

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Facultad de Químico Farmacobiología

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Temática: Biotecnología Alimentaria



“Caracterización química del mucílago de seis especies de *Opuntia* colectadas en Morelia, Michoacán y municipios aledaños”

Tesis de maestría

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:

Q.F.B. Sarahí Rodríguez González

D.C. Héctor Eduardo Martínez Flores

Asesor

Morelia, Michoacán, México.

Abril, 2013.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida que me ha prestado hasta el momento, para poder realizar lo me gusta y apasiona, por darme la fuerza, inspiración, tenacidad y sabiduría para lograr un sueño más, gracias!

A mis padres por apoyarme y estar conmigo en todo momento, por su esfuerzo para ayudarme a lograr lo que he hecho, por su ejemplo de vida y fuerza, por su amor y comprensión, gracias!

A mis hermanos y familia: Pilar, Marilú, Judith, Imelda, Vicente y Carlos por su apoyo y por ser parte de mi familia.

A Luis por acompañarme durante estos dos años, por su apoyo incondicional, por brindarme su hombro en aquellos momentos tormentosos llenos de esfuerzo, cansancio y desesperación, por su comprensión, por su tiempo, por motivarme a ser una mejor persona, por recordarme que me ama y que la vida es bella, por su amor, amistad y cariño, gracias!

A Simón por su amistad sincera y hermandad, por su apoyo, por sus consejos, por escucharme en todo momento, por estar ahí siempre que lo necesito, por su confianza, por creer en mí, por su cariño y por ser un ejemplo de vida para mí y recordarme que los sueños se pueden lograr, gracias!

A Eder y Kira por formar un bonito equipo de trabajo lleno de apoyo incondicional, esfuerzo, dedicación, comprensión, confianza y compañerismo, acompañado de una amistad verdadera y cariño, porque además de haber sido mis compañeros, encontré unos grandes y buenos amigos y eso lo valoro mucho, y por haber hecho más ameno el camino, gracias, los voy a extrañar!

A Nora, Esther, Tsanda, Karla, Rick, y Rodo, que durante estos dos años compartimos muy buenos momentos, que además de haber conocido unos muy buenos compañeros de trabajo, encontré buenos amigos. Por apoyarnos siempre, por su amistad, por su confianza, por sus consejos y por permitirme conocerlos realmente, gracias chicos, los extrañaré!

Al responsable de este proyecto el Dr. Héctor, por todo su apoyo, por permitirme haber formado parte de su equipo de investigación, por creer y confiar en mí, por su paciencia, por despertarme el gusto por la investigación y enseñarme las bases de esta y permitirme aprenderle tanto, por ser uno de los mejores maestros que he tenido, y por ser un ejemplo en la investigación, gracias!

A la Dra. Carla por todo su apoyo, ayuda, paciencia, tiempo, dedicación y comprensión, por sus valiosas sugerencias, correcciones y observaciones que sin lugar a duda me ayudaron a mejorar el presente trabajo y por permitirme aprenderle un poco de la investigación, gracias!

A cada uno de mis sinodales: A la Dra. Lulú por su apoyo en todo momento, por permitirme llevar a cabo parte de lo experimental en su área de trabajo, por ayudarme a comprender un poco mejor su tema y ayudarme con cada duda que se me presentó, por sus observaciones, correcciones y acertadas sugerencias, muchas gracias! Al Dr. Chacón por toda su ayuda, por facilitarme equipo de trabajo así como material, reactivos y área de trabajo, por sus valiosas sugerencias, observaciones y correcciones, por su tiempo, paciencia y por su interés en el proyecto, gracias! A la Dra. Lupita y Dra. Rosa Elena por sus comentarios, acertadas sugerencias, correcciones y observaciones y por formar parte de mi mesa de comité, gracias!

A todos los que me apoyaron técnicamente: Christian, Benja, Beto, José Luis y Leslie muchas gracias por su ayuda, tiempo, paciencia, comprensión y amistad, cada uno de ustedes me ayudaron en la parte experimental de este trabajo, gracias!

A mis compañeras de laboratorio LJDA: Eunice, Jueth y Marce, por su apoyo, compañerismo, por las pláticas, consejos, gracias chicas!

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por formarme a lo largo de mi carrera. Agradezco el haber formado parte de esta casa de estudios.

Al PIMCB por permitirme realizar mis estudios y trabajo de investigación, además de formarme como investigadora, gracias!

A CONACYT por brindarme su apoyo en este proyecto de investigación, gracias!

“LA GRATITUD ES LA MEMORIA DEL CORAZÓN”

ÍNDICE

ÍNDICE	i
Lista de tablas	iii
Lista de figuras.....	iii
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Especies de <i>Opuntia</i>	1
1.2 Mucílago de nopal (<i>Opuntia</i>).....	4
1.2.1 Estructura química del mucílago.....	4
1.2.2 Producción y función del mucílago en la planta	5
1.2.3 Viscosidad del mucílago en función de la cantidad de agua.....	6
1.2.4 Viscosidad del mucílago en función del pH, iones Ca^{2+} y grado de esterificación	6
1.2.5 Contenido de fibra dietética en nopal.....	8
1.2.6 Composición química del mucílago de <i>Opuntia</i>	9
1.2.7 Propiedades funcionales del mucílago	9
1.3 Técnicas utilizadas para la caracterización química de mucílago de <i>Opuntia</i>	10
1.3.1 Cromatografía	10
1.3.1.1 Cromatografía de capa fina	11
1.3.1.2 Cromatografía de gases	11
1.3.1.3 Técnicas cromatográficas utilizadas para la caracterización química del mucílago de <i>Opuntia</i>	12
1.3.2 Espectroscopia de infrarrojo	16
1.3.2.1 Técnicas espectroscópicas de IR utilizadas para la caracterización química del mucílago de <i>Opuntia</i>	17
1.3.3 Compuestos de Calcio en <i>Opuntia</i>	19
1.3.4 Microscopía electrónica de barrido.....	20
1.3.4.1 Técnicas microscópicas (MEB) utilizadas para la caracterización química del mucílago de <i>Opuntia</i>	21
1.3.5 Resonancia magnética nuclear	22
1.3.5.1 Estudios de <i>Opuntia</i> por RMN ^{13}C	22
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVO.....	27
4.1 Objetivos específicos	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS	28
5.1 Material	28
5.2 Métodos.....	29
5.2.1 Metodología de cromatografía en capa fina.....	33
5.2.1.1 Prueba de temperatura de extracción	33
5.2.1.2 Prueba de tiempo de extracción	34
5.2.1.3 Prueba de proporción nopal/agua.....	34
5.2.1.4 Prueba de disolvente	34
5.2.1.5 Comparación de los cuatro métodos de extracción.....	34
5.2.2 Metodología de cromatografía de gases.....	37
5.2.3 Metodología para espectroscopia FTIR	39

5.2.4	Metodología para microscopía electrónica de barrido	39
5.2.5	Metodología para minerales	40
5.2.5.1	Espectroscopia de absorción atómica.....	40
5.2.5.2	Espectroscopia UV-Vis.....	41
5.2.6	Metodología para resonancia magnética nuclear ¹³ C.....	42
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1	Caracterización química.....	43
6.1.1	Cromatografía de capa fina	43
6.1.2	Cromatografía de gases	48
6.1.3	Espectroscopia FTIR.....	53
6.1.4	Minerales.....	54
6.1.4.1	Calcio	55
6.1.4.2	Calcio/Fósforo.....	57
6.1.4.3	Fósforo	57
6.1.4.4	Potasio	57
6.1.4.5	Magnesio	58
6.1.4.6	Sodio	58
6.1.4.7	Hierro	58
6.1.4.8	Zinc	58
6.1.4.9	Cobre	58
6.1.5	Microscopía electrónica de barrido	60
6.1.6	Resonancia magnética nuclear ¹³ C.....	63
6.2	Análisis bromatológico	67
6.2.1	Humedad	67
6.2.2	Cenizas	67
6.2.3	Proteína (nitrógeno total proteico)	67
6.2.4	Fibra dietética.....	68
6.2.5	Extracto etéreo (grasa)	68
6.2.6	Carbohidratos	69
7.	CONCLUSIONES	72
8.	BIBLIOGRAFÍA	73

Lista de tablas

Tabla 1. Distribución de cinco especies de <i>Opuntia</i> en Michoacán	2
Tabla 2. Valores medios de las variables morfométricas de especies de <i>Opuntia</i>	3
Tabla 3. Forma y altura de la planta de diferentes especies de <i>Opuntia</i>	3
Tabla 4. Composición de FD total, soluble e insoluble (%) de cladodios secos de diferentes especies de <i>Opuntia</i>	9
Tabla 5. Rendimientos de mucílago de cinco especies de <i>Opuntia</i> de Michoacán.	9
Tabla 6. Composición del mucílago de nopal (<i>Opuntia</i>) reportada por diferentes autores y técnicas utilizadas (%)	15
Tabla 7. Atribución de las principales bandas observadas en el espectro IR para los polisacáridos de la pectina del mucílago de la cáscara de la tuna (Habibi, 2004).....	18
Tabla 8. Asignaciones de las señales del espectro de la RMN ¹³ C del polisacárido de frutas de <i>O. ficus-indica</i> parcialmente hidrolizado.....	22
Tabla 9. Desplazamientos químicos de las señales del espectro de RMN ¹³ C del mucílago de la cáscara de la tuna	24
Tabla 10. Rotulado de placas CCF azúcares ácidos (ács. urónicos) y monosacáridos de la extracción de mucílago de <i>O. hyptiacantha</i> a 65, 75, y 83°C con y sin lavados, y CCF de los lavados del nopal, y de los estándares de azúcares	45
Tabla 11. Medias de la composición química de las seis especies de <i>Opuntia</i> (%).....	51
Tabla 12. Resultados de los minerales (Ca, K, Mg, P, Na, Fe, Zn y Cu) y relación Ca/P en las seis especies de <i>Opuntia</i>	55
Tabla 13. Microanálisis de <i>O. atropes</i>	61
Tabla 14. Microanálisis <i>O. tomentosa</i>	61
Tabla 15. Microanálisis <i>O. hyptiacantha</i>	61
Tabla 16. Microanálisis <i>O. joconostle</i>	62
Tabla 17. Microanálisis <i>O. streptacantha</i>	62
Tabla 18. Microanálisis <i>O. ficus-indica</i>	62
Tabla 19. Resultados del análisis bromatológico del mucílago de las seis especies de <i>Opuntia</i> (peso seco)	69

Lista de figuras

Figura 1. Presunta estructura del mucílago (<i>O. ficus-indica</i>)	5
Figura 2. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases (Fuente: Skoog <i>et al.</i> , 1992).	12
Figura 3. Espectro de absorbancia de espectroscopia de FTIR de la pectina de nopal y de una pectina comercial de un cítrico (Cárdenas <i>et al.</i> , 2007).....	18
Figura 4. Difracción de rayos-X de nopal en polvo (100 días) y el estándar de oxalato de Ca (Contreras-Padilla <i>et al.</i> , 2011).	20
Figura 5. Difracción de rayos-X de nopal en polvo en diferentes etapas de maduración (Contreras-Padilla <i>et al.</i> , 2011).	20
Figura 6. Imagen morfológica de drusa de oxalato de calcio de <i>O. ficus-indica</i> variedad redonda (Contreras-Padilla <i>et al.</i> , 2011).	21

Figura 7. Espectro de RMN ¹³ C de la pectina de <i>O. ficus-indica</i> en D ₂ O a 85 °C. El segundo espectro corresponde a una amplificación de la región 55-109 ppm (Cárdenas <i>et al.</i> , 2007).	23
Figura 8. Espectro de RMN ¹³ C del mucílago de la cáscara de la tuna (Habibi, 2004).	24
Figura 9. Espectro de RMN ¹³ C de dos fracciones de polisacáridos solubles en agua de cladodios de <i>Opuntia monacantha</i> (Zhao <i>et al.</i> , 2007).	25
Figura 10. Fotografías de las seis especies de <i>Opuntia</i>	28
Figura 11. Metodología para la caracterización química y análisis bromatológico <i>Opuntia</i> spp. ...	31
Figura 12. Método de extracción del mucílago de <i>Opuntia</i> (Método desarrollado por Rodríguez-González (2010) y modificado por Zavala-Mendoza (2012).	32
Figura 13. Pruebas de cromatografía líquida de capa fina (CCF), metodología obtenida de Ribeiro <i>et al.</i> (2010) realizada a muestras de mucílago de <i>O. hyptiacantha</i>	35
Figura 14. Comparación de cuatro métodos de extracción del mucílago de <i>O. hyptiacantha</i> usando la técnica de CCF de Ribeiro <i>et al.</i> (2010).	36
Figura 15. Metodología para hidrólisis del polisacárido del mucílago de <i>Opuntia</i> spp.	37
Figura 16. Metodología para cromatografía de gases del mucílago de <i>Opuntia</i> spp.	38
Figura 17. Cromatógrafo de gases.	39
Figura 18. Espectrofotómetro FTIR.	39
Figura 19. Microscopio electrónico de barrido.	40
Fig. 20. Espectrofotómetro de absorción atómica.	41
Fig. 21. Digestión de las muestras.	41
Figura 22. Espectrofotómetro UV-Vis.	41
Figura 23. Digestión y filtración de las muestras.	42
Figura 24. Espectrómetro de resonancia magnética.	42
Figura 25. Placas de CCF para azúcares ácidos (ács. urónicos) y monosacáridos de la extracción de mucílago de <i>O. hyptiacantha</i> a 65°, 75°, y 83 °C con y sin lavados, y CCF de los lavados del nopal, y de los estándares de azúcares.	45
Figura 26. Placa de CCF para monosacáridos de la extracción sin H ₂ O, con H ₂ O 1:1 y 1:2, y	46
Figura 27. Placa de CCF para monosacáridos de la extracción con H ₂ O,	46
Figura 28. Placa CCF para monosacáridos de la extracción con H ₂ O, etanol al 50 y 80% después de precipitar.	47
Figura 29. Placa CCF para ácidos urónicos de la extracción con H ₂ O, etanol al 50 y 80% después de precipitar.	47
Figura 30. Placa CCF para monosacáridos de la comparación de extracciones con etanol al 50, 80%, y los 2 métodos de extracción después de precipitar.	47
Figura 31. Perfil cromatográfico de los carbohidratos identificados en el mucílago de las seis especies de <i>Opuntia</i>	48
Figura 32. Resultados de arabinosa para las seis especies de <i>Opuntia</i>	49
Figura 33. Resultados de galactosa para las seis especies de <i>Opuntia</i>	49
Figura 34. Resultados de xilosa para las seis especies de <i>Opuntia</i>	50
Figura 35. Resultados de glucosa para las seis especies de <i>Opuntia</i>	50
Figura 36. Resultados de ramnosa para las seis especies de <i>Opuntia</i>	50
Figura 37. Resultados de ácidos urónicos para las seis especies de <i>Opuntia</i>	50
Figura 38. Espectro de IR de las seis especies de <i>Opuntia</i>	54
Figura 39. Anova y Tukey-Kramer de Ca.	59
Figura 40. Anova y Tukey-Kramer de P.	59
Figura 41. Anova y Tukey-Kramer de Mg.	59

Figura 42. Anova y Tukey-Kramer de Ca/P.	59
Figura 43. Anova y Tukey-Kramer de K.	59
Figura 44. Anova y Tukey-Kramer de Na.	59
Figura 45. Anova y Tukey-Kramer de Fe.	60
Figura 46. Anova y Tukey-Kramer de Zn.	60
Figura 47. Anova y Tukey-Kramer de Cu.	60
Figura 48. Cristales de calcio en <i>O. atropes</i>	61
Figura 49. Cristales de Ca en <i>O. tomentosa</i>	61
Figura 50. Cristales de Ca en <i>O. hyptiacantha</i>	61
Figura 51. Cristales de Ca en <i>O. joconostle</i>	62
Figura 52. Cristales de Ca en <i>O. streptacantha</i>	62
Figura 53. Cristales de Ca en <i>O. ficus-indica</i>	62
Figura 54. Espectro de de RMN ¹³ C del mucílago de las seis especies de <i>Opuntia</i>	65
Figura 55. Espectro de RMN ¹³ C del mucílago de <i>Opuntia ficus-indica</i> (control) con D ₂ O y NaOD (condiciones en las que se analizaron los mucílagos de las seis especies de <i>Opuntia</i> , en la parte de arriba) y mucílago hidrolizado con DCl (en la parte de abajo).....	65
Figura 56. Espectro de RMN ¹³ C de los siete azúcares pertenecientes a la estructura del mucílago de <i>Opuntia</i> con D ₂ O y NaOD (condiciones en las que se analizaron los mucílagos de las seis especies de <i>Opuntia</i>).	66
Figura 57. Espectro de RMN ¹³ C de los siete azúcares pertenecientes a la estructura del mucílago de <i>Opuntia</i> con D ₂ O.....	66
Figura 58. ANOVA y Tukey-Kramer de humedad.	70
Figura 59. ANOVA y Tukey-Kramer de cenizas.	70
Figura 60. ANOVA y Tukey-Kramer de proteína.	70
Figura 61. ANOVA y Tukey-Kramer de FD.	70
Figura 62. ANOVA y Tukey-Kramer de FS.....	70
Figura 63. ANOVA y Tukey-Kramer de FI.....	70
Figura 64. ANOVA y Tukey-Kramer de E.E.	71
Figura 65. ANOVA y Tukey-Kramer de carbohidratos.	71

1. ANTECEDENTES

1.1 Especies de *Opuntia*

Las especies de *Opuntia* fueron uno de los alimentos básicos de la dieta de los mexicanos en los tiempos pre-agriculturales. México es el principal productor de *Opuntia* contando con por lo menos 104 de las 200 especies reportadas en el mundo. Más de 50 de estas especies son usadas como alimento y materia prima para elaborar medicinas; 20 especies son cultivadas para producción de frutas y producción de insectos del género *Dactylopius* (Chávez-Moreno *et al.*, 2009, 2011).

Chávez-Moreno *et al.* (2009) señalan que el género *Opuntia* (Cacteaceae: *Opuntioideae*) incluye 250 especies de acuerdo a Britton y Rose (1963), 181 según Anderson (2001) y 195 documentadas por Hunt y Taylor (2002), todas estas distribuidas en el continente americano. En México se encuentran un total de 104 especies de *Opuntia*, de acuerdo a Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1978); pero según Guzmán *et al.* (2003) son sólo 83 y cerca de la mitad de estas especies del género son endémicas (Britton y Rose 1963; Anderson, 2001).

En el estado de Michoacán se han registrado 20 especies de *Opuntia* ya sea silvestres y/o cultivados (Segura *et al.*, 2009; SIAP, 2009). Entre las silvestres se han identificado: *O. atropes*, *O. hyptiacantha*, *O. joconostle*, *O. streptacantha* y *O. tomentosa* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978), las cuales han sido poco estudiadas, pero representan un gran potencial para su estudio y caracterización ya que podrían traer grandes beneficios tecnológicos, económicos, sociales y culturales (Sáenz *et al.*, 2006). Zavala-Mendoza (2012) localizó estas cinco especies en poblaciones del estado de Michoacán las cuales se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. Distribución de cinco especies de *Opuntia* en Michoacán

Especie	Municipio	Localidad	Altitud (m. s. n. m.)	Latitud Norte	Latitud Oeste
<i>O. atropes</i>	Morelia	Camino hacia las Flores	2224	19° 42' 56''	101° 16' 17''
	Morelia	Lado noreste del Cerro del Águila, subiendo al poblado de San Nicolás de Obispo	2370	19° 37' 50''	101° 20' 00''
<i>O. hyptiacantha</i>	Cuto del porvenir	Carretera Morelia-Cuto del porvenir	1949	19° 50' 18''	101° 9' 43''
<i>O. joconostle</i>	Cuto del porvenir	Carretera Morelia-Cuto del porvenir	1949	19° 50' 18''	101° 9' 43''
<i>O. streptacantha</i>	Morelia	Morelia, Ciudad jardín	2177	19° 42' 57''	101° 15' 51''
	Cuto del porvenir	Carretera Morelia-Cuto del porvenir	1949	19° 50' 18''	101° 9' 43''
<i>O. tomentosa</i>	Morelia	Camino hacia las Flores	2224	19° 42' 56''	101° 16' 17''
	Morelia	Lado noroeste del Cerro del Águila	2315	19° 38' 07''	101° 20' 18''
	Tiripetío	Entrada a Tiripetío	2017	19° 32' 36''	101° 20' 40''

(Fuente: Zavala-Mendoza, 2012).

La identificación de cada especie se realizó por caracteres cualitativos y cuantitativos morfológicos de cladodios de 2 a 3 años de edad, además de la forma y altura de la planta. Entre los caracteres cualitativos están: la forma del cladodio, forma y color del fruto, color de la flor, la forma de las espinas y color de las glóquidas. Y los cuantitativos: caracteres morfométricos básicos como: largo, ancho (inferior, medio, superior) y espesor del cladodio (Zavala-Mendoza, 2012), los cuales se muestran en la Tabla 2, donde se puede ver que el valor de lo largo de las especies *O. tomentosa* (34.06 cm), *O. hyptiacantha* (34.14 cm) y *O. streptacantha* (34.7 cm) es mayor ($P \leq 0.05$) que las demás, mientras que el valor de *O. joconostle* (23.76 cm) es el menor en cuanto al grosor. En cuanto a lo ancho en la parte inferior y media de la penca, *O. streptacantha* fue la más ancha, y en la parte superior *O. streptacantha*, *O. joconostle* y *O. atropes* fueron las de mayor ($P \leq 0.05$) longitud. Por otra parte, no hubo efecto de especie en el grosor de la penca, ya que los valores fueron estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$) entre las cinco especies.

Por su parte, los parámetros morfológicos son los que se usan para la clasificación taxonómica de las especies del género *Opuntia* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978). La forma y altura de cada una de las cinco especies mencionadas se muestra en la Tabla 3. A excepción de *O. atropes* que es arbustiva, todas las especies estudiadas son arbóreas y tienen de 3 a 5 m de altura.

Tabla 2. Valores medios de las variables morfométricas de especies de *Opuntia*

Especie	Largo (cm)	Ancho (cm)			Espesor (mm)
		Inferior	Medio	Superior	
<i>O. tomentosa</i>	34.06 ^a	6.20 ^c	9.70 ^d	9.06 ^b	9.86 ^a
<i>O. atropes</i>	24.89 ^b	9.80 ^b	13.26 ^c	11.11 ^a	11.51 ^a
<i>O. hyptiacantha</i>	34.14 ^a	6.35 ^c	13.06 ^c	7.12 ^c	9.1 ^a
<i>O. streptacantha</i>	34.7 ^a	12.14 ^a	18.54 ^a	12.22 ^a	12 ^a
<i>O. joconostle</i>	23.76 ^c	10.76 ^b	15.77 ^b	11.73 ^a	11.43 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre las medias de cada especie, Tukey-Kramer HSD ($P \leq 0.05$), Fuente: Zavala-Mendoza (2012).

Tabla 3. Forma y altura de la planta de diferentes especies de *Opuntia*

Especie	Tipo de planta
<i>O. tomentosa</i>	Arbórea 3 a 5 m de altura. Ramas abundantes formando copa amplia.
<i>O. atropes</i>	Arbustiva de 1 a 3 m de alto. Muy ramificada.
<i>O. hyptiacantha</i>	Arbórea de hasta 4 m de altura. Muy ramificada.
<i>O. streptacantha</i>	Arbórea de hasta 5 m de altura. Ramas abundantes formando copa amplia.
<i>O. joconostle</i>	Arbórea de hasta 5 m de altura. Ramas abundantes formando copa amplia.

Fuente: Zavala-Mendoza (2012).

De las diferentes especies de *Opuntia*, una de las más cultivada y estudiada en el mundo ha sido *O. ficus-indica* (Ruiz y Guerrero, 2009); se ha reportado el uso del mucílago de esta especie para la obtención de películas comestibles (Abraján, 2008), además de su empleo como aditivos mejoradores de la textura en los alimentos (Álvarez *et al.*, 2007; Ruiz y Guerrero, 2009) así como espesante, gelificante y emulsificante (Álvarez *et al.*, 2007 y Rodríguez-González, 2010).

1.2 Mucílago de nopal (*Opuntia*)

1.2.1 Estructura química del mucílago

El mucílago excretado de la penca de nopal es un componente de la fibra dietética (FD) (Gibson y Nobel, 1990), y constituye aproximadamente el 14% del cladodio en peso seco (Ginestra *et al.*, 2009). El mucílago del nopal es un polisacárido fibroso y ácido (pH =4.5 a 5.7) (Chávez *et al.*, 2010), altamente ramificado con azúcares. Cada molécula de mucílago de *O. ficus-indica* puede contener más de 30,000 subunidades de azúcar, o residuos (Gibson y Nobel, 1990), y su peso molecular es de 3×10^6 g/mol (Cárdenas *et al.*, 1997; Ruiz y Guerrero, 2009). Los azúcares de 5 ó 6 carbonos son los más abundantes, e incluyen arabinosa, galactosa, ramnosa, y xilosa. El mucílago también contiene una considerable cantidad de ácidos urónicos, los cuales son azúcares carboxilados. La molécula de mucílago tiende a estar cargada negativamente, ya que los iones hidrógeno pueden disociarse de la parte carboxílica, de las subunidades galacturónicas (Gibson y Nobel, 1990).

De acuerdo con Gibson y Nobel (1990) el mucílago contiene arabinosa (35-40%), galactosa (20-25%), xilosa (20-25%), ramnosa (7-8%) y ácido galacturónico (7-8%); estas proporciones pueden variar de acuerdo a la especie de nopal, edad, condiciones ambientales y método de extracción del mucílago (Abraján, 2008). Con base a la composición de azúcares mencionada y la evidencia química disponible, McGarvie y Parolis (1981a) propusieron un modelo hipotético de este polímero. En la Figura 1 se muestra que para una unidad repetida de mucílago de *O. ficus-indica* las 20 cadenas de los lados (R_1 - R_{20}) contienen un total cerca de 15 residuos de xilosa y 25 residuos de arabinosa (Gibson y Nobel, 1990; McGarvie y Parolis, 1981a).

El esqueleto de la molécula de mucílago consiste de residuos alternados de ramnosa y ácido galacturónico. En cada residuo de ramnosa se encuentran unidas cadenas laterales conteniendo tres residuos de galactosa. A su vez, en cada galactosa puede estar unido un residuo de arabinosa (R_1) y xilosa (R_2); generalmente uno o dos residuos de arabinosa se unen a la galactosa. Un residuo de xilosa se une ya sea a galactosa o a arabinosa. Algunas cadenas de galactosa tienen unidas a los lados arabinosa pero no xilosa, y algunas tienen una xilosa con dos residuos de arabinosa. Por lo tanto, el mucílago es un heteropolisacárido; es un ramnogalaturonano unido a un arabinogalactano (Gibson y Nobel, 1990; McGarvie y Parolis,

1981a). Esta estructura representa sólo una pequeña porción de molécula del mucílago, porque la unidad representada en la Figura 1 es repetida 500 veces (Gibson y Nobel, 1990). El mucílago de otras especies de *Opuntia* está compuesto por los mismos residuos de azúcares, pero en diferentes porcentajes que *O. ficus-indica* (Gibson y Nobel, 1990).

