



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias
Área Académica de Ingeniería Agroindustrial

Caracterización reológica de polisacáridos
pécticos extraídos de cáscara de
xoconostle (*Opuntia* sp.)

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Que para obtener el título de:
INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

Nancy Reyna Jaen

Dirección: Dra. Adriana I. Rodríguez Hernández, ICAp, UAEH
Codirección: Dr. Norberto Chavarría Hernández, ICAp, UAEH

Tulancingo de Bravo, Hidalgo. Septiembre 2011.

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Físicoquímica y Análisis Especiales del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). La dirección de este trabajo estuvo a cargo de la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández y del Dr. Norberto Chavarría Hernández. El trabajo forma parte de las actividades del proyecto: “Producción de biopelículas inocuas a base de pectinas extraídas de la cáscara de tuna (*Opuntia* spp.) para la conservación de alimentos”, FOMIX - CONACYT-Gobierno del Estado de Hidalgo-2008, Clave 98184.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y al Instituto de Ciencias Agropecuarias por permitir mi formación académica, así como al Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos UAEH-ICAp donde se realizó el presente trabajo de investigación.

A CONACyT por el financiamiento al proyecto de investigación, PIFI 2008-PROMEPE, por la beca concedida.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández por permitirme formar parte de su proyecto de investigación, por su enseñanza, confianza, apoyo y enorme paciencia.

Al Dr. Norberto Chavarría por su valioso apoyo y enseñanza durante la realización del presente proyecto.

A la Química Elvira Ríos Leal del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, Zacatenco, D.F. por el apoyo para realizar el análisis de ácido galacturónico y azúcares neutros de los polisacáridos estudiados en dicho proyecto.

A la Ingeniera Mayra Alejandra López Ortega por su colaboración en la extracción de polisacáridos pécticos del xoconostle, por su valiosa compañía y apoyo en todo momento, por ser mi gran amiga.

A la pasante de Ingeniería en Alimentos Montserrat Cotonieto Morales por apoyo en la adquisición de tuna Xoconostle.

A Lizbeth (Perrito), Maritza, Carmen, Yarett, Janeth, Wendy y Mariana por su amistad y todos los momentos gratos compartidos durante la carrera.

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme estar viva, gozar de salud y ayudarme a cumplir todos mis sueños.

A mis madres por brindarme amor, cuidados, confianza y educación.

A mi esposo por compartir grandes momentos conmigo, por su apoyo, confianza y amor, por estar siempre a mi lado.

A mi hermano Victor que siempre ha estado cuando lo necesito, por ser catarro y el mejor hermano.

A ti mi gran amor, por llegar a mi vida y llenarla de alegría. . . Laura.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1 Marco teórico	1
1.1 Pectinas	1
1.2 Propiedades funcionales de pectinas	4
1.3 Polisacáridos pécticos de frutos de <i>Opuntia</i>	6
1.3.1 Polisacáridos pécticos de tuna	6
1.3.2 Polisacáridos pécticos de xoconostle	12
Capítulo 2 Justificación	15
2.1 Justificación	15
Capítulo 3 Hipótesis y objetivos	18
3.1 Hipótesis	18
3.2 Objetivo general	18
3.3 Objetivos específicos	18
Capítulo 4 Materiales y métodos	20
4.1 Materiales	20
4.2 Evaluación de parámetros morfológicos de frutos de xoconostle	20
4.3 Extracción de polisacáridos pécticos de cáscara de xoconostle	21
4.4 Purificación del polisacárido péctico de xoconostle	22
4.5 Determinación del rendimiento del polisacárido extraído	23
4.6 Caracterización fisicoquímica del polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle	23
4.6.1 Determinación de humedad	23
4.6.2 Determinación de cenizas	23
4.6.3 Determinación de proteína	24
4.6.4 Determinación de azúcares totales	25
4.6.5 Determinación de azúcares neutros	25
4.7 Caracterización reológica del polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle	26
4.7.1 Reometría de flujo	26
4.7.2 Reometría oscilatoria	27
Capítulo 5 Resultados y discusiones	29
5.1 Análisis de morfología de frutos de xoconostle	29
5.2 Rendimiento de extracción de polisacáridos pécticos de la cáscara de xoconostle	31
5.3 Análisis proximal	32
5.3.1 Composición de azúcares y ácido galacturónico	33
5.4 Reología	36
5.4.1 Pruebas de cizalla estacionaria	36
5.4.2 Pruebas de cizalla oscilatoria	45
Capítulo 6 Conclusiones y recomendaciones para futuros trabajos	48
6.1 Conclusiones	48
6.2 Recomendaciones para futuras investigaciones	48
Capítulo 7 Referencias	50
7.1 Referencias bibliográficas	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Composición de azúcares y ácido galacturónico de polisacárido péctico extraído de cáscara de tuna. (Condiciones de extracción: 1% EDTA en medio acuoso, 70°C, 2 h). Determinaciones en HPLC-IR usando una columna SugarSC1011 y agua como fase móvil (0.5 mL/min) a 60°C. Para la calibración de las columnas se usaron estándares comerciales de carbohidratos (Lira-Ortiz, 2009).	8
Cuadro 2	Condiciones cromatográficas para la determinación de azúcares neutros en muestra de polisacárido péctico de xoconostle en su fracción soluble e insoluble.	26
Cuadro 3	Polisacáridos pécticos utilizados en las determinaciones reológicas de cizalla estacionaria.	27
Cuadro 4	Valores promedio de características físicas de frutos de xoconostle (<i>Opuntia</i> sp.). Datos promedio de 20 mediciones en frutos independientes.	29
Cuadro 5	Valores de rendimiento obtenidos en la extracción de polisacáridos pécticos de nopal, tuna y xoconostle.	31
Cuadro 6	Análisis proximal de la composición química del polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle (<i>Opuntia</i> sp.) dividido en fracción soluble e insoluble posterior al proceso de diálisis. Se muestran los datos promedio (n=3) \pm su desviación estándar.	32
Cuadro 7	Contenido de azúcares neutros y ácido galacturónico en polisacáridos pécticos y mucílagos de frutos de <i>Opuntia</i> . Datos expresados en % peso/peso en base seca.	34
Cuadro 8	Parámetros reológicos del Modelo de Ostwald de Waele determinados en soluciones al 0.5%, 1% y 2% de: polisacárido de cáscara de xoconostle (PX), pectina de frutas cítricas (PC), pectina de manzana (PM), fracción soluble del polisacárido dializado de la cáscara de xoconostle (PXDS) y pectina de tuna (<i>O. albicarpa</i> S.) (PT).	41
Cuadro 9	Parámetros reológicos del Modelo de Herschel Bulkley determinados en soluciones al 0.5%, 1% y 2% de: polisacárido de cáscara de xoconostle (PX), pectina de frutas cítricas (PC), pectina de manzana (PM), fracción soluble del polisacárido dializado de la cáscara de xoconostle (PXDS) y pectina de tuna (<i>O. albicarpa</i> S.) (PT).	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Organización estructural general de las pectinas (Cosgrove, 2005).	4
Figura 2	Parámetros del modelo de Ostwald de Waele, K y n, de dispersiones acuosas al 1 % p/p de pectinas extraídas de la cáscara de tuna, en función de las condiciones de extracción: temperatura y concentración de agente secuestrante de calcio (EDTA). Determinaciones realizadas a 25°C (Lozada-Carbajal, 2007).	7
Figura 3	Distribución de masas moleculares en pectina de cáscara de tuna extraída en medio acuoso con 1% EDTA, 70°C. Cromatografía de líquidos acoplada a detector de índice de refracción (Varian Pro Star), usando una columna TSK gel 5000PWXL. La fase móvil fue agua (0.3 mL/min) a 70°C. La determinación de masas molares se realizó a través de una curva de calibración con estándares de diferentes masas moleculares, bajo las mismas condiciones cromatográficas (Lira-Ortiz, 2009).	8
Figura 4	Espectros de infrarrojo por transformada de Fourier de ácido poligalacturónico (APG) y polisacárido tipo pectina de cáscara de tuna (PT) (Lira-Ortiz, 2009).	9
Figura 5	Comparación de espectros de Infrarrojo con Transformada de Fourier de pectina cítrica con 0% (A), 30% (B), 60% (C), 90% (D) de metoxilación y del polisacárido péctico extraído de la cáscara de tuna (E). Determinaciones realizadas en FTIR, Sprettrum GX, Perkin Elmer. Los espectros fueron registrados por 40 escaneos a una resolución de 4.0 cm ⁻¹ . La flecha indica el pico de absorción correspondiente a grupos carboxilos esterificados (Lira-Ortiz, 2009).	11
Figura 6	Propiedades reológicas en cizalla estacionaria de soluciones acuosas (2% p/p) de pectina de tuna, pectina cítrica de alto metoxilo (índice de metoxilación: 72%, Genu®Pectin 150, Kelco) y pectina cítrica de bajo metoxilo (índice de metoxilación: 9%, Genu®Pectin LM-5 CS, Kelco). Determinaciones realizadas a 25°C en un reómetro AR2000 con geometría cono-plato (60 mm, 2°) (Lira-Ortiz, 2009).	12
Figura 7	Proceso de extracción fraccionada de polisacáridos pécticos en tanque agitado.	21
Figura 8	Recuperación del polisacárido péctico de xoconostle del medio de extracción a) precipitación con etanol, b) polisacárido recuperado, c) lavado con etanol.	22
Figura 9	Nopalera con frutos de xoconostle en la región de Otumba, estado de México (a). Distintas imágenes de frutos de xoconostle maduros aún en la planta (b, c y d), fotografías tomadas en junio 2011 antes del inicio de la temporada de lluvia, por lo que se observa deshidratación en los frutos. Frutos de xoconostle usados para este	30

trabajo (e). Corte transversal de un fruto de xoconostle en donde se observa la magnitud del grosor de su cáscara (f).

Figura 10	Soluciones de polisacárido péctico de la cáscara de xoconostle en diferentes concentraciones. a) fracción insoluble (PX), b) fracción soluble (PXDS)	33
Figura 11	Estructura del polisacárido péctico de tuna (<i>Opuntia ficus-indica</i>) propuesta por Habibi <i>et al.</i> (2004).	36
Figura 12	Comparación de soluciones elaboradas con los polisacáridos extraídos de la cáscara de xoconostle (<i>Opuntia</i> sp) a las concentraciones de 0.5, 1 y 2%, donde PX es el polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle sin proceso posterior de purificación y PXDS es el polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle sometido a un proceso de diálisis y de eliminación de la fracción insoluble.	37
Figura 13	Comparación del comportamiento al flujo de soluciones elaboradas con polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle en la fracción cruda (PX) y la fracción soluble del polisacárido dializado (PXDS); pectinas de grado comercial como pectina de manzana (PC) y pectina de frutas cítricas (PC); además de pectina de tuna (<i>O. albicarpa</i> S.); en concentraciones de 0.5% 1% y 2%.	39
Figura 14	Ajuste de datos experimentales al Modelo de Ostwald de Waele o Ley de la Potencia. Soluciones al 0.5% de: polisacárido de cáscara de xoconostle (PX), pectina de frutas cítricas (PC), pectina de manzana (PM), fracción soluble del polisacárido de cáscara de xoconostle dializado (PXDS) y pectina de tuna (<i>O. albicarpa</i> S.) (PT).	40
Figura 15	Ajuste de datos experimentales al Modelo de Herschel Bulkley. Soluciones al 0.5% de: polisacárido de cáscara de xoconostle (PX), pectina de frutas cítricas (PC), pectina de manzana (PM), fracción soluble del polisacárido de cáscara de xoconostle dializado (PXDS) y pectina de tuna (<i>O. albicarpa</i> S.) (PT).	42
Figura 16	Comparación del comportamiento reológico de soluciones de PXDS en concentraciones de 0.5%, 1% y 2% con solución de xantana al 0.5%.	45
Figura 17	Evolución de los módulos dinámicos G' y G'' durante el enfriamiento de solución de PXDS al 0.4% (p/p) con CaCl_2 0.5 mM. Velocidad de enfriamiento 1 °C/min, frecuencia constante de 1 rad/s, torque de 10 micro N.m.	46
Figura 18	Evolución de los módulos dinámicos G' y G'' con respecto a la frecuencia de oscilación de soluciones de PXDS al 0.4%. Temperatura 25°C y torque 10 micro N.m.	48

NOTACIÓN

		unidades
Pa	Pascales	[N m ⁻²]
Hz	Hertz	[s ⁻¹]
G'	Módulo de almacenamiento	[Pa]
G''	Módulo de pérdida	[Pa]
n	Índice de consistencia	[Pa·s ⁿ]
mM	Concentración milimolar	[1x10 ⁻³ mol/L]
p/p	Relación peso-peso	[g/g]
T	Temperatura	[° C]
R ²	Coeficiente de regresión	-

SÍMBOLOS GRIEGOS

γ	Deformación de cizalla	[-]
$\dot{\gamma}$	Velocidad de deformación	[s ⁻¹]
η	Viscosidad no Newtoniana	[Pa·s]
σ	Esfuerzo cortante	[Pa]
σ_0	Esfuerzo de cedencia	[Pa]
ω	Frecuencia de oscilación	[rad/s]
$\tan \delta$	G''/G'	[-]

RESUMEN

México es un país con una variedad importante de frutas, dentro de éstas encontramos la tuna y xoconostle, los cuales han sido muy apreciados por sus cualidades alimenticias y medicinales. El nopal tunero se cultiva en gran parte del país aunque la mayor producción se registra sólo en 9 estados, dentro de los cuales destaca el estado de Hidalgo en el cuarto lugar. Dentro de la amplia variedad de tunas se encuentra el xoconostle (*Opuntia* spp.), tuna ácida que crece principalmente de forma silvestre en las regiones áridas y semiáridas del centro del país. Dicha cactácea tiene una importante tolerancia a la sequía y heladas, además de una adaptación a suelos pobres y delgados como los del altiplano mexicano, por lo que puede cultivarse todo el año. Por otra parte la industrialización del xoconostle ha sido poco abordada; la gran parte de los productos son artesanales. En este trabajo se realizó la extracción y la caracterización reológica de polisacáridos pécticos de la cáscara de xoconostle, con la finalidad de conocer su potencial como aditivos alimentarios.

Los polisacáridos pécticos fueron extraídos de la cáscara de xoconostle a través de un proceso en medio acuoso de dos etapas. Se obtuvo un rendimiento de 5.07% en base seca (polisacárido péctico/sólidos de cáscara de xoconostle). El polisacárido péctico se sometió a un proceso de diálisis de donde se obtuvieron dos fracciones, una fracción de polisacárido péctico de xoconostle soluble en agua (PXDS, 26.3%) y otra rica en proteínas (73.7%). La fracción soluble (PXDS) presentó 41.7% de ácido galacturónico y una composición de azúcares neutros en donde predominó ramnosa. Esta fracción presentó en solución comportamiento no newtoniano, reofluidificante a la cizalla. Las soluciones acuosas de PXDS presentaron valores de índices de consistencia de 0.015-11.5 y de índice de flujo de 0.86-0.34, en soluciones del 0.5 al 2%. A través de pruebas reológicas oscilatorias, se confirmó que el polisacárido soluble gelifica en presencia de calcio, formando geles suaves. Las propiedades reológicas al flujo de PXDS lo caracterizan como un polisacárido viscosificante con valores de viscosidad aparente y pseudoplasticidad superiores a pectinas comerciales.

Capítulo 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Pectinas

El término “pectina” o sustancia péctica se ha asignado a un extenso grupo de glicanogalacturonanos, que se caracterizan por ser polisacáridos ácidos vegetales cuyo cadena principal consiste de residuos de ácido D-galacturónico unidos a través de enlaces α -1,4 (Schols y Voragen, 2002). Las pectinas son los constituyentes mayoritarios de la lámina intermedia de los tejidos de las plantas, químicamente son polímeros que pueden contener de 200 a 1,000 unidades de ácido galacturónico (Badui, 2006); actúan como agentes de hidratación y material de unión de la red celulósica, por lo que se consideran agentes cementantes de la pared celular (Seymour *et al.*, 1993; Contreras-Esquivel *et al.*, 2006). Las pectinas tienen la capacidad de interactuar con la hemicelulosa, lignina y celulosa, creando una estructura rígida a lo largo de la célula (Handford, 2006), además de determinar la porosidad de la pared controlando la difusión de ciertos compuestos y proporcionar cargas que modulan el pH de la pared (Habibi *et al.*, 2004).

