



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**Extracción por ultrasonido de compuestos bioactivos
de xoconostle.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

PRESENTA

CÉSAR ALBERTO ROLDÁN CRUZ

Director:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel.

Asesores:

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes.

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez.

Dra. Abigail Reyes Munguía.



Tulancingo de Bravo, Hidalgo. Septiembre, 2014

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca brindada para realizar los estudios de Maestría en Ciencia de los Alimentos en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACYT.

Al Dr. Rafael G. Campos Montiel

Por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por la orientación e introducción al mundo de la investigación. Gracias Doctor por su invaluable apoyo. La experiencia y consejos que usted me comparte, me ayudarán siempre en este camino de la ciencia, en el cuál espero volver a encontrarme con usted.

A la Dra. Alma D. Hernández Fuentes

Por considerarme su amigo, brindarme la mano y apoyarme en los momentos que se requirió. Agradezco a usted doctora por haberme invitado a estudiar la maestría, deseo que en el futuro podamos seguir trabajando.

Al Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Doctor muchas gracias por orientarme, apoyarme y facilitarme el trabajo con sus consejos y aportaciones. El tiempo que usted conmigo invirtió fue muy fructífero.

A la Dra. Diana J. Pimentel González

Doctora, agradezco a usted todas las enseñanzas dadas, que me han servido para mejorar como alumno y como persona. Gracias por ayudarme y confiar en mí, puedo decir que encontré en usted a una amiga.

A los Doctores:

A ustedes que intervinieron en mi formación académica y personal, a quienes en muchas ocasiones me brindaron la mano y me exigieron el máximo esfuerzo, a ustedes agradezco por su excelente labor Dra. Norma, Dra. Aurora, Dra. Adriana, Dra. Isabel, Dr. Norberto, Dr. Piloni, Dr. Sergio, Dr. Víctor.

Dedicatorias**A ÉL**

Existe un modelo universal de la vida, es un modelo imaginado y realizado por el Creador. En este modelo todos y cada uno de nosotros jugamos un rol casi invisible, pero que engrana en la red del destino. Por tanto soy responsable de lo que pienso, siento, digo, hago y proyecto, ya que hasta el menor suspiro puede afectar el equilibrio de este modelo. Te agradezco Señor, por mantenerme hasta el día de hoy dentro de este equilibrio, es para mí un regalo todo lo que me has puesto en el camino y cada paso que doy pienso que Tú ya lo habías imaginado, permíteme seguir descubriendo los planes que para mí tienes y recuérdame siempre ser agradecido...

Una Historia

Corría el año de 1986, en un municipio del Estado de Hidalgo se encontraban de manera inesperada Javier (un trabajador petrolero originario de Veracruz) y Elena (una mujer única y por cierto Hidalguense), quienes sin esperarlo fueron víctimas del destino y decidieron (a pesar de los obstáculos) unir sus vidas para siempre. Todo era alegría, pero dos años más tarde, ésta se convirtió en felicidad, cuando vieron la llegada de su primogénito, un niño soñador y al que le gusta contar historias. Miles de cosas pasaron, hasta que 3 años 7 meses y 23 días después la vida regaló más felicidad con la llegada de un niño inquieto, talentoso, valiente, inteligente, audaz, lleno de magia, que a la larga se convertiría en un ejemplo de éxito, él se llama Javier, sí, Javier igual que su papá y es importante mencionar que comparten más que el nombre.

Los caminos se recorrieron, Javier (papá) caminó, corrió, se detuvo y volvió a empezar, con el fin de apoyar a su familia y ser el proveedor del hogar. Por su parte Elena hizo todo y más de lo necesario para tener un hogar lleno de amor y éste sello se marcó en sus dos hijos y en su esposo Javier.

Javier (o Chimi, como desde niño se le conoce), creció con la mano firme de sus progenitores, tanto que hasta militar quiso ser, pero la vida le deparó una sorpresa y decidió aventurarse en Puebla.

Otra ruta fue la que decidió tomar el que narra esta historia, él se aventuró en el mundo de las patadas, pero al ver que ese no era su fuerte mejor decidió entrar a la universidad. Lugar donde conocería una simpática, bonita, amorosa y demás descriptivos que se le pueden dar a quien ayer, hoy mañana y por la eternidad fue, es y será el amor de su vida, ella se llama Adriana.

Bueno, viendo los cuatro caminos al mismo tiempo, recapitulamos y encontramos que en este momento de la historia Javier es una persona muy fuerte que a quien han dializado, pero que no pierde el sentido de la vida; Elena es una guerrera incansable que además de trabajar en IAAMEH, sigue dedicando su vida a su esposo e hijos; Chimi es un estudiante de ingeniería que está a un año de graduarse con honores y en el último camino encontramos a un pequeño emprendedor con su novia que deciden entrar a estudiar una maestría.

En el camino al ingreso a la maestría (en ICAP, UAEH, Tulancingo), las cosas no salen como los novios emprendedores planeaban y aquí se les presenta una difícil pero muy buena prueba. Él se queda añorando estar con ella, pero así son los juegos del destino y ellos han decidido jugar.

La aventura de la maestría inicia para él con dificultades, pero son compartidas con los compañeros de aventura (Alba, Elba, Ángel, Eva, Humberto, Laura, Lizbeth, Lorena, Nancy, Rafael y Wendy) y

con los amigos (Adabella, Carmen, Chalo, Elba, Elías, Emmanuel, Jorge, Lupita, Nacho, René, Rosy, Ulin, Yesica, y los que se me han pasado), además del apoyo de toda la familia (primos, tíos, Familia Roldán Perales, Familia Cruz Ramírez, Familia Bertrand Rodríguez, Familia Mendoza Roldán, Familia León Valerio, Familia Perales Martínez).

Ese primer semestre es una locura, sentimientos encontrados por todos lados, la presión al máximo y el deceso de un tío muy querido (Isaac), después de lidiar con todo esto, se logró acreditar la primera etapa de la maestría. Para el inicio de la segunda etapa, la decisión de trabajar en el laboratorio de Aprovechamiento Agroindustrial es tomada, se fortalecen los vínculos y se concluye. El tercer semestre se ve lleno de trabajo y con la buena noticia que los emprendedores enamorados se vuelven a unir y Chimi se titula con honores. Llega el cuarto y último semestre, el cierre de este ciclo, el momento en que hay que cerrar un capítulo e iniciar otro, desgraciadamente un tío más se va (Fabián).

En el momento del cierre de este ciclo los caminos van así: Javier, es un hombre alegre que vive la vida al máximo, un padre preocupado por su esposa e hijos, yo le llamo Don Favi; Elena es la mamá, esposa, hermana, tía, cuñada, amiga, que cualquiera quisiera tener (pero sólo es nuestra), continua trabajando y dedicando su vida a todos, aunque ya hace más por ella; Chimi es un Ingeniero Mecánico Automotriz que imparte cátedra en una universidad poblana,

además es el encargado del proyecto electraton de su universidad, por si fuera poco es mi hermano y mi ejemplo constante), el cuarto camino se continúa labrando tomando como referencia los otros tres, siempre en busca de la excelencia, el amor, la paz, el progreso, la verdad, el equilibrio. Para ellos se escucha la experiencia ajena y se intenta actuar de la mejor manera.

El amor continúa en la puerta y los sueños y anhelos siguen creciendo junto a tí mi pequeña Adrianita, Los consejos los sigo escuchando padrino José, y sigo agradeciendo a los iniciadores de esta historia, a los que son el origen de mi origen (Mamá Esperancita, Papá Lino, Tita Herminia y Abuelito Fabián) y a su vez a los que son origen de ellos, sin olvidar al ingeniero que diseñó todo este engranaje, a Él que en su mente tuvo antes que yo esta historia y que tiene la continuidad de todos los caminos.

Este trabajo es dedicado a todos los que han creído siempre en mí, a mis papás que tanto amo y por quienes daré la siempre la vida a mi hermano y amigo que llevo siempre en mi corazón, a mi pequeñita Adriana, a mis hijos, sobrinos y nietos (aunque aún no hay, pero algún día leerán esto), a mi familia completa.

Y como dicen las buenas novelas, esta historia continuará...



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis titulada: “**Extracción por ultrasonido de compuestos bioactivos de xoconostle**”, que desarrolla el I.I.A. César Alberto Roldán Cruz.

Asistentes:

- Dr. Rafael Germán Campos Montiel
- Dra. Alma Delia Hernández Fuentes
- Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando al I.I.A. César Alberto Roldán Cruz, oportunamente las correcciones adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado.
El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 26 de Agosto del 2014

- Dr. Rafael Germán Campos Montiel
- Dra. Alma Delia Hernández Fuentes
- Dr. Gabriel Aguirre Álvarez



ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	3
2.1	Xoconostle (<i>Opuntia joconostle</i> Web.).....	3
2.1.1	Composición fisicoquímica de <i>Opuntia joconostle</i>	5
2.1.2	Localización y producción de <i>Opuntia joconostle</i>	6
2.1.3	<i>Opuntia joconostle</i> en la salud.....	6
2.2	Radicales Libres.....	7
2.3	Antioxidantes.....	8
2.3.1	Mecanismo de acción de los antioxidantes.....	9
2.3.2	Medición de la actividad antioxidante.....	10
2.4	Compuestos fenólicos.....	12
2.4.1	Clasificación de los compuestos fenólicos.....	14
2.5	Flavonoides.....	14
2.5.1	Tipos y fuentes de flavonoides.....	16
2.6	Bacterias patógenas.....	17
2.6.1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	17
2.6.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	18
2.6.3	<i>Salmonella</i> spp.....	20

2.6.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.7	Tecnologías emergentes.....	23
2.8	Ultrasonido.....	24
2.8.1	Cavitación.....	27
2.8.1.1	La cavitación inercial versus no inercial.....	28
2.8.2	Ultrasonido de baja y alta intensidad.....	31
2.8.2.1	Descripción de ultrasonido de baja intensidad.....	32
2.8.2.2	Descripción de ultrasonido de alta intensidad.....	33
III.	ANTECEDENTES.....	36
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	40
V.	OBJETIVOS.....	42
5.1	Objetivo general.....	42
5.2	Objetivos Específicos.....	42
VI.	HIPÓTESIS.....	43
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
7.1	Localización del experimento.....	44
7.2	Materia Prima.....	44
7.2.1	Xoconostle.....	44
7.2.2	Cepas.....	44
7.3	Extracción por ultrasonido.....	45

7.4	Determinación de Fenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	46
7.5	Determinación de Flavonoides Totales	47
7.6	Determinación de capacidad antioxidante por técnica de ABTS	48
7.7	Determinación de capacidad antioxidante por técnica de DPPH	49
7.8	Actividad antimicrobiana.	50
7.8.1	Preparación de los extractos.	50
7.8.2	Activación de las cepas.	50
7.8.3	Método de microdilución en caldo.	51
7.9	Análisis de resultados.	52
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	53
8.1	Fenoles Totales.....	53
8.2	Flavonoides Totales	57
8.3	ABTS.....	62
8.4	DPPH	67
8.5	<i>Escherichia coli</i>	71
8.6	<i>Salmonella spp.</i>	75
8.7	<i>Staphylococcus aureus</i>	79
8.8	<i>Listeria monocytogenes</i>	83
8.9	Condiciones óptimas experimentales para cada variable	87
IX.	CONCLUSIONES.....	89

X.	RECOMENDACIONES	91
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	92
XII.	ANEXOS	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Opuntia joconostle</i>	3
Figura 2. Mecanismo de acción de un antioxidante.	10
Figura 3. Estructura de un Fenol.....	13
Figura 4. Estructura de los Flavonoides.	15
Figura 5. <i>Escherichia coli</i>	18
Figura 6. <i>Listeria monocytoges</i>	19
Figura 7. Microscopia electrónica de <i>Salmonella spp</i>	21
Figura 8. Micrografía electrónica de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figura 9. Comportamiento de un onda ultrasónica (McClements, 1995).	25
Figura 10. Gráfico que muestra una onda de ultrasonido sinusoidal, distancia contra señal de amplitud.	26
Figura 11. Representación esquemática (a) cavitación trascendente y (b) cavitación estable.....	30
Figura 12. Curva de Calibrado para la medición de Fenoles Totales.....	47
Figura 13. Curva de calibrado para la medición de Flavonoides Totales	48
Figura 14. Curva de calibración para la medición de actividad antioxidante por ABTS.....	49
Figura 15. Curva de calibración para la medición de actividad antioxidante por DPPH.....	50
Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de compuestos fenólicos de xoconostle asistida por ultrasonido. (A) Muestra el efecto de la relación m/v y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la	

concentración y el tiempo de extracción, (C) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo en la concentración de compuestos fenólicos..... 55

Figura 17. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de Flavonoides Totales de xoconostle asistida por ultrasonido, muestra el efecto de la concentración de metanol y el tiempo de extracción con la relación m/v 1:30 g/mL..... 59

Figura 18. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que eliminan el radical ABTS^{•+}, (A) muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración..... 64

Figura 19. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que eliminan el radical DPPH[•], (A) muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración..... 69

Figura 20. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que inhiben el crecimiento de *Escherichia coli*, (A) muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 21. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que inhiben el crecimiento de *Salmonella spp.* (A) muestra el efecto del tiempo y la concentración de

metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y
(C) muestra la relación m/v y la concentración. 77

Figura 22. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. (A) muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración. 82

Figura 23. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. (A) Muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración. 86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del xoconostle.	5
Tabla 2. Composición fisicoquímica del xoconostle fresco.	6
Tabla 3. Condiciones de sonicación.....	45
Tabla 4. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box- Behnken y resultados observados para Fenoles Totales.....	53
Tabla 5. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para Fenoles Totales.	54
Tabla 6. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box- Behnken y resultados observados para Flavonoides Totales.	57
Tabla 7. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para Flavonoides totales.	58
Tabla 8. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box- Behnken y resultados observados para la actividad antioxidante por ABTS.	62
Tabla 9. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la actividad antioxidante por ABTS.	63
Tabla 10. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box- Behnken y resultados observados para la actividad antioxidante por DPPH.	67
Tabla 11. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la actividad antioxidante por DPPH.....	68
Tabla 12. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box- Behnken y resultados observados para la inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	71

Tabla 13. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	72
Tabla 14. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para la inhibición del crecimiento de <i>Salmonella spp.</i>	75
Tabla 15. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la inhibición del crecimiento de <i>Salmonella spp.</i>	76
Tabla 16. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para la inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Tabla 17. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	80
Tabla 18. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para la inhibición del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	83
Tabla 19. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la inhibición del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	84
Tabla 20. Condiciones óptimas experimentales para cada variable, en la extracción asistida de ultrasonido de compuestos de xoconostle.	87

RESUMEN

El xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.) es una tuna ácida, que contiene fenoles y flavonoides, los cuales actúan como antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios, entre otras funciones. El objetivo de este trabajo, fue la extracción asistida con ultrasonido de Fenoles y Flavonoides Totales, a los cuales se les evaluaron su capacidad antioxidante y antimicrobiana. Para la extracción se consideraron diferentes factores: concentración de metanol (40, 60 y 80%), relación m/v (1:10, 1:20 y 1:30 g de muestra seca/mL de metanol) y tiempo de sonicación (10, 20 y 30 minutos). La actividad antioxidante fue evaluada por medio de las pruebas ABTS y DPPH. Mientras que para la evaluación de la actividad antimicrobiana se probaron dos bacterias Gram-Negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella spp.*) y dos bacterias Gram-Positivas (*Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*). Para analizar los datos se empleó el diseño de superficie de respuesta Box-Behnken. Se encontró que bajo las condiciones de extracción 10 minutos, relación m/v 1:20 y concentración de 40%, la cantidad de Fenoles Totales fue la máxima (2426.54 mg E.A.G/100g peso seco), bajo estas mismas condiciones *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* tuvieron la mayor inhibición (98.9 y 66.08% respectivamente). Los Flavonoides Totales (17.84 mg E.Q./100g peso seco), al igual que la actividad antioxidante por ABTS (1431.96 mg E.A.A./100g peso seco), encontraron su punto máximo cuando el tiempo de sonicación fue de 20 minutos, una relación m/v 1:30 y una concentración de metanol al 40%. Por otro lado la mayor actividad antioxidante alcanzada por DPPH fue de 223.85 mg E.A.A./100g peso seco, mientras la actividad antimicrobiana

frente a la inhibición de *Listeria monocytogenes* fue de 99.69%, estos valores fueron obtenidos cuando el tiempo de sonicación fue de 20 minutos, la relación m/v 1:30 y la concentración del 80%. La única variable que no presentó similitud en sus condiciones de extracción fue el porcentaje de inhibición para *Escherichia coli*, donde su punto máximo (88.75%) se logró usando sonicación por 20 minutos, relación m/v 1:10 y concentración de 40%. Estos resultados sugieren que los compuestos bioactivos actúan específicamente y que algunos de ellos tienen la capacidad de actuar como antioxidantes y como antimicrobianos. Además de que los factores tiempo, relación m/v y concentración del solvente influyen en la extracción asistida por ultrasonido.

ABSTRACT

The xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.) is an acidic tuna that contains phenols and flavonoids which act as antioxidants, antimicrobials, anti-inflammatory, among other functions. The aim of this work was the assisted extraction of Flavonoids and Total Phenols with ultrasound as well as the evaluation of their antioxidant and antimicrobial capacity. There were considered the parameters: methanol concentration (40, 60 and 80%) at the ratio m/v (1:10, 1:20 and 1:30 g dry/mL of methanol sample) and sonication time (10, 20 and 30 minutes). The antioxidant activity was evaluated by means of ABTS and DPPH test. For the evaluation of antimicrobial activity there were tested two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Salmonella spp.*) and two gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*). The statistical analysis of the data was carried out with the response surface Box-Behnken method. The amount of Total Phenols was high (2426.54 mg GAE / 100g dry weight) at 10 min, ratio m/v, concentration of 1:20 and 40%. Also, *Salmonella spp.* and *Staphylococcus aureus* showed the greatest inhibition (98.9% and 66.08% respectively) under the same conditions of extraction. Both total Flavonoids (17.84 mg EQ/100g dry weight) and antioxidant activity by ABTS (1431.96 mg EAA/100g dry weight) showed the highest amount at 20 minutes time of sonication, ratio m/v 1:30 and 40% methanol concentration. The maximum DPPH antioxidant activity was achieved at EAA 223.85 mg / 100 g dry weights. Meanwhile, the antimicrobial activity for the inhibition of *Listeria monocytogenes* was found at 99.69% with the treatment of 20 minutes sonication, ratio m/v 1:30 and 80% methanol

concentration. However, the parameter percent inhibition for *Escherichia coli* was the only one that did not show similarity in their extraction conditions. Its highest point (88.75%) was achieved by using sonication for 20 minutes, ratio m/v 1:10 and concentration of 40%. These results suggest that the bioactive compounds act specifically and some of them have the capacity to work as antioxidants as well as antimicrobials. Also, the factors such as time ratio m/v and solvent concentration have influence in the ultrasound assisted extraction.

I. INTRODUCCIÓN

La función de las frutas en el organismo humano es semejante a la de las verduras, ya que actúan como alimentos reguladores y son muy ricas en minerales. Tienen un importante papel antioxidante gracias a las vitaminas hidrosolubles y liposolubles. Además de vitaminas antioxidantes, las frutas y los vegetales contienen otro tipo de antioxidantes, concretamente los flavonoides (un grupo de polifenoles) (Aranceta *et al.*, 2003). La distribución de frutas y verduras en el territorio Nacional es amplia y gracias a las condiciones climáticas la variedad y calidad de los frutos producidos es extensa.

Un ejemplo de esta diversidad es el Xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.), conocido comúnmente como tuna ácida, la cual es una cactácea resistente a la sequía. Desde el punto de vista económico, es de gran importancia en la gastronomía mexicana al utilizarse en ensaladas, mermeladas, dulces cristalizados, jugos, refrescos caseros, vinos; entre otros (Borrego & Burgos, 1986).

El fruto de xoconostle contiene nutrientes tales como carbohidratos, minerales y componentes nitrogenados, además de vitaminas A, B1, B2 y C, estas últimas le dan la característica de ser un excelente antioxidante (Olivares *et al.*, 2003). Guzmán-Maldonado y colaboradores (2010), reportaron que el xoconostle contiene polifenoles solubles. Estos compuestos orgánicos presentan características antioxidantes, además de efecto antibacteriano, anticancerígeno, anti-inflamatorio y propiedades antivirales (Muchuweti, Mupure, & Murenje, 2007).

El xoconostle se ha utilizado en la medicina tradicional como tratamiento para la diabetes, la hipertensión, la obesidad y las enfermedades respiratorias (Zavaleta, Olivares, Montiel, Chimal, & Scheinvar, 2001). Recientemente, Pimienta y colaboradores (2008), informaron que el consumo del pericarpio de *O. joconostle* causó una reducción en los niveles de colesterol, una disminución gradual de los niveles séricos de glucosa y en aumento los niveles séricos de inulina.

Dicho fruto tiende a cambios químicos, físicos y bioquímicos a través del tiempo y estos cambios dan lugar a la degradación de compuestos bioactivos, llevando consigo el deterioro de la capacidad antioxidante. Islas (2012), reportó que la mejor condición de extracción de compuestos bioactivos fue hecha con una hidrólisis enzimática, seguida por la extracción con solventes orgánicos.

El desarrollo de nuevas técnicas de extracción, ha venido a beneficiar la cantidad de compuestos extraídos, los tiempos, los recursos económicos y el ambiente. Una de estas técnicas es la extracción asistida por ultrasonido, la cual aprovecha las altas presiones y temperaturas generadas de manera molecular para extraer diversos compuestos.

Por todos los motivos antes expuestos, este trabajo se enfoca en la extracción asistida por ultrasonido de compuestos bioactivos del xoconostle, y probar si la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos se ve afectada por las variables m/v, tiempo y concentración de solvente.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.)

El nombre común del xoconostle (Figura 1) deriva del vocablo náhuatl xococnochtli, que significa tuna ácida (Santamaría, 1992). La planta mide de 1 a 2 metros de altura, con pencas de 30 a 40 cm de diámetro, areolas muy juntas, espinas de 3-5 por areola y frutas redondas en forma de pera, de pulpa acida, comestible, puede ser rosada o blanca y ligeramente perfumada (López, 1997). Se encuentra de forma silvestre en varios lugares del altiplano mexicano. La descripción morfológica de la materia prima son las *Opuntia spp*, que por su singular capacidad que tiene el tallo de distenderse al acumular agua en sus tejidos, forman parte del grupo de plantas llamadas xerofitas, resistentes y adaptadas a la sequía (Morales, 2012).