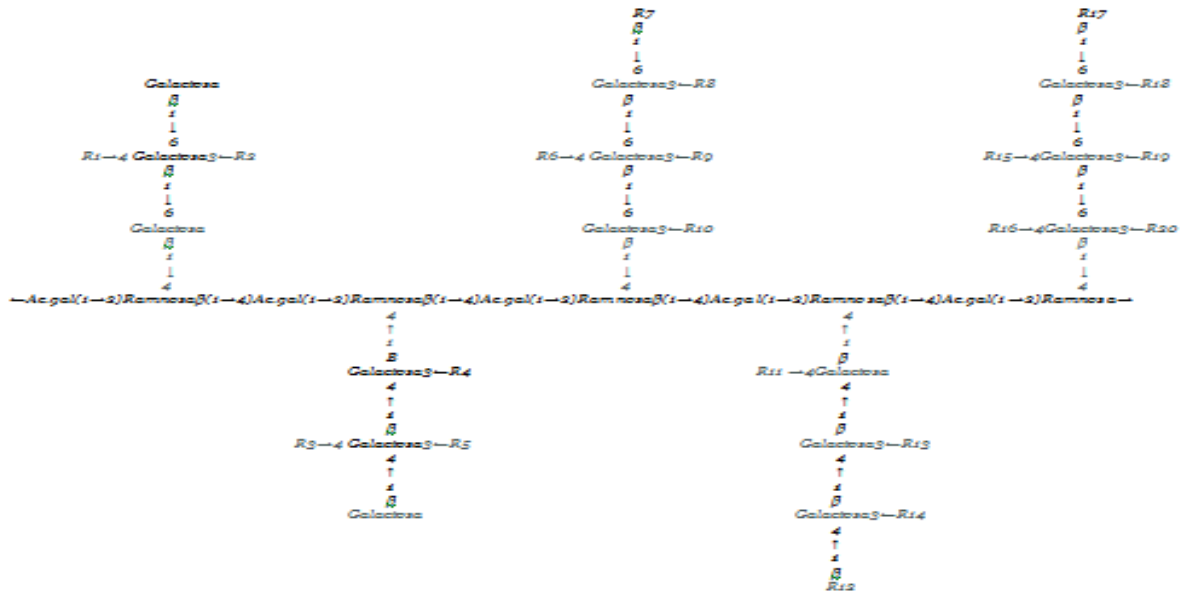


Figura 1. Presunta estructura del mucílago (*O. ficus-indica*)

Fuente: Gibson y Nobel (1990); McGarvie y Parolis (1981a).

1.2.2 Producción y función del mucílago en la planta

Las células del nopal que contienen mucílago se encuentran tanto en el clorénquima, que forma parte del interior de los cladodios y es donde se lleva a cabo la fotosíntesis, como en el parénquima medular blanco cuya función principal es el almacenamiento de agua (Sáenz *et al.*, 2004; Chávez *et al.*, 2010).

La producción de mucílago en la planta se ve influenciado por el manejo del cultivo, la temperatura, el suelo, el riego y la lluvia. El contenido de mucílago de cladodios aumenta durante la aclimatación a bajas temperaturas. Sin embargo, también se ha observado que aumenta en su

respuesta a la sequía, esto se puede atribuir a la propiedad protectora en la planta misma (Sáenz *et al.*, 2004).

Por otra parte, Goycoolea y Cárdenas (2003) reportaron que el mucílago es un tipo de pectina de bajo grado de metoxilo, la cual se produce en la pared celular y puede ser extraído por medio de un suave proceso alcalino ayudada con un agente quelante.

El grado de metilación (GM) se define como el número de moles de metanol por cada 100 moles de ácido galacturónico. Las pectinas son llamadas de alto metoxilo, cuando el valor de GM es de 50 o más alto. Mientras que cuando el GM es inferior a 50, la pectina es de bajo metoxilo. El grado de acetilación (GAC) se define como el porcentaje de residuos galacturonosil esterificados con un grupo acetilo. Este valor es generalmente bajo en pectinas nativas, y oscila entre 3 y 15%. El origen botánico y el procedimiento de extracción de las pectinas determina su contenido de ácido galacturónico, el GM, y el GAC (los grupos carboxílicos pueden ser parcialmente esterificados con metanol, y en ciertas pectinas los grupos hidroxilos pueden ser parcialmente acetilados) (Goycoolea y Cárdenas, 2003; Cárdenas *et al.*, 2007).

1.2.3 Viscosidad del mucílago en función de la cantidad de agua

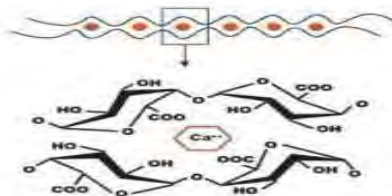
La viscosidad del mucílago varía en función de la cantidad de agua que reciben las plantas. La tierra que es extremadamente seca produce un jugo de *Opuntia* más viscoso que el de una tierra semi-árida. Por lo tanto, la viscosidad del jugo de *Opuntia* será mayor en una planta que crece en las zonas donde llueve poco en comparación con otro cultivo de un área de lluvia normal. Este es un factor importante del comportamiento a tener en cuenta para la obtención del mucílago usado en la industria tanto alimentaria como farmacéutica (Sáenz *et al.*, 2006).

1.2.4 Viscosidad del mucílago en función del pH, iones Ca^{2+} y grado de esterificación

La viscosidad intrínseca del mucílago depende fuertemente del pH y de la concentración de cationes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) indicando que la molécula es un polielectrolito cargado negativamente. El incremento del pH en la región ácida del mucílago en solución causa un aumento en la viscosidad intrínseca, debido a que los grupos carboxilos de la cadena polimérica se ionizan y esto provoca que haya repulsión entre las cargas negativas de la cadena, por lo tanto, ésta se expande, por lo que ocupa más espacio y se hace más resistente a fluir a través de las moléculas del H_2O (Trachtenberg y Mayer, 1982a).

Por otro parte, la alta viscosidad en H_2O , sin la presencia de iones Ca^{2+} puede ser atribuida al hecho de que las cargas negativas de la cadena son expuestas causando una fuerte repulsión intramolecular provocando la expansión de las moléculas e induciendo aparentemente rigidez. Mientras que la presencia de cationes disminuye la viscosidad, y es más pronunciado con cationes divalentes que con monovalentes, principalmente Ca^{2+} y Mg^{2+} , sin embargo, la molécula del mucílago tiene una especial afinidad por el Ca^{2+} , ya que la adición de iones Ca^{2+} neutraliza las cargas negativas, reduciendo la repulsión y rigidez de las moléculas (Trachtenberg y Mayer, 1982a). De igual manera, Goycoolea y Cárdenas (2003), observaron pérdida de la viscosidad de la pectina de *Opuntia* en presencia de cationes divalentes (Ca^{2+}). No obstante, también se señala que esta interacción conduce a un aumento masivo de la viscosidad y formación de gel y no a una reducción de la viscosidad tal como se mencionó anteriormente (Goycoolea y Cárdenas, 2003). Lo anterior se debe a que la interacción con Ca^{2+} causa la formación de pequeños volúmenes hidrodinámicos en solución y geles fuertes con menos contenido de agua, mientras que la ausencia de Ca^{2+} aumenta los volúmenes hidrodinámicos de las moléculas y forma geles de alto contenido de agua y baja resistencia mecánica (Trachtenberg y Mayer, 1982a). El origen molecular de la gelificación de la pectina de nopal de bajo metoxilo con calcio es debido a las interacciones del Ca^{2+} con los grupos carboxílicos formando la llamada “caja de huevo”, en la cual cada dos grupos carboxílicos presentes en dos cadenas poligalacturónicas forman complejos de coordinación con iones Ca^{2+} . De esta forma, los complejos de coordinación formados con estos cationes divalentes coadyuvan a la gelificación de la pectina (Goycoolea y Cárdenas, 2003).

De acuerdo con Sáenz *et al.* (2004) el mucílago es un polímero tipo pectina de bajo grado de esterificación, con capacidad para formar geles a pH neutro en presencia de calcio, mediante un doble mecanismo que involucra el entrecruzamiento iónico con Ca^{2+} en ensamblados diméricos tipo “caja de huevos” y una segunda red termorreversible gobernada por estructuras helicoidales tipo 3. Y en ausencia de calcio pierde la capacidad para formar geles.



Cárdenas *et al.* (2008) reportaron que dependiendo del grado de esterificación (GE) (expresado convencionalmente como un porcentaje del contenido de unidades esterificadas en

comparación con el contenido de ácidos urónicos totales), las pectinas pueden formar redes de gel ya sea en un medio ácido y en altas concentraciones de azúcares (pectinas de alto GE, más del 50%) o por interacción con cationes divalentes, en particular Ca^{2+} (pectinas de bajo GE, menos del 50%); en estos geles las macromoléculas están unidas por iones calcio divalentes. En ambos casos, la gelificación y propiedades reológicas dependerá de muchos factores, incluyendo el pH, temperatura, GE, contenido de azúcar, calcio y pectina.

Por otra parte, Trachtenberg y Mayer. (1982b) determinaron histológicamente la localización subcelular del calcio soluble en las células parenquimatosas y en el mucílago de nopal. En este estudio se analizaron los cristales de oxalato de calcio, el calcio soluble de las células del mucílago de la especie *Opuntia ficus-indica*; observaron calcio soluble en las cámaras de cristal que contienen oxalato de calcio en la membrana de las vesículas, calcio presente en la membrana plasmática, en plasmodesmos, en las paredes celulares, en las mitocondrias y en las vacuolas, especialmente calcio soluble en vesículas libres o condensado con el plasmalema, y poco calcio libre en otros compartimentos de la célula. Finalmente, proponen que los idioblastos podrían jugar un papel importante en la economía del calcio de los tejidos de la localización de calcio soluble y el transporte de calcio y oxalato de calcio de las células de mucílago a las células parenquimatosas y viceversa. La quelación de calcio por el mucílago u oxalato, depende del pH, fuerza iónica, etc. (Trachtenberg y Mayer 1982b).

1.2.5 Contenido de fibra dietética en nopal

El contenido de FD depende de algunos factores como la variedad y la edad de la planta en el período de cosecha, el suelo y el clima (Ribeiro *et al.*, 2010). Zavala-Mendoza (2012) realizó un análisis de fibra dietética (FD) de cinco especies de *Opuntia*, y encontró que *O. hyptiacantha* es la especie con mayor porcentaje de FD total (69.36%) en comparación con las otras cuatro especies, sin embargo, *O. tomentosa* es la que tiene mayor cantidad de fibra soluble (FS) 17.61% que es la que corresponde al mucílago de nopal, y también presenta un alto contenido de FD (52.27%) (Tabla 4). Al realizar Zavala-Mendoza (2012) la extracción de mucílago de las cinco especies, se observó mayor rendimiento de extracción del mucílago en *O. tomentosa* (Tabla 5).

Tabla 4. Composición de FD total, soluble e insoluble (%) de cladodios secos de diferentes especies de *Opuntia*.

Especie	Fibra soluble	Fibra insoluble	Fibra dietética total
<i>Opuntia atropes</i>	16.41 ^a	23.21 ^c	39.62 ^d
<i>O. hyptiacantha</i>	14.20 ^{ab}	55.15 ^a	69.36 ^a
<i>O. joconostle</i>	6.36 ^c	37.28 ^b	43.64 ^c
<i>O. streptacantha</i>	11.48 ^b	35.01 ^b	46.49 ^c
<i>O. tomentosa</i>	17.61 ^a	34.66 ^b	52.27 ^b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre las medias de cada especie, Tukey-Kramer HSD (P<0.05) (Tomado de Zavala-Mendoza, 2012).

Tabla 5. Rendimientos de mucílago de cinco especies de *Opuntia* de Michoacán.

Especie	Gramos	Rendimiento (%)
<i>Opuntia atropes</i>	2.4	0.8
<i>O. hyptiacantha</i>	2.11	0.703
<i>O. joconostle</i>	5.066	1.689
<i>O. streptacantha</i>	1.31	0.437
<i>O. tomentosa</i>	5.543	1.848

(Fuente: Zavala-Mendoza, 2012).

1.2.6 Composición química del mucílago de *Opuntia*

En la composición química del mucílago de nopal en peso seco (*O. ficus-indica*) reportado por Rodríguez-González (2010) indica que el mucílago *O. ficus-indica* en polvo posee una humedad de 9.31%, este valor es mayor que lo reportado por Sepúlveda *et al.* (2007) de 5.6%. Sin embargo, los valores de cenizas (11.91%) reportados por Rodríguez-González (2010) fueron menores que los reportados por Sepúlveda *et al.* (2007) de 37.3%. Por otra parte, el porcentaje de proteína es muy similar en ambos estudios 6.69% y 7.3%. Finalmente, en Rodríguez-González (2010) el porcentaje de FD es más del 57.83%, del cual el 56.80% corresponde a FS, el 2.51% equivale a pectina, y sólo el 1.03% es FI.

1.2.7 Propiedades funcionales del mucílago

El mucílago es un compuesto importante para la industria de alimentos (Sepúlveda *et al.*, 2007) porque tiene la capacidad de formar redes moleculares y retener fuertemente grandes cantidades de agua (Ruiz y Guerrero, 2009). De esta manera modifica las propiedades de viscosidad y

elasticidad, es un buen gelificante, espesante y emulsificante (Álvarez *et al.*, 2007). Además, controla la cristalización, estabiliza las suspensiones, inhiben la sinéresis, puede usarse como película comestible, sustituto de grasas en diversos alimentos y agente ligante del sabor (Abraján, 2008), o en la obtención de aditivos mejoradores de la textura en los alimentos (Álvarez *et al.*, 2007; Ruiz y Guerrero, 2009). Debido a su conformación polimérica y sus propiedades reológicas, los mucílagos representan compuestos de gran interés para la investigación y el desarrollo de productos en el sector industrial de alimentos.

Además, es de gran interés para la investigación médica, debido a sus propiedades funcionales, ya que su mayor contenido es FS, por lo tanto, ayuda al buen funcionamiento del intestino, asimila grasas, colesterol, glucosa y sustancias biliares, cumpliendo un papel en la prevención y tratamiento de enfermedades crónico degenerativas, como desórdenes gastrointestinales, obesidad, enfermedad coronaria, diabetes y cáncer de colon (Álvarez *et al.*, 2007).

1.3 Técnicas utilizadas para la caracterización química de mucílago de *Opuntia*

Las técnicas más utilizadas para la caracterización química del mucílago de nopal son cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) y la cromatografía de gases (CG), aunque se han utilizado algunas otras como cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía en columna de intercambio iónico o de exclusión de tamaño, espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (FTIR), microscopía electrónica de barrido (MEB), espectroscopía de absorción atómica, espectroscopía UV/Vis., difracción de rayos-X y resonancia magnética nuclear (RMN).

1.3.1 Cromatografía

La cromatografía es un método de separación y caracterización de mezclas complejas. En todos los tipos de cromatografía, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente

(Skoog *et al.*, 1992). Esta separación se puede realizar en función de sus cargas, masas, tamaños moleculares, la polaridad de sus enlaces y sus potenciales redox (Bautista *et al.*, 2010).

Debido a que los carbohidratos son moléculas hidrosolubles, fuertemente polares y no volátiles, no son separados con facilidad por los métodos de rutina disponibles, ya que no son cromóforos y no logran ser detectados mediante la espectroscopía de absorción. Por lo anterior, la derivatización de los carbohidratos es un proceso que se utiliza para transformar el analito por una reacción química a un derivado más fácil de analizar. Si los carbohidratos serán analizados por GC, éstos se derivan para hacerlos más volátiles y no tener que usar temperaturas tan altas en el puerto de inyección del cromatógrafo que pueda descomponerlos. Se han desarrollado diversas técnicas de derivatización que incluyen: la formación de alquil-éteres o alquil-ésteres, así como una trimetil-sililación para obtener derivados volátiles estables. En el caso de un análisis por CLAE acoplado a un detector de índice de refracción, la muestra no es necesario derivatizarla y por lo tanto se utiliza con mayor frecuencia. Por otra parte, los métodos cromatográficos acoplados a espectrómetro de masas son una buena alternativa para el análisis de carbohidratos, debido a su alta sensibilidad y precisión (Bachmann, 2007).

1.3.1.1 Cromatografía de capa fina

Para una cromatografía de capa delgada (CCF) se emplea una capa plana y relativamente delgada de un material que a su vez es el soporte, o bien que recubre una superficie de vidrio, plástico o metálica. La fase móvil se mueve a través de la estacionaria por capilaridad, y los componentes son separados debido a su PM y al proceso conocido como partición, de tal manera que unos componentes se desplazan con mayor o menor factor de retardo (R_f) (Gómez *et al.*, 2010).

1.3.1.2 Cromatografía de gases

En la cromatografía de gases (CG), la muestra se inyecta al puerto de inyección de un CG, donde se volatiliza y entra a la cabeza de una columna cromatográfica en forma gaseosa. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte. La fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna (Skoog *et al.*, 1992). Los componentes de la muestra (analitos) son separados unos de otros en base a sus presiones relativas de vapor, afinidades y solubilidades en la temperatura dada, con la fase estacionaria (McNair y Miller, 1997).

La CG es un sistema compuesto principalmente de gas portador, sistema de inyección de muestra, columna, y detector (Fig. 2) (Skoog *et al.*, 1992).

Existen dos tipos de cromatografía de gases (CG):

Cromatografía gas-sólido (CGS): Se produce la retención de los analitos en una fase estacionaria sólida como consecuencia de la adsorción física.

Cromatografía gas-líquido (CGL): La cromatografía gas-líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. Esta es la que se usa más ampliamente (Skoog *et al.*, 1992).

La muestra es inyectada, y transportada a través de la columna por un gas inerte, donde es retenido el material a diferentes tiempos, de acuerdo a la naturaleza de la muestra, los componentes de la muestra son separados unos de otros en base a su PM, saliendo primero de la columna los compuestos más ligeros, entonces, estos son detectados y registrados a través de un software (Fig. 2).

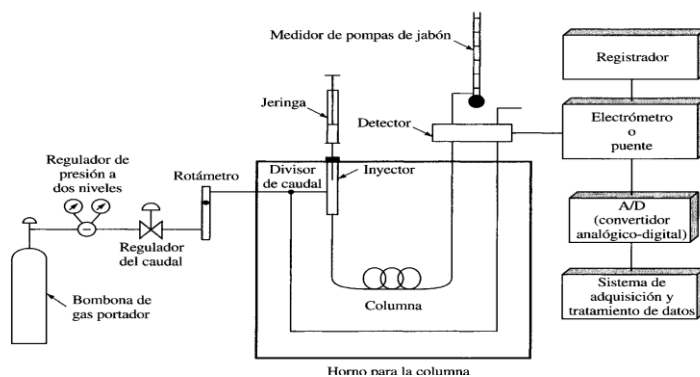


Figura 2. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases (Fuente: Skoog *et al.*, 1992).

1.3.1.3 Técnicas cromatográficas utilizadas para la caracterización química del mucílago de *Opuntia*

La composición de *Opuntia dillenii* fue reportada por Srivastava *et al.* (1974) en la cual sólo se identificó galactosa y arabinosa. Un año después Saag *et al.* (1975) identificaron los azúcares presentes en *Opuntia* sp. por cromatografía de papel donde encontraron la presencia de dos azúcares más (ramnosa, y xilosa), además de unidades de ácidos urónicos, de igual manera, Paulsen y Lund (1979) identificaron los mismos azúcares por CG y CGL. Posteriormente, en 1981(a) McGarvie y Parolis reportaron la misma composición para *Opuntia ficus-indica*:

galactosa con un 18.4%, arabinosa con 42.4%, xilosa con 24.5%, ramnosa con 6.4% y ácidos urónicos con 8.4%. Trachtenberg y Mayer (1981) también encontraron la presencia de estos azúcares en la misma especie por cromatografía de capa fina (CCF) y cromatografía de gases (CG). El rango de los porcentajes de los azúcares de acuerdo a los autores anteriores y a Nobel *et al.* (1992) fue de: 21-40.1% de galactosa; 7-13.1% de ramnosa; 24.6-42% de arabinosa; 22-22.2% de xilosa y 8-12.7% de ácido galacturónico. McGarvie y Parolis (1981a y 1981b) también encontraron estos componentes en *O. ficus-indica*, sin embargo, los mismos autores, en ese año, en un estudio diferente con la misma especie, reportaron la ausencia de ramnosa y ácidos urónicos. Sáenz *et al.* (1993) en *Opuntia* sp. no identificaron la presencia de xilosa. Por su parte, Molina-Torres *et al.* (2000) también identificaron la presencia de estos cinco azúcares por CLAE: galactosa (17.92%), arabinosa (46.68%), xilosa (23.45%), ramnosa (6.76%), y ácidos urónicos (5.19%); de igual manera Goycolea y Cárdenas (2003) reportaron la presencia de: galactosa (20.99%), arabinosa (17.93%), xilosa (3.06%), ramnosa (1.75%) y ácidos urónicos (11%), así como Arizmendi (2004) quien reportó galactosa (18%), ramnosa (7%), arabinosa (47%), xilosa (23%) y ácidos urónicos (5%). Más tarde, Matsuhira *et al.* (2006, por CLAE y CGL) y Cárdenas *et al.* (2007, por CGL), reportaron un porcentaje de galactosa de 7% y arabinosa de 6% como los principales azúcares predominantes de tipo neutros, con una menor presencia de ramnosa (0.6%) y xilosa (1%), y un gran porcentaje de ácidos urónicos (85.4%). Finalmente, Magoloni (2007) caracterizó químicamente los azúcares del mucílago de nopal por CCF y CG, con la finalidad de observar si el mucílago de nopal estaba siendo utilizado como aglutinante orgánico en las pinturas murales del Templo Rojo, en Cacaxtla (Tlaxcala, México). La cromatoplaque de la muestra de la pintura mural fue igual a la de testigo, confirmando que el aglutinante contenido en las muestras de pintura es un polisacárido similar al mucílago de nopal. Por otra parte, se analizó el extracto de la pintura por cromatografía de gases y se utilizaron los cuatro azúcares que constituyen el polisacárido del mucílago como testigos: galactosa, arabinosa, xilosa y ramnosa, y se obtuvo un cromatograma que muestra la presencia de los mismos cuatro azúcares característicos de mucílago.

Aparte de los cuatro azúcares mencionados anteriormente y de los ácidos urónicos, también se han identificado glucosa, fructosa, fucosa y manosa; de acuerdo a la caracterización de Zhong *et al.* (2010) por CLAE/CPG que además de arabinosa y ramnosa, también identificó la presencia de glucosa. De igual manera Habibi (2004) identificó por CLAE la presencia de

galactosa (23.5%) y arabinosa (32.7%), y una proporción menor de ramnosa (4.2%), xilosa (4.5%), y ácidos urónicos (14.2%), además de glucosa (1.5%) en el mucílago extraído de la cáscara de la tuna. La presencia de residuos de ácidos urónicos en el extracto crudo, confiere a las moléculas una carga iónica determinada. Esta carga es probable que interactúe con un medio iónico, es por eso que Habibi (2004) purificó el mucílago por cromatografía de intercambio de iones. Los resultados indicaron que el mucílago está constituido principalmente de una fracción aparentemente neutra, que no fue retenida por el soporte. Esta fracción, a la que llamó MP1, con un peso de 55.2%, se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Biogel P6 para encontrar posibles oligosacáridos. Posteriormente, con el fin de apreciar la homogeneidad de la fracción MP1 recuperado, fue analizado por cromatografía de exclusión estérico de alto rendimiento, el cual indica una buena homogeneidad del polisacárido.

Por otra parte, Ginestra *et al.* (2009) son los autores que más azúcares han reportado para *O. ficus-indica* ya que además de los cuatro azúcares y ácidos urónicos reportados por otros autores, también encontraron glucosa, fucosa y manosa. Ribeiro *et al.* (2010) encontraron además glucosa y fructosa, pero reportaron la ausencia de ramnosa por medio de CLAE y CCF. Majdoub *et al.* (2010) identificaron por CG además de galactosa (27.8%), ramnosa (10.2%), arabinosa (25%), xilosa (25.3%) y ácidos urónicos (10.3%) también glucosa (1.3%) y manosa (0.1%) en *O. ficus-indica*. Y para *O. litoralis*: galactosa (27.6%), ramnosa (10.3%), arabinosa (24.4%), xilosa (29.7%), ácidos urónicos (7.6%) y glucosa (0.4%), pero en esta especie no se encontró presencia de manosa (Tabla 6).

Tabla 6. Composición del mucílago de nopal (*Opuntia*) reportada por diferentes autores y técnicas utilizadas (%)

Autor	Especie	Peso Molecular	Gal	Ara	Xil	Ram	Ácidos Urónicos	Glu	Fru	Fuc	Man	Técnica de análisis
1974 Srivastava <i>et al.</i>	<i>Opuntia dillenii</i>		+	+								
1975 Saag <i>et al.</i>	<i>Opuntia sp.</i>		+	+	+	+	+					Cromatografía de papel
1979 Paulsen y Lund	<i>Opuntia sp.</i>		+	+	+	+	+					CG, CGL
1981a McGarvie y Parolis	<i>O. ficus-indica</i>		18.4	42.4	24.5	6.4	8.4					
1981b McGarvie y Parolis	<i>O. ficus-indica</i>		+	+	+							
1981 Trachtenberg y Mayer	<i>O. ficus-indica</i>	4.3×10 ⁶	40.1	24.6	22.2	13.1	12					CCF, CG
1992 Nobel <i>et al.</i>	<i>Opuntia sp.</i>		21	42	22	7	8					
1993 Sáenz <i>et al.</i>	<i>Opuntia sp.</i>		+	+		+	+					
1997 Cárdenas <i>et al.</i>	<i>O. ficus-indica</i>	3×10 ⁶										CLAE y Cromatografía de exclusión de tamaño
2000 Medina-Torres <i>et al.</i>	<i>O. ficus-indica</i>	2.3×10 ⁴	17.92	46.68	23.45	6.76	5.19					CLAE
2003 Goycoolea y Cárdenas	<i>O. ficus-indica</i>		20.99	17.93	3.06	1.75	11					
2004 Arizmendi	<i>O. ficus-indica</i>		18	47	23	7	5					
2004 Habibi	<i>O. ficus-indica</i>		23.5	32.7	4.5	4.2	14.2	1.5				CLAE, Cromatografía de intercambio de iones y cromatografía de exclusión de tamaño
2006 Matsuhiro <i>et al.</i>	<i>O. ficus-indica</i>		+	+	+	+	+					CLAE, CGL
2008 Cárdenas <i>et al.</i>	<i>O. ficus-indica</i>		7	6	1	0.6	85.4					CGL
2007 Magoloni	<i>O. ficus-indica</i>		+	+	+	+						CCF y CG
2009 Ginestra <i>et al.</i>	<i>O. ficus-indica</i>		+	+	+	+	+	+		+	+	CLAE
2010 Ribeiro <i>et al.</i>	<i>O. ficus-indica</i>		+	+	+		+	+	+			CCF y CLAE
2010 Majdoub <i>et al.</i>	<i>O. ficus-indica</i>	6.1 x 10 ⁶	27.8	25	25.3	10.2	10.3	1.3			0.1	CG
	<i>O. littoralis</i>	2.0 x 10 ⁷	27.6	24.4	29.7	10.3	7.6	0.4				

Gal: Galactosa, Ram: Ramnosa, Ara: Arabinosa, Xil: Xilosa, Glu: Glucosa, Fru: Fructosa, Fuc: Fucosa y Man: Manosa.

CCF: Cromatografía de capa fina, CG: Cromatografía de gases, CLAE: Cromatografía líquida de alta eficacia, CGL: Cromatografía de gases-líquidos y CGP: Cromatografía de premiación en gel.

1.3.2 Espectroscopia de infrarrojo

La espectroscopia infrarroja (IR) se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y, posiblemente, el acoplamiento vibracional (Espectrometria.com).

Los espectros de adsorción, emisión y reflexión en el infrarrojo, de especies moleculares, se pueden explicar asumiendo que todos son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros (Skoog *et al.*, 1992).

Si la molécula recibe luz con la misma energía de esa vibración, entonces la luz será absorbida si se dan ciertas condiciones. Para que una vibración aparezca en el espectro infrarrojo, la molécula debe someterse a un cambio en su momento dipolar durante la vibración. En particular, una aproximación de Born-Oppenheimer y aproximaciones armónicas; es decir, cuando el hamiltoniano molecular correspondiente al estado electrónico estándar puede ser aproximado por un oscilador armónico cuántico en las cercanías de la geometría molecular de equilibrio, las frecuencias vibracionales de resonancia son determinadas por los modos normales correspondientes a la superficie de energía potencial del estado electrónico estándar. No obstante, las frecuencias de resonancia pueden estar, en una primera aproximación, en relación con la longitud del enlace y las masas de los átomos en cada extremo del mismo. Los enlaces pueden vibrar de seis maneras: estiramiento simétrico, estiramiento asimétrico, tijeras, rotación y giro (Espectrometria.com).

