



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE SUPERFICIE DE COMPUESTOS
PRESENTES EN LA PLANTA DEL GÉNERO *GONOLOBUS*

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. CATALINA FIGUEROA VILLANUEVA

TUTOR

DR. ALBERTO TECANTE CORONEL
FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Manuel Jiménez Estrada	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Jesús Gracia Fadrique	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. José Fausto Rivero Cruz	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Andrea Trejo Márquez	FES-Cuautitlán, UNAM
Secretario	Dra. Anna Kozina	Instituto de Química, UNAM

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, L-313. Facultad de Química, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM.

A la Facultad de Química.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Agradezco al Doctor Alberto Tecante Coronel por su asesoría para la realización de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para desarrollar los estudios de posgrado. Número de becario: 596641; CVU: 738671.

A los miembros del jurado por sus contribuciones para la mejora de este trabajo.

RESUMEN

Un extracto líquido del fruto de una especie vegetal del género *Gonolobus*, conocido localmente como “jicarita”, se examinó mediante varias técnicas de cromatografía con el objetivo de aislar compuestos con actividad superficial. La estrategia inicial para aislarlos tomó en cuenta que las saponinas son los surfactantes de origen vegetal mejor conocidos, por lo que se usaron métodos de extracción y purificación reportados para su extracción. El extracto crudo obtenido del material vegetal deshidratado se fraccionó por cromatografía en columna abierta usando diferentes soportes. Las fracciones recolectadas se sometieron a pruebas de producción de espuma y se midió su tensión superficial. Debido a los bajos rendimientos de extracción, ca. 9.78 % de extracto crudo y entre 0.03 y 5.26 % de fracciones primarias, no fue posible determinar la tensión superficial de las fracciones subsecuentes. Por ello, el seguimiento en la purificación de compuestos se enfocó en la cromatografía en capa fina usando un sistema de elución establecido para revelar saponinas. De esta forma se aisló un compuesto sólido amorfo y de aspecto blanquecino.

Las fracciones primarias del extracto de *Gonolobus* redujeron hasta en 50 % la tensión superficial del agua, mientras que el material vegetal sin extraer mostró un abatimiento de la tensión superficial de 17 %. Pese a esto, la fracción con menor tensión superficial produjo apenas 50 % de espuma con respecto a la fracción que tuvo mejor rendimiento. Se seleccionó la fracción obtenida con una fase de elución de 70:30 metanol-agua, debido a que fue la que produjo mayor cantidad de espuma. Se trazó la curva de tensión superficial en función de la concentración de sólidos solubles. La concentración de 4.0 mg/g mostró la menor tensión superficial; 40.95 ± 0.43 mN/m. Esta concentración es alta si se considera que sería necesario extraer 114 g de *Gonolobus* para preparar 100 g de una disolución con esa tensión superficial. Con base en estos resultados, i.e., bajo rendimiento, altos tiempos de extracción y purificación, se omitió el estudio del resto de las fracciones del material vegetal y se optó por replantear la estrategia de trabajo.

En el nuevo planteamiento se reconsideró la función atribuida a la “jicarita” como agente espumante indispensable, según la costumbre, en la producción de espuma en una bebida a base de cacao, que además incluye haba, maíz, azúcar, canela y anís como ingredientes. Se hizo un diseño de experimentos factorial 2^n en el cual los factores considerados fueron el cacao, el haba, el maíz y la “jicarita”. Con base en los resultados, se concluyó que la presencia de “jicarita” no tiene un efecto significativo sobre la cantidad de espuma generada en la bebida, pues su rendimiento, 4.3 %, fue el más bajo de todas las mezclas que, con excepción del maíz y la combinación de maíz con la “jicarita”, se situó por arriba de 30%. No obstante, se encontró que sí provoca una disminución en el tamaño de burbuja y la tensión superficial de las mezclas preparadas. Sin embargo, el aislamiento de los compuestos responsables de estos efectos se vuelve aún más complejo pues lo observado podría deberse a la presencia de una mezcla de varios surfactantes de estructura diferente, como proteínas, ácidos grasos de cadena corta, y saponinas, entre otros.

1. ANTECEDENTES

1.1 *Surfactantes naturales*

Los agentes con actividad superficial, conocidos como surfactantes, son moléculas de naturaleza anfifílica que contienen una porción no polar hidrofóbica, generalmente una cadena lineal o ramificada hidrocarbonada o fluorocarbonada de entre ocho a dieciocho átomos de carbono unida a una porción polar o iónica, hidrofílica. En ambientes acuosos, las cadenas hidrocarbonadas interactúan pobremente con las moléculas de agua mientras que las moléculas de agua y la parte polar presentan fuertes interacciones de tipo ion-dipolo o dipolo-dipolo. Estas interacciones son las responsables de que los surfactantes sean hidrosolubles (Tadros, 2014). Debido a sus características, estos compuestos son empleados ampliamente en el sector industrial, mantenimiento del hogar y en productos como detergentes, productos de cuidado personal, pinturas, y pesticidas, entre otros. Esta extensa distribución hace inevitable su presencia en diferentes partes del medio ambiente; la literatura científica indica que los surfactantes afectan a los seres vivos en distintos niveles (Olkowska, Polkowska, & Namie 2011). La preocupación por esta contaminación ambiental, además del auge de los productos de etiqueta limpia, es decir, basados en ingredientes naturales, han propiciado un interés en los surfactantes naturales. En sentido estricto, un surfactante natural es aquel tomado directamente de una fuente natural. La fuente puede ser de origen vegetal o animal y el producto debe ser obtenido mediante un proceso de extracción, precipitación o destilación, sin modificación alguna posterior a su aislamiento.

En relación con su aplicación en la Industria Alimentaria, los surfactantes naturales pueden agruparse en proteínas, fosfolípidos, polisacáridos y saponinas. Las proteínas más usadas en alimentos son las derivadas de la leche de bovino; caseínas y proteínas del suero. Un área de investigación emergente es la identificación de proteínas emulsionantes obtenidas de plantas como chícharo, soya, germen de maíz y lupino. Estas resultan de importancia si se busca sustituir proteínas de origen animal en productos para veganos. Los ejemplos más comunes de polisacáridos con actividad superficial son la goma arábiga, la pectina y los galactomananos. La goma arábiga es la más utilizada en la industria de alimentos, principalmente en bebidas (Ozturk & McClements, 2016; Holmberg, 2001).

Las saponinas son moléculas anfifílicas que contienen un núcleo hidrofóbico que puede ser de tipo triterpénico o esteroideal llamado aglicona. Este núcleo está unido a cadenas de azúcares hidrofílicas a través de enlaces covalentes éter o éster. La soyasaponina III es una saponina triterpénica y la dioscina pertenece al grupo esteroideal (Fig. 1). La presencia de la aglicona y las cadenas de azúcares le provee actividad superficial. Estos compuestos son los más conocidos dentro de los surfactantes de origen vegetal. Debido a la variedad de sustituyentes que puede encontrarse en las agliconas así como en el número de cadenas de azúcar unidas a ellas resulta una extensa diversidad de estructuras de saponinas, incluso diferentes partes del material vegetal pueden albergar saponinas con estructuras variadas. Los procesos para la separación de estos compuestos incluyen la combinación de múltiples técnicas como cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, cromatografía flash, cromatografía en Sephadex y HPLC (Pradhan & Bhattacharyya, 2017; Oleszek & Bialy, 2006). Recientemente ha salido al mercado un producto de grado alimenticio, Q-Naturale® (Ingredion, EE.UU) basado en saponinas aisladas de la corteza del árbol de *Quillaja saponaria*. Su uso en alimentos es prometedor gracias a su estabilidad

sobre un amplio intervalo de condiciones (Zhang & Reineccius, 2016; Ozturk & McClements, 2016).

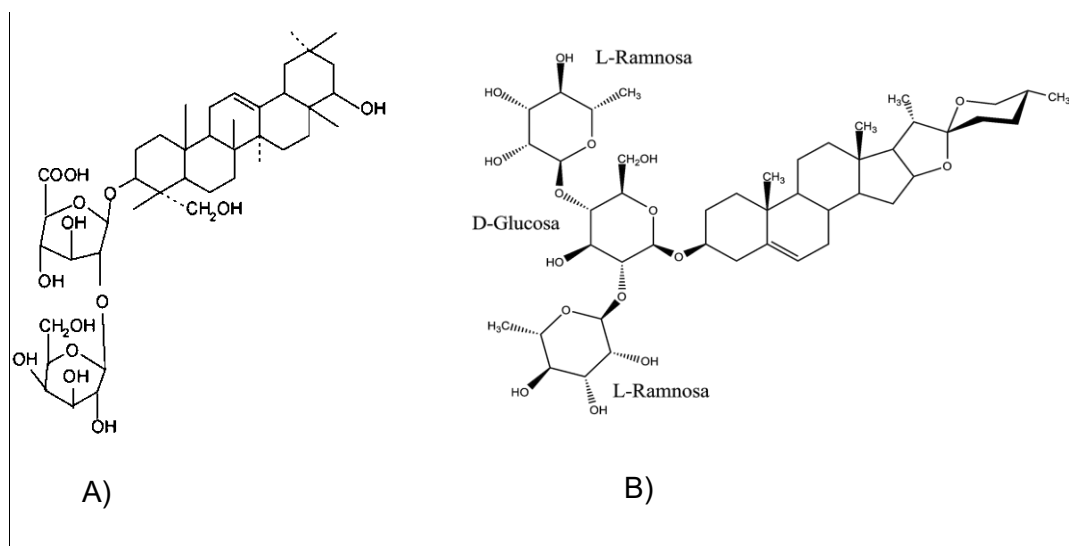


Figura 1. Estructura de saponinas triterpénica: soyasaponina III (A) y esteroidal: dioscina (B) (Makkar *et al.*, 2007).