Las protopectinas son polisacáridos altamente esterificados con metanol e insolubles en agua. Se encuentran en los tejidos inmaduros de los frutos y son responsables de su textura rígida; sin embargo, la acción de la enzima protopectinasa hace que se conviertan en pectinas solubles o ácido pectínico en el proceso de maduración y con ello contribuyen al ablandamiento del fruto. Los polisacáridos pécticos incluyen tanto a los componentes insolubles de la protopectina como a los constituyentes biopoliméricos solubles del vegetal de origen (Ovodov, 2009). Asociados a la estructura principal de las pectinas se encuentran los arabinanos, galactanos y arabinogalactanos, que son cadenas de azúcares neutros que forman las ramificaciones del ramnogalacturonano, otro segmento estructural de la molécula de pectina. Adicional a éste se pueden encontrar otros elementos estructurales como el xilogalacturonano y apiogalacturonano (Schols y Voragen, 2002).

Las pectinas son polidispersas en su composición y tamaño molecular, y heterogéneas con respecto a la estructura química y masa molar (Pilnik y Voragen, 1970; Azcon-Bieto y Talón 1993; Chang *et al.*, 1994). Dependiendo de la fuente vegetal y de las condiciones de extracción se dispone de pectinas cuyos grupos carboxílicos presentan diferentes grados de esterificación con grupos metilo, además algunos de los grupos hidroxilo pueden estar acetilados. El grado de metoxilación de una pectina se define como el número de grupos carboxilo esterificado por cada 100 grupos galacturónicos (Voragen *et al.*, 1995). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Codex de Química de Alimentos (FCC 1996) y la Unión Europea (EU 1998), establecen como criterio de identificación de una pectina, el contenido de ácido galacturónico, de esta forma un polisacárido es considerado “pectina” cuando contiene al menos 65% de ácido galacturónico (Rolin, 2002).

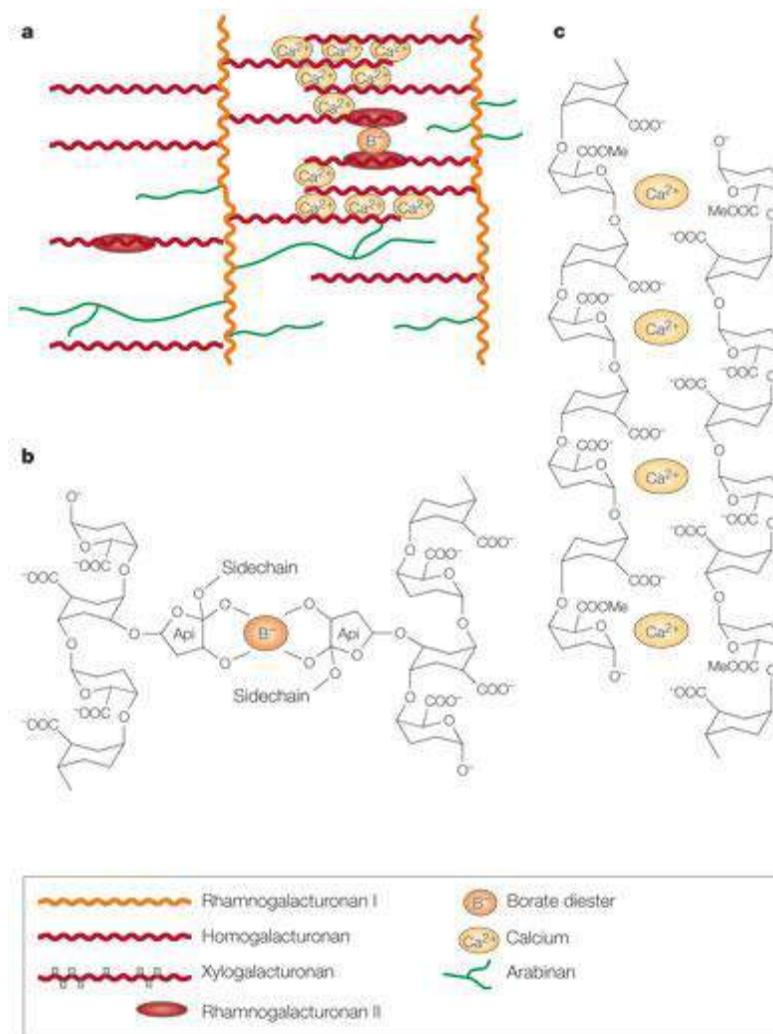
El grado de esterificación divide comercialmente a las pectinas en dos grupos, ya que éste influye significativamente en el mecanismo de gelificación, sus propiedades y aplicaciones. Las pectinas de alto metoxilo son aquéllas que contienen del 50 a 80% de sus grupos carboxilo de manera esterificada, mientras que las pectinas de bajo metoxilo sólo presentan de 18 a 50% de esterificación. Una pectina con 100% de metoxilación es considerada como protopectina, mientras que si el grado de metoxilación es de 0% se considera un ácido péctico (Goldberg *et al.*, 1996).

La estructura general de los polisacáridos pécticos se ha reportado en numerosos artículos. Básicamente se identifican dos regiones: a) La región lineal de homogalacturano, la cual consiste de moléculas de ácido galacturónico unidas a través de enlaces α -1,4. Estos segmentos lineales se unen con uno o dos residuos de L-ramnopiranososa a través de enlaces 1,2. b) La región ramificada consiste de tres subunidades: ramnogalacturonano I, arabinogalactano y xilogalacturonano, los cuales están presentes en distintas proporciones. En algunas pectinas se encuentran también apiogalacturonanos (Ovodov, 2009).

El ramnogalacturonano I (RG-I) varía considerablemente en diferentes pectinas. Su cadena principal consiste de residuos de 1,4-ácido galacturónico y 1,2-ramnosa, alternados entre sí. La ramnosa forma los puntos de ramificación de la cadena principal, en ese azúcar se unen unidades de galactosa a través de enlaces 1,4.

El RG-I puede también contener unidades de xilogalacturonano o de apiogalacturonano e incluso se ha encontrado ácido ferúlico (pectina de remolacha azucarera). El ramnogalacturonano II (RG-II) es un componente minoritario de la pared celular vegetal, tiene una estructura muy compleja y se han distinguido en su composición los monosacáridos: D-ácido galacturónico, L-ramnosa, D-galactosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, L-fucosa, D-manosa, D-ácido glucurónico, apiosa, metilfucosa, ácido acérico, entre otros (Schols y Voragen, 2002; Ovodov, 2009). En la figura 1 se esquematiza la organización estructural de pectinas.

Las principales fuentes de pectinas son los frutos inmaduros y especialmente algunos tejidos suaves, como la cáscara de los cítricos (naranja, limón, toronja, lima), bagazos de manzana y pera. Sin embargo algunos investigadores han propuesto otras fuentes alternativas como: nopal, jícama, melocotón, tejocote, maracuyá, mora, mango, ciruela, tuna, entre otros (Habibi *et al.*, 2004; Contreras-Esquivel *et al.*, 2007; Ovodov, 2009).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
 Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1. Organización estructural general de las pectinas (Cosgrove, 2005).

1.2 Propiedades funcionales de pectinas

Las propiedades reológicas y algunas características sensoriales de diversos alimentos dependen de las propiedades funcionales de las macromoléculas constituyentes y de los hidrocoloides que son adicionados, entre los cuales se encuentran las pectinas. Estas macromoléculas no son hidrolizadas por las

enzimas del tracto digestivo humano, considerándose como componentes de la fibra dietaria, de aquí el gran uso en la industria alimentaria. Se le llama pectinas comerciales a los ácidos pectínicos solubles en agua, parcialmente metoxilados, capaces de formar geles bajo determinadas condiciones (Boatella, 2004).

La esterificación y polimerización de las pectinas determina las condiciones en que gelifica y por lo tanto su utilización en los productos alimenticios. Las pectinas de alto metoxilo requieren un medio con baja actividad de agua para formar geles y un pH entre 2 y 3.5. Esta característica se alcanza usualmente con un contenido de sólidos solubles entre 55 y 85%. Con las condiciones antes mencionadas se logra que los grupos carboxilo de la pectina no se disocien y se reduzcan las interacciones por repulsión de cargas, además se minimizan las interacciones pectina solvente y se favorecen la formación de puentes de hidrógeno. Este grupo se subdivide en pectinas de gelificación rápida, que tienen un grado de esterificación mayor de 68%, gelifican a temperaturas cercanas a 80°C en menos de 5 minutos; y de gelificación lenta con un grado de esterificación menor de 68%, gelificando a temperaturas menores a 60°C pero con tiempos más largos, cercanos a 30 minutos (Badui, 2006).

Los geles con pectinas de bajo metoxilo se alcanzan en sistemas con un pH entre 1 y 7; sin requerir la presencia de sacarosa y el rango de sólidos solubles puede estar entre 0 y 80%, pero es necesario adicionar iones polivalentes como el Ca^{+2} . La cantidad de calcio se evalúa de acuerdo al porcentaje de grupos carboxilos disponibles para formar enlaces con el calcio. Las pectinas con un alto nivel de grupos carboxilo libres requieren menor cantidad de calcio y viceversa. Adicionalmente, el nivel de calcio también depende del contenido de sólidos solubles, encontrándose que a medida que el contenido de sólidos solubles se incrementa en un alimento, el requerimiento de calcio para formar un gel estable disminuye. Las pectinas amidadas gelifican bajo condiciones similares a las de las pectinas de bajo metoxilo, pero se diferencian en la temperatura de formación de geles. Las pectinas de bajo metoxilo gelifican a temperaturas entre 40 y 100°C,

mientras que los geles con pectinas amidadas se estabilizan entre 30 y 70°C y son reversibles térmicamente, lo que significa que dichos geles fluidifican a temperaturas alrededor de 70°C. Los geles con pectinas de bajo metoxilo fluidifican a temperaturas cercanas a 150°C, mientras que los que se preparan con pectinas de alto metoxilo son irreversibles (Badui, 2006). Otras propiedades funcionales de importancia para el uso alimentario son: la solubilidad y viscosidad de las soluciones, las cuales dependen de la masa molar y el grado de polimerización de las pectinas.

1.3 Polisacáridos pécticos de frutos de Opuntia

1.3.1 Polisacáridos pécticos de tuna

En distintas variedades de tunas se ha reportado que la cáscara representa entre el 15% y el 20% del peso seco total del fruto y que en su composición química predominan polisacáridos no celulósicos (c.a 40%) con un alto contenido de ácido galacturónico (Habibi *et al.*, 2004). En países como Italia, Túnez y Marruecos se han estudiado el nopal y la cáscara de tuna de *Opuntia* spp. como fuentes potenciales de pectina (Habibi *et. al.*, 2004). Se han reportado extracciones bajo condiciones de alta acidez, como las usadas para la extracción de pectinas cítricas (Forni *et. al.*, 1994) y extracciones fraccionadas en medio acuoso (Habibi *et. al.*, 2004), obteniéndose polisacáridos con porcentajes de ácido galacturónico entre el 52% y 65%, y bajos niveles de metoxilación.

Lozada-Carbajal (2007) evaluó distintas condiciones de extracción de pectinas de cáscaras de tuna (*Opuntia* spp) variedad Alfajayucan del estado de México e Hidalgo a nivel laboratorio y estandarizó un proceso de extracción de pectinas reactivas al calcio, obteniéndose rendimientos desde 1.8 hasta 19% en base seca, dependiendo de la temperatura y la concentración de agente quelante usados en la extracción. El proceso de extracción determinó el rendimiento de polisacárido

obtenido y las propiedades reológicas al flujo de las soluciones acuosas de éste. Los tratamientos que generaron menores rendimientos de extracción dieron lugar a pectinas que en solución acuosa presentan mayor pseudoplasticidad y viscosidad aparente (Figura 2).

Los polisacáridos extraídos de la cáscara de tuna también han sido caracterizados químicamente en su perfil de azúcares, contenido de ácido galacturónico (Cuadro 1) y distribución de masas molares (Figura 3) (Lira-Ortiz, 2009). Los resultados evidenciaron características químicas de un arabinogalactano con 62% de ácido galacturónico, lo cual coincide con lo reportado por otros grupos de investigación (Habibi *et al.*, 2004), y una polidispersidad característica de polisacáridos pécticos.

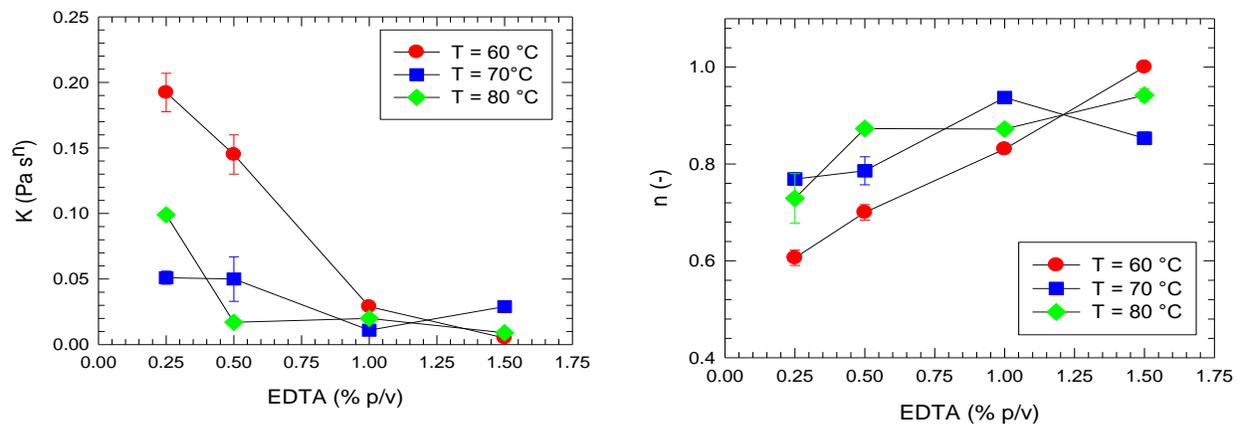


Figura 2. Parámetros del modelo de Ostwald de Waele, K y n , de dispersiones acuosas al 1 % p/p de pectinas extraídas de la cáscara de tuna, en función de las condiciones de extracción: temperatura y concentración de agente secuestrante de calcio (EDTA). Determinaciones realizadas a 25°C (Lozada-Carbajal, 2007).

Cuadro 1. Composición de azúcares y ácido galacturónico de polisacárido péctico extraído de cáscara de tuna. (Condiciones de extracción: 1% EDTA en medio acuoso, 70 °C, 2 h). Determinaciones en HPLC-IR usando una columna SugarSC1011 y agua como fase móvil (0.5 mL/min) a 60°C. Para la calibración de las columnas se usaron estándares comerciales de carbohidratos (Lira-Ortiz, 2009).

Compuesto	% p/p
Glucosa	0.92
Xilosa	1.48
Ramnosa	4.20
Galactosa	15.40
Arabinosa	9.74
Ácido galacturónico	61.24

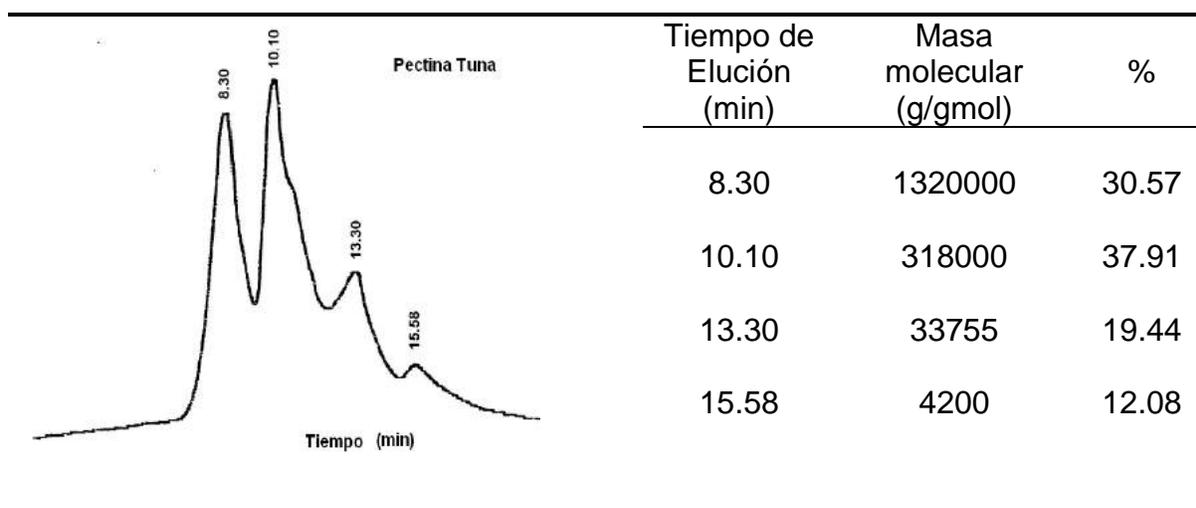


Figura 3. Distribución de masas moleculares en pectina de cáscara de tuna extraída en medio acuoso con 1% EDTA, 70 °C. Cromatografía de líquidos acoplada a detector de índice de refracción (Varian Pro Star), usando una columna TSK gel 5000PWXL. La fase móvil fue agua (0.3 mL/min) a 70 °C. La determinación de masas molares se realizó a través de una curva de calibración con estándares de diferentes masas moleculares, bajo las mismas condiciones cromatográficas (Lira-Ortiz, 2009).