Con el fin de hacer medidas en una muestra, se transmite un rayo monocromo de luz infrarroja a través de la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida. Repitiendo esta operación en un rango de longitudes de onda de interés (por lo general, $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) se puede construir un gráfico, y así, obtener información sobre la misma. Esta técnica funciona casi exclusivamente en enlaces covalentes, y se usa mucho en química, en especial en química orgánica. Se pueden generar gráficos bien resueltos con muestras de

una sola sustancia de gran pureza. Sin embargo, la técnica se utiliza habitualmente para la identificación de mezclas complejas (Espectrometria.com).

1.3.2.1 Técnicas espectroscópicas de IR utilizadas para la caracterización química del mucílago de *Opuntia*

Cárdenas *et al.* (2007) investigaron el grado de esterificación de la pectina de *Opuntia ficus-indica* mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y lo compararon con una pectina comercial de un cítrico.

La banda en 1749 cm^{-1} es asignada a las vibraciones del C=O de los grupos carboxílicos no ionizados. Se ha propuesto para cuantificar el grado de esterificación en una pectina. La ionización (a través de la formación de sales) conduce a la desaparición de esta banda y a la aparición de dos nuevas bandas asociadas a vibraciones simétricas y asimétricas del grupo COO^- centradas aproximadamente a $1600\text{-}1650$ y $1400\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$, respectivamente (Cárdenas *et al.*, 2007).

La inspección de la región espectral entre 1350 y 1750 cm^{-1} de los resultados de un análisis realizado por Cárdenas *et al.* (2007) revela la ausencia total de una banda a los 1749 cm^{-1} y la clara presencia de dos bandas con centro en 1625 y 1415 cm^{-1} . Este resultado concuerda con la saponificación completa de los grupos metil y la presencia de la forma Na^+ de los grupos carboxilatos de la pectina. Por lo tanto, el alto contenido de grupos carboxílicos libres es directamente relacionado con las condiciones alcalinas de extracción. De esta manera se puede concluir que la pectina de nopal es de bajo grado de esterificación ya que no se presentó la banda a 1749 cm^{-1} característica de grupos carboxílicos esterificados.

Las pencas de nopal contienen 0.5-1% de proteína y 1-2% de cenizas en base de peso fresco. El espectro FTIR de la pectina hace revelar la presencia de cierta cantidad residual de proteínas ya que se presenta un pequeño hombro a 1550 cm^{-1} que puede ser asignado para amida II (Fig. 3).

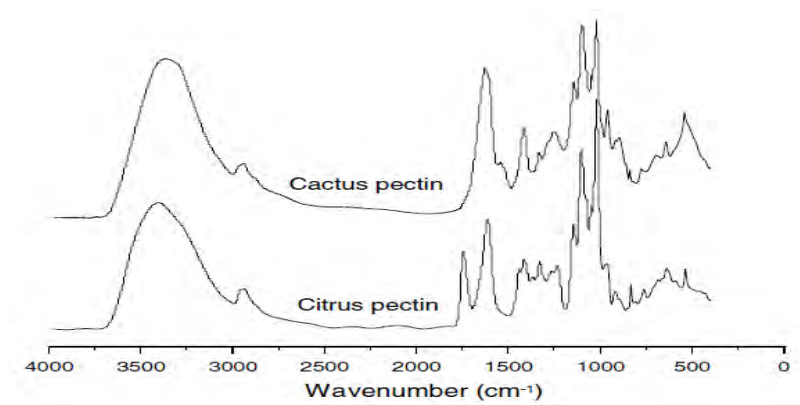


Figura 3. Espectro de absorbancia de espectroscopia de FTIR de la pectina de nopal y de una pectina comercial de un cítrico (Cárdenas *et al.*, 2007).

Al realizar el análisis de espectroscopia de IR del mucílago extraído de la cáscara de la tuna Habibi (2004) encontró la aparición de varias bandas principalmente a 1730 cm^{-1} que pertenece a la vibración del enlace $\text{C}=\text{O}$ de ácidos y ésteres, y a 3370 cm^{-1} de OH de los polisacáridos, entre otras señales como las indicadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Atribución de las principales bandas observadas en el espectro IR para los polisacáridos de la pectina del mucílago de la cáscara de la tuna (Habibi, 2004)

Vibración	Atribución	Frecuencia en cm^{-1}
OH	Polisacáridos y agua de hidratación	3370
CH y CH_2	Polisacáridos	2918 y 2850
C=O	Ácidos y ésteres	1730
Los enlaces de hidrógeno y de agua absorbida		1650
$\delta\text{C-H}$, δCH_2 y $\delta\text{O-H}$	Polisacáridos	1430-1200
C-C y C-O	Polisacáridos	1160-1000

Se infiere que la relación del área de la banda a 1736 cm^{-1} (correspondiente al número de grupos carboxílicos esterificados) sobre la suma de las áreas del bandas a 1736 y 1613 cm^{-1} (correspondiente al número del total de grupos carboxílicos) debe ser proporcional al grado de esterificación (Majdoub *et al.* 2010).

Los polisacáridos extraídos de la pulpa de *O. ficus-indica* son de bajo grado de metilación (menor a 50%) según Majdoub *et al.* (2010).

1.3.3 Compuestos de Calcio en *Opuntia*

El calcio (Ca) presente en el nopal entero no es totalmente biodisponible, debido a que la biodisponibilidad de este mineral está relacionada con la concentración de oxalatos de Ca presentes en el nopal (McConn y Nakata, 2004; Loubet, 2008; Contretas-Padilla *et al.* 2011; Ramírez-Moreno *et al.* 2011), la razón de esto, es porque el oxalato tiene el potencial para combinarse con el Ca, y por lo tanto no permite que esté disponible (Contretas-Padilla *et al.* 2012; Loubet, 2008; Ramírez-Moreno *et al.*, 2011).

La biodisponibilidad del Ca, puede ser definida como la fracción de Ca dietético que es potencialmente absorbible por el intestino y que puede ser utilizado para las funciones fisiológicas, particularmente mineralización del hueso o limitar su pérdida. Entre los factores fisiológicos y dietéticos que intervienen en la absorción de Ca se encuentran el aumento del pH, que favorece la absorción al aumentar su solubilidad, la influencia negativa de un alto contenido de fibra dietética, de fitatos, oxalatos y taninos que pueden formar complejos insolubles con el Ca, provocando una reducción en su absorción (Loubet, 2008; Ramírez-Moreno *et al.*, 2011), también compuestos ligeramente metoxilados como las pectinas, inhiben fuertemente la absorción del calcio y otros minerales (Loubet, 2008).

Rojas *et al.* (2010) identificaron la presencia de compuestos de Ca en *O. ficus-indica* mediante la técnica de espectroscopia de dispersión de energía y dispersión de rayos-X. Los resultados de la difracción de rayos X revelaron la presencia de oxalato de Ca en la fracción pesada (fibra dietética insoluble). Por el contrario, no se detectó la presencia de oxalato de Ca en la fracción ligera (fibra dietética soluble/mucílago) de las pencas. Sin embargo, los difractogramas obtenidos a partir de la fracción ligera de las pencas de nopal mostraron evidencia de la presencia de carbonato de Ca, el cual es un compuesto biodisponible por el organismo humano. La separación de la fracción pesada y la fracción ligera se llevó a cabo mediante la extracción del parénquima acuoso por medios mecánicos y físicos, separando la corteza y la médula, así como una solubilización con alcohol etílico al 95%.

Por otra parte, Trachtenberg y Mayer (1982b), afirmaron que las células mucilagosas de *O. ficus-indica* poseen Ca soluble, debido a que el mucílago quela al Ca y

no permite que se una al oxalato y forme compuestos insolubles, esta quelación puede depender del pH y fuerza iónica.

Contreras-Padilla *et al.* (2011) realizaron un estudio donde analizaron la cantidad de Ca y oxalatos de Ca en *O. ficus-indica* en diferentes etapas de maduración (de 40 a 100 días de maduración). Los resultados de difracción de rayos-X, del nopal entero en polvo muestran la presencia oxalato de Ca, además de otros componentes cristalinos como celulosa, monoaluminato de Ca (CaAl_2O_4), fósforo de Fe (Fe_2P), ion fosfato de K (KH_2PO_4) y fosfato de Zn (Zn_3PO_4) (Fig. 8). Por otra parte, se observó que el contenido de oxalatos depende parcialmente de la madurez del nopal (Fig. 5), pero pueden interferir también otras variables como factores ambientales, condiciones climáticas, tipo de suelo, necesidades de la planta y variedades, al igual que en el contenido de varios componentes del nopal.

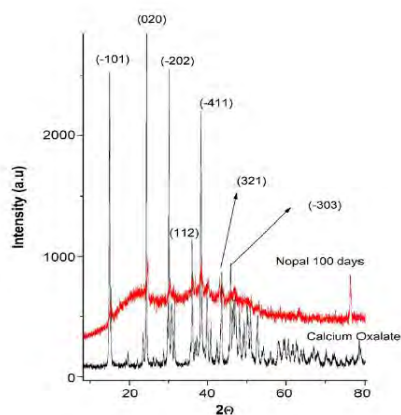


Figura 4. Difracción de rayos-X de nopal en polvo (100 días) y el estándar de oxalato de Ca (Contreras-Padilla *et al.*, 2011).

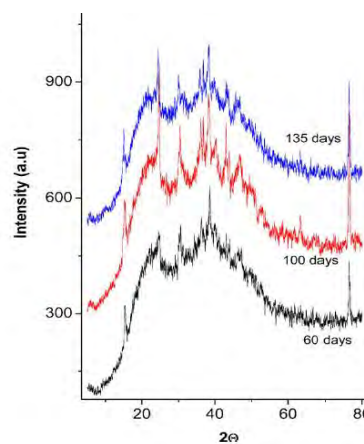


Figura 5. Difracción de rayos-X de nopal en polvo en diferentes etapas de maduración (Contreras-Padilla *et al.*, 2011).

1.3.4 Microscopía electrónica de barrido

Cada vez se le da más importancia al conocimiento detallado de la naturaleza física de las superficies de las muestras a analizar. El método clásico para obtener tal información es la microscopía óptica, una de las técnicas de este método es la microscopía electrónica de

barrido (MEB). Consiste en obtener una imagen de la superficie de la muestra, se barre mediante un rastreo programado (raster pattern) con un haz de electrones muy fino focalizado o con una sonda adecuada. Durante el proceso de barrido se recibe una señal por encima de la superficie y se almacena en un sistema computarizado donde posteriormente se convierte en una imagen (Skoog *et al.*, 1992).

1.3.4.1 Técnicas microscópicas (MEB) utilizadas para la caracterización química del mucílago de *Opuntia*

Rojas *et al.* (2010) también identificaron la presencia de compuestos de Ca en *O. ficus-indica* cuando realizaron una caracterización estructural y morfológica de los compuestos de Ca por microscopía electrónica de barrido (MEB); estos análisis se realizaron tanto en la fracción pesada como en la fracción ligera de la penca de nopal.

Las micrografías obtenidas a través del microscopio electrónico de barrido mostraron la presencia de cristales de oxalato de Ca que se caracterizan por agruparse en forma de drusas ocluidos al interior de la matriz fibrosa de la fracción insoluble, esto coincide con lo reportado por Contreras-Padilla *et al.* (2011) quienes observaron los cristales de oxalato de Ca en forma de drusas que corresponden a la típica forma parecida a una estrella con picos agudos en *O. ficus-indica* variedad redonda (Fig. 6). En tanto que los cristales de carbonato de Ca se encontraron en forma de prismas (Rojas *et al.*, 2010).

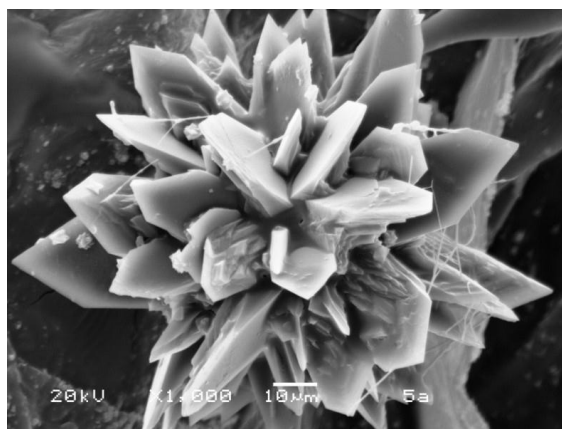


Figura 6. Imagen morfológica de drusa de oxalato de calcio de *O. ficus-indica* variedad redonda (Contreras-Padilla *et al.*, 2011).

1.3.5 Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las técnicas más potentes para la elucidación de estructuras de las especies químicas. Se basa en la medida de la absorción de la radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias aproximadamente de 5 a 900 MHz. El analito se coloca en un intenso campo magnético, con el fin de que aparezcan los estados de energía de los núcleos que hagan posible la absorción (Skoog *et al.*, 1992).

1.3.5.1 Estudios de *Opuntia* por RMN ^{13}C

Matsuhiro *et al.* (2006) quienes caracterizaron químicamente el mucílago de las frutas de *O. ficus-indica*, encontraron en los resultados de RMN de ^{13}C una señal a 173.46 ppm la cual fue asignada al carbono del carbonilo del grupo carboxilo, y otras nueve señales más fueron asignadas a una unidad de ramnogalacturonano. Las asignaciones de las señales del espectro para cada carbono, de cada tipo de unidad, se presentan en la Tabla 8. El desplazamiento del campo bajo de una señal de C_2 (77.95 ppm) de residuos deramnopiranosil puede indicar que está ligado 1→2, como lo reporta McGarvie y Parolis, (1981b) en el mucílago de los tallos de *O. ficus-indica*.

Tabla 8. Asignaciones de las señales del espectro de la RMN ^{13}C del polisacárido de frutas de *O. ficus-indica* parcialmente hidrolizado

Tipos de unidades	Desplazamientos químicos (δ , ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -D-galactopiranosúrico	100.39	70.06	70.96	78.90	71.95	173.46
α -L-ramnopiranosil	99.16	77.95	70.96	73.28	70.20	17.85

(Fuente: Matsuhiro *et al.*, 2006).

Por otro lado, Cárdenas *et al.* (2007) en su análisis del comportamiento de gelificación de la pectina de bajo metoxilo de nopal (*O. ficus-indica*), reporta los resultados para RMN ^{13}C , confirmando la presencia de dos tipos de compuestos en esta pectina de nopal. Uno de los principales constituyentes de los carbohidratos dieron lugar a seis principales señales de C incluyendo la señal del $-\text{C}=\text{O}$ a 176.1 ppm característica del ácido urónico (Fig. 7), y un componente menor al cual también pueden ser asignadas seis señales no bien definidas de carbono.

Las integrales de las señales pequeñas representan aproximadamente un 11% (w/w) de las señales grandes. Este valor está muy relacionado con el obtenido para la proporción de azúcares neutros después de la hidrólisis completa. Por lo tanto, las señales de gran tamaño pueden ser atribuidas al ácido poli-D-galacturónico, mientras que las señales pequeñas pueden ser asignadas a varios azúcares neutros presentes.

Es interesante señalar que estos autores no encontraron evidencia de la presencia de ramnosa, es decir, ausencia de señales características en la región anomérico y para el C₆ del grupo metilo en 99 y en 17.4 ppm, respectivamente. Además, no detectaron tampoco la presencia de la señal en 20.2-20.7 ppm para -CH₃, lo cual, revela que no hay presentes de éster metílico ni residuos *O*-acetilados.

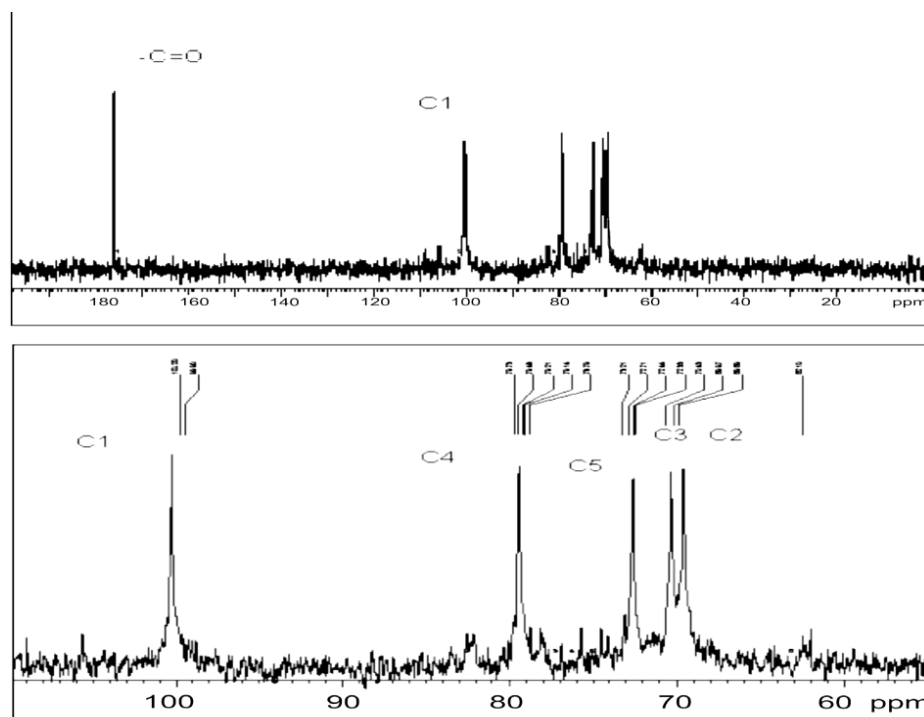


Figura 7. Espectro de RMN ¹³C de la pectina de *O. ficus-indica* en D₂O a 85 °C. El segundo espectro corresponde a una amplificación de la región 55-109 ppm (Cárdenas *et al.*, 2007).

Por otra parte, el análisis de RMN ¹³C del mucílago extraído de la cáscara de la tuna por Habibi (2004), muestra las señales asignadas a cada carbono de los diferentes residuos glucosídicos como se muestra en la Tabla 9 y Fig. 8.

Tabla 9. Desplazamientos químicos de las señales del espectro de RMN ^{13}C del mucílago de la cáscara de la tuna

Residuos glucosídicos	Relación molar	Desplazamientos químicos (ppm)					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
1	5	105.26	72.86	74.30	78.49	75.43	61.73
	3	104.11	73.86	82.22	79.12	75.43	61.73
2	1	108.36	81.01	77.86	84.95	69.70	-
	3	110.40	81.34	77.39	85.26	62.44	-

(Habibi, 2004).

1. Galactopiranososa $\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\rightarrow 3,4)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$
2. Arabinofuranosa $\rightarrow 5)\text{-}\alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow \alpha\text{-L-Araf-(1}\rightarrow$

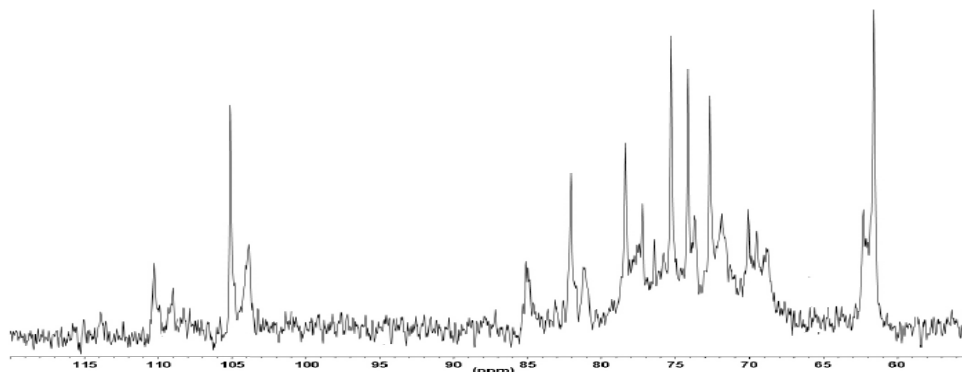


Figura 8. Espectro de RMN ^{13}C del mucílago de la cáscara de la tuna (Habibi, 2004).

En una caracterización estructural de dos fracciones mayoritarias de polisacáridos solubles en agua de cladodios de *Opuntia monacantha* realizada por Zhao *et al.* (2007), los resultados de RMN ^{13}C reportaron que las unidades de $(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-ramnosapiranososa}$ fueron caracterizadas por seis fuertes señales a 99.24, 77.52, 70.19, 71.33, 69.81 y 17.45 ppm, las señales identificadas a 103.73, 75.11, 76.79, 77.53, 76.13 y 62.26 ppm podrían ser asignadas a los seis carbonos de $\beta\text{-D-glucosa}$. Lo cual indica la presencia de ramnosa y glucosa principalmente, en las dos fracciones de polisacáridos. Y las señales a 108.57, 81.92, 83.14 y 68.29 ppm del espectro de ^{13}C de la primer fracción de polisacáridos (POMC V) podrían estar relacionadas con los el C-1, C-2, C-4 y C-5 de $\alpha\text{-L-arabinosa}$, mientras que las señales a 102.16, 66.91 y 66.15 ppm del espectro de ^{13}C de la segunda

fracción de polisacáridos (POMC VI) podrían corresponder al C-1, C-4 y C-6 de α -D-manosa. Y por último, la señal a 175.92 ppm corresponde al C-6 del β -d-glucurónico (Fig. 9).

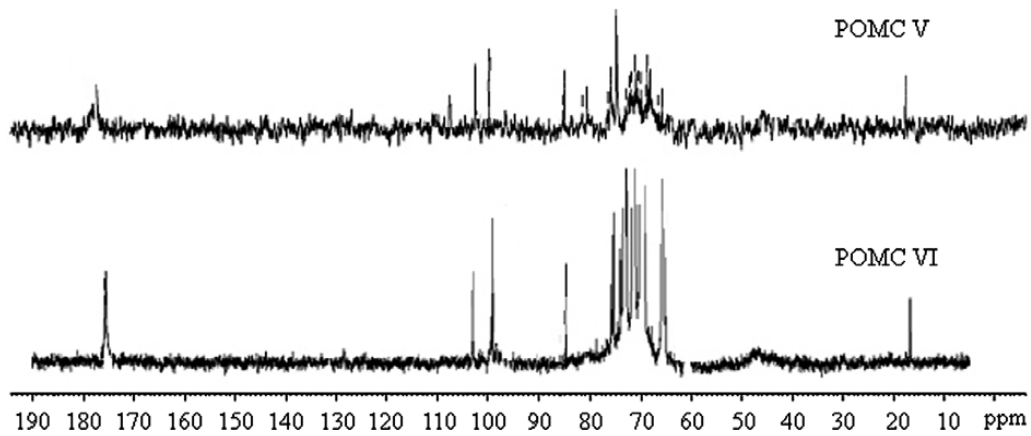


Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C de dos fracciones de polisacáridos solubles en agua de cladodios de *Opuntia monacantha* (Zhao *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN

Michoacán cuenta con varias especies de *Opuntia*, entre ellas *O. tomentosa*, *O. joconostle*, *O. hyptiacantha*, *O. streptacantha* y *O. atropes* que han sido poco estudiadas y las cuales pueden ser aprovechadas, ya que están presentes en abundancia en el país y generalmente son consideradas producto de desecho. El mucílago es un compuesto que puede tener gran potencial en la producción rentable de aditivos para la industria de alimentos, por ello, es importante caracterizar químicamente el polisacárido del mucílago de estas especies, para determinar sus componentes y la cantidad en la que están presentes, a fin de establecer su posible comportamiento reológico, y compáralo con *O. ficus-indica* para comprobar si es posible utilizar el mucílago de estas especies silvestres en la producción de hidrocoloides y aditivos. Además, México ha dependido del exterior casi por completo en el ámbito científico-tecnológico y comercial de los hidrocoloides industriales, y la producción de estos compuestos naturales en la industria de alimentos, podría impactar en la economía del país.

3. HIPÓTESIS

El mucílago de las seis especies de *Opuntia* colectadas en municipios aledaños a la ciudad de Morelia, Michoacán, presenta variaciones en su composición química.

4. OBJETIVO

Caracterizar la composición química del mucílago extraído de seis especies de *Opuntia* de Morelia, Michoacán y municipios.

4.1 Objetivos específicos

- ✓ Establecer las condiciones de extracción y purificación del mucílago de seis especies de *Opuntia* (*O. atropes*, *O. hyptiacantha*, *O. joconostle*, *O. streptacantha* y *O. tomentosa*, *O. ficus-indica*) que permitan obtener la estructura nativa del mucílago.
- ✓ Determinar la composición bromatológica del mucílago extraído de las seis de especies *Opuntia* en estudio.
- ✓ Determinar la composición de carbohidratos del mucílago extraído de las seis especies de *Opuntia* por cromatografía de gases y RMN.
- ✓ Determinar la región de la huella dactilar para el mucílago extraído de las seis especies de estudio a través de un análisis de los grupos funcionales presentes.
- ✓ Estudiar las formas en que se encuentran presentes los compuestos de calcio así como el contenido de calcio en el mucílago de cada especie en estudio.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material

Las especies estudiadas fueron: *Opuntia atropes*, *O. hyptiacantha*, *O. joconostle*, *O. streptacantha*, *O. tomentosa* y *O. ficus-indica*. Esta última especie se usó como patrón de comparación (Fig. 10). Se seleccionaron plantas de dos o más años de edad y se cortaron podarios de cladodios de dos años de edad. Las especies de estudio fueron colectadas en la ciudad de Morelia, Michoacán, México y municipios aledaños, en donde todos los sitios de colecta tienen condiciones similares de suelo, altitud, longitud, vegetación y precipitación pluvial.



O. atropes



O. hyptiacantha



O. joconostle



O. streptacantha



O. tomentosa



O. ficus-indica

Figura10. Fotografías de las seis especies de *Opuntia*.

5.2 Métodos

El procedimiento general de todo el estudio se muestra en la Fig. 11. La metodología se divide en análisis bromatológico y caracterización química del mucílago extraído de las seis especies. En la caracterización química se consideraron las técnicas de cromatografía, espectroscopía FTIR, microscopía electrónica de barrido (MEB), difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) y las espectroscopias de Absorción Atómica y UV/VIS.

El análisis bromatológico del mucílago de las seis especies de *Opuntia* consistió en las siguientes determinaciones: humedad, cenizas, proteína método Kjeldahl y extracto etéreo por los métodos 925.45, 945.18, 955.04, y 920.39 de la AOAC (2005), respectivamente. El análisis de fibra dietética soluble, insoluble y total se realizó por la metodología de Prosky *et al.* (1998) y el contenido de carbohidratos totales se determinó por diferencia porcentual utilizando la siguiente fórmula, Carbohidratos totales: $100 - (\text{valores de humedad} + \text{cenizas} + \text{proteína} + \text{extracto etéreo} + \text{fibra dietética total})$.

Primero, se realizaron diferentes pruebas de extracción del mucílago. El método de extracción de *O. ficus-indica* usado en estas pruebas es el reportado por Rodríguez-González (2010) quien se basó en las técnicas de Forni *et al.* (1994), las sugerencias de Medina-Torres *et al.* (2000) citado por Arizmendi en el 2004, y las modificaciones realizadas por Zavala-Mendoza (2012) (Fig. 12). De esta manera se establecieron las condiciones de extracción del mucílago, de tal forma que no se afectara su estructura nativa.