1.1. *Gonolobus* sp.

El género *Gonolobus* pertenece a la familia Apocynaceae, ubicada entre las quince familias más diversas de México. La familia Apocynaceae incluye plantas anuales o perennes, principalmente hierbas erectas o trepadoras, con menor frecuencia árboles y arbustos (Juárez-Jaimes, Alvarado-Cárdenas & Villaseñor, 2007). A su vez, *Gonolobus* pertenece a la subfamilia Asclepiadoideae y a la subtribu Gonolobinae, un grupo restringido al continente americano. Se conocen de cien a ciento cincuenta especies de *Gonolobus*; todas ellas son trepadoras con hojas opuestas y conspicuo látex. Hasta el año 2007 se habían reportado treinta y nueve especies de *Gonolobus* con presencia en México de las cuales diecinueve son endémicas (Carnevali Fernández-Concha & Cetzal-Ix, 2015; Juárez-Jaimes *et al.*, 2007).

1.1.1. Uso alimenticio de *Gonolobus*

Se tiene registro del aprovechamiento de algunas especies de *Gonolobus* para consumo humano en los Estados de Guerrero, Oaxaca y Sonora, donde los frutos verdes de *Marsdenia* y *Gonolobus* se consumen asados. En la depresión central de Chiapas, se consumen en almíbar y sus semillas, hervidas o asadas, se comen como las palomitas de maíz y el látex es utilizado como pegamento (Pérez-Negrón & Casas, 2007; Juárez-Jaimes *et al.*, 2007). En Veracruz, el fruto de *Gonolobus niger* se consume hervido con azúcar. En países centroamericanos como El Salvador y Guatemala los frutos tiernos de la especie de *G. edulis*, cuyo nombre común es cuayote o guayote, se comen cocinados, también los frutos de *G. salvinii*, conocido como cuchamper o siguamper son destinados a consumo

humano. En Honduras se prepara un dulce a partir de los frutos de *G. stenanthus* (Williams, 1981).

En el poblado de Santa Inés Zacatelco, Tlaxcala, se usa el fruto seco de una especie de *Gonolobus* llamada localmente “jicarita” como agente espumante en la preparación de una bebida a base de cacao. Se trata de una bebida refrescante, no fermentada ni alcohólica de consumo corriente cuya característica principal es la abundante espuma. Esta bebida ha sido declarada Patrimonio Cultural Inmaterial de esa localidad. Algunas referencias señalan el uso de distintas secciones de *Gonolobus niger* con fines espumantes en la producción de una bebida de chocolate; el látex, la raíz o incluso el fruto sirven para este propósito. Este vegetal se obtiene por recolección o cultivo en solares (Lascurain, Avendaño, Amo, De Mirna & Covarrubias, 2010; Cruz Martínez, 2004).

1.1.2. Estudios previos sobre *Gonolobus*

Los estudios relacionados con la composición química de especies de este género incluyen la identificación de compuestos volátiles presentes en las flores de *G. barbatus*. Los principales componentes hallados fueron mono-terpenos como los isómeros E y Z de ocimeno así como linalol. El extracto de *G. condurango* ha sido documentado por sus actividades antiinflamatoria y antioxidante en estudios *in vivo*. Dicho extracto contiene un conjunto de glicósidos, principalmente el glucósido condurango A, CGA por sus siglas en inglés. y esteroides, así como taninos y una pequeña cantidad de un alcaloide similar a la estricnina. En general, la familia Apocynaceae es una con mayor abundancia de alcaloides, sin embargo, en *Gonolobus* la presencia de estos compuestos no es particularmente alta (Do, Liede-Schumann, Meve, & Ju, 2009; Bishayee, Avijit, & Ghosh 2013; Aniszewski, 2007). No se encontraron estudios sobre propiedades de superficie de los compuestos aislados a partir de este género botánico.

2. HIPÓTESIS

El fruto de *Gonolobus* sp. examinado en este estudio contiene compuestos con actividad superficial capaces de abatir significativamente la tensión superficial del agua y contribuir a la formación, estabilización y modificación de espuma en comparación con otros surfactantes naturales.

3. OBJETIVOS

- Examinar la capacidad de la “jicarita” (*Gonolobus* sp.), utilizada en Santa Inés Zacatelco, Tlaxcala, para modificar la tensión superficial del agua, y para producir espuma en medio acuoso con el propósito de identificar una posible fuente de surfactantes naturales.
- Determinar el efecto de la adición de “jicarita” sobre el rendimiento de las espumas obtenidas con otros surfactantes naturales para caracterizar sus propiedades de superficie.
- Aislar e identificar aquellos compuestos que logren reducir significativamente la tensión superficial del agua para considerar si es atractivo purificarlos para su aplicación práctica.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. Material vegetal

La Figura 2 muestra el fruto deshidratado de *Gonolobus* sp. usado en este trabajo. La cavidad de tonalidad amarilla está llena de semillas que se liberan cuando el fruto se abre al deshidratarse de manera natural. Las semillas son negras aplanadas de aproximadamente 5 mm de largo, con una cola de folículos blancos de aproximadamente 30 mm de longitud y más de cien por fruto. La cola de folículos se despliega en una especie de abanico cuando el fruto se abre y hace volar la semilla para diseminarla al contacto con el viento.



Figura 2. Fruto de *Gonolobus* deshidratado usado en este trabajo. La sección longitudinal, *l*, mide 8 cm y la transversal, *t*, 4.5 cm.

Una ejemplar de toda la planta y su enredadera se recolectó en el poblado de Santa Inés Zacatelco, Tlaxcala, México, durante el mes de octubre de 2015. El vegetal fue identificado por la M. en C. Rosa María Fonseca Juárez, Investigadora de la Facultad de Ciencias de la UNAM, y se depositó en el Herbario Nacional de México (MEXU), que se ubica en el Instituto de Biología de la UNAM con el número de acceso **1464964**. A la fecha se ha determinado que la “jicarita” pertenece al género *Gonolobus*, sin embargo, por falta de más información sobre su hábitat no ha sido posible aún determinar la especie. El material utilizado para la extracción y aislamiento de los compuestos químicos con actividad superficial se obtuvo en la misma población durante el mes de octubre de 2016 y posteriormente durante el mes de febrero de 2017.

4.2. Obtención del extracto acuoso de la “jicarita”

Se siguió un método para la extracción de saponinas con metanol acuoso similar a otros reportados para este fin. Una masa de 850 g del fruto seco sin semillas de *Gonolobus* sp. se molió por atrición (Nixtamatic modelo NTC-01), hasta obtener un tamaño de partícula menor de 2 mm. El material molido se maceró con 7 L de una mezcla metanol-agua (80:20) durante cuatro días a temperatura ambiente. Posteriormente, el extracto de metanol-agua se filtró por gravedad a través de un embudo de vidrio provisto de un tapón de algodón y

se desechó el residuo sólido. El filtrado se concentró en un rotavapor (IKA® RV 10 digital; Suiza) a 15 kPa y 50 °C hasta eliminar la mezcla de disolventes de extracción y obtener el extracto total de la “jicarita”.

4.3. *Métodos generales de análisis*

Cromatografía líquida de vacío

Se usó como fase estacionaria Diaion® HP-20 en una columna de vidrio de 5 × 20 cm con fondo sinterizado conectada al vacío. Diaion® HP-20 es una resina no polar del copolímero de estireno-divinilbenceno.

Cromatografía en columna abierta

Se utilizaron dos columnas de Sephadex® LH-20 de 3 × 63 cm y de 5 × 40 cm. Este material consiste en perlas de moléculas de dextrano entrecruzadas que han sido hidroxipropiladas lo que le confiere un carácter lipofílico e hidrofílico.

Cromatografía en columna de presión media

Se usó una columna de 3 × 40 cm en fase reversa C-18, acoplada a una bomba Cole-Parmer para flujo mediano.

Cromatografía en capa fina (CCF)

Se hicieron cromatografías de tipo analítico sobre placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (TLC Silicagel 60 F₂₅₄, Merck). Además, se hizo la cromatografía preparativa en fase reversa en placas de vidrio de 20 × 20 cm (TLC Silicagel 60 RP-18 F₂₅₄, Merck). Los métodos utilizados para revelar las placas cromatográficas fueron físicos: visualización bajo luz UV a una longitud de onda 254 nm y químicos y anisaldehído sulfúrico con calentamiento y posterior exposición a la luz UV a 365 nm.

Tensión superficial

La tensión superficial estática se midió por el método de Du Noüy a 30 ± 1.0 °C en un tensiómetro Kibron Ez-Pi+ (Kibron, Finland). Las muestras líquidas se colocaron en tubos de ensayo con tapón de rosca previamente sometidos a un tratamiento de limpieza en baño de sonicación, enjuague con agua desionizada y finalmente acetona. Los tubos se mantuvieron en un baño de agua a 30 °C durante algunos minutos previos a su medición para asegurar una temperatura de trabajo controlada. Un volumen de aproximadamente 3 mL de muestra se colocó en una copa de vidrio, y una vez alcanzada la estabilidad de la sonda del equipo se hizo la medición. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Entre cada medición la copa de vidrio se lavó con una disolución de Extran® al 2 %, se enjuagó con agua desionizada y después acetona. La sonda de medición se enjuagó con agua desionizada, se flameó y se enjuagó con acetona al término de cada determinación.

