



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**EFFECTO DEL TERMOULTRASONIDO SOBRE LA
EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SEMILLAS DE TUNA
(*Opuntia ficus indica*) Y SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
Y ANTIMICROBIANA**

T E S I S

Que para obtener el título de

Licenciada en Nutrición

P R E S E N T A

P.L.N. María de los Angeles Ortega Ortega

Bajo la Dirección de:

Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino

Pachuca de Soto, Hgo., Marzo 2016



Índice general

| | |
|---|------|
| LISTADO DE ABREVIATURAS | IV |
| LISTADO DE FIGURAS | V |
| LISTADO DE TABLAS | VI |
| RESUMEN | VII |
| ABSTRACT | VIII |
| I. MARCO TEÓRICO | 1 |
| 1.1. <i>OPUNTIA FICUS INDICA</i> | 1 |
| 1.2. TUNA..... | 2 |
| 1.2.1. Descripción morfológica de la tuna..... | 2 |
| 1.2.2. Distribución y condiciones climáticas..... | 4 |
| 1.2.3. Producción y comercialización | 5 |
| 1.2.4. Usos | 6 |
| 1.2.5. Composición de la tuna | 7 |
| 1.2.6. Efectos funcionales de la tuna..... | 8 |
| 1.3. SEMILLAS DE TUNA..... | 9 |
| 1.3.1. Descripción morfológica de las semillas de tuna | 10 |
| 1.3.2. Composición de las semillas de tuna..... | 12 |
| 1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES DE SEMILLAS | 19 |
| 1.4.1. Extracción por métodos no tradicionales | 20 |
| 1.5. ULTRASONIDO | 20 |
| 1.5.1. Extracción de aceite por ultrasonido..... | 22 |
| 1.5.2. Termoultrasonido..... | 23 |
| 1.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE ALGUNOS ACEITES DE SEMILLAS | 24 |
| 1.6.1. Actividad antioxidante..... | 24 |
| 1.6.2. Actividad antimicrobiana..... | 26 |

| | |
|---|----|
| II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN..... | 28 |
| III. JUSTIFICACIÓN..... | 29 |
| IV. OBJETIVOS..... | 30 |
| 4.1. OBJETIVO GENERAL | 30 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 30 |
| V. HIPÓTESIS..... | 31 |
| VI. DISEÑO METODOLÓGICO | 32 |
| 6.1. OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA..... | 32 |
| 6.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA | 33 |
| 6.3. DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE DE HUMEDAD..... | 33 |
| 6.4. EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SEMILLAS DE TUNA..... | 34 |
| 6.4.1. Extracción de aceite por termoultrasonido..... | 34 |
| 6.4.2. Extracción de aceite de semillas de tuna por métodos convencionales | 36 |
| 6.4.2.2. Método de maceración..... | 37 |
| 6.4.3. Determinación del rendimiento de aceite..... | 38 |
| 6.5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE..... | 38 |
| 6.5.1. Determinación por ABTS | 38 |
| 6.5.2. Determinación por DPPH | 39 |
| 6.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA | 40 |
| 6.6.1. Obtención de cultivos microbianos | 40 |
| 6.6.2. Determinación de la cuenta viable..... | 40 |
| 6.6.3. Inoculación | 41 |
| 6.6.4. Evaluación de actividad antimicrobiana y determinación de la concentración mínima inhibitoria | 41 |
| 6.7. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO | 42 |
| 6.8. DISEÑO EXPERIMENTAL | 43 |
| 6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 45 |
| VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 46 |

| | |
|---|----|
| 7.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD | 46 |
| 7.2. RENDIMIENTO DEL ACEITE EXTRAÍDO POR TERMOULTRASONIDO | 46 |
| 7.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE EXTRAÍDO POR TERMOULTRASONIDO | 48 |
| 7.4. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DE TERMOULTRASONIDO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE SEMILLAS DE TUNA | 49 |
| 7.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SEMILLAS DE TUNA POR TERMOULTRASONIDO | 52 |
| 7.6. REPRODUCIBILIDAD DEL MODELO | 53 |
| 7.7. COMPARACIÓN DEL RENDIMIENTO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE OBTENIDO POR LOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN | 53 |
| 7.7.1. Rendimiento de extracción | 54 |
| 7.7.2. Actividad antioxidante | 57 |
| 7.7.3. Actividad antimicrobiana | 61 |
| 7.8. EFECTO DE LA TERMOULTRASONICACIÓN SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA SEMILLA DE TUNA VERDE EVALUADO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO | 65 |
| VIII. CONCLUSIONES | 68 |
| IX. RECOMENDACIONES | 70 |
| X. REFERENCIAS | 71 |
| XI. ANEXOS | 87 |

Listado de abreviaturas

| | |
|----------------------------------|---|
| ABTS | 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) |
| DPPH | 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl |
| MEB | Microscopía electrónica de barrido |
| SEM | Scanning electron microscopy |
| °Brix | Grados Brix |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| Pa/-s | Pascal por segundo |
| meq O ₂ /kg de aceite | Miliequivalente de oxígeno por kilogramo de aceite |
| UFC | Unidades formadores de colonias |
| g(I ₂)/100 g | Gramos de yodo por cien gramos |
| mg KOH/g de aceite | Miligramos de hidróxido de potasio por gramo de aceite |
| ppm | Partes por millón |
| v/v | Volumen volumen |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| mM | Milimolar |
| mgEAA/100 g | Miligramos de equivalentes de ácido ascórbico por cien gramos |
| μmolET/100 g | Micromol de equivalentes de trólox por cien gramos |
| OH ⁻ | Grupo hidroxilo |
| H ⁺ | Catión hidrógeno |

Listado de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación mesoamericana de la <i>Opuntia ficus indica</i> | 1 |
| Figura 2. Fruto de la <i>Opuntia ficus indica</i> | 3 |
| Figura 3. Distribución de la tuna en el mundo..... | 4 |
| Figura 4. Estados de la República Mexicana productores de tuna..... | 5 |
| Figura 5. Municipios del Estado de Hidalgo productores de tuna..... | 6 |
| Figura 6. Semillas de la tuna de <i>Opuntia ficus indica</i> | 10 |
| Figura 7. Semilla de tuna de <i>Opuntia ficus indica</i> | 11 |
| Figura 8. Esquema del diseño experimental..... | 32 |
| Figura 9. Procesador de ultrasonidos..... | 35 |
| Figura 10. Sistema universal de extracción de grasas..... | 36 |
| Figura 11. Efectos de los tratamientos de termoultrasonificación sobre la actividad antioxidante del aceite de semilla..... | 50 |
| Figura 12. Condiciones óptimas de la termoultrasonificación para la extracción de aceite de semillas con elevada actividad antioxidante..... | 52 |
| Figura 13. Rendimiento de extracción de aceite por los diferentes métodos de extracción..... | 54 |
| Figura 14. Actividad antioxidante por la determinación de ABTS del aceite de semilla de tuna extraído por los diferentes métodos..... | 58 |
| Figura 15. Actividad antioxidante por la determinación de DPPH del aceite de semilla de tuna extraído por los diferentes métodos..... | 59 |
| Figura 16. Micrografías de la estructura del polvo de la semilla de tuna..... | 66 |

Listado de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Composición fisicoquímica de la tuna verde. | 7 |
| Tabla 2. Parámetros físicos de las semillas de tuna. | 11 |
| Tabla 3. Análisis proximal de las semillas de tuna. | 12 |
| Tabla 4. Composición mineral de las semillas de tuna. | 13 |
| Tabla 5. Contenido de fenoles y flavonoides de las semillas de la tuna. | 14 |
| Tabla 6. Características fisicoquímicas del aceite de semillas de tuna. | 15 |
| Tabla 7. Composición de ácidos de grasos del aceite de semilla de tuna. | 16 |
| Tabla 8. Perfil de vitaminas liposolubles y esteroides del aceite de semillas de tuna. | 18 |
| Tabla 9. Tratamientos obtenidos del diseño experimental compuesto central rotatorio para el método de termoultrasonido. | 44 |
| Tabla 10. Rendimiento del aceite recuperado de semillas de tuna extraído por termoultrasonido. | 47 |
| Tabla 11. Actividad antioxidante del aceite de semillas de tuna extraído por termoultrasonido bajo diferentes condiciones. | 48 |
| Tabla 12. Coeficientes de regresión de las condiciones de extracción por termoultrasonido sobre la actividad antioxidante. | 51 |
| Tabla 13. Reproducibilidad del modelo de superficie de respuesta | 53 |
| Tabla 14. Actividad antimicrobiana del aceite de semillas de tuna extraído por los diferentes métodos. | 62 |
| Tabla 15. Concentración mínima inhibitoria del aceite de semillas de tuna obtenido por los diferentes métodos de extracción. | 65 |

Resumen

Las semillas de tuna han sido poco estudiadas, al igual que el aceite que se obtiene de éstas y las propiedades benéficas que poseen. Existen tecnologías diferentes a las tradicionales, como el ultrasonido, para la extracción de aceites, que mejoran su rendimiento y las propiedades bioactivas que estos presentan. Sin embargo, no hay evidencia científica que indique las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del aceite de semillas de tuna, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del termoultrasonido sobre la extracción de aceite de semilla de tuna y su actividad antioxidante y antimicrobiana. La extracción del aceite se realizó por los métodos de Soxhlet, maceración y termoultrasonido. Se comparó rendimiento de extracción, actividad antioxidante por ABTS y DPPH, y actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* de los aceites obtenidos por los tres métodos, y se evaluó el efecto de termoultrasonificación sobre la semilla por MEB. Se obtuvo que el aceite termoultrasonificado presentó un rendimiento similar al de maceración y menor al de Soxhlet, pero recuperado en un menor tiempo. En términos de actividad antioxidante por ABTS, el aceite por Soxhlet presentó un valor mayor que los recuperados por termoultrasonido y maceración. Por DPPH, el aceite extraído por termoultrasonido mostró mayor actividad antioxidante que el obtenido por maceración. El aceite presentó actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, sin obtener diferencias significativas entre los métodos de extracción. La MEB exhibió los cambios causados en las estructuras de la semilla por la sonicación, y se observó que después del tratamiento con termoultrasonido no habían estructuras integrales de la semilla, por lo que este método pudo mejorar la extracción del aceite. La termoultrasonificación es un método eficiente para extraer aceite en menor tiempo permitiéndole conservar sus propiedades bioactivas, facilitando su utilización como aditivo alimenticio.

Palabras clave: Aceite, antimicrobiano, antioxidante, extracción, semillas de tuna, termoultrasonido.

Abstract

Cactus pear seeds have been little studied, like the oil obtained from these and the beneficial properties that it has. There are different technologies to the traditional, such as ultrasound, to extract oils, which enhance its yield and bioactive properties that these present. However, there is no scientific evidence to indicate the antioxidant and antimicrobial properties of cactus pear seed oil, so the objective of this study was to evaluate the effect of thermoultrasound on cactus pear seed oil extraction and its antioxidant and antimicrobial activity. Oil extraction was performed by Soxhlet, maceration and thermoultrasound methods. Extraction yield, antioxidant activity by ABTS and DPPH and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* of oils recovered by three methods were compared, and the effect of thermoultrasonication on seed was evaluated by SEM. Oil obtained by thermoultrasound showed similar yield by maceration extraction and less than Soxhlet extraction, but recovered in less time. In terms of antioxidant activity by ABTS, oil acquired by Soxhlet showed a higher value than it recovered by thermoultrasound and maceration extractions. For DPPH, oil extracted by thermoultrasound showed higher antioxidant activity than maceration extraction. Oil presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, without obtaining significant differences between extraction methods. SEM exhibited changes caused on seed structures by sonication, and it was observed that after treatment with thermoultrasound had no integrity structures of seed, so this method could enhance oil extraction. Thermoultrasound is an efficient method to extract oil in less time allowing it retains its bioactive properties facilitating its use as food additive.

Keywords: oil, antimicrobial, antioxidant, extraction, cactus pear seed, thermoultrasound.

