domínguez, M., Martínez, A., Dávila, G., & Betancur, D. (2012). Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) Protein Hydrolysates with ACE-I Inhibitory Activity. *Food and Nutrition Sciences*, 03(04), 511-521.  
<http://dx.doi.org/10.4236/fns.2012.34072>
- Chel, L., Maldonado, M., Burgos, A., Betancur, D., & Castellanos, A. (2011). Functional and some nutritional properties of an isoelectric protein isolate from Mexican cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Journal of Food and Nutrition Research*, 50(4), 210-220.
- Chel, L., Pérez, V., Betancur, D., & Dávila, G. (2002). Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 584-91.  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf010778j>
- Córdova, A. (2011). *Evaluación de la capacidad de concentrado e hidrolizados proteínicos de frijol lima (Phaseolus lunatus)*. Estancia corta de investigación. Mérida, Yucatán, México.  
<https://drive.google.com/file/d/0Bw1c1Uffvmvva3J5RmNrSnZUOWM/view?usp=sharing>  
(Fecha último acceso: Noviembre 2014)
- Córdova, A., Ruiz, J., Segura, M., Betancur, D., & Chel, L. (2012). Actividad antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados proteínicos de frijol lima. *Revista de la facultad de ingeniería química, U.A.D.Y.*, 52, 25-31.

- Corzo, L. J., Betancur, D., & Chel, L. (2012). In rheological and textural properties of native and carboxymethylated flamboyant (*Delonix regia*) seed gums. *5th International Congress Food Science & Food Biotechnology in Developing Countries*. Nuevo Vallarta, Nayarit, México. 101-105.
- Desplanques, S., Renou, F., Grisel, M., & Malhiac, C. (2012). Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 401-410.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.015>
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473-1482.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
- Dickinson, E., & Vílchez, M.C. (2011). Food colloids, Granada, March 2010. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 557-557.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.008>
- Filipiak-Florkiewicz, A., Florkiewicz, A., Cieilik, E., Walkowska, I., Walczycka, M., Leszczyńska, T. et al. (2011). Effects of Various Hydrothermal Treatments on Selected Nutrients in Legume Seeds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), 181-186.
- Gan, C.Y., Cheng, L.H., Azahari, B., & Easa, A.M. (2009). *In vitro* digestibility and amino acid composition of soy protein isolate cross-linked with microbial transglutaminase followed by heating with ribose. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(7), 99-108.  
<http://dx.doi.org/10.1080/09637480802635090>
- Gavlighi, H.A., Meyer, A.S., Zaidel, D.N., Mohammadifar, M.A., Mikkelsen, J.D. (2013). Stabilization of emulsions by gum tragacanth (*Astragalus spp.*) correlates to the galacturonic acid content and methoxylation degree of the gum. *Food Hydrocolloids*, 31(1), 5-14.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.09.004>
- Gavlighi, Girard, M., Turgeon, S.L., & Gauthier, S.F. (2002). Interbiopolymer complexing between  $\beta$ -lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. *Food Hydrocolloids*, 16(6), 585-591.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(02\)00020-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(02)00020-6)
- Itoh, A., & Ueno, K. (1970). Evaluation of 2-hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulpho-1-naphthylazo)-3-naphthoic acid and hydroxynaphthol blue as metallochromic indicators in the EDTA titration of calcium. *The Analyst*, 95(1131), 583-589.  
<http://dx.doi.org/10.1039/an9709500583>

*Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocoloides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (Delonix regia) y Proteínas de Leguminosas (Phaseolus Lunatus y Vigna Unguiculata), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional*

- Kitts, D.D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1309-1323.  
<http://dx.doi.org/10.2174/1381612033454883>
- Klein, M., Aserin, A., Svitov, I., & Garti, N. (2010). Enhanced stabilization of cloudy emulsions with gum Arabic and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(1), 75-81.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.01.008>
- Koliandris, A.L., Morris, C., Hewson, L., Hort, J., Taylor, A.J., & Wolf, B. (2010). Correlation between saltiness perception and shear flow behaviour for viscous solutions. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 792-799.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.006>
- Korhonen, H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 79-88.  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00050.x>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945-960.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
- Krishnaraj, K., Joghi, M., Chandrasekar, N., Muralidharan, S., & Manikandan, D. (2012). Development of sustained release antipsychotic tablets using novel polysaccharide isolated from *Delonix regia* seeds and its pharmacokinetic studies. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 20(3), 239-248.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.12.003>
- Liu, S., Elmer, C., Low, N.H., & Nickerson, M.T. (2010). Effect of pH on the functional behaviour of pea protein isolate–gum Arabic complexes. *Food Research International*, 43(2), 489-495.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.022>
- Mannarswamy, A., Munson, S.H., & Andersen, P.K. (2010). D-optimal designs for the Cross viscosity model applied to guar gum mixtures. *Journal of Food Engineering*, 97(3), 403-409.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.10.035>
- Medina, D.K. (2012) *Funcionalidad tecnológica de sistemas hidrocoloides mixtos de hidrolizados de frijol lima (Phaseolus lunatus) con goma modificada de flamboyán (Delonix regia)*. Tesis. Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Mejía, A., González, M., & Lomelí, G. (2010). *Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB)*. Mexico. 47.
- MG Ingredient (2011). *Guar Gum Powder MG235F Specification Sheet*. Brandon: MG Ingredients. 1.