El método desarrollado se usó para obtener el mucílago de una especie, *O. hyptiacantha*. Las variables del proceso fueron: Proporción de *Opuntia*:agua en la molienda, el tiempo y la temperatura de extracción. Posteriormente, para cada extracción se realizó una cromatografía líquida de capa fina (CCF) utilizando las condiciones reportadas por Ribeiro *et al.* (2010), con la finalidad de corroborar que no hubiera presencia de monosacáridos libres en la extracción. La presencia de monosacáridos libres puede modificar el perfil cromatográfico de los azúcares del mucílago del nopal, y por lo tanto alterar el resultado de la caracterización química de este polímero, ya que se podrían cuantificar azúcares que no pertenecen al polisacárido del mucílago.

Una vez determinadas las condiciones de extracción que permitieron tener el mucílago en su forma nativa, el tercer paso fue la caracterización de azúcares por cromatografía de gases el

cual se realizó con la modificación de la metodología desarrollada por Chávez-Moreno (2011). Esta metodología se llevó a cabo a partir de las técnicas de Macías-Rodríguez *et al.* (2002), Habibi *et al.* (2004), Cuello (2007) y Ribeiro *et al.* (2010), en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. El análisis se efectuó por triplicado.

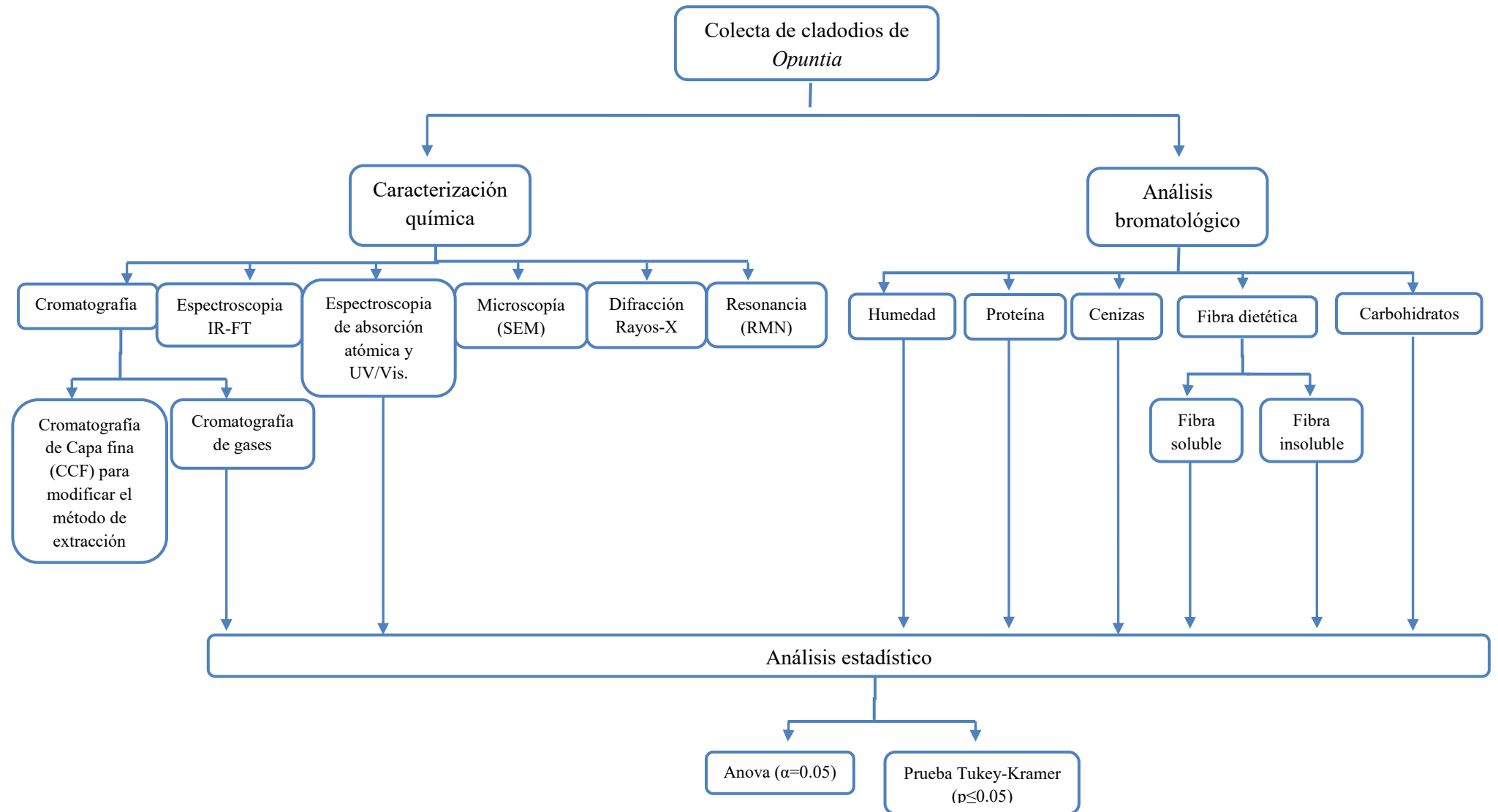


Figura 11. Metodología para la caracterización química y análisis bromatológico *Opuntia* spp.

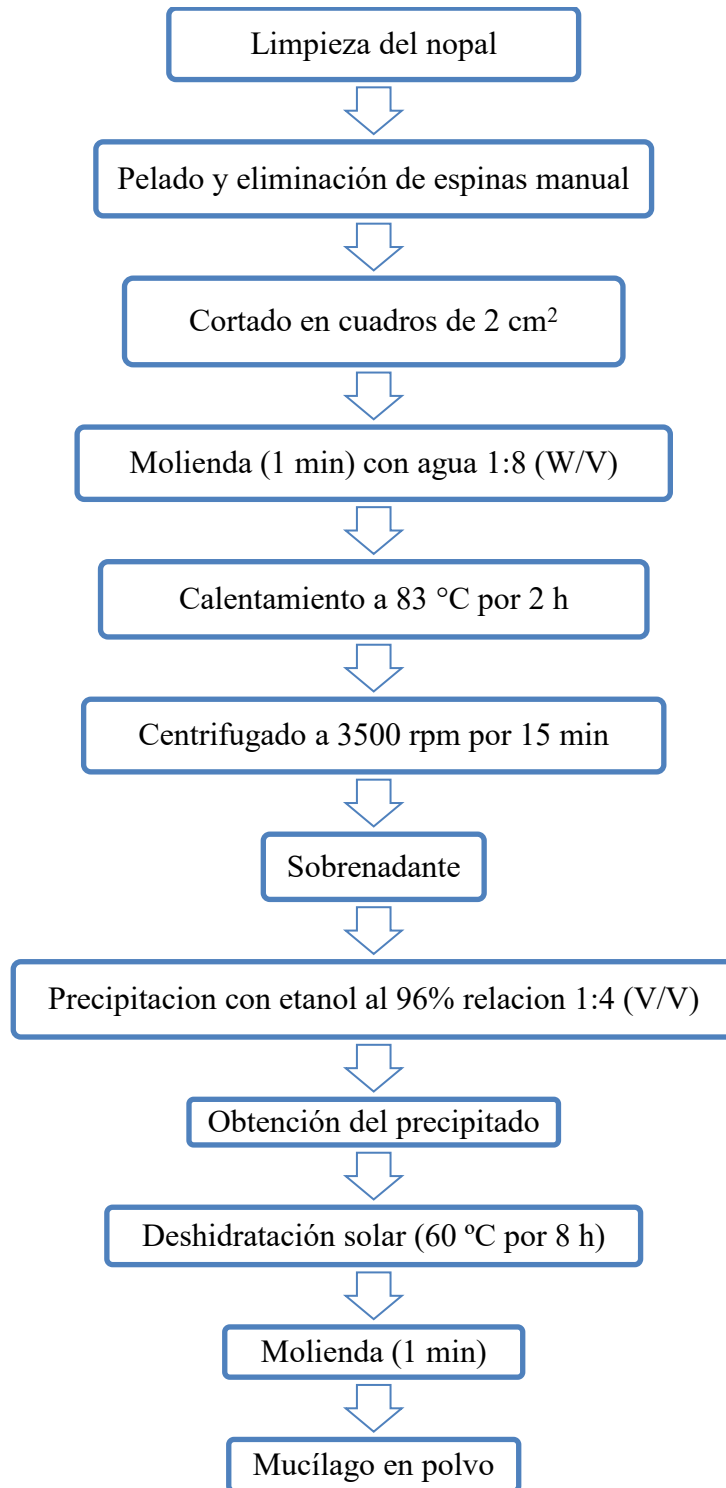


Figura 12. Método de extracción del mucílago de *Opuntia* (Método desarrollado por Rodríguez-González (2010) y modificado por Zavala-Mendoza (2012).

5.2.1 Metodología de cromatografía en capa fina

Se realizó el ensayo de cromatografía en capa fina (CCF) a los mucílagos obtenidos bajo diferentes condiciones de extracción, para corroborar la presencia o ausencia de monosacáridos libres, producto de la desintegración de la estructura del mucílago. De esta manera se realizaron cuatro pruebas de CCF a los extractos obtenidos bajo diferentes condiciones de temperatura, tiempo de extracción, proporción nopal/agua y tipo de disolvente. Al finalizar, se llevó a cabo la CCF de los dos métodos que permiten recuperar al mucílago en su forma nativa, y se comparó con los otros dos métodos ya establecidos por Rodríguez-González (2010) y Zavala-Mendoza (2012). La metodología utilizada para la CCF fue la reportada por Ribeiro *et al.* (2010). Este método consistió en analizar los extractos colocando una muestra en una placa de sílice y aluminio, que se introdujo en una cámara de CCF que contenía un sistema de elución de acetona/n-butanol/agua (80:10:10 v/v/v) para monosacáridos y cloroformo/metanol/ácido acético/agua (40:40:10:10:10 v/v/v/v) para azúcares ácidos (ácido glucurónico y galacturónico). Se utilizó un mismo sistema de revelado para ambos: 2% de difenilamina preparado en acetona, 2% de anilina preparado también en acetona y 85% de ácido ortofosfórico (5:5:1 v/v/v) (Fig. 13). La CCF se realizó a cada producto obtenido bajo las distintas pruebas de extracción que a continuación se describen.

5.2.1.1 Prueba de temperatura de extracción

La primera prueba de extracción que se llevó a cabo para determinar si había monosacáridos libres en el nopal antes de ser procesado y si la temperatura tiene algún efecto sobre los carbohidratos presentes en el mucílago es la que se muestra en la Fig. 13. Antes de la extracción un lote del material fue lavado con H₂O desionizada y otro lote no. La prueba de temperatura se llevó a cabo a tres temperaturas: 65°C, 75°C y 83°C, con un tiempo de extracción de 2 h en todos los casos, usando una proporción nopal/H₂O (1:2, W/V) (Zavala-Mendoza, 2012), con y sin lavados previos del nopal en H₂O desionizada. Durante la extracción se monitoreó la temperatura. Se realizó la CCF tanto de esta extracción antes de precipitar el mucílago con etanol al 96%, como de las aguas residuales de los lavados del nopal (Fig. 13).

5.2.1.2 Prueba de tiempo de extracción

En la segunda prueba se siguió el método de extracción descrito en la Fig. 16, modificando únicamente el tiempo de extracción a tres niveles 0 min, 1 h y 2 h con el fin de verificar si la variación del tiempo de contacto de la muestra y el disolvente favorecía la modificación y desintegración de la estructura del mucílago. El análisis de CCF del mucílago de cada extracción se realizó antes de precipitar el polisacárido con etanol al 96% y del mucílago precipitado en polvo (Fig. 13).

5.2.1.3 Prueba de proporción nopal/agua

En la tercera prueba se realizó el método de extracción que se muestra en la Fig. 16, modificando solamente la proporción de nopal:agua, teniendo tres niveles de variación nopal/sin H₂O, nopal/con H₂O 1:1 y nopal/con H₂O 1:2. De igual manera, para verificar que este parámetro no sea un factor que afecte a la estructura del mucílago, se llevó a cabo la CCF del mucílago de cada prueba, antes de precipitar el polisacárido con etanol al 96% (Fig.13).

5.2.1.4 Prueba de disolvente

Para la prueba cuatro, se hicieron tres extracciones, partiendo del método de extracción que se muestra en la Fig. 16; se evaluó el proceso a 20 °C y a 10 min de extracción, usando diferentes disolventes para la molienda: 1) nopal:H₂O (1:1), 2) nopal:etanol al 50% (1:1), 3) nopal:etanol al 80% (1:1). Se realizaron las CCF del mucílago antes de precipitar el extracto con etanol al 96% y del mucílago precipitado en polvo de cada extracción (Fig. 13).

5.2.1.5 Comparación de los cuatro métodos de extracción

Por último, se hizo el análisis de CCF del mucílago en polvo extraído por los cuatro métodos descritos previamente para conocer cual de ellos permitió la extracción sin afectar la estructura nativa del mucílago. Para este estudio se consideró que la ausencia de monosacáridos libres corresponde a una estructura de mucílago nativa sin cambios estructurales debidos al proceso de extracción (Fig. 14).

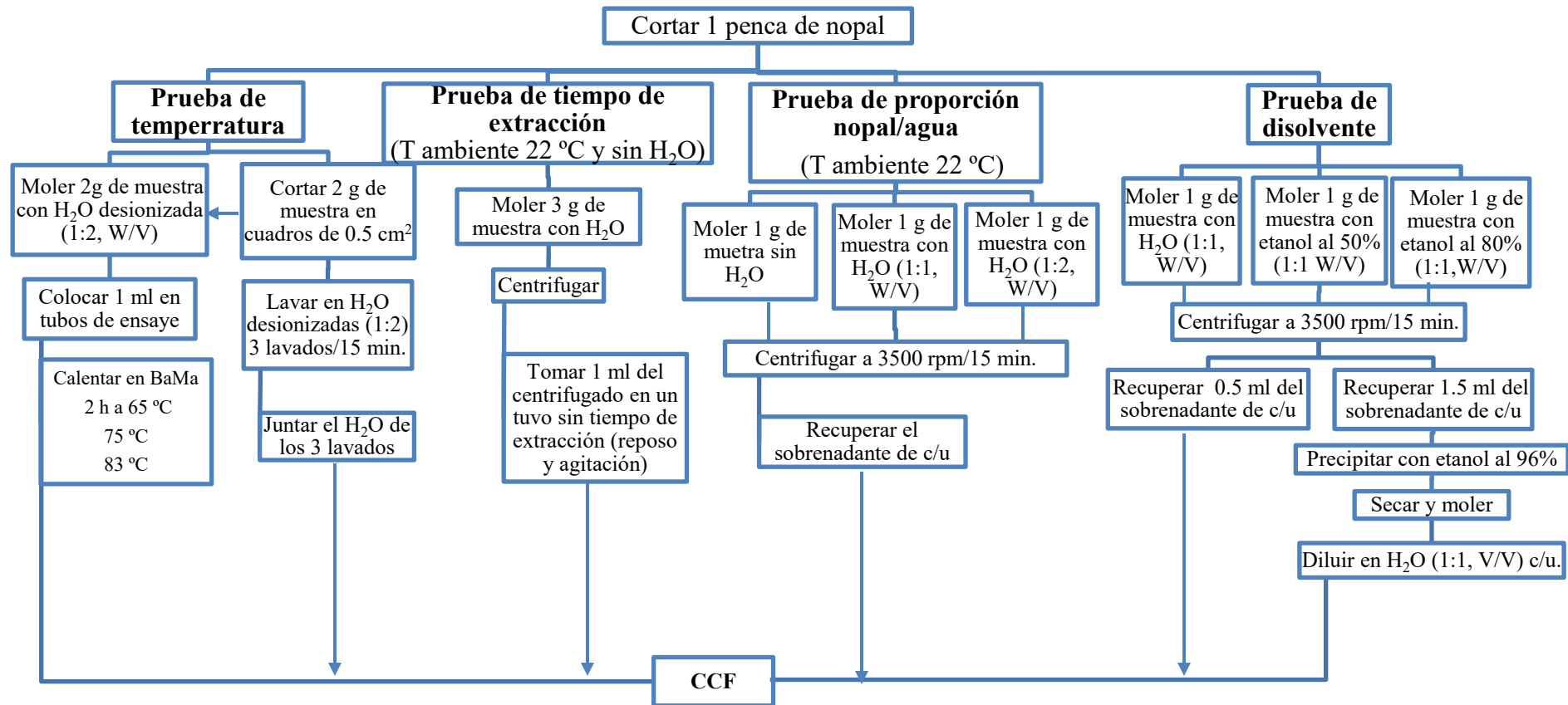


Figura 13. Pruebas de cromatografía líquida de capa fina (CCF), metodología obtenida de Ribeiro *et al.*(2010) realizada a muestras de mucílago de *O. hyptiacantha*.

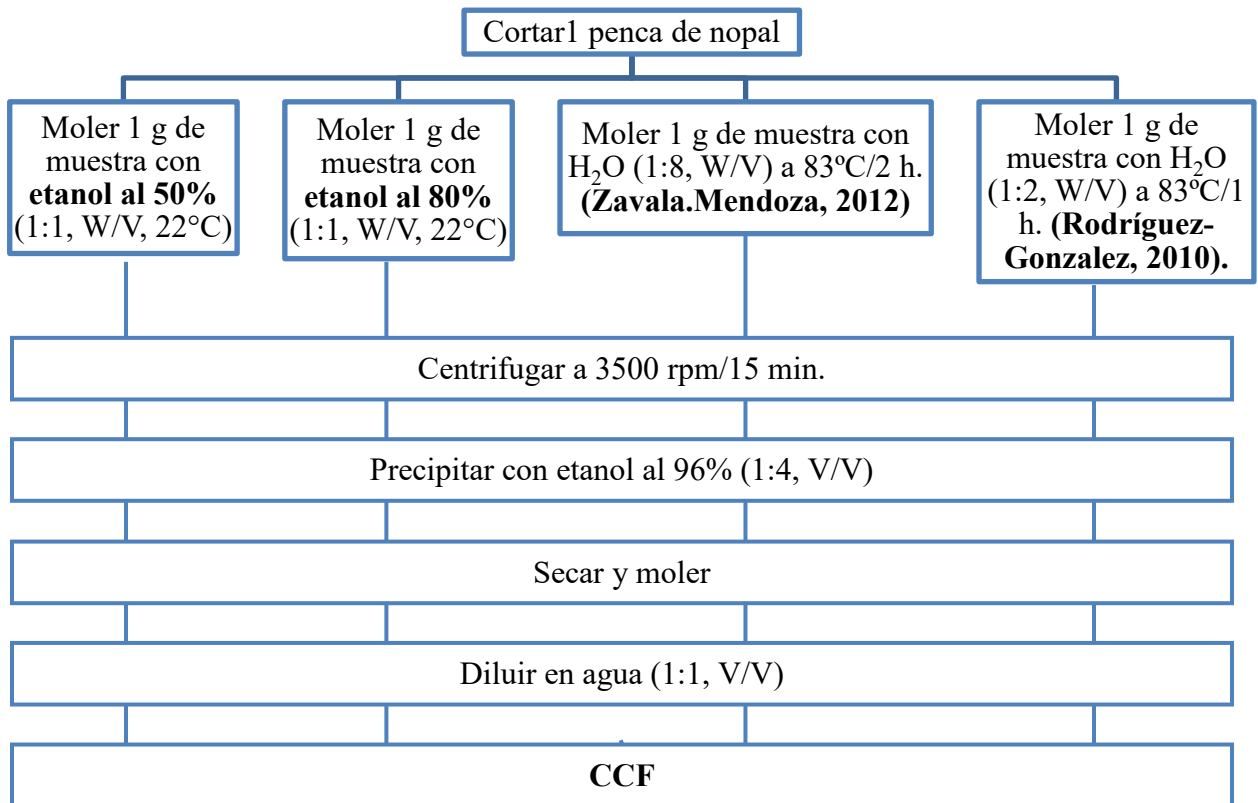


Figura 14. Comparación de cuatro métodos de extracción del mucílago de *O. hyptiacantha* usando la técnica de CCF de Ribeiro *et al.* (2010).

5.2.2 Metodología de cromatografía de gases

Para la caracterización química del mucílago mediante cromatografía de gases se utilizaron seis especies de *Opuntia*: *O. atropes*, *O. hyptiacantha*, *O. joconostle*, *O. streptacantha* y *O. tomentosa* y como control el *O. ficus indica*.

Para llevar a cabo la caracterización química del mucílago de *Opuntia* mediante cromatografía de gases, fue necesario hacer una hidrólisis ácida previa del polisacárido para poder cuantificar sus azúcares constituyentes (Fig. 15).

Posteriormente, se realizó la derivatización de los carbohidratos, empleando piridina, cloruro de hidroxilamina y anhídrido acético (reactivos grado cromatografía). La piridina es una sustancia aromática heterocíclica que permite capturar todos los H⁺. Mientras que el cloruro de hidroxilamina es un compuesto que se emplea para bloquear la mutarotación de los azúcares, sobre todo de los reductores, ya que al nitrilar los azúcares no se permite que se ciclen y que se encuentren en su forma abierta. Además, se empleó anhídrido acético que es un reactivo que se emplea para acetilar los OH de los azúcares por lo tanto los hace solubles en el cloroformo, el cual es volátil, y los convierte en compuestos que pueden ser leídos en un cromatógrafo de gases. Se utilizó un cromatógrafo Agilent 6859 Series II equipado con un detector MS Agilent 5973, (Palo Alto, CA, EUA) (Fig 16 y 17) con una columna HP-5-MS (30 m-250 μ m) de 5% de dimetil siloxano. Con una rampa de temperatura de 150 °C por 3 min elevándose 6 °C/min hasta 270 °C por 25 min. El gas de arrastre utilizado fue Helio con un de flujo de 1ml/min. Se inyectó 1 μ l de muestra a 230°C. Se utilizó persitol como estándar interno. Al finalizar se efectuó un análisis de ANOVA ($\alpha=0.05$) para la comparación de medias del mucílago las seis especies para cada azúcar encontrado. Y se llevó a cabo la prueba de Tukey-Kramer ($P\leq 0.05$) para ver posibles diferencias significativas entre cada especie.



Figura 15. Metodología para hidrólisis del polisacárido del mucílago de *Opuntia* spp.

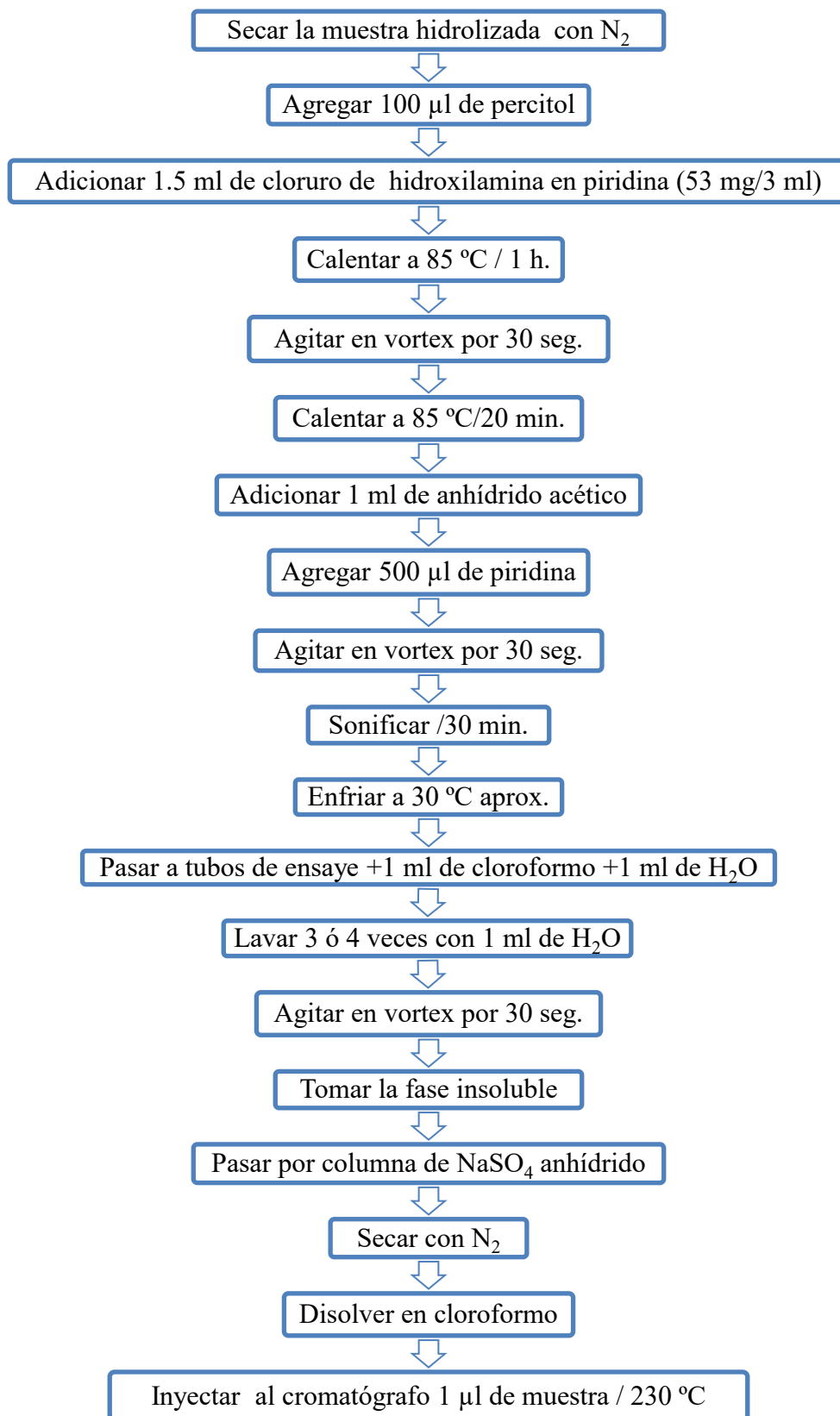


Figura 16. Metodología para cromatografía de gases del mucílago de *Opuntia* spp.



Figura 17. Cromatógrafo de gases.

5.2.3 Metodología para espectroscopia FTIR

Para realizar el análisis de espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR), se obtuvo una mezcla de 3 mg de muestra de mucílago extraído en polvo de cada una de las seis especies de *Opuntia* con Bromuro de potasio (KBr) de alta pureza. La mezcla obtenida se comprimió a presiones entre 1200-3000 atm con el fin de formar una pastilla translúcida. Se utilizó un espectrofotómetro FTIR marca BRUKER, modelo Tensor 27 (Fig. 18).



Figura 18. Espectrofotómetro FTIR.

5.2.4 Metodología para microscopía electrónica de barrido

Las muestras de mucílago extraído de las seis especies utilizando *O. ficus-indica* como control, fueron metalizadas con zinc (Zn) y cobre (Cu) para ser analizadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL Mod. JMS-6400 acoplado a un microanalizador BRUKER AXS (Fig. 19). A través del analizador es posible identificar la presencia de cristales de calcio en las diferentes especies de *Opuntia*.



Figura 19. Microscopio electrónico de barrido.

5.2.5 Metodología para minerales

El análisis de Ca, Mg, Cu, Zn y Fe se realizó por medio de espectroscopia de absorción atómica, mientras que el de Na y K se llevó a cabo por espectroscopia por emisión atómica en un espectrofotómetro de Absorción Atómica (AAS), modelo AAnalyst 200 y marca PerkinElmer (EUA) (Fig. 20). La determinación de P se hizo por espectrofotometría UV/Vis modelo 6305, marca JENWAY (Inglaterra) (Fig. 22).

5.2.5.1 Espectroscopia de absorción atómica

El método utilizado para la absorción atómica fue el que indica el manual del equipo PerkinElmer, que consiste en una digestión ácida para posteriormente poder analizar las muestras en el espectrofotómetro.

Se pesó 1 g de mucílago en polvo de cada especie de *Opuntia* por triplicado y se colocaron en tubos y vasos de digestión. Se adicionaron 8 ml de HNO_3 concentrado y 2 ml de H_2O_2 . Se calentaron a temperatura baja en una placa hasta que terminó la producción de vapores rojos de NO_2 . Se dejó que se evaporaran las soluciones hasta un pequeño volumen (Fig. 21). Y posteriormente, se transfirieron las muestras a matraces de 25 ml, se aforaron con agua desionizada y se diluyeron. En algunas muestras fue necesario diluir más la muestra. Posteriormente se procedió a analizar las muestras



Fig. 20. Espectrofotómetro de absorción atómica. Fig. 21. Digestión de las muestras.