I. Marco teórico

1.1. *Opuntia ficus indica*

Opuntia ficus indica es una planta arbustiva conocida como nopal, pertenece al género *Opuntia* de la familia *Cactaceae* (DGAPEAS, 2011). Es una especie nativa del continente americano (Medina – Torres y col., 2008), su registro data desde los viajes de los españoles al nuevo continente, quienes llevaron esta planta a España como muestra de su hallazgo (Kiesling, 2013). Evidencia arqueológica revela que las civilizaciones mesoamericanas, azteca y maya, ya cultivaban esta planta como fuente de alimento (Griffith, 2004; Sáenz, 2013a), en la Figura 1 se observa la representación prehispánica de esta planta.

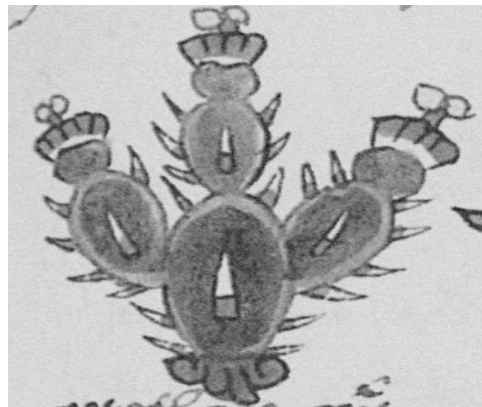


Figura 1. Representación mesoamericana de *Opuntia ficus indica* (Griffith, 2004).

Se cree que derivó de *Opuntia amyclae* u *Opuntia megacantha*, distribuidas en la región centro – norte de México (Reyes – Agüero y col., 2005). Los géneros y especies descritas hasta la fecha van de 125 – 250 y de 1,500 – 2,000, respectivamente (FIA, 2011; Kaur y col., 2012). En México se reconocen cerca de 104 especies, siendo endémicas alrededor de 60 (Prieto – García y col., 2006; DGAPEAS, 2011). Como otras plantas del género *Opuntia*, *Opuntia ficus indica* se caracteriza por los segmentos o cladodios en los que se divide, que son tallos capaces de ramificarse, emitiendo flores y frutos (Reyes – Agüero y col., 2005; DGAPEAS, 2011).

1.2. Tuna

La tuna es el fruto que crece del nopal, cuya forma, tamaño y color son muy variables (FIA, 2011). El nombre náhuatl precolombino fue *Tencchtli* (Tenochtli) que significa “Nopal divino” (Reyes – Agüero y col., 2005), pero también es conocido como *higo de los moros* en Portugal, *cactus de las misiones* en Estados Unidos, *sabra* en Israel y *palma forrageira* en Brasil (Pereira y col., 2014), a pesar de ello México registra la mayoría de los nombres comunes, relacionados con las características del fruto; el nombre de “tuna” es el más común en el mundo (Reyes – Agüero y col., 2005).

México tiene la mayor diversidad y abundancia de especies y cultivares de tuna a nivel mundial (Bensadón y col., 2010), entre las variedades más comunes están Reyna, Rojo Pelón, Esmeralda (FIA, 2011), Naranjona, Cardona, Camuesa, Roja Lisa, Liria (Yahia y Mondragon – Jacobo, 2011) y Alfajayucan (Bensadón y col., 2010).

1.2.1. Descripción morfológica de la tuna

La tuna es una baya de forma oval, elíptica o cilíndrica, aunque algunas veces esférica, que tiene un tamaño promedio de 7 – 9 cm de largo, 5 – 8 cm de ancho y con un peso aproximado de 86 – 200 g (Figura 2a; SAGARPA, 2005; Labuschagne y Hugo, 2010).

Como otras frutas, la tuna está integrada por tres estructuras principales que determinan su calidad, la pulpa, una gran cantidad de semillas inmersas en ésta y una capa externa que la recubre llamada cáscara.

La cáscara es una corteza de mayor dureza que protege al fruto (Figura 2b; Cerezal y Duarte, 2005). Su grosor varía de entre 2 – 4 mm, contiene alrededor de 51 – 69 aréolas (Reyes – Agüero y col., 2005; FIA, 2011) y abarca aproximadamente del 33 al 55 % del peso total del fruto (Aguirre y col., 2013), también es conocida como pericarpio y entre menor peso tenga, mayor será la calidad de la tuna (Cerezal y

Duarte, 2005; FIA, 2011). Existe una capa más externa y delgada que cubre a la cáscara denominada piel (Cerezal y Duarte, 2005), en la cual se encuentran las espinas que pudieran presentarse en el fruto. La cáscara frecuentemente se presenta en una gama de colores que van del amarillo hasta el rojo púrpura (Reyes – Agüero y col., 2005).

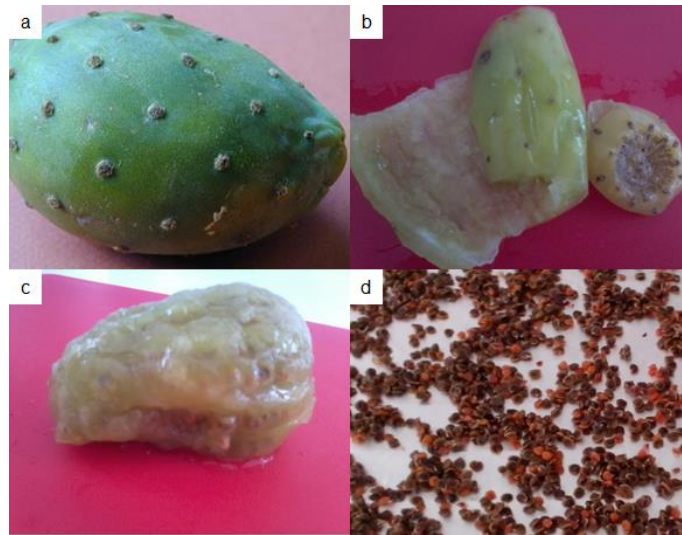


Figura 2. Fruto de *Opuntia ficus indica*; **a:** Tuna y sus principales estructuras **b:** Cáscara; **c:** Pulpa; **d:** Semillas.

La pulpa es la parte carnosa de la tuna (Figura 2c; Cerezal y Duarte, 2005) que abarca del 60 al 70 % del peso total de la fruta (Labuschagne y Hugo, 2010). Compuesta mayoritariamente de agua (alrededor de un 83 %) y tiene insertas a las semillas. La pulpa presenta el mismo color que la cáscara, pero a diferencia de ésta, su color es brillante (Cerezal y Duarte, 2005), cambiando de tonalidades dependiendo del cultivo, debido a la presencia de pigmentos solubles en el agua, tal como betacianinas (morado – rojo) y betaxantinas (amarillo – naranja) (Gurrieri y col., 2000); y su sabor es ligeramente dulce a muy dulce (Reyes – Agüero y col., 2005; FIA, 2011).

Por último están las semillas, las cuales se encuentran inmersas en la pulpa y pueden encontrarse de entre 100 a más de 400 por cada tuna (Figura 2d; Cerezal y Duarte, 2005).

1.2.2. Distribución y condiciones climáticas

La tuna es nativa de las regiones áridas y semiáridas del continente americano, distribuida desde el norte de Canadá hasta el sur de Chile (Méndez y García, 2006). Ha sido introducida y adaptada en otros lugares de clima seco y cálido, como África, algunas partes de Asia (Yahia y Mondragon – Jacobo, 2011), Australia (Sumaya – Martínez y col., 2011) y a través del Mediterráneo (Figura 3; Al – Juhaimi y Özcan, 2013; Pereira y col., 2014), incluyendo microhábitats que son secos periódicamente, como playas, sitios rocosos y lugares tropicales de estos países (Lozano, 2011).



Figura 3. Distribución de la tuna en el mundo.

Este fruto se ha adaptado bien a condiciones climáticas restringidas en cuanto a recursos hídricos, incluso en lugares con lluvias erráticas (Bensadón y col., 2010), es resistente a altas (60 °C) y bajas temperaturas (- 40 °C) dependiendo de la edad de la planta (Lozano, 2011); y otros aspectos medioambientales (Cerezal y Duarte, 2005; Jiménez – Aguilar y col., 2014).

Actualmente la tuna se encuentra en casi todos los continentes, en forma silvestre o de manera cultivada (Kgatla y col., 2010; Yahia y Mondragon – Jacobo, 2011), e incluso algunas de las especies han sido naturalizadas en ciertos países (FIA, 2011), debido a las modificaciones realizadas por el hombre para su producción y comercialización (Reyes – Agüero y col., 2005).

1.2.3. Producción y comercialización

La producción de la tuna es la principal finalidad del cultivo de las *Opuntias* en la mayoría de los países, siendo México e Italia quienes lideran a cerca de 30 países a nivel mundial (Lozano, 2011; Jiménez – Aguilar y col., 2014), entre los cuales destacan Chile, Argentina, Bolivia, Perú, Colombia, Estados Unidos, Sudáfrica, Marruecos, Argelia, Libia, Túnez, Egipto, Jordania, Paquistán, Israel, Grecia, España y Portugal. No obstante México, Italia, Sudáfrica, Chile, Israel y Estados Unidos acuden al mercado internacional (DGAPEAS, 2011; FIA, 2011).

México es el principal productor de tuna, y cuenta con más del 45 % (308,000 toneladas aproximadamente) de la producción a escala mundial (Jolalpa y col., 2011), siendo sólo el 1.5 % de esta producción exportada (Sumaya – Martínez y col., 2011). Ocupa una superficie aproximada de 65,000 hectáreas para la producción, concentrándose en tres regiones: región sur: Puebla y Oaxaca; región centro: Estado de México e Hidalgo; y región centro – norte: Guanajuato, Jalisco, Aguascalientes, San Luis Potosí y Zacatecas (Figura 4), siendo Hidalgo el estado que produce un 8.1 % de la producción nacional (Jolalpa y col., 2011).



Figura 4. Estados de la República Mexicana productores de tuna.

Las principales dos regiones productoras de tuna en Hidalgo son: El Valle del Mezquital (Actopan, El Arenal, Ajacuba, Ixmiquilpan, Huichapan y Francisco I. Madero) y el Altiplano hidalguense (Zempoala, Epazoyucan, Villa de Tezontepec,

San Agustín Tlaxiaca, Singuilucan, Apan y Tlanalapa), donde es producida para consumo como fruto fresco (Figura 5; Jolalpa y col., 2011).

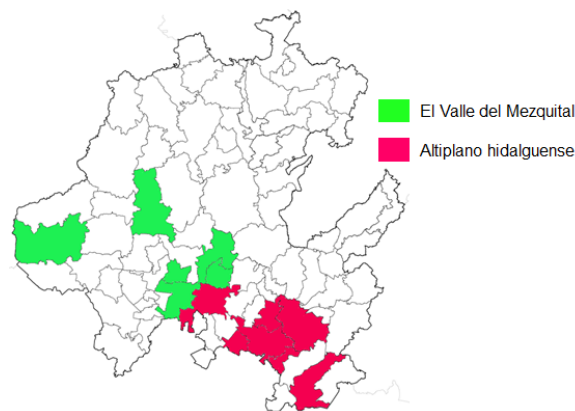


Figura 5. Municipios del Estado de Hidalgo productores de tuna.

1.2.4. Usos

La tuna ha sido ampliamente utilizada en México y en otros países, principalmente como alimento humano (Saenz, 2000; Chougui y col., 2013), forraje o alimento para la crianza de animales y como materia prima para la realización de productos de interés de la industria alimentaria (Prieto y col., 2008).

Este fruto es consumido principalmente como fruto fresco (Medina – Torres y col., 2008; Bensadón y col., 2010; Ochoa y Guerrero, 2012), siendo más alto su consumo en época de verano, incluso más que otros frutos, como la naranja y el plátano (Yahia y Mondragon – Jacobo, 2011). También ha sido utilizado en un amplio rango de productos hechos en casa, pequeñas empresas o a nivel industrial (Kabas y col., 2006), como jugos, néctares, helados, mermeladas, jarabes, jaleas, fruta seca, laminillas de pulpa, dulces cristalizados, queso, bebidas alcohólicas y vinos (Gurrieri y col., 2000; Saenz, 2000; Lozano, 2011; Sáenz, 2013c).