4.4. Fraccionamiento primario del extracto total de la "jicarita"

Una porción de 83 g en 750 mL de suspensión acuosa del extracto total de "jicarita" se fraccionó mediante partición líquido-líquido utilizando sucesivamente hexano (2×500 mL) y acetato de etilo (3×500 mL). Las fracciones se secaron con sulfato de sodio y se concentraron al vacío individualmente. El proceso permitió obtener tres fracciones: hexano (FSH), acetato de etilo (FSA) y la fracción líquida acuosa refinada (FLR). Todo el FLR se mezcló con 87 g de resina DIAION® HP-20 durante 16 h, con agitación constante a 60 rpm y 25 °C. Enseguida, la mezcla resina-extracto se filtró al vacío a través de una columna con fondo de vidrio sinterizado. Una vez empacada la resina dentro de la columna, se hicieron pasar volúmenes de 500 mL de eluyente compuesto por metanol y agua en las proporciones mostradas en la Tabla 1. Así se recolectaron diez fracciones diluidas (F1-F10) de 500 mL cada una, que se concentraron por separado en un rotavapor a 50 °C y 7.2 kPa.

Tabla 1. Proporción de disolventes en las fracciones recolectadas de la VLC.

Fracción	Eluyente	Proporción (%)
1-3	H ₂ O	100
4	H ₂ O:CH ₃ OH	90:10
5	H ₂ O:CH ₃ OH	80:20
6	H ₂ O:CH ₃ OH	70:30
7	CH ₃ OH:H ₂ O	50:50
8-9	CH ₃ OH:H ₂ O	70:30
10	CH ₃ OH	100

4.5. Aislamiento y purificación

Fraccionamiento en columna de Sephadex® LH-20 (5 × 40 cm)

Una porción de 0.7099 g de la fracción F8-F9 se disolvió en aproximadamente 5 mL de metanol, se filtró al vacío, y el filtrado se colocó en una columna de Sephadex® LH-20 (5 × 40 cm). La columna se eluyó con metanol y se recolectaron quince fracciones (S1-S15). Las fracciones se compararon por cromatografía en capa fina y se reunieron aquellas que presentaron similitud cromatográfica. La fase móvil utilizada fue CHCl₃-CH₃COOH-CH₃OH-H₂O (64:32:12:8) y como revelador anisaldehído sulfúrico. Se seleccionó este sistema por estar reportado para la separación de saponinas (Hildebert & Sabine, 2001).

Fraccionamiento en columna de presión media fase reversa (3 × 40 cm)

Los eluatos S11 y S12; S13, S14 y S15 se reunieron para generar las fracciones combinadas F12 (0.1005 g) y F15 (0.1116 g), respectivamente. Cada mezcla se disolvió de forma individual en metanol y se hizo pasar por la columna cromatográfica; la fase móvil fue metanol-agua (50:50), el flujo de la columna fue 1 mL/min y se recolectaron fracciones de 50 mL. Nuevamente las fracciones se agruparon por similitud cromatográfica (Tabla 2).

Tabla 2. Unión de fracciones resultantes de cromatografía en columna de presión media.

Nombre	Fracciones unidas	Cantidad (g)
FA	F1, F2, F3	0.0418
FB	F0', F1', F2', F3'	0.0715

Segundo fraccionamiento en columna de Sephadex® LH-20 (3 x 63 cm)

De manera independiente, FA y FB se fraccionaron en la columna de Sephadex®, se utilizó metanol puro como fase móvil, se recolectaron fracciones de 10 mL, que fueron comparadas por CCF y posteriormente unidas por similitud cromatográfica.

Cromatografía en placa preparativa en fase reversa

Las fracciones en las que se observó la mezcla de dos compuestos en la CFF se unieron (40.6 mg). Esta mezcla se disolvió en aproximadamente 3 mL de metanol-agua (80:20) y se depositó sobre una placa de cromatografía fase reversa (20 x 20 cm); como fase móvil se usó metanol-agua (50:50). Una vez concluida la elución de la placa, se observó bajo luz UV a 256 nm y se marcaron las franjas de separación para cada compuesto. Las bandas correspondientes se rasparon de la placa de vidrio para recuperar los compuestos purificados, el material adsorbido se dejó macerar en la mezcla metanol-agua (50:50) durante toda la noche, se filtró al vacío, las aguas madres se llevaron a sequedad en rotavapor.

4.6. Caracterización de la estructura de los compuestos aislados

Los compuestos purificados a través de las técnicas empleadas se analizaron por RMN-¹H y RMN-¹³C en un equipo Varian a 400 y 100 MHz, respectivamente. Las muestras se disolvieron en metanol deuterado.

4.7. Interacción de la "jicarita" con otros componentes de la bebida de cacao

Se hizo un diseño de experimentos factorial 2ⁿ tomando en cuenta cuatro componentes: haba, cacao, maíz y *Gonolobus* sp., "jicarita", en concentraciones masa/masa. Los resultados se alimentaron al software STATGRAPHICS Centurion XVI.I, el análisis estadístico se hizo con 95 % de confianza. Se presentan los diagramas de Pareto para ilustrar los efectos significativos sobre los parámetros evaluados. El gráfico de Pareto muestra cada uno de los efectos estimados en orden decreciente de importancia. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, el cual es el efecto estimado dividido entre su error estándar. La línea vertical sirve como referencia para decidir cuáles efectos son estadísticamente significativos. Cualquier barra que rebese esta línea indica un efecto significativo. Las combinaciones de los cuatro factores se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Matriz de experimentos realizados para mezclas de cuatro componentes.

Muestra	Concentración (mg/g)			
	Haba	Cacao	Maíz	<i>Gonolobus sp.</i>
1	54.6	54.6	0.00	0.00
2	27.3	27.3	27.3	1.70
3	0.00	54.6	0.00	3.40
4	0.00	0.00	0.00	0.00
5	54.6	0.00	0.00	3.40
6	0.00	0.00	54.6	3.40
7	54.6	0.00	54.6	0.00
8	0.00	54.6	54.6	0.00
9	54.6	54.6	54.6	3.40
10	54.6	54.6	0.00	3.40
11	27.3	27.3	27.3	1.70
12	0.00	54.6	0.00	0.00
13	0.00	0.00	0.00	3.40
14	54.6	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	54.6	0.00
16	54.6	0.00	54.6	3.40
17	0.00	54.6	54.6	3.40
18	54.6	54.6	54.6	0.00

Preparación de las mezclas

El maíz, el cacao y el haba con cáscara se adquirieron en un mercado local. Cada componente se tostó a fuego lento y se dejó enfriar. Una vez fríos, el cacao y el haba se pelaron. La humedad de los materiales una vez tostados se determinó en una termobalanza (Ohaus MB 45, EE.UU.). Se colocó 1 g de la muestra molida y se calentó a 100 °C durante 10 min, la determinación se realizó por triplicado. Los ingredientes se pesaron en las proporciones que indica la Tabla 3 y se molieron en licuadora con 100 mL de agua desionizada hasta obtener una pasta madre de donde se tomó la cantidad necesaria para preparar 70 g de una suspensión acuosa a las concentraciones requeridas. Finalmente, la suspensión se filtró mediante un colador doméstico con una abertura de 1 × 0.3 mm.

Caracterización de las mezclas

Se midió el pH, la concentración de sólidos solubles y la tensión superficial de cada una de las muestras por duplicado; el promedio y la desviación estándar se reportan en la Tabla A2 de la sección de Anexos. La medición de pH se hizo directamente en la suspensión, en el caso de los sólidos solubles y la tensión superficial se tomó una porción de alrededor de 15 g de cada una y se centrifugó a 1956g (5000 rpm) durante 15 min. Se separó el sobrenadante para realizar las determinaciones de sólidos solubles y tensión superficial. Una vez concluidas las pruebas las muestras se reincorporaron a su suspensión original para la producción de la espuma.

Las espumas se formaron al agitar las suspensiones, colocadas en vasos de 150 mL, con un homogeneizador rotor-estator (Ultra Turrax® IKA® T25 digital; Suiza) a 4800 rpm durante 30 s. Los volúmenes de la suspensión y la espuma se midieron para determinar el rendimiento de cada mezcla. Se tomaron muestras de la espuma recién formada, dentro de los 15 min posteriores a su formación, se colocaron en portaobjetos para su observación bajo un microscopio óptico (Olympus BX-45, Olympus Corporation, Japan), se capturaron imágenes de cada muestra que posteriormente fueron procesadas con el software Image-Pro-Plus versión 4.5 para medir los diámetros de las burbujas. Las burbujas demasiado grandes para ser observadas bajo el microscopio se midieron tomando una fotografía de la superficie de la espuma y una referencia de longitud para después medir el diámetro con ayuda del software de análisis de imagen Digimizer versión 5.1.2.

El contenido de proteína soluble en cada mezcla se cuantificó utilizando el método de Lowry et al. (1951). Para ello se tomó una porción de alrededor de 10 g de la mezcla a analizar y se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm. El sobrenadante se diluyó para obtener una concentración de sólidos solubles de 300 µg/mL. A 1 mL de esta disolución se le agregaron 5 mL de reactivo de Lowry que consiste en la mezcla de 20 mg/mL de carbonato de sodio (J. K. Baker, EE. UU.), 0.1 mol/dm³ de NaOH, 10 mg/mL de sulfato cúprico (J.K. Baker, México), y 20 mg/mL de tartrato sódico potásico (Mallinckrodt, Francia) en proporción 100:1:1, respectivamente. Posteriormente, se agitó en un vortex (Cole-Parmer, EE. UU.) durante 5 s, se dejó reposar durante 15 min, se adicionaron 0.5 mL de reactivo de Folin y Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EE. UU.) 1 N, se agitó en vortex por 5 s e inmediatamente se colocó en reposo en oscuridad durante 30 min. Al término del reposo, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10UV). La concentración de proteína soluble se calculó a partir de una curva patrón preparada con albúmina sérica de bovino (Sigma-Aldrich, EE. UU.) en el intervalo de concentraciones de 10 a 100 µg/mL, como blanco se usó agua desionizada.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2. *Análisis de la “jicarita” por separado*

5.2.1. *Purificación y caracterización de compuestos*

Se obtuvieron dos compuestos de forma pura que analizados por CCF mostraron una fluorescencia azul bajo luz UV. Dichos compuestos fueron denominados GONCO01 (9.5 mg) y GONCO02 (3.2 mg). GONCO01 se aisló como un sólido amorfo de color blanquecino.