5.2.5.2 Espectroscopia UV-Vis

Este método se utilizó para determinar el contenido de P, consiste en la digestión ácida de la muestra haciéndola reaccionar con molibdo-vanadato para su posterior análisis en el espectrofotómetro de UV-Vis.

La técnica consistió en pesar 1 g de muestra de cada especie e incinerar a 600 °C por 4 h. Se dejaron enfriar las muestras, y se les adicionaron 10 ml de HCl y varias gotas de HNO₃ concentrado, se calentaron hasta ebullición. Se enfriaron y transfirieron a matraces volumétricos de 100 ml y se aforaron con agua destilada (Fig. 23). Después se filtraron, se tomó una alícuota de 10 ml, se agregaron 10 ml de solución de molibdo-vanadato y se aforó a 100 ml y se homogenizó. Posteriormente se analizó a 400 nm, por último se calculó el contenido de P usando la ecuación de la línea recta de acuerdo a la curva patrón.

Los resultados fueron analizados estadísticamente, mediante análisis de ANOVA ($\alpha = 0.05$) para determinar si existen efectos de los efectos de variación (especie) sobre los promedios de cada mineral. Se utilizó la prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$) para ver la diferencia significativa entre cada especie.



Figura 22. Espectrofotómetro UV-Vis.



Figura 23. Digestión y filtración de las muestras.

5.2.6 Metodología para resonancia magnética nuclear ^{13}C

Los espectros de RMN ^{13}C se registraron en un espectrómetro modelo Varian, marca Gemini de 200 MHz (EUA), utilizando frecuencias de 50 MHz para la detección de ^{13}C , a 20 °C (Fig. 24). Se pesaron 20 mg de mucílago en polvo de cada especie. Debido a la elevada viscosidad del mucílago, se tuvo que diluir en agua D_2O (0.5 ml) e hidróxido de sodio NaOD (0.2 ml) deuterados. Ya que, de acuerdo con Chávez *et al.* (2010) el incremento de pH causa la ionización de los grupos carboxilos de la estructura del mucílago, y como consecuencia hay un aumento en la solubilidad del mucílago. Para este análisis, se corrieron dos espectros el primero diluyendo la muestra con D_2O y el segundo preparando una mezcla de agua (D_2O , 0.5 ml) e hidróxido de sodio (NaOD, 0.2 ml) deuterados, para hacer la comparación con el mucílago de las seis especies de *Opuntia*. También se comparó el mucílago *O. ficus-indica* hidrolizado con ácido clorhídrico deuterado (DCI) con el mucílago sin hidrolizar. Se utilizaron los azúcares glucosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, galactosa, ácido glucurónico y galacturónico como estándares.



Figura 24. Espectrómetro de resonancia magnética.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización química

6.1.1 Cromatografía de capa fina

El mucílago del nopal es soluble en agua debido a la presencia de monosacáridos que contienen grupos hidroxilos, además de ácidos urónicos, los cuales a menudo se encuentran en su forma iónica o cargada. Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar las condiciones ideales de extracción del mucílago, con las cuales se pudiera incrementar el rendimiento sin afectar la integridad de la molécula. Los resultados de CCF de la primera extracción indican que hubo presencia de monosacaridos libres (mayoritariamente xilosa), así como de ácidos urónicos, y mucílago en menor cantidad, tanto en las corridas con lavados como sin lavados previos a la extracción, independientemente de las temperaturas de extracción usadas. Sin embargo, se observó que en la extracción a temperatura ambiente (22 °C) con y sin lavados, resultó con menor concentración de monosacáridos y ácidos urónicos, lo cual indica que la temperatura sí afectó la estructura del mucílago, pudiéndose haber liberado residuos de xilosa por efecto de la temperatura. En la CCF de los lavados del nopal no hubo presencia de monosacáridos, polisacárido (mucílago), ni ácidos urónicos, por lo tanto, no hubo monosacáridos libres en el nopal antes de ser procesado que interfirieran en la cuantificación de los azúcares del mucílago, así que no es necesario realizarle lavados al nopal con agua antes de la extracción (Fig. 25).

En los resultados de la CCF de la extracción de modificación de la relación nopal/H₂O y tiempo de extracción (Fig. 26) sí hubo presencia de monosacaridos, además del mucílago, aunque fue menos concentrada en la corrida del mucílago con extracción nopal/H₂O 1:2 (W/V); lo anterior se pudo deber a que al haber mayor cantidad de H₂O hubo un efecto de dilución de la concentración de monosacaridos, así que, esto no indica que haya menos concentración de monosacáridos en esta extracción, debido a los resultados, se decidió que la relación nopal/H₂O debe ser 1:1. Y en las placas de CCF en la prueba de tiempo de extracción, la corrida a 0 min fue menos concentrada que las otras dos, esto indica que el tiempo de extracción también puede afectar a la estructura del polisacárido (Fig. 26).

Cuando la extracción se realizó con etanol al 50 y 80%, el mucílago se encontró en mayor concentración que los monosacáridos. En la extracción con agua se observó mayor concentración de monosacáridos y menor contenido de mucílago. Esto fue observado cuando el mucílago no había sido aún precipitado con etanol al 96% (Fig. 27), pero al llevar a cabo las CCF de estas con mucílago precipitado en polvo, en la extracción con etanol al 50 y 80% no hubo presencia de monosacáridos ni de ácidos urónicos, y sí del mucílago (Fig. 28 y 29).

En los métodos de Rodríguez-González (2010) y Zavala-Mendoza (2012) se observó que en el mucílago extraído por estos dos métodos si hubo presencia de monosacáridos libres y ácidos urónicos además del mucílago (Fig. 30) a diferencia del de los CCF del precipitado de las extracciones con etanol al 50 y 80% donde no se observó su presencia. Lo cual indica que es más factible utilizar el método de extracción con etanol al 50 ó 80% (1:1 W/V), sin temperatura ni tiempo de extracción, y no es necesario realizarle lavados al nopal previos a la extracción.

La presencia de monosacáridos y ácidos urónicos se debió a la temperatura y tiempo de extracción, así como al solvente utilizado (etanol); este último es un factor importante ya que disuelve a los monosacáridos y ácidos urónicos libres, que al momento de precipitar con etanol al 96% no permite que estos sean precipitados junto con el polisacárido, por lo tanto, sólo precipita el mucílago sin la presencia de estos.

En base a estos resultados, se obtuvo el mucílago del resto de las especies a temperatura ambiente, sin tiempo de extracción, la molienda fue con etanol al 50% (1:1, W/V) y la precipitación con etanol al 96% (1:4, V/V), se secó en un deshidratador solar y se obtuvo el mucílago en polvo de cada especie, el cual se empleó para realizar la caracterización química.

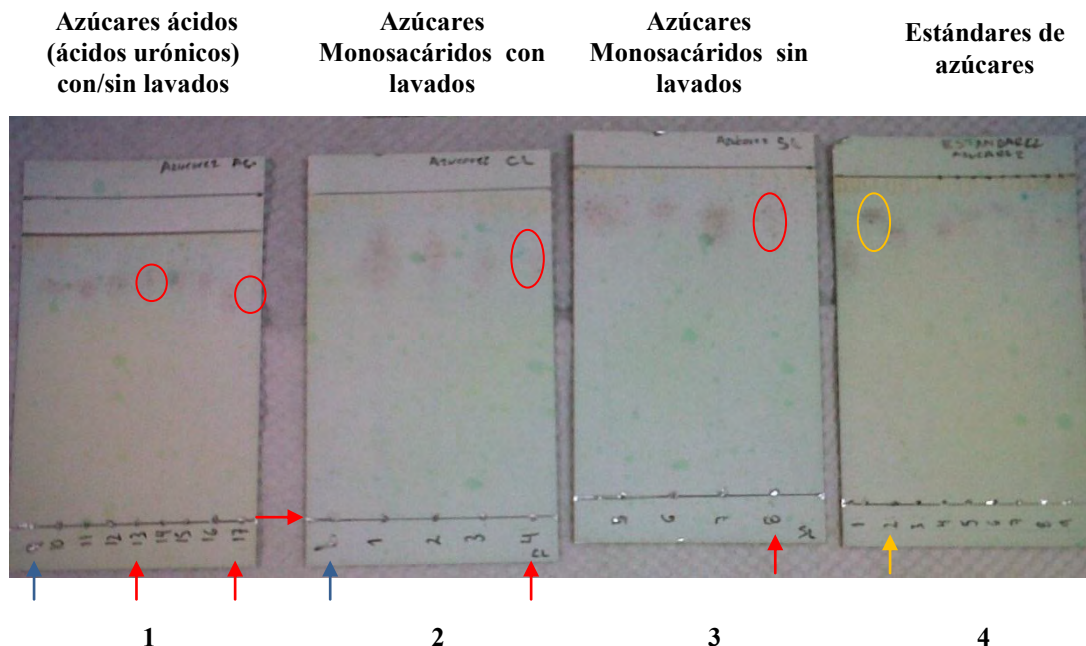
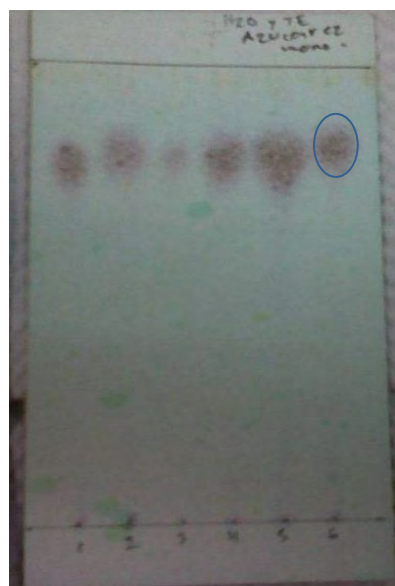


Figura 25. Placas de CCF para azúcares ácidos (ács. urónicos) y monosacáridos de la extracción de mucílago de *O. hyptiacantha* a 65°, 75°, y 83 °C con y sin lavados, y CCF de los lavados del nopal, y de los estándares de azúcares.

Tabla 10. Rotulado de placas CCF azúcares ácidos (ács. urónicos) y monosacáridos de la extracción de mucílago de *O. hyptiacantha* a 65, 75, y 83°C con y sin lavados, y CCF de los lavados del nopal, y de los estándares de azúcares

1. Azúcares ácidos (ács. urónicos) con/sin lavados	2-3. Azúcares monosacáridos con/sin lavados	4. Estándares de azúcares
No.-Muestra	No.-Muestra	No.-Muestra
9 -Lavados del nopal	L - Lavados del nopal	1 -Galactosa
10 - Con lavados a 65°C	1 -Con lavados a 65°C	2 -Xilosa
11 - CL a 75°C	2 - CL a 75°C	3 -Arabinosa
12 - CL a 83°C	3 - CL a 83°C	4 -Ribosa
13 - CL a T°C ambiente	4 - CL a T°C ambiente	5 -Glucosa
14 - Sin lavados a 65°C	5 - Sin lavados a 65°C	6 -Manosa
15 - SL a 75°C	6 - SL a 75°C	7 -Sacarosa
16 - SL a 83°C	7 - SL a 83°C	8 -Maltosa
17 -SL a T°C ambiente	8 -SL a T°C ambiente	9 -Fructosa



Azúcares monosacáridos	
No.	Muestra
1	Relación de nopal/agua sin H ₂ O
2	Relación de nopal/agua 1:1 (W/V)
3	Relación de nopal/agua 1:2 (W/V)
4	Tiempo de extracción 0 min.
5	Tiempo de extracción 1 h.
6	Tiempo de extracción 2 h.

1 2 3 4 5 6

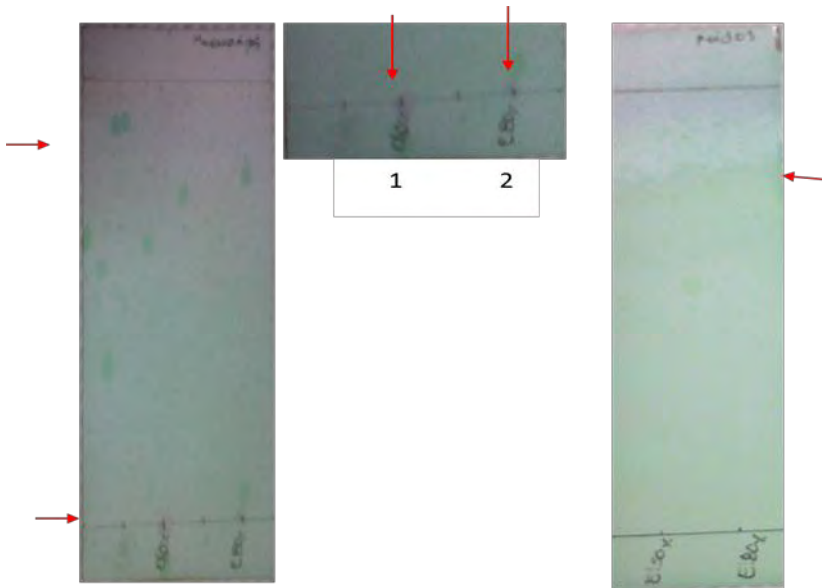
Figura 26. Placa de CCF para monosacáridos de la extracción sin H₂O, con H₂O 1:1 y 1:2, y a 0 min. 1h. y 2 h. de extracción.



Azúcares monosacáridos	
No.	Muestra
1	Extracción con H ₂ O 1:1 (W/V)
2	Extracción con etanol al 50% 1:1 (W/V)
3	Extracción con etanol al 80% 1:1 (W/V)

1 2 3

Figura 27. Placa de CCF para monosacáridos de la extracción con H₂O, etanol al 50 y 80% antes de precipitar.



Azúcares monosacáridos	
No.	Muestra
1	Extracción con etanol al 50% 1:1 (W/V) precipitado
2	Extracción con etanol al 80% 1:1 (W/V) precipitado.

Figura 28. Placa CCF para monosacáridos de la extracción con H₂O, etanol al 50 y 80% después de precipitar.

Figura 29. Placa CCF para ácidos urónicos de la extracción con H₂O, etanol al 50 y 80% después de precipitar.

Azúcares Monosacáridos	
No.	Muestra
1	Mucílago en polvo, extracción con etanol al 50% (1:1, W/V, 22°C).
2	Mucílago en polvo, extracción con etanol al 80% (1:1, W/V, 22°C).
3	Mucílago en polvo, extracción con H ₂ O (1:8, W/V) a 83°C por 2 h. (usando el método de Zavala-Mendoza, 2012).
4	Mucílago en polvo, extracción con H ₂ O (1:2, W/V) a 83°C por 1 h. (usando el método de Rodríguez-González, 2010).

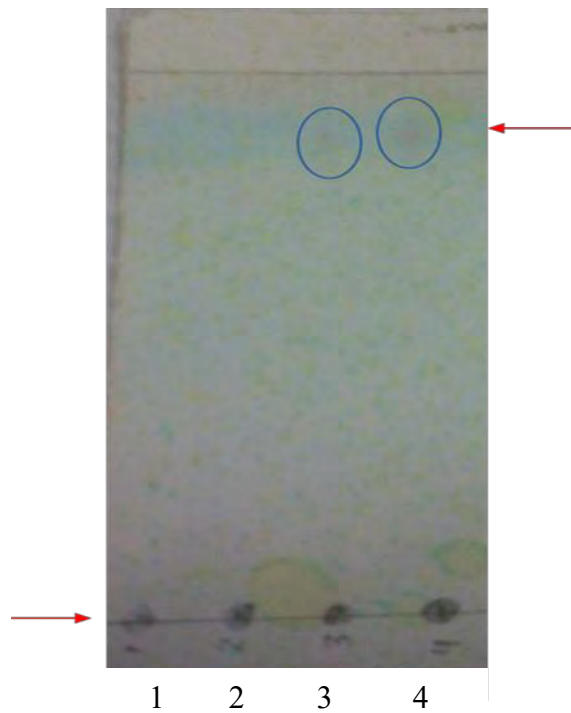


Figura 30. Placa CCF para monosacáridos de la comparación de extracciones con etanol al 50, 80%, y los 2 métodos de extracción después de precipitar.

6.1.2 Cromatografía de gases

La funcionalidad de un hidrocoloide como goma, pectina o mucílago usado para una aplicación comercial está controlada por su estructura y conformación en soluciones acuosas y la forma que están influenciados por interacciones específicas o no específicas con otros ingredientes. La concentración, el grado de polimerización y tamaño (peso molecular y dimensiones) son otros factores que determinan sus propiedades físicas, ya que cadenas ramificadas de cierto peso molecular son capaces de producir interacciones intra e intermolecular en más alto porcentaje entre las cadenas poliméricas que las cadenas lineales, y por lo tanto, la viscosidad de las cadenas ramificadas será mayor (Al-Assaf y Phillips, 2009). De acuerdo con lo anterior, se decidió caracterizar el tipo de monosacárido presente en el mucílago de cada especie de *Opuntia* mediante la CG-MS.

El análisis de mucílago por CG indicó la presencia de galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácidos urónicos, además de glucosa para las seis especies de *Opuntia* analizadas (Fig. 31), lo cual concuerda con lo reportado por Habibi *et al.* (2004), Ginestra *et al.* (2009), Ribeiro *et al.* (2010), y Majdoub *et al.* (2010) para *O. ficus-indica*.

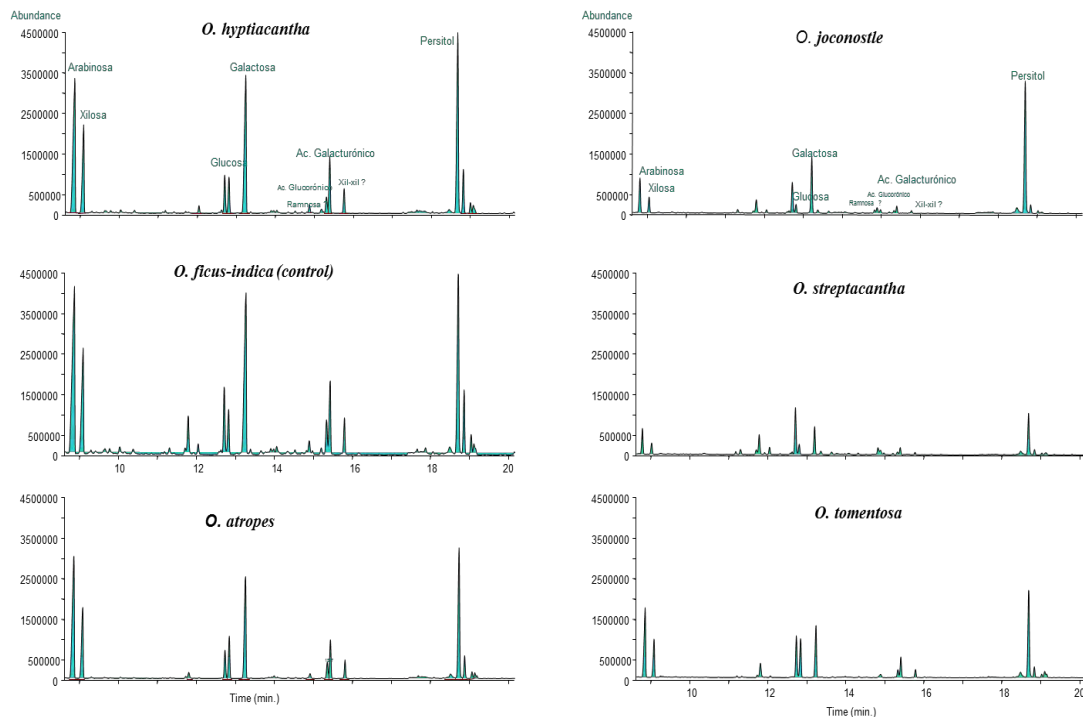


Figura 31. Perfil cromatográfico de los carbohidratos identificados en el mucílago de las seis especies de *Opuntia*.

Los resultados de la cuantificación de azúcares del mucílago de las seis especies de *Opuntia* muestran que en general los azúcares más abundantes fueron arabinosa (26.83-35.36%) y galactosa (21.59-45.48%), siguiéndole xilosa (12.23-17.05%), ácidos urónicos (5.59-13.91%), glucosa (5.18-16.21%) y ramnosa (1.41-5.40%). Estos resultados tienen gran similitud con los porcentajes de estos azúcares reportados por Trachtenberg y Mayer (1981) y Nobel *et al.* (1992), y hubo diferencias con lo reportado por McGarvie (1981a), Medina-Torres (2000), Goycoolea y Cárdenas (2003), Arizmendi (2004), Habibi (2004) y Majdoub *et al.* (2010) en mucílago de *Opuntia ficus-indica*. Cabe mencionar que se encontró una mayor diferencia con respecto a lo reportado por Cárdenas *et al.* (2007). Estas diferencias con respecto a los autores posiblemente se deban a la estructura del mucílago de *Opuntia*, que es dependiente de la especie, la edad del nopal, las condiciones de extracción, la ubicación (suelo) y otros factores ambientales como lo indican Goycoolea y Cárdenas (2003), Ribeiro *et al.* (2010), Cárdenas *et al.* (2007) y Majdoub *et al.* (2010).

En los resultados del ANOVA ($\alpha = 0.05$) (Fig. 32-37) se obtuvo una $P < 0.0001$ para todos los azúcares, lo cual indica que el mucílago de al menos una de las especies es diferente significativamente al resto en lo que respecta a los promedios de azúcares presentes. Por lo tanto, se prosiguió a realizar la prueba de Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$) para comprobar si es una o son más las especies que son diferentes significativamente en sus promedios (Tabla 12).

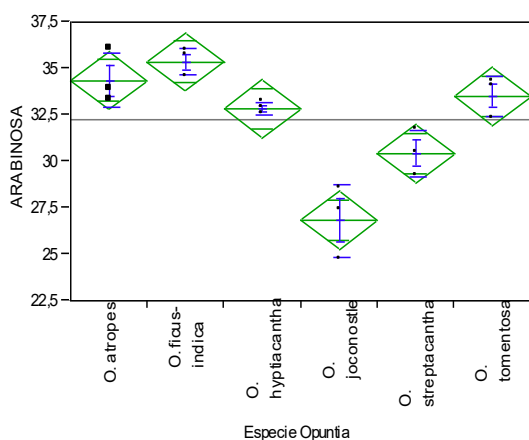


Figura 32. Resultados de arabinosa para las seis especies de *Opuntia*.

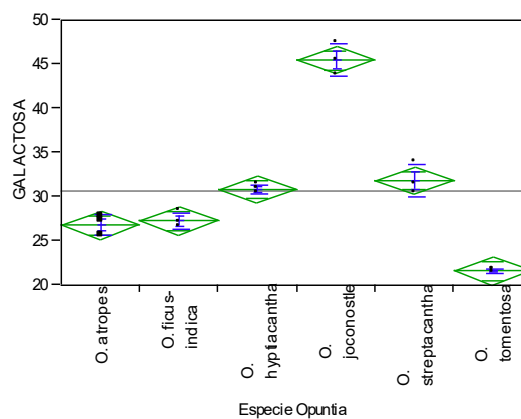


Figura 33. Resultados de galactosa para las seis especies de *Opuntia*.

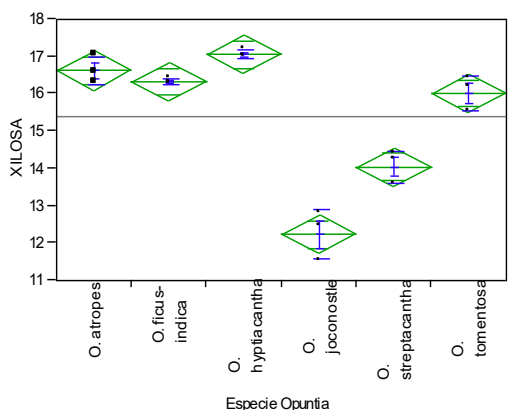


Figura 34. Resultados de xilosa para las seis especies de *Opuntia*.

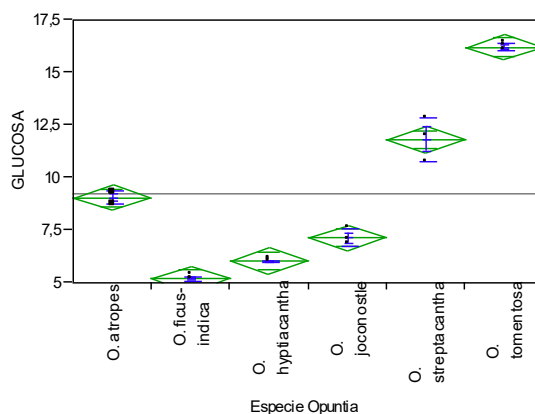


Figura 35. Resultados de glucosa para las seis especies de *Opuntia*.

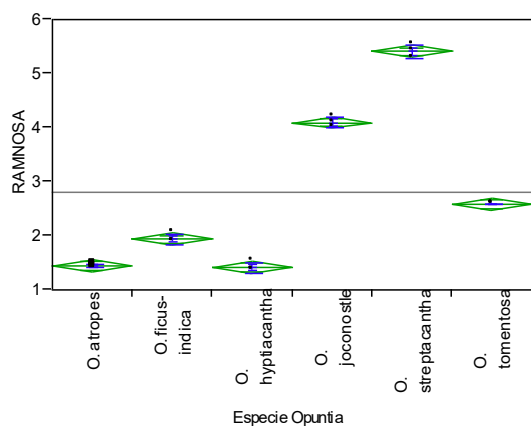


Figura 32. Resultados de ramnosa para las seis especies de *Opuntia*.

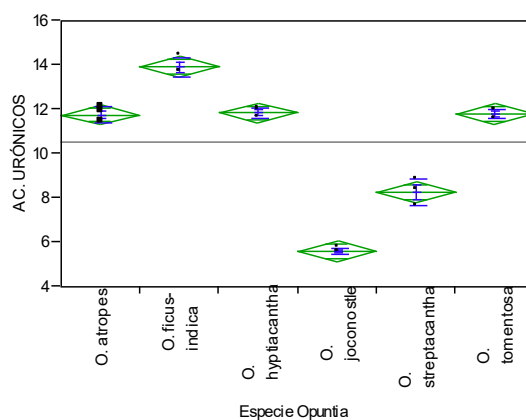


Figura 37. Resultados de ácidos urónicos para las seis especies de *Opuntia*.

Los resultados del análisis estadístico determinaron la existencia de efecto de especie ($P < 0.0001$) sobre la cantidad promedio de azúcares presentes. En cuanto a la galactosa, el mucílago de *O. joconostle* presentó un mayor ($P \leq 0.05$) contenido de este azúcar ($45.48\% \pm 1.79$) en comparación con el resto de las especies evaluadas. Mientras que el mucílago de *O. tomentosa* fue la especie con menor aporte ($P \leq 0.05$) de galactosa ($21.59\% \pm 0.18$) (Tabla 11). Se podría creer que a mayor porcentaje de este azúcar en una especie podría haber más sitios de unión con los azúcares ramificantes, como xilosa y ramnosa y por lo tanto, aumentaría el grado de polimerización, y como consecuencia podría tener mayor viscosidad, sin embargo, si aumenta el porcentaje de este azúcar, el porcentaje de los

azúcares ramificantes podría disminuir, por lo tanto, la viscosidad posiblemente se vería afectada.