En la medicina tradicional e industria farmacéutica la tuna también ha sido utilizada, debido a la composición fisicoquímica que presentan algunos de sus componentes (Kabas y col., 2006).

1.2.5. Composición de la tuna

La composición fisicoquímica de la tuna (Tabla 1) varía dependiendo de una gran diversidad de factores, incluyendo el estado de madurez de la fruta, e incluso los cultivares (Sáenz, 2013b). Se sabe que contiene un amplio parámetro de sustancias, las cuales se ha sugerido que son importantes para la salud humana (Gurrieri y col., 2000; Yahia y Mondragon – Jacobo, 2011).

Tabla 1. Composición fisicoquímica de la tuna verde.

| Parámetro | Cantidad |
|------------------------------------|--------------------------|
| Sólidos solubles (°Brix) | 12 – 17 ¹ |
| pH | 5.3 – 7.1 ¹ |
| Acidez titulable (% ácido cítrico) | 0.01 – 0.18 ¹ |
| Viscosidad (mPa s) | 73.9 ¹ |
| Humedad (%) | 83.8 ⁴ |
| Componente | g/100 g |
| Proteína | 0.82 ⁴ |
| Lípidos | 1.14 ³ |
| Fibra | 0.23 ⁴ |
| Cenizas | 0.44 ⁴ |
| Azúcares totales | 14.06 ⁴ |
| Vitamina C (mg/100g) | 20.33 ⁴ |
| Pectina | 0.22 ² |
| β – caroteno (mg/100g) | 0.53 ⁴ |
| Mineral | mg/100 g |
| Calcio | 12.8 ⁴ |
| Magnesio | 16.1 ⁴ |
| Hierro | 0.4 ⁴ |
| Sodio | 0.6 ⁴ |
| Potasio | 217 ⁴ |
| Fósforo | 32.8 ⁴ |

¹Saenz, 2000; ²Cerezal y Duarte, 2005; ³Bensadón y col., 2010; ⁴Sáenz, 2013b.

El agua es el principal componente de la tuna, debido a que es valiosa en las regiones áridas y semiáridas, es protegida por la piel, ya que es gruesa y contiene mucilago, éste se une con el agua y ayuda a prevenir la deshidratación de la fruta (Sáenz, 2013b). Es rica en carbohidratos digeribles, principalmente glucosa y fructosa, fibra dietética y minerales, y es baja en proteínas y grasa (Bensadón y col., 2010).

Las variaciones en la composición de la tuna podrían ser atribuidas a la localización de las plantas, la agronomía del cultivo, la aplicación de fertilizantes, el uso de irrigación, el clima y las diferencias genéticas entre las variedades. Las variaciones en el contenido de algunos minerales pueden ser debidas a los diferentes países (Sáenz, 2013b), es decir, depende de los minerales encontrados en el suelo (Lozano, 2011).

Entre los compuestos funcionales, los cuales tienen efectos benéficos para la salud, encontrados en la tuna, destacan la fibra, hidrocoloides (mucilagos), pigmentos (betalaínas y carotenoides), minerales (calcio y potasio), algunas vitaminas como la vitamina C y los compuestos fenólicos (FIA, 2011; Ochoa y Guerrero, 2012), que le confieren características de un alimento funcional, por lo que a la presencia de estos compuestos, se le atribuye los efectos funcionales que posee el fruto, y razón por la cual la tuna ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional.

1.2.6. Efectos funcionales de la tuna

En México, la tuna también es utilizada en la medicina tradicional contribuyendo favorablemente a la salud humana (Gurrieri y col., 2000; Cai y col., 2008; Yahia y Mondragon – Jacobo, 2011), se usa como agente terapéutico por las propiedades bioactivas que se han descrito en varios estudios realizados (Ramadan y Mörsel, 2003; Guevara, 2009; Liu y col., 2009; Jun y col., 2013; Rabhi y col., 2013).

Se ha demostrado que extractos de tuna presentan actividad antioxidante (Guevara, 2009; Kaur y col., 2012; Bhatt y Nagar, 2013), debido a su alto contenido de ácido ascórbico, compuestos fenólicos, flavonoides, pigmentos betalaínicos, entre otros (Sumaya – Martínez y col., 2011; Ochoa y Guerrero, 2012 Jun y col., 2013; Zafra – Rojas y col., 2013); los cuales son capaces de inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno, quienes actúan rompiendo las membranas de las células (Guevara, 2009; Kaur y col., 2012). En estudios realizados en humanos se ha

demostrado que el consumo de tuna decrece el daño oxidativo, de lípidos principalmente (Ramadan y Mörsel, 2003; Rabhi y col., 2013).

Los extractos de tuna habían sido utilizados en la medicina tradicional mexicana, principalmente en la cicatrización de heridas y para disminuir algunos dolores (Gurrieri y col., 2000; Cai y col., 2008; Guevara, 2009), ya que se conoce que estos extractos tienen un efecto analgésico y antiinflamatorio, debido a que contienen ácido acetil salicílico, el cual tiene la capacidad de causar dichos efectos (Guevara, 2009; Kaur y col., 2012).

Los usos terapéuticos han sido modificados al paso del tiempo, debido a nuevas investigaciones realizadas, actualmente se sabe que los compuestos extraídos de la tuna tienen actividad contra la aparición de úlceras, control de la gastritis, efecto hipoglucemiante, hipolipídico e hipocolesterolémico, así como también efecto diurético y antiúrico, contra daño hepático y actividad inmunomoduladora (Gurrieri y col., 2000; Ramadan y Mörsel, 2003; Guevara, 2009; Kaur y col., 2012). Una parte de estos compuestos son obtenidos de las semillas de la tuna (Ennouri y col., 2006).

1.3. Semillas de tuna

Además de que se han realizado varios estudios de investigación sobre la composición química de la pulpa y la cáscara de la tuna, también se han realizado investigaciones acerca de las semillas de este fruto, en menor grado.

Las semillas constituyen alrededor del 3 al 15 % de la pulpa de la tuna, dependiendo principalmente del lugar en el que son cultivadas (Ramadan y Mörsel, 2003; SAGARPA, 2005; Labuschagne y Hugo, 2010; Chougui y col., 2013; Zine y col., 2013); y son usualmente descartadas como desecho después de extraer la pulpa (Bhatt y Nagar, 2013).

Existe una estrecha relación entre el número de semillas y el peso del fruto, indicando que a mayor tamaño del fruto hay un mayor número de semillas (FIA,

2011), así como la relación peso del fruto y peso de la pulpa, esto es debido a que las semillas originan la pulpa (SAGARPA, 2005). Hay cerca de 3.5 g de semillas en 100 g de pulpa de tuna, dependiendo de las condiciones bajo las cuales son cultivadas (Cerezal y Duarte, 2005).

1.3.1. Descripción morfológica de las semillas de tuna

Las semillas de la tuna presentan una forma que va de lenticuladas a elipsoide, generalmente son pequeñas de aproximadamente 3 – 4.5 mm de longitud, 3.2 – 3.8 mm de ancho, de 1.2 – 1.6 mm de grosor y 96 – 253 kg de dureza (Figura 6; Reyes – Agüero, 2005).

El número de semillas depende del número inicial de óvulos, la eficiencia de polinización y de los cultivos (SAGARPA, 2005). Las semillas de una tuna pueden ser abortivas y normales (Figura 6; Cerezal y Duarte, 2005; SAGARPA, 2005; FIA, 2011).

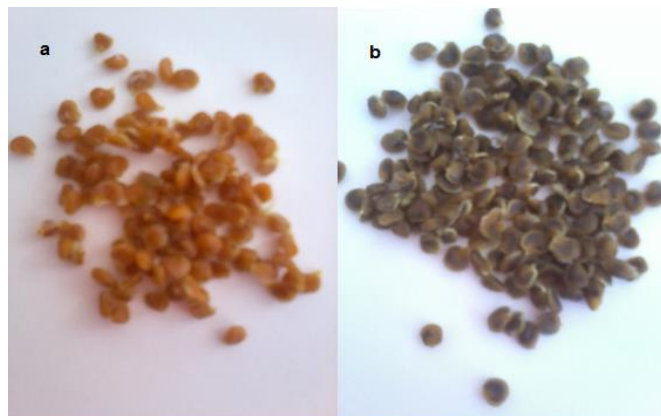


Figura 6. Semillas de la tuna de *Opuntia ficus indica*. **a:** semillas abortivas; **b:** semillas normales.

Las semillas abortivas, en un fruto maduro, son pequeñas, de color pardo claro, originadas de la falta temprana de desarrollo embrionario, constituyen del 35 – 40 % del total de las semillas y se caracterizan por que su envoltura folicular es capaz de desarrollar pulpa (Cerezal y Duarte, 2005; SAGARPA, 2005; FIA, 2011), en

comparación con las semillas normales que son de mayor tamaño y de color oscuro (FIA, 2011). La relación entre semillas abortivas y normales es uno de los parámetros más importantes para definir la calidad del fruto (SAGARPA, 2005).

En la micrografía de sección transversal (Figura 7), se muestra que las semillas de tuna consisten en dos diferentes tejidos principalmente, el endospermo y el pericarpio. El pericarpio corresponde de 90 – 95 % del total de la semilla (Habibi y col., 2008).

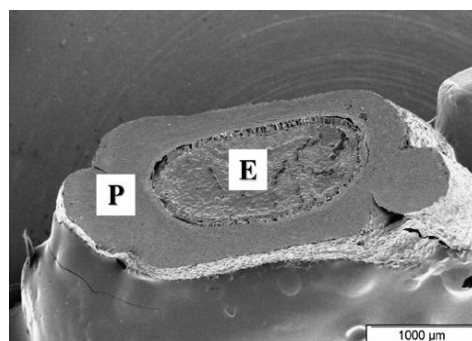


Figura 7. Semilla de tuna de *Opuntia ficus indica*, **E:** endospermo, **P:** pericarpio (Habibi y col., 2008).

Estudios realizados indican que las semillas de tuna de *Opuntia ficus indica* tienen un peso bajo en comparación con otras especies de *Opuntia* (*O. heliabravoana* y *O. xocoonstle*), ya que las semillas de tuna de *Opuntia ficus indica* presentan valores bajos de densidad peso hectolitro y densidad peso mil granos, indicando que es blanda, porosa y más voluminosa (Prieto – García y col., 2006), tal como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros físicos de las semillas de tuna.

| Parámetro | Cantidad |
|---|----------|
| Peso de 100 semillas (g) | 1.38 |
| Densidad peso hectolitro (kg·hL ⁻¹) | 55.97 |
| Densidad peso mil granos (g·1000 granos ⁻¹) | 13.43 |
| Densidad por índice de flotación (%) | 23.21 |
| Dureza por abrasión (%) | 7.59 |
| Volumen del grano (mm ³) | 28.70 |

Ennouri y col., 2005 y Prieto – García y col., 2006.

1.3.2. Composición de las semillas de tuna

La composición de las semillas de tuna no es muy diferente a la de otras semillas de frutos, sin embargo varía dependiendo del origen y cultivo de la tuna (Ramadan y Mörsel, 2003). Su contenido de proteínas es relativamente bajo en comparación con los cereales y las leguminosas (Tlili y col., 2011), no obstante son ricas en lípidos y carbohidratos (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis proximal de las semillas de tuna.

| Componente | % materia seca |
|------------------------------|--------------------|
| Humedad | 3.55 ¹ |
| Proteína | 0.97 ¹ |
| Lípidos | 17.22 ¹ |
| Carbohidratos | 74.68 ¹ |
| Fibra total | 2.66 ¹ |
| Hemicelulosa (% fibra total) | 9.9 ² |
| Celulosa (% fibra total) | 83.2 ² |
| Pectina (% fibra total) | 6.69 ² |
| Lignina (% fibra total) | 0.19 ² |
| Azúcares reductores | 4.16 ¹ |
| Sacarosa | 0.85 ¹ |
| Almidones | 69.67 ¹ |
| Cenizas | 1.01 ¹ |

¹Prieto – García y col., 2006; ²Jiménez – Aguilar y col., 2014.