En la Figura 4 se presentan el espectro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) de ácido poligalacturónico (APG) y polisacárido péctico de cáscara de tuna (PT) reportados por Lira-Ortiz (2009). El pico de la muestra PT en la región de 1715 cm^{-1} representa la absorción de los grupos carboxilo metoxilados (COOCH_3). La tensión de los enlaces $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}-\text{O}$ de ácidos carboxílicos se presentan en longitudes de onda de 1600 y 1414 cm^{-1} , respectivamente (McCann *et al.*, 1991;

Thygesen *et al.*, 2003). La señal en estas longitudes de onda indica una mayor proporción de grupos carboxilos no esterificados. Por consiguiente, los picos observados en 1594 cm^{-1} y 1412 cm^{-1} representan la cantidad de ácidos urónicos no esterificados presentes en la muestra, la cual fue similar en proporción a la presente en la muestra de ácido poligalacturónico.

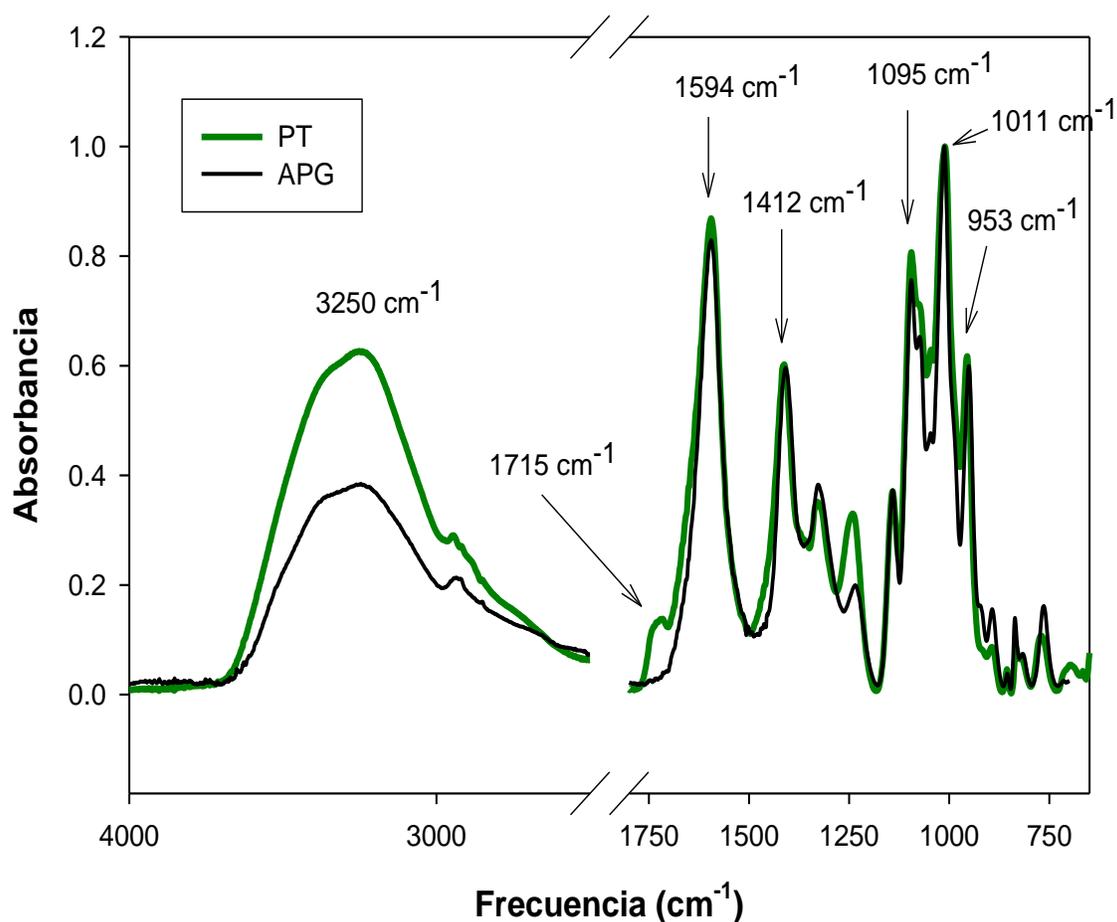


Figura 4. Espectros de infrarrojo por transformada de Fourier de ácido poligalacturónico (APG) y polisacárido tipo pectina de cáscara de tuna (PT) (Lira-Ortiz, 2009).

La comparación del espectro de FTIR de muestras estándar de pectinas cítricas con diferentes grados de esterificación y el polisacárido péctico de tuna estudiado por Lira-Ortiz (2009) se presenta en la Figura 5, en donde se puede observar cómo a medida que incrementa el grado de metoxilación de cada una de las muestras, se obtienen picos más grandes en la longitud de onda de 1700 cm^{-1} (flechas), siendo ausentes en el ácido poligalacturónico (0% de metoxilación, APG).

En la Figura 5 se puede observar que el pico correspondiente a los grupos COOR del polisacárido péctico de tuna se aproxima al presentado en la pectina con 30% de metoxilación. Paralelamente, el pico en la región de 1600 cm^{-1} , el cual representa a los grupos carboxilo libres, disminuye conforme se reduce el grado de esterificación en la pectina. Finalmente, los picos de absorción en la región conocida como “huella dactilar” (1200 cm^{-1} y 600 cm^{-1}) son semejantes tanto en los estándares como en la muestra de PT analizada, lo cual demuestra la similitud en la composición de azúcares neutros (polisacáridos estructurales) entre el polisacárido de tuna y pectinas cítricas estándares.

Por otra parte, los estudios reológicos de pectina de tuna (Lozada-Carbajal. 2007; Lira-Ortiz, 2009) han probado que este polisacárido tiene un comportamiento no newtoniano, reofluidificante a la cizalla, el cual es completamente diferente al observado en soluciones de pectinas cítricas comerciales (Figura 6).

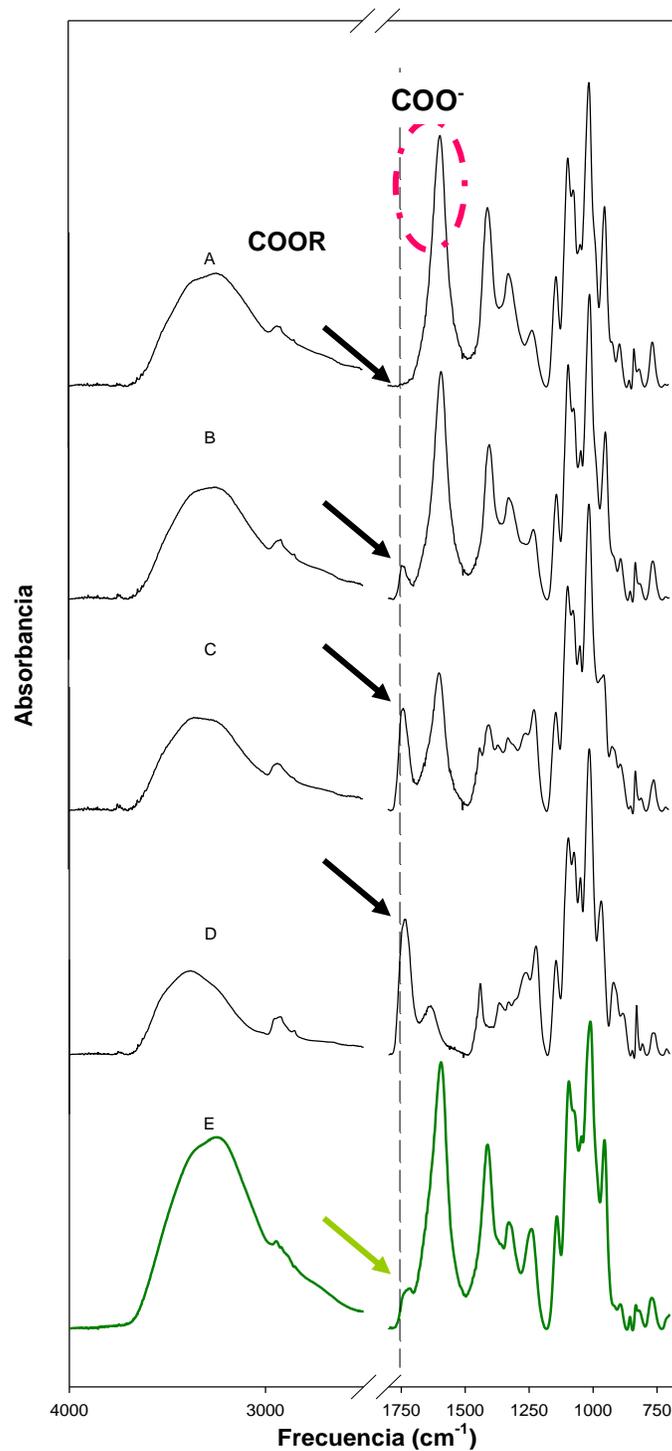


Figura 5. Comparación de espectros de Infrarrojo con Transformada de Fourier de pectina cítrica con 0% (A), 30% (B), 60% (C), 90% (D) de metoxilación y del polisacárido péctico extraído de la cáscara de tuna (E). Determinaciones realizadas en FTIR, Spectrum GX, Perkin Elmer. Los espectros fueron registrados por 40 escaneos a una resolución de 4.0 cm^{-1} . La flecha indica el pico de absorción correspondiente a grupos carboxilos esterificados (Lira-Ortiz, 2009).

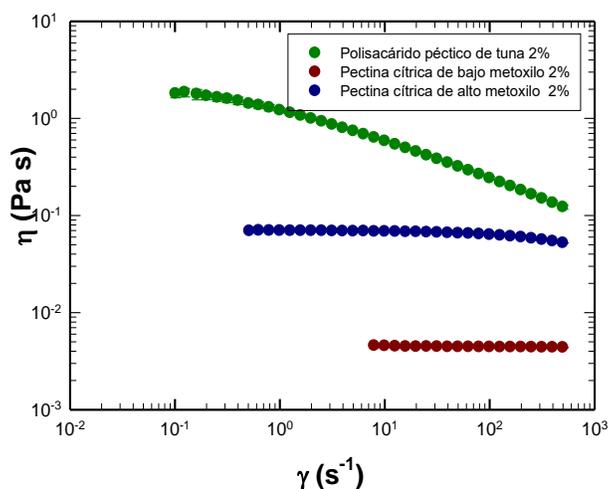


Figura 6. Propiedades reológicas en cizalla estacionaria de soluciones acuosas (2% p/p) de pectina de tuna, pectina cítrica de alto metoxilo (índice de metoxilación: 72%, Genu®Pectin 150, Kelco) y pectina cítrica de bajo metoxilo (índice de metoxilación: 9%, Genu®Pectin LM-5 CS, Kelco). Determinaciones realizadas a 25°C en un reómetro AR2000 con geometría cono-plato (60 mm, 2°) (Lira-Ortiz, 2009).

1.3.2 Polisacáridos pécticos de xoconostle

Una de las variedades de *Opuntia* que es poco valorado comercialmente es el xoconostle o tuna agria. Su nombre proviene del náhuatl "xococ" que significa agrio, y de "nochtli" que quiere decir tuna. Este fruto es de una variedad específica de nopal, que en la herbolaria se conoce por sus propiedades para combatir la diabetes, hipertensión, obesidad (triglicéridos) y enfermedades respiratorias (García-Pedraza *et al.* 2005). A las infusiones de este fruto se le atribuyen propiedades medicinales para el alivio de tos, migraña y dolor de cabeza. El xoconostle suele tener un sabor ácido y se utiliza principalmente en la cocina para la preparación de salsas, ensaladas, como frutos secos, condimento y aperitivo en guisos tradicionales, en la preparación de bebidas alcohólicas del estado de Guanajuato e Hidalgo, y en la elaboración de mermeladas, postres, pan y bebidas de frutas (Durán-Ávila, 2009).

El xoconostle (*Opuntia* spp.) es una baya esférica, cilíndrica o piriforme; presenta una depresión apical o receptáculo llamado ombligo; contiene una proporción pequeña de pulpa y un pericarpio grueso, ácido y succulento; el cual es comestible (García-Pedraza *et al.* 2005). Se han documentado 8 especies de xoconostle (*O. duranguensis* Britton and Rose, *O. heliabravoana* Scheinvar, *O. imbricata* DC., *O. joconostle* A. Web., *O. leucotricha* DC., *O. matudae* Scheinvar, *O. velutina* F.A.C. Weber y *O. zamudioi* Scheinvar) y 7 especies con variantes tipo xoconostle (*O. chavena* Griffiths, *O. lasiakantha* Pfeiff., *O. megacantha* Salm-Dyck, *O. robusta* Wendl., *O. spinulifera* Salm-Dyck, *O. streptacantha* Lem.). El xoconostle crece en climas áridos y semiáridos en nopaleras silvestres, jardines de casas o en plantaciones comerciales principalmente, en el centro de México. Según Sagarpa las variedades más comunes de xoconostle son el “cuaresmeño” (*O. matudae*) y el “burro” o “blanco”, los cuales crecen en forma silvestre aunque ya se cultivan con fines comerciales. Los principales productores de xoconostle cuaresmeño son: San Luis Potosí, Estado de México, Hidalgo, Puebla y Querétaro, y en menor proporción Aguascalientes, Zacatecas y Guanajuato. En el año 2009, los estados de Hidalgo y México sumaron una superficie cosechada de mil 218.5 hectáreas con una producción de 11 mil 614.25 toneladas (INIFAP, 2009).

Los estudios de extracción y caracterización de los polisacáridos estructurales del xoconostle son incipientes, existen aún pocos reportes científicos o tecnológicos. Recientemente se reportaron los contenidos de mucílagos, pectinas, celulosas y hemicelulosas, en frutos de xoconostle *Opuntia matudae* (conocido como “cuaresmeño”) cultivados en el estado de México (Álvarez-Armenta y Peña-Valdivia, 2009). Los resultados indicaron que los frutos de xoconostle son un alimento rico en fibra alimentaria soluble (7.8 a 18.6%) y fibra insoluble (11.6 a 16.5%). El contenido de mucílago, pectinas y celulosa representó una cantidad significativamente superior en los frutos con mayor madurez, 7.5, 8.0 y 15.4%, respectivamente.

Según estudio realizado por Álvarez-Armenta y Peña-Valdivia (2009) a 8 tipos de xoconostle de una plantación comercial, el índice de madurez del fruto se diferencia por la profundidad del receptáculo ya que en el análisis se pudo observar que los frutos maduros tienen un receptáculo plano; mientras que los menos maduros lo tuvieron 11.5 veces más profundo. La talla del fruto no depende del tiempo de maduración; mientras que la cantidad de biomasa seca y húmeda si cambia con el tiempo de maduración, siendo mayor en los frutos maduros. En el análisis de polisacáridos se determinó que existen diferencias entre los frutos maduros y de menor grado de maduración, encontrándose mayor proporción de mucílagos y pectinas en el primer grupo. En cuanto al contenido de celulosa se determina que incrementa conforme avanza el periodo de maduración, aunque se encontraron niveles altos en los frutos con menor período de madurez.