Tabla 11. Medias de la composición química de las seis especies de *Opuntia* (%)

Especie <i>Opuntia</i>	Arabinosa	Galactosa	Xilosa	Glucosa	Ramnosa	Ács. Urónicos
<i>ficus-indica</i>	35.36 ^a ±0.72	27.26 ^c ±0.97	16.32 ^a ±0.08	5.18 ^c ±0.11	1.93 ^d ±0.09	13.91 ^a ±0.41
<i>Atropes</i>	34.36 ^a ±1.44	26.75 ^c ±1.16	16.62 ^a ±0.36	9.05 ^c ±0.32	1.44 ^c ±0.03	11.76 ^b ±0.33
<i>hyptiacantha</i>	32.82 ^{ab} ±0.31	30.83 ^b ±0.48	17.05 ^a ±0.11	6.03 ^{dc} ±0.04	1.41 ^c ±0.09	11.84 ^b ±0.22
<i>Joconostle</i>	26.83 ^c ±1.95	45.48 ^a ±1.79	12.23 ^c ±0.65	7.13 ^d ±0.40	4.09 ^b ±0.10	5.59 ^d ±0.14
<i>streptacantha</i>	30.43 ^b ±1.23	31.83 ^b ±1.75	14.04 ^b ±0.42	11.81 ^b ±1.03	5.40 ^a ±0.11	8.26 ^c ±0.60
<i>Tomentosa</i>	33.50 ^{ab} ±1.08	21.59 ^d ±0.18	16.02 ^a ±0.46	16.21 ^a ±0.16	2.58 ^c ±0	11.80 ^b ±0.21

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa en las medias entre especies, Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$).

En lo que corresponde al aporte (cantidad) de glucosa por especie, el mucílago de *O. tomentosa* es la que presentó un promedio superior ($P \leq 0.05$) de este azúcar (16.21% ± 0.16) en comparación con el resto de las especies evaluadas; siendo el mucílago de *O. ficus-indica* e *O. hyptiacantha* las especies que aportan menos ($P \leq 0.05$) glucosa y cuyos promedios fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$): 5.18% ± 0.11 y 6.03% ± 0.04 , respectivamente. A pesar de que Gibson y Nobel (1990) y McGarvie y Parolis (1981a) no reportan la glucosa en la estructura del mucílago, los resultados demuestran que sí hay presencia de este azúcar, lo cual coincide con lo reportado por Habibi (2004) (1.5%), Ginestra *et al.* 2007, Ribeiro *et al.* (2010), Majdoubd *et al.* (2010) (1.3% para *O. ficus-indica* y 0.4% para *O. litoralis*), sin embargo, los valores de estos autores son menores a los resultados de este estudio.

En la comparación de medias para ramnosa, el mucílago de *O. atropes* y *O. hyptiacantha* fueron los que obtuvieron menor cantidad ($P \leq 0.05$) de este azúcar: 1.44% ± 0.03 y 1.41% ± 0.09 , respectivamente, y *O. streptacantha* la mayor cantidad ($P \leq 0.05$) (5.40% ± 0.11). Debido a que este azúcar forma parte del esqueleto principal del mucílago, podría ser que entre mayor cantidad de este azúcar presente en alguna especie, podría ser

menor el grado de polimerización ya que disminuiría la cantidad de los azúcares de ramificación como xilosa y arabinosa, por lo tanto, la viscosidad posiblemente disminuiría.

Con los resultados obtenidos por CG-MS sobre la composición de carbohidratos en el mucílago de las diferentes especies de *Opuntia*, se puede inferir sobre su posible uso como agente texturizante o espesante en la industria alimentaria. De acuerdo a la estructura hipotética del mucílago de *O. ficus-indica* (Fuente: Gibson y Nobel, 1990; McGarvie y Parolis, 1981a), las ramificaciones de la estructura del polisacárido están conformadas por tres unidades de galactosa que a su vez se unen a residuos de arabinosa y xilosa, por lo tanto, los grupos funcionales de estos dos últimos azúcares son los más disponibles para interactuar, debido a su conformación estructural es más probable que las interacciones sean intermoleculares, y que haya pocos grupos funcionales que interactúen con el agua, y de esta manera su solubilidad puede ser más baja, pero la viscosidad puede aumentar, de acuerdo a esto, se puede decir teóricamente que el mucílago de las especies que contienen mayor porcentaje de arabinosa (*O. ficus-indica* sin diferencia significativa con *O. atropes*, *O. tomentosa* y *O. hyptiacantha*) y xilosa (*O. hyptiacantha* sin diferencia significativa con *O. atropes*, *O. ficus-indica* y *O. tomentosa*) generarán mayor viscosidad que las otras dos especies, especialmente *O. joconostle* que es la que contiene menor porcentaje tanto de arabinosa como de xilosa, seguida de *O. streptacantha* (Tabla 13).

Además de esto, el contenido de ácidos urónicos también influye en la viscosidad del mucílago debido a las interacciones de sus grupos funcionales en forma iónica con el agua o con ciertos cationes (Ca^{+2}), la especie con mayor porcentaje de estos compuestos se presentó en la especie control (*O. ficus-indica*), siguiéndole *O. atropes*, *O. hyptiacantha* y *O. tomentosa* (estas tres últimas especies sin diferencia significativa entre ellas), seguidas de *O. streptacantha* y con menor valor nuevamente *O. joconostle*. Por lo tanto se podría decir, que el mucílago de *O. ficus-indica* en solución tiene mayor contenido de cargas negativas que pueden ser repulsadas entre sí, y por lo tanto, la cadena polimérica podría expandirse ocupando más espacio y haciéndose más resistente a fluir entre las moléculas del H_2O , de tal forma que la viscosidad aumentaría. Sin embargo, también es importante resaltar que las cargas negativas derivadas de los ácidos urónicos ionizados podrían ser neutralizadas con la presencia de iones de Ca^{2+} .

De acuerdo a los resultados, es posible que aparte del mucílago de la especie comercial (*O. ficus-indica*) que se utiliza como aditivo en la industria alimentaria, de igual manera el mucílago de las especies silvestres *O. atropes*, *O. tomentosa* y *O. hyptiacantha* puede ser utilizado como mejorador de textura y propiedades reológicas en alimentos. No obstante, para poder confirmar la viscosidad hipotética mencionada en base a estos resultados, es necesario realizar un análisis reológico donde se estudie la viscosidad y textura del mucílago de cada especie. Además, la viscosidad del mucílago también depende de otros factores como la cantidad de Ca^{2+} presente, el pH (Trachtenberg y Mayer, 1982a) y grado de esterificación (Cárdenas *et al.*, 2007).

6.1.3 Espectroscopía FTIR

En los resultados obtenidos por espectroscopía de FTIR se presentó homogeneidad en las seis especies de *Opuntia* mostrando las mismas bandas en cada especie. Se observó ausencia de bandas a los 1749 cm^{-1} , 1730 cm^{-1} ó 1736 cm^{-1} , que corresponden a las vibraciones del enlace C=O de ácidos y grupos carboxílicos esterificados según Cárdenas *et al.* (2007), Habibi (2004) y Majdoub *et al.* (2010). Pero, hay presencia de dos bandas en 1625.97 y 1423.05 cm^{-1} que pueden corresponder a las regiones $1600\text{-}1650$ y $1400\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ posiblemente debido a la ionización de las moléculas de ácidos y grupos carboxilos no esterificados (Cárdenas *et al.*, 2007, Habibi, 2004). Lo cual indica que la molécula de mucílago de las seis especies de *Opuntia* son de bajo grado de esterificación esto concuerda con lo reportado por Sáenz *et al.* (2004) y Cárdenas *et al.* (2007). También se presenta una banda a 3405.68 cm^{-1} que puede corresponder a la banda a 3370 cm^{-1} de las vibraciones del OH del polisacárido como lo menciona Habibi (2004). Se encontró otra banda a 2933.35 cm^{-1} que puede pertenecer a las vibraciones de CH y CH_2 de los polisacáridos como hace referencia Habibi (2004) para las bandas 2918 y 2850 cm^{-1} . Además, se pueden observar también bandas en la región $1324.29\text{-}1252.34\text{ cm}^{-1}$ que pueden ser de las vibraciones $\delta\text{C-H}$, δCH_2 y $\delta\text{O-H}$ de los polisacáridos según Habibi (2004) al igual que las bandas encontradas en la región $1084.27\text{-}1046.47\text{ cm}^{-1}$ que pueden atribuirse a las vibraciones de C-C y C-O de lo polisacáridos (Fig. 38).

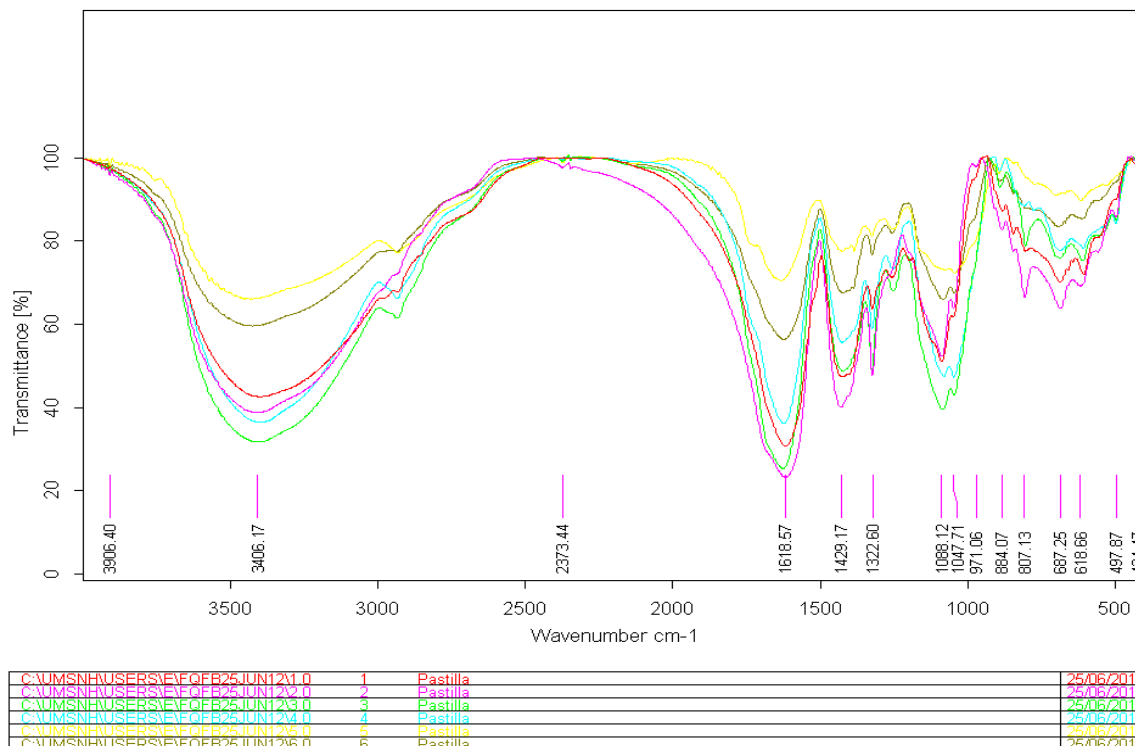


Figura 33. Espectro de IR de las seis especies de *Opuntia*.

(Pastilla 1: *O. joconostle*, pastilla 2: *O. ficus-indica*, pastilla 3: *O. streptacantha*, pastilla 4: *O. tomentosa*, pastilla 5: *O. atropes*, pastilla: *O. hyptiacantha*).

6.1.4 Minerales

Los resultados revelan que los minerales más abundantes en el mucílago de las seis especies de *Opuntia* fueron el Mg, Ca y K, esto coincide para nopal entero de la especie *O. ficus-indica* reportado por Loubet (2008), Ramirez-Moreno *et al.* (2011), Galizzi *et al.* (2004) y McConn y Nakata (2004) que indican que los minerales más abundantes son el K, seguido del Ca y Mg, respectivamente. A la concentración de estos minerales en el mucílago de las seis especies estudiadas le siguen en orden decreciente las concentraciones de P, Na, Fe, Zn y Cu.

Como se puede observar en la Tabla 12 el Mg es el mineral con la mayor concentración en el mucílago de las especies *O. ficus-indica*, *O. joconostle*, y *O. tomentosa*, el Ca en *O. hyptiacantha* y *O. streptacantha* y el K en *O. atropes*.

Tabla 12. Resultados de los minerales (Ca, K, Mg, P, Na, Fe, Zn y Cu) y relación Ca/P en las seis especies de *Opuntia*

Mineral (mg/100 g)	<i>O. ficus-indica</i>	<i>O. Atropes</i>	<i>O. hyptiacantha</i>	<i>O. joconostle</i>	<i>O. streptacantha</i>	<i>O. tomentosa</i>
Ca	799.17 ^b ±0.04867	1097.67 ^b ±0.093	2171.0 ^a ±0.129	2054.83 ^a ±0.1853	2340.23 ^a ±0.1227	890.83 ^b ±0.0635
K	1886.71 ^c ±0.01623	3237.66 ^a ±0.02524	1735.73 ^c ±0.009	2452.43 ^{abc} ±0.02149	1931.95 ^{bc} ±0.01755	2935.96 ^{ab} ±0.01506
Mg	5996.67 ^a ±0.028	1690.0 ^c ±0.019	1610.0 ^c ±0.017	3296.67 ^b ±0.0182	2063.33 ^c ±0.0095	3506.67 ^b ±0.01067
P	226.66 ^c ±5.7735	463.33 ^a ±15.2753	186.66 ^c ±11.5470	230 ^c ±30	300 ^b ±10	186.66 ^c ±11.5470
Na	13.48 ^a ±0.0046	13.76 ^a ±0.00522	14.85 ^a ±0.0038	14.11 ^a ±0.0042	13.88 ^a ±0.00583	14.60 ^a ±0.00385
Fe	3.81 ^c ±0.0642	7.18 ^a ±0.0193	5.79 ^{ab} ±0.1322	4.41 ^{bc} ±0.02283	5.68 ^{ab} ±0.0945	3.55 ^c ±0.0375
Zn	11.66 ^a ±0.1277	2.92 ^d ±0.0793	4.37 ^c ±0.0662	4.57 ^c ±0.0958	4 ^{cd} ±0.0735	6.64 ^b ±0.0593
Cu	0.79 ^a ±0.017	0.25 ^{cd} ±0.0213	0.015 ^e ±0.00683	0.32 ^c ±0.03083	0.17 ^d ±0.015	0.58 ^b ±0.01417
Ca/P	3.52 ^{cd} ±0.1440	2.36 ^d ±0.4579	11.63 ^a ±0.4242	8.93 ^b ±1.6684	7.80 ^b ±0.6193	4.77 ^c ±0.5145

Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa en las medias entre especies, Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$).

6.1.4.1 Calcio

Los resultados en torno a Ca mostraron que *streptacantha* (2340.23 mg/100g), *O. hyptiacantha* (2171 mg/100g) y *O. joconostle* (2054.84 mg/100g) fueron las que concentran la mayor cantidad de este mineral ($P \leq 0.05$), en comparación con el resto de las especies evaluadas, sin embargo, estas tres especies fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$) en la concentración de Ca (Tabla 13). *O. ficus-indica* (799.17 mg/100g) la especie control fue la que menor contenido de Ca presentó ($P \leq 0.05$) en comparación con las especies evaluadas. Además, el valor de *O. ficus-indica* fue menor a lo reportado por Sepúlveda (2007) 9.86% (9860 mg/100g) y mayor al establecido por Trachtenber y Mayer (1981): contenido de Ca de 0.022% (22 mg/100g) para el mucílago de *O. ficus-indica*. Posiblemente la diferencia de la concentración de Ca y de otros minerales en el mucílago, se deba al método de extracción del mucílago y a otros factores, tales como: a) estado de maduración, a mayor

grado de madurez mayor concentración de Ca (Loubet, 2008; Rojas *et al.*, 2011; Contreras-Padilla *et al.*, 2012; Rodríguez-García *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2011). b) pH del suelo, entre más alcalino sea el suelo, mayor será la concentración de Ca en la planta (Galizzi *et al.*, 2004) (Tabla 12 y Fig. 39).

Comparando el resultado de Ca en el mucílago de *O. ficus-indica* con los resultados de Ramírez-Moreno *et al.* (2011), Contreras-Padilla *et al.* (2012), Rodríguez-García *et al.* (2007) y Loubet (2008), se observa que la concentración de Ca es mayor en el nopal entero que en el mucílago, esto sugiere que parte de la concentración del Ca presente en el nopal se pierde en la parte insoluble del nopal al momento de la extracción del mucílago. Por esta razón, es posible que los demás minerales también puedan presentarse en menor concentración en el mucílago.

De acuerdo con Trachtenberg y Mayer (1982a) y (Goycoolea y Cárdenas, 2003), quienes reportan que la viscosidad del mucílago en solución es afectada fuertemente por la concentración de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}), principalmente Ca^{2+} , puesto que la molécula del mucílago tiene una especial afinidad por el Ca^{2+} , la interacción de estos cationes (Ca^{2+}) con la cadena polimérica del mucílago evita su ionización, ya que neutraliza las cargas negativas, reduciendo la repulsión intramolecular y expansión de la cadena polimérica, y por lo tanto, evitando la rigidez de las moléculas. Sin embargo, Trachtenberg y Mayer (1982a) indican que la interacción con Ca^{2+} causa la formación de pequeños volúmenes hidrodinámicos en solución y geles fuertes con menos contenido de agua, mientras que la ausencia de Ca^{2+} aumenta los volúmenes hidrodinámicos de las moléculas y forma geles de alto contenido de agua y baja resistencia mecánica.

Apartir de esta información y base a los resultados de la concentración de Ca obtenido en el mucílago de las seis especies estudiadas, se podría suponer que el mucílago de *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha* y *O. joconostle* presentará menor viscosidad en solución que el mucílago de las otras especies, ya que fue el mucílago de las especies con mayor contenido de Ca. Mientras que el mucílago de *O. ficus-indica*, *O. tomentosa* y *O. atropes* podrían presentar una solución con mayor viscosidad, debido a su bajo contenido de Ca, lo cual sugiere que la viscosidad del mucílago de *O. ficus-indica*, *O. tomentosa* y *O. atropes* sería más alta a la *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha* y *O. joconostle*. Pero para

poder confirmar esto, se tendría que realizar un análisis reológico donde se analicen todas las características que contribuyen a la viscosidad y la textura del mucílago.

Por otra parte, el grado de polimerización y tamaño (peso molecular y dimensiones) del mucílago son otros factores que también determinan su viscosidad y propiedades físicas (Al-Assaf y Phillips, 2009).

6.1.4.2 Calcio/Fósforo

Otro factor importante en la biodisponibilidad del Ca es la relación Ca/P (Loubet, 2008). Debido a que el fósforo presente en el nopal se encuentra principalmente en forma de fitatos, estos compuestos tienen la propiedad de secuestrar el Ca de los alimentos impidiendo su absorción para la formación de masa ósea. Por lo tanto, es importante que la relación Ca/P en la dieta no sea menor a 1 para no interferir con la absorción del Ca en el organismo (Ramírez-Moreno *et al.*, 2011; Loubet, 2008; Anderson *et al.*, 1972).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el mucílago de la especie que presentó menor ($P \leq 0.05$) relación Ca:P fue *O. atropes* (2.36) y el mucílago con mayor ($P \leq 0.05$) relación Ca:P fue *O. hyptiacantha* (11.63) (Tabla 12 y Fig. 40), esta relación tan alta puede afectar en la absorción de Ca debido a la deficiencia de P (Loubet, 2008).

6.1.4.3 Fósforo

Los resultados obtenidos muestran que el mucílago de la especie que obtuvo mayor concentración de P ($P \leq 0.05$) fue *O. atropes* (463.33 mg/100g), y por lo tanto, podría haber mayor interacción del P con el Ca en forma de fitatos de Ca, lo cual lo hace menos biodisponible, y el mucílago de *O. joconostle* (230 mg/100g), *O. ficus-indica* (226.66 mg/100g), *O. hyptiacantha* (186.66 mg/100g) y *O. tomentosa* (186.66 mg/100g) presentan menor contenido ($P \leq 0.05$) (Tabla 12 y Fig. 41).

6.1.4.4 Potasio

En cuanto a los resultados del análisis de K, resultó que el mucílago de *O. atropes* (3237.66 mg/100g), *O. tomentosa* (2935.96 mg/100g) y *O. joconostle* (2452.43 mg/100g), son los que tienen mayor cantidad de K ($P \leq 0.05$) y el mucílago de *O. streptacantha* (1931.95 mg/100g), *O. ficus-indica* (1886.71 mg/100g) y *O. hyptiacantha* (1735.73 mg/100g) tienen

menor contenido ($P \leq 0.05$). Todos estos valores son mayores a lo reportado por Sepúlveda (2007) para el mucílago de *O. ficus-indica* que indica que tiene 1.55% (1550 mg/100g) (Tabla 12 y Fig. 42).

6.1.4.5 Magnesio

En cuanto al contenido de Mg el mucílago de la especie *O. ficus-indica* fue el que presentó mayor cantidad ($P \leq 0.05$) de Mg (5996.67 mg/100g), y el mucílago de *O. streptacantha* (2063.33 mg/100g), *O. atropes* (1690 mg/100g) y *O. hyptiacantha* (1610 mg/100g) fueron los que presentaron menor cantidad ($P \leq 0.05$). Sin embargo estos valores son mayores a lo reportado por Trachtenber y Mayer (1982) quienes reportan 0.013% (13 mg/100g) para el mucílago de *O. ficus-indica* (Tabla 12 y Fig. 43).

6.1.4.6 Sodio

No se encontró efecto de especie de nopal ($P \leq 0.05$) sobre la cantidad de Na en mucílago por lo tanto la cantidad de Na en el mucílago de las seis especies se encuentra entre 13.4 a 14.8 mg/100 g (Tabla 12 y Fig. 44).

6.1.4.7 Hierro

En cuanto a la cantidad de Fe presente en el mucílago de las seis especies, el mucílago con mayor cantidad ($P \leq 0.05$) fue *O. atropes* (7.18 mg/100 g), *O. hyptiacantha* (5.79 mg/100 g) y *O. streptacantha* (5.68 mg/100 g), y el mucílago de *O. joconostle* (4.41 mg/100 g), *O. ficus-indica* (3.81 mg/100 g) y *O. tomentosa* (3.55 mg/100 g) presentaron la menor cantidad ($P \leq 0.05$) de este mineral (Tabla 12 y Fig. 45).

6.1.4.8 Zinc

El mucílago con mayor ($P \leq 0.05$) contenido de Zn fue *O. ficus-indica* (11.66 mg/100 g) y el mucílago con menor ($P \leq 0.05$) cantidad fue *O. atropes* (2.92 mg/100 g) (Tabla 12 y Fig. 46).

6.1.4.9 Cobre

Y por último, en cuanto al contenido de Cu, el mucílago de *O. ficus-indica* (0.79 mg/100 g) es nuevamente el mayor ($P \leq 0.05$), y *O. hyptiacantha* (0.015 mg/100 g) contiene la menor ($P \leq 0.05$) cantidad de Cu (Tabla 12 y Fig. 47).

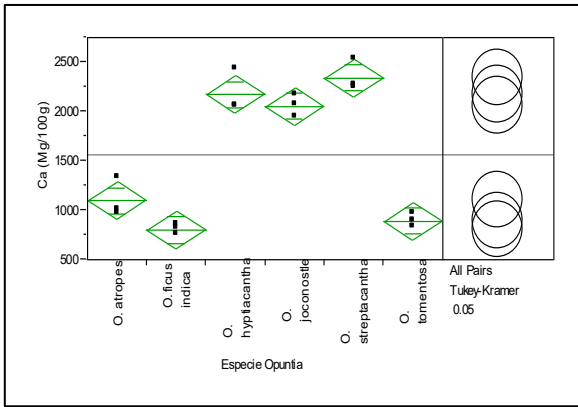


Figura 34. Anova y Tukey-Kramer de Ca.

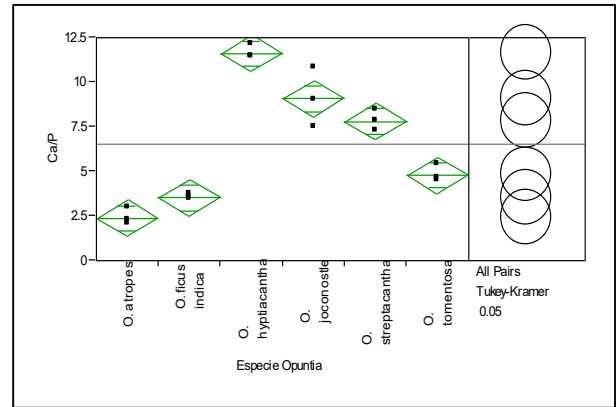


Figura 40. Anova y Tukey-Kramer de Ca/P.

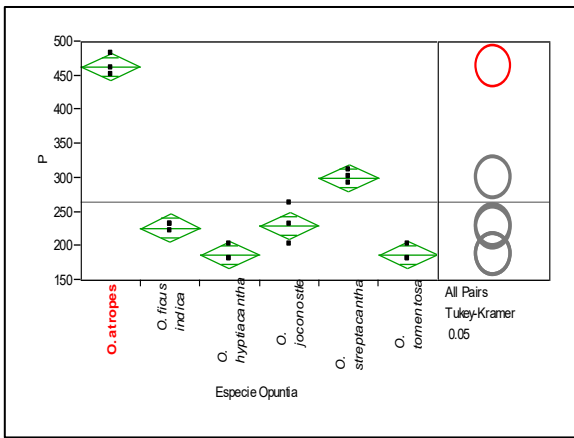


Figura 41. Anova y Tukey-Kramer de P.

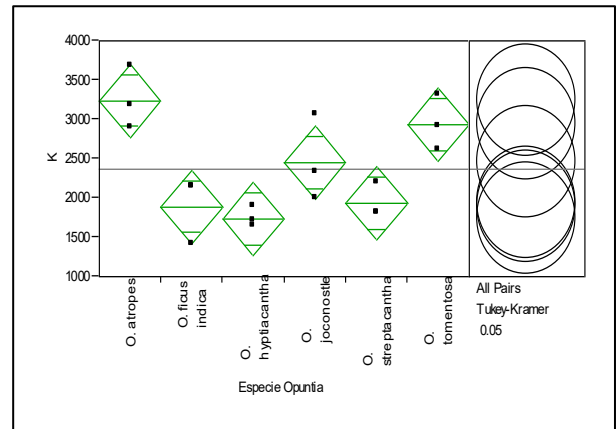


Figura 42. Anova y Tukey-Kramer de K.

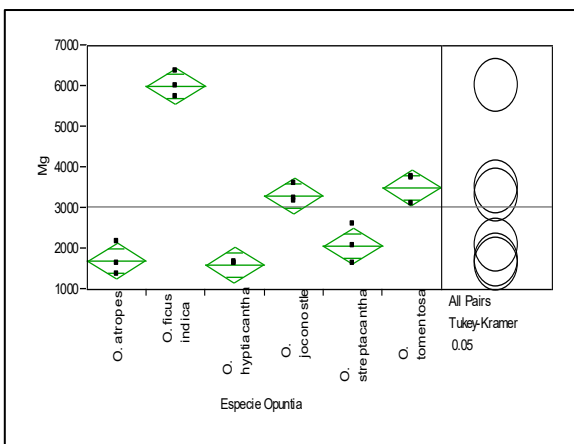


Figura 43. Anova y Tukey-Kramer de Mg.

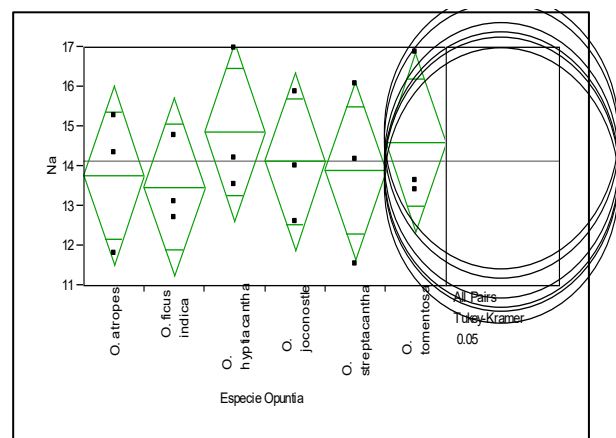


Figura 35. Anova y Tukey-Kramer de Na.