La semilla es la parte de la tuna que tiene la menor cantidad de fibra, sin embargo está compuesta en su mayoría por celulosa (Jiménez – Aguilar y col., 2014). Los principales carbohidratos encontrados en la semilla son los almidones. Es posible que por sus altos contenidos de carbohidratos y lípidos pudieran servir para la elaboración de algún complemento alimenticio, en caso de que los lípidos no sean perjudiciales para la salud humana (Prieto – García y col., 2006).

En cuanto al contenido de cenizas, este depende de los niveles de metales que pueden contener (Prieto – García y col., 2006). En la Tabla 4 se describe la composición mineral de las semillas de tuna. Las semillas de tuna poseen una cantidad abundante de minerales, principalmente magnesio y fósforo, sin embargo el hierro, calcio y potasio se encuentran en cantidades importantes. No obstante, el

contenido mineral de las semillas depende de la composición de la tierra en la que la tuna es cultivada (Prieto – García y col., 2006; Al – Juhaimi y Özcan, 2013; El – Mostafa y col., 2014).

Tabla 4. Composición mineral de las semillas de tuna.

| Mineral | mg/100 g |
|----------------|------------------------|
| Aluminio | 0.2484 ¹ |
| Cadmio | < 0.00026 ¹ |
| Calcio | 73.64 ¹ |
| Cromo | 0.8012 ¹ |
| Plomo | 2.1346 ¹ |
| Magnesio | 143.12 ¹ |
| Potasio | 23.97 ¹ |
| Sodio | 0.36 ¹ |
| Zinc | < 0.00014 ¹ |
| Arsénico | < 0.00039 ¹ |
| Mercurio | < 0.00024 ¹ |
| Fósforo | 110 ² |
| Hierro | 12.1 ^{2,3} |
| Cobre | < 0.83 ² |
| Manganeso | < 0.83 ² |
| Molibdeno | < 0.33 ² |

¹Prieto – García y col., 2006; ²Jiménez – Aguilar y col., 2014; ³El – Mostafa y col., 2014.

También se pueden observar cantidades detectables de elementos tóxicos, tales como arsénico, mercurio y cadmio, siendo el plomo encontrado en mayor cantidad, estos minerales pueden provenir de los mismos suelos de cultivo o de las aguas utilizadas en el riego (Prieto – García y col., 2006).

Uno de los componentes de actual interés son los compuestos fenólicos. Los polifenoles representan una familia de moléculas orgánicas ampliamente distribuidas en las plantas. Sus estructuras químicas están caracterizadas por la presencia de algunos grupos fenólicos, los cuales son usualmente subproductos del metabolismo de la planta (Tlili y col., 2011; El – Mostafa y col., 2014).

El creciente interés en los compuestos fenólicos resulta de su actividad antioxidante, la cual es involucrada en beneficios a la salud humana, para la prevención de la inflamación, desregulación cardiovascular y enfermedades neurodegenerativas (Tlili

y col., 2011; El – Mostafa y col., 2014). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es debida, principalmente, a sus propiedades redox, los cuales los hace actuar como agentes reductores, donadores de hidrógenos, desactivadores de oxígeno y también pueden tener un potencial quelante metálico (Elfalleh y col., 2012). Todas las partes de la tuna son ricas en los miembros de la familia de los polifenoles, así como flavonoides y ácidos fenólicos (Tabla 5; El – Mostafa y col., 2014).

Tabla 5. Contenido de fenoles y flavonoides de las semillas de la tuna.

| Componente identificado | Contenido en mg/100 g |
|----------------------------------|------------------------------|
| Ácidos fenólicos totales | 48 – 89 ² |
| Isómero 1 de feruloyl – sacarosa | 7.36 – 17.62 ² |
| Isómero 2 de feruloyl – sacarosa | 2.9 – 17.1 ² |
| Isómero 3 de feruloyl – sacarosa | 253 ¹ |
| Sinapoyl – diglucósido | 12.6 – 23.4 ^{1,2} |
| Flavonoides totales | 1.5 – 2.6 ^{1,2} |
| Taninos totales | 4.1 – 6.6 ^{1,2} |

¹Chougui y col., 2013; ²El – Mostafa y col., 2014.

Las semillas de tuna contienen altas cantidades de compuestos fenólicos que van de 48 a 89 mg/100 g, incluyendo derivados de feruloyl, taninos y sinapoyl diglucósido (Chougui y col., 2013; El – Mostafa y col., 2014). Las diferencias que pudieran encontrarse en el contenido de estos compuestos son atribuidas al tipo de cultivo, origen geográfico de la fruta, grado de madurez, condiciones de almacenamiento y condiciones de extracción (tiempo de extracción y tipo de disolvente utilizado) (Chougui y col., 2013). Su contenido de compuestos fenólicos es menor que el de otras semillas tales como las del aguacate: 951 mg/100 g (Kosińska y col., 2012).

Otro componente importante de las semillas es el aceite, el cual ya ha sido caracterizado fisicoquímicamente en otras investigaciones (Tabla 6; Liu y col., 2009; Boukeloua y col., 2012; Zine y col., 2013); así como la composición de los ácidos grasos presentes en el aceite (Tabla 7; Labuschagne y Hugo, 2010; Matthäus y Özcan, 2011; Tlili y col., 2011; Chougui y col., 2013 y Ghazi y col., 2013).

Las semillas contienen la máxima cantidad de aceite, casi 98.8 g/kg de materia seca (Ramadan y Mörsel, 2003). La acidez provee información sobre la proporción de ácidos grasos libres existentes en el aceite (Boukeloua y col., 2012).

Tabla 6. Características fisicoquímicas del aceite de semillas de tuna.

| Característica | Valores |
|--|------------------------------|
| Acidez | 0.56 – 1.82 ^{2,3} |
| Humedad (%) | 0.07 ³ |
| Viscosidad (Pa s) | 0.0531 ¹ |
| Densidad (kg/m ³) | 0.909 ^{1,2,3} |
| Índice de refracción | 1.475 ^{1,2,3} |
| Índice de peróxidos (meq O ₂ /kg de aceite) | 3.5 ^{2,3} |
| Índice de yodo [g (I ₂)/100 g] | 130.5 ^{1,2,3} |
| Índice de saponificación (mg KOH/g de aceite) | 186.63 ^{1,2,3} |
| Materia insaponificable (%) | 1.19 ^{2,3} |
| Fósforo (ppm) | 30 ³ |
| Fosfolípidos (ppm) | 789.5 ³ |
| Estado físico a temperatura ambiente | Líquido ² |
| Color | Amarillo marrón ² |

¹Ennouri y col., 2005; ²Boukeloua y col., 2012; ³Zine y col., 2013.

La densidad del aceite depende de la temperatura y la composición química de éste, lo cual indica la naturaleza de la composición de los ácidos grasos, incluyendo la longitud de las cadenas, la presencia de insaturaciones y la funcionalidad en la cadena de carbono. En cuanto al índice de refracción, depende de la densidad, la composición química del aceite y de la temperatura, y se incrementa con la insaturación. El índice de peróxidos indica que la estabilidad a la oxidación, del aceite de semillas de tuna, es relativamente baja, lo cual se debe a su alto contenido de ácidos grasos insaturados (Boukeloua y col., 2012; Zine y col., 2013).

Un índice de yodo y una estabilidad oxidativa altos muestra que el aceite de semillas mantiene una buena calidad de aceite comestible, esto es debido a que los glicéridos de los ácidos grasos no saturados, presentes en el aceite, se unen con una cantidad definida de yodo, por lo que es una medida de insaturación, no obstante entre más alto sea el índice de yodo, el aceite tendrá menos estabilidad oxidativa (Ronald, 2002).

El índice de saponificación se encuentra por debajo del rango promedio (189 – 194 mg KOH/g de aceite) lo cual indica que su contenido de triglicéridos no es alto y por lo tanto puede ser utilizado en cosmetología (Zine y col., 2013). Los fosfolípidos presentes pueden actuar como antioxidantes o prooxidantes (Choe y Min, 2006; Koprivnjak y col., 2008), dependiendo de su concentración en el aceite y a la presencia de iones metal (Choe y Min, 2006) o tocoferoles (Judde y col., 2003; Koprivnjak y col., 2008).

La composición de los ácidos grasos es una de las determinaciones más importantes en los aceites, ya que con ello se evalúa la calidad de estos (Tabla 7; Tlili y col., 2011). Los ácidos grasos extraídos son principalmente insaturados (83 %), de los cuales mono y poliinsaturados cubren un 17 y 66 %, respectivamente (Bhatt y Nagar, 2013).

Tabla 7. Composición de ácidos de grasos del aceite de semilla de tuna.

| Ácidos grasos | Porcentaje |
|-------------------------------|--------------------------|
| Ácido palmítico | 13 ^{1,2,3} |
| Ácido esteárico | 3.5 ^{1,2,3} |
| Ácido oleico | 16.3 ^{1,2,3} |
| Ácido vaccénico | 5.3 ² |
| Ácido linoleico | 61.8 ^{1,2,3} |
| Ácido α - linolénico | 0.2 – 0.8 ^{1,3} |
| Ácido palmitoleico | 0.6 – 1.0 ^{1,3} |
| Ácido araquidónico | 0.2 ³ |
| Ácidos grasos saturados | 17 ^{1,2} |
| Ácidos grasos insaturados | 83 ^{1,2} |
| Ácidos grasos monoinsaturados | 17 ¹ |
| Ácidos grasos poliinsaturados | 66 ^{1,3} |

¹Labuschagne y Hugo, 2010; ²Chougui y col., 2013; ³Zine y col., 2013.

El aceite de semillas de tuna es caracterizado por su alto contenido de ácidos linoleico y oleico principalmente, los cuales le confieren algunas propiedades benéficas para la salud humana; no obstante el ácido palmítico se encuentra de manera importante (Bhatt y Nagar, 2013). Sin embargo la composición de los ácidos grasos es muy influenciada por los factores climáticos y genéticos (Matthäus y Özcan, 2011).

Los ácidos grasos presentes en el aceite de las semillas, también son influyentes en la promoción de la salud, principalmente los ácidos linoleico, oleico y linolenico (Liu y col., 2009; Tlili y col., 2011; Ghazi y col., 2013).

El ácido linoleico puede ser transformado por el organismo en una serie de ácidos grasos de cadena larga, precursores de eicosanoides, una familia de compuestos con 20 carbonos, incluyendo leucotrienos y prostaglandinas, las cuales tienen un rol importante a nivel vascular y para la coagulación sanguínea (Tlili y col., 2011). También tiene propiedades benéficas para la piel, y esto propone su uso por las industrias de productos cosméticos (Ghazi y col., 2013).

El ácido linolenico tiene importancia en la prevención secundaria de enfermedad coronaria y en la prevención de cáncer. El ácido oleico tiene un rol fundamental en muchas enfermedades tal como la prevención de enfermedades cardiovasculares (Tlili y col., 2011).

En el aceite de semillas de tuna también se encuentran algunas vitaminas liposolubles y esteroides. La Tabla 8 describe el perfil de las vitaminas liposolubles y esteroides que contiene el aceite de semillas de tuna. El aceite de estas semillas tiene altos niveles de tocoferoles, principalmente de vitamina E y γ – tocoferol (Matthäus y Özcan, 2011).

La vitamina E es el antioxidante liposoluble más importante, y protege al sistema biológico de la oxidación degradable, al igual que los tocoferoles, que son antioxidantes naturales (Ghazi y col., 2013). Su concentración de tocoferol es más alta que la de otros aceites, tal como el de soya, calabaza, girasol, sésamo, canola, oliva y aguacate (Matthäus y Özcan, 2011; Bhatt y Nagar, 2013).

También tiene un alto contenido de vitamina K (Tabla 8), la cual puede actuar como un cofactor para la síntesis de los factores de la coagulación sanguínea (II, VII, IX y X) o inhibidor de la coagulación y de las proteínas de la matriz ósea, ya que la

deficiencia de esta vitamina puede causar un síndrome trombótico o hemorrágico y alteración de la masa ósea (Jiménez – Aguilar y col., 2014).