Figura 1. *Opuntia joconostle*

Se trata de otra manera muy similar a las tunas en apariencia, constituida también por una piel gruesa (Kossori, 1998), casi toda con espinas y por lo general sin hojas, este grupo se caracteriza por presentar tallos aplanados. Sin embargo, la piel del xoconostle (mesocarpio) es de aproximadamente 1 a 1,3 cm de espesor y es la estructura de la fruta la que se consume como alimento después de retirar la fina cáscara (pericarpio) (aproximadamente 1 a 2 mm de espesor). El centro del xoconostle (endocarpio) está compuesto principalmente por semillas y por lo general es descartado (Maldonado, Morales, Mondragón, & Herrera, 2010).

El mesocarpio (pulpa) es la parte comestible de este fruto, y se usa como condimento en la cocina mexicana, así como en la elaboración de dulces, jaleas y bebidas. Contiene azúcares fácilmente absorbibles, fibra dietética, ácido ascórbico, carotenoides, polifenoles, betacianinas y pigmentos, que han sido relacionados con sus beneficios para la salud por tener propiedades tales como la acción hipoglucemiante e hipolipemiante y antioxidante (Pimienta *et al.*, 2008). Por otra parte, las semillas de xoconostle se consideran subproductos potenciales, ya que presentan un alto contenido de ácidos grasos insaturados, ácidos grasos especialmente poliinsaturados (PUFAs), que están asociados con reducir el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares e inflamatorias (Simopoulus, 2002). Estos beneficios para la salud están asociados con el hecho de que los ácidos grasos n-3 y n-6, tales como linoléico (LA, C18: 2n-6) y α -linolénico (ALA, C18: 3n-3) son los precursores biosintéticos de eicosanoides, que participan en una amplia gama de las funciones metabólicas.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del xoconostle.

Reino	Vegetal
Subreino	Embryophytas
División	Angiospermote
Clase	Dicotiledoneas
Subclase	Dialipetalas
Orden	Opuntiales
Familia	Cactaceae
Tribu	<i>Opuntia</i>
Género	<i>Opuntia</i>
Subgénero	Platyopuntia
Especie	<i>Opuntia joconostle</i>
Nombre vulgar	xoconostle

Fuente: (Bravo-Hollis, 1978).

Se han descrito más de 300 especies, y alrededor de 1200 a 1800 variedades de opuntias (Escamilla, 1997). Por ello su clasificación taxonómica se muestra en el Tabla 1.

2.1.1 Composición fisicoquímica de *Opuntia joconostle*

Entre las propiedades fisicoquímicas del xoconostle (Tabla 2) destaca su acidez, la cual se encuentra entre un pH de 3.7 a 4.5, de ahí su nombre, lo que restringe su consumo a diferencia de la tuna dulce, que presenta valores de pH de entre 5.2 a 6.0 (Bravo-Hollis, 1978). Este valor bajo de pH, es el que permite que el fruto pueda almacenarse por periodos más largos que la tuna dulce, sin presentar niveles de descomposición amplios. Este factor también permite que el fruto permanezca más tiempo en la planta, incluso varias semanas después de que el fruto ha madurado.

Tabla 2. Composición fisicoquímica del xoconostle fresco.

Parámetro	Valor
Cenizas (%)	5.48
pH	3.89
Proteína cruda (N6.25) %	7.42
Extracto libre de Nitrógeno (%)	30.91
Extracto etéreo (%)	0.40
Fibra cruda (%)	45.78
Carbohidratos (%)	5.20

Fuente: (Sheinvar, Filardo, Olalde, & Zavaleta, 2008).

2.1.2 Localización y producción de *Opuntia joconostle*

La *Opuntia joconostle* se localiza en Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas (Sheinvar *et al.*, 2008).

Crece en climas cálidos y templados, lo podemos encontrar silvestre en varios lugares del altiplano mexicano y cultivado en los estados de Jalisco, Querétaro, Michoacán, Estado de México e Hidalgo (Borrego & Burgos, 1986). Tipo de vegetación: Matorrales xerófilos sobre suelos derivados de rocas volcánicas, con obsidias, rolitas y en pastizales y en laderas calizas. Altitud: 1710-2400 msnm (Filardo *et al.*, 2001).

2.1.3 *Opuntia joconostle* en la salud

Se encontró que en personas sanas, el consumo frecuente de xoconostle puede coadyuvar a prevenir estados de hiperglucemia y alteración en la concentración del colesterol y triglicéridos, que pueden asociarse con síndrome metabólico.

Mientras que en personas con Diabetes Melitus tipo 2 (DM2), el consumo habitual de la cascara del xoconostle en el control de la glucosa sérica (Pimienta *et al.*, 2008).

El destacable contenido de fibra del xoconostle, ayuda a incrementar los movimientos peristálticos y facilita el tránsito intestinal y como consecuencia, la defecación; con esto se destaca que su principal acción se lleva a cabo en el colon del ser humano, al mismo tiempo se sabe que la fibra cuenta con propiedades hipoglucemiantes lo cual promueve y acelera la secreción de ácidos biliares y de colesterol uniéndolos a la fibra para posteriormente eliminarlos en las heces, reduciendo la posibilidad de reabsorción (Badui Dergal, 2006).

2.2 Radicales Libres

Los radicales libres se definen como átomos o moléculas que poseen un electrón extra no apareado en su órbita externa, generando una alta inestabilidad, los cuales son tóxicos y generadores de enfermedades, activando reacciones en cadena que culmina en la destrucción total de la célula (Reyes-Munguía, Azúara-Nieto, Beristain, Cruz-Sosa, & Vernon-Carter, 2009) y que tienden a reaccionar con compuestos como ácidos nucleídos, proteínas y en especial con los ácidos grasos poliinsaturados (Córdova, 1997), esto debido a que las moléculas estables tienen electrones en parejas.

Son generados fundamentalmente por células fagocíticas (monocitos, neutrófilos, eosinófilos y muchos tipos de macrófagos) para cumplir una función bactericida (Halliwell, 1994). Además existen varias reacciones responsables de la generación

de radicales libres: las reacciones de reducción–oxidación (redox) que se producen durante el metabolismo mitocondrial, la absorción de energía radiante (UV, rayos X), el metabolismo enzimático de sustancias químicas exógenas, penetración de leucocitos en los tejidos (inflamación), entre otros factores (Pardo, 1996).

Los términos que se emplean para denominar a los radicales libres son: “especies reactivas del oxígeno” (EROs) y “especies reactivas del nitrógeno” (ERN). Las EROs más comunes de mayor importancia biológica están representadas por el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), radical hidroxilo (OH^\cdot), radical peroxilo (RO), radical anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HClO). Las ERNs comprenden al óxido nítrico (ON) y el radical peroxinitrito (ONOO^\cdot) como las más estudiadas.

Las EROs y las ERNs son productos importantes de las células. Estas moléculas son necesarias para el funcionamiento y balance armónico de diversos sistemas, sin las cuales se producirían desordenes fisiológicos o alteraciones en el sistema inmune. Sin embargo los radicales libres tienen un potencial efecto destructivo por lo que son controlados por estrictos mecanismos protectores: los antioxidantes (Morales-Aguilera, Fernández Pérez, & Méndez Soto del Valle, 2010).

2.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, oxidándose ellos mismos (Reyes-Munguía *et al.*, 2009).

Estos han sido agrupados en tres sistemas:

- a) Antioxidantes primarios: son los que previenen la formación de nuevas EROs. Esto lo consiguen convirtiendo las EROs en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar, o evitando su formación a partir de otras moléculas. En este grupo se destacan las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión transferasa (GST) y proteínas de unión a metales como la ferritina y la ceruloplasmina. Es fundamental señalar en este sentido la importancia que adquiere una correcta nutrición, ya que las enzimas necesitan determinados oligoelementos como zinc, cobre, manganeso, que actúan como grupos prostéticos (Veiga, Aguilar, Calvo, & Llanes, 1997).
- b) Antioxidantes secundarios o moléculas suicidas: capturan los radicales libres y evitan la reacción en cadena. Ejemplos de ellos son el tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), β -carotenos, ácido úrico, bilirrubina, compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) y albúmina (Zafrilla *et al.*, 2002).
- c) Antioxidantes terciarios: son los encargados de la recuperación de las estructuras químicas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas reparadoras del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la metionina sulfóxido reductasa (Morales-Aguilera *et al.*, 2010).

2.3.1 Mecanismo de acción de los antioxidantes

Los mecanismos de acción de los antioxidantes (Figura 2) incluyen la eliminación del oxígeno y nitrógeno reactivos, especies de radicales libres; la disminución de

la concentración de oxígeno localizada, reduciendo de este modo el potencial de oxidación del oxígeno molecular; metabolización de peróxidos de lípidos a los productos no radicales y los iones quelantes de metales para evitar la generación de radicales libres. De esta manera, los antioxidantes limitan los radicales libres de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) colesterol. Las LDL oxidadas puede aumentar el riesgo de la aterosclerosis, la promoción de la adhesión de plaquetas, lo que puede conducir a la trombosis aumentando así el riesgo de enfermedades del corazón o accidentes cerebrovasculares, dañando el ADN de la célula, lo que puede conducir a cáncer, el bloqueo de la función de la célula endotelial normal y vasodilatación en respuesta al óxido nítrico (NO), un mecanismo potencial para el corazón, el cáncer, la inflamación y la activación de la función inmune (Lakenbrink, Lapczynski, Maiwald, & Engelhardt, 2000).

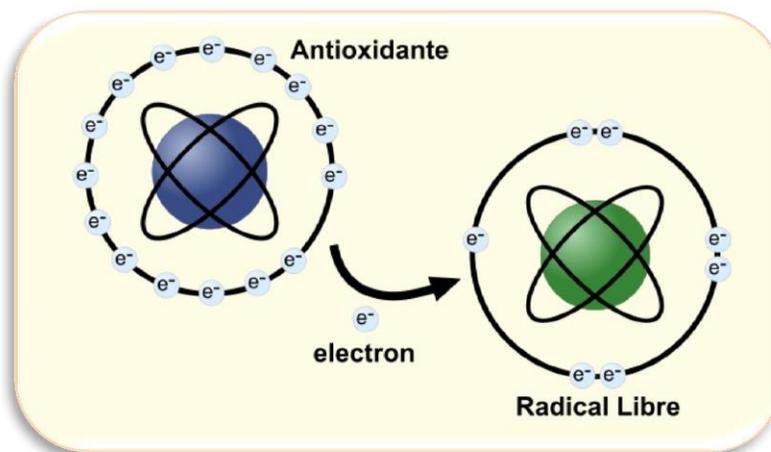


Figura 2. Mecanismo de acción de un antioxidante.

2.3.2 Medición de la actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en

cadena de los radicales libres. Existen muchos métodos para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia, un método muy usado se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizado por su absorción alrededor de 515nm, cuando la disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrogeno con otra especie radical (R) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida de color y por lo tanto la pérdida de absorbancia (Molyneux, 2004).

Los métodos más aplicados son ABTS (2,2-azinobis (3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) y DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl). Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias (Miller & Rice, 1996).

El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical $ABTS^{•+}$ tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005). De estos máximos de absorción se suele seleccionar el de 734 nm ya que al encontrarse próximo al espectro infrarrojo, se

mitigan muchas de las interferencias debidas a los compuestos coloreados que absorben en el espectro visible (Kuskoski, Asuero, García-Parilla, Troncoso, & Fett, 2004).

El DPPH es un radical estable de color violeta, cuya absorbancia disminuye al ser reducido por un antioxidante (Rojano-A *et al.*, 2008) y presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Kuskoski *et al.*, 2005).

El método de FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica) ocurre por reducción directa, es un método rápido, simple operacionalmente y reproducible. Consiste en la formación de un complejo férrico con el reactivo TPTZ, el cual en presencia de antioxidantes forma un complejo azul de máxima absorción a 593 nm (Kuskoski *et al.*, 2004).

2.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (Figura 3) se pueden definir como sustancias que poseen un anillo aromático, llevando uno o más grupos hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales (Lacueva-Andrés *et al.*, 2010). Constituyen una de las familias más numerosas y ampliamente distribuidas en el reino vegetal (Gil, 2010). Las plantas pueden contener una gran variedad de derivados fenólicos incluyendo fenoles simples, fenilpropanoides, derivados benzoicos, flavonoides, isoflavonoides, antocianidas, ácidos fenólicos, taninos, etc. (Saura-Calixto & Goñi, 2006).

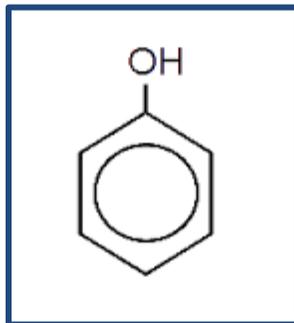


Figura 3. Estructura de un Fenol

Muchos tienen papeles en la defensa contra herbívoros o patógenos, otros participan en el soporte mecánico, en la atracción de polinizadores y dispersantes de frutos, en la absorción de la radiación ultravioleta dañina o en la reducción del crecimiento de las plantas competidoras próximas (Taiz & Zeiger, 2007). Suelen ser responsables del color, el aroma y el sabor de los alimentos que los contienen. Entre ellos hay pigmentos que aportan los tonos rojos, azules y violáceos propios de frutas y verduras (Adjé *et al.*, 2010).

Actualmente este grupo de compuestos presenta gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. Desde 1990, varias organizaciones internacionales en el ámbito de la nutrición, recomiendan un consumo diario de al menos 5 raciones de frutas y/o verduras para asegurar una adecuada ingesta de antioxidantes y prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Así, muchos de los efectos beneficiosos para la salud, entre los que destacan: vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales e inhibidores de enzimas prooxidantes, son asociados al consumo de alimentos de origen vegetal

se atribuyen en gran medida a los compuestos fenólicos (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004).

2.4.1 Clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar según su complejidad estructural y su origen biosintético. El grupo más sencillo corresponde a los fenoles propiamente dichos: ácidos fenólicos y acetonas polifenólicas. Los fenilpropanoides, basados en un núcleo C₆ C₃, son un amplio grupo constituido por diferentes compuestos: cumarias, cromonas, benzofuranos y lignanos. Otros 3 grupos de compuestos fenólicos que cabe considerar incluyen las xantonas (con un esqueleto C₆ C₁ C₆), los estilbenos (con esqueleto C₆ C₂ C₆) y las quinonas (benzo-, nafto- y antraquinonas).

Por último, destacan los flavonoides, que suponen aproximadamente la mitad de los compuestos fenólicos presentes en las plantas (Castillo & Martínez, 2007).

2.5 Flavonoides

Son dos tercios de los fenoles consumidos en la dieta humana, el rango de consumo es de 25 mg a 1 g por día, dependiendo del tipo de dieta (frutas, vegetales, granos, té y especias) (Robbins, 2003). Son un grupo muy abundante de productos naturales presentes en la práctica totalidad de las plantas superiores (Castillo & Martínez, 2007).

Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C₆ C₃ C₆), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico), (Figura 4) (Anderson & Markham,

2006). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Bors, 1990).

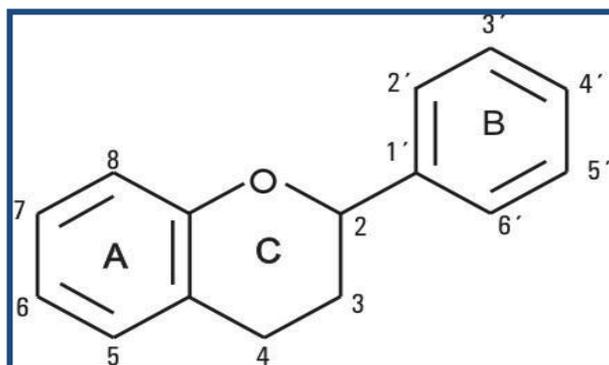


Figura 4. Estructura de los Flavonoides.

Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- 1.- Flavanos, como la catequina, con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
- 2.- Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
- 3.- Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
- 4.- Antocianidinas, que tienen unido el grupo –OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Letan, 1996).

2.5.1 Tipos y fuentes de flavonoides

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales (Reyes-Munguía *et al.*, 2009).

Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo, mariano o crataegus. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas (Escamilla-Jiménez, Cuevas-Martínez, & Guevara-Fonseca, 2009). Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida (Formica & Regelson, 1995).

Se han identificado más de 5000 flavonoides (Ross & Kasum, 2002), entre los que se pueden destacar:

1.- Citroflavonoides: quercetina, hesperidina, rutina, naranjina y limoneno. La quercetina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócoles, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La naranjina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, el limoneno se ha aislado del limón y la lima.

2.- Flavonoides de la soja o isoflavonoides. Están presentes en los alimentos con soja tales como porotos, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso, etc. Los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeína.

3.- Proantocianidinas se localizan en las semillas de las uvas, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.

4.- Antocianidinas: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.

5.- Ácido elágico: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.

6.- Catequina: el té verde y negro son buenas fuentes.

7.- Kaempferol: aparece en puerros, brócoles, rábano, endibias y remolacha roja

2.6 Bacterias patógenas

La mayoría de las cepas conocidas no son patógenas, pero algunas sin embargo causan infecciones en el hombre que pueden localizarse en el tracto intestinal o fuera de él (vías urinarias, meninges, sangre, peritoneo, heridas diversas) (Fernández, 2000).

2.6.1 *Escherichia coli* O157:H7

E. coli O157:H7 es un bacilo Gram negativo (Figura 5), un serotipo del grupo enterohemorrágica forma parte importante de la microbiota intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, sin embargo, algunas cepas han desarrollado capacidad para provocar enfermedad en el hombre, como son las infecciones gastrointestinales. Estas cepas patógenas representan la principal causa de diarrea infantil en el mundo (Caballero, 2008).



Figura 5. *Escherichia coli*

Esta bacteria es incapaz de desarrollarse a temperaturas superiores a 42°C, muestra un activo desarrollo entre 37-41°C, con tiempos de generación 0.49 horas a 37°C y 0.64 horas a 42°C en caldo soya tripticasa. Sin embargo, ya resulta muy escaso a 44-45°C (dependiendo en parte del medio de cultivo) y nulo a 10 o a 45.5 °C en 48 horas. El pH mínimo de desarrollo se encuentra entre 4-4.5, el tipo de ácido usado para ajustar el pH influye en la respuesta.

La importancia de esta bacteria a la salud humana sobresale por su baja dosis infectante, su efecto en todos los grupos etarios de la población, la severidad del padecimiento que origina, la tolerancia a condiciones de acidez poco comunes entre los patógenos y su asociación con rumiantes que aportan alimentos de amplio consumo humano (Fernández, 2000).

2.6.2 *Listeria monocytogenes*

Es un bacilo corto Gram positivo (Figura 6), no esporulado de 1.2 por 0.5 µm, muestra una forma diploformas en V; las células también aparecen aisladas. La apariencia pleomórfica no es excepcional. Es distintivamente móvil en caldos

incubado a 30°C; pero a 37°C se atrofian los flagelos, y queda visible uno solo. Las colonias rugosas suelen contener células de 6-20 µm. Es una bacteria omnipresente y común en el medioambiente. El pH óptimo para su desarrollo es de 7, con límites de 4.5 a 8, con temperaturas de 37°C. Alimentos frecuentes de su desarrollo es la leche cruda, verduras, carnes crudas (Fernández, 2000).

El desarrollo de *L. monocytogenes* a niveles suficientes para provocar infecciones en personas hipersensibles, no se acompaña de signos de deterioro del alimento implicado. En el almacenamiento de los alimentos perecederos la temperatura es crítica para controlar su actividad. El cambio de 4°C a 8°C puede ser decisivo para que se alcance niveles considerados de alto riesgo, por ejemplo, se observó que en un postre lácteo la presencia de una célula sobre gramo puede llegar teóricamente a 100 células sobre gramo después de 5 días a 8°C, pero requiere de dos semanas si la temperatura desciende a 4°C. Esta diferencia en tiempo resulta considerable y altamente significativa en el comercio y servicio de los alimentos (Rooso, Bajard, & Flandrois, 1996).

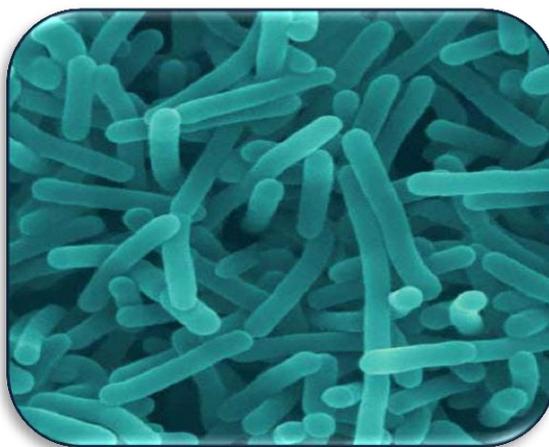


Figura 6. *Listeria monocytogenes*

La incidencia de infección es sin embargo baja, si la infección resultara sólo de un individuo susceptible cuando este es expuesto a una dosis alta suficiente de una cepa virulenta. Los síntomas de la enfermedad, la cual es más probable de desarrollar en mujeres embarazadas, niños o ancianos y los inmunocomprometidos, puede variar desde una enfermedad leve, gripe como enfermedad de la meningitis (Rooso *et al.*, 1996).

2.6.3 *Salmonella spp.*

Es un bacilo Gram negativo (Figura 7) de la familia *Enterobacteriaceae*. Generalmente son móviles, aerobios o facultativos anaerobios con una rica composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus miembros en serotipos, más recientemente designados como serovares. Es una bacteria primariamente parasita del intestino de los animales, incluido el hombre (hábitat natural). Se libera al medioambiente cuando se le expulsa por las heces, su desarrollo óptimo se encuentra a una temperatura de 37°C con un pH de 6.5-7.5. Muestra cierta capacidad de sobrevivencia en los materiales que contacta y bajo condiciones favorables, también para multiplicarse en ellos; los alimentos no son su excepción. Así, una diversidad de localidades se convierten en reservorio extra intestinal del microorganismo y por tanto en una fuente de contaminación a los alimentos (Fernández, 2000).

Los alimentos como vehículo de *Salmonella*, tiene importancia especial en los brotes de salmonelosis humana y animal. Puede jugar un papel meramente pasivo, o constituir un substrato en el cual hay actividad el patógeno previo al consumo. Esta última situación eventualmente conduce a incidentes más serios,

en forma de brotes o en individuos aislados. Los alimentos de origen animal encabezan marcadamente los vehículos implicados en los brotes en alimentos crudos y procesados (Fernández, 2000).