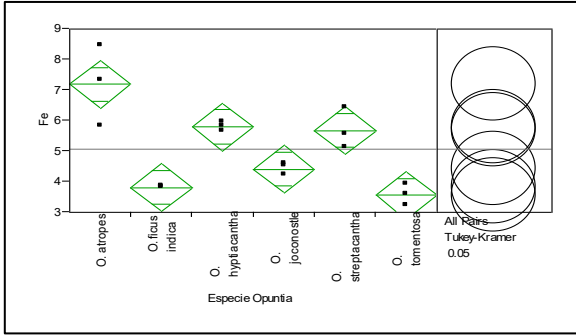


Figura 36. Anova y Tukey-Kramer de Fe.

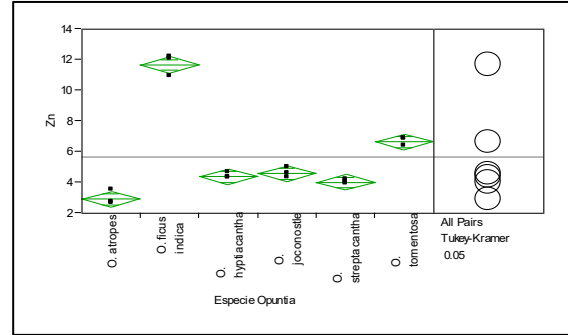


Figura 37. Anova y Tukey-Kramer de Zn.

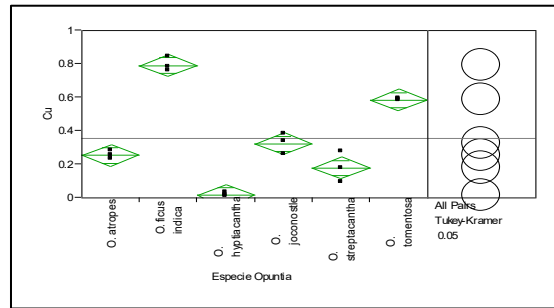
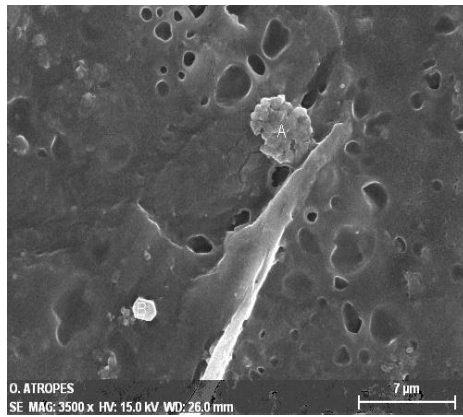


Figura 38. Anova y Tukey-Kramer de Cu.

6.1.5 Microscopía electrónica de barrido

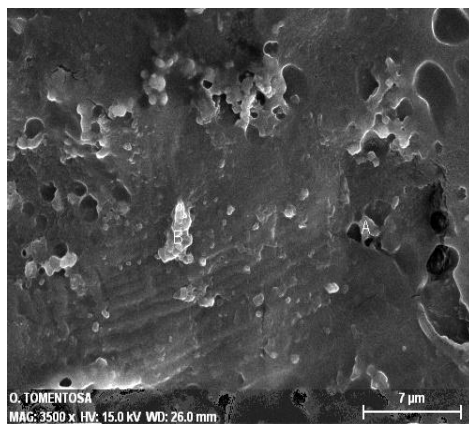
Los resultados de las seis especies de *Opuntia* muestran la presencia de diferentes sales de Ca, la mayoría de ellos son amorfas como se muestra en *O. atropes*, *O. hyptiacantha*, *O. streptacantha*, *O. joconostle* y *O. ficus-indica* (Fig. 50, 52, 51 y 53, respectivamente) y en algunos se presenta la forma hexagonal, prisma, cúbica (*O. atropes* Fig. 48 y *O. tomentosa*, Fig. 49), y esférica (*O. tomentosa*, Fig. 49 y *O. hyptiacantha*, Fig. 50). En el análisis de composición centesimal se muestra un alto contenido de Ca y se asume que los cristales son de carbonato de Ca debido a lo reportado en la literatura. En ninguna especie se observaron cristales en forma de drusas que es la morfología característica del oxalato de Ca, esto concuerda con lo reportado para *O. ficus-indica* por Rojas *et al.* (2010).

Por otra parte, el microanálisis también reporta la presencia de K y Mg en altas proporciones aún más que Ca en el mucílago de las seis especies. Lo cual podría indicar que una proporción de calcio presente en el nopal se quedó en el residuo que queda después de obtener el mucílago.



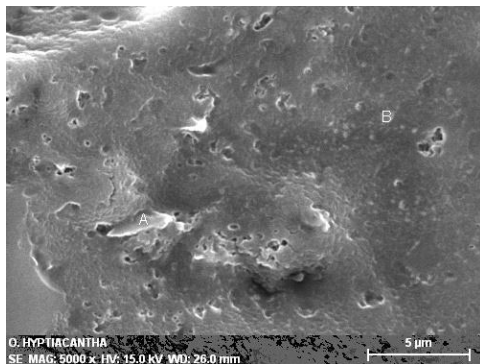
Elemento	(%)
Carbono	3,239782
Oxígeno	80,05211
Magnesio	4,191089
Azufre	1,057272
Potasio	4,008453
Calcio	7,449292

Figura 39. Cristales de calcio en *O. atropes*. Tabla 13. Microanálisis de *O. atropes*.



Elemento	(%)
Carbono	6,999356
Oxígeno	78,30763
Magnesio	5,323836
Azufre	0,895788
Potasio	3,962391
Calcio	3,780987
Manganeso	0,366361
Aluminio	0,067895
Fósforo	0,293759

Figura 40. Cristales de Ca en *O. tomentosa*. Tabla 14. Microanálisis *O. tomentosa*.



Elemento	(%)
Carbono	2,799418
Oxígeno	82,6553
Magnesio	5,826433
Azufre	1,450811
Potasio	4,060422
Calcio	3,205616

Figura 41. Cristales de Ca en *O. hyptiacantha*. Tabla 15. Microanálisis *O. hyptiacantha*.

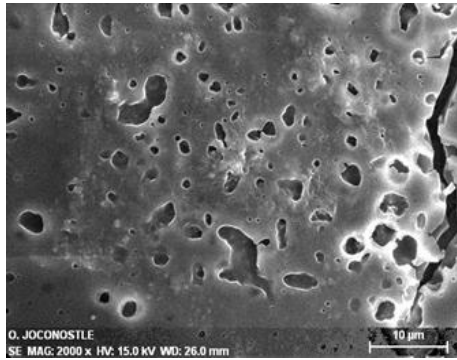


Figura 42. Cristales de Ca en *O. joconostle*.

Elemento	(%)
Carbono	8.4487533
Oxígeno	76.321389
Magnesio	6.1212219
Azufre	1.9253268
Potasio	5.6614447
Calcio	1.2337113
Aluminio	0.0644702
Fósforo	0.1039643

Tabla 16. Microanálisis *O. joconostle*.

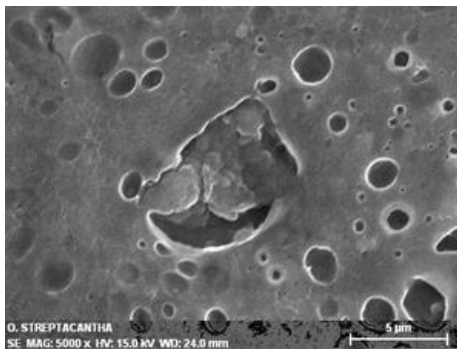


Figura 43. Cristales de Ca en *O. streptacantha*.

Elemento	(%)
Calcio	6,874875
Potasio	5,362397
Carbono	2,590926
Oxígeno	57,7337
Sodio	7,081003
Magnesio	5,663976
Fósforo	0,640142
Azufre	1,270565

Tabla 17. Microanálisis *O. streptacantha*.

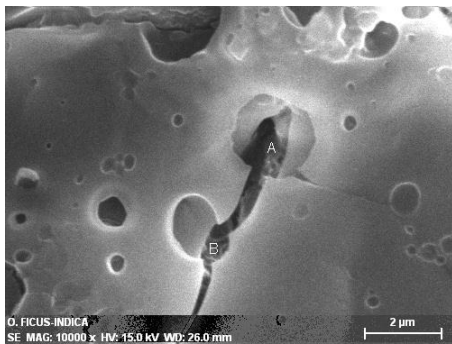


Figura 44. Cristales de Ca en *O. ficus-indica*.

Elemento	(%)
Carbono	9,733815
Oxígeno	79,43061
Magnesio	3,896503
Azufre	0,432754
Potasio	1,374016
Calcio	4,530702
Manganeso	0,569252
Aluminio	2,48E-14
Fósforo	0,03035

Tabla 18. Microanálisis *O. ficus-indica*.

6.1.6 Resonancia magnética nuclear ^{13}C

Los resultados de los espectros de RMN ^{13}C de mucílago en solución alcalina (NaOD) de las seis especies de *Opuntia* se resumen en las Figuras 54, 55, 56 y 57 en donde se pueden apreciar señales a campo alto típicas de grupos metilo y metileno entre 17-23 y 40-60 ppm respectivamente, de alcoholes entre 60-75 ppm, señales en la región de carbonos aromáticos y olefinicos entre 118 y 131 ppm y finalmente a campo bajo entre 170 y 185 ppm señales correspondientes a carbonilos típicas de ésteres o ácidos carboxílicos (Fig. 54).

En los espectros de RMN ^{13}C se esperan señales típicas de carbohidratos que han sido reportados en este tipo de mucílagos. Así por ejemplo, de acuerdo a los estudios en el mucílago de *O. ficus indica* (Matsuhira *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*, 2007; Habibi, 2004; Zhao *et al.* 2007), en este estudio hay evidencia de señal en 173 ppm que corresponde al carbonilo del grupo carboxilo de los ácidos urónicos (Matsuhira *et al.*, 2006; Cárdenas *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Por otra parte, también hay presencia de una señal a 17 ppm, característica del C₆ del grupo metilo de ramnosa; a 77 ppm la cual según McGarvie y Parolis (1981b) corresponde a residuos de ramnopiranosil que indica que pueden estar ligados con enlaces 1→2 del C₂, además de evidencia de la evidente señal a 70 ppm que podría corresponder al C₃ de (1→2)- α -L-ramnosapiranosil, (Zhao *et al.*, 2007 y Matsuhira *et al.*, 2006); una señal a 75 y a 57 ppm que podría corresponder al C₅ y al C₆ de galactosa, respectivamente (Habibi, 2004). Así mismo, la presencia de una señal a 81 ppm que es indicativa de C₂ de arabinosa (Habibi, 2004 y por Zhao *et al.*, 2007).

Sin embargo, pese a que los espectros se obtuvieron con cantidades relativamente altas de mucílago y que algunas señales corresponden aparentemente con las reportadas para los carbohidratos en ningún caso se aprecian señales significativas en la región de carbonos acetálicos en 100 ppm característica de carbohidratos (Fig. 54).

Asumiendo que la ausencia de dichas señales pudiese deberse a la alcalinidad del medio, se procedió a la obtención de los espectros en solución ácida utilizando ácido clorhídrico deuterado del mucílago de la especie *O. ficus-indica*. Sin embargo, aunque ciertamente se apreció un desplazamiento de las señales no se observó señal alguna en 100 ppm (Fig. 55). Fue por este motivo que se obtuvo el espectro de RMN ^{13}C de los carbohidratos en las mismas condiciones alcalinas y en D₂O y se compararon con los

espectros de las diferentes especies de *Opuntia* estudiadas (Fig. 56 y 57). Algunas de las señales típicas de carbohidratos en las referencias fueron observadas lo que corroboró que no se trataba de una cuestión técnica, sino de la ausencia de unas de las señales de los carbohidratos lo cual no es debido a la falta de estos (ya que fue demostrado por el análisis de cromatografía de gases), sino a su proporción relativa con respecto a otros compuestos no identificados.

Cabe resaltar que para la detección de los carbohidratos en las diferentes especies de *Opuntia* analizadas en este trabajo llevadas a cabo por CG, las muestras fueron sometidas a un tratamiento de aislamiento y purificación de carbohidratos que implicaba incluso la acetilación para facilitar la solubilidad en disolventes orgánicos. Seguramente en este proceso, se eliminan otros compuestos que por lo tanto, no pueden ser identificados por CG, pero que por RMN ^{13}C es posible encontrarlos, sin embargo, no han sido identificados hasta el momento por este tipo de estudios, ya que las señales encontradas del presente estudio de estos compuestos (entre 118 y 131 ppm) no corresponden con los compuestos descritos por Matsuiro *et al.* (2006), Cárdenas *et al.* (2007), Habibi (2004) y Zhao *et al.* (2007), compuestos como: ácidos fenólicos (ácidos gálico, cumárico, ferúlico, salicílico y 3,4 dihidroxibenzoico y 4 hydroxybenzoico), flavonoides (iso-quercetina, nicotiflorina, rutina, narcisina e isoramnetina-3-O-glucosido) (Guevara-Figueroa *et al.*, 2010), además de carotenoides como luteína, caroteno y cryptoxantina, compuestos que podrían estar presentes en el mucílago ya que se pueden formar complejos entre los polisacáridos y estos compuestos (Jaramillo-Fores *et al.*, 2003). Sin embargo, las señales obtenidas son lo suficientemente significativas para pensar en productos abundantes que es conveniente identificar (Fig. 54).

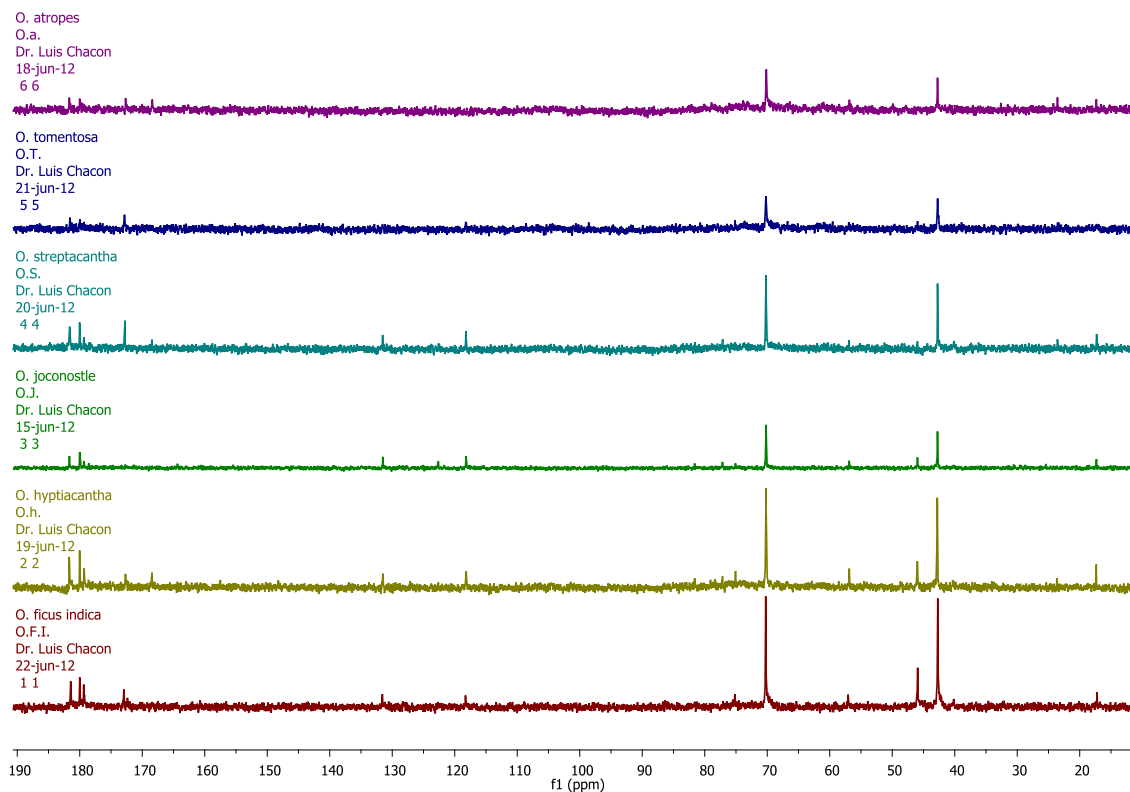


Figura 45. Espectro de de RMN ^{13}C del mucílago de las seis especies de *Opuntia*.

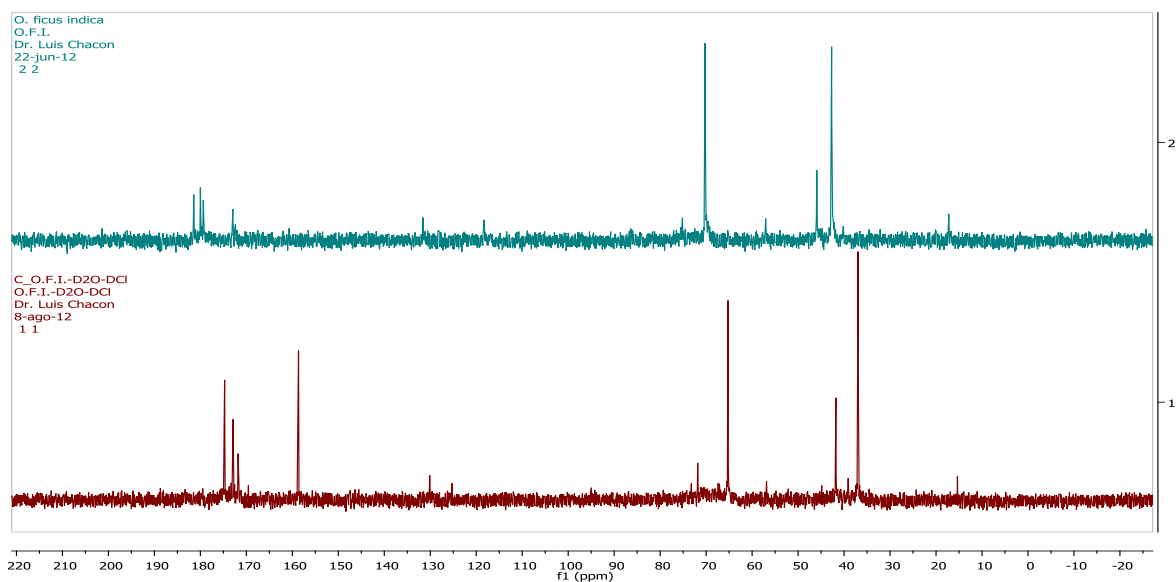


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C del mucílago de *Opuntia ficus-indica* (control) con D_2O y NaOD (condiciones en las que se analizaron los mucílago de las seis especies de *Opuntia*, en la parte de arriba) y mucílago hidrolizado con DCl (en la parte de abajo).

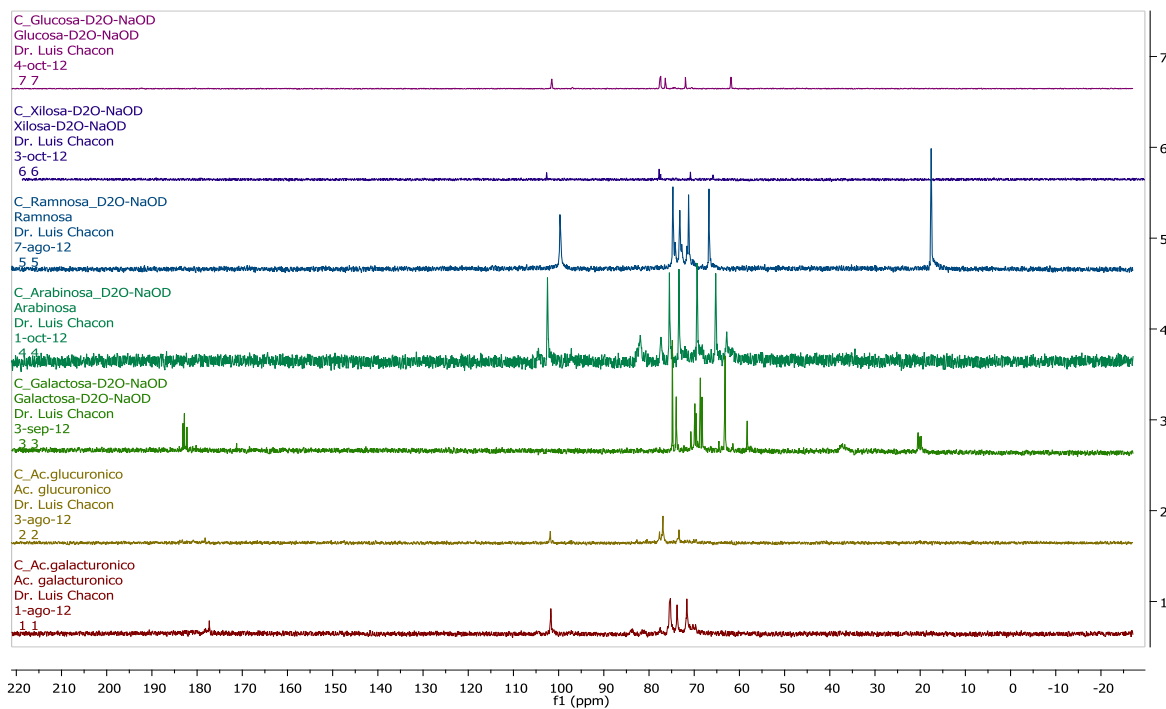


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C de los siete azúcares pertenecientes a la estructura del mucílago de *Opuntia* con D_2O y NaOD (condiciones en las que se analizaron los mucílago de las seis especies de *Opuntia*).

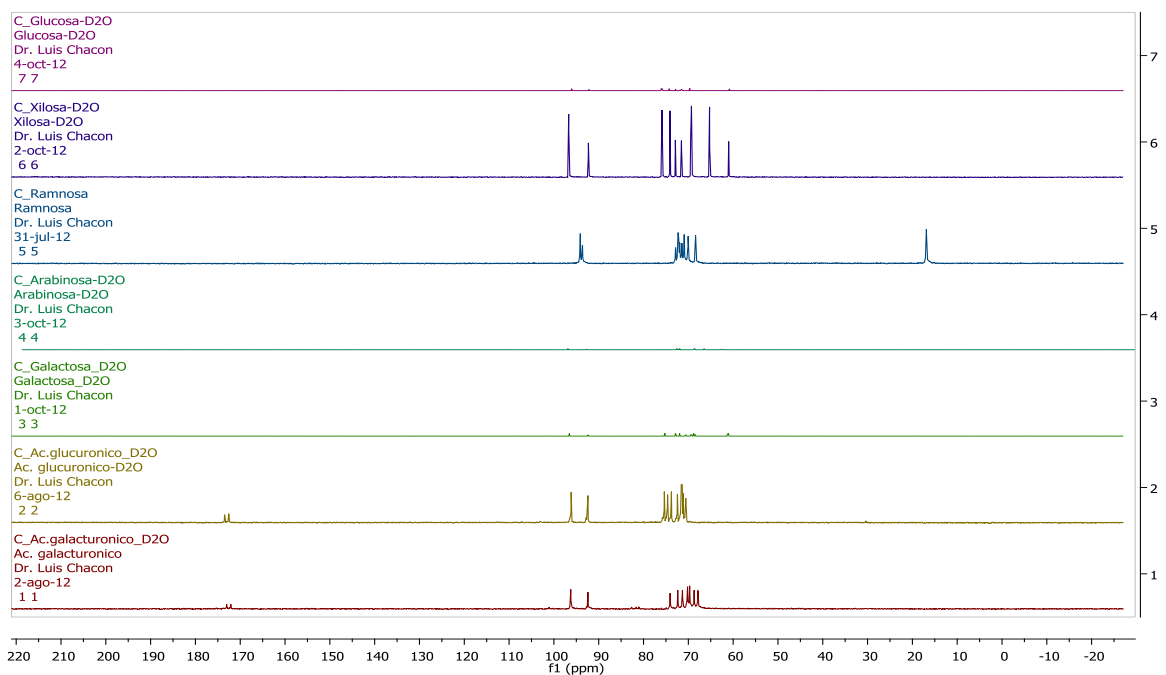


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C de los siete azúcares pertenecientes a la estructura del mucílago de *Opuntia* con D_2O .

6.2 Análisis bromatológico

6.2.1 Humedad

Los resultados muestran que el mucílago de la especie con mayor ($P \leq 0.05$) cantidad de humedad es *O. streptacantha* 8.27%, esto es mayor a lo reportado por Sepúlveda *et al.* (2007) (5.6%) para el mucílago de *O. ficus-indica*, sin embargo, es menor a lo obtenido por Rodríguez-González (2010) (9.31%), pero está dentro del porcentaje adecuado para la estabilidad y evitar el desarrollo de microorganismos (menor a 10%) en el alimento (Loubet, 2008). El mucílago de la especie con menor ($P \leq 0.05$) porcentaje de humedad fue *O. hyptiacantha* con 3.44%. Por lo tanto, se puede decir que el mucílago de las seis especies puede ser almacenado por tiempo prolongado de forma segura (Tabla 19 y Fig. 58).

6.2.2 Cenizas

En este estudio, la especie con el mayor ($P \leq 0.05$) contenido de cenizas, en el mucílago, fue *O. ficus-indica* (15.13%). No obstante, Sepúlveda *et al.* (2007) reportan un porcentaje mayor para esta especie (37.3%) y Rodríguez-González (2010) un valor menor (11.91%). De esta manera, en el presente trabajo, de las seis especies estudiadas, la especie control *O. ficus-indica*, contiene el mayor porcentaje de minerales y *O. hyptiacantha* aporta el menor ($P \leq 0.05$) contenido minerales (10.82%). Con el análisis bromatológico se corroboró que por su contenido de mucílago, las seis especies de *Opuntia* estudiadas son una buena fuente de minerales, sobre todo en cuanto a su contenido de Magnesio (Mg), Calcio (Ca) y Potasio (K) (Tabla 19 y Fig. 59).

6.2.3 Proteína (nitrógeno total proteico)

En cuanto al contenido de proteína del mucílago de *O. ficus-indica* (peso seco), Sepúlveda *et al.* (2007) reportan un porcentaje de proteína de 7.3%, mientras que Rodríguez-González reporta 6.69%. Los resultados del presente estudio para el mucílago de las seis especies son semejantes con estos valores, ya que se obtuvo un porcentaje de proteína de 8.26% a 4%. Siendo el mucílago de *O. streptacantha* el que contiene mayor ($P \leq 0.05$) porcentaje (8.26%), y el mucílago de *O. atropes* con el menor ($P \leq 0.05$) porcentaje (Tabla 19 y Fig. 60).

6.2.4 Fibra dietética

En cuanto a fibra dietética (FD), las seis especies contienen un valor superior a 50%. El mucílago de las especies con el mayor ($P \leq 0.05$) porcentaje de FD fue *O. hyptiacantha* (73%), *O. tomentosa* (68.43%), *O. streptacantha* (67.44%) y *O. joconostle* (65.2%) y el mucílago con el menor ($P \leq 0.05$) porcentaje fue el de las especies *O. atropes* (57.71%) y *O. ficus-indica* (57.23%). Por lo tanto, las especies silvestres estudiadas a excepción de *O. atropes* aportan mayor ($P \leq 0.05$) cantidad de FD que la especie control *O. ficus-indica*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Rodríguez-González (2010), quien obtuvo un porcentaje similar para el mucílago de *O. ficus-indica* (57.83%) (Tabla 19 y Fig. 61).

La FD se compone de FS y FI. La mayor parte de la FD corresponde a FS en el mucílago de las seis especies. El mucílago de la especie *O. ficus-indica* registró el menor porcentaje ($P \leq 0.05$) de FS (51.79%), valor menor al reportado por Rodríguez-González (2010) (56.8%). Por otra parte el mucílago de las especies con mayor porcentaje ($P \leq 0.05$) de FS fueron *O. hyptiacantha* (67.51%), *O. joconostle* (65.2%), *O. tomentosa* (64.4%), *O. streptacantha* (61.07%) y *O. atropes* (57.69%) (Tabla 20 y Fig. 62).