5.2.2. *Determinación de tensión superficial y producción de espuma*

De las fracciones obtenidas de la “jicarita” durante el primer fraccionamiento, aquellas menos polares fueron las que presentaron un abatimiento mayor de la tensión superficial del disolvente puro (Tabla 4). F8-F9 produjo la proporción más alta de espuma, sin embargo, no fue la que redujo al máximo la tensión superficial del agua. La curva de tensión superficial en función de la concentración de sólidos solubles mostró que el valor mínimo de tensión superficial fue de 40.95 ± 0.43 mN/m para una concentración de 4 mg/g (Fig. 3). Concentraciones mayores resultaron en un aumento de la tensión superficial de aproximadamente 2 mN/m. La presencia de un mínimo en este tipo de curvas, se ha asociado con la presencia de impurezas no iónicas que se adsorben fuertemente en la superficie (Martínez-balbuena et al., 2017) lo que parece razonable si se considera que F8-F9 todavía es una mezcla compleja de compuestos. Esta concentración es alta si se

compara con la concentración micelar crítica (CMC) de algunas saponinas como la escina; 0.1 mg/g, y el extracto del castaño de indias; 1.5 mg/g, entre otras saponinas estudiadas por Pagureva, Tcholakova, Golemanov, Denkov, Pelan & Stoyanov (2016). Los extractos que contienen saponinas pueden reducir la tensión superficial del agua apenas a 50 mN/m, como el extracto crudo de *Camellia oleífera* que ha sido usada como detergente natural y cuyas propiedades espumantes fueron estudiadas por Chen, Yang, Chang, Ciou & Huang (2010).

Tabla 4. Tensión superficial promedio a 30 °C de las muestras diluidas a 0.4 °Bx (4 mg/g) y rendimiento de fraccionamiento.

Fracción	Rendimiento base seca (%)	Espuma producida (mm espuma/g de muestra)	Tensión superficial estática (mN/m) Ajustada a 0.4 °Brix (n = 3)
Agua desionizada	-	0.0	71.33 ± 0.27
FSA	0.26	4.8 ± 0.68	32.69 ± 0.98
FSH	0.33	4.0 ± 0.41	32.42 ± 0.50
F1-F3	5.20	1.8 ± 0.49	55.98 ± 0.67
F4	1.96	2.2 ± 0.14	54.77 ± 0.72
F5-F6	0.60	1.6 ± 0.18	57.87 ± 0.89
F7	0.34	1.7 ± 0.21	52.94 ± 0.91
F8-F9	0.35	7.1 ± 0.42	46.02 ± 0.49
F10	0.02	3.8 ± 0.26	36.20 ± 0.80

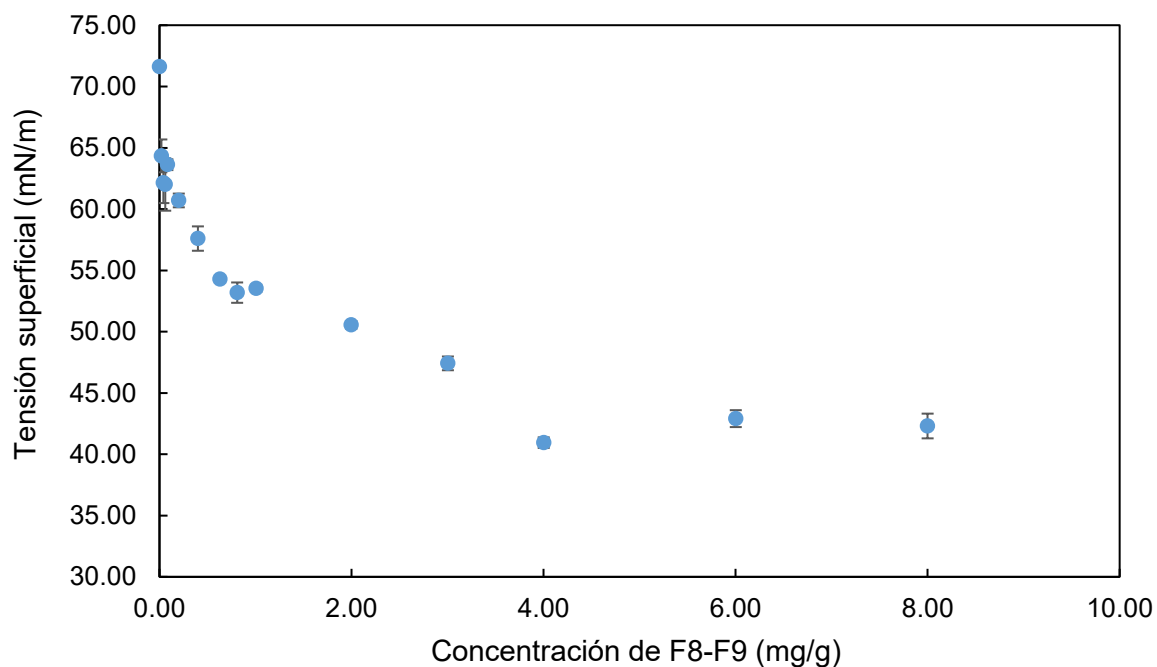


Figura 3. Tensión superficial a 30 °C en función de la concentración de F8-F9.

5.3. Interacción de la “jicarita” con otros componentes de la bebida de cacao

Las combinaciones de “jicarita” (*Gonolobus sp.*) con los otros componentes de la bebida de cacao, resultan en una disminución significativa de la tensión superficial en relación con el resto de los componentes (Figura 4, Tabla A1; Anexo A). La concentración de sólidos solubles en las mezclas (Tabla A2; Anexo A) aumentó significativamente por la adición de los tres componentes mayoritarios en la masa; el haba contribuye en mayor medida. Esto era de esperarse si se considera que la proporción de “jicarita” en esas mezclas es decenas de veces menor. Sin embargo, dicha proporción fue suficiente para disminuir el pH de las mezclas de manera significativa.

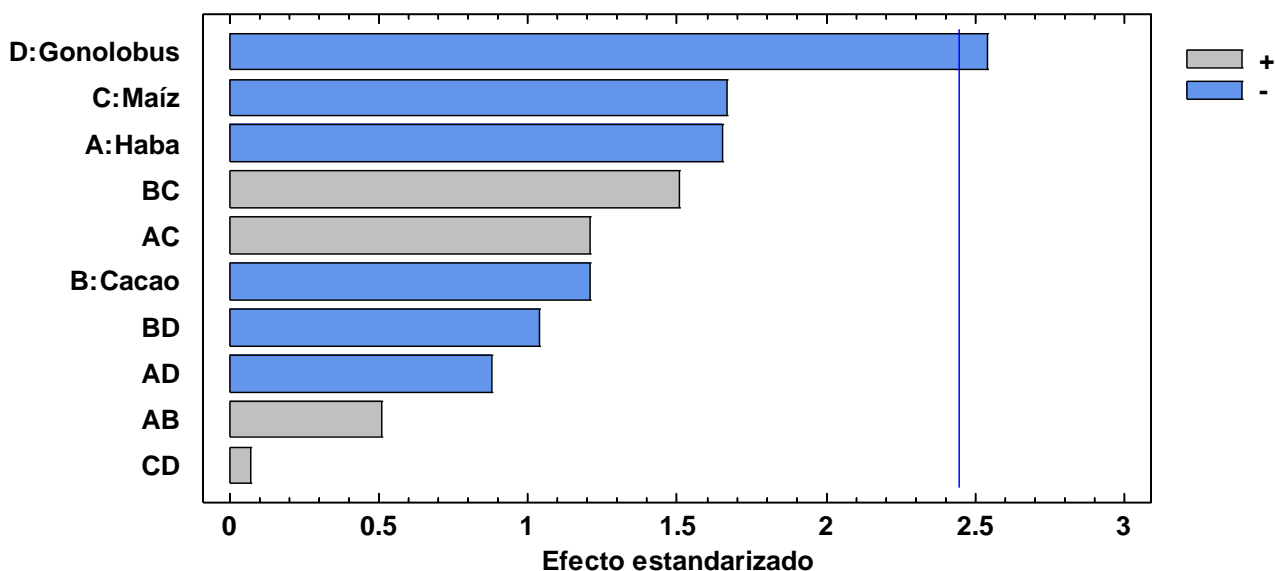


Figura 4. Diagrama de Pareto para el efecto en la tensión superficial de cada componente de la mezcla. Las barras que cruzan la línea vertical azul tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta.