Estudios recientes han descubierto que el consumo de la tuna xoconostle aporta al organismo importantes cantidades de fibra, minerales, vitamina C y antioxidantes; estos últimos debidos a la combinación de fenoles solubles, vitamina C y betalaínas. Se ha destacado que el aporte de vitamina C del xoconostle es superior al de la fresa, mora azul y cereza (Velasco, 2010).

Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN

2.1 Justificación

México es un país con una variedad importante de frutas, lamentablemente muchas de éstas se pierden en la cosecha o no se aprovechan adecuadamente. En México el nopal y la tuna han sido muy apreciados por sus cualidades alimenticias y medicinales, actualmente se cultivan en gran parte del país aunque la mayor producción se registra sólo en 9 estados dentro de los cuales destaca el estado de Hidalgo en el cuarto lugar (Gobierno del estado de Hidalgo, 2010). De acuerdo a los datos de SAGARPA, en 2009 se obtuvo una producción de 130,765.67 toneladas de tuna variedad Alfajayucan a nivel nacional, de las cuales el estado de México contribuyó con 93,613.09, Hidalgo con 29,966.58, Zacatecas con 3,089, San Luis Potosí con 1,047 y Guanajuato con 50 toneladas (INIFAP, 2009). Sin embargo, existe una sobreoferta en los meses de cosecha del fruto, lo cual genera que ésta no sea costeable por los bajos precios de la fruta y se produzca un desperdicio considerable.

El xoconostle (*Opuntia* spp.) es una especie con frutos ácidos, que crece principalmente de forma silvestre en las regiones áridas y semiáridas del centro del país. La planta de esta cactácea es más tolerante a la sequía y a las heladas que otro tipo de cactáceas, se adapta bien a los suelos pobres y delgados del altiplano mexicano (www.inforural.com.mx). Entre las especies más populares que se cultivan incluso en plantaciones comerciales, se encuentran *O. oligacantha* y *O. matudae*, Los frutos de *O. matudae* se les conoce como “xoconostle cuaresmeño”, debido a que carecen de espinas y se pueden mantener unidos a la planta de un año a otro sin daño mecánico, por lo que se pueden cultivar todo el año. En el año 2009, los estados de Hidalgo y México sumaron una superficie cosechada de mil 218.5 hectáreas con una producción de 11 mil 614.25 toneladas de tuna xoconostle (INIFAP, 2009).

No obstante de los efectos benéficos a la salud por el consumo de tuna xoconostle, existen pocos reportes derivados de investigaciones sobre las propiedades funcionales de este fruto. Por otra parte, los aspectos de aprovechamiento industrial han sido poco abordados; la mayor parte de los productos derivados del xoconostle son artesanales (salsas, mermeladas, bebidas, dulces, etc.).

Por lo que es urgente el desarrollo de tecnologías para procesar y ampliar la oferta de productos derivados de la tuna y xoconostle con mayor valor agregado. Entre éstos se puede citar la extracción de polisacáridos estructurales de la cáscara (pectinas, mucílagos, hemicelulosa, celulosa), los cuales pueden tener propiedades de interés para la industria farmacéutica y de alimentos. En particular, la extracción de pectinas o polisacáridos pécticos resulta de interés por las propiedades reológicas que imparten estos hidrocoloides a los medios en donde son incluidos. Actualmente, las pectinas son polisacáridos que se usan para incrementar la viscosidad de alimentos, para estabilizar suspensiones, como agentes gelificantes y como materiales para elaborar películas comestibles para empacar alimentos (Rolin, 2002; Nieto, 2009).

Hasta ahora, la industria de las pectinas se ha centrado en los cítricos; sin embargo, es posible extraer polisacáridos pécticos de fuentes no convencionales, lo cual puede ser atractivo desde el punto de vista económico y científico. Se ha reportado la extracción de pectinas del amaranto, remolacha azucarera, tejocote, jícama, mango, durazno, nopal, tuna, etc. (Contreras-Esquivel *et al.*, 2007; Ovodov, 2009).

En este trabajo se propone la extracción de polisacáridos pécticos de la cáscara del xoconostle tomando como referencia trabajos previos del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria de la UAEH (Lozada-Carbajal, 2007; Lira-Ortiz, 2009; Reséndiz-Vega, 2010). Los experimentos preliminares a este trabajo demostraron que es posible extraer de la cáscara de xoconostle (*Opuntia* sp),

polisacáridos tipo pectina que gelifican en presencia de calcio. Por lo tanto se considera importante evaluar las propiedades reológicas de los polisacáridos tipo pectina de la cáscara de xoconostle con la finalidad de aprovechar este fruto que crece en climas áridos y semiáridos de nuestro país, generando productos con mayor valor agregado, lo cual coadyuvaría a valorar este fruto poco industrializado.

Capítulo 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Los polisacáridos pécticos de xoconostle (*Opuntia* sp.) están conformados por una fracción soluble y una insoluble, ésta última rica en proteína. Será posible separar las fracciones y caracterizar las propiedades reológicas al flujo de éstas en solución acuosa. La fracción soluble del polisacárido péctico de xoconostle presentará en solución propiedades reológicas de interés para la industria de alimentos, tales como pseudoplasticidad, viscosidad aparente superior a algunas pectinas comerciales y posiblemente capacidad para gelificar en presencia de calcio. La caracterización reológica y proximal de la fracción soluble de los polisacáridos pécticos permitirá determinar si este polisacárido péctico puede ser atractivo como aditivo alimentario.

3.2 Objetivo general

Determinar la composición química y evaluar el comportamiento reológico de polisacáridos extraídos de la cáscara de xoconostle (*Opuntia* sp.), para sugerir su uso como hidrocoloide de uso alimenticio.

3.1 Objetivos específicos

- Establecer un proceso de extracción y recuperación de polisacáridos hidrosolubles reactivos al calcio, a partir de cáscara de xoconostle (*Opuntia* sp.) en grado de madurez comercial, con la finalidad de identificar factibilidad comercial de este biopolímero.

- Cuantificar y caracterizar químicamente las fracciones solubles e insolubles del polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle, usando técnicas bromatológicas y de cromatografía de líquidos.

- Evaluar las propiedades reológicas de soluciones acuosas del polisacárido péctico de xoconostle en su fracción soluble usando reometría de cizalla estacionaria y de cizalla oscilatoria, con la finalidad de caracterizar el comportamiento al flujo de las soluciones e identificar capacidad gelificante en presencia de calcio.

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

- a) Xoconostle (*Opuntia* sp.), cosechado en Otumba estado de México (Marzo 2010). Se seleccionaron frutos con madurez comercial.
- b) EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, BAKER)
- c) Etanol de caña grado industrial
- d) Pectina de frutas cítricas (Sigma-Aldrich, P9135-100g)
- e) Pectina de manzana (Sigma-Aldrich, 76282)
- f) Goma xantana (CP Kelco, 411683A)

4.2 Evaluación de parámetros morfológicos de frutos de xoconostle

Se realizó una descripción morfológica de los frutos de la especie de xoconostle usada en este trabajo, considerando como guía al Manual gráfico para la descripción varietal del nopal tunero y xoconostle (*Opuntia* spp.) (Gallegos-Vázquez *et al.*, 2005). Las mediciones se realizaron en 20 frutos de xoconostle. Se determinó: longitud, diámetro máximo, relación longitud/diámetro máximo, espesor de cáscara, peso de la cáscara, peso de pulpa, relación peso pulpa/cáscara y %sólidos en cáscara.

4.3 Extracción de polisacáridos pécticos de cáscara de xoconostle

Para la extracción de polisacáridos pécticos de la cáscara del xoconostle se tomó como referencia el protocolo experimental reportado por Lira-Ortiz (2009) eliminando la primera etapa de extracción que consiste en la remoción de solutos

solubles en agua a temperatura ambiente. Las cáscaras de xoconostle se sometieron a las siguientes etapas:

- a) Despulpado del fruto
- b) Corte de la cáscara en trozos cúbicos de aproximadamente 0.5 cm por lado (para obtener un tamaño de partícula que permitiera mayor área de contacto)
- c) Escalde de la cáscara troceada con vapor saturado a 92°C durante 20 min.
- d) Enfriamiento
- e) Congelación

La extracción del polisacárido se realizó usando cáscaras escaldadas y congeladas. El proceso de extracción se efectuó en medio acuoso, mediante procesos discontinuos a nivel tanque agitado de 5 L con un volumen de operación de 3 L (Fig. 7). Se usó una relación cáscara húmeda/medio acuoso de 30g/100 ml, utilizándose agua desionizada durante el proceso.

El proceso consistió en dos etapas. La primera a 70 °C durante 2 horas con 350 rpm de agitación y sin control de pH. Concluido el tiempo de esta etapa, las cáscaras en suspensión se separaron desechando el extracto, éstas se re-suspendieron en una solución acuosa de EDTA con una concentración de 0.5% (p/v) a 70 °C durante 2 horas, 350 rpm (pH de la mezcla=4.01). El residuo agotado se separó de la solución acuosa filtrando a través de un lienzo de tela de organza.



Figura 7. Proceso de extracción fraccionada de polisacáridos pécticos en tanque agitado.

Los polisacáridos extraídos se recuperaron del medio de extracción utilizando etanol frío al 96 % v/v (grado industrial) en una relación 1:1.5 extracto filtrado-etanol (Fig. 8a). El polisacárido precipitado se separó de la solución acuosa filtrando con tela de organza doblada (para evitar pérdidas del polisacárido extraído), hasta obtener un polímero de apariencia esponjosa (Fig. 8c).



Figura 8. Recuperación del polisacárido péctico de xoconostle del medio de extracción a) precipitación con etanol, b) polisacárido recuperado, c) lavado con etanol.

4.4 Purificación del polisacárido péctico de xoconostle

Se preparó una solución acuosa al 2% del polisacárido extraído, ésta se distribuyó en membranas de celulosa para diálisis con corte molecular de 12 kDa (D9527, Sigma-Aldrich). Las membranas con las soluciones se colocaron en 7.5 L de agua desionizada y se mantuvieron en agitación durante 48 horas, con cambio total del agua cada 12 horas. Posterior a la diálisis la solución se centrifugó a 5800 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se precipitó con alcohol al 96°, usando una relación de 1:1 v/v; se dejó reposar durante toda la noche en refrigeración para recuperar el polímero al siguiente día a través de filtración con tela de organza. El precipitado resultante de la centrifugación se colocó en una caja petri para secarlo en una estufa a 45°C, tritularlo y conservarlo para su posterior análisis. Al polisacárido sin dializar o fracción cruda se denominó "PX" mientras

que a la fracción soluble e insoluble del polisacárido dializado se denominó “PXDS” y PXDN”, respectivamente.

4.5 Determinación del rendimiento del polisacárido extraído

El rendimiento (R) de las extracciones se calculó utilizando la siguiente ecuación.

$$R = \frac{\text{Sólidos secos extraídos y precipitados con etanol (g)}}{\text{Sólidos secos totales de la cáscara de xoconostle (g)}} \quad (1)$$

4.6 Caracterización fisicoquímica del polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle

4.6.1 Determinación de humedad

Se colocó ~0.1 g de muestra de polisacárido de xoconostle en cápsulas de aluminio (a peso constante) en una estufa de secado (Shell Lab, modelo 1380FX) a 100°C por 24 horas. La ecuación para determinar humedad fue la siguiente:

$$\%humedad = \frac{C_m - C_{ms}}{m} 100 \quad (2)$$

Donde:

C_m = masa de la cápsula con muestra húmeda (g)

C_{ms} = masa de la cápsula con muestra seca (g)

m = masa de la muestra húmeda (g)

4.6.2 Determinación de cenizas

Se colocaron ~0.1 g de muestra de polisacárido de xoconostle en crisoles de porcelana (a peso constante). La muestra se calcinó hasta obtener cenizas claras

en una mufla (Lundberg/Blue No. serie BH51700) a 550° C durante 5 horas. El resultado se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{C_c - C}{m} 100 \quad (3)$$

Donde:

C_c = masa del crisol con cenizas (g)

C = masa del crisol seco, sin muestra (g)

m = masa de la muestra sin calcinar (g)

3.6.3 Determinación de proteína

Se determinó mediante el método Kjendahl (AOAC, 1998). Utilizando ~0.1 g de muestra con 3 réplicas. Se usó HCl para valorar el ión borato (proporcional a la cantidad de nitrógeno). El porcentaje de nitrógeno total se calculó usando la Ecuación 4 y se usó el factor de 6.25 para convertir nitrógeno total a contenido de proteína.

$$N = \frac{(V - V_0)(N_{HCl})N_{meq}}{M_m} \quad (4)$$

Donde:

N = Nitrógeno total (g_{nitrógeno}/g_{muestra})

V = Volumen de HCL gastados en la valoración de nitrógeno en el problema (mL)

V_0 = Volumen de HCL gastados en la valoración de nitrógeno en el blanco (mL)

N_{HCl} = Normalidad de HCL (miliequivalentes/mL)

N_{meq} = Peso equivalente del Nitrógeno (g/miliequivalentes) = 0.014

M_m = Masa de la muestra (g)

3.6.4 Determinación de azúcares totales

Hidrólisis ácida de pectina

Para dicho experimento se utilizaron ≈ 0.025 g de polisacárido a los cuales se les adicionó 500 μL de H_2SO_4 concentrado. La mezcla se mantuvo en agitación cada 10 minutos durante 1 h, usando un agitador de tubo tipo vórtex. Posteriormente se adicionaron 10 mL de agua y la mezcla obtenida se llevó a 121°C en un autoclave durante 1 hora. Posterior a este tratamiento las soluciones se enfriaron y aforaron a 50 mL de agua (soluciones de pectina hidrolizada).

Determinación de azúcares totales

La determinación de azúcares totales se realizó con la técnica de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) usando la pectina hidrolizada. En tubos de ensayo se colocó 1 mL de la solución acuosa de pectina hidrolizada, 1 mL de fenol al 5% (p/v) y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, para posteriormente mezclarlos en un agitador de tubos; se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se determinó la intensidad del color naranja con un espectofotómetro (Jenway, 6715 Uv/Vis. Spectrophotometer) a 485 nm. Para calcular la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra se preparó una curva patrón con soluciones diluidas de glucosa y ácido galacturónico.

3.6.5 Determinación de azúcares neutros

Los polisacáridos extraídos de la cáscara de tuna se sometieron a una hidrólisis ácida. El hidrolizado se secó y se aforó a 10 mL con agua destilada. La muestra se analizó por HPLC-IR. Se prepararon soluciones estándares de azúcar (1mg/mL) y se analizaron bajo las siguientes condiciones:

Cuadro 2. Condiciones cromatográficas para la determinación de azúcares neutros en muestra de polisacárido péctico de xoconostle en su fracción soluble e insoluble.

Columna	Varian Meta Carb Ca Plus 300 mm x 7.8 mm
Fase móvil	Agua
Flujo	0.3 mL/min

4.7 Caracterización reológica del polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle

Se prepararon soluciones acuosas de polisacárido al 0.5, 1 y 2% p/p. El polisacárido se dispersó con agitación magnética en un baño maría a 50°C, durante 18 horas previas al análisis reométrico. Las pruebas reológicas se realizaron en un reómetro de esfuerzo controlado AR-2000 (TA Instruments).

4.7.1 Reometría de flujo

Se realizaron pruebas de cizalla estacionaria a 25 °C, utilizando la geometría de cilindros concéntricos de doble pared (espacio anular interno de 0.19 mm, espacio anular externo de 0.415 mm y longitud del cilindro de 59.5 mm) para las soluciones al 0.5 y 1%; y la geometría de cono-plato (acrílico, 60 mm y 2°) para las soluciones al 2%. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado en el polisacárido crudo extraído de xoconostle y en la fracción soluble de éste, PX y PXDS, respectivamente. Las curvas de flujo se compararon con pectina de frutas cítricas y pectina de manzana, ambas de grado comercial; usando las mismas condiciones de concentración y de preparación de la muestra (Cuadro 3).

Cuadro 3. Polisacáridos pécticos utilizados en las determinaciones reológicas de cizalla estacionaria.