El resto de FD del mucílago de las seis especies, corresponde a FI, el cual es un valor bajo. Sin embargo los valores mayores ($P \leq 0.05$) fueron obtenidos del mucílago de *O. streptacantha* (6.37%), *O. hyptiacantha* (5.5%), *O. ficus-indica* (5.43%) y *O. tomentosa* (4.03%), mientras que los menores ($P \leq 0.05$) porcentajes se obtuvieron del mucílago de *O. joconostle* (0.079%) y *O. atropes* (0.026%). Lo anterior sugiere que el mucílago de *O. atropes* es más puro, ya que casi todo el porcentaje de FD le corresponde a FS, la cual corresponde al mucílago, y no presenta gran cantidad de impurezas (FI). Por su parte Rodríguez-González (2010) obtuvo un 1.03% de FI para el mucílago de *O. ficus-indica*, el cual, tiene variación con los resultados obtenidos en el presente trabajo (Tabla 19 y Fig. 63).

6.2.5 Extracto etéreo (grasa)

En cuanto al contenido de extracto etéreo (grasa), los valores obtenidos para el mucílago de las especies estudiadas fueron bajos: el porcentaje del mucílago de *O. joconostle*, *O. streptacantha* y *O. tomentosa* (0.2, 0.19 y 0.162%, respectivamente) fueron los mayores ($P \leq 0.05$), y el mucílago de *O. ficus-indica*, *O. hyptiacantha* y *O. atropes* (0.09, 0.063 y

0.061%, respectivamente) fueron los que presentaron menor ($P \leq 0.05$) porcentaje. Sin embargo, el resultado del mucílago de las seis especies fue mayor que el que obtuvo Rodríguez-González (2010) para el mucílago de *O. ficus-indica* (0.03%) (Tabla 19 y Fig. 67).

6.2.6 Carbohidratos

La cantidad de carbohidratos obtenida fue en orden decreciente, *O. atropes* 18.67%, *O. ficus-indica* 14.67%, *O. joconostle* 9.82%, *O. tomentosa* 8.21%, *O. hyptiacantha* 6.25% y *O. streptacantha* 1.62%. Mientras que Rodríguez-González (2010) reporta un 13% de carbohidratos presentes en el mucílago de *O. ficus-indica* (Tabla 19 y Fig. 68). Esta cantidad de carbohidratos resultante puede ser debido a que en la extracción de FD, la estructura de FS (mucílago) es dañada por hidrólisis por el ácido y la temperatura como se confirmó en los resultados de CCF, como consecuencia, se rompe la cadena del polisacárido y hay liberación de los azúcares más disponibles, de esta manera el contenido de carbohidratos aumenta.

Tabla 19. Resultados del análisis bromatológico del mucílago de las seis especies de *Opuntia* (peso seco)

Especie <i>Opuntia</i>	Humedad (%)	Cenizas (%)	E. E. (%)	FD (%)	FS (%)	FI (%)	Proteína (%)	Carbohidratos (%)
<i>tomentosa</i>	6.32 ±0.08 ^c	11.26±0.04 ^d	0.162±0.01 ^a	68.43±3.31 ^{ab}	64.4±3.66 ^a	4.03±0.95 ^a	5.59±0.14 ^{cd}	8.21±3.36 ^{abc}
<i>atropes</i>	5.39 ±0.50 ^d	14±0.01 ^b	0.061±0.01 ^b	57.71±1.95 ^b	57.69±1.97 ^{ab}	0.026±0.02 ^b	4±0.53 ^c	18.67±2.19 ^a
<i>hyptiacantha</i>	3.44±0.07 ^e	10.82±0.03 ^e	0.063±0.02 ^b	73±2.20 ^a	67.51±1.52 ^a	5.5±0.69 ^a	6.38±0.36 ^{bc}	6.25±2.21 ^{bc}
<i>joconostle</i>	6.32 ±0.15 ^c	11.72±0.01 ^c	0.2±0.02 ^a	65.2±5.54 ^{ab}	65.12±5.51 ^a	0.079±0.07 ^b	6.7±0.58 ^b	9.82±5.49 ^{abc}
<i>streptacantha</i>	8.27±0.04 ^a	14.19±0.14 ^b	0.19±0.03 ^a	67.44±0.79 ^{ab}	61.07±1.11 ^{ab}	6.37±0.57 ^a	8.26±0.31 ^a	1.62±0.97 ^c
<i>ficus-indica</i>	7.62±0.09 ^b	15.13±0.02 ^a	0.090±0.02 ^b	57.23±7.74 ^b	51.79±5.25 ^b	5.43±2.49 ^a	5.24±0.09 ^d	14.67±7.74 ^{ab}

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa en las medias entre especies, Tukey-Kramer ($P \leq 0.05$).

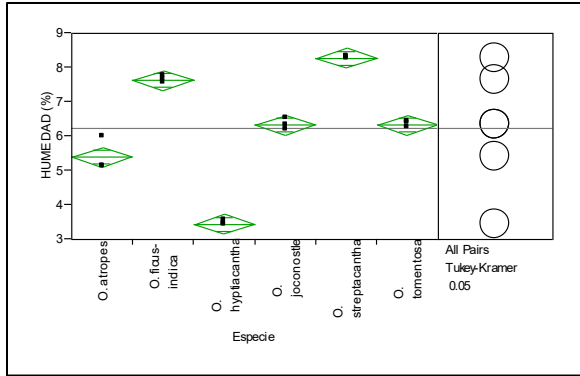


Figura 49. ANOVA y Tukey-Kramer de humedad.

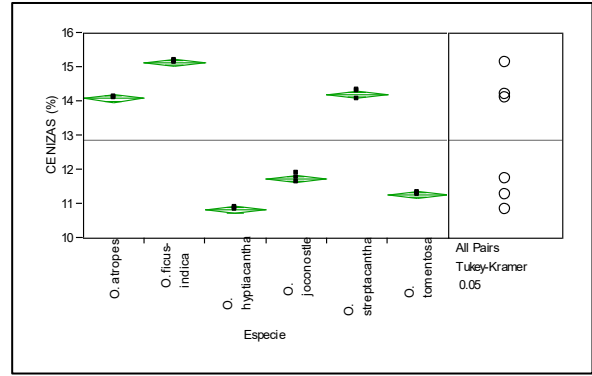


Figura 59. ANOVA y Tukey-Kramer de cenizas.

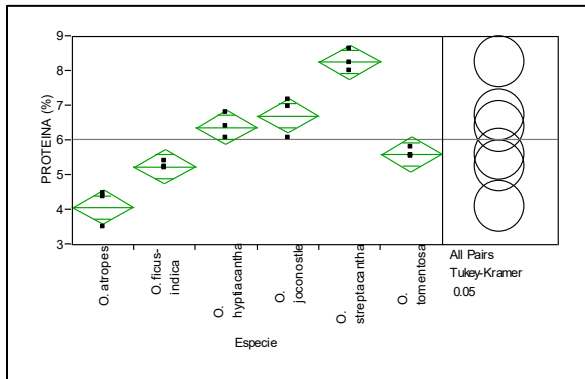


Figura 60. ANOVA y Tukey-Kramer de proteína.

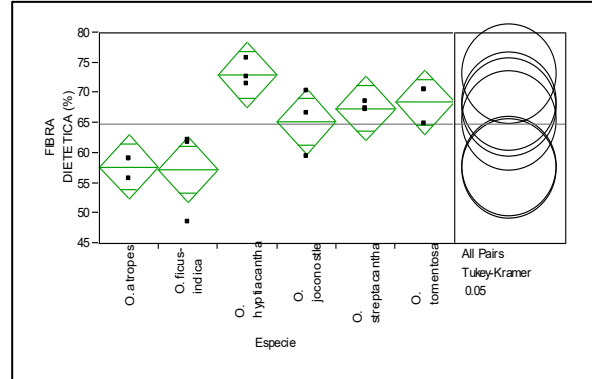


Figura 61. ANOVA y Tukey-Kramer de FD.

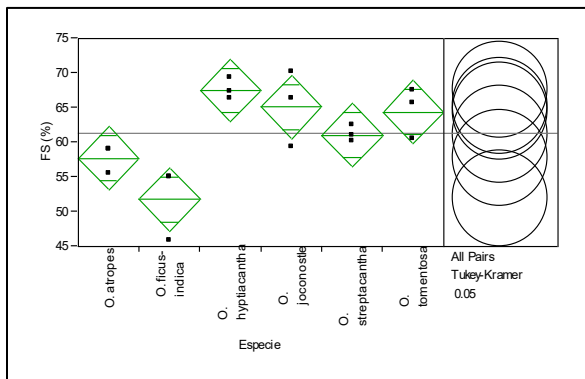


Figura 62. ANOVA y Tukey-Kramer de FS.

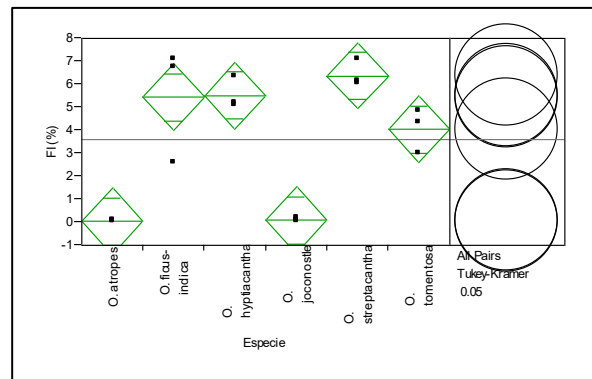


Figura 50. ANOVA y Tukey-Kramer de FI.

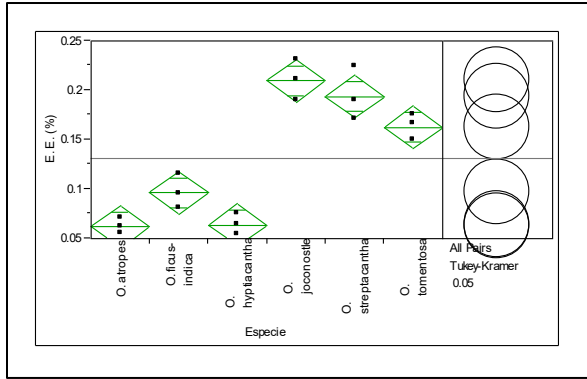


Figura 51. ANOVA y Tukey-Kramer de E.E.

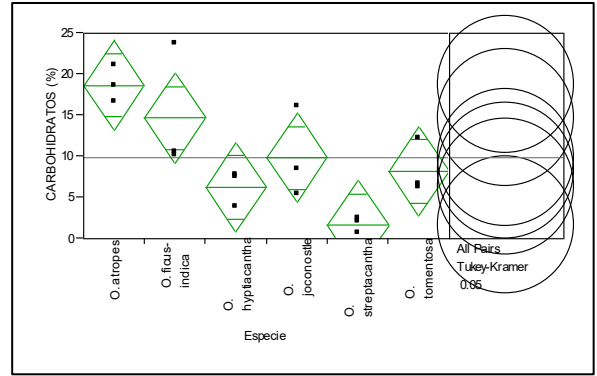


Figura 52. ANOVA y Tukey-Kramer de carbohidratos.

7. CONCLUSIONES

En cuanto a la extracción del mucílago de *Opuntia*, es más adecuado extraerlo a temperatura ambiente, la molienda debe ser con etanol al 50 u 80% y la precipitación con etanol al 96%.

La composición química del mucílago de las cinco especies de *Opuntia* contiene los mismos azúcares, sin embargo, la proporción varía en cuanto a la especie. Los azúcares que se encontraron fueron: arabinosa (26.83-35.36%), galactosa (21.59-45.48%), xilosa (12.23-17.05%), ácidos urónicos (5.59-13.91%), glucosa (5.18-16.21%) y ramnosa (1.41-5.40%). De acuerdo a estos resultados se podría decir que aparte del mucílago de la especie comercial (*O. ficus-indica*) que se utiliza como aditivo en la industria alimentaria, de igual manera el mucílago de las especies silvestres estudiadas: *O. atropes*, *O. tomentosa* y *O. hyptiacantha* puede ser utilizado la fabricación de hidrocoloides y mejoradores de textura y propiedades reológicas en la industria alimentaria en el estado de Michoacán. No obstante, para poder confirmar esto, es necesario realizar un análisis reológico donde se estudie la viscosidad y textura del mucílago de cada especie y poder correlacionarlo con el contenido de azúcares, por lo que se sugiere continuar con dicho análisis.

Algo interesante de destacar es que el mucílago de las especies silvestres estudiadas (*O. atropes*, *O. tomentosa*, *O. hyptiacantha*, *O. streptacantha* y *O. joconostle*) contienen mayor contenido de FD y FS que la especie control (*O. ficus-indica*) esta es otra razón para aprovechar el mucílago de las cinco especies al igual que el de *O. ficus-indica* para la producción rentable de aditivos en la industria alimentaria.

Por otra parte, aunque el análisis de RMN ^{13}C de mucílago de las seis especies de *Opuntia* sólo se realizó para complementar los resultados de CG, no fue posible determinar la proporción de carbohidratos en las diferentes especies de *Opuntia* estudiadas, la técnica más conveniente es la CG. Sin embargo, la RMN ^{13}C permitió determinar otros compuestos (aromáticos) no descritos en el mucílago de *Opuntia*, que es recomendable elucidar en un futuro sobre todo considerando el gran interés que han tenido estos productos naturales, abundantes en, en áreas como las ciencias farmacéuticas.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abraján, V.M.A. 2008. Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*Opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Tesis de doctorado. Departamento de tecnología de alimentos. Universidad politécnica de valencia. Valencia, España. 10, 22-25, 85-91 pp.

Al-Assaf, S., Phillips, G.O. 2009. Hydrocolloids: structure-function relationships. *Food Science and Technology*, 23(3):17-20.

Álvarez, O.C., Díaz, S.C., Ramírez, V.D., Yáñez F.J. 2007. Secado por Aspersión de Mucílago de Nopal. Memorias en extenso del IX Congreso de ciencia de los alimentos y V foro de ciencia y tecnología de alimentos. Departamento de Bioingeniería. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. IPN. Guanajuato, Guanajuato, México. 277 pp.

Anderson, E. 2001. The cactus family. Timber Press, Portland, Oregon.

AOAC. 2005. Official methods of analysis of the AOAC. 18th edition. Ed. By the Association of Official Analytical Chemists INTERNATIONAL. USA.

Arizmendi, C.D. 2004. Optimización de dos compuestos plastificantes (glicerol y polietilenglicol) en la elaboración de una película plástica comestible obtenida a partir del mucílago de nopal de la especie *opuntia tomentosa* salm-dyck. Facultad de Ciencias Agrícolas. UAEMEX. México, D.F.

(http://www.pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_04h.asp?page=04e12). Consultada el día: 15/03/11.

Bachmann, L.H.E. 2007. Estudio preliminares de caracterización de miel de abeja: determinación de carbohidratos por GC/MS y análisis enzimáticos. Tesis de licenciatura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Valdivia, Chile. 13-14pp.

Bautista, A.I., Benayas A.Y., Ortiz, A. 2010. Cromatografía principios y aplicaciones. <http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografia-Principios-y-Aplicaciones>.

Bravo-Hollis, H., Sánchez-Mejorada, H. 1978. Las cactáceas de México. 2^a ed Vol. 1, UNAM. México.

Britton, N.L., Rose J.N. 1963. The Cactácea. Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family. Vols. 1 and 2. Courier Dover Publications Inc., New York.

Cárdenas, B.A., Higuera, C.F.M., Goycoolea, F.M. 1997. Rheology and Aggregation of Cactus (*Opuntia ficus-indica*) Mucilage in Solution. Centro de investigación de Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, Mexico. *J. PACD*, 2:152-159.

Cárdenas, A., Goycoolea, M.F. Rinaudo, M. 2008. On the gelling behaviour of nopal (*Opuntia ficus-indica*) low methoxyl pectin. *Carbohydrate polymers*, 73(2):212-222.

Chávez, A.C., Gómez, A.C.A., Murúa, P.B. 2010. Optimización del proceso de modificación del almidón de maíz ceroso por extrusión y el uso de mezclas de almidones modificados con mucílago de nopal para la encapsulación de aceite esencial de naranja empleando el secado por aspersión. Tesis de licenciatura. Instituto de ciencias básicas e ingeniería. Centro de investigaciones químicas. Universidad autónoma del estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo. 10-13 pp.

Chávez-Moreno, C.K., Tecante, A., Casas, A. 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in México: a historical perspective of use, interaction and distribution. *Biodiversity and Conservation*, 18(13):3337-3355.

Chávez-Moreno, C.K., Tecante, A., Casas, A. Claps L.E. 2011. Distribution and habitat in México of *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) and their hosts of the subfamily Opuntioideae (Cactaceae). *Neotropical Entomology*, 40(1):62.

Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E., Hernández-Urbiola, M.I., Hernández-Quevedo, G., del Real, A., Rivera-Muñoz, E.M. Rodríguez-García, M.E. 2011. Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. redonda) at different maturity stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1):38-43.

Contreras-Padilla, M., Gutiérrez-Cortes, E., Valderrama-Bravo, M.C., Rojas-Molina, I., Espinosa-Arbeláez, D.G., Suárez-Vargas, R., Rodríguez-García, M.E. 2012. Effects of drying process on the physicochemical properties of nopal cladodes at different maturity stages. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(1):44-49.

Cuello, M.C. 2007. Caracterización cuantitativa de los carbohidratos no estructurales del Maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana*) Tesis Maestría en Ciencias ambientales. Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina. Universidad de San Luis Potosí, México.

Espectroscopia.com(http://www.espectrometria.com/espectrometra_infrarroja).

Forni, E., Penci, M., Polesello, A. 1994. A preliminary characterization of some pectins from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill) and prickly pear (*Opuntia ficus indica*) peel. *Carbohydrate Polymers*, 23(4):231-234.

Galizzi, F.A., Felker, P., González, C., Gardiner, D. 2004. Correlations between soil and cladode nutrient concentrations and fruit yield and quality in cactus pears, *Opuntia ficus indica* in a traditional far setting in Argentina. *Journal of Arid Environments*, 59:115-132.

Gibson, C.A., Nobel, S.P. 1990. The cactus primer. First Harvard University Press paperback edition. 196-199 pp.

(<http://books.google.com.mx/books?id=B1NEgtRguQMC&pg=PA198&dq=cactus+mucilage&lr=&cd=2#v=onepage&q=cactus%20mucilage&f=false>). Consultada el día: 17/02/11.

Ginestra, G., Parker, L.M., Bennett, N.R., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, B.R., Bisignano, G., Faulds, B.C., Waldron, W.K. 2009. Anatomical, Chemical, and Biochemical characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21):10323-10330.

Gómez, R., Rincón, U., Serrano, A.A. 2010. Cromatografía fundamentos y aplicaciones. <http://es.scribd.com/doc/11642417/Cromatografía-Fundamentos-y-Aplicaciones>.

Goycoolea, F.M., Cárdenas, A. 2003. Pectinas de *Opuntia spp.*; Un corto review. Centro de investigación en alimentos y Desarrollo, A. C. Laboratorio de biopolímeros. Hermosillo, Sonora.

Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M.L., Mortensen, A.G., Laursen, B. B., Lin, L.W., León-Rodríguez, A., Fomsgaard, I.S., Barba, R.A. P. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of comercial and wild nopal (*Opuntia spp.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6):525-532.

Guzmán, U., Arias, S., Dávila, P. (2003) Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y Consejo Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad CONABIO. México.

Habibi, Y. 2004. Contribution á l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de barbarie les polysaccharides pariétaux: caractérisation et modification chimique. Tesis de doctorado. Universidad Joseph Fourier y Cadi Ayyad. Francia.117-125 pp.

Hunt, D., Taylor, N.P. (2002).That's *Opuntia*, that was! *In* Studies in the Opuntioideae (Cactaceae). Milborne Port, Dorset: David Hunt. *Succulent Plant Research*, 6:245-249.

Jaramillo-Flores, M.E., González-Cruz, L., Cornejo-Mazón, M., Dorantes-Álvarez, L., Gutiérrez-López, G.F., Hernández-Sánchez, H. 2003. Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food Science and Technology International*, 9(4):271-278.

Kaur, M., Kaur, A., Sharma R. 2012. Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 02(07):15-18.

Loubet, G.A.L. 2008. Biodisponibilidad de calcio presente en harina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en función a su estado de maduración. Universidad autónoma del estado de Hidalgo Instituto de ciencias de la salud, área académica de nutrición. Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

Macías-Rodríguez, L., Quero, E., López, D.M. 2002. Differences in Strawberry Crowns and Fruit (*Fragaria ananassa*) during Plant Development. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 50(11):3317-3321.

Magoloni, K.D. 2007. Análisis de la técnica pictórica prehispánica: El templo Rojo, Cacaxtla. Instituto de Química de la UNAM. (<http://www.posgrado.unam.mx/servicios/productos/omnia/anteriores/20/07.pdf>). Consultada el día 29/09/10.

Majdoub, H., Picton, L., Le Cerf, D. 2010. Water Retention Capacity of Polysaccharides from Prickly Pear Nopals of *Opuntia Ficus Indica* and *Opuntia Litoralis*: Physical-Chemical Approach. *Journal of Polymers and the Environment*, 18(4):451-458.

Matsuhira, B., Lillo, E.L., Sáenz, C., Urzúza, C.C., Zárate, O. 2006. Chemical characterization of mucilage from fruits of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydrate Polymers*, 63(2):263-267.

McConn, M.M., Nakata, P.A. 2004. Oxalate reduces calcium availability in the pads of the prickly pear cactus through formation of calcium oxalate crystals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5):1371-1374.

McGarvie, D., Parolis, H. 1981 a. Methylation analysis of the mucilage of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydrate Research*, 88(2):305-314.

McGarvie, D., Parolis, H. 1981b. The acid-labile, peripheral chains of the mucilage of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydrate Research*, 94(1):57-65.

McNair, H.M., Miller, J.M. 1997. Basic gas chromatography. John Wiley & Sons, interscience. New York, EUA. 3, 4, 166-169 pp.

Medina-Torres, L. Brito-de la Fuente, E., Torrestiana-Sanchez, B., Katthain, R. 2000. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus-indica*). *Food Hydrocolloids*, 14(5):417-424.

Navarrete, H.J.E., Miranda, L.R., Jiménez, G.S.N., Vázquez, C.M.A., Botello, A.J.E. 2010. Perfil químico de distintos frutos de cactáceas. Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Guanajuato, México. Memorias del XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

(<http://search.conduit.com/Results.aspx?q=Perfil+qu%C3%ADmico+de+distintos+frutos+de+cact%C3%A1ceas&meta=all&hl=es&gl=mx&SearchSourceOrigin=13&SelfSearch=1&ctid=CT2086743>). (<http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2010/ee-09-2010/index.html>). Consultada el día 29/09/10.

Nobel, P., Cavelier, J., Andrade, J.L. 1992. Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. *Journal of Experimental Botany*, 43 (5):641-648.

Organización Mundial de la Salud. Informe de un grupo mixto FAO/OMS de expertos. 1962. Necesidades de calcio. Serie de informes técnicos N° 230. Ginebra.

Paulsen, B.S., Lund, P.S. 1979. Water-soluble polysaccharides of *Opuntia ficus-indica* cv "burbank's spineless". *Phytochemistry*, 18:569-571.

Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., Devries, J.W., Furda, I. 1998. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *Journal of Association Official Analytical Chemists*, 71(5):1017-1023.

Ramírez-Moreno, E., Diez, M.C., Sánchez-Mata, Goni, I. 2011. *In vitro* calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *LWT-Food Science and Technology*, 44(7):1611-1615.

- Ribeiro**, E.M.O., Silva, N.H., Lima, F.J.L., Brito, J.Z., Silva, M.P. C. 2010. Study of carbohydrates present in the cladodes of *Opuntia ficus-indica* (fodder palm), according to age and season". *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 30(4): 933-939.
- Rodríguez-García**, M.E., de Lira, C., Hernández-Becerra, E., Cornejo-Villegas, M.A., Palacios-Fonseca, A.J., Rojas-Molina, I., Reynoso, R., Quintero, L.C., Del-Real, A., Zepeda, T.A., Muñoz-Torres, C. 2007. Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus-indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(3):107-112.
- Rodríguez-González**, S. 2010. Efecto de la incorporación de mucílago de nopal sobre las propiedades sensoriales y texturales de una pasta a base de huitlacoche *Ustilago maydis*. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología. UMSNH. Morelia, Mich. Mexico. 35 pp.
- Rojas**, I., Gutiérrez E., Aguilera, A., Rojas, A., Ibarra, C., Contreras, M. 2010. Identificación por microscopia electronica de barrido de compuestos de calcio en cladodios de nopal. X Congreso Nacional de Microscopía-Morelia. Morelia, Michoacán.
- Ruiz**, H.F. Guerrero, B.J.A. 2009. Aplicación de las películas comestibles a base de quimostato y mucílago de nopal en fresa (*Fragaria ananasa*) en refrigeración. Tesis de maestría. Ciencia en alimentos. Universidad de las Américas. Puebla, Puebla. 21-23 pp.
- Saag**, K.M.L., Sanderson, G., Moyna, P., Ramos, G. 1975. Cactaceae mucilage composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26(7):993–1000.
- Sáenz**, C., Sepúlveda, E. 1993. Alternativas de industrialización de la tuna (*Opuntia ficus-indica*). *Revista de Alimentos*, 18(3):2932.
- Sáenz**, C., Sepúlveda, E, Matsuhiro, B. 2004. *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments*, 57(3):275-290.
- Sáenz**, C., Berger, H., Corrales, G.J., Galletti, L., García, C.V., Higuera, I., Mondragón, C., Rodríguez, A.F., Sepúlveda, E., Vanero, M.T. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. Reimpresión. Boletín de servicios de la FAO. Roma, Italia. 13 pp.
- Segura**, L.S., Zavala, R.D., Equihua, C.C., Andrés, A.J., Yopez, T.E. 2009. Los recursos genéticos de frutales en Michoacán. UAC. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 15(3):297-305.
- Sepúlveda**, E. Sáenz, C. Aliaga, E., Aceituno, C. 2007. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments*, 68(4):534-545.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)**, 2009. Con información de las Delegaciones de la SAGARPA.
- Skoog**, D.A., West, D.M., Crouch, S.R. 1992. Fundamentos de química analítica. Thomson. 8thed. México D. F. 823 pp.
- Srivastava**, B.K., Pande, C.S. 1974. Arabinogalactan from pods of *Opuntia dillenii*. *Planta Medica*, 25(1):92–97.

Trachtenberg, S., Mayer, M.A. 1981. Composition and properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *Phytochemistry*, 20(12):2665-2668.

Trachtenberg, S., Mayer, M.A. 1982 a. Biophysical Properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *Phytochemistry*, 21(12):2835-2843.

Trachtenberg, S., Mayer M.A. 1982 b. Mucilage cells, calcium oxalate crystals and soluble calcium in *Opuntia ficus-indica*. *Annals of Botany*, 50(4):549-557.

Zavala-Mendoza, E. 2012. Optimización del proceso de extracción del mucílago de cinco especies de *Opuntia* (L.) Miller de Michoacán. Tesis de maestría. Facultad de Químico Farmacobiología. UMSNH. Morelia, Mich. México.

Zhao, M., Yang, N., Yang, B., Jiang, Y., Zhang, G. 2007. Structural characterization of water-soluble polysaccharides from *Opuntia monacatha* cladodes in relation to their anti-glycated activities. *Food Chemistry*, 105(4):1480-1486.

Zhong, X.K., Jin, X., Lai, F.Y., Lin, Q.S., Jiang, J.G. 2010. Chemical analysis and antioxidants activities *in vitro* of polysaccharide extracted from *Opuntia ficus indica* Mill. Cultivated in China. *Carbohydrate Polymers*, 82:722-727.