Los factores de virulencia o atributos de patogenicidad de *Salmonella* incluyen: la habilidad para invadir células, poseer una cubierta completa de lipolisacárido, capacidad para replicarse intracelularmente y posibilidad de producción de toxinas. Se conocen 3 formas clínicas de salmonelosis en el humano: gastroenteritis (causada por *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, etc.), fiebre entérica (causada por *S. typhi* y *S. paratyphi*) y una enfermedad invasiva sistémica (ocasionada por *S. choleraesuis*). Las complicaciones menos comunes pero más graves pueden ser artritis y pericarditis, puede producir también un cuadro grave, con meningitis, aborto y hasta la muerte (Caballero, 2008).

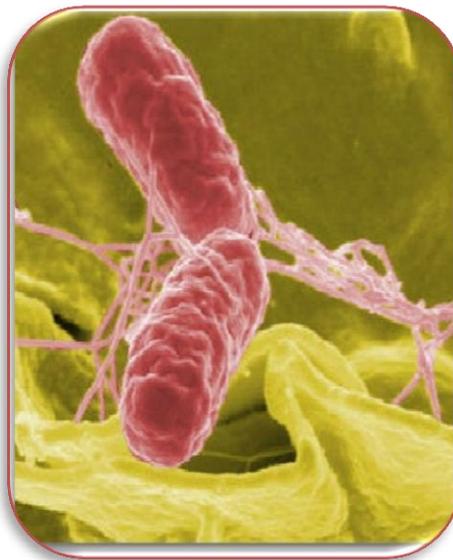


Figura 7. Microscopia electrónica de *Salmonella* spp

2.6.4 *Staphylococcus aureus*

Es una célula esférica Gram positiva de 0.8 a 1.2 μm de diámetro, no esporulado y no es móvil (Figura 8). Produce catalasa y otras enzimas, algunas relacionadas con la patogenicidad; tienen utilidad para su identificación en el laboratorio o sugieren un potencial enterotoxigénico: lipasa, fibrinolisisina, hemolisina, gelatinasa, coagulasa, fosfatasa, etc. La producción de penicilinas se asocia como un mecanismo de resistencia a la penicilina. La síntesis de estas enzimas no es extensiva para todas las cepas de *S. aureus*.

Una revisión de la ecología de esta bacteria pone de manifiesto las amplias oportunidades con las que puede llegar a los alimentos, se aísla con frecuencia en la piel y algunas mucosas del hombre y animales. La temperatura para el desarrollo de *Staphylococcus aureus* óptima para su desarrollo se encuentra a 37°C, a un pH 6-7. Posee una notable capacidad para proliferar en diversos alimentos. Bajo condiciones propicias la tasa de crecimiento conduce a la concentración de suficiente entero toxina para provocar brotes de gastroenteritis severos. Notable diversidad de alimentos pueden ser vehículo de la intoxicación por este microorganismo. A parte de la exposición a la contaminación (generalmente humana), o el empleo de una materia prima o ingrediente (típica, aunque no exclusivamente de origen animal) contaminado, deben satisfacerse condiciones ecológicas en el alimento que favorezcan un crecimiento franco del germen, incluida una temperatura superior a los 20-25°C, por pocas horas. Los alimentos que se identifican con mayor frecuencia en los brotes de intoxicación,

consisten en jamón, pasteles rellenos, alimentos cocinados a base de pollo, pavo, res y diversas ensaladas (Fernández, 2000).

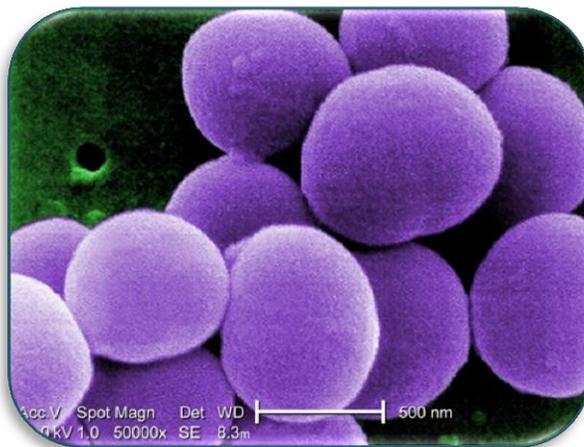


Figura 8. Micrografía electrónica de *Staphylococcus aureus*.

S. aureus es un patógeno potencial para el hombre y animales que se manifiesta de diversas formas. Dentro de su ciclo natural existe como parásito intrascendente en diversas localidades del cuerpo humano; o puede dar lugar a procesos patológicos que van desde infecciones muy localizadas del tipo de un forúnculo autolimitado o sinusitis, otitis, y muchos otros, hasta septicemia y endocarditis con letalidad de 40-80% y síndrome de shock tóxico (Caballero, 2008).

2.7 Tecnologías emergentes

Las deficiencias de las tecnologías de extracción existentes, como el aumento del consumo de energía (más del 70% del total del proceso requiere energía), altas emisiones de CO₂ y un mayor consumo de productos químicos nocivos, han obligado a las industrias alimentarias y químicas a encontrar nuevas técnicas de separación a las que les han llamado “tecnologías emergentes”, las cuales reducen el gasto de solvente y energía (Tao, Wu, Zhang, & Sun, 2014). Entre

estas técnicas destacan las microondas, los fluidos supercríticos, la ultrafiltración, las altas presiones, los pulsos eléctricos y los ultrasonidos (Chemat, Zille, & Khan, 2011).

La tecnología de ultrasonido ha recibido considerable atención debido a sus propiedades benéficas, incluyendo alto rendimiento de extracción, alta reproducibilidad, bajo consumo de solvente, fácil operación, bajo costo y baja contaminación ambiental (Tao & Sun, 2013).

2.8 Ultrasonido

El ultrasonido consta de una serie de ondas sonoras con frecuencias altas que comienzan a 16 kHz, que está cerca del límite superior del rango de la audición humana (Elmehdi, 2003). Cuando una determinada fuente irradia sonido en un medio cercano que tiene masa (por ejemplo, aire, líquido o sólido), el sonido se propaga en forma de ondas sinusoidales. El medio responde a la propagación de estas ondas y también las sostiene por vibración elástica. Las vibraciones elásticas del medio son de dos tipos: de condensación y rarefacción (Hecht, 1996; Knorr, Zenker, Heinz, & Lee, 2004). Durante la condensación, las partículas del medio se comprimen (es decir, el espacio entre las partículas se condensa), causando que la presión del fluido y la densidad aumenten (Gallego-Juárez, Elvira-Segura, & Rodríguez-Corral, 2003; Hecht, 1996). Durante rarefacción, las partículas del medio cambian separadas para que la densidad y la presión del medio disminuyan (Hecht, 1996; M., 2002).

McClements (1995) describe el comportamiento de la onda ultrasónica viendo la ola desde dos perspectivas, el tiempo y la distancia. En una posición fija en el medio, la onda de sonido se comporta sinusoidalmente con respecto al tiempo (Figura 9), el intervalo de tiempo de una amplitud de un pico a otro, es el período de tiempo τ de la onda sinusoidal.

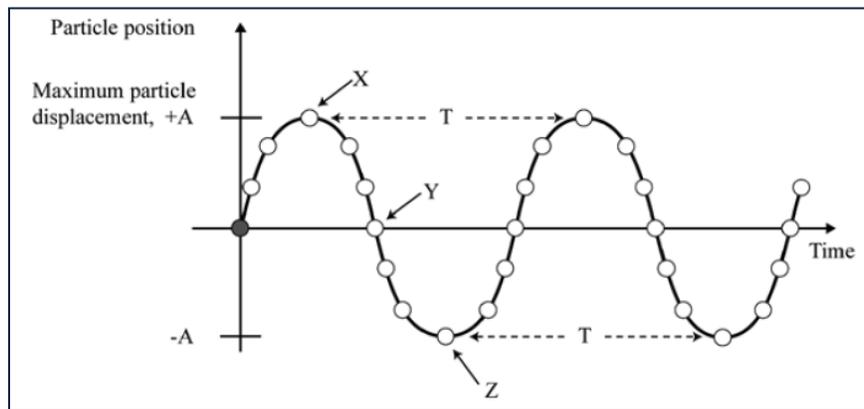


Figura 9. Comportamiento de un onda ultrasónica (McClements, 1995).

Esto significa que cada partícula físicamente a cierta profundidad en el medio (a lo largo de alguna línea de equidistancia) debe esperar un período de tiempo τ antes de experimentar una nueva ola de sonido igual a la que acabamos de vivir. La sinusoides frecuencia f representa con qué frecuencia de la sinusoides se completa una oscilación (ciclo de pico a pico) en un segundo de duración y está matemáticamente dado por la inversa del período de tiempo tal como se muestra en la Ecuación 1 (McClements, 1995):

$$f = 1/\tau \quad \text{Ecuación 1}$$

La distancia considera el efecto de la onda de sonido en cualquier instante fijo en el tiempo en partículas que son sucesivamente más profundas en el medio. En

cualquier momento, la amplitud de la onda de sonido se siente fuertemente por las partículas cerca de la fuente de ondas de sonido, pero las partículas más profundas en la experiencia medio de la onda de sonido con menos fuerza. Esta disminución en la amplitud de la onda de sonido con la distancia, es debido a la atenuación del medio. La trama de amplitud del sonido frente a la distancia es en realidad una senoide que decae exponencialmente (Figura 10). La distancia entre los picos de amplitud sucesivas es la longitud de onda (λ). La longitud de onda se refiere a la frecuencia a través de la velocidad del viaje la onda c , de la siguiente manera en la ecuación (2) (McClements, 1995):

$$\lambda = c/f \quad \text{Ecuación 2}$$

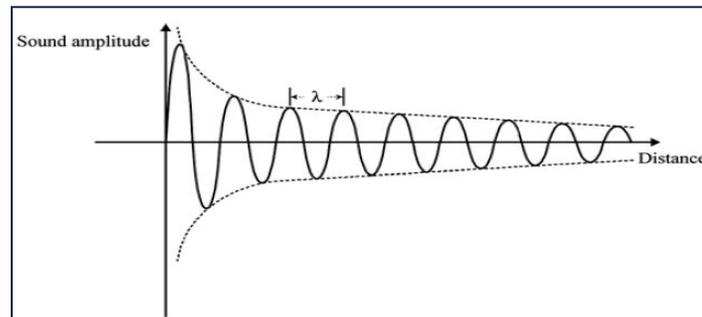


Figura 10. Gráfico que muestra una onda de ultrasonido sinusoidal, distancia contra señal de amplitud.

Por lo tanto, las ondas de sonido viajan a través del medio con una velocidad medible actuando en las partículas del medio. Las olas oscilan las partículas del medio respecto a sus posiciones de equilibrio. En cualquier momento en el tiempo, las partículas se desplazan hacia o lejos el uno del otro. Este desplazamiento hace que la presión y la densidad en el medio tengan aumentos y disminuciones

alternas. Por consiguiente, el único tipo de energía que se imparte en el medio de la ecografía es mecánica, que se asocia con la oscilación de las partículas del medio (Hecht, 1996).

Con respecto a la energía impartida, los tratamientos con ultrasonidos difieren de los tratamientos mediante ondas de espectro electromagnético (EM), tales como las ondas de luz ultravioleta (UV), ondas de radio frecuencia (RF) y microondas (MW) (Kardos & Lucie, 2001), así como los campos de pulsos eléctricos (PEF). Las ondas EM y PEF introducen energía eléctrica y magnética en un medio, que son absorbidos por las partículas del medio.

2.8.1 Cavitación

La cavitación es el mecanismo que permite que se produzca en los alimentos los efectos deseados del ultrasonido de alta intensidad. Los efectos de la muerte celular, la inhibición de la actividad enzimática, la maduración de los vinos, la limpieza de superficies de los productos, la extracción, la filtración, emulsificación, y la cristalización, todos se basan en el mecanismo de la cavitación (Mason, Paniwnyk, & Lorimer, 1996).

La actividad de las burbujas determina cuál de los dos tipos de cavitación ocurre, la cavitación inercial o no inercial, ambos producen efectos muy diferentes en el medio. Cuando se produce la cavitación inercial, la dinámica de las burbujas está detrás de las actividades producidas en los alimentos, por ejemplo, si se generan o no los radicales libres y en qué medida la erosión se produce en los alimentos (Mason *et al.*, 1996; Patrick, Blindt, & Janssen, 2004). Sin embargo, las burbujas

no pueden controlarse directamente en los experimentos (Mason *et al.*, 1996; Povey & Mason, 1998). En su lugar, los efectos de otros parámetros en las burbujas deben ser estudiados en profundidad si la cavitación es utilizada para optimizar los mejores efectos. Estos parámetros deben incluir la amplitud de presión acústica (controlada por la amplitud de la onda ultrasónica) y la frecuencia acústica.

En general, la cavitación en los líquidos puede causar desgasificación rápida y completa; iniciar varias reacciones químicas mediante la generación de iones libres de productos químicos (radicales); acelerar las reacciones químicas, facilitando la mezcla de los reactivos; aumentar las reacciones de polimerización y despolimerización por la ruptura de enlaces químicos en las cadenas de polímeros; mejorar los índices de difusión; producir emulsiones altamente concentradas; asistir a la extracción de enzimas de origen animal, vegetal, o células bacterianas; eliminar los virus de tejido infectado; y finalmente erosionar y romper las partículas sensibles, incluidos los microorganismos (Kuldiloke, 2002).

2.8.1.1 La cavitación inercial versus no inercial

Los dos tipos de cavitación ya se ha mencionado (Figura 11), inercial (también llamado "transitoria") y no inercial (también llamado "estable") (Povey & Mason, 1998), involucrar a un campo de sonido que impulsa las burbujas en un líquido en algún tipo de respuesta. Una de las respuestas que ocurren en ambos casos, es el crecimiento de burbujas de cavitación; en un proceso denominado difusión rectificada, las burbujas aumentan de tamaño mediante la elaboración de más gas

desde el líquido circundante en la burbuja. Las burbujas también disminuyen de tamaño al expulsar el gas en el líquido. Las variaciones de presión en el medio determinan si el gas se introduce en la burbuja (cuando la presión del gas dentro de la burbuja pasa a ser inferior a presión del líquido a temperatura ambiente) o es soltado de la burbuja en el líquido.

En la cavitación no inercial, el campo de sonido hace que las burbujas ya sea que aumenten de tamaño y luego se disuelvan o pulsen entre un tamaño más pequeño y más grande durante muchos ciclos acústicos. Debido a que las burbujas no colapsan o se rompen en fragmentos, esta forma de cavitación se denominó originalmente cavitación estable.

Cavitación inercial se caracteriza tanto por un crecimiento rápido seguido de un rápido colapso de las burbujas o por extremas pulsaciones de gran amplitud en las que las burbujas se expanden en gran medida y en gran medida se contraen continuamente y, finalmente, colapsan (Povey & Mason, 1998). Después de que una burbuja se colapsa, puede fragmentarse en burbujas mucho menores o puede crecer de nuevo para someterse a más pulsaciones y / o colapsos. Porque las primeras observaciones de la cavitación inercial involucran sonoluminiscencia de las burbujas que fragmentaron después de unos pocos ciclos, el fenómeno se denomina cavitación transitoria.

Los efectos de la cavitación pueden producir una serie de cambios deseables en los alimentos, tales como erosión mecánica y fractura de las partículas de alimentos (para mejorar la separación, mezclar y generar extracciones), que son

causadas por las tensiones de cizalladura hidrodinámicas de pulsaciones de gran amplitud, la presión de una burbuja que se colapsó; microcorrientes, y chorro (Povey & Mason, 1998). El chorro, en particular, puede desalojar la suciedad y las bacterias de las superficies de los alimentos, tales como huevos y las plantas de procesamiento de alimentos (Povey & Mason, 1998). Otros cambios pueden ser biológicos, tales como la estimulación de crecimiento de semillas para incubar, por ejemplo; los puntos calientes creados por el colapso de burbujas pueden degradar contaminantes hidrófobos en agua (Mason, 2003). Los cambios también se producen a partir de reacciones químicas, tales como la descomposición de los contaminantes hidrófilos en el agua por los radicales hidroxilo producidos durante la cavitación inercial (Mason, 2003). La inactivación de los microorganismos y enzimas en los alimentos se produce a partir de combinaciones de efectos mecánicos, químicos, y biológicos.

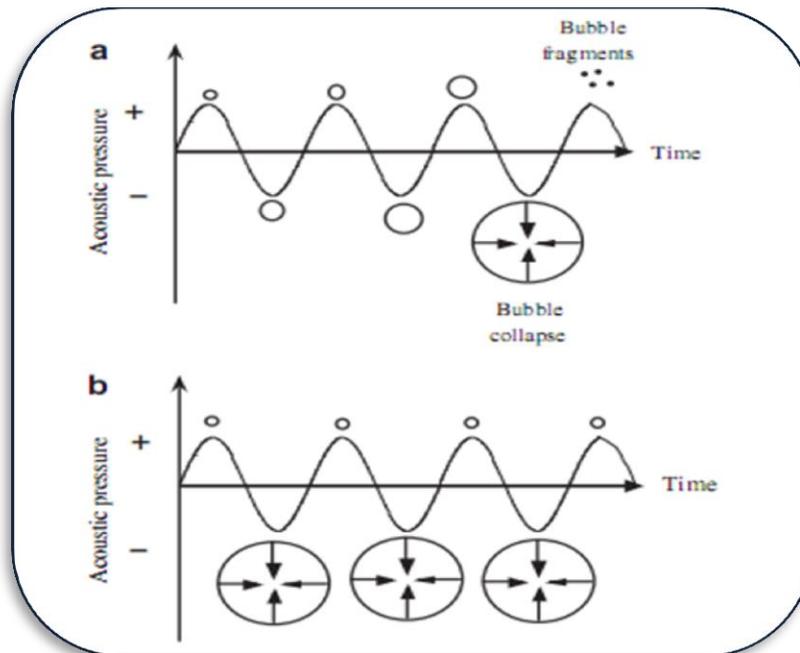


Figura 11. Representación esquemática (a) cavitación trascendente y (b) cavitación estable

2.8.2 Ultrasonido de baja y alta intensidad

Mientras que el ultrasonido de baja intensidad o de alta frecuencia se utiliza principalmente para análisis, ensayos no destructivos y de imagen, el ultrasonido de alta intensidad se utilizan para el tratamiento de los líquidos, para mezclar, emulsionar, desaglomerar, desintegrar, dispersar. Cuando los líquidos son sonicados a intensidades altas, las ondas sonoras que se propagan en el medio generan ciclos de alta presión (compresión) y de baja presión (rarefacción), con tasas en función de la frecuencia. Durante el ciclo de baja presión, las ondas de ultrasonidos de alta intensidad crean pequeñas burbujas de vacío o huecos en el líquido. Cuando las burbujas alcanzan un volumen en el que ya no pueden absorber la energía, colapsan violentamente durante un ciclo de alta presión. Este fenómeno se denomina cavitación. Durante la implosión se alcanzan a nivel local temperaturas muy elevadas (aprox. 5000 K) y presiones (aprox. 2000 atm). La implosión de la burbuja de cavitación también forma de chorros de líquido de hasta 280m /s de velocidad.

El ultrasonido de alta intensidad produce agitación violenta en los líquidos de baja viscosidad, que puede ser usado para dispersar (Ensminger, 1988). En líquidos/sólidos o interfaces/gas, la implosión de las burbujas de cavitación asimétrica puede provocar turbulencias extremas que reducen el límite de la capa de difusión, aumentan la transferencia de masa por convección, y aceleran considerablemente la difusión en los sistemas en común, la mezcla no es posible (Nyborg, 1965).

2.8.2.1 Descripción de ultrasonido de baja intensidad

Ultrasonido de baja intensidad (no destructivo, de alta frecuencia), se aplica generalmente para la detección, por lo que se utiliza como una ayuda a la transformación en la industria alimentaria para caracterizar componentes de los alimentos, a menudo en las líneas de control de calidad. Acertadamente denominado ensayo no destructivo (END). Este proceso envía ondas ultrasónicas a través de un medio sin causar ningún cambio físico, químico o eléctrico permanente en el medio, debido a que la intensidad ultrasónica es demasiado baja ($<1 \text{ W/cm}^2$) para alterar el material (Gestrelius, Hertz, Nuamu, Persson, & Lindström, 1993; McClements, 1995). Las partículas del medio oscilan en respuesta a la baja energía (puramente mecánica) mientras está expuesto a olas ultrasónicas y simplemente vuelve a su posición de equilibrio cuando la fuente de ultrasonido se elimina.

Cuando las ondas acústicas pasan a través del medio, las ondas son parcialmente reflejadas o dispersadas dondequiera que el medio cambie de un material a otro (Hecht, 1996). La distancia a la ubicación de la reflexión se puede calcular mediante las propiedades ultrasónicas como la frecuencia (siempre superior a 1 MHz) y la atenuación coeficiente, para permitir la detección y la localización de la presencia de partículas extrañas y cambios de composición en los alimentos (McClements, 1995).

El ultrasonido de baja intensidad puede ayudar inestimablemente al control de calidad en la producción de alimentos, así como supervisar los cambios a los que los alimentos se someten a medida que se procesan (congelación, emulsionantes, secado, etc.). Los fabricantes de alimentos utilizan ensayos no destructivos por ultrasonidos para localizar cuerpos extraños, como vidrio, residuos orgánicos, o las infecciones bacterianas en los sólidos y líquidos, incluso después de que los alimentos se envasan (Gestrelus *et al.*, 1993; Hæggström & Luukkala, 2001). Otros ejemplos incluyen la caracterización de la estructura celular de la masa precocida para obtener predicciones de la calidad del producto cocido (Elmehdi, 2003), y vigilancia de la circulación del frente de hielo en un alimento sólido (cómo la comida se congela lentamente) para determinar la eficiencia energética del proceso de congelación (Sigfusson, Ziegler, & Coupland, 2004).

2.8.2.2 Descripción de ultrasonido de alta intensidad

El ultrasonido de alta intensidad (de baja frecuencia, potencia) se utiliza ya sea para destruir estructuras celulares, mejorar o inhibir las actividades dentro de los alimentos (Mason *et al.*, 1996) y es caracterizado por intensidades de potencia que en general oscilan entre 10 y 1.000 W/cm².