Polisacárido	Concentraciones (% p/p)
PX	
PXDS	
PC	0.5, 1.0, 2.0
PM	

PX: polisacárido extraído de cáscara de xoconostle

PXDS: fracción soluble del polisacárido extraído de cáscara de xoconostle

PC: pectina comercial de frutas cítricas

PM: Pectina comercial de manzana

Los resultados de esfuerzo-velocidad de deformación se ajustaron a los modelos reológicos de Ostwald de Waele (Ec. 5) y Herschel Bulkley (Ec. 6). Por lo que se reportaron los parámetros: índice de consistencia (K), índice de flujo (n) y esfuerzo de cedencia (σ_0).

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (5)$$

$$\sigma = \sigma_0 + K\dot{\gamma}^n \quad (6)$$

Donde:

σ : Esfuerzo de cizalla (Pa)

σ_0 : Esfuerzo de cedencia (Pa)

$\dot{\gamma}$: Velocidad de cizalla (s^{-1})

K: Índice de consistencia ($Pa s^n$)

n: índice de flujo (-)

4.7.2 Reometría oscilatoria

Se realizaron también pruebas de cizalla oscilatoria en soluciones acuosas del polisacárido péctico soluble en agua (PDXS) en presencia de calcio. Se preparó una solución al 0.4% p/p de la fracción soluble del polisacárido extraído de

xoconostle (PXDS). Ésta se calentó hasta 90°C y se adicionó a la solución un volumen de CaCl₂ 80 mM para obtener una concentración de calcio en la muestra de 0.5 mM. La solución caliente se colocó en la geometría precalentada del reómetro (90°C) y se realizó:

- a) Un barrido de temperatura de 90 a 25°C, manteniendo la deformación de la muestra dentro de la zona de viscoelasticidad lineal (controlando manualmente la torca al valor mínimo accesible por el equipo o a torcas que generaron deformaciones en la muestra menores al 0.5%). Este barrido permitió determinar el intervalo de temperatura en donde ocurre la transición sol-gel.

- b) Un barrido de frecuencia a 25°C, manteniendo la deformación de la muestra dentro de la zona de viscoelasticidad lineal. Este barrido caracterizó el comportamiento reológico del posible gel de polisacárido. Previo a estas pruebas se determinó la zona lineal de viscoelasticidad realizando un barrido de torca a 25°C en una muestra recién preparada.

En ambas pruebas se evaluó la evolución del módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdida (G'') con relación a la temperatura (barrido de temperatura) y a la frecuencia de oscilación (barrido de frecuencia) en régimen lineal (cuando esfuerzo y deformación son proporcionales y no existe colapso de la estructura del material).

Capítulo 5

Resultados y discusiones

5.1 Análisis de morfología de frutos de xoconostle

En el Cuadro 4 se presentan los valores promedio de algunas de las características físicas de los xoconostles usados en esta investigación. De acuerdo a la clasificación de SAGARPA (Gallegos-Vázquez *et al.*, 2005) el xoconostle tiene una longitud corta, diámetro máximo estrecho, por lo tanto la relación entre longitud/diámetro máximo fue pequeña. El espesor de la cáscara, de acuerdo a la misma clasificación fue “muy grueso”, el peso de la cáscara presentó un valor medio, el peso de la pulpa fue muy ligero y la relación peso de pulpa/peso de cáscara fue muy pequeña. El fruto fue de forma oboval, la uniformidad del color en su superficie fue irregular, predominando el color rosa, la pulpa también presentó un color rosa aunque más intenso. La Figura 9 presenta fotografías de los frutos usados en este trabajo.

Cuadro 4. Valores promedio de características físicas de frutos de xoconostle (*Opuntia* sp.). Datos promedio de 20 mediciones en frutos independientes.

Parámetro	Valor medio \pm desviación estándar
Longitud (mm)	60.535 \pm 5.4
Diámetro máximo (mm)	49.810 \pm 2.793
Relación longitud/diámetro máximo (mm)	1.221 \pm 0.145
Espesor de la cáscara (mm)	13.126 \pm 2.701
Peso de la cáscara (g)	68.540 \pm 7.645
Peso de la pulpa (g)	11.523 \pm 2.101
Relación peso de pulpa/cáscara (g)	0.168 \pm 0.027
% sólidos en cáscara (%p/p)	7.642 \pm 0.613
Forma	Oboval
Uniformidad del color de la superficie	Irregular
Color principal de la superficie	Rosa
Color de la pulpa	Rosa

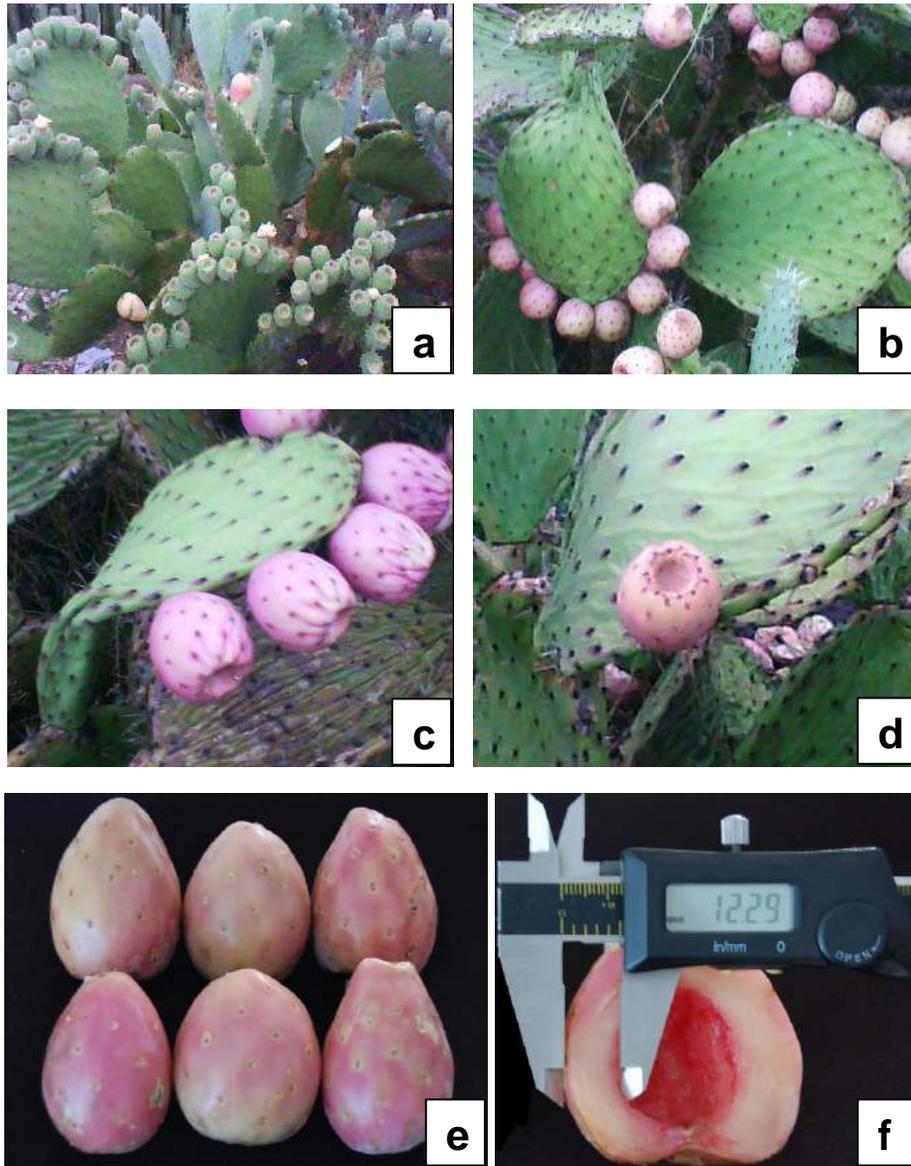


Figura 9. Nopalera con frutos de xoconostle en la región de Otumba, estado de México (a). Distintas imágenes de frutos de xoconostle maduros aún en la planta (b, c y d), fotografías tomadas en junio 2011 antes del inicio de la temporada de lluvia, por lo que se observa deshidratación en los frutos. Frutos de xoconostle usados para este trabajo (e). Corte transversal de un fruto de xoconostle en donde se observa la magnitud del grosor de su cáscara (f).

5.2 Rendimiento de extracción de polisacáridos pécticos de la cáscara de xoconostle

El Cuadro 5 presenta el rendimiento de extracción (g polímero seco/g sólidos secos en cáscara) de polisacárido péctico de xoconostle, el cual es inferior a los reportados para pectinas de tuna (Reséndiz-Vega, 2010) y xoconostle variedad Cuaresmeño (Álvarez-Armenta y Peña-Valdivia, 2009); pero superior a los que se reportaron para pectinas de tuna en trabajos pioneros (Forni *et al.*, 1994) y a los de la extracción de pectinas gelificantes de nopal (Cárdenas y Goycoolea, 2003). Las diferencias pueden ser debidas principalmente a los métodos de extracción y de recuperación de los polisacáridos.

Cuadro 5. Valores de rendimiento obtenidos en la extracción de polisacáridos pécticos de nopal, tuna y xoconostle.

Fruto de Opuntia	Polisacárido Extraído	Condiciones de extracción	Tiempo de extracción (h)	Rendimiento (% p/p) en base seca	Referencia
Tuna <i>Opuntia albicarpa</i> S.	Pectina	Ácida pH 2, 80°C	2 h	0.12 ± 0.01	Forni <i>et al.</i> , 1994
Nopal <i>Opuntia ficus-indica</i>	Pectina	Alcalina con agentes quelantes	1 h	0.6	Cárdenas y Goycoolea, 2003
Xoconostle <i>Opuntia matudae</i>	Polisacáridos pécticos	Acuosa con agentes quelantes (0.5% de oxalato de amonio)	1	15.4% ± 0.94	Álvarez-Armenta y Peña-Valdivia, 2009
Tuna <i>Opuntia albicarpa</i> S.	Pectina	Acuosa con agentes quelantes (0.5% EDTA, 70°C)	2	9.12%±0.14	Reséndiz Vega, 2010
Xoconostle <i>Opuntia</i> sp.	Polisacáridos pécticos	Acuosa con agentes quelantes (0.5% EDTA, 70°C)	2	5.068%±1.613	Presente trabajo

5.3 Análisis proximal

El polisacárido de xoconostle (PX) obtenido en este trabajo presentó solubilidad parcial al agua y formación de espuma durante la disolución. Con la finalidad de mejorar sus propiedades reológicas se separó, a través de centrifugación, la fracción insoluble de este polímero. En el Cuadro 6 se presenta el análisis proximal de las fracciones solubles e insolubles que conformaron el PX, las cuales representaron el 26.27 y 73.73%, respectivamente.

Cuadro 6. Análisis proximal de la composición química del polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle (*Opuntia* sp.) dividido en fracción soluble e insoluble posterior al proceso de diálisis. Se muestran los datos promedio (n=3) \pm su desviación estándar.

Muestra	Humedad (% p/p)	Cenizas (% p/p)	Proteína (% p/p)	Azúcares ¹
Fracción soluble	2.64 \pm 0.63	5.87 \pm 1.96	2.36 \pm 0.24	48.70 \pm 0.28
Fracción insoluble	3.77 \pm 0.18	15.83 \pm 1.71	11.51 \pm 0.49	26.08 \pm 1.08

¹ Determinados por técnica de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) usando una curva estándar con ácido galacturónico y otra con glucosa.

Es evidente que la fracción insoluble es rica en proteínas, las cuales pudieron ser removidas de la cáscara del fruto durante el proceso de extracción o bien formar parte de la estructura de estos polisacáridos estructurales. Es importante hacer notar la cantidad de minerales presentes en ambas fracciones a pesar de haber sido sometidas a un proceso de diálisis, lo cual permite sugerir menores cantidades de agentes quelantes (EDTA) durante el proceso de extracción. A diferencia del polisacárido sin dializar, la fracción soluble generó soluciones acuosas translúcidas ligeramente amarillentas, a medida que se incrementa la concentración de polisacárido en la solución. En la Figura 10 se muestran imágenes de las soluciones del PX y PXDS, en donde es evidente que la remoción de la fracción rica en proteínas mejoró la solubilidad.

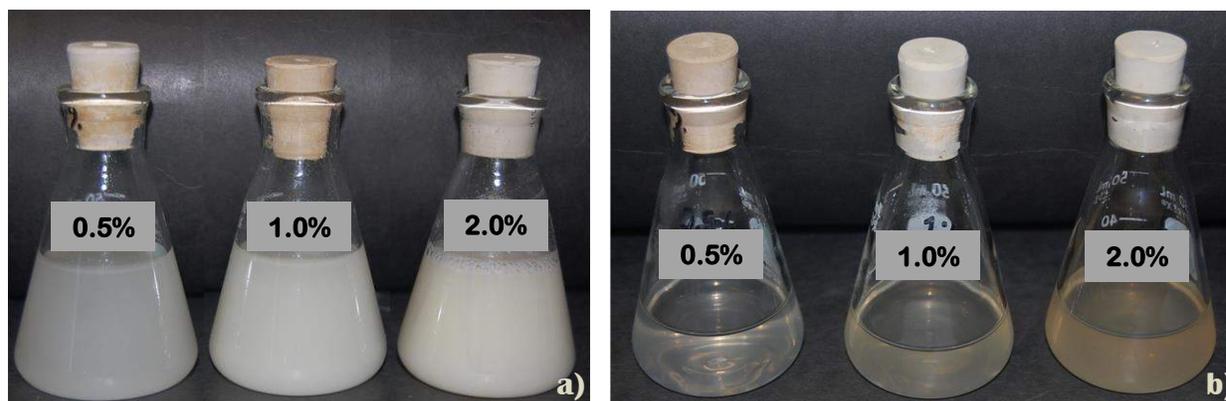


Figura 10. Soluciones de polisacárido péctico de la cáscara de xoconostle en diferentes concentraciones. a) Fracción insoluble (PX), b) Fracción soluble (PXDS)

La fracción soluble representa una fracción minoritaria en los polisacáridos pécticos extraídos, lo cual da lugar a un rendimiento de extracción del 1.33% en base seca. No obstante que este rendimiento pudiese ser pobre para ser de interés comercial en la industria de los alimentos, las propiedades funcionales que presentó este polisacárido pueden darle mayor valor agregado como aditivo, no sólo alimentario, sino también como biopolímero para la industria farmacéutica, de cosméticos o de materiales biodegradables en donde éstos se cotizan a mayores precios.

5.3.1 Composición de azúcares y ácido galacturónico

En el Cuadro 7 se presenta la composición de azúcares neutros y ácido galacturónico de algunos mucílago y polisacáridos pécticos de *Opuntia* que se han reportado en la literatura. El mucílago de nopal a diferencia de los polisacáridos pécticos presenta un contenido bajo de ácido galacturónico y una mayor proporción de arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa. En contraste, los polisacáridos pécticos y pectinas presentan un contenido importante de ácido galacturónico (>50%) con cantidades menores de azúcares neutros en donde predominan arabinosa, galactosa y ramnosa. Tanto la fracción soluble como la insoluble del polisacárido de xoconostle de este trabajo, presentaron contenidos de ácido galacturónico inferiores al 65%, lo cual de acuerdo al Codex Alimentario y

a la FAO (Rolín 2002), se identifica como polisacárido péctico; para que sea considerado como pectina comercial es requerido un mínimo de 65% de ácido galacturónico en su composición.

La fracción insoluble, además de contener una proporción alta de proteínas y minerales (Cuadro 6), presentó un contenido relativamente alto de glucosa, galactosa y ramnosa; esto permite especular, con base a lo revisado en la literatura (sección 1.1), que este polisacárido estaría conformado principalmente del componente de la pared celular denominado ramnogalacturonano II, que se integra a la estructura de las pectinas y presenta una estructura compleja con azúcares variados en su composición (i.e. ramnosa, galactosa, arabinosa, xilosa, glucosa manosa, entre otros) (Schols y Voragen, 2002; Ovodov, 2009).

Por otra parte, la fracción soluble presentó mayor contenido de ácido galacturónico y menores proporciones de azúcares neutros que la fracción insoluble; sólo el contenido de ramnosa fue superior en la fracción soluble. Se ha reportado que la ramnosa forma los puntos de ramificación de la cadena principal del ramnogalacturonano I de las pectinas, por lo tanto es posible que la fracción soluble sea un polisacárido péctico muy ramificado con cadenas laterales compuestas por galactosa, arabinosa y glucosa.

Cuadro 7. Contenido de azúcares neutros y ácido galacturónico en polisacáridos pécticos y mucílagos de frutos de *Opuntia*. Datos expresados en % peso/peso en base seca.