- Montgomery, D. (Ed.). (2009). *Design and Analysis of Experiments*. Canadá: John Wiley & Sons.
- Nielsen, P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- NMX-AA-029-SCFI-2001, Análisis de aguas - Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba (cancela a la nmx-aa-029-1981).
- NMX-Y-100-SCFI-2004, Alimentos para animales - Determinacion de fosforo en alimentos terminados e ingredientes para animales - metodo de prueba (cancela a la nmx-y-100-1976).
- Odedeji, J.O., & Oyeleke, W.A. (2011). Proximate, Physicochemical and Organoleptic Properties of Whole and Dehulled Cowpea Seed Flour (*Vigna unguiculata*). *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(12), 1175-1178.  
<http://dx.doi.org/10.3923/pjn.2011.1175.1178>
- Pacheco, J., Rosado, G., Betancur, D., & Chel, L. (2010). Propiedades fisicoquímicas de la goma carboximetilada de flamboyán (*Delonix regia*). *CyTA-Journal of Food*, 8(3), 169-176.  
<http://dx.doi.org/10.1080/19476330903322960>
- Pacheco, J., Rosado, J., Chel, L., & Betancur, D. (2008). Caracterización fisicoquímica y funcional de la goma de Flamboyán (*Delonix regia*). *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 18(Especial), 16-21.
- Ping, Y., Yu, R., Xiao, Y., Zheng, C., Qing, W., & Yi, S. (2011). Comparison of nutrition composition of transgenic maize (*Chitinase gene*) with its non-transgenic counterpart. *Ciencia E Investigación Agraria*, 38(1), 149-153.
- Rao, M. (2007). Rheology of fluid and semisolid foods. En Barbosa, G. (Ed.). New York: Springer. 471.  
<http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-70930-7>
- Rocha, C., Teixeira, J.A., Hilliou, L., Sampaio, P., & Gonçalves, M.P. (2009). Rheological and structural characterization of gels from whey protein hydrolysates/locust bean gum mixed systems. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1734-1745.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.005>
- Rodríguez, J.M., & Pilosof, A.M.R. (2011). Protein-polysaccharide interactions at fluid interfaces. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1925-1937.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.023>
- Ruiz, J. (2011). *Actividad biológica de péptidos obtenidos de frijol (Phaseolus vulgaris L.) endurecido*. Tesis. Instituto Politécnico Nacional, México.

*Evaluación de Algunas Características Reológicas y Bioactivas de Hidrocoloides Mixtos Provenientes de Goma de Flamboyán (Delonix regia) y Proteínas de Leguminosas (Phaseolus Lunatus y Vigna Unguiculata), para Su Potencial Aplicación como Ingrediente Funcional*

- Ruiz, J., Segura, M., Betancur, D., & Chel, L. (2013). Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéutico. En Segura, M., Betancur, D., & Chel, L. (Eds.). *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*. Barcelona: OmniaScience. 11-27.  
<http://dx.doi.org/10.3926/oms.34>
- Sabahelkheir, K. (2012). Quality Assessment of Guar Gum (Endosperm) of Guar (*Cyamopsis tetragonoloba*). *ISCA Journal of Biological Sciences*, 1(1), 67-70.
- Sandoval, V. (2013). *Microencapsulación de hidrolizados de Phaseolus lunatus con gomas de flamboyán (Delonix regia) y Chía (Salvia hispanica)*. Tesis. Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Segura, M.R., Chel, L.A., & Betancur, D.A. (2010). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions extracted by ultrafiltration of cowpea *Vigna unguiculata* hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2512-2518.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4114>
- Srivastava, M., & Kapoor, V.P. (2005). Seed galactomannans: an overview. *Chemistry and Biodiversity*, 2(3), 295-317.  
<http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.200590013>
- Tamaki, Y., Teruya, T., & Tako, M. (2010). The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(5), 1110-1112.  
<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.90935>
- Torres, M., Gadala, F., & Wilson, D. (2013). Comparison of the rheology of bubbly liquids prepared by whisking air into a viscous liquid (honey) and a shear-thinning liquid (guar gum solutions). *Journal of Food Engineering*, 118, 213-228.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.04.002>
- Turgeon, S., Beaulieu, M., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2003). Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8(5), 401-414.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0294\(03\)00093-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-0294(03)00093-1)
- Valim, M.D., Cavallieri, A.L.F., & Cunha, R.L. (2008). Whey Protein/Arabic Gum Gels Formed by Chemical or Physical Gelation Process. *Food Biophysics*, 4(1), 23-31.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11483-008-9098-z>
- Warner, E.A., Kanekanian, A.D., & Andrews, A.T. (2001). Bioactivity of milk proteins: 1. Anticariogenicity of whey proteins. *International Journal of Dairy Technology*, 54(4), 151-153.  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1364-727x.2001.00029.x>

M.E. Ramírez-Ortiz, W. Rodríguez-Canto, L.J. Corzo-Rios, S. Gallegos-Tintoré,  
D. Betancur-Ancona, L. Chel-Guerrero

Webb, M., Naeem, H., & Schmidt, K. (2002). Food protein functionality in a liquid system: A comparison of deamidated wheat protein with dairy and soy proteins. *Journal of Food Science*, 67(8), 2896-2902.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08835.x>

Ye, A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *International Journal of Food Science y Technology*, 43(3), 406-415.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01454.x>

Yust, M.M., Pedroche, J., Girón, J., Vioque, J., Millán, F., & Alaiz, M. (2004). Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*, 85(2), 317-320.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.026>