Estas ondas acústicas intensas pueden causar altas presiones en el interior de los alimentos líquidos, produciendo corrientes de microburbujas que se mueven rápidamente y causan el colapso violento de las burbujas en líquidos (Mann & Krull, 2004). Estos tipos de actividades de burbujas en líquidos, respectivamente

se denomina cavitación no inercial e inercial, son mecanismos que afectan a la propiedades físicas y químicas de los alimentos (Povey & Mason, 1998). La actividad de cavitación en los líquidos puede ser tan intensa que las paredes celulares se rompan, generando así radicales libres, y procesos tales como la germinación de las semillas son mejorados, mientras que las actividades enzimáticas se inhiben (Mason *et al.*, 1996; McClements, 1995; Povey & Mason, 1998). Por lo tanto, Povey y Mason (1998) acuñaron el término "Material que altera" para describir ultrasonido de alta potencia, en paralelo con el descriptor "No destructivos" a ultrasonidos de baja intensidad.

Las aplicaciones de materiales que alteran de ultrasonidos de alta intensidad son numerosas en el campo de procesamiento de alimentos. Las principales escuelas de investigación que trabajan con ultrasonidos de potencia en el procesamiento de alimentos principalmente están estudiando extracción, emulsificación, filtración, cristalización, producción de finas partículas, descongelación y congelación, mientras que varios equipos de investigación de todo el mundo están estudiando la inactivación de microorganismos y enzimas en los alimentos (Mason, 2003). Cuando los investigadores analizan los resultados de los experimentos de ultrasonido, determinan el uso de diferentes parámetros de proceso para aplicaciones de alta intensidad que para aplicaciones de baja intensidad. Los únicos parámetros de uso común tanto en aplicaciones de alta y baja intensidad incluyen la frecuencia (f , o frecuencia angular $\omega = 2\pi f$), el poder y la amplitud (denotado por A o P). Estos valores se establecen o son ajustados por el equipo de generación de ultrasonido y controlado por el experimentador sobre la base de

los resultados deseados. Parámetros que se utilizan ampliamente en el ultrasonido de baja intensidad incluyen la frecuencia, amplitud, velocidad, tiempo y distancia de viaje, coeficiente de atenuación, reflexión coeficiente, impedancia acústica, y la densidad. Parámetros de ultrasonido de alta intensidad incluir la potencia, frecuencia, temperatura de tratamiento, y el tiempo de tratamiento.

III. ANTECEDENTES

En los últimos años, el xoconostle ha sido estudiado por la comunidad científica, debido principalmente a su propiedad antioxidante, la cual se presume está dada por la presencia de compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, entre otros). Del mismo modo, han sido sujetos a investigación diversos métodos para poder extraer dichos compuestos bioactivos. Entre estos métodos destacan las extracciones químicas, enzimáticas y el uso de tecnologías emergentes como microondas, fluidos súper críticos, pulsos eléctricos, ultrasonido.

Se realizaron análisis físico-químicos a varias partes anatómicas del fruto, destacando la pulpa y las semillas. Los resultados que obtuvieron, demuestran que se trata de un fruto con humedad del 93-94% en el caso de la pulpa y de un 60-74% para las semillas, un contenido proteínico por debajo del 1% en el caso de la pulpa y un porcentaje entre 2 y 3.8 % en las semillas, el porcentaje en grasa menor al 0.05 % para la pulpa y en semillas de un 2 a 3.5%. Referente a las propiedades antioxidantes, la eliminación del radical DPPH osciló entre 5-16 mg/mL de extracto para la pulpa, en cuanto a las semillas se encontró una concentración de 1.53 a 1.88 mg/mL de extracto. La cantidad de Fenoles Totales se encontró para la pulpa entre 33-38 mg Equivalentes de Ácido Gálico (GAE)/g de extracto y para las semillas entre 50-59.48 mg Equivalentes de Ácido Gálico (GAE)/g de extracto (Morales, 2012).

Contrastando con esta investigación Osorio y colaboradores (2011), realizaron un estudio de la actividad antioxidante en diversas partes anatómicas del *Opuntia joconostle* c.v. cactus, destacando el pericarpio, mesocarpio, endocarpio y el fruto

entero, encontrándose una concentración de Fenoles Totales de 2.1, 1.4, 1.1 y 1.48 mg de EAG/g de muestra. Además reportan la actividad antioxidante contra el radical DPPH• de diversos extractos obtenidos de las partes anatómicas antes mencionadas, obteniendo un mayor porcentaje de inhibición en el pericarpio (86%), seguido del fruto entero (80%).

La extracción de estos compuestos se ha beneficiado con la aplicación de ultrasonidos de potencia, lo que se ha convertido en trabajos de elevado interés científico. Las violentas implosiones producidas por la cavitación pueden contribuir a la disrupción celular y facilitar la extracción de componentes celulares, lo que puede influir tanto en el rendimiento de la operación como en la composición del extracto.

Referente a estas tecnologías Toma y colaboradores (2001), mostraron el diferente efecto de los ultrasonidos en los tejidos vegetales durante la extracción con diferentes solventes a partir de imágenes tomadas en un microscopio óptico (100x). Las experiencias fueron realizadas con un sistema tipo sonda a 20 kHz. Los efectos ocasionados en el sólido fueron distintos para los diferentes tejidos. Así, en hojas de menta los ultrasonidos degradaron prácticamente la totalidad de las glándulas de almacenamiento del aceite, mientras que en pétalos de caléndula el efecto de los ultrasonidos se centró en los pelos colocados en el fondo de los pétalos, que resultaron fuertemente degradados.

También la extracción de aceites esenciales a partir de dientes de ajo mediante métodos convencionales fue comparada con la extracción asistida por ultrasonidos

(35 kHz) (Kimbaris *et al.*, 2006), donde la aplicación de ultrasonidos influyó en la composición del extracto obtenido, tanto de forma cuantitativa como cualitativa, evitando el daño térmico producido por los métodos convencionales y mejorando la calidad organoléptica del extracto. Jiménez y su equipo de trabajo (2007), mostraron como la aplicación de ultrasonidos influyó tanto en el rendimiento de la extracción como en la calidad del aceite de oliva virgen.

Dentro de la extracción asistida por ultrasonido, se han investigado la influencia de cuatro variables en la eficiencia de extracción de ácido clorogénico. Las condiciones de extracción óptimas encontradas fueron: metanol acuoso al 70%; relación disolvente: muestra de 20:1 (v / w); tiempo de extracción 3 x 30 min. Además se estudió la recuperación de ácido clorogénico (HPLC) y se determinó la reproducibilidad del método de extracción. Se aplicaron las condiciones de extracción de ultrasonidos optimizados para extraer el ácido clorogénico de hojas frescas, corteza fresca y corteza seca de *E. ulmodies* y cuatro medicinas tradicionales chinas. La aplicación del método de sonicación demostró ser altamente eficiente en la extracción de ácido clorogénico a partir de *E. ulmodies* y otras medicinas chinas en comparación con los métodos clásicos (Li & Yao, 2005).

De igual manera se han optimizado las variables del proceso de extracción de compuestos bioactivos (antocianinas totales, fenoles y flavonoides) de la cáscara de la fruta *Nephelium lappaceum* L. Se estudió el efecto de las variables de proceso tales como temperatura de extracción (30-50°C), la potencia de los ultrasonidos (20-40 W), tiempo de extracción (10-30 min) y la relación sólido-líquido (1:10-1:20 g/mL). Las condiciones óptimas sobre la base tanto individual

como combinaciones de todas las variables de proceso fueron: temperatura de extracción de 50 ° C, potencia de ultrasonidos de 20 W, tiempo de extracción de 20 min y relación sólido-líquido de 1:18.6 g/mL. En estas condiciones, el contenido total de antocianina fue $10,26 \pm 0,39$ mg/100g, compuestos fenólicos $552,64 \pm 1,57$ mg GAE/100 g y flavonoides $104 \pm 1,13$ mg RE/100 g (Prakash, Manikandan, Vigna, & Dinesh, 2013).

Otros procesos de extracción reportados en la literatura son la extracción de aceite de almendras, extractos de hierbas (hinojo, lúpulo, caléndula, menta), saponinas del ginseng, jengibre, rutina y ácido carnósico a partir del romero, polifenoles, aminoácidos y cafeína del té verde y de las piretrinas flores. En general todos estos procesos se han beneficiado del uso de ultrasonido, que muestra un mayor rendimiento de extracción y costos, tiempos de procesamiento más cortos, y sobre todo el proceso más eficiente (Vilkhu, Mawson, Simons, & Bates, 2008).

IV. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se han incrementado los estudios referentes a productos con alto contenido de compuestos bioactivos. Dichos trabajos se han realizado debido a resultados obtenidos en investigaciones previas, las cuales demuestran que estos compuestos poseen características importantes para ayudar a conservar la salud, ya que pueden funcionar como una fuente importante de antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos y además ayudan a controlar los niveles de glucosa y presión arterial en el cuerpo humano.

Gracias a la diversidad edafoclimática de nuestro país, podemos contar con una amplia variedad de fuentes para obtener compuestos bioactivos de importancia económica. Una de estas fuentes es el xoconostle, este fruto se encuentra principalmente en la región central del país y ha sido motivo de diversas investigaciones por considerarse un fruto al que no se le da un valor agregado y que posee una amplia variedad de compuestos bioactivos.

Para obtener estos compuestos se han hecho extracciones físicas, químicas y enzimáticas entre otras. Las cuales dañan los compuestos bioactivos, contaminan el ambiente o requieren de mucho tiempo. Para resolver estos problemas y tener una disponibilidad aceptable de estos compuestos, la comunidad científica se ha dado a la tarea de desarrollar nuevas técnicas de extracción, como: campos eléctricos, microondas, fluidos supercríticos, ultrasonido entre otras tecnologías. A las cuales se les ha llamado tecnologías emergentes o tecnologías verdes, esto porque benefician la extracción de biocompuestos ya que reducen el tiempo, el costo, aumentan rendimientos y no contaminan el ambiente.

Ya que no se le da un valor agregado al xoconostle y que las investigaciones referentes a la extracción de sus compuestos han sido químicas y enzimáticas, se ha decidido realizar este proyecto, en el cual se usó el ultrasonido para hacer más eficiente el proceso de extracción, reduciendo el tiempo de proceso y aumentando la cantidad de compuestos bioactivos obtenidos, así como su capacidad antioxidante y antibacteriana.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- ◆ Determinar las mejores condiciones para llevar a cabo la extracción asistida por ultrasonido de compuestos bioactivos de xoconostle.

5.2 Objetivos Específicos

- ◆ Encontrar las mejores condiciones para lograr la extracción de Fenoles Totales y Flavonoides Totales por medio de ultrasonido.
- ◆ Determinar el efecto de la extracción asistida con ultrasonido, en actividad antioxidante por medio de los ensayos ABTS y DPPH.
- ◆ Utilizar la técnica de microdilución en caldo para determinar el efecto inhibitorio, de los diferentes extractos obtenidos por la asistencia de ultrasonido en el crecimiento bacteriano.

VI. HIPÓTESIS

El uso de ultrasonido ayuda a extraer compuestos bioactivos del xoconostle, los cuales son capaces de brindar actividad antioxidante y antimicrobiana.

VII.MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Localización del experimento

El desarrollo experimental fue hecho en el Laboratorio de Aprovechamiento Agroalimentario Integral, Laboratorio de Bioquímica y Biología Celular del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp), en los Laboratorios de Físicoquímica, Análisis Especiales y de Tecnología Poscosecha del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTA), de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

7.2 Materia Prima

7.2.1 Xoconostle

El xoconostle que se utilizó fue de la variedad cuaresmeño rosa (*Opuntia oligacantha*) obtenido del municipio de Tizayuca, Hidalgo. Los frutos se cosecharon cuando tenían una coloración media (estado dos de madurez fisiológica).

7.2.2 Cepas

Las cepas que se utilizaron para probar el efecto antimicrobiano de los extractos fueron *Escherichia coli* O157:H7 (USDA) 465-97, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, todas proporcionadas por el laboratorio de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Querétaro.

7.3 Extracción por ultrasonido

Los xoconostles se cortaron en rodajas y se metieron a liofilizar por 2 días. Pasado este tiempo el xoconostle se pulverizó y fue pasado en un tamiz del número 50. Se pesó el polvo obtenido y se colocó en un vaso de plástico junto con el volumen de metanol acuoso requerido para la extracción, posteriormente se trató esta mezcla con un procesador ultrasónico modelo VCX 130 (Sonics Vibracell, E.U.A.) con un poder ultrasónico de 130 W y 20 KHz de frecuencia, a temperatura ambiente y bajo las siguientes condiciones:

Tabla 3. Condiciones de sonicación.

Factores		Niveles		
		-1	0	1
A	Tiempo (minutos)	10	20	30
B	Concentración (%)	40	60	80
C	Relación masa/volumen (g/mL)	1:10	1:20	1:30

A los extractos finales se les determinaron los siguientes parámetros: Fenoles Totales, Flavonoides Totales, actividad antioxidante inhibición del radical DPPH y ABTS) y actividad antimicrobiana.

Es importante mencionar que la relación masa/volumen de ahora en adelante se le llamará relación m/v.

7.4 Determinación de Fenoles Totales por el método de Folin-Ciocalteu

El ensayo Folin-Ciocalteu ha sido utilizado durante muchos años para medir el contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. Sin embargo, el mecanismo básico del método es una reacción redox por lo que puede considerarse como otro método de medida de la actividad antioxidante total. El método que se utiliza actualmente es una modificación efectuada por Singleton y colaboradores (1999). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azul que presenta un máximo de absorción a 760 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico. Para la ejecución de este método se preparó una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5 %. Las muestras se prepararon colocando 1 mL del extracto en tubos de ensayo, a esto se adicionaron 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:10 en agua destilada), se mezcló en un vórtex y se dejó reposar por 7 minutos en oscuridad, después se añadieron 4 mL de la solución de carbonato de sodio, se agitaron de nuevo y se dejaron reposar por un período de 120 minutos contando a partir de la adición de carbonato de sodio al primer tubo, transcurrido este tiempo se procedió a leer en espectrofotómetro a 760 nm. Dado que los resultados deben ser expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico (mg E.A.G./100g peso seco), fue necesario elaborar previamente la respectiva curva patrón (Figura 12), para ello se preparó una solución madre de ácido gálico con una concentración de 1000 mg/L a partir de ella se hicieron las diluciones

necesarias hasta obtener las siguientes concentraciones: 0,10, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L.

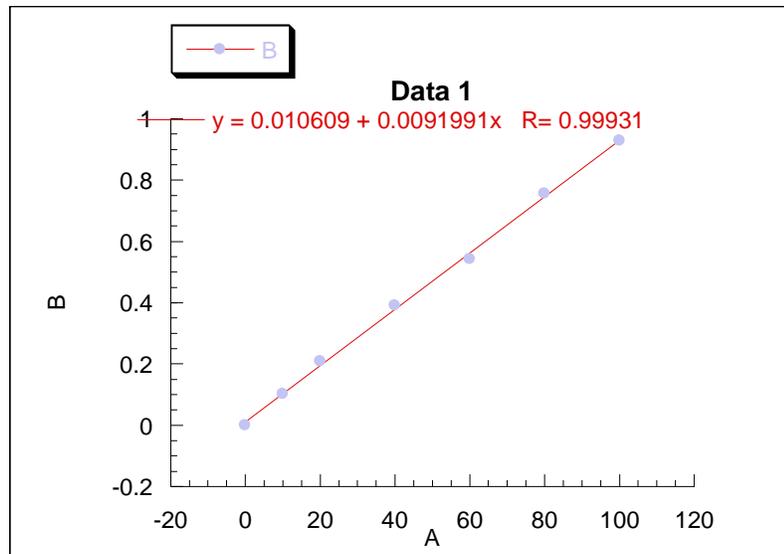


Figura 12. Curva de Calibrado para la medición de Fenoles Totales

7.5 Determinación de Flavonoides Totales

Para la determinación del contenido de Flavonoides Totales, se realizó mediante el método Dowd, adaptado por Arvouet-Grand y colaboradores, (1994). Se utilizó una solución de tricloruro de aluminio (AlCl_3) (Fermont, Monterey, Mex.) al 2% en metanol. Se midió 1 mL de extracto y se aforó a 10 mL con metanol en agitación, esta mezcla se filtró con papel Whatman No. 1. Posteriormente se colocaron 2 mL de la mezcla del extracto, más 2 mL de la solución metanólica de AlCl_3 , dejándolos reposar durante 20 min en la obscuridad. Pasando este tiempo se leyeron las absorbancias con celdas de cuarzo, a 415 nm en un espectrofotómetro. El contenido total de flavonoides fue determinado usando la curva estándar (Figura 13) con quercetina (Sigma Aldrich, E.U.A.) (0-40mg/L), los resultados fueron expresado en mg equivalentes de quercetina (mg E.Q.)/100g peso seco.

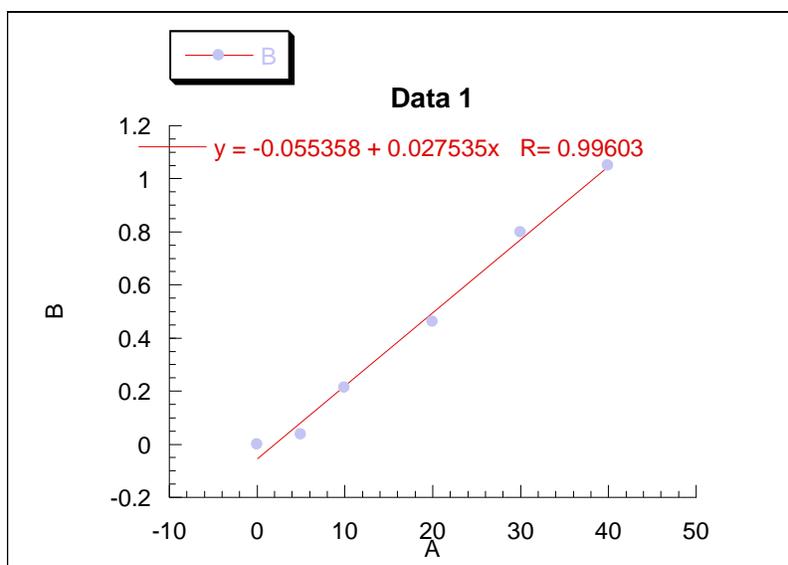


Figura 13. Curva de calibrado para la medición de Flavonoides Totales

7.6 Determinación de capacidad antioxidante por técnica de ABTS

Para ABTS, la técnica fue desarrollada en base a lo establecido por Re y colaboradores, (1999) con algunas modificaciones. El reactivo ABTS (Sigma Aldrich, E.U.A.) se disolvió en agua a concentración 7 mM., el catión radical $ABTS^{•+}$ fue producido mediante la reacción de la solución madre de ABTS con persulfato de potasio (2.45 mM) y la mezcla se mantuvo en agitación constante y a temperatura ambiente en la oscuridad en un periodo de tiempo de 16 a 24 horas antes de su uso. Después de que el radical fue creado, se mezcló en una celda de cuarzo 390 μ L de $ABTS^{•+}$ aproximadamente con 2.61 mL de etanol al 20 %, para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 754 nm. Se añadió 100 μ L de muestra, se mezcló y se midió la absorbancia después de seis minutos. La concentración de compuestos que eliminan el radical $ABTS^{•+}$ se expresó en miligramos equivalentes de ácido ascórbico (mg E.A.A.)/100g peso seco y fue calculada por medio de una curva patrón (0-50mg/L), que se observa en la Figura 14.

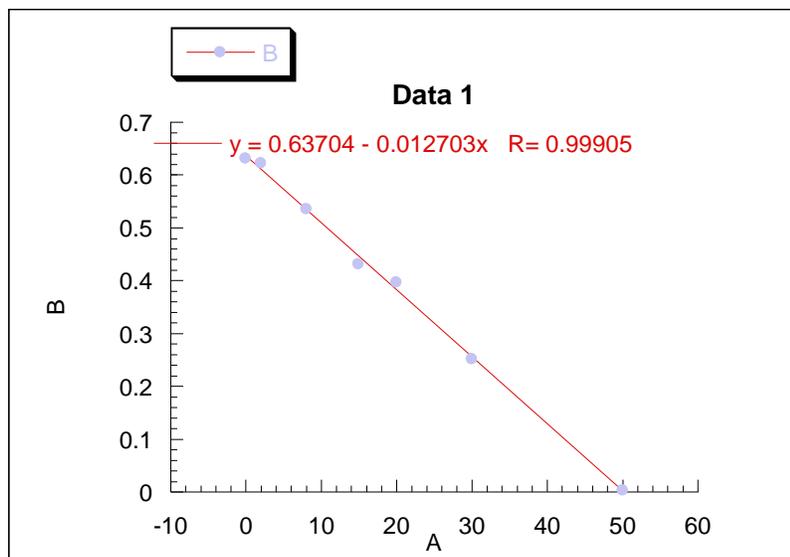


Figura 14. Curva de calibración para la medición de actividad antioxidante por ABTS.

7.7 Determinación de capacidad antioxidante por técnica de DPPH

El DPPH es un radical libre estable descubierto por Goldschmidt y Renn (Ioita, 2005), es comúnmente usado como herramienta para medir la habilidad de los compuestos fenólicos para eliminar a los radicales libres (Lai, Wen, Li, Wu, & Li, 2010). La técnica se realizó de acuerdo a Brand-Williams y colaboradores (1995) y se describe a continuación:

Para la preparación de la solución de DPPH 0.2 Mm, se pesó 7.8 mg de DPPH y se disolvió en 100 mL de metanol 80%, en oscuridad. Para una buena disolución fueron necesarias dos horas aproximadamente en agitación. La preparación de las muestras se hizo en tubos de vidrio, donde se colocaron 2500 μ L de la solución de DPPH 0.2 Mm, se agregaron 500 μ L del extracto (muestra), se agitó 15 segundos, se dejó en reposo y oscuridad por 120 minutos, las lecturas se efectuaron a 515 nm en el espectrofotómetro. El blanco fue metanol 80%. Los resultados fueron

expresados como mg E.A.A./100g peso seco. Para ello se realizó una curva patrón (0-80mg/L) con Ácido Ascórbico (Figura 15).

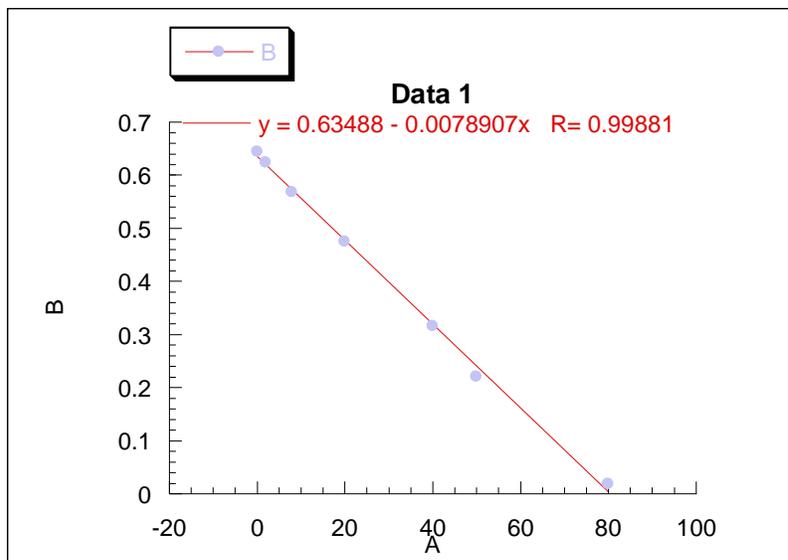


Figura 15. Curva de calibración para la medición de actividad antioxidante por DPPH.