Tabla 8. Perfil de vitaminas liposolubles y esteroides del aceite de semillas de tuna.

| Componente | g/kg de aceite |
|--------------------------|-----------------------|
| α – Tocoferol | 0.011 |
| β – Tocoferol | 0.012 |
| γ – Tocoferol | 0.330 |
| δ – Tocoferol | 0.005 |
| Vitamina E | 0.403 |
| Vitamina K1 | 0.525 |
| β – Caroteno | 0.047 |
| Ergosterol | ND |
| Campesterol | 1.66 – 2.17 |
| Estigmasterol | 0.29 – 0.76 |
| Lanosterol | 0.28 |
| β – Sitosterol | 4.30 – 11.50 |
| $\Delta 5$ – Avenasterol | 0.29 – 0.82 |
| $\Delta 7$ – Avenasterol | 0.05 – 0.23 |

Tabla modificada de Jiménez – Aguilar y col., 2014.

El perfil de ácidos grasos presentes en el aceite de semillas, muestra que éste es una excelente fuente de lípidos con propiedades nutraceuticas. Su contenido de carotenoides y la presencia de fitoesteroides, tales como campesterol, estigmasterol, lanosterol, entre otros (Tabla 8), muestra que es posible que contribuya a la salud de manera benéfica, ya que su consumo disminuye la absorción de los niveles de colesterol en plasma, debido a que la estructura de los fitoesteroides es similar a la del colesterol (Jiménez – Aguilar y col., 2014), haciéndolo una buena fuente para ayudar a reducir los riesgos de algunas enfermedades, como las cardiovasculares, también debido a la actividad antioxidante que presentan (Matthäus y Özcan, 2011; Jiménez – Aguilar y col., 2014).

Recientemente los esteroides han sido agregados a aceites vegetales como un ejemplo de alimento funcional exitoso. Este tipo de producto es ahora disponible y ha sido específicamente probado para disminuir colesterol LDL en sangre, alrededor de 10 – 15 % como parte de una dieta saludable (Ghazi y col., 2013).

Sin embargo todos los compuestos presentes en el aceite, que tienen propiedades bioactivas, dependen de varios factores, principalmente de los métodos y las condiciones empleadas para su extracción (Elfalleh y col., 2012; El – Mostafa y col., 2014).

1.4. Métodos de extracción de aceites de semillas

El contenido de lípidos está formado de constituyentes “libres”, que pueden ser extraídos por métodos mecánicos, físicos y con disolventes poco polares; y lípidos “enlazados”, que requieren de disolventes más polares, e incluso de la combinación de varios métodos, para su extracción (Kirk y col., 2002).

En varios estudios se han descrito algunos métodos de extracción de aceites en diversas semillas, ya sean o no tradicionales. Entre los principales métodos tradicionales utilizados están los mecánicos, que se basan en la aplicación de presión ejercida sobre una masa de semillas (Kirk y col., 2002). Están los métodos de extracción directa con disolventes, los cuales se caracterizan por el uso de disolventes polares, temperatura o agitación y largos periodos de tiempo para extraer el material estudiado (Kirk y col., 2002; Azuola y Vargas, 2007; Zhang y col., 2008). La extracción de Soxhlet es la más utilizada de estos métodos; que consiste básicamente en un material de vidrio utilizado para extraer compuestos de naturaleza lipídica, principalmente, usando un disolvente afín a dicho compuesto a manera de reflujo constante (Azuola y Vargas, 2007).

También destacan los métodos de extracción por solubilización, que se basan en disolver la muestra completamente, ya sea por hidrólisis ácida o alcalina, antes de la extracción con disolventes polares; y los métodos volumétricos, que incluyen la disolución de la muestra en ácido sulfúrico y centrifugación de la grasa en recipientes de vidrio especialmente calibrados (Kirk y col., 2002).

Otros métodos utilizados son la extracción por destilación, que consiste en la separación, utilizando calor, de los diferentes componentes líquidos de una mezcla,

basado principalmente en las diferencias volátiles de estos compuestos (Azuola y Vargas, 2007); y extracción por enzimas, las cuales hidrolizan los polisacáridos estructurales de las paredes celulares y las proteínas asociadas con cuerpos lipídicos para mejorar la liberación de aceites (Gai y col., 2013).

También existen métodos de extracción no tradicionales, los cuales, se fundamentan en la mejora de la eficiencia de los métodos tradicionales por acción física sobre el medio (Gao y Liu, 2005).

1.4.1. Extracción por métodos no tradicionales

Entre los métodos no tradicionales se encuentra la extracción por microondas, en la cual la irradiación emitida por éste origina un movimiento de moléculas por la migración de iones y rotación de dipolo, contribuyendo a la transferencia de energía al disolvente y material estudiado (Azuola y Vargas, 2007; UIB, 2010; Gai y col., 2013).

En la extracción por fluidos supercríticos, que se difunde a través de sólidos como un gas y disuelven materiales como un líquido, generando un disolvente de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial (UIB, 2010); extracción turbo, que utiliza agitación muy alta induciendo una cavitación hidrodinámica; extracción eléctrica, aplicando descargas eléctricas a la mezcla de extracción hasta que se formen burbujas de cavitación; y por último extracción por ultrasonido que utiliza sonidos de frecuencia creando burbujas de cavitación, con el fin de extraer el compuesto buscado del material estudiado (Azuola y Vargas, 2007).

1.5. Ultrasonido

El ultrasonido consiste en la producción de ondas sonoras de frecuencia elevada, superior a 20 kHz que no son captadas por el oído humano (Herrero y Romero de Ávila, 2006; UIB, 2010). El ultrasonido puede clasificarse en función de la potencia y

señal que emite (Azuola y Vargas, 2007; UIB, 2010), aunque también pueden agruparse en función de la intensidad acústica (UIB, 2010).

Los ultrasonidos de baja intensidad actúan de transmisores y receptores, reproduciendo el efecto piezoeléctrico, el cual consiste en que pequeños cristales generan una carga eléctrica al ser sometidos a presión, cuando se les aplica un campo eléctrico, las moléculas de los cristales se separan y se juntan produciendo una vibración y oscilación en el aire, produciéndose así una onda sonora. La onda sonora no es más que ciclos de aumento y disminución de la presión, dependiendo de la densidad y compresibilidad de un medio (UIB, 2010).

Los ultrasonidos de potencia o alta intensidad pueden llegar a modificar el material estudiado, dañando sus propiedades mediante el proceso, e incluso originar una reacción química (UIB, 2010) con el fin de liberar el compuesto buscado (Azuola y Vargas, 2007).

El ultrasonido de potencia o alta intensidad se basa fundamentalmente en el fenómeno de cavitación (Herrero y Romero de Ávila, 2006; Azuola y Vargas, 2007; UIB, 2010), el cual consiste en la generación, crecimiento y colapso de microburbujas producidas en regiones de un líquido sometido a mucha potencia, pero a baja frecuencia que se alternan rápidamente. Al colapsar las microburbujas, se libera toda la energía almacenada incrementando la temperatura del medio, dando lugar a un choque mecánico con las estructuras físicas del material estudiado, causando su ruptura y modificación de estructuras del producto (Herrero y Romero de Ávila, 2006; Aday y col., 2012). De acuerdo con estudios reportados es utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica con diversos fines, y puede decirse que uno de ellos es la extracción de compuestos contenidos en algunos alimentos (Vinatoru, 2001; Vilku y col., 2008).

Diversos autores han comparado la extracción de compuestos con varios métodos, entre ellos el ultrasonido, y concuerdan con el hecho de que es una tecnología segura, no tóxica, amigable ambientalmente, no cara, no se requiere de mucho

tiempo para llevar a cabo la extracción y no altera las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos (Zhang y col., 2005; Vilku y col., 2008; Aday y col., 2012).

Algunas de las aplicaciones del ultrasonido son limpieza y desinfección de algunos materiales, mezclado y emulsificación, por ejemplo ha sido aplicado para la homogenización de la leche y yogurt (Wu y col., 2001); impregnación, filtración, cristalización y precipitación, congelación, deshidratación, inactivación microbiana y enzimática (Piyasena y col., 2003; Ulusoy y col., 2007; Ashokkumar y col., 2010), conservación (Aday y col., 2012) e incluso la extracción de compuestos a partir de materiales vegetales (Azuola y Vargas, 2007), entre los cuales se puede destacar el aceite de ciertas semillas.

1.5.1. Extracción de aceite por ultrasonido

El ultrasonido ha sido ampliamente utilizado en la extracción de componentes de muchos materiales, incluyendo las semillas de frutos y plantas. Las extracciones por ultrasonido, o asistidas por este, consisten fundamentalmente en la aplicación de un tratamiento, o pretratamiento, con un sonicador, bajo ciertas condiciones que esté en contacto directo con la muestra, facilitando así la extracción de los compuestos del material estudiado (Vilku y col., 2008; Karki y col., 2010; Adam y col., 2012; Allaf y col., 2013).

Los compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos, antocianinas) han sido el objetivo principal de las extracciones por ultrasonido (Albu y col., 2004; Chemat y col., 2004a; Ghafoor y col., 2009; Wang y col., 2008; Aybastier y col., 2013; Da Porto y col., 2013; Ince y col., 2013).

Actualmente se ha estudiado acerca de la extracción de aceites de semillas asistida por ultrasonido, tales como semillas de tabaco (Stanisavljević y col., 2007), papaya (Samaram y col., 2013), linaza (Zhang y col., 2008), pino coreano (Zhang y col., 2005), alcaparro (Ara y col., 2014), uva (Da Porto y col., 2013), granada (Goula,

2013; Tian y col., 2013) y melón chino (Bimakr y col., 2012). Sin embargo, en todas las extracciones de aceite reportadas por este método, utilizan un baño ultrasónico.

Estudios previos, demuestran que la utilización del ultrasonido, como método de asistencia para extracciones de aceites, muestra mejores resultados que los métodos convencionales (Bimakr y col., 2012), sin embargo no son tan diferentes entre sí. Las principales diferencias son observadas en la actividad antioxidante que presenta el aceite obtenido (Bimakr y col., 2012; Samaram y col., 2013).

Sin embargo, el ultrasonido no solo se combina con los métodos convencionales, sino que también con ciertas condiciones, tales como la temperatura (termoultrasonido), con la cual se pueden obtener mejores resultados que con la combinación de dos métodos.

1.5.2. Termoultrasonido

El termoultrasonido (o termoultrasonificación) es el método de ultrasonificación combinado con un tratamiento térmico. Su origen data de 1987, cuando Ordoñez y col. combinaron las ondas ultrasónicas de alta potencia con temperatura, obteniendo que los efectos de la inactivación de microorganismos fueron mayores que los efectos de las ondas ultrasónicas a temperatura ambiente.

Actualmente esta tecnología es cada vez más utilizada, principalmente para la inactivación de microorganismos y enzimas de algunos jugos de frutos, por ejemplo de naranja (Gómez – López y col., 2010; Koshani y col., 2014), de fresa (Herceg y col., 2013), de manzana (Muñoz y col., 2012; Abid y col., 2014), de tuna púrpura (Cruz – Cansino y col., 2015) y de tomate (Wu y col., 2008); así como extender la vida útil de algunas frutas, tal como la fresa (Aday y col., 2012).

No obstante hay estudios escasos sobre su utilización para extraer compuestos antioxidantes de algunos residuos de frutos, tal es el caso del residuo de mango (Neria, 2015) y de zarzamora (Zafra, 2015), sin embargo no hay reportes sobre su

utilización para la extracción de aceites de semillas, ni acerca de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del aceite obtenido.

1.6. Actividad antioxidante y antimicrobiana de algunos aceites de semillas

Muchos compuestos naturales aislados de las semillas han demostrado tener actividades biológicas, tal como los compuestos fenólicos. Actualmente se ha prestado más atención a los aceites de semillas como agentes naturales para la conservación de alimentos y se ha probado que tienen varios efectos farmacológicos como antirreumático, antiséptico, digestivo y diurético (Ozcan y col., 2010).

Los aceites procedentes de semillas de algunos alimentos, frutos principalmente, tienen características antioxidantes y antimicrobianas, por lo que se puede llegar a pensar que esta es una de las razones por la que esos alimentos se utilizaban en la medicina tradicional (Kesari y col., 2010; Khoobchandani y col., 2010; Gai y col., 2013).