El haba es el único factor que incrementa significativamente el rendimiento (%) de espuma en las mezclas (Fig. 5). El haba contiene 28 a 33 % de proteína cruda; 20 % (m/m) son albúminas solubles en agua y 80 % globulinas solubles en disoluciones salinas. Por lo tanto, este resultado puede atribuirse a su fracción proteínica pues además su capacidad para formar espuma ya ha sido demostrada (Husband, Wilde, Clark, Rawel, & Muschiolik, 1994; Nivala, Mäkinen, Kruus, Nordlund, & Ercili-Cura, 2017; Voigt, Biehl, & Wazir, 1993). En algunas variedades de haba se reporta un contenido de 3.9 % (m/m) de saponinas, un valor considerable si se toma en cuenta que para producir espuma no se requiere una alta concentración de estos compuestos (Revilla, 2014), la presencia de saponinas en el material usado para preparar las mezclas en el presente trabajo no se determinó.

A pesar de que el contenido de proteínas en el maíz es alto, 7.2 %, su solubilidad en agua es baja debido a que 41 % de ellas corresponde a la zeína; una prolina soluble en mezclas de etanol y agua y relativamente insoluble en agua, lo que puede explicar el bajo contenido de proteína soluble en la muestra de maíz solo. Esta condición se refleja

directamente en la escasa producción de espuma (Myers, Hojilla-Evangelista, & Johnson 1994).

La tensión superficial de la suspensión de cacao fue menor que la reportada por Holguín-Salas, Lópe-López, Corkidi, & Galindo (2013) para una suspensión acuosa con 50 mg/mL de cacao; 54.6 ± 0.9 mN/m, mientras que el del presente trabajo fue 51.64 ± 0.57 mN/m. No obstante, la diferencia entre ambos valores es de aproximadamente 6 %. Salas et al. (2013) también hicieron pruebas de producción de espuma en estas mezclas y encontraron un mayor contenido de cacao, produce una mayor cantidad de espuma. Sin embargo, su rendimiento fue aproximadamente 17 %, mientras que, en el presente trabajo, el rendimiento fue 33 %. Esta diferencia podría deberse a que se usó una mayor concentración de cacao lo que implica una mayor cantidad de ácidos grasos de cadena corta, que han sido identificados como responsables de la formación de la espuma. Además, se usó una velocidad de agitación mayor.

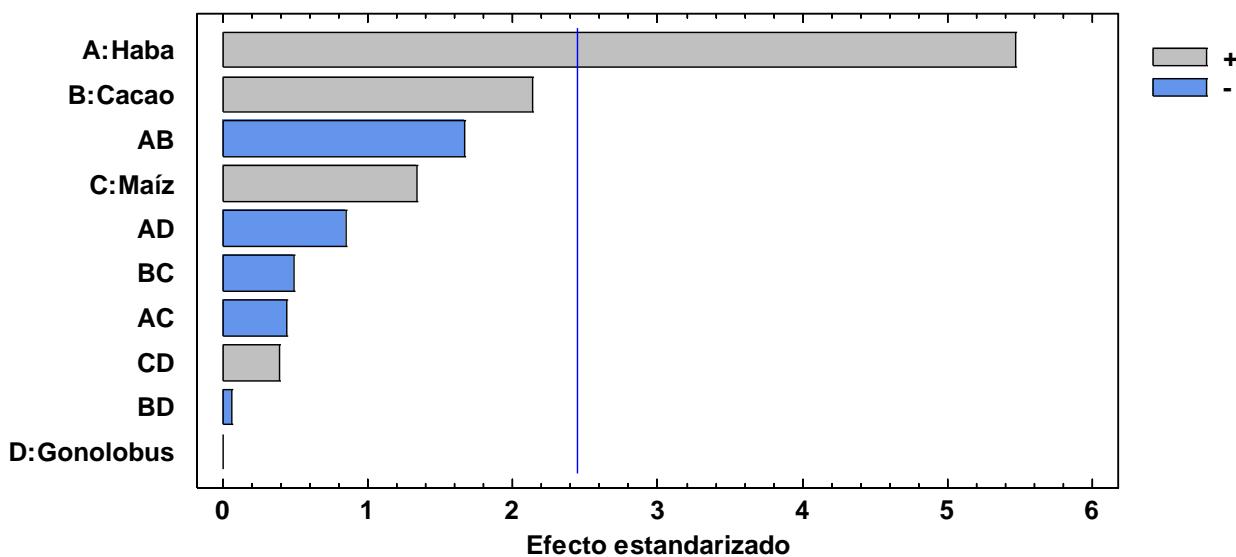


Figura 5. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de espuma producida por las mezclas. Las barras que cruzan la línea vertical azul tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta.

La relación entre una baja tensión superficial y un mayor rendimiento de espuma no fue clara. El valor más bajo de tensión superficial fue 33.61 ± 0.23 mN/m que corresponde a la combinación haba-cacao-*Gonolobus*, pero su rendimiento fue 94 %. Los rendimientos más altos, 103 y 104 %, fueron alcanzados con tensiones superficiales de 49.36 ± 0.12 y 45.05 ± 0.31 mN/m, respectivamente. Esto puede deberse a que hay una combinación de diferentes especies que tienen actividad superficial. Por un lado, las proteínas y por el otro los ácidos grasos de cadena corta. Las diferencias de estructura química de estos agentes surfactantes también repercuten en la manera que estabilizan la espuma; este aspecto es importante porque la espuma debe ser lo suficientemente estable poder medirla.

En este caso las moléculas más pequeñas estabilizan las burbujas y evitan su coalescencia, fenómeno que se presenta cuando hay un adelgazamiento excesivo de la lamela, mediante el efecto Gibbs-Marangoni. Durante el adelgazamiento de la película de la burbuja se produce un gradiente de tensión superficial que provoca la difusión de las moléculas de surfactante hacia el área afectada, arrastrando consigo líquido que

reestablece el espesor de la película. Las proteínas, al tener múltiples residuos de diferente polaridad, pueden actuar sobre una mayor superficie de la burbuja, de esta manera forman una capa rígida de proteínas entrecruzadas en la interface, lo que estabiliza la burbuja (Campbell & Mougeot, 2000).

La consecuencia de combinar diferentes especies de surfactantes puede ser la interferencia de las moléculas pequeñas de surfactante que se adsorben de forma rápida en la superficie y evitan la interacción proteína-proteína y en otras situaciones las proteínas interfieren con la rápida difusión del surfactante. De aquí que las mezclas con los máximos porcentajes de proteína no siempre mostraron el mayor abatimiento de la tensión superficial, es decir, hay componentes distintos de las proteínas que contribuyen a disminuir la tensión superficial de la mezcla. De forma similar, las muestras con los valores mínimos de tensión superficial no siempre fueron los que dieron rendimientos máximos, pues si bien durante la agitación se formaron burbujas, no fueron lo suficientemente estables para generar una espuma mensurable.

5.3.1. Diámetro de burbuja

El aspecto físico de las espumas también se diferenció por el tipo de componentes que intervino en ellas, lo que sugiere que hay una interacción entre los factores. A simple vista el cacao y el maíz presentaron burbujas de mayor tamaño (Fig. 6). La combinación de los cuatro componentes en la bebida resultó en una evidente disminución del tamaño de burbuja. Las combinaciones entre dos y tres componentes también mostraron apariencias distintas a las de cada uno por separado como se puede observar en la Figura 7. El tamaño de burbuja del cacao se redujo considerablemente cuando se combinó con *Gonolobus*.



Figura 6. Vista superior de las espumas producidas por los componentes de forma individual, así como en la bebida. El diámetro del contenedor es de 54 mm.



Figura 7. Efecto de *Gonolobus* sobre la apariencia de la espuma de cacao y de haba. El diámetro de los contenedores es de 54 mm.

Debido a los valores heterogéneos en los diámetros de burbuja se optó por hacer una comparación de las medianas de cada mezcla. Las pruebas estadísticas indicaron que existe diferencia significativa en los tamaños de burbuja de las mezclas. Las combinaciones binarias de cacao con haba y maíz, así como el cacao individualmente fueron las que presentaron mayor diámetro de burbuja. Por otro lado, la mayoría de las muestras que

Gráfico de Medianas con Intervalos del 95.0% de Confianza

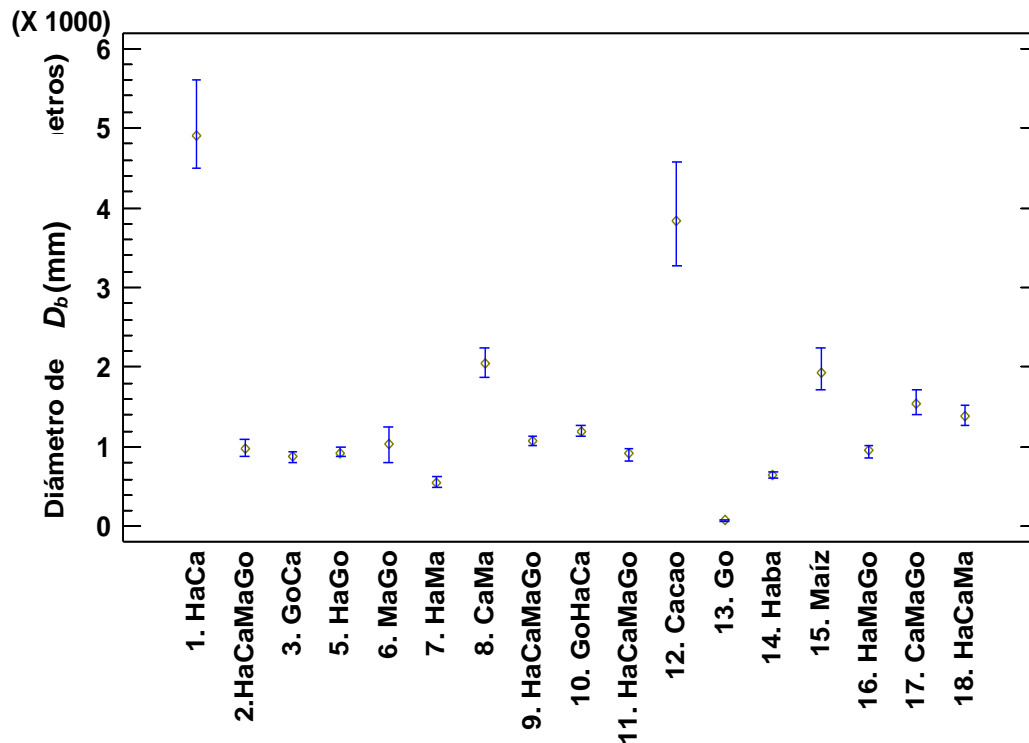


Figura 8. Diámetro de burbuja para las espumas producidas por las diferentes mezclas. Ha = haba, Ca = cacao, Go = *Gonolobus* y Ma = maíz.