7.8 Actividad antimicrobiana.

7.8.1 Preparación de los extractos.

A los extractos obtenidos con los tratamientos propuestos en la parte 7.4, se les realizó la prueba de actividad antimicrobiana. Para ello se concentraron en un rotavapor BÜCHI R-210/215, hasta separar la mayor cantidad de solvente, en seguida se liofilizaron dichas muestras, para tener los extractos secos.

7.8.2 Activación de las cepas.

Las cepas proporcionadas por la Universidad Autónoma de Querétaro, que se encontraban en congelación (-10°C) en una mezcla 50:50 glicerol-caldo nutritivo, fueron activadas agregando 1mL de la bacteria a un frasco que contenía 99 mL de caldo nutritivo estéril. Este caldo fue incubado por 5 horas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ para

Escherichia coli; en cuanto a *Salmonella spp.* en un tiempo de incubación de 22.5 horas.; *Staphylococcus aureus* se incubó por 9 horas y *Listeria monocytogenes* se dejó un lapso de tiempo de 24-37 horas. En todos los casos fue hasta obtener una densidad bacteriana de 10^6 - 10^7 UFC/mL.

7.8.3 Método de microdilución en caldo.

La metodología que se siguió fue de acuerdo a Klancnik y colaboradores (2010), con algunas modificaciones. Dicha metodología se describe a continuación:

Se prepararon los medios de cultivo específicos con agar eosina y azul de metileno para para *Escherichia coli* O157:H7 (USDA) 465-97, agar Salmonella-Shigella para *Salmonella spp.*, agar nutritivo para *Listeria monocytogenes*, finalmente se utilizó agar de Estafilococos para *Staphylococcus aureus* (todos los agares usados fueron de la marca Bioxon llevándose a cajas petri de 6 cm de diámetro), las cajas se dejaron solidificar a temperatura ambiente (20°C). Las diluciones se prepararon con una solución salina estéril, a concentración de 125 mg de extracto/mL.

Un vez que se activó cada bacteria hasta obtener una densidad microbiana de aproximadamente, 10^6 - 10^7 UFC/mL en caldo nutritivo, se realizó una dilución 1:10, agregando en un frasco estéril un mililitro de bacteria más nueve mililitros de la solución de extractos de xoconostle y solución salina, esto se agitó durante diez minutos. Después de ese tiempo se hicieron las diluciones microbiológicas necesarias y se inoculó en los respectivos agares para cada bacteria. La incubación se llevó a cabo en una estufa a 37°C en un lapso de tiempo de 18-24

horas. El control positivo fue una solución salina y como control negativo agua. Las pruebas se realizaron por triplicado.

7.9 Análisis de resultados.

Todos los datos fueron determinados por triplicado y los resultados fueron promediados. Se utilizó para el análisis el software Design Expert versión 9 (Stat-Ease, Minneapolis E.U.A.) El diseño empleado fue un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken, con tres niveles y tres factores (Tabla 3).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Fenoles Totales

Como se observa en la Tabla 4 los factores codificados, así como el valor experimental y predicho del contenido de Fenoles Totales se ajusta modelo polinomial cuadrático utilizando un Diseño Box-Behnken (BBD). En la corridas de punto central (2, 6, 7, 11 y 17), se observa que el valor experimental y predicho es el mismo.

Tabla 4. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para Fenoles Totales

Orden de Corrida	Factores Codificados			Variable de Respuesta (Y)	
	X ₁ ; Tiempo (min)	X ₂ ; Concentración (%)	X ₃ ; Relación m:v (g/mL)	Valor Experimental	Valor Predicho
1	1	0	-1	2115.96	2180.66
2	0	0	0	2334.64	2334.64
3	1	1	0	1603.27	1565.98
4	-1	0	1	2196.62	2131.92
5	0	1	-1	1952.76	1925.35
6	0	0	0	2334.64	2334.64
7	0	0	0	2334.64	2334.64
8	0	-1	-1	2149.45	2116.78
9	0	1	1	1137.82	1170.49
10	1	0	1	1656.13	1660.75
11	0	0	0	2334.64	2334.64
12	-1	-1	0	2426.25	2463.54
13	1	-1	0	2124.48	2092.45
14	-1	0	-1	2359.47	2354.85
15	0	-1	1	2101.39	2128.80
16	-1	1	0	1808.21	1840.25
17	0	0	0	2334.64	2334.64

El modelo obtenido fue el siguiente:

Fenoles Totales

$$= 2334.64 - 161.34A - 287.44B - 185.71C + 24.21AB - 74.25AC \\ - 191.72BC - 48.70A^2 - 295.39B^2 - 203.90C^2$$

Ecuación 3

El modelo cuadrático polinomial (Ecuación 3) fue altamente significativo y suficiente para representar la actual relación entre la variable de respuesta y los parámetros significativos con un bajo nivel del valor-p (<0.0001) y una R² predicha=.8599 como se observa en la Tabla 5.

Tabla 5. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para Fenoles Totales

Source	Sequential p- value	Lack of Fit p- value	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Linear	0.007		0.4999	0.3157	
2FI	0.4603		0.4921	0.06	
Quadratic	< 0.0001		0.98	0.8599	Suggested
Cubic			1		Aliased

El experimento 12 (10 minutos, 40% de metanol y 1:20 g/mL) mostró la mayor cantidad de compuestos fenólicos con 2426.25 mg E.A.G./100g de peso seco y en el experimento 9 (10 minutos, 80% de concentración y una relación m/v de 1:30) se extrajo la menor cantidad de compuestos fenólicos con 1137.82 mg E.A.G./100g de muestra seca (Tabla 4). Estos resultados son muy cercanos a los valores predichos para la extracción de compuestos fenólicos de xoconostle en los experimentos 12 y 9, los cuales fueron 2463.54 y 1170.49 mg E.A.G/100g de peso seco respectivamente. Dicha similitud entre los valores obtenidos

experimentalmente y los valores predichos, se deben a la buena adecuación del modelo cuadrático polinomial en el Diseño Box-Behnken.

La relación entre los parámetros de extracción y el contenido total de compuestos fenólicos fue investigada por medio de gráficas de superficie de respuesta.

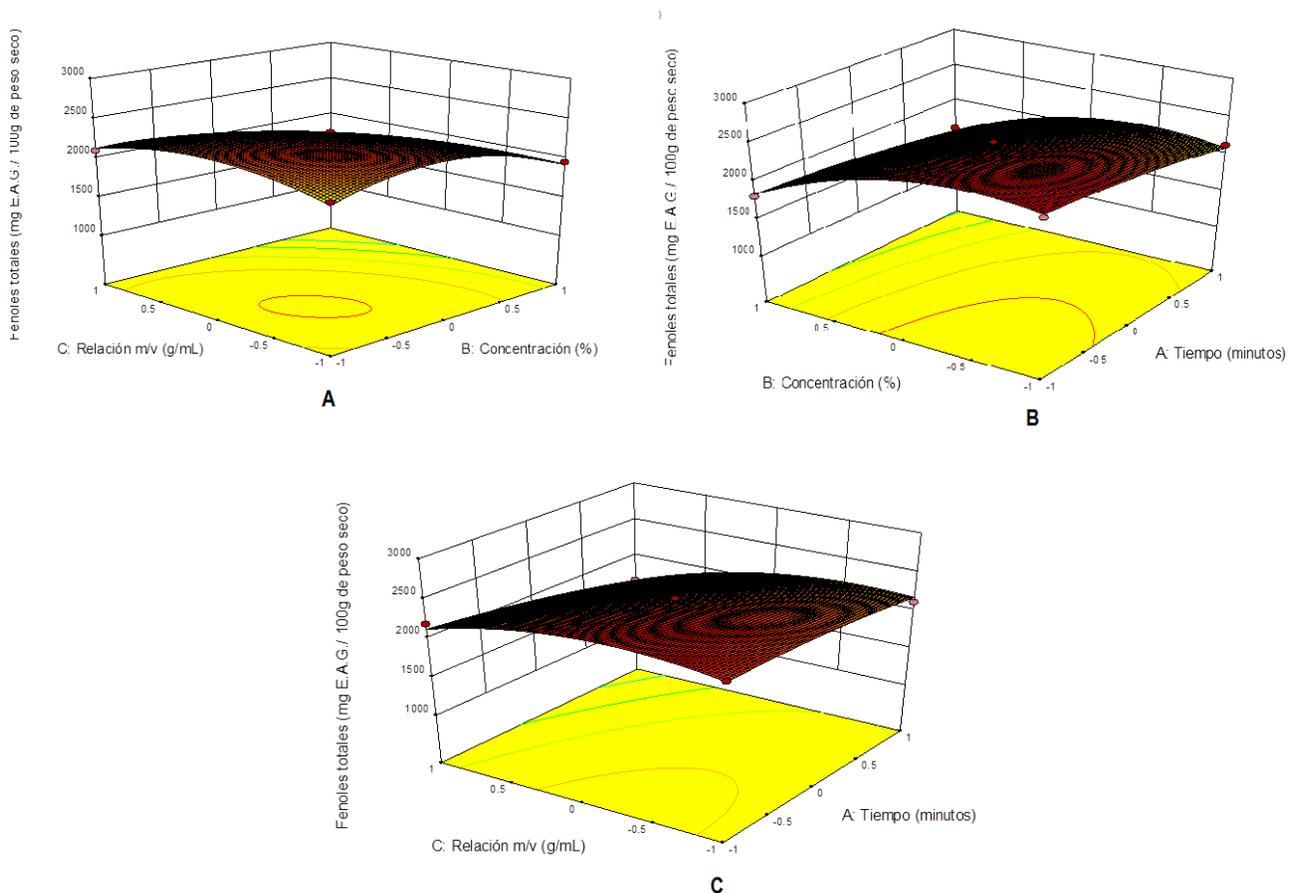


Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de compuestos fenólicos de xoconostle asistida por ultrasonido. (A) Muestra el efecto de la relación m/v y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la concentración y el tiempo de extracción, (C) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo en la concentración de compuestos fenólicos.

En la Figura 16A se muestra el efecto de la concentración de metanol, tiempo de extracción, relación m/v y sus respectivas interacciones en el total de compuestos fenólicos extraídos. Un alto contenido de compuestos fenólicos se puede observar

cuando la relación m/v es 1:15 y la concentración de metanol al 50% aproximadamente. Esto coincide con otra investigación (Aybastier, Işik, Şahin, & Demir, 2013; Escribano-Bailon & Santos-Buelga, 2003; Liu, Wei, & Liao, 2013), en la extracción de compuestos fenólicos de plantas, donde reportan que el máximo contenido de compuestos fenólicos se puede alcanzar con una concentración del 50% de metanol.

Por otro lado en la Figura 16B, es posible observar el efecto de la concentración de metanol y el tiempo de sonicación para lograr la extracción, la concentración, mantiene la misma tendencia que en la gráfica 8A, encontrando que la mejor concentración para extraer compuestos fenólicos del xoconostle por ultrasonido es a 50% de metanol. Respecto al factor tiempo, se encontró que en 10 minutos se extrae la mayor cantidad de compuestos fenólicos y conforme va aumentando el tiempo, la concentración de compuestos va disminuyendo. Esto se puede explicar porque el uso prolongado de ultrasonido puede generar la descomposición química de los compuestos bioactivos presentes en el extracto, resultando en el decremento en la cantidad de Fenoles Totales extraídos (Lu *et al.*, 2008).

La Figura 16C, corrobora los resultados obtenidos para la concentración y el tiempo, en esta figura interactúan estas dos variables, encontrando que una relación cercana a 1:15 y un tiempo cercano a 10 minutos la extracción de compuestos fenólicos es favorecida. Los resultados gráficos, mostraron que el comportamiento de las variables (tiempo, relación m/v y concentración) se ajusta a un efecto cuadrático, pues las gráficas tienen una curvatura característica de este tipo de función (Franco-Arteaga, 2007).

8.2 Flavonoides Totales

Es posible observar en la tabla 6 que los factores codificados, así como el valor experimental y predicho del contenido de Flavonoides Totales, son similares, esto debido al buen ajuste al modelo lineal, utilizando un Diseño Box-Behnken (BBD).

Tabla 6. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para Flavonoides Totales.

Orden de Corrida	Factores Codificados			Variable de Respuesta (Y)	
	X ₁ ; Tiempo (min)	X ₂ ; Concentración (%)	X ₃ ; Relación m:v (g/mL)	Valor Experimental	Valor Predicho
1	1	0	-1	11.53	11.41
2	0	0	0	13.45	13.77
3	1	1	0	11.94	12.29
4	-1	0	1	16.23	16.13
5	0	1	-1	10.37	9.76
6	0	0	0	13.45	13.77
7	0	0	0	13.45	13.77
8	0	-1	-1	12.61	12.88
9	0	1	1	15.07	14.65
10	1	0	1	16.65	16.3
11	0	0	0	13.45	13.77
12	-1	-1	0	15.46	15.24
13	1	-1	0	15.7	15.42
14	-1	0	-1	11.7	11.23
15	0	-1	1	17.84	17.78
16	-1	1	0	11.73	12.12
17	0	0	0	13.45	13.77

El modelo obtenido fue el siguiente:

$$\text{Flavonoides Totales} = 13.77 + 0.087A - 1.56B + 2.45C$$

Ecuación 4

El modelo lineal polinomial (Ecuación 4) fue altamente significativo y suficiente para representar la actual relación entre la variable de respuesta y los parámetros significativos con un bajo nivel del valor-p (<0.0001) y una R^2 predicha=.9499 como se observa en la Tabla 7.

Tabla 7. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para Flavonoides totales.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	< 0.0001		0.9663	0.9499	Suggested
2FI	0.8236		0.9599	0.9006	
Quadratic	0.1147		0.9742	0.8194	
Cubic				1	Aliased

Tomando los factores 20 minutos, concentración al 40% y 1:30 en relación m/v (experimento 15), se obtiene la mayor concentración de Flavonoides Totales 17.84 y 17.78 mg EQ/100g peso seco para el valor experimental y el valor predicho por el modelo respectivamente. Mientras que con las condiciones 20 minutos, 80% de concentración y 1/10 relación m/v (experimento 5), se obtienen las menores concentraciones de extracción para Flavonoides Totales con 10.37 y 9.76 mg EQ/100g peso seco, para el valor experimental y el predicho por el modelo respectivamente (Tabla 6).

El que los resultados experimentales y predichos sean muy parecidos se debe a la buena adecuación del modelo lineal polinomial en el Diseño Box-Behnken.

La relación entre los parámetros de extracción y la cantidad de Fenoles Totales extraída, se analizó por medio de gráficas de superficie de respuesta.

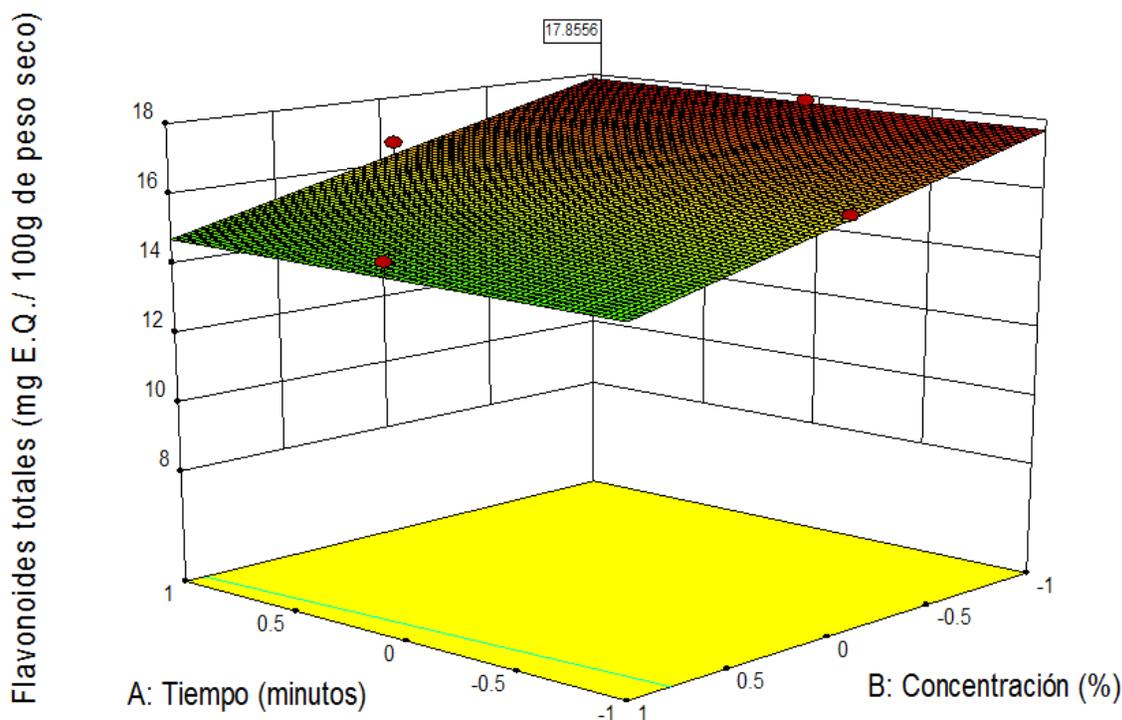


Figura 17. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de Flavonoides Totales de xoconostle asistida por ultrasonido, muestra el efecto de la concentración de metanol y el tiempo de extracción con la relación m/v 1:30 g/mL.

La Figura 17, muestra que la relación entre los parámetros de extracción de Flavonoides Totales es lineal. Se decidió mantener la relación m/v en 1:30. El aumentar la relación m/ y extraer más Flavonoides Totales, se logra porque al aumentar el volumen del disolvente, se aumenta el área de superficie de contacto de la muestra de las ondas ultrasónicas (Huang, Xue, Niu, Jia, & Wang, 2009). Referente al tiempo de sonicación, es posible observar que conforme aumenta el tiempo de tratamiento ultrasónico, la cantidad de Flavonoides Totales aumenta ligeramente, Stanisavljević y colaboradores (2009), probaron 2.5, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos de sonicación en la extracción de Flavonoides a partir de *Echinacea purpurea L.*, encontrando que el aumento en el tiempo de sonicación incrementa la cantidad extraída de Flavonoides. El aumento en el tiempo de sonicación,

puede lograr que los compuestos bioactivos se extraigan en mayor cantidad debido a que se generan más ciclos de cavitación, con esto se cree que se generan altos gradientes de cizalla que causan microcorrientes, las cuales destruyen la pared celular (Gogate & Kabadi, 2009). Esto acelera significativamente la penetración del solvente dentro de la célula y libera sus componentes en él, y al mismo tiempo mejora la transferencia de masa logrando mayor rendimiento en la extracción (Lou, Wang, Zhang, & Wang, 2010). Respecto a la concentración, la mayor cantidad de compuestos (17.85 mg EQ/100g peso seco) es encontrada cuando la concentración de metanol se encuentra en el valor codificado -1. Los resultados sugieren que metanol al 40% podría ofrecer la presión de vapor, la viscosidad y la tensión superficial adecuada de disolvente de extracción, que son muy importantes características físicas de disolvente y que influyen en la eficiencia de la sonicación, para el extracto enriquecido en flavonoides (Mason *et al.*, 1996). La concentración del solvente en las extracciones juega un papel muy importante, el variarla puede ayudar a extraer diferentes tipos de compuestos. Los resultados obtenidos en esta investigación son similares a los presentados por Teh & Birch (2014) , donde encuentran que la extracción de Flavonoides Totales por ultrasonido de semillas de Cáñamo, aumenta cuando se cambia la relación m/v, teniendo una concentración de 11.67 y 28.18 mg LUE/100g peso fresco en 1:10 y 1:20 g/mL respectivamente. La concentración usada de metanol es cercana al 35% y el tiempo de sonicación va de 20 a 30 minutos. Por otra parte Huang y colaboradores (2009), encontraron que con etanol en una concentración del 42%, es posible obtener la mayor cantidad de

Flavonoides Totales cuando la extracción de ellos a partir de *Folium eucommiae* se asiste con ultrasonido.

8.3 ABTS

Como se observa en la Tabla 8 los factores codificados, así como el valor experimental y predicho de la eliminación del radical libre ABTS, presenta un ajuste adecuado al modelo polinomial cuadrático con la transformada 1/Sqrt, utilizando un Diseño Box-Behnken (BBD) en la corridas 1, 2, 4, 6, 7, 10, 11, 14 y 17 se observa que el valor experimental y predicho es el mismo.

Tabla 8. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para la actividad antioxidante por ABTS.

Orden de Corrida	Factores Codificados			Variable de Respuesta (Y)	
	X ₁ ; Tiempo (min)	X ₂ ; Concentración (%)	X ₃ ; Relación m:v (g/mL)	Valor Experimental	Valor Predicho
1	1	0	-1	0.057	0.057
2	0	0	0	0.046	0.046
3	1	1	0	0.041	0.039
4	-1	0	1	0.041	0.041
5	0	1	-1	0.045	0.047
6	0	0	0	0.046	0.046
7	0	0	0	0.046	0.046
8	0	-1	-1	0.045	0.043
9	0	1	1	0.029	0.031
10	1	0	1	0.039	0.039
11	0	0	0	0.046	0.046
12	-1	-1	0	0.033	0.035
13	1	-1	0	0.032	0.034
14	-1	0	-1	0.058	0.058
15	0	-1	1	0.026	0.024
16	-1	1	0	0.041	0.040
17	0	0	0	0.046	0.046

El modelo obtenido fue el siguiente:

$$\frac{1}{\text{Sqrt}(\text{ABTS})} = 0.046 - 5.073^{-004}A + 2.661^{-003}B$$

Ecuación 5

El modelo cuadrático polinomial transformado (1/Sqrt) (Ecuación 5) fue altamente significativo y suficiente para representar la actual relación entre la variable de respuesta y los parámetros significativos con un bajo nivel del valor-p (<0.0001) y una R^2 predicha=.6865 como se observa en la Tabla 9.