1.6.1. Actividad antioxidante

Un antioxidante es un compuesto químico orgánico que previene de la oxidación de otro compuesto químico, es decir, que protege el componente celular clave mediante la neutralización de los efectos dañinos de los radicales libres, los cuales son subproductos naturales del metabolismo celular (Shenoy y Shirwaikar, 2002).

Los radicales libres se forman cuando se metabolizan moléculas de oxígeno e hidrógeno, y son compuestos químicos que poseen un electrón desapareado en el último orbital de una molécula, siendo ésta la principal razón por la que los radicales libres son altamente reactivos y pueden reaccionar con proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. Los radicales atacan a moléculas estables más cercanas robándoles su electrón. Cuando la molécula es atacada y pierde su electrón, se

convierte en radical libre, provocándose una reacción en cadena, resultando finalmente en la destrucción de una célula viva (Patil y col., 2003).

Los antioxidantes son capaces de proteger las células del cuerpo humano contra daños de radicales libres debido a sus propiedades redox, es decir, son capaces de donar los electrones a los radicales libres inhibiendo la reacción en cascada de oxidación (Simopoulos, 2004).

Los antioxidantes pueden ser sintéticos o de origen natural, sin embargo, el uso de los antioxidantes sintéticos es restringido por los posibles efectos adversos sobre la salud humana, de ahí el interés de obtener antioxidantes de fuentes naturales (Zainol y col., 2003). Por lo que se propone que las semillas son fuentes potenciales de antioxidantes naturales debido a su contenido de fitoquímicos tal como taninos, diterpenos, flavonoides y ácidos fenólicos (Dawidowicz y col., 2006).

Algunos de los ácidos grasos encontrados en los aceites extraídos de semillas, como los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico, son los que presentan las propiedades antioxidantes, principalmente en semilla de calabaza (Nawirska – Olszańska y col., 2013), manzana (Cervantes – Cardoza y col., 2010), mango (Abdalla y col., 2007), almendra (Lafont y col., 2011), anís (Gülçin y col., 2003), uva (Jayaprakasha y col., 2003) y guaraná (Majhenič y col., 2007).

Se ha reportado que las semillas de la tuna de *Opuntia dillenii* poseen una notable actividad antioxidante, ya que contienen grandes cantidades de compuestos, tal como polifenoles y flavonoides. Sin embargo, estas semillas también contienen una cantidad importante de aceite, el cual posee un contenido elevado de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales también pueden presentar una elevada actividad antioxidante (Liu y col., 2009). Por lo que es posible que las semillas de tuna de *Opuntia ficus indica*, presente propiedades antioxidantes similares a las de las semillas de *Opuntia dillenii*.

Además de la actividad antioxidante reportada en los aceites de semillas, algunos de ellos también reportan actividad antimicrobiana, tal es el caso del aceite de semillas de laurel (Ozcan y col., 2010), camelia (Feás y col., 2013), comino (Allahghadri y col., 2010) y comino negro (Singh y col., 2005).

1.6.2. Actividad antimicrobiana

Un antimicrobiano es una sustancia que actúa en contra de los microorganismos, es decir, que destruye o inhibe su crecimiento. Los antimicrobianos pueden ser de origen sintético o de origen natural, por ejemplo los aceites (Reyes – Jurado y col., 2014).

Los antimicrobianos se clasifican en bactericidas, los cuales ejercen una acción letal para la bacteria, por ejemplo inhiben la síntesis proteica; o bacteriostáticos, que sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano, actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN (Calvo y Martínez – Martínez, 2009).

El creciente interés de la industria alimentaria en los aceites, puede ser debido a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas que presentan sus componentes. Actualmente se sabe que los aceites obtenidos de material vegetal, como semillas de plantas y frutos, presentan propiedades antimicrobianas sobre levaduras, mohos y bacterias (Ozcan y col., 2010; Khoobchandani y col., 2010; Kesari y col., 2010; Reyes – Jurado y col., 2014), por lo que son considerados como una alternativa natural para la conservación de alimentos (Fisher y Phillips, 2008).

Se ha demostrado el efecto antimicrobiano de aceites de semillas sobre varias cepas microbianas, tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogens*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexneri* y *Bacillus subtilis* e incluso para *Vibrio cholerae* (Salman y col., 2008), principalmente en los aceites de semilla de comino negro (Nair y col., 2005),

albahaca (Hussain y col., 2008), *Eruca sativa* (Khoobchandani y col., 2010), *Nigella sativa* (Salman y col., 2008),.

Asimismo presentan una actividad antifúngica, principalmente contra *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* y *Fusarium solani* en el aceite de semilla de albahaca (Nair y col., 2005; Salman y col., 2008).

II. Problema de investigación

La tuna es principalmente producida en México, es un fruto que contiene una gran cantidad de semillas, que al ser procesado para la obtención de productos derivados (jugos, mermeladas, queso y láminas de pulpa), son eliminadas y pasan a formar parte de los residuos, los cuales pueden contaminar el entorno ambiental.

El aceite es uno de los componentes mayoritarios de las semillas, por lo que pueden ser aprovechadas para la obtención de este subproducto. Cabe mencionar que hasta el momento, los estudios sobre el aceite de la semilla de tuna son pocos y se desconocen las propiedades bioactivas (actividad antioxidante y antimicrobiana) que el aceite posee. La mayoría de las extracciones de aceites de semillas, son realizadas por métodos que utilizan disolventes. Por lo que se están buscando métodos alternativos de extracción, que disminuyan la utilización de disolventes como es el uso de tecnologías emergentes.

Es por ello que en este trabajo se estudió el método de extracción por termoultrasonido para obtener un aceite más puro con propiedades bioactivas, minimizando el uso de disolvente, comparado con otros métodos convencionales.

III. Justificación

Debido a la alta cantidad de residuos obtenidos a partir del procesado de la tuna, se obtiene un alto contenido de semillas, las cuales podrían ser utilizadas para la extracción de aceites, ya que estudios reportan, que ciertos aceites de semillas presentan actividades antioxidante y antimicrobiana, debido a ciertos componentes que posee, como ácidos grasos, tocoferoles, carotenoides y polifenoles. Las semillas de tuna presentan una composición muy similar a la de otros frutos, por lo que sus componentes podrían tener las propiedades antes mencionadas.

Por otro lado la extracción de aceites de semillas es realizada por métodos convencionales en donde se utiliza una gran cantidad de disolventes. Por lo que el uso de una tecnología emergente como lo es el termoultrasonido, facilitaría la extracción del aceite de semillas de tuna, y con ello el uso de disolventes sería menor.

La obtención de este aceite podría favorecer al sector productivo de la tuna en la posible utilización de este residuo, y su posible empleo como aditivo antimicrobiano y antioxidante, y al mismo tiempo participaría en la disminución de la contaminación del medioambiente.

IV. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar los efectos de la extracción de aceite de semilla de tuna Reyna (*Opuntia ficus indica*) por termoultrasonido sobre la actividad antioxidante y antimicrobiana como una alternativa a métodos convencionales de extracción.

4.2. Objetivos específicos

- i. Determinar las condiciones óptimas (porcentaje de amplitud y tiempo) utilizando la metodología de superficie de respuesta en la extracción termoultrasonificada del aceite de semillas de tuna en base a la actividad antioxidante (ABTS y DPPH).
- ii. Comparar el rendimiento de aceite de la extracción optimizada por termoultrasonido con dos métodos convencionales (Soxhlet y maceración).
- iii. Establecer una comparación de la actividad antioxidante (ABTS y DPPH) de la extracción optimizada por termoultrasonido con Soxhlet y maceración.
- iv. Contrastar la actividad antimicrobiana (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) de la extracción optimizada de aceite por termoultrasonido con los obtenidos por Soxhlet y maceración.
- v. Determinar el efecto de la termoultrasonificación sobre la estructura de la semilla de tuna al extraer el contenido lipídico utilizando microscopía electrónica de barrido.

V. Hipótesis

El método de extracción por termoultrasonido permitirá un mayor rendimiento de aceite de las semillas de tuna, obteniendo una elevada actividad antioxidante y alto efecto antimicrobiano en comparación con el método convencional.

VI. Diseño metodológico

En la Figura 8 se muestran las determinaciones que se llevaron a cabo en esta investigación.

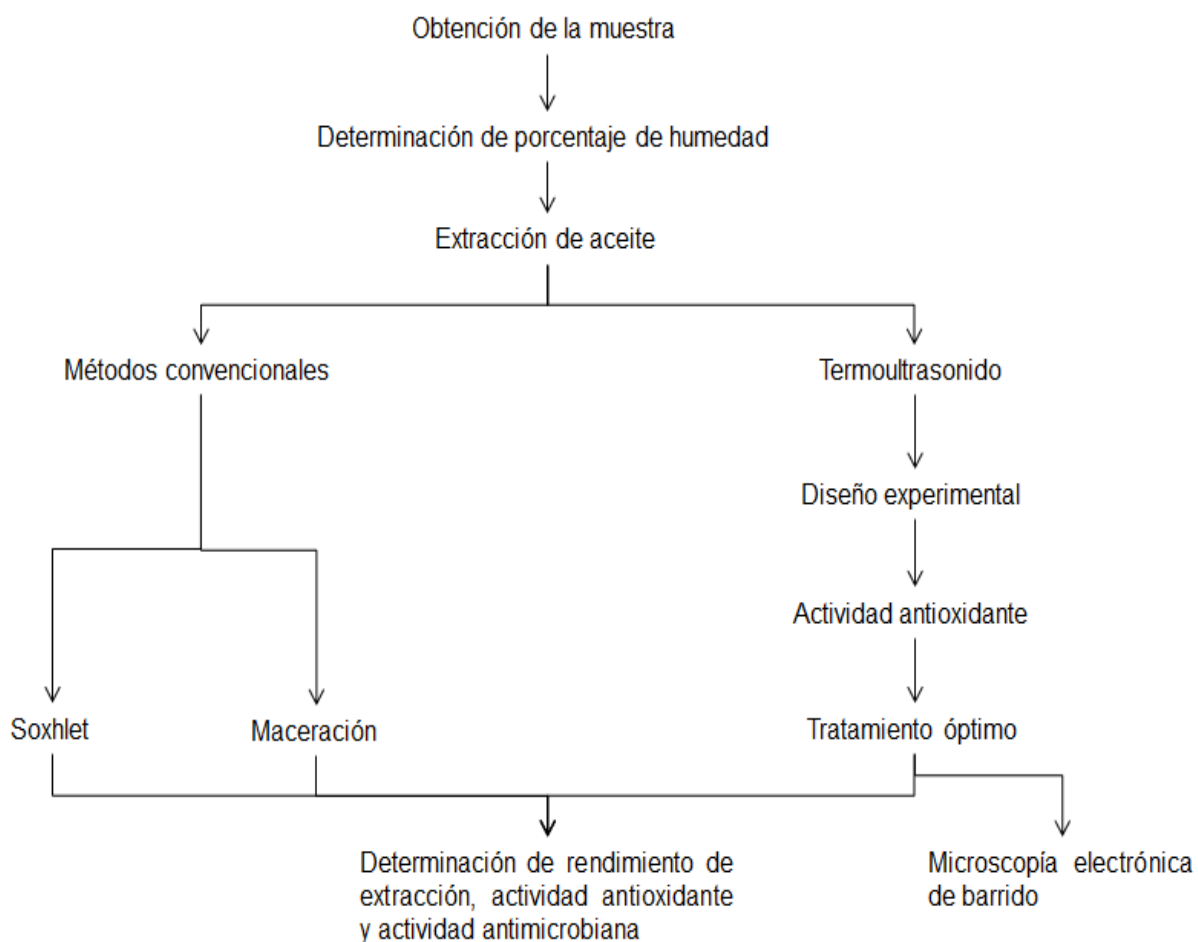


Figura 8. Esquema del diseño experimental.

6.1. Obtención de la materia prima

La muestra utilizada fue tuna de la variedad Reyna, suministrada por el Consejo Mexicano de Nopal y Tuna (CoMeNTuna), del municipio de Actopan, Hidalgo, México, en primavera de 2012.