El análisis estadístico del diseño factorial mostró que *Gonolobus* redujo significativamente el tamaño de la burbuja. También las interacciones del cacao con el maíz y *Gonolobus* resultaron en la disminución del diámetro de la burbuja, mientras que el cacao lo incrementó, el diagrama de Pareto con esta información se encuentra en la Figura A1 del Anexo A.

Con base en los resultados anteriores, fue necesario reducir el número de componentes en las mezclas para disminuir la complejidad del sistema de estudio y comprender mejor el papel que tienen los compuestos con actividad superficial de la “jicarita” sobre la espuma. Se descartó el maíz por no tener una contribución significativa en ninguno de los parámetros evaluados. Las concentraciones y combinaciones utilizadas, así como los resultados de su caracterización se presentan en la Tabla 7. Las Figuras B1-B3; Anexo B muestran los diagramas de Pareto para los valores de tamaño de burbuja, tensión superficial y rendimiento para estas nueve mezclas. Los resultados fueron similares a los obtenidos de las mezclas con cuatro componentes: el diámetro de burbuja se vio disminuido por la presencia de *Gonolobus* (Fig. B1; Anexo B), también la tensión superficial mostró una disminución por efecto de la “jicarita” (Fig. B2; Anexo B).

Tabla 7. Matriz de experimentos para mezclas con tres componentes.

Número	Haba	Cacao	<i>Gonolobus</i>	Proteína Soluble (n = 2)	Tensión Superficial (n = 3)	Rendimiento	Sólidos Solubles (n = 3)
	(mg/g)			(mg/g)	(mN/m)	(%)	(°Bx)
1	19.11	19.11	1.911	3.3 ± 0.04	46.71 ± 1.55	56.7	1.3 ± 0.06
2	35.49	19.11	1.911	5.0 ± 0.00	46.74 ± 0.37	67.8	1.8 ± 0.0
3	19.11	19.11	3.549	4.1 ± 0.15	40.25 ± 1.23	58.9	1.9 ± 0.0
4	27.30	27.3	2.73	4.9 ± 0.05	40.66 ± 0.12	66.1	1.9 ± 0.0
5	35.49	19.11	3.549	6.1 ± 0.13	45.57 ± 0.62	81.5	2.4 ± 0.06
6	19.11	35.49	1.911	3.8 ± 0.10	45.69 ± 0.22	49.2	1.5 ± 0.0
7	19.11	35.49	3.549	4.6 ± 0.00	45.50 ± 0.26	35.0	2.0 ± 0.06
8	35.49	35.49	1.911	5.3 ± 0.05	40.51 ± 0.89	56.1	2.0 ± 0.0
9	35.49	35.49	3.549	6.4 ± 0.00	38.95 ± 2.27	61.1	2.5 ± 0.0

El haba, nuevamente, mostró un efecto significativo positivo sobre el rendimiento de las espumas (Fig. B3; Anexo B). El rendimiento máximo se obtuvo cuando el contenido de proteína fue alto, lo que reforzaría la explicación de que gran parte de la espuma producida se debe a las proteínas aportadas por el haba. Aunque el haba, el cacao y la “jicarita” contribuyeron significativamente al contenido de proteína soluble en la mezcla, este efecto fue más notorio cuando se aumentó la concentración de *Gonolobus* como se ilustra en la Figura B4; Anexo B, la cual muestra el diagrama de efectos principales sobre esta variable de respuesta. La combinación de los tres componentes en sus niveles altos mostró el máximo contenido de proteína y la mínima tensión superficial. Sin embargo, en las mezclas de cuatro componentes no hubo un mayor rendimiento. Este resultado podría deberse a que los ácidos grasos provenientes del cacao interfieren con las interacciones entre proteínas. Este cambio en la proteína soluble debido a la variación de la concentración de “jicarita” en las mezclas podría significar la presencia de un efecto cooperativo, es decir, que este vegetal favorece la disolución de una mayor cantidad de proteína de haba en lugar de aportar la proteína excedente, dado que la “jicarita” y el cacao tuvieron una concentración

similar de proteína soluble. La Tabla A1, Anexo A muestra que en las muestras con cuatro componentes el haba fue el componente con mayor contenido de proteína soluble. Este contenido disminuyó en todas las mezclas, posiblemente debido a que la interacción con los demás componentes de la bebida favoreció la agregación de la proteína, lo que se manifestó como una disminución de la solubilidad, i.e., de la proteína soluble. Tomando en cuenta este resultado, el aislamiento del conjunto de compuestos responsables de este cambio en la solubilidad de la proteína de haba requeriría un nuevo enfoque de la estrategia experimental. Esto implica un mayor alcance al que se consideró en la estrategia inicial del presente trabajo.

6. CONCLUSIONES

La “jicarita” mostró un efecto significativo sobre el abatimiento de la tensión superficial del agua, tanto de las fracciones obtenidas por extracción con metanol acuoso y el material vegetal crudo. La influencia de *Gonolobus sp.* sobre la producción de espuma no fue significativa en comparación con la contribución que tienen otros componentes en la bebida: cacao, haba y maíz. Sin embargo, el diámetro de la burbuja sí se redujo significativamente con la presencia de *Gonolobus sp.* Estos resultados sugieren que la mayor parte de agentes con actividad superficial son aportados por el haba y el cacao y que la función de *Gonolobus* no es la producción de espuma, sino favorecer la disolución de una mayor cantidad de proteína. La separación de los compuestos que intervienen en este fenómeno de disolución demanda una serie de nuevos experimentos exploratorios que se plantean como trabajo futuro.

REFERENCIAS

- Aniszewski, T. (2007). *Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*. 1st ed. Elsevier Science.
- Bishayee, K., Avijit, P., & Ghosh, S. (2013). Condurango-glycoside-A fraction of *Gonolobus condurango* induces DNA damage associated senescence and apoptosis via ROS-dependent p53 signalling pathway in HeLa cells. *Molecular Cellular Biochemistry* 382, 173–83. doi:10.1007/s11010-013-1732-5.
- Campbell, G.M., & Mougeot, E. (2000). Creation and characterisation of aerated food products. *Trends in Food Science and Technology* 10, 283-296. doi: 10.1016/S0924-2244(00)00008-X
- Carnevali Fernández-Concha, G., & Cetzal-Ix, W. (2015). El Género *Gonolobus* (Apocynaceae, Asclepiadoideae, Gonolobinae) en la porción mexicana de la Península de Yucatán: La novedad indocumentada. *Herbario CICY* 5, 1–5.
- Chen, Y.-F., Yang, C.-H., Chang, M.-S., Ciou, Y.-P., & Huang, Y.-C. (2010). Foam properties and detergent abilities of the saponins from *Camellia oleifera*. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 4417–4425. doi:10.3390/ijms11114417.
- Cruz Martínez, F. (2004). Hacia una geografía del Popo. <http://texistepec.gob.mx/wp-content/uploads/sites/80/2014/12/Hacia-una-geografía-del-Popo.pdf>.
- Do, S., Liede-Schumann, S., Meve, U., & Ju, A. (2009). Chemical diversity of floral volatiles in Asclepiadoideae-Asclepiadeae (Apocynaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 36, 842–52. doi:10.1016/j.bse.2008.10.005.
- Hildebert, W., & Bladt, S. (2001). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Second ed., Germany, Springer.
- Holguín-Salas, A., López-López, D., Corkidi, G., & Galindo, E., (2013). Food and