Tabla 9. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la actividad antioxidante por ABTS.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Linear	0.0102		0.469	0.1507	
2FI	0.9958		0.3139	-0.9793	
Quadratic	< 0.0001		0.9552	0.6865	Suggested
Cubic			1		Aliased

En la corrida 15 (20 minutos, 40% de concentración, 1:30 relación m/v) se pueden apreciar los valores transformados (1/Sqrt) mayores, tanto el experimental, como el predicho. Se observa que en la corrida 14, el valor predicho y el experimental (0.058) es igual para ambos casos, siendo de todas las corridas, donde menor actividad antioxidante hay (297.64mg E.A./100g peso seco).

Para interpretar la interacción de los parámetros se utilizó gráficas de superficie de respuesta (Figura 18).

En la Figura 18A, es posible observar la extracción de compuestos que neutralizan radical ABTS^{•+} y las interacciones para obtenerlos, entre los parámetros tiempo, concentración y relación m/v (1:30 g/mL). Es posible observar una gráfica propia de un modelo cuadrático polinomial. La mayor cantidad de compuestos que neutralizan al radical ABTS^{•+}, se encuentran en una concentración 40% de metanol y un tiempo aproximado de 25 minutos.

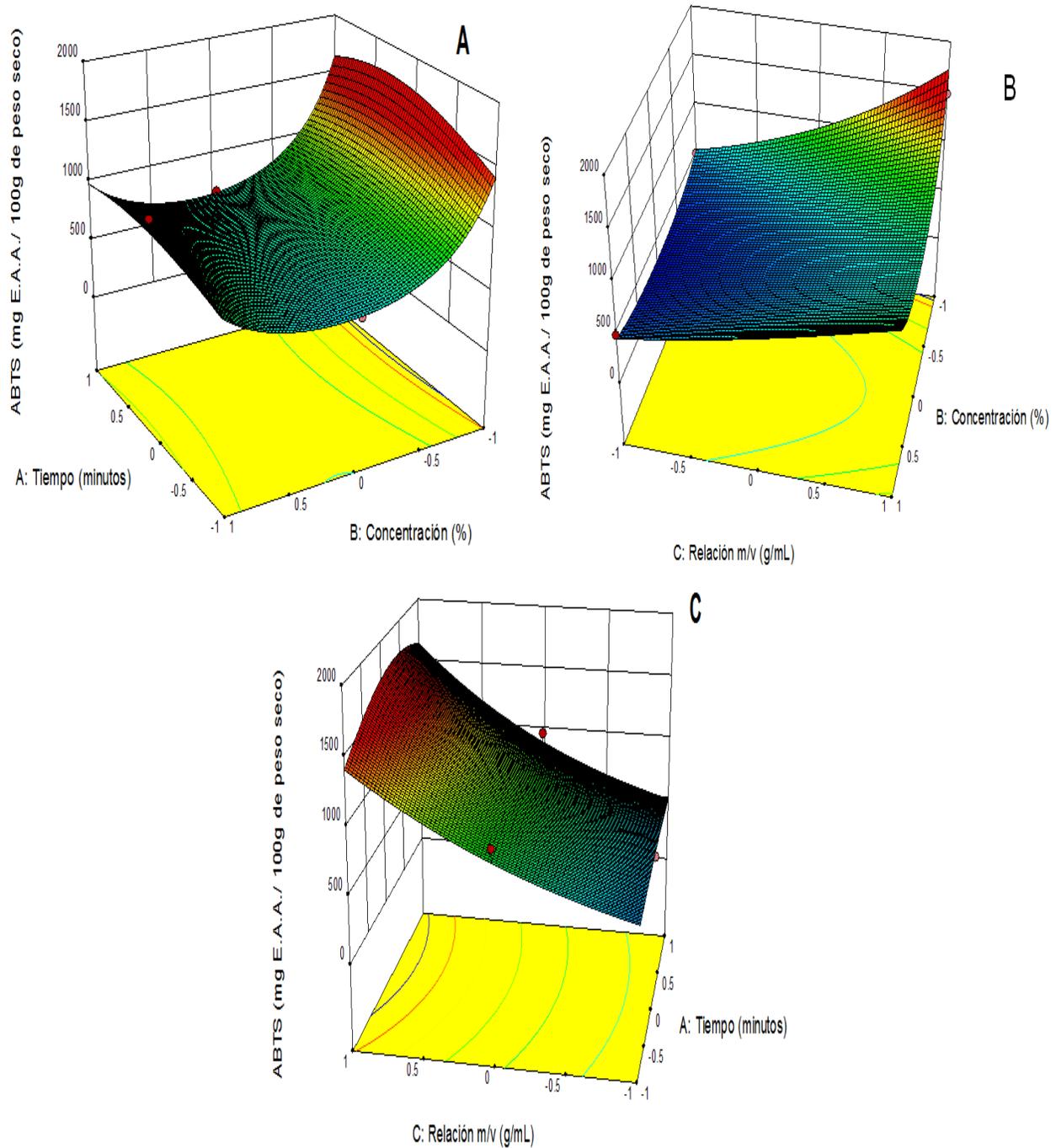


Figura 18. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xonostle asistida por ultrasonido de compuestos que eliminan el radical $ABTS^{+}$, (A) muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración.

El comportamiento del factor tiempo en nuestra investigación es similar al reportado por Cruz y colaboradores (2013), donde sometieron a sonicación el jugo de *Opuntia ficus Indica* encontrando que el aumento del tiempo de sonicación beneficia la cantidad de compuestos que inhiben al radical ABTS^{•+}, pero después de un tiempo determinado estos compuestos empiezan a disminuir, este fenómeno puede ser explicado de dos formas: la primera es que posiblemente sea debido a la destrucción estructural y la descomposición de compuestos que presentan actividad antioxidante frente al radical ABTS^{•+} durante el prolongado tiempo de extracción (Carrera, Ruiz-Rodríguez, Palma, & Barroso, 2012) y la segunda explicación es porque la cavitación prolongada en los líquidos puede iniciar varias reacciones químicas, mediante la generación de iones libres de productos químicos (radicales), los cuales pueden disminuir la actividad antioxidante del extracto (Kuldiloke, 2002).

Por otra parte en la Figura 18B es posible observar la interacción de los parámetros relación m/v, tiempo y concentración (40%). Se logra observar que si la relación m/v se aumenta de 1:10 a 1:30 y se mantiene el tiempo de sonicación entre 18 y 22 minutos, se alcanza la mayor cantidad extraída predicha por el modelo de compuestos que neutralizan al radical ABTS^{•+}, llegando aproximadamente a los 1800 mg E.A.A./100g peso seco,

En la figura 18C con la interacción de la concentración, la relación m/v y el tiempo (20 minutos) se corrobora lo que se observó en las gráficas anteriores, la mayor cantidad extraída de compuestos que neutralizan al radical ABTS^{•+}, se alcanza si se utiliza una concentración del 40%, una relación de 1:30 y un tiempo ligeramente

superior a 20 minutos. La prueba de ABTS evalúa compuestos hidrofílicos y lipofílicos, aunque se detectan en mayor concentración los compuestos hidrofílicos (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Con los resultados obtenidos en esta investigación podemos inferir que los compuestos que se están extrayendo en su mayoría son de carácter hidrofílico, ya que la concentración del metanol usado es la menor (hay más agua que metanol).

8.4 DPPH

En la Tabla 10 se presentan los factores codificados, así como el valor experimental y predicho de la eliminación del radical DPPH, existe un ajuste adecuado modelo polinomial cuadrático, utilizando un Diseño Box-Behnken (BBD). En las corridas de punto central 2, 6, 7, 11 y 17 se observa que el valor experimental y predicho es el mismo.

Tabla 10. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para la actividad antioxidante por DPPH.

Orden de Corrida	Factores Codificados			Variable de Respuesta (Y)	
	X ₁ ; Tiempo (min)	X ₂ ; Concentración (%)	X ₃ ; Relación m:v (g/mL)	Valor Experimental	Valor Predicho
1	1	0	-1	68.23	67.48
2	0	0	0	144.33	144.33
3	1	1	0	147.24	147.4
4	-1	0	1	217.74	218.49
5	0	1	-1	70.79	71.38
6	0	0	0	144.33	144.33
7	0	0	0	144.33	144.33
8	0	-1	-1	69.25	69.8
9	0	1	1	223.85	223.3
10	1	0	1	221.23	221.62
11	0	0	0	144.33	144.33
12	-1	-1	0	145.05	144.89
13	1	-1	0	146.5	146.7
14	-1	0	-1	69.2	68.81
15	0	-1	1	222.28	221.69
16	-1	1	0	147.59	147.39
17	0	0	0	144.33	144.33

El modelo obtenido fue el siguiente:

$$DPPH = 144.33 + 0.45A + 0.80B + 75.95C - 0.45AB + 1.11AC + 7.500^{-003}BC - 0.089A^2 + 2.35B^2 - 0.14C^2$$

Ecuación 6

El modelo cuadrático polinomial (Ecuación 6) fue altamente significativo y suficiente para representar la actual relación entre la variable de respuesta y los parámetros significativos con un bajo nivel del valor-p (0.0009) y una R^2 predicha=.999 como se observa en la Tabla 11.

Tabla 11. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la actividad antioxidante por DPPH.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	< 0.0001		0.9991	0.9987	
2FI	0.5539		0.9991	0.9975	
Quadratic	0.0009		0.9999	0.999	Suggested
Cubic			1		Aliased

Se utilizaron las gráficas de superficie de respuesta (Figura 19), para entender el comportamiento de los parámetros en la extracción de compuestos que eliminan el radical DPPH.

La Figura 19A se puede observar la interacción de la concentración, el tiempo y la relación m/v (1:19). La gráfica muestra un comportamiento constante. Pero si tomamos en cuenta la Figura 19B, podemos ver que si la relación m/v aumenta de 1:10 a 1:30, existe un incremento en la cantidad de compuestos que eliminan el radical DPPH, llegando a extraer 225 mg E.A.A./100g peso seco, cabe señalar que la extracción respecto al tiempo se mantiene constante desde los 10 hasta los 30 minutos, por lo que podemos deducir que el tiempo no es un parámetro que influya en el proceso de extracción, razón por la cual se podría utilizar una sonicación de 10 minutos para disminuir los costos de extracción. En la actividad antioxidante por DPPH no influye el tiempo de extracción a diferencia de ABTS. Por lo tanto es importante notar que el tiempo de irradiación ultrasónica puede

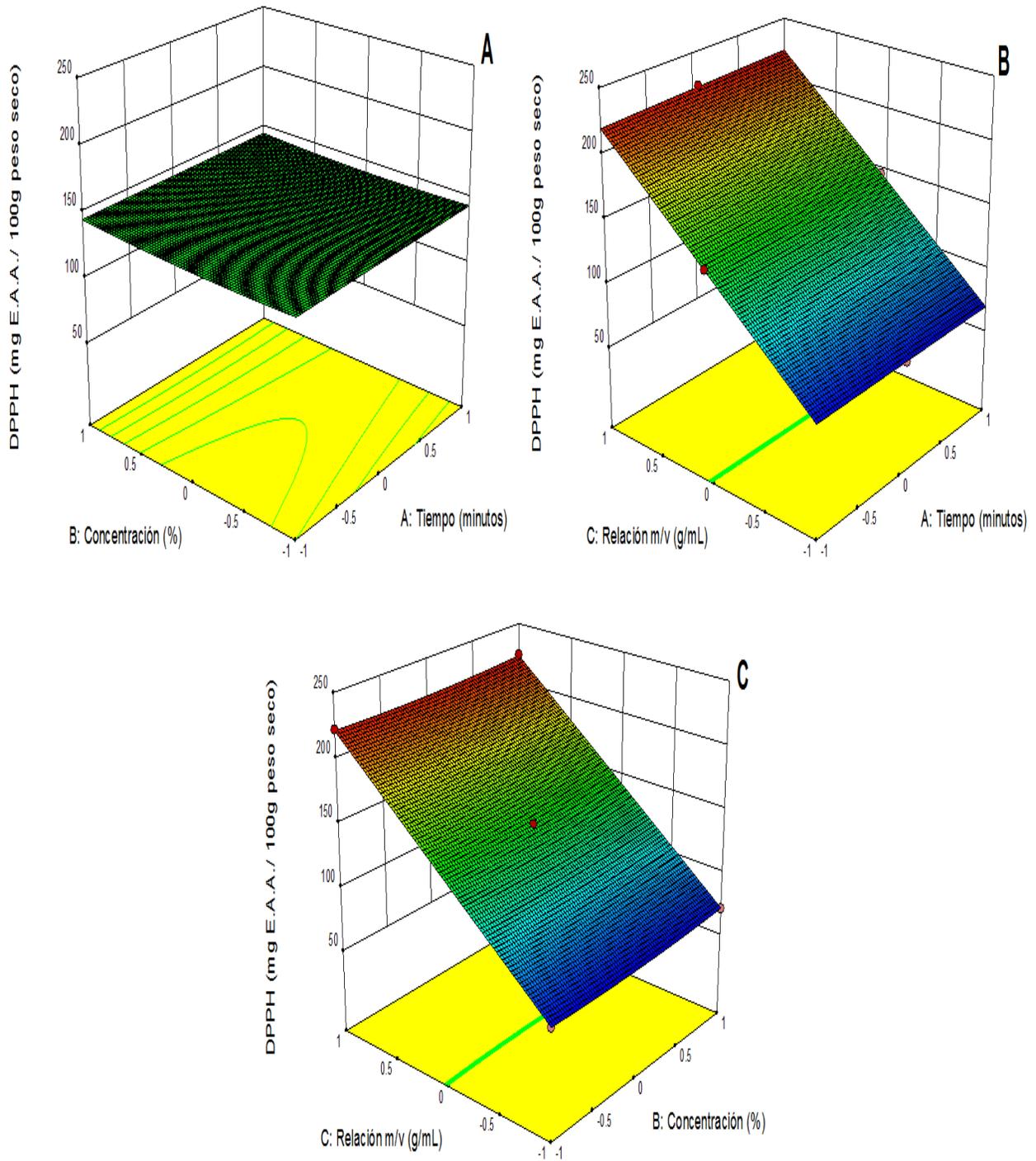


Figura 19. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que eliminan el radical DPPH[•], (A) muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración.

variar dependiendo de la naturaleza y propiedades biológicas de los compuestos presentes en el material vegetal (Wang & Weller, 2006).

En la Figura 19C, es posible observar y verificar nuevamente que la concentración del metanol en la extracción, es un factor que al igual que el tiempo no influye en el proceso de extracción pues se mantiene constante la cantidad de compuestos extraída desde 40 hasta 80% de metanol. Esta gráfica nos muestra que el único factor de impacto en la extracción de compuestos que eliminan el radical DPPH, es la relación m/v, obteniendo la mayor concentración de extractos cuando se usa la relación m/v 1:30. Esto porque al incrementar la proporción de metanol se reduce la constante dieléctrica de la solución y en consecuencia reduce la energía de interacción entre las moléculas de soluto y de solvente (Cacace & Mazza, 2003). También es importante mencionar que cuando se usa un amplio volumen en la relación m/v, se pueden obtener mayor capacidad antioxidante (Muñiz-Márquez *et al.*, 2013), este fenómeno se explica por la aceleración en la difusión de los compuestos, lo cual incrementa la actividad antioxidante (Liu *et al.*, 2013).

Un comportamiento similar muestra Vieira y colaboradores (2013), para la actividad antioxidante por DPPH a partir de compuestos de *Euterpe edulis*, en este trabajo encontraron que conforme aumenta la relación m/v, la actividad antioxidante lo hace de igual manera.

8.5 *Escherichia coli*

Como se observa en la Tabla 12 los factores codificados, así como el valor experimental y predicho para la inhibición de *Escherichia coli*, presenta un ajuste aceptable al modelo 2FI, utilizando un Diseño Box-Behnken (BBD).

Tabla 12. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*.

Orden de Corrida	Factores Codificados			Variable de Respuesta (Y)	
	X ₁ ; Tiempo (min)	X ₂ ; Concentración (%)	X ₃ ; Relación m:v (g/mL)	Valor Experimental	Valor Predicho
1	1	0	-1	60.63	59.9
2	0	0	0	56.7	58.25
3	1	1	0	47.23	47.44
4	-1	0	1	55.27	53.7
5	0	1	-1	42.86	41.44
6	0	0	0	56.7	58.25
7	0	0	0	56.7	58.25
8	0	-1	-1	88.75	84.85
9	0	1	1	46.65	52.48
10	1	0	1	60.98	53.01
11	0	0	0	56.7	58.25
12	-1	-1	0	77.32	73.61
13	1	-1	0	62.77	65.47
14	-1	0	-1	60.71	66.39
15	0	-1	1	50.89	54.23
16	-1	1	0	52.68	46.48
17	0	0	0	56.7	58.25

El modelo obtenido fue el siguiente:

$$Escherichia coli = 58.25 - 1.80A - 11.29B - 4.90C + 2.27AB + 1.45AC + 10.41BC$$

Ecuación 7

El modelo 2FI (Ecuación 7) fue significativo y suficiente para representar la actual relación entre la variable de respuesta y los parámetros significativos con un bajo

nivel del valor-p (0.0096) y una R^2 predicha=.4062 como se observa en la Tabla 13.

Tabla 13. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R ²	Predicted R ²	
Linear	0.0033		0.5571	0.2527	
2FI	0.0096		0.8073	0.4062	Suggested
Quadratic	0.7649		0.7641	-0.6515	
Cubic			1		Aliased

Fueron utilizadas gráficas de superficie de respuesta para ver la interacción de los factores en la extracción de compuestos que inhiben el crecimiento *E. coli* (Figura 20A, 20B y 20C).

Es posible observar en la Figura 20A, la relación entre los factores Tiempo (A), Concentración (B) y relación m/v (1:10) en el porcentaje de inhibición de *Escherichia coli*. La gráfica muestra un incremento en el porcentaje de inhibición cuando el tiempo de sonicación son 10 minutos (-1 en factor codificado) y la concentración de metanol es al 40% (-1 en factor codificado), el color azul en la gráfica de superficie de respuesta indica que en esos parámetros está el menor porcentaje de inhibición, por su parte el color rojo indica el mayor porcentaje de inhibición. La buena inhibición del crecimiento de *E. coli* cuando la concentración de metanol es la más baja, es posible que se deba a que en el extracto obtenido existen más compuestos solubles en agua, los cuales son eficientes en la inhibición del crecimiento bacteriano (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001).

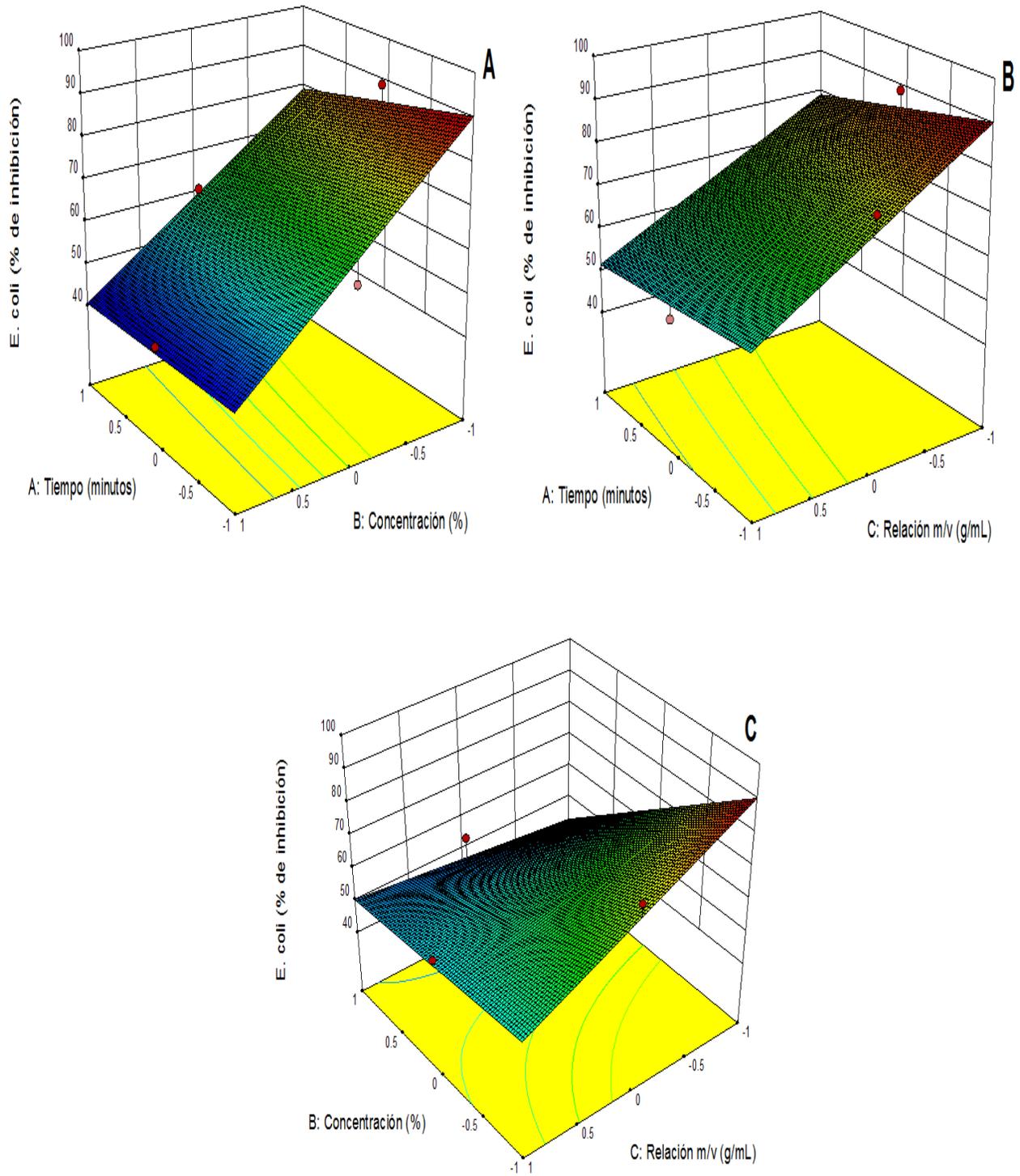


Figura 20. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que inhiben el crecimiento de *Escherichia coli*, (A) muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración

La relación entre el tiempo (A), la relación m/v (B) y concentración (40%), se aprecia en la Figura 20B. Es posible apreciar que cuando el tiempo de sonicación disminuye de 30 a 10 minutos la inhibición encontrada es mayor, de igual forma cuando la relación m/v decrece, el porcentaje de inhibición aumenta. Es posible alcanzar un 90% de inhibición cuando los parámetros en tiempo son 10 minutos y la relación m/v es 1:10. En su trabajo Karabegović y colaboradores (2011), probaron la relación 1:10 para realizar la extracción de compuestos por ultrasonido a partir de *Artemisia sp.* Encontrando que los extractos obtenidos presentan buena inhibición frente a *Escherichia coli*.