Polisacárido	Ácido galacturónico	Glu	Xil	Gal	Ram	Ara	Referencia
Polisacárido péctico de tuna (<i>O. ficus-indica</i>)	64.0	2.6	2.1	22.0	^a	6.0	Forni <i>et al.</i> , 1994
Mucílago de nopal (<i>O. ficus-indica</i>)	6.38 ^b	-	22.13	20.43	7.02	44.04	Medina-Torres <i>et al.</i> , 2000

Mucílago de nopal (<i>O. ficus-indica</i>)	10.2 ^b	1.9	9.1	11	46	15	Majdoub <i>et al.</i> , 2001a
Mucílago de nopal (<i>O. ficus-indica</i>)	9.6	1	18.7	20.3	6.9	33.1	Majdoub <i>et al.</i> , 2001b
Pectina (<i>O. ficus-indica</i>)	56.3 ^b	0	0.9	6.5	0.5	5.6	Cárdenas y Goycoolea, 2003
Polisacárido péctico de tuna (<i>O. ficus-indica</i>)	64.5	-	0.9	4.0	3.7	17.2	Habibi <i>et al.</i> , 2004
Pectina nopal (<i>O. ficus-indica</i>)	85.4 ^b	0	1	7	0.6	6	Cárdenas <i>et al.</i> , 2003
Polisacárido péctico de tuna (<i>Opuntia albicarpa</i> S.)	61.24	0.92	1.48	15.40	4.20	9.74	Lira-Ortiz, 2009
Polisacárido péctico de xoconostle (<i>Opuntia</i> sp.) Fracción soluble	41.68	0.48	Tr	0.27	4.32	0.46	Presente trabajo
Polisacárido péctico de xoconostle (<i>Opuntia</i> sp.) Fracción insoluble	38.68	2.44	Tr	3.49	2.86	1.1	Presente trabajo

Glu: Glucosa, Xil: Xilosa, Gal: Galactosa, Ram: Ramnosa, Ara: Arabinosa

Tr: Traza

^a: Se reporta la suma de galactosa y ramnosa

^b: Expresado como ácido urónicos

La organización estructural del polisacárido es posible identificarla con técnicas analíticas más específicas como RMN y espectroscopía de masas. El polisacárido péctico de tuna reportado por Habibi *et al* (2004) presentó un contenido similar de ramnosa pero concentraciones mayores, en más de una orden de magnitud, de arabinosa y galactosa. Estos autores realizaron análisis de RMN y reportaron que el polisacárido consistió de una cadena principal de $\rightarrow 2)$ - α -L-ramnosa-(1 $\rightarrow 4)$ - α -D-ácido galacturónico-(1 \rightarrow con cadenas laterales de arabinanos (24-29 unidades de arabinosa) o galacto-oligosacáridos (2-3 unidades de galactosa). La estructura del polisacárido péctico de tuna dilucidada por Habibi *et al* (2004) se muestra en la Figura 11. Comparando la distribución de ramnosa y ácido galacturónico del polisacárido soluble de xoconostle (PXDS) con el polisacárido péctico estudiado por Habibi *et al* (2004) y por Lira-Ortiz (2009), ambos de tuna; posiblemente PXDS presente similitudes en su estructura, principalmente en el hecho de presentar ramificaciones en la cadena principal que influyan en sus propiedades reológicas en solución.

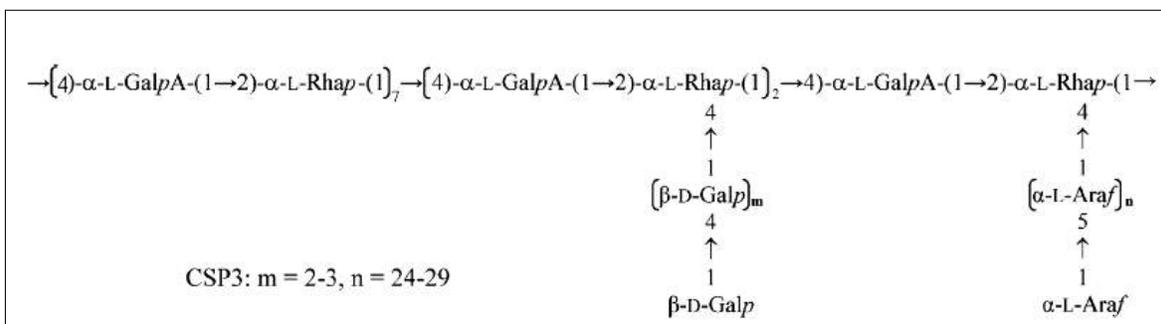


Figura 11. Estructura del polisacárido péctico de tuna (*Opuntia ficus-indica*) propuesta por Habibi *et al*. (2004).

5.4 Reología

5.4.1 Pruebas de cizalla estacionaria

En la Figura 12 se muestra el comportamiento al flujo de soluciones al 0.5, 1.0 y 2.0%, elaboradas con el polisacárido no dializado (PX) y la fracción soluble del polisacárido dializado (PXDS), extraídos de la cáscara de xoconostle. Es evidente que la eliminación de sales y proteínas (fracción insoluble) a través de la diálisis y

centrifugación, generó una fracción polisacárida soluble en agua que presenta mayor viscosidad en solución que el polisacárido “crudo” sin ningún tratamiento.

En todas las muestras se observa que conforme aumenta la velocidad de cizalla, la viscosidad disminuye, lo cual indica un comportamiento pseudoplástico. A medida que se incrementa la concentración, la pseudoplasticidad y la diferencia entre PX y PXDS se incrementa. Por ejemplo, las soluciones al 2% de PXDS son más viscosas en más de una orden de magnitud que PX, mientras que las soluciones de PXDS al 0.5% son ≈ 7 veces más viscosas que sus contrapartes elaboradas con PX. La pseudoplasticidad de polisacáridos alimenticios es de interés para la industria, muchos agentes viscosificantes y estabilizantes de amplio uso presentan comportamiento reológico no newtoniano del tipo reofluidificante (pseudoplasticidad).

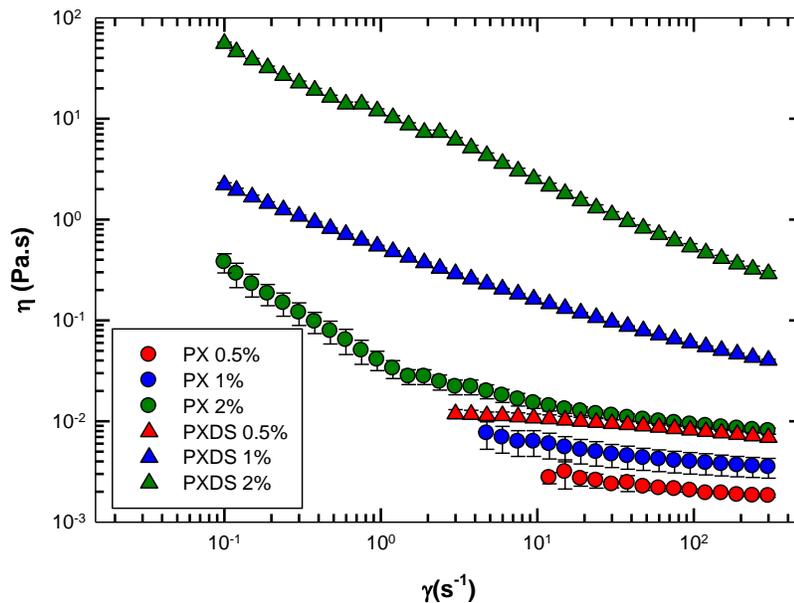


Figura 12. Comparación de soluciones elaboradas con los polisacáridos extraídos de la cáscara de xoconostle (*Opuntia* sp) a las concentraciones de 0.5, 1 y 2%, donde PX es el polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle sin proceso posterior de purificación y PXDS es el polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle sometido a un proceso de diálisis y de eliminación de la fracción insoluble.

En la Figura 13 se muestra el comportamiento al flujo de soluciones al 0.5%, 1% y 2% de PX y PXDS. Se muestran también, con fines comparativos, las curvas de viscosidad de soluciones de pectinas comerciales: pectina de frutas cítricas (PC), pectina de manzana (PM) y pectina de tuna (*O. albicarpa*) obtenida y estudiada por Lira-Ortiz (2009). En la figura se observa que el polisacárido PX es el que presentó menor viscosidad aparente, en las tres concentraciones analizadas; debido probablemente a la cantidad de proteínas y minerales contenidos en la muestra; aunque al aumentar la concentración se acentuó el comportamiento pseudoplástico. En el caso de las pectinas de frutos cítricos y de manzana se observa que la viscosidad no cambió conforme aumenta la velocidad de cizalla lo cual indica un comportamiento newtoniano. Las viscosidades de las soluciones de estas pectinas fueron significativamente menores a la presentada por pectina de tuna (PT) y polisacárido péctico de xoconostle (PXDS). Por otra parte, las soluciones de pectinas comerciales, PC y PM, no presentan incrementos sustanciales de viscosidad con el incremento de concentración, como sí sucede en el caso de la pectina de tuna y PXDS. La viscosidad de PC y PM al 2% \approx 15 veces la viscosidad de las soluciones al 0.5% y 3 veces la presentada en soluciones al 1%. En la Figura 13 también se observa que PT y PXDS presentan viscosidades aparentes en el mismo orden de magnitud. En secciones siguientes se discutirá el comportamiento reológico de PXDS con base al ajuste de datos a modelos reológicos.

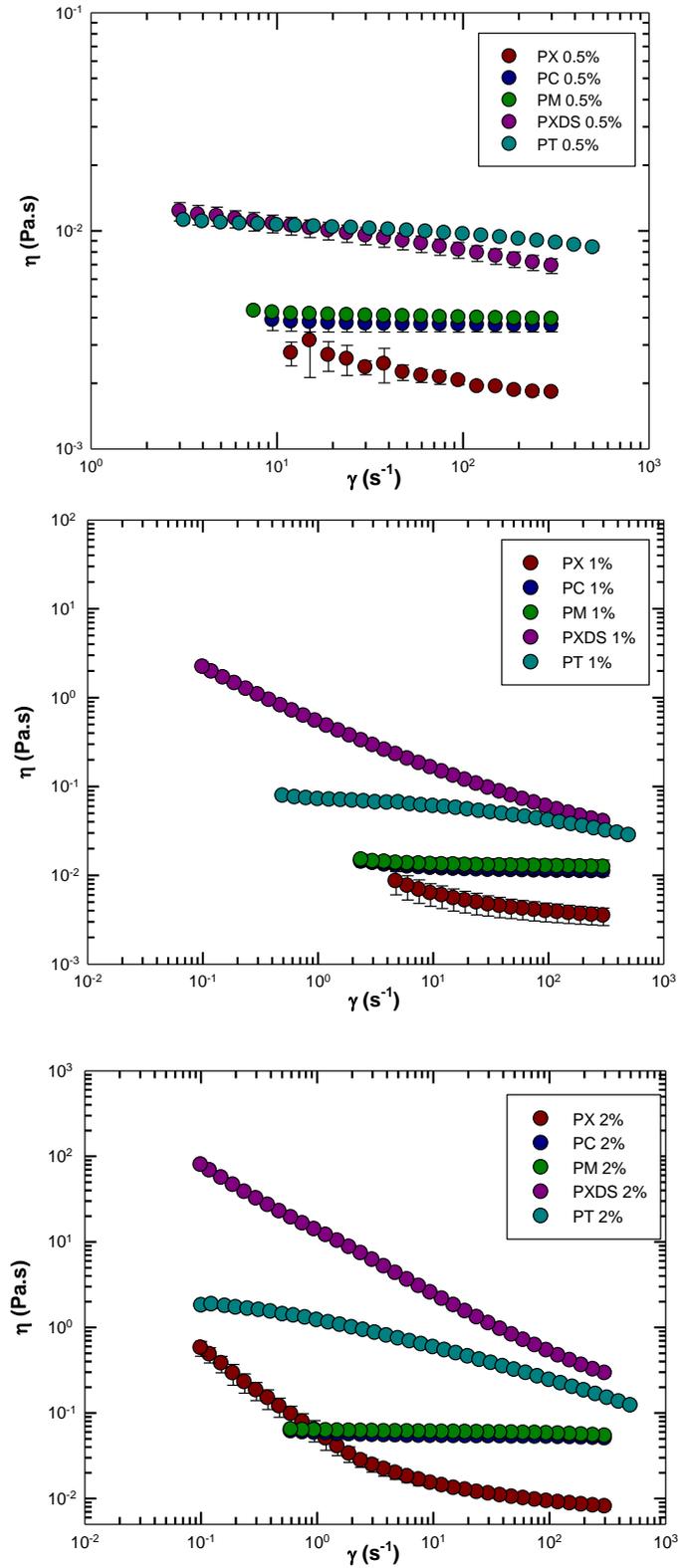


Figura 13. Comparación del comportamiento al flujo de soluciones elaboradas con polisacárido extraído de la cáscara de xoconostle en la fracción cruda (PX) y la fracción soluble del polisacárido dializado (PXDS); pectinas de grado comercial como pectina de manzana (PM) y de frutas cítricas (PC); además de pectina de tuna (*O. albicarpa* S.) (PT); en concentraciones de 0.5% 1% y 2%.

En la Figura 14. A manera de ejemplo, se muestra el modelado de los datos reológicos, de las soluciones de pectinas o polisacáridos pécticos al 0.5%, al modelo de Ostwald de Waele también conocido como Ley de la Potencia. En todos los casos se obtuvo un ajuste satisfactorio a este modelo ($R^2 > 0.998$) y los resultados del modelado se presentan en el Cuadro 8.

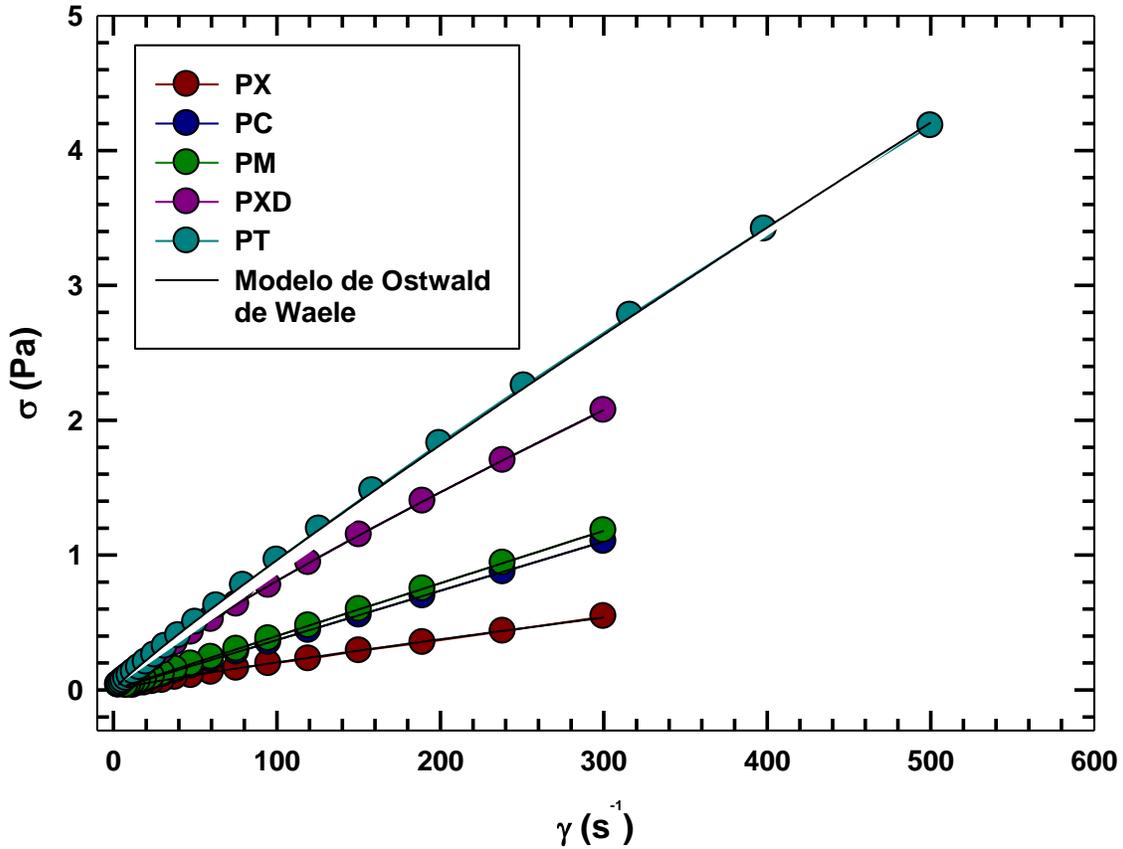


Figura 14. Ajuste de datos experimentales al Modelo de Ostwald de Waele o Ley de la Potencia. Soluciones al 0.5% de: polisacárido de cáscara de xoconostle (PX), pectina de frutas cítricas (PC), pectina de manzana (PM), fracción soluble del polisacárido de cáscara de xoconostle dializado (PXDS) y pectina de tuna (*O. albicarpa* S.) (PT).