6.2. Obtención de la muestra

Las muestras de semillas de tuna fueron obtenidas retirando toda la pulpa y residuo que las rodea mediante varios lavados con agua. Se dejaron secar a temperatura ambiente en charolas de plástico. Posteriormente las semillas fueron molidas en un molino industrial (Cyclotec 1093, Tecator, Suecia), en el Instituto de Ciencias Agropecuarias, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; y se sometieron a un tamizado para obtener un tamaño de partícula de ≤ 0.5 mm. La semilla en polvo fue almacenada en bolsas con cierre hermético a temperatura ambiente, en un lugar fresco en la oscuridad.

6.3. Determinación de porcentaje de humedad

Esta prueba se basa en la pérdida de agua que experimenta la muestra al ser llevada a peso constante. El método utilizado para esta determinación fue el descrito por la AOAC método 925.09 (2005). Se utilizó charolas de aluminio previamente puestas a peso constante durante una hora. Se pesó 0.5 g, aproximadamente, de la semilla, tanto entera como molida. La semilla se llevó a $105 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en un horno de secado (Scorpion Scientific) durante dos horas. Transcurrido el tiempo las charolas se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un desecador por 10 min y fueron pesadas. Se llevó las charolas nuevamente al horno por media hora más. Finalmente, y una vez cumplido el tiempo, las charolas se enfriaron en un desecador por 10 min y fueron pesadas. El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% H = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100$$

donde:

$\%H$ = Porcentaje de humedad

P_i = Peso inicial de la muestra antes de ser secada (g)

P_f = Peso final de la muestra después de ser secada (g)

6.4. Extracción de aceite de semillas de tuna

La extracción de aceite de semillas se realizó por medio de tres métodos, por termoultrasonido, Soxhlet y maceración, estos dos últimos caracterizados por la utilización directa de disolventes.

Todas las muestras de aceite extraídas por los tres métodos, se almacenaron en tubos eppendorf de color ámbar con una capacidad de 2 mL, hasta su utilización; en cuanto a la semilla en polvo sin aceite se almacenó en bolsas con cierre hermético en la oscuridad.

6.4.1. Extracción de aceite por termoultrasonido

La extracción por ultrasonido se fundamenta en la generación del fenómeno de cavitación, el cual al reducir el tamaño de la partícula, incrementa el área de exposición de ésta, permitiendo así la extracción de compuestos; combinado con un tratamiento térmico, lo cual no permite el daño de los compuestos por cambios de temperatura.

Se utilizó un equipo de ultrasonido de 1500 W (procesador de ultrasonidos VCX – 1500, Sonic & Materials, Inc. Newtown, CT, Estados Unidos; Figura 9), con una frecuencia constante de 20 kHz. Para controlar la temperatura se utilizó un recipiente de doble capa, el cual tiene una capacidad de 400 mL, para realizar la extracción de aceite por termoultrasonido.

Las extracciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: temperatura fija de salida (25 °C), tiempo (5 – 15 min), amplitud (80 – 90 %) y 20 g de semillas molidas y tamizadas. Se utilizó hexano como disolvente para las extracciones. Las condiciones de extracción fueron obtenidas de pruebas preliminares y referencias de extracciones de aceites de semillas de frutos.

Finalizado el tratamiento, la mezcla se vació en un vaso de precipitado y se tomó inmediatamente la temperatura, posteriormente las fases acuosa y sólida fueron separadas mediante filtración utilizando una bomba de vacío (DOA – P704 – AA, GAST Manufacturing, Inc., Michigan, Estados Unidos).



Figura 9. Procesador de ultrasonidos VCX – 1500, Sonic & Materials, Inc. Newtown, CT, Estados Unidos.

La fase acuosa se mezcló con hexano (1:1 v/v) durante 30 min, pasado el tiempo se volvió a filtrar separándola del disolvente por medio de un embudo de separación, el disolvente se almacenó, para posteriormente llevarlo a evaporación y obtener el aceite; mientras que la fase acuosa se llevó a centrifugación (Centrífuga refrigerada Allegra 25R, Beckman Coulter, California, Estados Unidos; a 10 000 rpm, 30 min, 4 °C) obteniendo tres fases una capa en la superficie, un sobrenadante y el precipitado, se separó la capa de la superficie, así como el precipitado, los cuales se mezclaron con 50 mL de hexano por 10 min, y por decantación se obtuvo el disolvente, el cual se mezcló con el disolvente previamente almacenado.

La fase acuosa se almacenó en recipientes de plástico en congelación para su posterior análisis.

La fase sólida, se deshidrató (Weston 74 – 1001 – w, Weston Products L.L.C. Strongsville, Ohio, Estados Unidos) a una temperatura no mayor a 40 °C. Posteriormente se mezcló con 150 mL de hexano con agitación durante 30 min, pasado el tiempo se separó la fase sólida del disolvente por filtración realizando tres lavados con el disolvente, el último lavado se realizó con 50 mL de hexano.

La fase sólida se almacenó en bolsas selladas herméticamente en la oscuridad. El disolvente obtenido de las dos fases se llevó a un evaporador rotatorio BÜCHI R – 200 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza) a 40 °C para la obtención del aceite.

6.4.2. Extracción de aceite de semillas de tuna por métodos convencionales

6.4.2.1. Método de Soxhlet

La extracción de la materia grasa de una muestra, por este método, se basa en el calentamiento continuo a reflujo con disolvente, tal como hexano, el cual por medio de su volatilización y condensación sobre la muestra, se produce un lavado continuo logrando extraer todo el material soluble en él.



Figura 10. Sistema universal de extracción de grasas BÜCHI B – 811 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza).

La extracción por este método, se realizó en base al procedimiento descrito por la AOAC método 930.39 (2005) para la extracción de grasas. Se utilizó 5 g de semilla, molida y tamizada; 120 mL de hexano y un sistema universal de extracción de grasas BÜCHI B – 811 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza; Figura 10), bajo las condiciones reportadas por el fabricante.

El proceso consistió en el calentamiento del disolvente en los vasos inferiores del equipo de extracción, que se volatilizó y subió al refrigerante donde se enfrió, condensó y cayó dentro del cartucho que contenía la muestra. Posteriormente ocurrió el contacto del disolvente con la muestra y la extracción sólido – líquido.

Al mismo tiempo se fue incrementando, paulatinamente, el nivel del disolvente, que cuando alcanzó un cierto nivel marcado por el sifón ocurrió un reflujo, un ciclo de extracción, donde el disolvente con los ácidos grasos cayeron a los vasos inferiores para iniciarse un nuevo ciclo, de esta forma el aceite extraído por el disolvente se fue quedando en los vasos inferiores.

Por último se llevó a cabo una etapa de secado, la cual consiste en evaporar todo el disolvente de los vasos inferiores, a manera de que solo quedará el aceite en dichos vasos.

6.4.2.2. Método de maceración

La extracción de grasas por este método consiste en sumergir la muestra a macerar en un recipiente cerrado con una cantidad suficiente de disolvente, para que la cubra totalmente; dejándola un periodo de tiempo largo.

Para la extracción por este método se utilizó como disolvente hexano. Se colocó 10 g de semilla de tuna, molida y tamizada, en una bolsita de tela de algodón, previamente desgrasada con un lavado con jabón y uno con alcohol; la cual se sumergió en 200 mL de hexano dentro de un frasco cerrado, para evitar su volatilización, a una temperatura de alrededor de 25 °C, almacenado en un lugar

oscuro durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, el aceite fue recuperado por la evaporación del disolvente con un evaporador rotatorio BÜCHI R – 200 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza) a 40 °C.

6.4.3. Determinación del rendimiento de aceite

El rendimiento del aceite obtenido se determinó como lo reporta Chougui y col. (2013), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Aceite (\%)} = \left(\frac{M_1 - M_0}{M_2} \right) * 100$$

donde:

Aceite (%) = Porcentaje del aceite obtenido

M₀ = Peso del recipiente vacío (g)

M₁ = Peso del recipiente después de la evaporación del disolvente (g)

M₂ = Peso de la semilla en polvo (g)

6.5. Determinación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante del aceite extraído de las semillas de tuna verde, tanto por termoultrasonido como por métodos convencionales, fue evaluada por las determinaciones de capacidad de captación de los radicales libres de ABTS^{•+} y DPPH[•].

6.5.1. Determinación por ABTS

La prueba de ABTS es una técnica de decoloración, en la que hay una generación directa del radical en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes. El ABTS^{•+} es un radical con un nitrógeno central que presenta un color característico azul – verde, cuando este catión radical es reducido por un antioxidante a la forma no

radical, presenta una pérdida de color. La actividad antioxidante en base al catión libre de ABTS^{•+}, se realizó de acuerdo al método descrito por Kuskoski y col. (2005).

Esta determinación se realizó mediante la formación del radical ABTS, el cual se obtuvo tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM, concentración final), incubados a temperatura ambiente (± 25 °C) en la oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS se diluyó hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70 (± 0.1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción) utilizando el lector de microplacas (Power Wave XS [Bio Tek]. Software KC Junior, Estados Unidos).

Se agregó 20 μ L de aceite y 980 μ L de solución de ABTS, se agitó en el vortex (Vortex – Genie 2, Scientific Industries, Inc., NY, Estados Unidos) y se dejó reposar a temperatura ambiente por 7 min, posteriormente se determinó la absorbancia a 754 nm empleando el lector de microplacas. Los resultados fueron expresados en mg equivalente de ácido ascórbico (EAA) por 100 g de muestra.

6.5.2. Determinación por DPPH

En esta prueba el radical DPPH[•] es caracterizado como un radical libre estable, debido a la deslocalización del electrón libre sobre la molécula en conjunto, el cual al reaccionar con otras moléculas con un electrón libre, se produce una decoloración (Molyneux, 2004).

El reactivo DPPH[•] es un radical libre estable, que en solución etanólica presenta una coloración violeta. Si se adiciona a este medio una sustancia susceptible de atrapar radicales libres, el electrón no apareado del DPPH[•] se aparea e inmediatamente se presenta una decoloración de la solución que puede ir hasta amarillo en razón del número de electrones apareados. La actividad antioxidante en base al radical DPPH[•] se evaluó de acuerdo al procedimiento reportado por Morales y Jiménez – Pérez (2001).

Esta determinación consistió en agregar 100 μ L de aceite y 500 μ L de solución DPPH, se agitó en el vortex (Vortex – Genie 2, Scientific Industries, Inc., NY, Estados Unidos) y se dejó reposar a temperatura ambiente por una hora, posteriormente se determinó la absorbancia a 520 nm, empleando lector de microplacas (Power Wave XS [Bio Tek]. Software KC Junior, Estados Unidos). Los resultados fueron expresados en μ mol equivalente de trolox (ET) por 100 g de muestra.

6.6. Determinación de actividad antimicrobiana

6.6.1. Obtención de cultivos microbianos

Los microorganismos utilizados para la determinación de actividad antimicrobiana fueron: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 1654) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Todos los microorganismos fueron obtenidos de la Colección Mexicana de Cultivos Microbianos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, México, D. F., México.

6.6.2. Determinación de la cuenta viable

Los medios de cultivo utilizados fueron agar para métodos estándares y caldo digerido de soya – caseína.

Para cada uno de los microorganismos se realizó una curva de crecimiento microbiano, con el fin de conocer la concentración aproximada de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

A partir de glicerol, que contenía las bacterias, se tomó una alícuota y se realizó una siembra en agar para obtener colonias aisladas y de ahí se realizó otra siembra para aislar una colonia y realizar posteriormente la determinación de actividad antimicrobiana.

Se inoculó un tubo con 5 mL de caldo con una colonia del microorganismo, y se incubó con agitación a 200 rpm (Incubadora Labtech, LSI – 3016A, Lab. Ind. Vac instruments, Namyangju – City, Kayonggi – Do, KOREA) a 37 °C durante, mínimo 12 horas. Posteriormente se tomó 1 mL de cultivo del tubo y se pasó a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo estéril, el cual se llevó a incubación con agitación a 200 rpm a 37 °C, hasta que el cultivo alcanzó las absorbancias de 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 y 0.9, medidas en alícuotas de 1 mL (SHIMDZU UV – 1061, Duisburg, F. R., Alemania) a una longitud de onda de 600 mn.