La Figura 20C, confirma lo que se observó en la dos graficas anteriores, con una concentración del 40%, en una relación de solvente 1:10 y un tiempo de sonicación igual o un poco superior a 10 minutos se alcanza un porcentaje de inhibición de *Escherichia coli* cercano al 90%. Rauha y colaboradores (2000), encontraron que los extractos de diversas plantas presentan un efecto inhibitorio para el crecimiento de *E. coli*, dicho efecto puede ser atribuido a los metabolitos secundarios que están presentes en las plantas y los cuales tienen la función de defensa contra organismos que causan algún problema a la planta, dentro de estos metabolitos secundarios es posible encontrar a los compuestos fenólicos (Tan, Zheng, & Tang, 1998).

8.6 *Salmonella spp.*

Como se observa en la Tabla 14, el valor experimental y predicho para la inhibición de *Salmonella spp.*, presentan un ajuste adecuado al modelo cuadrático polinomial, utilizando un Diseño Box-Behnken (BBD), encontrando que los valores experimentales y predichos son iguales en los puntos centrales (2, 6, 7, 11 y 17).

Tabla 14. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para la inhibición del crecimiento de *Salmonella spp.*

Orden de Corrida	Factores Codificados			Variable de Respuesta (Y)	
	X ₁ ; Tiempo (min)	X ₂ ; Concentración (%)	X ₃ ; Relación m:v (g/mL)	Valor Experimental	Valor Predicho
1	1	0	-1	98.53	103.96
2	0	0	0	98.53	98.53
3	1	1	0	88.08	85.35
4	-1	0	1	98.68	93.25
5	0	1	-1	87.56	84.86
6	0	0	0	98.53	98.53
7	0	0	0	98.53	98.53
8	0	-1	-1	88.15	84.17
9	0	1	1	90.14	94.12
10	1	0	1	88.97	87.72
11	0	0	0	98.53	98.53
12	-1	-1	0	61.97	64.7
13	1	-1	0	68.54	67.09
14	-1	0	-1	98.9	100.15
15	0	-1	1	49.06	51.76
16	-1	1	0	88.03	89.48
17	0	0	0	98.53	98.53

El modelo obtenido fue el siguiente:

Salmonella spp.

$$= 98.53 - 0.43A + 10.76B - 5.79C - 1.63AB - 2.34AC + 10.42BC - 2.17A^2 - 19.71B^2 - 0.094C^2$$

Ecuación 8

El modelo lineal polinomial (Ecuación 8) fue altamente significativo y suficiente para representar la actual relación entre la variable de respuesta y los parámetros significativos con un bajo nivel del valor-p (0.0002) y una R^2 predicha=.4134 como se observa en la Tabla 15.

Tabla 15. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la inhibición del crecimiento de *Salmonella spp.*

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	0.1284		0.1926	-0.2249	
2FI	0.4942		0.1652	-1.0643	
Quadratic	0.0002		0.9162	0.4134	Suggested
Cubic			1		Aliased

Para interpretar la interacción de los factores en la extracción de compuestos que inhiben el crecimiento de *Salmonella spp.* fue necesario el uso de gráficas de superficie de respuesta (Figura 21).

El análisis gráfico para el comportamiento del tiempo (A), de la concentración (B) y de la relación m/v (1:20) se encuentra en la Figura 21A, es posible observar que el comportamiento tiene un punto máximo cuando la concentración se encuentra aproximadamente en 68% de metanol, respecto al tiempo se observa que de 20 a 30 minutos hay una disminución en el porcentaje de inhibición de *Salmonella spp.*, pero si el tiempo disminuye de 20 a 10 minutos se puede observar un comportamiento constante obteniendo aproximadamente un 98% de inhibición.

Por otra parte, la Figura 21B muestra la interacción entre los parámetros relación m/v (C), concentración (B) y tiempo (20 minutos). En esta gráfica se observa claramente que la concentración para obtener mayor porcentaje de inhibición de

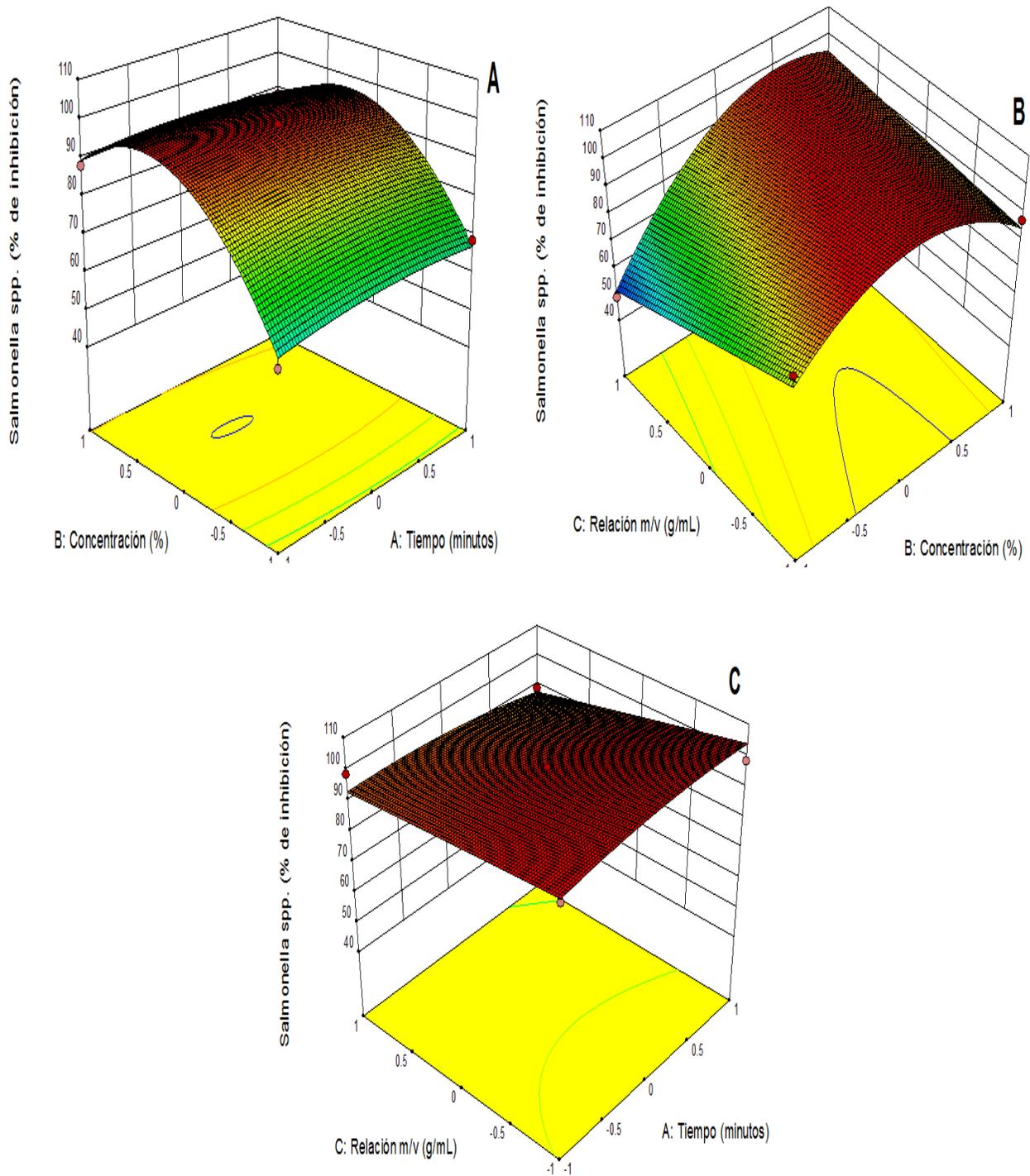


Figura 21. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que inhiben el crecimiento de *Salmonella spp.* (A) muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración.

Salmonella spp., se encuentra entre 68 y 70% de metanol, mientras que para la relación m/v se ve un efecto cuadrático, cuando el volumen aumenta, se incrementan los compuestos que inhiben el crecimiento de *Salmonella spp.*, con este comportamiento los mejores resultados se encuentran cuando se maneja una relación aproximada de 1:24 g/mL. Este fenómeno puede ser atribuido principalmente a la transferencia de masa, debido a que baja relación m/v tiene una alta concentración de gradiente, lo que aumenta la difusión y el rendimiento de extracción de compuestos que inhiben el crecimiento de *Salmonella spp.*

La Figura 21C, muestra que después de 20 minutos de sonicación existe una ligera disminución en el porcentaje de inhibición de *Salmonella spp.*, por lo que sería conveniente usar 10 minutos para realizar la extracción, referente a la relación m/v, podría usarse una relación 1:20 o hasta 1:10, debido a que se encuentra buen porcentaje de inhibición con estas condiciones.

8.7 *Staphylococcus aureus*

Como se observa en la Tabla 16, valor experimental y predicho para la inhibición de *Staphylococcus aureus*, presenta un ajuste aceptable al modelo cuadrático polinomial transformado (Ln), utilizando un Diseño Box-Behnken (BBD), con el valor experimental y predicho igual en los puntos centrales.

Tabla 16. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Orden de Corrida	Factores Codificados			Variable de Respuesta (Y)	
	X ₁ ; Tiempo (min)	X ₂ ; Concentración (%)	X ₃ ; Relación m:v (g/mL)	Valor Experimental	Valor Predicho
1	1	0	-1	3.42	3.48
2	0	0	0	3.98	3.98
3	1	1	0	3.9	3.88
4	-1	0	1	4.04	3.98
5	0	1	-1	3.4	3.37
6	0	0	0	3.98	3.98
7	0	0	0	3.98	3.98
8	0	-1	-1	3.24	3.23
9	0	1	1	3.38	3.38
10	1	0	1	3.42	3.44
11	0	0	0	3.98	3.98
12	-1	-1	0	4.19	4.22
13	1	-1	0	3.22	3.16
14	-1	0	-1	3.61	3.59
15	0	-1	1	3.53	3.57
16	-1	1	0	3.4	3.46
17	0	0	0	3.98	3.98

El modelo obtenido fue el siguiente:

$$\begin{aligned}
 & \text{Ln}(\textit{Staphylococcus aureus}) \\
 & = 3.98 - 0.16A - 0.011B + 0.087C + 0.37AB - 0.11AC - 0.079BC \\
 & \quad - 0.031A^2 - 0.27B^2 - 0.32C^2
 \end{aligned}$$

Ecuación 9

El modelo cuadrático polinomial (Ecuación 9) fue altamente significativo y suficiente para representar la actual relación entre la variable de respuesta y los parámetros significativos con un bajo nivel del valor-p (<0.0001) y una R^2 predicha=0.824 como se observa en la Tabla 17.

Tabla 17. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	0.5128		-0.0378	-0.523	
2FI	0.1167		0.2324	-0.4584	
Quadratic	< 0.0001		0.9749	0.824	Suggested
Cubic			1		Aliased

Para poder ver gráficamente el comportamiento de de los factores tiempo, relación m/v y concentración de metanol frente a la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, fue necesario apoyarse de gráficas de superficie de respuesta (Figura 22A, 22B y 22C).

El porcentaje de inhibición de *Staphylococcus aureus* tomando en cuenta los factores concentración (B), tiempo (A) y relación m/v (1:20) se muestra en la Figura 22A, donde se logra ver que en una concentración de metanol entre 40 y 50% y un tiempo de 10 minutos el porcentaje de inhibición es cercano a 54%.

El comportamiento del tiempo (A), la relación m/v (C) y la concentración (60%) es mostrado en la Figura 22B, en esta gráfica se puede ver que la relación m/v se comporta con la mayor inhibición cuando se trabaja de 1:20 a 1:25 g/mL. La relación m/v tiene un efecto cuadrático. Cuando el volumen aumenta, se incrementan los compuestos que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus*

aureus, pero llega hasta un punto máximo y después de éste existe un decremento en la cantidad de compuestos extraídos, con este comportamiento los mejores resultados se encuentran cuando se maneja una relación aproximada de 1:24 g/mL. Este fenómeno puede ser atribuido principalmente a la transferencia de masa y a la distribución de densidad de energía ultrasónica en las soluciones de extracción (Zeng, Xi, & Ge, 2013). Baja relación m/v tiene una alta concentración de gradiente, lo que aumenta la difusión y el rendimiento de extracción de compuestos que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus.*, pero cuando la relación m/v está sobre 1:24 g/mL el decremento en la distribución de densidad de energía ultrasónica en la solución de extracción es dominante y tiene un efecto negativo sobre el rendimiento de extracción (Liu *et al.*, 2013). En la Figura 22C, es posible observar con mayor claridad que la relación m/v con la cual se tiene el mayor porcentaje de inhibición, es 1:25 y la concentración entre 40 y 50% de metanol.

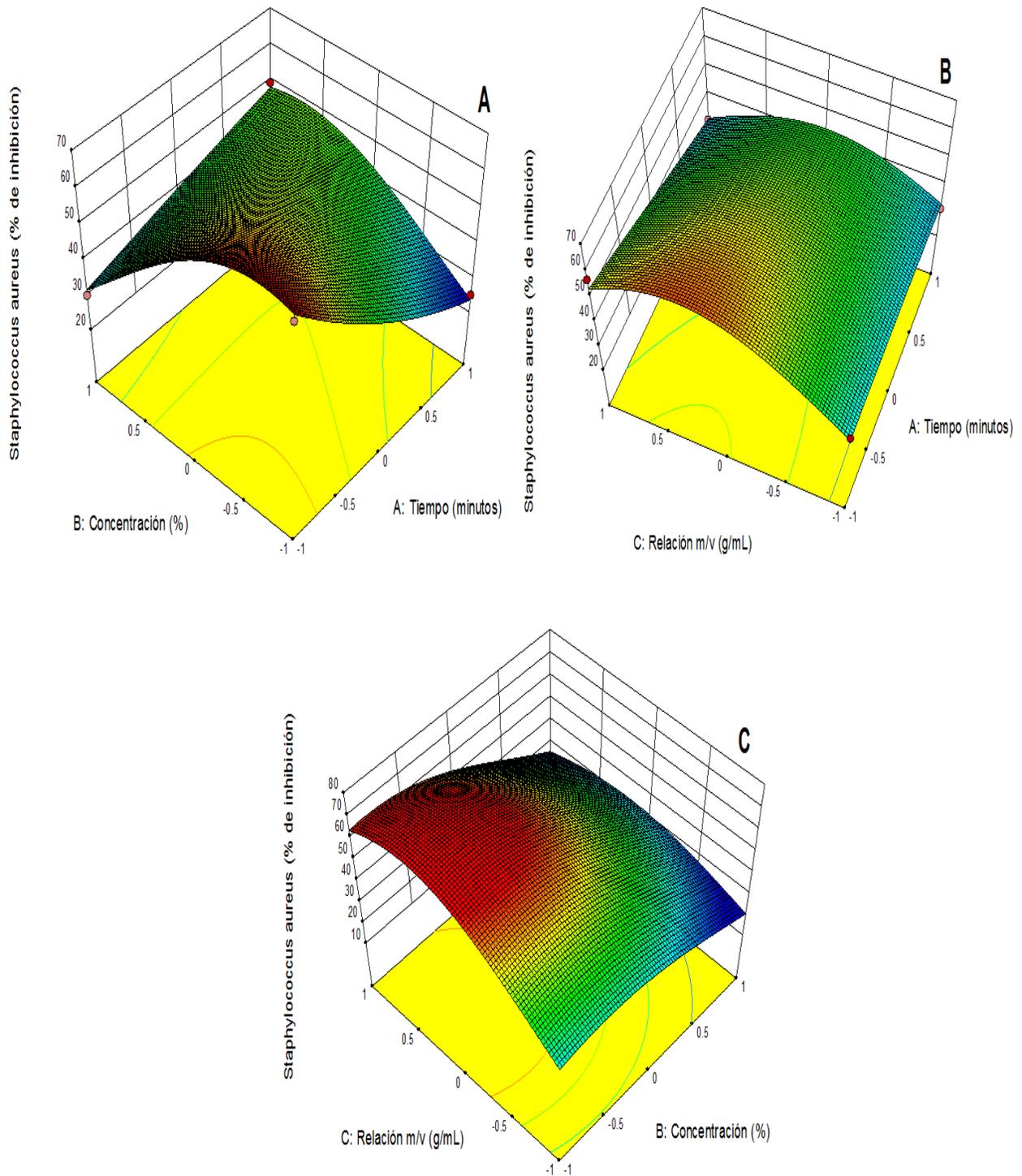


Figura 22. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. (A) muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración.

8.8 *Listeria monocytogenes*

Como se observa en la Tabla 15 los factores codificados, así como el valor experimental y predicho para la inhibición de *Listeria monocytogenes*, no presenta un ajuste al modelo cuadrático polinomial ajustado (Sqrt), utilizando un Diseño Box-Behnken (BBD), teniendo en los puntos centrales el mismo valor en lo experimental y predicho.

Tabla 18. Valores codificados de las variables independientes en una matriz Box-Behnken y resultados observados para la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Orden de Corrida	Factores Codificados			Variable de Respuesta (Y)	
	X ₁ ; Tiempo (min)	X ₂ ; Concentración (%)	X ₃ ; Relación m:v (g/mL)	Valor Experimental	Valor Predicho
1	1	0	-1	9.83	9.91
2	0	0	0	9.81	9.81
3	1	1	0	9.97	9.96
4	-1	0	1	9.93	9.85
5	0	1	-1	9.94	9.87
6	0	0	0	9.81	9.81
7	0	0	0	9.81	9.81
8	0	-1	-1	9.97	9.98
9	0	1	1	9.98	9.97
10	1	0	1	9.79	9.81
11	0	0	0	9.81	9.81
12	-1	-1	0	9.9	9.91
13	1	-1	0	9.98	9.88
14	-1	0	-1	9.8	9.78
15	0	-1	1	9.77	9.85
16	-1	1	0	9.73	9.83
17	0	0	0	9.81	9.81

El modelo obtenido fue el siguiente:

$$\begin{aligned}
 & \text{Sqrt}(\textit{Listeria monocytogenes}) \\
 & = 9.81 + 0.025A + 6.110^{-004}B - 7.607^C + 0.039AB - 0.042AC \\
 & + 0.060BC + 5.413^{-003}A^2 + 0.084B^2 + 0.025C^2
 \end{aligned}$$

Ecuación 10

El modelo cuadrático polinomial (Ecuación 10) no fue apropiado para presentar la actual relación entre la variable de respuesta y los parámetros significativos con un bajo nivel del valor-p (0.2628) y una R^2 predicha=-5.6592 como se observa en la Tabla 19.

Tabla 19. Adecuación del modelo de prueba de respuesta para la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R^2	Predicted R^2	
Linear	0.8816		-0.1716	-0.8711	
2FI	0.3829		-0.1374	-2.1471	
Quadratic	0.2628		0.0487	-5.6592	Suggested
Cubic			1		Aliased

Aunque los datos obtenidos no se adecuaron al modelo propuesto aún después de hacer ajustes matemáticos, se decidió elaborar las gráficas de superficie de respuesta para compararlas con otros resultados en la extracción de compuestos que inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Es posible observar en la Figura 23A que cuando la relación m/v es 1:20, la concentración de metanol 80% y 30 minutos de sonicación, se obtiene el mayor porcentaje de inhibición de *Listeria monocytogenes*. Aunque la gráfica sugiere que si se aumenta el tiempo y se reduce la concentración se obtendrá mayor inhibición, lo cual no es posible, pues el porcentaje de inhibición pasaría el 100%, este error se atribuye a la falta de ajuste de esta variable al modelo. Por otro lado la figura 23B, el modelo predice una inhibición superior al 100% cuando se utilizó una concentración 1:10 y la concentración 40%, mientras que los datos experimentales muestran la mayor inhibición cuando la concentración es 1:30 y la concentración de 80%. En la Figura 23C, es posible observar con mayor precisión este error, ya que marca en los

límites superior e inferior de los parámetros los puntos óptimos, este comportamiento es el que representa una función cúbica. Aquí se puede verificar la falta de ajuste de la variable al modelo.

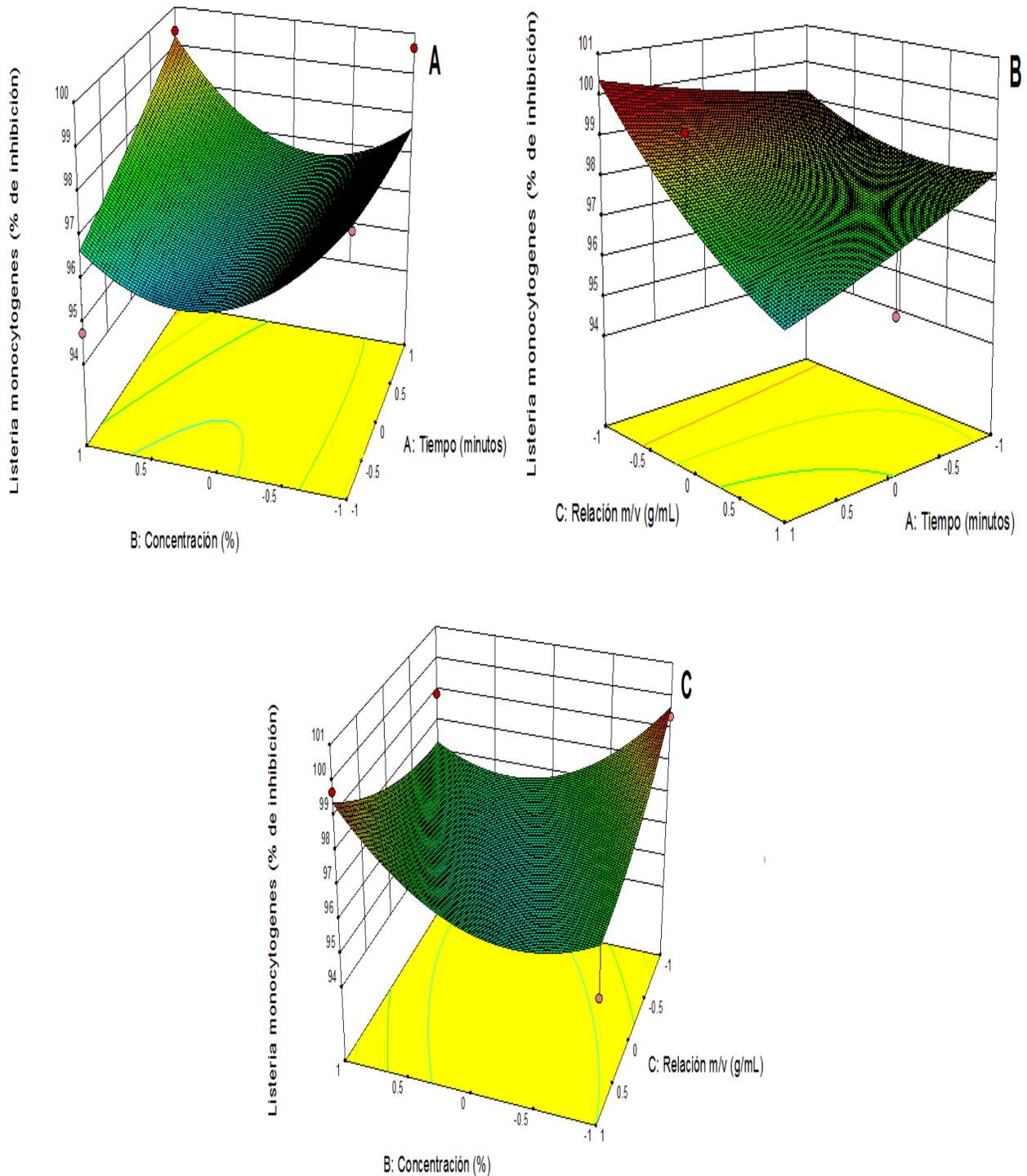


Figura 23. Gráfica de superficie de respuesta para la extracción de xoconostle asistida por ultrasonido de compuestos que inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. (A) Muestra el efecto del tiempo y la concentración de metanol, (B) muestra el efecto de la relación m/v y el tiempo de extracción y (C) muestra la relación m/v y la concentración.