- bioproducts processing foam production and hydrodynamic performance of a traditional mexican molinillo (beater) in the chocolate beverage preparation process. *Food and Bioproducts Processing* 93, 139-147. doi:10.1016/j.fbp.2013.12.007.
- Holmberg, K. (2001). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 6(2), 148–59. doi:10.1016/S1359-0294(01)00074-7.
- Husband, F. A., Wilde, P. J., Clark, D. C., Rawel, H. M., & Muschiolik, G. (1994). Foaming properties of modified faba bean protein isolates. *Topics in Catalysis* 8(5), 455–468. doi:10.1016/S0268-005X(09)80088-X.
- Juárez-Jaimes, V., Alvarado-Cárdenas, L.O., & Villaseñor, J.L (2007). The family Apocynaceae Sensu Lato in Mexico: Diversity and distribution. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78, 459–482. doi: http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2007.002.402.
- Lascurain, M., Avendaño, S., Amo, A., Ambrosio, M. & Covarrubias, M. (2010). *Guía de Frutos Silvestres Comestibles En Veracruz*. Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal. Conafor-CONACYT.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275. doi: 10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- Makkar, H., Siddhuraju, P., & Klaus, B. (2007). *Methods in molecular biology: Plant secondary metabolites*. Estados Unidos: Humana Press.
- Martínez-balbuena, L., Arteaga-jiménez, A., & Hernández-zapata, E. (2017). Applicability of the Gibbs Adsorption Isotherm to the analysis of experimental surface-tension data for ionic and nonionic surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science* 247, 178-184. doi: dx.doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.018.
- Myers, D., Hojilla-Evangelista, M.P., & Johnson, L.A. (1994). Functional properties of protein extracted from flaked, defatted, whole corn by ethanol/alkali during sequential extraction processing. *Journal of the American Oil Chemists Society* 71(11), 1201–1204. doi: https://doi.org/10.1007/BF02540537.
- Nivala, O., Mäkinen, E., Kruus, K., Nordlund, E., & Ercili-Cura, D. (2017). Structuring colloidal oat and faba bean protein particles via enzymatic modification. *Food Chemistry* 231, 87–95. doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.114.
- Oleszek, W. & Bialy, Z. (2006). Chromatographic determination of plant saponins — An update (2002 – 2005) *Journal of Chromatography A* 1112, 78–91. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.037.
- Olkowska, E., Polkowska, Z. & Namie, J. (2011). Analytics of surfactants in the environment: Problems and challenges. *Chemical Reviews* 111, 5667–5700. doi: 10.1021/cr100107g.
- Ozturk, B. & McClements, D.J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science* 7, 1–6. doi: https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.008.
- Pagureva, N., Tcholakova, S., Golemanov, K., Denkov, N., Pelan, E., & Stoyanov, S.D. (2016). Surface properties of adsorption layers formed from triterpenoid and steroid saponins. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 491, 18–28. doi: 10.1016/j.colsurfa.2015.12.001.
- Pérez-Negrón, E., & Casas, A. (2007). Use, extraction rates and spatial availability of plant resources in the Tehuacán-Cuicatlán valley, Mexico: The case of Santiago Quioitepec, Oaxaca. *Journal of Arid Environments* 70(2), 356–79. doi:10.1016/j.jaridenv.2006.12.016.
- Pradhan, A. & Bhattacharyya, A. (2017) Quest for an eco-friendly alternative surfactant: Surface and foam characteristics of natural surfactants. *Journal of Cleaner Production* 150, 127–34. doi:10.1016/j.jclepro.2017.03.013.

- Revilla, I. (2014). *Impact of Thermal Processing on Faba Bean (Vicia faba) Composition. Processing and Impact on Active Components in Food* 1. 337-343. doi:10.1016/B978-0-12-404699-3.00040-8.
- Tadros, T. F. (2014). *An Introduction to Surfactants*. Alemania: DE GRUYTER.
- Voigt, J., Biehl, B., & Wazir, S.K.S. (1993). The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chemistry* 47, 145–51. doi: Doi 10.1016/0308-8146(93)90236-9.
- Williams, L.O. (1981). The useful plants of Central America. *CEIBA* 24 (1–2), 40–42. <https://revistas.zamorano.edu/index.php/CEIBA/article/viewFile/898/848>.
- Zhang, J. & Reineccius, G.A. (2016). Factors controlling the turbidity of submicron emulsions stabilized by food biopolymers and natural surfactant. *LWT - Food Science and Technology* 71, 162–168. doi:10.1016/j.lwt.2016.03.035.

ANEXO A

Tabla A1. Tensión superficial y rendimiento de espumas de las mezclas.

Muestra	Concentración (mg/g)				Tensión superficial (mN/m) n = 2	Rendimiento (%)	Proteína soluble (%)
	Haba	Cacao	Maíz	<i>Gonolobus</i>			
1	54.6	54.6	0.00	0.00	49.73 ± 0.82	68.5	0.2402
2	27.3	27.3	27.3	1.70	38.73 ± 1.49	36	0.1928
3	0.00	54.6	0.00	3.40	41.89 ± 0.23	40.6	0.1999
4	0.00	0.00	0.00	0.00	60.82 ± 1.35	-14.7	0
5	54.6	0.00	0.00	3.40	43.22 ± 0.52	36.9	0.2233
6	0.0.0	0.00	54.6	3.40	45.93 ± 0.99	19.0	0.0482
7	54.6	0.00	54.6	0.00	51.06 ± 0.24	62.5	0.2368
8	0.00	54.6	54.6	0.00	52.71 ± 2.42	49.1	0.2001
9	54.6	54.6	54.6	3.40	40.02 ± 0.69	64.6	0.3453
10	54.6	54.6	0.00	3.40	33.61 ± 0.23	94	0.2632
11	27.3	27.3	27.3	1.70	34.05 ± 0.50	86.9	0.0967
12	0.00	54.6	0.00	0.00	51.64 ± 0.57	33.9	0.102
13	0.00	0.00	0.00	3.40	58.79 ± 1.32	4.3	0.0047
14	54.6	0.00	0.00	0.00	49.36 ± 0.12	103.6	0.5552
15	0.0.0	0.00	54.6	0.00	40.07 ± 0.79	14.5	0.0205
16	54.6	0.00	54.6	3.40	33.84 ± 0.15	108.7	0.3026
17	0.00	54.6	54.6	3.40	36.99 ± 0.35	53.7	0.083
18	54.6	54.6	54.6	0.00	45.05 ± 0.31	104	0.2583

Tabla A2. Valores de pH y sólidos solubles expresados como °Brix en las mezclas

Muestra	Concentración (mg/g)				°Brix	pH
	Haba	Cacao	Maíz	<i>Gonolobus</i>	n = 3	n = 2
1	54.6	54.6	0.00	0.00	2.1 ± 0	6.5 ± 0.14
2	27.3	27.3	27.3	1.70	1.2 ± 0	6.1 ± 0.01
3	0.00	54.6	0.00	3.40	0.9 ± 0	6.0 ± 0.02
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0 ± 0	7.1 ± 0.01
5	54.6	0.00	0.00	3.40	1.6 ± 0	6.3 ± 0.01
6	0.00	0.00	54.6	3.40	0.4 ± 0	5.6 ± 0.08
7	54.6	0.00	54.6	0.00	1.7 ± 0	6.3 ± 0.02
8	0.00	54.6	54.6	0.00	1.0 ± 0	6.1 ± 0.05
9	54.6	54.6	54.6	3.40	2.7 ± 0	6.0 ± 0.04
10	54.6	54.6	0.00	3.40	2.1 ± 0.1	6.1 ± 0.01
11	27.3	27.3	27.3	1.70	1.4 ± 0.1	6.0 ± 0.01
12	0.00	54.6	0.00	0.00	0.7 ± 0	6.1 ± 0.0
13	0.00	0.00	0.00	3.40	0.1 ± 0	4.9 ± 0.02
14	54.6	0.00	0.00	0.00	2.1 ± 0	6.5 ± 0.03
15	0.00	0.00	54.6	0.00	0.2 ± 0	6.0 ± 0.04
16	54.6	0.00	54.6	3.40	2.1 ± 0	6.1 ± 0.01
17	0.00	54.6	54.6	3.40	1.1 ± 0.1	6.0 ± 0.04
18	54.6	54.6	54.6	0.00	2.5 ± 0	6.3 ± 0.02

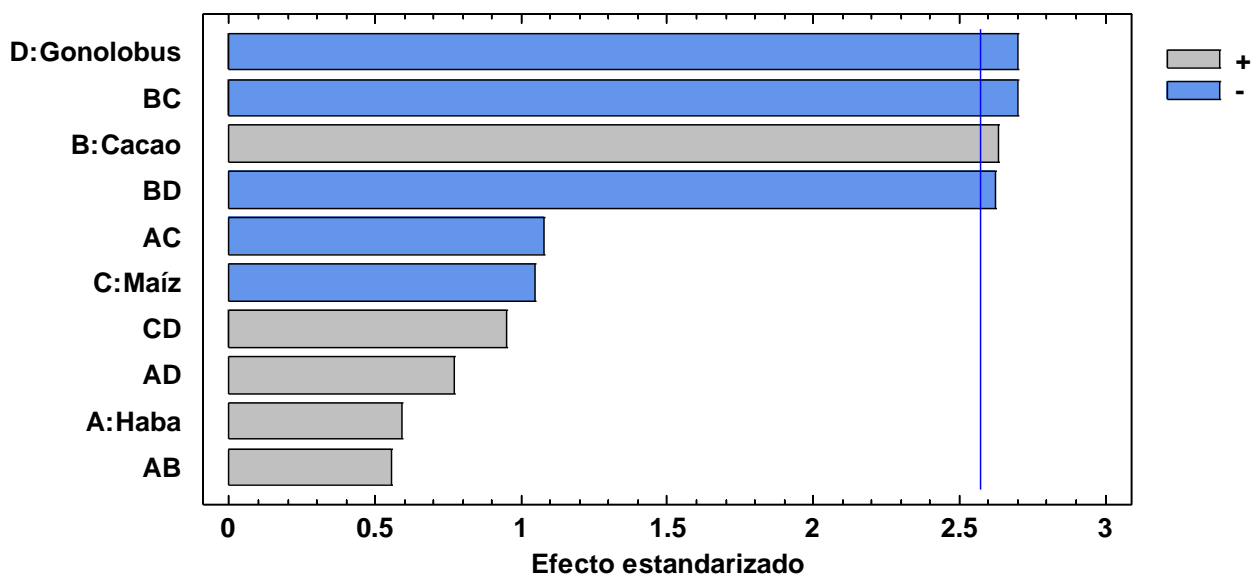


Figura A1. Diagrama de Pareto para el tamaño de burbuja de las espumas. Las barras que cruzan la línea vertical azul tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta.