Cuadro 8. Parámetros reológicos del Modelo de Ostwald de Waele determinados en soluciones al 0.5%, 1% y 2% de: polisacárido de cáscara de xoconostle (PX), pectina de frutas cítricas (PC), pectina de manzana (PM), fracción soluble del polisacárido dializado de la cáscara de xoconostle (PXDS) y pectina de tuna (*O. albicarpa* S.) (PT).

	K (Pa.s ⁿ)	n (-)	R ²	Error estándar
0.5%				
PX	0.0036	0.8796	0.9999	0.0050
PC	0.0038	0.9916	0.9999	0.0006
PM	0.0043	0.9849	0.9999	0.0006
PXDS	0.0154	0.8601	0.9999	0.0033
PT	0.0141	0.9166	0.9999	0.0116
1%				
PX	0.0070	0.8761	0.9994	0.0074
PC	0.0122	0.9826	0.9999	0.0031
PM	0.0138	0.9806	0.9999	0.0014
PXDS	0.3790	0.6015	0.9979	0.1435
PT	0.1150	0.7749	0.9996	0.0749
2%				
PX	0.0195	0.8421	0.9971	0.0322
PC	0.0596	0.971	0.9999	0.0246
PM	0.0716	0.9502	0.9999	0.0405
PXDS	11.5	0.3391	0.9849	2.6029
PT	1.57	0.5914	0.9996	0.3277

PX: polisacárido de cáscara de xoconostle (*Opuntia* sp) en fracción cruda
 PC: pectina de frutas cítricas
 PM: pectina de manzana
 PXDS: polisacárido de cáscara de xoconostle dializado en fracción soluble
 PT: pectina de tuna (*O. albicarpa* S.)

De acuerdo a los parámetros reológicos del Cuadro 8, el PXDS presenta un comportamiento pseudoplástico con valores de n desde 0.86 hasta 0.33, estos valores disminuyeron al incrementar la concentración de polisacárido. A excepción de PXDS, las soluciones al 0.5% de todas las muestras analizadas presentaron comportamientos ligeramente pseudoplásticos y los valores del índice de consistencia, K, se ubicaron en valores cercanos a 4 mPasⁿ. PT y PXDS presentaron los valores mayores en K. Comportamiento similares se observaron en el resto de las concentraciones. Es importante hacer notar los valores de K y n obtenidos en PXDS al 2%, los cuales sobresalen del resto de los polisacáridos evaluados. Este

polisacárido por lo tanto tiene propiedades viscosificantes y reofludificantes importantes que pudiesen ser de interés industrial.

De forma similar a la Figura 14, la Figura 15 muestra a manera de ejemplo el ajuste de datos reológicos de las soluciones de pectinas o polisacáridos pécticos al 0.5%; al modelo de Herschel Bulkley. Los parámetros obtenidos en la regresión no lineal se presentan en el Cuadro 9.

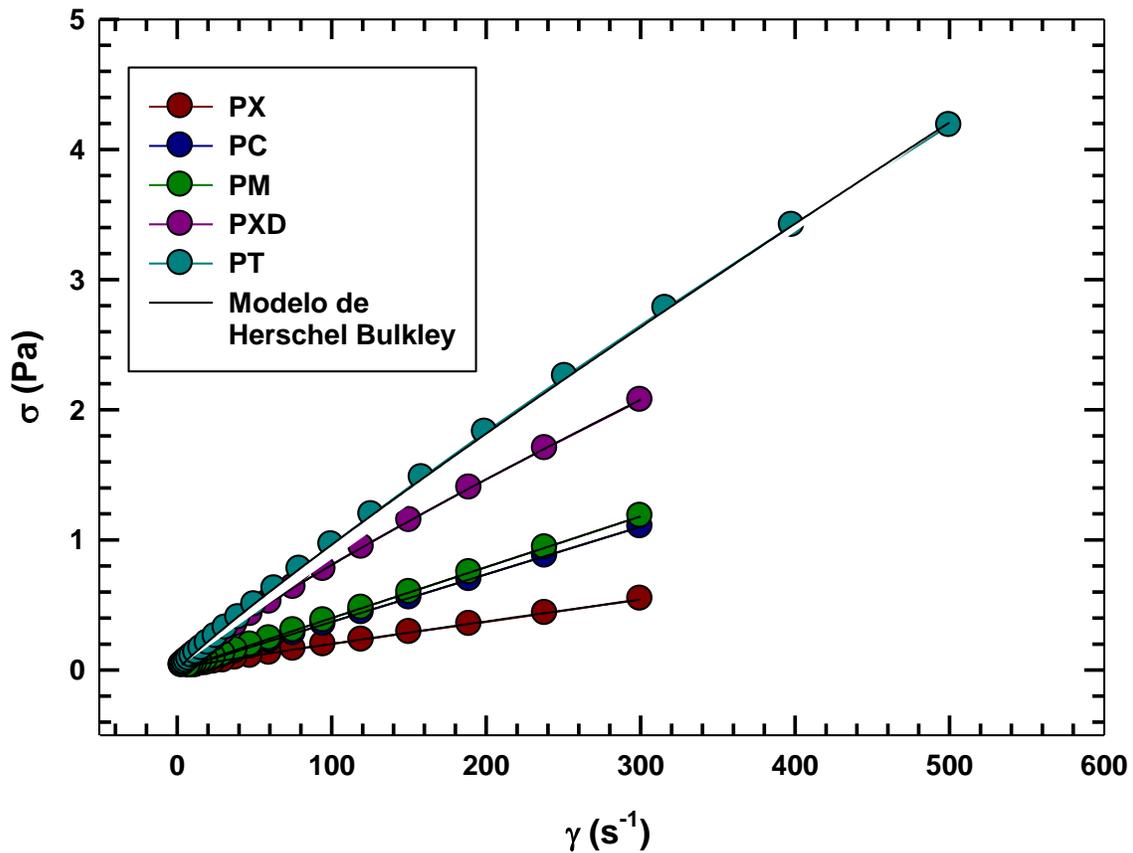


Figura 15. Ajuste de datos experimentales al Modelo de Herschel Bulkley. Soluciones al 0.5% de: polisacárido de cáscara de xoconostle (PX), pectina de frutas cítricas (PC), pectina de manzana (PM), fracción soluble del polisacárido de cáscara de xoconostle dializado (PXDS) y pectina de tuna (*O. albicarpa* S.) (PT).

En el Cuadro 9 se comparan los parámetros del modelo de Herschel Bulkley obtenidos en las soluciones de pectinas o polisacáridos pécticos al 0.5%. PXDS presentó un comportamiento pseudoplástico en las tres concentraciones evaluadas con un valor de n de 0.86 a 0.46, acentuándose el comportamiento pseudoplástico al aumentar la concentración. Este efecto no se observó ni en PX ni en las pectinas comerciales, PC y PM, en donde la reducción en el índice de flujo fue marginal al incrementar la concentración.

En cuanto al índice de consistencia del modelo de Herschel Bulkley, K_2 , se observó un incremento importante conforme se incrementó la concentración de polisacárido en todas las muestras, sin embargo PXDS al 2% presenta valores de K_2 de hasta 5.54 Pa.sⁿ, superiores a los presentados por el resto de las soluciones de polisacáridos pécticos o pectinas comerciales, incluyendo los de PT reportados por Lira-Ortiz (2009).

El modelo de Herschel Bulkley se caracteriza por presentar como parámetro el esfuerzo de cedencia, σ_0 , que representa el esfuerzo que debe ser aplicado a un material para que empiece a fluir. Como se observa en el Cuadro 9, los valores de σ_0 resultaron bajos a excepción de PXDS al 2%, por lo que el modelado reológico del resto de las soluciones puede ser satisfactoriamente descrito a través del modelo de Ostwald de Waele (modelo de 2 parámetros). Para PXDS 2% es más confiable el ajuste al modelo de Herschel Bulkley, lo cual se verifica a través de los valores del coeficiente de correlación y error estándar.

Cuadro 9. Parámetros reológicos del Modelo de Herschel Bulkley determinados en soluciones al 0.5%, 1% y 2% de: polisacárido de cáscara de xoconostle (PX), pectina de frutas cítricas (PC), pectina de manzana (PM), fracción soluble del polisacárido dializado de la cáscara de xoconostle (PXDS) y pectina de tuna (*O. albicarpa* S.) (PT).

	σ_0 (Pa)	K_2 (Pa.s ⁿ)	n (-)	R ²	Error estándar
0.5%					
PX	0.0124	0.0025	0.9383	0.9996	0.0035
PC	0.00120	0.0038	0.995	0.9999	0.0003
PM	0.0012	0.0042	0.988	0.9999	0.0004
PXDS	2.69E-13	0.0154	0.8601	0.9999	0.0034
PT	1.99E-13	0.0141	0.9166	0.9999	0.01190
1%					
PX	0.0180	0.0053	0.9252	0.9999	0.0007
PC	0.00570	0.0118	0.9883	0.9999	0.0004
PM	0.0016	0.0137	0.982	0.9999	0.0011
PXDS	0.0236	0.2894	0.6479	0.9995	0.0686
PT	2.34E-12	0.1151	0.7749	0.9996	0.0762
2%					
PX	0.0458	0.0135	0.9049	0.9999	0.0054
PC	1.75E-10	0.0596	0.971	0.9999	0.0251
PM	1.75E-10	0.0596	0.971	0.9999	0.0413
PXDS	7.46	5.5409	0.4599	0.9960	1.3515
PT	4.72E-11	1.5652	0.5914	0.9996	0.3324

PX: polisacárido de cáscara de xoconostle (*Opuntia* sp.) en fracción cruda

PC: pectina de frutas cítricas

PM: pectina de manzana

PXDS: polisacárido de cáscara de xoconostle dializado en fracción soluble

PT: pectina de tuna (*O. albicarpa* S.)

La Figura 16 ejemplifica el comportamiento al flujo de soluciones de PXDS al 0.5%, 1% y 2% comparadas con una solución al 0.5% de un espesante líder en la industria alimentaria como es el caso de xantana. La preparación de soluciones y el protocolo reométrico fue igual en todas las muestras. La Figura 15 muestra un comportamiento pseudoplástico similar en las soluciones de PXDS al 1% y 2% con xantana; PXDS al 0.5% presentó un comportamiento menos pseudoplástico (n=0.86). La xantana en solución al 0.5% presentó valores de K y n de 1.92 Pa.sⁿ y 0.28, respectivamente, comparados con los valores de las soluciones de PXDS al 1% (K= 0.38 Pa.sⁿ, n=0.60) y 2% (K=11.5 Pa.sⁿ, n= 0.34), la solución de xantana es similar en

pseudoplasticidad a PXDS 2% pero con valores 6 veces menor en el índice de consistencia.

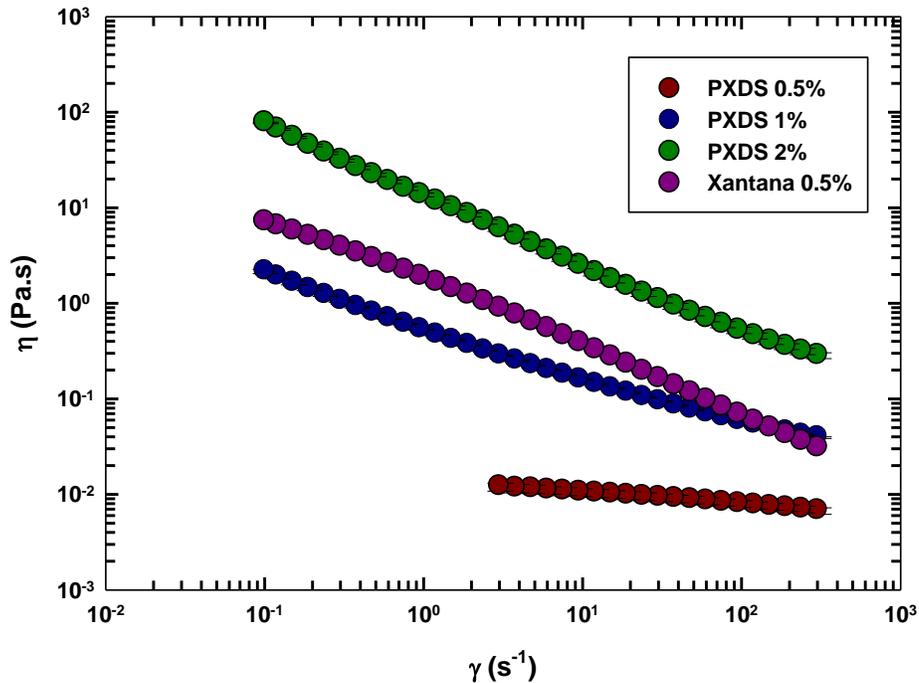


Figura 16. Comparación del comportamiento reológico de soluciones de PXDS en concentraciones de 0.5%, 1% y 2% con solución de xantana al 0.5%.

5.4.2 Pruebas de cizalla oscilatoria

En la Figura 17 se presenta la evolución de los módulos viscoelásticos G' y G'' con la temperatura, durante el enfriamiento de una solución de PXDS al 0.4% en presencia de 0.5 mM de CaCl_2 . Las determinaciones se realizaron bajo una frecuencia de oscilación constante de 1 rad/s manteniendo una torca constante de 10 μNm para no perturbar la posible gelificación de la muestra. En la figura se observa que al inicio de la prueba ($\sim 90^\circ\text{C}$) $G'' \gg G'$, el carácter viscoso predomina sobre el carácter elástico, característico de una solución sin entrecruzamientos entre macromoléculas. Alrededor de 72°C , $G' = G''$ ($\tan \delta \approx 1$), lo cual indica el inicio de la formación de red macromolecular o gel. A medida que desciende la temperatura G' incrementa hasta estabilizarse a temperatura ambiente (25°C)

mientras que G'' incrementa en menor medida. Al concluir el enfriamiento de la solución, $G' > G''$ en una orden de magnitud; lo cual se visualiza en los valores de $\tan \delta (=G''/G')$, parámetro que establece la relación entre el carácter viscoso o líquido y el carácter sólido. Algunos autores han definido la formación de un gel alimentario a partir de este parámetro. Un gel “fuerte” o “verdadero” tendrá valores de $\tan \delta < 0.1$, un gel suave o débil $0.1 < \tan \delta < 1$, mientras que valores de $\tan \delta > 1$ indican la ausencia de una red macromolecular o entrecruzamientos entre cadenas poliméricas (Clark y Ross-Murphy, 1987). Por lo tanto de acuerdo a la evolución de los módulos viscoelásticos y $\tan \delta$ con la temperatura, 0.4% PXDS en presencia de 5 mM de CaCl_2 gelifica alrededor de 72°C formando geles fuertes cuando las soluciones se enfrían a temperatura ambiente.