8.9 Condiciones óptimas experimentales para cada variable

Tabla 20. Condiciones óptimas experimentales para cada variable, en la extracción asistida de ultrasonido de compuestos de xoconostle.

Variable	Factores			Resultado
	Tiempo	Relación m/v	Concentración	
Fenoles Totales	10	1/20	40	2426.25 mg E.A.G./100g peso seco
Flavonoides Totales	20	1/30	40	17.84 mg E.Q./100g peso seco
ABTS	20	1/30	40	1431.96 mg E.A.A./100g peso seco
DPPH	20	1/30	80	223.85 mg E.A.A./100g peso seco
<i>Escherichia coli</i>	20	1/10	40	88.75% de inhibición
<i>Salmonella spp.</i>	10	1/20	40	98.9% de inhibición
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	1/20	40	66.08% de inhibición
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	1/30	80	99.69% de inhibición

En la Tabla 20, se muestran las condiciones óptimas encontradas en la parte experimental de este trabajo, se puede observar que las condiciones para obtener la actividad antioxidante no son igual en ABTS y DPPH, las diferencias en las condiciones de extracción entre estos dos ensayos, puede ser debido a la naturaleza del solvente y de los radicales, así como el tipo de polaridad del solvente y puede afectar la transferencia de electrones y la transferencia de átomos de hidrógeno, también la presencia de compuestos no antioxidantes en los extractos puede afectar los resultados (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006).

Las condiciones donde se encontró el mayor porcentaje de inhibición para las bacterias patógenas de estudio, no fueron iguales. Las bacterias Gram negativas no se comportaron igual, del mismo modo lo hicieron las Gram positivas, los efectos en la inhibición del crecimiento bacteriano, puede ser debido a un solo

compuesto o la acción conjunta de varios compuestos, aunque puede existir los casos en que un compuesto neutralice la acción de otro y no exista actividad antimicrobiana (Côté *et al.*, 2011). El efecto antimicrobiano de las frutas ha sido atribuido a la presencia de compuestos fenólicos, distribuidos en diversos grupos, incluyendo los compuestos con bajo peso molecular (ácidos fenólicos), taninos condensados, proantocianidinas, y flavonoides tales como antocianinas y flavonoles (Häkkinen *et al.*, 1999).

IX. CONCLUSIONES

- ◆ Las mejores condiciones de extracción asistida con ultrasonido de los compuestos bioactivos y actividades biológicas de Xoconostle, fueron diferentes (Fenoles Totales, Flavonoides Totales, actividad antioxidante ABTS, DPPH y efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias patógenas *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*).
- ◆ Los Fenoles Totales, *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*, tienen sus mejores rendimientos de extracción y porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano respectivamente, cuando las condiciones de extracción son: 10 minutos, relación m/v 1:20 g/mL y concentración de metanol al 40%.
- ◆ La mayor cantidad de Flavonoides Totales y de compuestos que eliminan el radical ABTS^{•+}, fueron encontradas bajo las condiciones de extracción: 20 minutos, relación m/v 1:30 g/mL y 40% en concentración de metanol.
- ◆ La mayor actividad antioxidante medida por DPPH y que inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, se encontraron cuando las condiciones de extracción fueron 20 minutos, relación m/v 1:30 g/mL y concentración de metanol 80%.
- ◆ Las mejores condiciones para la máxima inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* no son igual a las de ninguna otra variable, lo que indica

que los compuestos que están actuando sobre la bacteria no fueron analizados en este trabajo.

- ◆ El efecto de los compuestos extraídos del xoconostle con actividad inhibitoria no se relaciona con el Gram de la bacteria patógena.

X. RECOMENDACIONES

- ◆ Identificar qué fenoles o flavonoides se encuentran presentes en los extractos y en qué cantidad, esto por medio de una prueba de electroforesis capilar.

- ◆ Probar y verificar la relación de los compuestos identificados sobre la captación de los radicales ABTS^{•+} y DPPH, así como en la Inhibición del crecimiento bacteriano contra bacterias Gram Positivas y Gram Negativas de interés en la industria alimentaria.

- ◆ Probar el extracto y su bioactividad en una matriz compleja (alimento), para evaluar el comportamiento de los biocompuestos a través del tiempo, así como el comportamiento en condiciones gastrointestinales simuladas y bajo diferentes condiciones de envasado.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Adjé, F., Lozano, Y. F., Lozano, P., Adima, A., Chemat, F., & Gaydou, E. M. (2010). Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from *Delonix regia* tree flowers using ultrasound-assisted water extraction. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 439-444. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.06.011>
- Anderson, O. M., & Markham, K. R. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. . FL, USA.
- Aranceta, J., Foz, M., Moreno, B., Gil, B., Jover, E., Millán, J., . . . Monereo, S. (2003). Documento de consenso: obesidad y riesgo cardiovascular. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 15(5), 196-232. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0214-9168\(03\)78933-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0214-9168(03)78933-5)
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Lergret, P. (1994). Standardisation dun extrait de propolis et identification des principaux constituants. *J. Pharm. Belgique*, 49, 462-468.
- Aybastier, Ö., Işik, E., Şahin, S., & Demir, C. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from blackberry leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 44, 558-565.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los Alimentos* (P. Educación Ed. 4 ed.). México: Pearson Addison Wesley.
- Borrego, E. F., & Burgos, V. N. (1986). *El nopal* (Vol. 1): Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bors, W., Heller, W., Chista, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymology*, 186, 343-355.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bravo-Hollis, H. (1978). *Las cactáceas de México* (Vol. 2). México.
- Caballero, T. A. E. (2008). *Temas de Higiene de los Alimentos*.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379-389. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1)

- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100-104.
- Castillo, G. E., & Martínez, S. I. (2007). *Manual de fitoterapia* (Vol. 77).
- Córdova, A. y Á., M. (1997). La fatiga muscular en el rendimiento deportivo *La fatiga muscular en el rendimiento deportivo* (1 ed., pp. 169-192). Madrid, España: Gymnos.
- Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Dussault, D., Sylvain, J. F., & Lacroix, M. (2011). Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. *Food Control*, 22(8), 1413-1418. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.024>
- Cruz Casino, N., Pérez Carrera, G., Zafra Rojas, Q., Delgado Olivares, L., Alanis García, E., & Ramírez Moreno, E. (2013). Ultrasound Processing on Green Cactus Pear (*Opuntia ficus Indica*) Juice: Physical, Microbiological and Antioxidant Properties. *Journal Food Process Technol*, 4(9).
- Chemat, F., Zille, H., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Elmehdi, H. M., Page, J. H., and Scanlon, M. G. (2003). Using ultrasound to investigate the cellular structure of bread crumb. *Journal of Cereal Science*, 38, 33-42.
- Ensminger, D. E. (1988). Acoustic and electroacoustic methods of dewatering and drying. *Drying Technology*, 6, 473-499.
- Escamilla-Jiménez, C. I., Cuevas-Martínez, E. J., & Guevara-Fonseca, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista Facultad de Medicina UNAM*, 52(2), 73-75.
- Escamilla, H. (1997). *Proyecto para la industrialización de la tuna*. (Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Escribano-Bailon, M. T., & Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenol extraction from foods. In C. Santos-Buelga & G. Williamson (Eds.), *Methods in Polyphenol Analysis*. (pp. 1-16).
- Fernández, E. E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. México.
- Filardo, K., Sheinvar, L., Bye, R., González, L., Pérez, A., Mendoza, M., & J., J. (2001). Producción y comercialización de frutos comestibles de *Opuntia spp*

- en El Valle del Mezquital *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* (Vol. 46). México.
- Formica, J. V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemistry Toxicology*, 33, 1061-1080.
- Franco-Arteaga, C. I. (2007). *Optimización de la producción de fitasa por Aspergillus niger en fermentación en estado sólido utilizando métodos estadísticos*. (Maestría en Ciencias en Bioprocesos), Instituto Politecnico Nacional, México, D.F.
- Gallego-Juárez, J. A., Elvira-Segura, L., & Rodríguez-Corral, G. (2003). A power ultrasonic technology for deliquoring. . *Ultrasonics* 41, 255-259.
- Gestrelus, H., Hertz, T. G., Nuamu, M., Persson, H. W., & Lindström, K. (1993). A Nondestructive ultrasound method for microbial quality control of aseptically packaged milk. *Lebensm.Wiss.u.-Technology*, 26, 334-339.
- Gil, H. (2010). Composición y calidad nutritiva de los alimentos *Tratado de nutrición* (2 ed., pp. 812). México: Editorial Panamericana.
- Gogate, P. R., & Kabadi, A. M. (2009). A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 60-72. doi: 10.1016/j.bej.2008.10.006
- Guzmán, M., S. H., Morales, M., A. L., Mondragón, J., C., Herrera, H., G., Guevara, L., F., & Reynoso, C., R. (2010). Physicochemical, Nutritional, and Functional Characterization of Fruits Xoconostle (*Opuntia matudae*) Pears from Central- México Region. *Journal of Food Science*, 6(75), 485-492.
- Hæggström, E., & Luukkala, M. (2001). Ultrasound detection and identification of foreign bodies in food products. *Food Control*, 12, 37-45.
- Häkkinen, S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Ruuskanen, J., & Törrönen, R. (1999). Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, 32(5), 345-353. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00095-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00095-2)
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, tissue injury, and human disease: a potential for therapeutic use of antioxidants. In J. M. a. T. H. N. Kinney (Ed.), *Organ Metabolism and Nutrition Ideas for Future Critical Care* (pp. 425-455). New York: Raven Press.
- Hecht, E. (1996). *Physics: Calculus*. Pacific Grove, CA: Brooks/Cole.
- Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., & Wang, J. (2009). Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of

- antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food Chemistry*, 114, 1147-1154.
- Ioita, P. (2005). Is DPPH stable free radical a good scavenger for oxygen active species? *Chemical Papers*, 59, 11-16.
- Islas, R. (2012). *Extracción enzimática y química de compuestos bioactivos en el xoconostle*. (Maestría), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.
- Jiménez, A., Beltrán, G., & Uceda, M. (2007). High-power ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6), 725-731. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.12.006>
- Karabegović, I., Stojičević, S., Veličković, D., Veljković, V., & Lazić, M. (2011). Comparasion of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(3), 504-511.
- Kardos, N., & Luche, J. L. (2001). Sonochemistry of carbohydrate compounds. *Carbohydrate Research*, 332, 115-131.
- Kimbaris, A. C., Siatis, N. G., Pappas, C. S., Tarantilis, P. A., Daferera, D. J., & Polissiou, M. G. (2006). Quantitative analysis of garlic (*Allium sativum*) oil unsaturated acyclic components using FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 94(2), 287-295. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.017>
- Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B., & Mozina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extract. *Journal of Microbiological Methods*, 121-126.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., & Lee, D. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 261-266.
- Kossori, R. L., Villaume C., El Boustani E., Sauvaire Y., Méjean L. . (1998). Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* spp). . *Plant Foods for Human Nutrition*, 52, 263-270.
- Kuldiloke, J. (2002). *Efecto del ultrasonido, tratamientos de temperatura y presión sobre la actividad de una enzima Indicadores de calidad de las frutas y hortalizas* (Ph. D.), Technische Universität, Berlín, Alemania.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24, 691-693.

- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25, 726-732.
- Lacueva-Andrés, C., Medina-Rejon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., & Chivia-Blanch, G. (2010). *Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables*. Singapore.
- Lai, F., Wen, Q., Li, L., Wu, H., & Li, X. (2010). Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata L.*) hull with ultrasonic assisted treatment. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 323-329. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.011>
- Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B., & Engelhardt, U. H. (2000). Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2848-2852.
- Letan, A. (1996). The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives. *Journal Food Science*, 31, 518-523.
- Li, H., Chen, B., & Yao, S. (2005). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 12(4), 295-300. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.01.033>
- Liu, Y., Wei, S., & Liao, M. (2013). Optimization of ultrasonic extraction of phenolic compounds from *Euryale ferox* seed shells using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 49(0), 837-843. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.023>
- López, C. J. E. (1997). *Flora cactológica de las Ciencias del Río Balsas en el estado de Guerrero*. (Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, Edo. de México, México.
- Lou, Z., Wang, H., Zhang, M., & Wang, Z. (2010). Improved extraction of oil from chickpea under ultrasound in a dynamic system. *Journal of Food Engineering*, 98(1), 13-18. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.11.015>
- Lu, W., Dan, L., Changli, B., Jingyan, Y., Ziming, W., & Yuhua, S. (2008). Ultrasonic extraction and separation of anthraquinones from *Rheum palmatum L.* *Ultrasonics Sonochemistry*. doi: 10.1016/j.ultsonch.2007.12.008
- M., A. H. S. S. (2002). American Heritage Stedman's Medical Dictionary (Vol. 9): Boston: Innovative Food Science and Emerging Technologies.

- Maldonado, G. S. H., Morales, M. A. L., Mondragón, J. C., & Herrera, H. G. (2010). Physicochemical, Nutritional, and Functional Characterization of Fruits Xoconostle (*Opuntia matudae*) Pears from Central-México Region. *Journal of Science*, 76(6), 485-492.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Mann, T., & Krull, U. J. (2004). The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(5), 945-955.
- Mason, T. J. (2003). Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(4-5), 175-179. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1350-4177\(03\)00086-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1350-4177(03)00086-5)
- Mason, T. J., Paniwnyk, L., & Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), 253-260. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1350-4177\(96\)00034-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1350-4177(96)00034-X)
- McClements, J. D. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology* 6, 293-299.
- Miller, N. J., & Rice, E., C.A. . (1996). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay *Free Radical Research*, 26, 195-199.
- Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26, 211-216.
- Morales-Aguilera, R. A., Fernández Pérez, M. D., & Méndez Soto del Valle, R. (2010). Antioxidantes de origen marino. *Revista electrónica de la Agencia del Medio Ambiente*.
- Morales, L., Elizabeth (2012). *Evaluación de las propiedades funcionales de pulpa de xoconostle (Opuntia oligacantha) y su conservación mediante microcápsulas*. (Maestría), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo.
- Muchuweti, L. M., Mupure, A. N., & Murenje, M. A. N. T. (2007). Screening of antioxidant and radical activity of *Vigna unguiculata*, *Bidens pilosa* and *Cleome gynandra*. *American Journal of Food Technology*, 2, 161-168.
- Muñiz-Márquez, D. B., Martínez-Ávila, G. C., Wong-Paz, J. E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2013). Ultrasound-assisted

- extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5), 1149-1154. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.008>
- Nyborg, W. L. (1965). Acoustic Streaming. In W. P. Mason (Ed.), *Physical Acoustics* (Vol. 2B, pp. 265). New York: Academic Press.
- Olivares, O. J. L., Zavaleta, B. P., Chimal, H. A., Montiel, S. D., Fierro, A. A., & Scheinvar, L. (2003). *Xoconostle: Biología y manejo agronómico* (Vol. 45). México, D.F.
- Osorio, E., O., Ortiz-Moreno, A., Álvarez, V. B., Dorantes-Álvarez, L., & Giusti, M. M. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International*, 44, 2160-2168.
- Pardo, F. J. (1996). *Anatomía patológica*.
- Patrick, M., Blindt, R., & Janssen, J. (2004). The effect of ultrasonic intensity on the crystal structure of palm oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 251-258.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>
- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39(7), 791-800. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2006.02.003>
- Pimienta, B., Eulogio, M., M., L., Ramírez, H., C., B., García de Alba, G., . . . Domínguez, A., Rosa M. (2008). Efecto de la ingestión del fruto de xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.) sobre la glucosa y lípidos séricos. *Agrociencia*, 42, 645-653.
- Povey, J. W., & Mason, T. J. (1998). *Ultrasound in Food Processing*. London, England: Blackie Academic and Professional.
- Prakash, M., J., Manikandan, S., Vigna, N., C., & Dinesh, R. (2013). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface desing. *Arabian Journal of Chemistry*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.07>
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., & Hopia, A. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from Finnish berries. *Journal of Applied Microbiology* 90, 494-507.

- Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., . . . Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3-12. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00218-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00218-X)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolonization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Reyes-Munguía, A., Azúara-Nieto, E., Beristain, C. I., Cruz-Sosa, F., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Propiedades antioxidantes de maguey morado (*Rhoeo discolor*) CyTA- *Journal of Food*, 7(3), 209-216.
- Robbins, R. (2003). Phenolic acids in food: an overview of analytical methodology. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 51, 2866-2887.
- Rojano-A, B., Gaviria, C., Gil, M. A., Saez, J. A., Schinella, G., & Tournier, H. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 15(1), 173-181.
- Rooso, L., Bajard, S., & Flandrois, J. P. (1996). Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8 °C: consequences for the shelf life of chilled products. *Journal of Food Protection*, 944-949.
- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.
- Santamaría, F. J. (1992). Diccionario de mexicanismos (5 ed.). México: Porrúa.
- Saura-Calixto, F., & Goñi, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94(3), 442-447. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.033>
- Sheinvar, L., Filardo, K. S., Olalde, P. G., & Zavaleta, B. P. (2008). *Diez especies mexicanas productoras de xoconostle: Opuntia spp. y Cyllindropuntia imbricata (Cactácea)*. México.
- Sigfusson, H., Ziegler, G. R., & Coupland, J. N. (2004). Ultrasonic monitoring of food freezing *Journal of Food Engineering*, 62, 263-269.
- Simopoulus, A. P. (2002). The importance of ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedical Pharmacotherapy*, 56, 365-379.
- Singleton, V. L., Orthofer, L., & Lamuela, R. R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods enzymology*, 299, 152-178.

- Stanisavljević, I., Stojičević, S., Veličković, D., Veljković, V., & Lazić, M. (2009). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 17, 478-483.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2007). *Fisiología vegetal*. México.
- Tan, R., Zheng, W., & Tang, H. (1998). Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Plant Med.*, 64(4), 295-302.
- Tao, Y., & Sun, D. W. (2013). Enhancement of food processes by ultrasound: a review. *Food Science Nutrition*.
- Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q. A., & Sun, D. W. (2014). Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 706-715.
- Teh, S.-S., & Birch, E. J. (2014). Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 346-353. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.08.002>
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137-142. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X)
- Veiga, A. E., Aguilar, D. J. A., Calvo, V. B., & Llanes, M. L. (1997). Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos*, 89, 201-216.
- Vieira, G. S., Cavalcanti, R. N., Meireles, M. A. A., & Hubinger, M. D. (2013). Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). *Journal of Food Engineering*, 119(2), 196-204. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.030>
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>

- Zafrilla, P., Morillas, J., Martínez, C., A., Mulero, J., Cayuela, J. M., & López, N., J.M. . (2002). Radicales libres y antioxidantes. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 167, 109-114.
- Zavaleta, B., P., Olivares, O. L. J., Montiel, S., D., Chimal, H., A., , & Scheinvar, L. (2001). Organic Fertilization in sour prickly pear (*Opuntia Joconostle* and *O. matudae*). *Agrociencia*, 35, 609-612.
- Zeng, Z. L., Xi, G. X., & Ge, X. H. (2013). Study on comparison of two extraction methods of polysaccharide from *Momordica charantia* L. vines. *Science and Technology of Food Industry*, 34, 285-308.

XII.ANEXOS

AMIDIQ

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A. C.
“La Interdisciplinarietà en la Ingeniería Química”

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

César Alberto Roldán Cruz, Alma Delia Hernández Fuentes, Gabriel Aguirre Álvarez,
Rafael Germán Campos Montiel

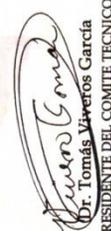
Por la presentación del trabajo:

**“EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE XOCONOSTLE ASISTIDA
POR ULTRASONIDO”**

ID: 524

XXXV Encuentro Nacional
Puerto Vallarta, Jalisco México, 6 al 9 de Mayo de 2014


Dr. Juan Gabriela Segovia Hernandez
PRESIDENTE DE AMIDIQ


Dr. Tomás Viveros Garcia
PRESIDENTE DEL COMITE TECNICO



La Universidad de Guanajuato y
La Universidad Autónoma de Nuevo León
otorgan la presente

CONSTANCIA

a

Roldán Cruz C. A., Ángeles Santos A., Hernández Fuentes A. D., Santos Fernández S.A.,
Campos Montiel R. G.

Por su participación con el trabajo

EFFECTO INHIBITORIO DE BACTERIAS PATÓGENAS CON EXTRACTOS DE
XOCONOSTLE ASISTIDOS POR ULTRASONIDO

En el Ier. Congreso Internacional sobre Innovación y Tendencias
en Procesamiento de Alimentos y el
XVI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos



Del 28 al 30 de mayo de 2014 en la ciudad de Guanajuato, Gto.


Dr. Gerardo Martínez Soto
Director del Departamento de Alimentos
Universidad de Guanajuato


Dra. Ma. Guadalupe Alanís Guzmán
Jefe del Depto. de Alimentos
Universidad Autónoma de Nuevo León


Dra. Ma. del Rosario Abraham Juárez
Coordinadora del evento

045 Roldan Cruz