ANEXO B

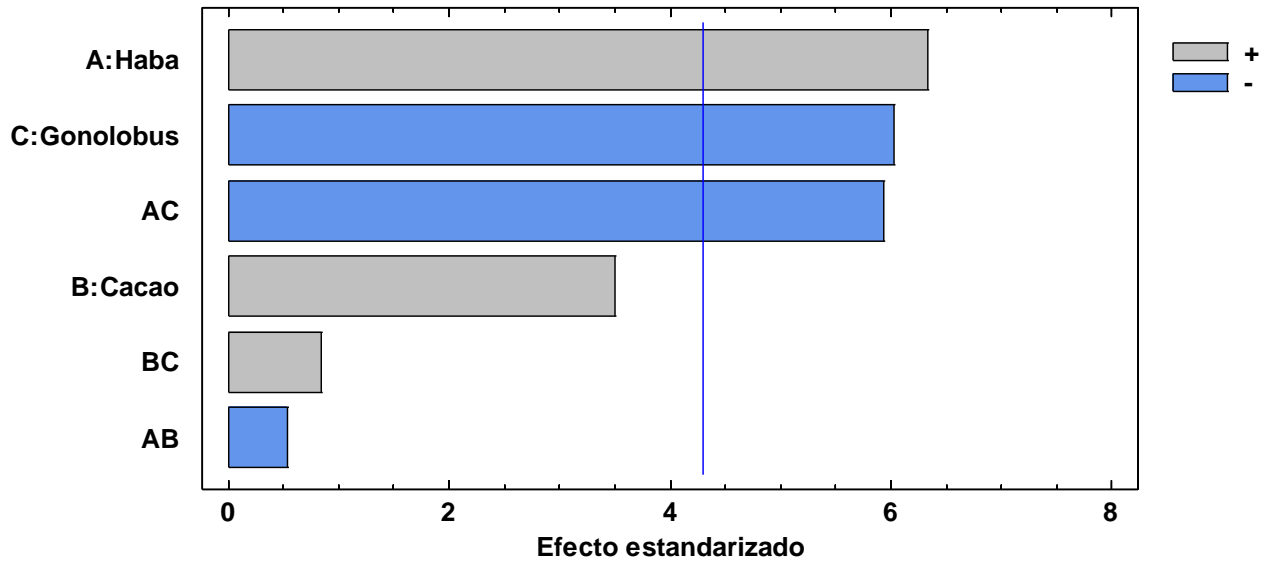


Figura B1. Diagrama de Pareto para el tamaño de burbuja de las espumas con tres componentes. Las barras que cruzan la línea vertical azul tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta.

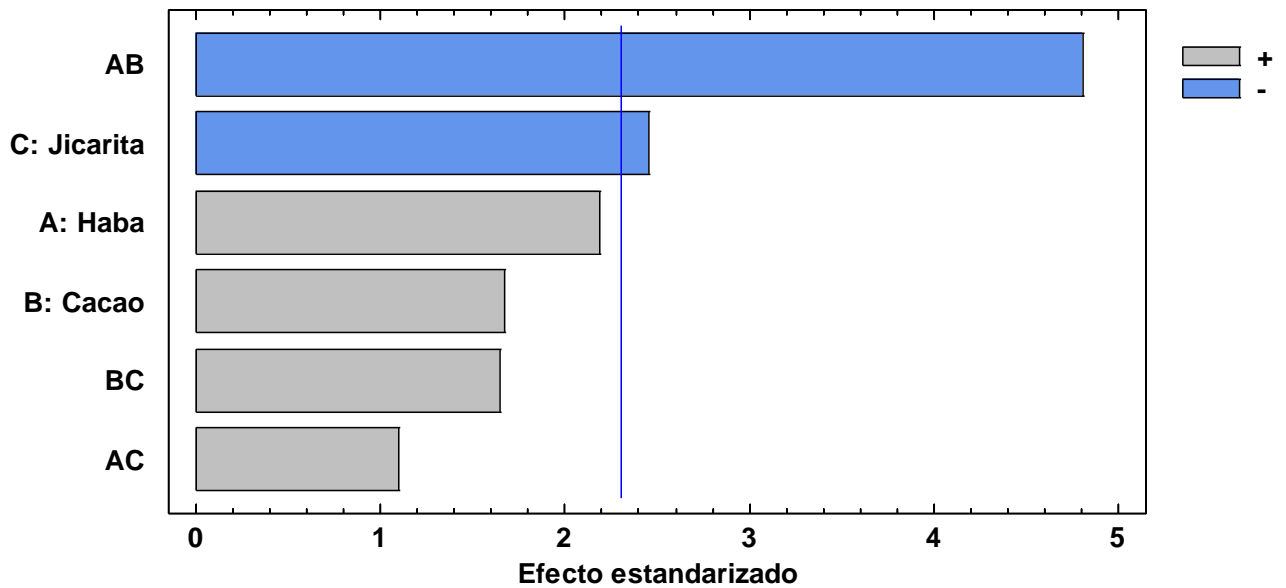


Figura B2. Diagrama de Pareto para el efecto de los tres componentes sobre la tensión superficial del agua. Las barras que cruzan la línea vertical azul tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta.

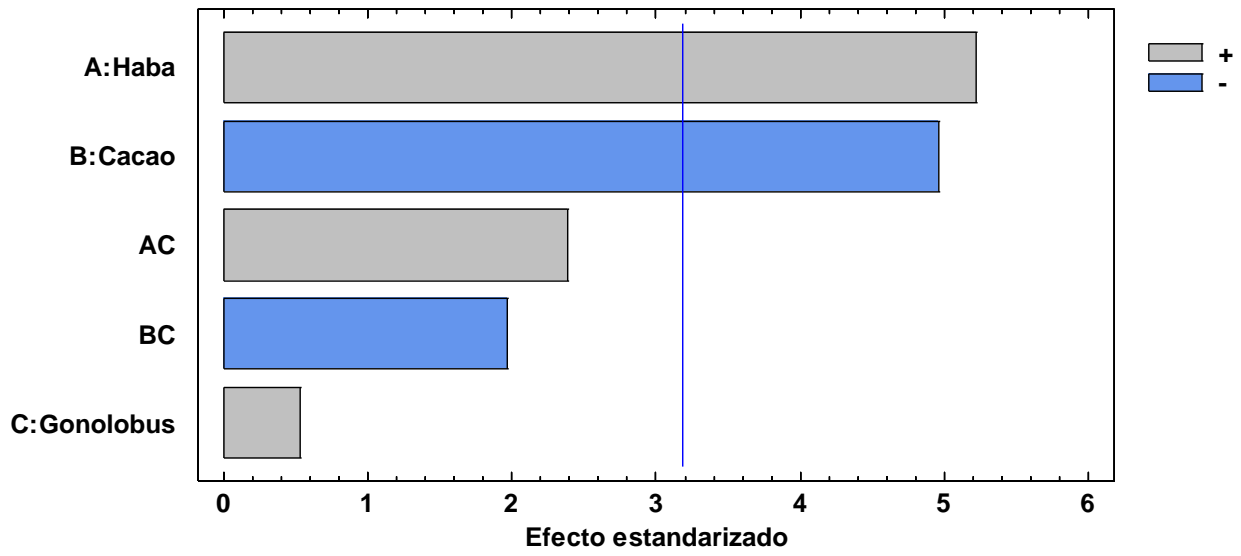


Figura B3. Diagrama de Pareto para el rendimiento de las espumas con tres componentes. Las barras que cruzan la línea vertical azul tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta.

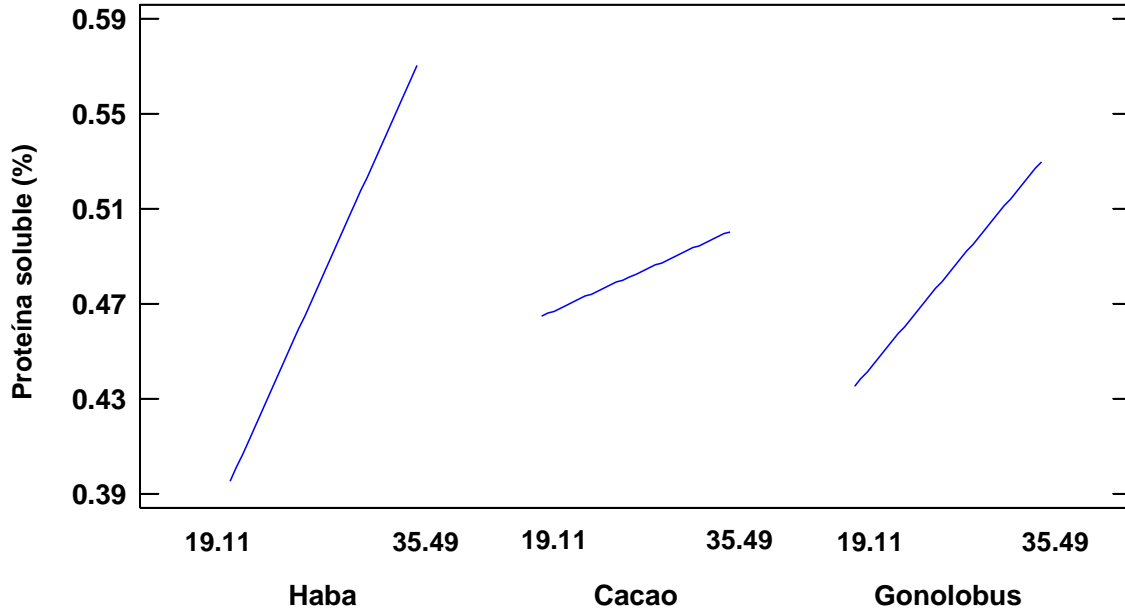


Figura B4. Efectos principales sobre la proteína soluble en las mezclas de tres componentes.