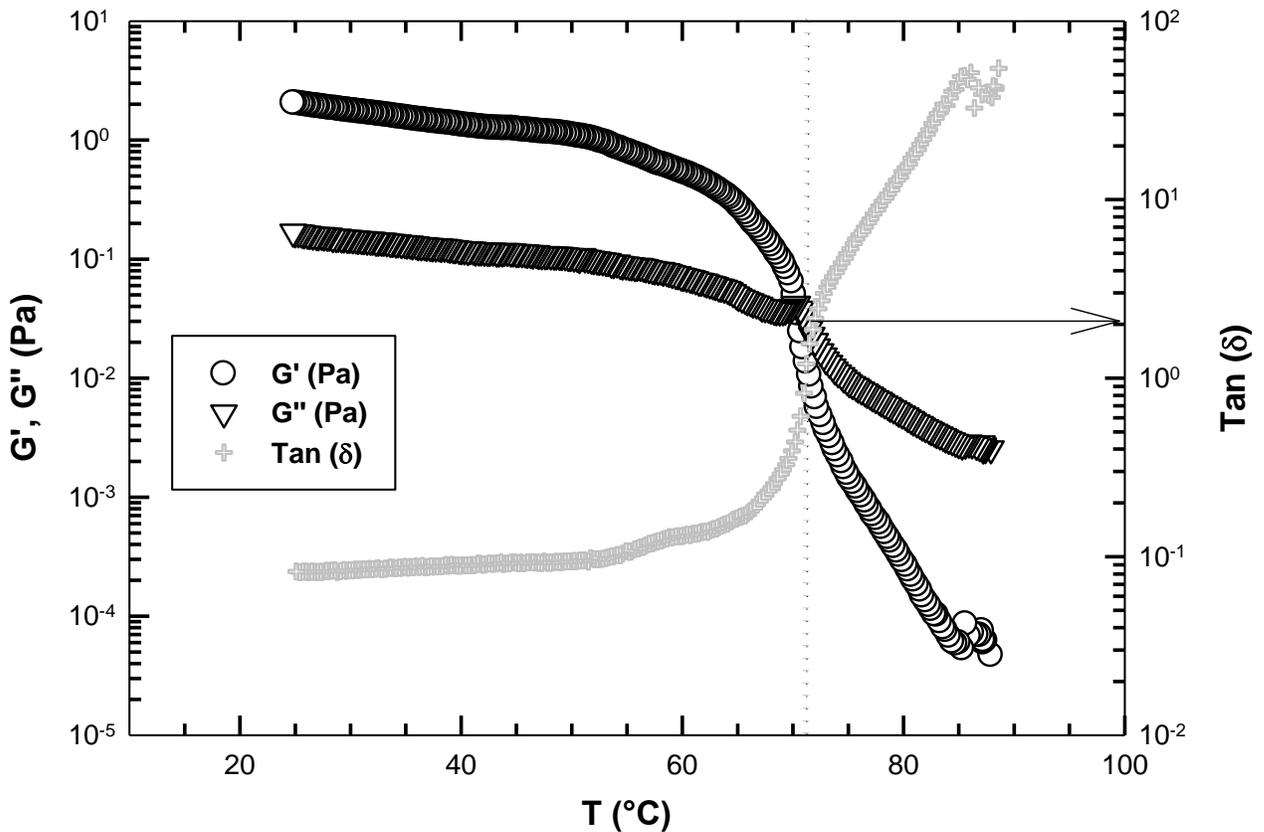


Figura 17. Evolución de los módulos dinámicos G' y G'' durante el enfriamiento de solución de PXDS al 0.4% (p/p) con CaCl_2 0.5 mM. Velocidad de enfriamiento $1^\circ\text{C}/\text{min}$, frecuencia constante de 1 rad/s, torque de 10 micro N.m.

El espectro mecánico dinámico de la solución 0.4% PXDS en presencia de 0.5 mM CaCl_2 a 25 °C se presenta en la Figura 17. Este reograma se obtuvo después de someter la muestra a un barrido de temperatura (Figura 17) y un barrido de tiempo manteniendo una torca constante mínima y una frecuencia de oscilación de 1 rad/s, con el finalidad de evaluar los módulos viscoelásticos del gel una vez concluido o estabilizado el proceso de gelificación. En el espectro de la Fig. 18 se observa que $G' > G''$ en todo el intervalo de frecuencia de oscilación, G' tiene baja dependencia con la frecuencia mientras que G'' incrementa con ésta. Los valores de $\tan \delta$ se presentan también en la figura y se observa que este parámetro presentó valores desde 0.05 hasta 0.29, lo cual caracteriza un gel suave, con tendencia a fluir al aumentar la frecuencia de oscilación.

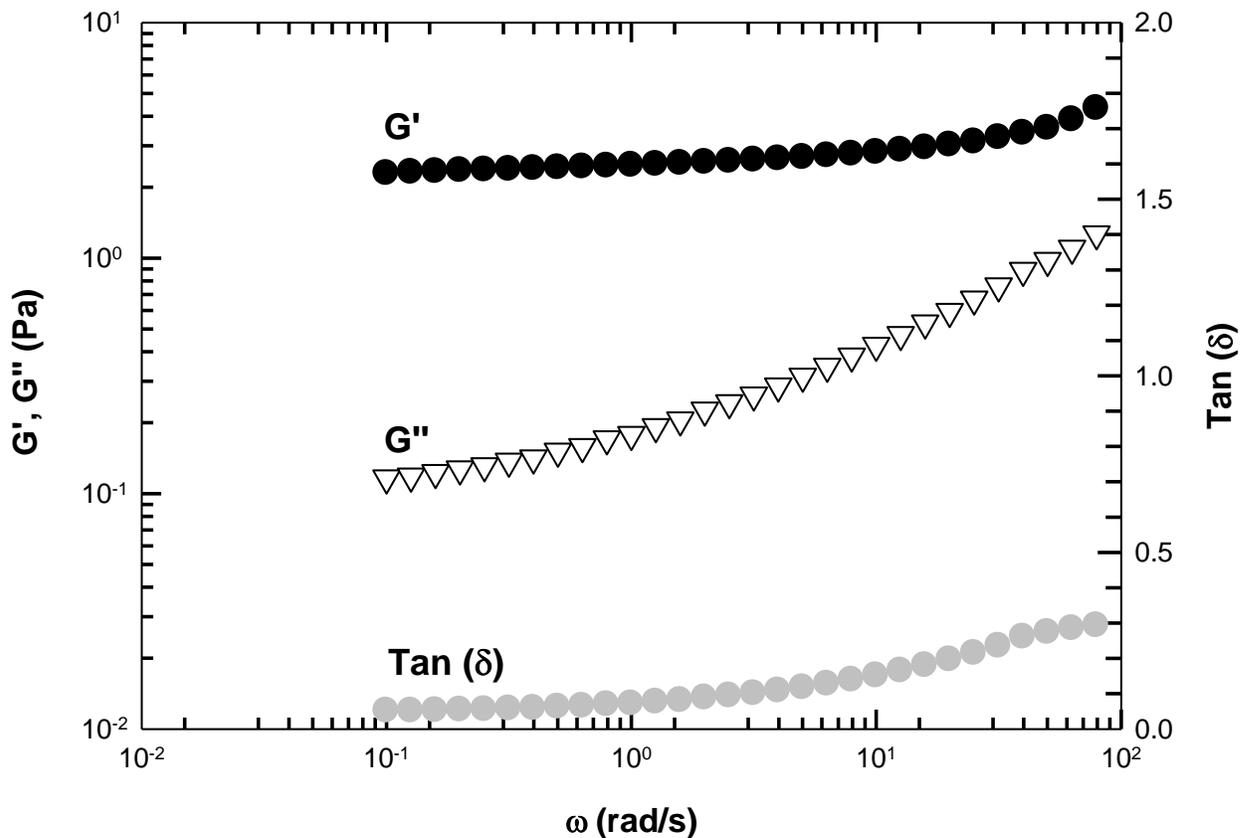


Figura 18. Evolución de los módulos dinámicos G' y G'' con respecto a la frecuencia de oscilación de soluciones de PDXS al 0.4%. Temperatura 25°C y torque 10 micro N.m.

Capítulo 6

Conclusiones y recomendaciones para futuros trabajos

6.1 Conclusiones

A partir de una extracción acuosa con EDTA se obtuvo un polisacárido péctico de la cáscara de xoconostle, del cual se obtuvo una fracción soluble y una insoluble rica en proteínas. El rendimiento de extracción en base seca fue del 5.07%, del cual el 26.3% corresponde a la fracción soluble.

La fracción soluble presentó 41.7% de ácido galacturónico y una composición de azúcares neutros en donde predomina ramnosa. La fracción soluble del polisacárido péctico (PXDS) presentó en solución, comportamiento no newtoniano que se ajustó satisfactoriamente al modelo de Ostwald de Waele, con valores de K de 0.015-11.5 y n de 0.86-0.34, en soluciones del 0.5 al 2%.

A través de pruebas de reológicas oscilatorias, se confirmó que el polisacárido soluble gelifica en presencia de calcio. PXDS al 0.4% con 0.5 mM CaCl_2 formó geles suaves con valores de $G' \approx 2-3$ Pa, $\tan \delta \approx 0.05-0.29$. Esta solución presentó una temperatura de gelificación $\approx 72^\circ\text{C}$.

6.2 Recomendaciones para futuras investigaciones

Proponer y evaluar diferentes métodos de extracción con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas (madurez del fruto, agitación, temperatura, tiempo, pH, etc.) que permitan obtener mayor rendimiento de polisacárido.

Continuar con estudios reológicos para caracterizar las propiedades viscoelásticas del polisacárido péctico de xoconostle, usando como variables de estudio la concentración de polímero, la concentración de calcio, pH y temperatura, entre otras.

Realizar estudios toxicológicos y de funcionalidad de este polímero, para proponerlo como aditivo alimentario.

Realizar estudios para identificar la especie y variedad de los frutos de xoconostle respecto al rendimiento y calidad de las pectinas obtenidas.

Capítulo 7

REFERENCIAS

7.1 Referencias bibliográficas

- Álvarez-Armenta, R., Peña-Valdivia, C.B. 2009. Structural polysaccharides in xoconostle (*Opuntia matudae*) fruits with different ripening stages. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 11, 26-44.
- Azcon-Bieto, J., Talón, M. 1993. Pared celular. Estructura y función. Editorial Interamericana McGraw-Hill. Madrid España, pp. 1-21.
- Badui, D. S. 2006. Química de los alimentos. Cuarta edición. Ed. Pearson Educación. México, pp. 92-97.
- Boatella, R. J. 2004. Química y Bioquímica de los Alimentos II. Ed. Universidad de Barcelona. Barcelona, España, pp. 111-115.
- Cárdenas, A., Goycoolea, F. M., Rinaudo, M., (2003). On the gelling behaviour of “nopal” (*Opuntia ficus-indica*) low methoxyl pectin, *Carbohydrate Polymers* 73, 212-222.
- Chang, K. C., Dhurandhar, N., You, X., Miyamoto, A. 1994. Cultivar/location and processing methods affect the quality of sunflower pectin. *Journal of Food Science*, 602, 49-59.
- Clark, A.H. y Ross-Murphy, S.B. 1987. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83, 57-192.
- Contreras-Esquivel, J. C., Espinoza-Pérez, J. D., Montañez, J. C., Charlez-Rodríguez, A. V., Renovato, J.; Aguilar C. N., Rodríguez-Herrera, R.; Wicker, L. 2007. Extraction and Characterization of Pectin from novel sources. *American Chemical Society*, 935, 215-229.
- Contreras-Esquivel, J. C., Voget, C. E., Vita, C. E., Espinoza-Pérez, J. D., Renard, C. M. 2006. Enzymatic extraction of lemon pectin by endo-poligalacturonase from *Aspergillus niger*. *Food Science and Biotechnology*, 15, 163-167.
- Cosgrove, D.J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 850-861.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

- Durán-Ávila, A. 2009. Un fruto versátil: El xoconostle, además de ser una delicia gastronómica funciona como planta medicinal. *El Universal*. Martes 28 de julio de 2009.
- Forni, E., Penci, M., Polesello, A. 1994. A preliminary characterization of some pectins from quince fruit (*Cydoniaoblonga* Mill.) and prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) peel. *Carbohydrate Polymers*, 23, 231-324.
- Gallegos-Vázquez, C., Cervantes-Herrera, J., Barrientos-Priego, A. F. 2005. Manual Gráfico para la Descripción Varietal del Nopal Tunero y Xoconostle (*Opuntia* spp.). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, pesca y Alimentación (SNICS-SAGARPA) y la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, México. 116 pp.
- García-Pedraza, L.G., Reyes-Agüero, J.A., Aguirre-Rivera. J.R., Pinos-Rodríguez J.M. 2005. Preliminary nutritional and organoleptic assessment of xoconostle fruit (*Opuntia* spp.) as a condiment or appetiezer. Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
- Gobierno del estado de Hidalgo. 2010. "Hidalgo en cifras". Secretaría de Desarrollo económico.
http://sedeco.hidalgo.gob.mx/descargas/Hidalgo_en_Cifras.pdf. Último acceso: 25 de septiembre de 2010.
- Goldberg, R., Morvan, C., Jauneau, A., Jarvis, M. C. 1996. Methyl-esterification, de-esterification and gelation of pectins in the primary cell wall. *Progression in Biotechnology*, 14, 561-568.
- Habibi, Y., Heyraud, A., Mahrouz, M., Vignon, M. R. 2004. Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research*, 339, 1119-1127.
- Handford, M. 2006. Biosynthesis of plant cell walls. *Ciencia e Investigación Agraria*, 33, 179-196.
- INFORURAL. Descubre INIFAP diversas propiedades nutricionales en la tuna de xoconostle. www.inforural.com.mx/spip.php?article55189. Último acceso 22 de junio de 2011.
- INIFAP. 2009. SIACON (Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta). <http://www.inifap.gob.mx/>. Último acceso: 20 de junio del 2011.
- Lira-Ortiz, A. L. 2009. Estudio químico y reológico de polisacáridos tipo pectina extraídos de la cáscara de tuna (*Opuntia* spp.). Tesis de Licenciatura.

- Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Lozada-Carbajal, M. A. 2007. Efecto de las condiciones de extracción en las propiedades reológicas de pectinas de la cáscara de tuna (*Opuntia* spp.). Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Majdoub, H., Roudesli, S., Dertrani, A. 2001a. Polysaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia ficus-indica*: extraction, characterization and polyelectrolyte behavior. *Polymers International*, 50, 552-560.
- Majdoub, H., Roudesli, S., Picton, L., Le Cerf, D., Muller, G., Grisel, M. 2001b. Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus-indica* physic-chemical study in dilute and semi-dilute solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46, 69-79.
- McCann, M. C., Roberts, K. 1991. Architecture of the primary cell wall. En: The cytoskeletal basis of plant growth and form. Londres C.W. Academia de Londres, pp 109-129.
- Medina-Torres, L., Brito-De La Fuente, E., Torrestiana-Sánchez, B. Katthain, R. 2000. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus-indica*). *Food Hydrocolloids*, 14, 417-424.
- Nieto, M. B. 2009. Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. En: Edible Films and Coatings for Food Applications. M. E. Embuscado, K. C. Huber (eds). Springer New York, 57-112.
- Ovodov, Y. S., 2009. Current views on pectin substances. *Russian Journal of Biorganic Chemistry*, 35, 269-284.
- Pilnik, W., Voragen, A. G. J. 1970. Pectic substances and other uronides. En: The biochemistry of fruits and their products. Volumen I, Editorial Humle, Academic Press. Londres, Inglaterra. 53-85.
- Reséndiz-Vega, F. 2010. Evaluación de las propiedades gelificantes de polisacáridos pécticos de tuna (*Opuntia* spp.) de potencial aplicación como aditivos alimentarios. Tesis de Licenciatura. Ingeniería en Alimentos. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. México.
- Rolin, C. 2002. Commercial pectin preparations. En: Pectins and their manipulation, G.B. Seymour, J.P. Knox (eds.), Blackwell Publishing CRC Press. Estados Unidos de América, pp 1-25.
- Schols, H. A., Voragen, A. G. J. 2002. The chemical structure of pectins. En: Pectins and their manipulation, G.B. Seymour, J.P. Knox (eds.), Blackwell Publishing CRC Press. Estados Unidos de América, pp 1-25.

-
- Seymour, G. B., Taylor, J. E., Tucker, G. A. 1993. Biochemistry of fruit ripening. Chapman and Hall. Cambridge Gran Bretaña, pp 17-24.
- Thygesen, L. G., Løkke, M. M., Micklander, E., Engelsen, S. B. 2003. Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 50-57.
- Velasco, E. C. 2010. Descubre el INIFAP importantes aportes nutritivos del xoconostle. Periódico La Jornada. Recuperado el 20 de junio del 2011 de <http://www.jornada.unam.mx/2010/03/01/sociedad/040n2soc>.
- Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J.-F., Axelos, M. A. V., Renard, C. M. G. C. 1995. Pectins. En: Food Polysaccharides and their Applications. Stephen, A.M. New York, Marcel Dekker: 287-339.