Una vez que el cultivo llegó a las absorbancias deseadas, se tomó 100 µL de la suspensión y se hicieron cinco diluciones (1/10, 1/100, 1/1,000, 1/10,000 y 1/100,000). De las dos últimas diluciones (1/10,000 y 1/100,000), se inoculó 100 µL de estas diluciones en medios en cajas por triplicado. Las cajas se incubaron (Incubadora Arsa AR – 130, Felisa, Jalisco, México) durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo se realizó el conteo de colonias para determinar el tamaño de inóculo a utilizar.

6.6.3. Inoculación

A partir de un tubo con 5 mL de cultivo, se inoculó 1 mL de cultivo en un matraz con 50 mL de caldo estéril y se incubó con agitación a 200 rpm a 37 °C, hasta que el cultivo alcanzó las absorbancias de 0.6, 0.6 y 0.9, para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente, que fue donde se obtuvo aproximadamente 1×10^8 UFC/mL. Consecuentemente se realizó una siembra masiva o un extendido homogéneo de la suspensión en el medio.

6.6.4. Evaluación de actividad antimicrobiana y determinación de la concentración mínima inhibitoria

Para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite de semillas de tuna, así como la concentración mínima inhibitoria (CMI), se empleó el método de difusión en disco.

Se impregnaron discos de papel filtro (6 mm de diámetro) con 66.67, 50, 33.33 y 16.67 μL de aceite, y se colocaron en las placas previamente inoculadas. Se utilizó hexano como control negativo, y discos de Ampicilina para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y Estreptomicina para *Pseudomonas aeruginosa* como controles positivos. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. Los diámetros de zona de inhibición fueron medidos en mm y los resultados de la CMI fueron expresados como $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

6.7. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (MEB) es una técnica utilizada para analizar la morfología de partículas pequeñas de materiales sólidos de todo tipo, emitiendo una visión tridimensional de su estructura, permitiendo conocer su composición estructural (Gámiz y col., 2002). Se fundamenta en el desplazamiento de un haz de electrones del microscopio sobre la superficie de la muestra a modo de un pincel, que barre la muestra con idas y venidas, amplificando la información de dicha muestra y emitiéndola como imagen (Yañez, 2014).

Con el fin de examinar las alteraciones morfológicas de las muestras de semillas de tuna, antes y después del proceso de termoultrasonificación, para observar la influencia de la ultrasonificación en el proceso de extracción del aceite, se utilizó MEB. Esta determinación se realizó en el Instituto de Ciencias de la Tierra y de los Materiales de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Las muestras de semilla, tanto la muestra control como la tratada con termoultrasonido bajo las condiciones óptimas para la extracción del aceite, fueron secadas a temperatura ambiente antes de realizar la determinación de MEB.

Las muestras en polvo se colocaron en un portamuestras sobre una cinta de granito de doble cara, posteriormente fueron recubiertas con una capa delgada de oro, de aproximadamente 1 mm de espesor, en una máquina ionizadora (Denton Vacuum Desk V, Moorestown, Nueva Jersey, Estados Unidos) a una presión de 20 millitorr y

una corriente de 20 mA durante 4 min. Este recubrimiento a presión tiene como objetivo llegar al punto de sublimación del oro, para volver conductora la muestra y así sea resistente al haz de electrones al que son sometidas dentro del microscopio electrónico. Una vez listas las muestras, se procedió a observarlas en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM – 6300, Estados Unidos, con un alcance de 300 000 magnificaciones y una resolución de 30 KV) a 500, 1000 y 2000 amplificaciones (500x, 1000x y 2000x), y se tomaron las micrografías para establecer la comparación estructural entre las muestras.

6.8. Diseño experimental

Actualmente la metodología de superficie de respuesta es ampliamente utilizada para optimizar las condiciones del método de extracción por ultrasonido (Bimakr y col., 2012; Ho y col., 2014). Para optimizar las variables de proceso en la extracción de aceite de semillas por el método de termoultrasonido, con elevada actividad antioxidante (ABTS y DPPH), se aplicó metodología de superficie de respuesta (RSM; por sus siglas en inglés: response surface methodology).

Se consideraron dos variables (porcentaje de amplitud y tiempo) para el método de termoultrasonido y se utilizó un diseño experimental central compuesto rotatorio, en cinco niveles. Los valores de amplitud fueron 80 – 90 % y tiempo entre 5 – 15 min; la temperatura de salida de extracción se fijó a 25 °C.

El diseño generó trece tratamientos con cinco puntos centrales, para estimar la reproducibilidad del método; cuatro puntos factoriales y cuatro puntos axiales (Tabla 9), a una distancia de 1.414, de cada diseño central.

Los valores medios fueron sometidos a un análisis múltiple en el programa estadístico JMP versión 7.0.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, Estados Unidos, 2007) y se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden, dado en la siguiente ecuación:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

donde Y_i es la respuesta prevista, β_0 es el coeficiente constante, β_1 y β_2 son los coeficientes de regresión en sus términos lineales, β_{11} y β_{22} son coeficientes de regresión cuadráticos y β_{12} es el coeficiente de interacción. En este modelo, X_1 y X_2 representan las variables independientes utilizadas, % de amplitud y tiempo, respectivamente.

Tabla 9. Tratamientos obtenidos del diseño experimental compuesto central rotatorio para el método de termoultrasonido.

| Tratamiento | Porcentaje de amplitud | Tiempo (min) |
|-------------|------------------------|--------------|
| 1* | 85 | 10 |
| 2 | 90 | 5 |
| 3 | 90 | 15 |
| 4* | 85 | 10 |
| 5 | 92 | 10 |
| 6 | 80 | 5 |
| 7* | 85 | 10 |
| 8 | 78 | 10 |
| 9 | 85 | 17 |
| 10 | 80 | 15 |
| 11* | 85 | 10 |
| 12* | 85 | 10 |
| 13 | 85 | 3 |

* Puntos centrales

La adecuación del modelo matemático se determinó utilizando el coeficiente R^2 . La significancia de los coeficientes de regresión del modelo se evaluó mediante análisis de varianza.

Se realizaron gráficas tridimensionales de la superficie de respuesta para la interpretación gráfica de los efectos de la interacción de las variables independientes sobre la respuesta obtenida, también se elaboraron gráficas de contorno para representar la extrapolación e interpretar la optimización de las variables de extracción, para lo cual se utilizó el programa SigmaPlot 12.0 software de gráficos (SYSTAT Software Inc., San Jose, CA, Estados Unidos). La validez del modelo se determinó comparando los valores predichos con los datos experimentales.

6.9. Análisis estadístico

Los resultados, tanto del tratamiento óptimo de termoultrasonido como los convencionales, se analizaron realizando un análisis unidireccional de varianza (ANOVA). Para la prueba de reproducibilidad del estudio se utilizó el análisis de medias utilizando la prueba t – student para una muestra. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado y las diferencias entre las medias (\pm desviación estándar; DE), fueron analizadas con una prueba Duncan con una confiabilidad del 95 %, utilizando el paquete estadístico SPSS versión 15.0, Sistema SPSS® para WIN™ (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

VII. Resultados y Discusión

7.1. Determinación del contenido de humedad

Una condición para la extracción eficiente del aceite, es la humedad inicial de las semillas, la cual debe ser inferior a 12 % de humedad de base seca (Martínez y Ceballos, 2012). El contenido medio de humedad de las semillas de tuna evaluadas, en base seca, fue de 6.43 ± 0.08 %, por lo cual no hubo necesidad de liofilizar la semilla antes de realizar las extracciones del aceite. Este porcentaje de humedad es comparable con el de las semillas de pitaya (6.9 %; Chemah y col., 2010), uva (6.3 %; Ghafoor y col., 2009; 6.2 %; Ghafoor y col., 2012), linaza (6 %; Zhang y col., 2008) y tabaco (5.5 %; Stanisavljević y col., 2007).

7.2. Rendimiento de recuperación del aceite extraído por termoultrasonido

La Tabla 10 muestra los resultados del rendimiento del aceite extraído por los trece tratamientos de termoultrasonido.

El rendimiento del aceite de semillas, extraído por los diferentes tratamientos con termoultrasonido, osciló entre 3.75 y 6 %. Se observa que el máximo rendimiento se obtuvo con la combinación de una amplitud alta de 92 % y un tiempo de 10 min (tratamiento 5).

En términos de porcentaje de amplitud, Bimakr y col. (2012) obtuvieron resultados similares a los de este estudio, cuando optimizaron las condiciones de extracción asistida por ultrasonido del aceite de semillas en melón chino, ya que adquirieron un mayor rendimiento de recuperación con un porcentaje de 75 %, siendo éste el límite superior que utilizaron (106.5 mg de extracto/g de materia seca).

En todas las extracciones, el rendimiento del aceite fue dependiente del porcentaje de amplitud utilizado, ya que a mayor porcentaje de amplitud mayor fue el rendimiento. Esto puede ser debido a que, al utilizar una amplitud alta se produce

con más intensidad el fenómeno de cavitación (Azuola y Vargas, 2007), el cual induce cambios en la estructura física de la semilla, rompiendo sus paredes celulares, reduciendo su tamaño y aumentando el área de exposición, facilitando así la penetración del disolvente y con ello la extracción del aceite (Stanisavljević y col., 2007; Zhang y col, 2008; Anise y col., 2013; Goula, 2013; Tian y col., 2013).

Tabla 10. Rendimiento del aceite recuperado de semillas de tuna extraído por termoultrasonido.

| Tratamiento | Condiciones de extracción | | Rendimiento (%) |
|-------------|---------------------------|--------------|-----------------|
| | Amplitud (%) | Tiempo (min) | |
| 1 | 85 | 10 | 5.75 ± 0.03 |
| 2 | 90 | 5 | 4.15 ± 0.01 |
| 3 | 90 | 15 | 4.85 ± 0.02 |
| 4 | 85 | 10 | 5.25 ± 0.01 |
| 5 | 92 | 10 | 6.00 ± 0.06 |
| 6 | 80 | 5 | 5.25 ± 0.01 |
| 7 | 85 | 10 | 3.75 ± 0.00 |
| 8 | 78 | 10 | 5.40 ± 0.10 |
| 9 | 85 | 17 | 5.60 ± 0.06 |
| 10 | 80 | 15 | 5.40 ± 0.00 |
| 11 | 85 | 10 | 5.75 ± 0.00 |
| 12 | 85 | 10 | 5.30 ± 0.10 |
| 13 | 85 | 3 | 5.50 ± 0.10 |

Por otro lado la máxima ruptura de la semilla de tuna se alcanzó hasta los 10 min, en donde se consiguió el mayor rendimiento (Tabla 10), por lo que también se observó que el tiempo de extracción es una variable importante para el rendimiento, no obstante, a un punto dado, deja de ser influyente en la recuperación del aceite, ya que Zhang y col. (2005), quienes estudiaron la extracción asistida por ultrasonido de aceite de semillas de pino coreano, señalan que el rendimiento es más alto conforme incrementa el tiempo de extracción, sin embargo cuando llega a un punto máximo se equilibra y después empieza a decrecer gradualmente. Esto puede deberse a que las paredes celulares de las semillas, son fracturadas completamente en un primer periodo de tiempo del efecto de cavitación, permitiendo la mayor liberación de los

compuestos y la transferencia del aceite de la semilla al disolvente (Zhang y col, 2008; Goula, 2013; Tian y col., 2013).

7.3. Actividad antioxidante del aceite extraído por termoultrasonido

Se ha reportado que las semillas de tuna tienen propiedades antioxidantes, debido a la presencia de compuestos fenólicos y algunos ácidos grasos (Dawidowicz y col., 2006; Elfalleh y col., 2012). Sin embargo, no hay estudios que reporten la actividad antioxidante del aceite de semillas de tuna extraído por termoultrasonido. Los valores de actividad antioxidante del aceite de semillas de tuna, evaluada por las determinaciones de capacidad de captación de los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•], extraído por termoultrasonido, se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Actividad antioxidante del aceite de semillas de tuna extraído por termoultrasonido bajo diferentes condiciones.

| Tratamiento | Condiciones de extracción | | Actividad antioxidante | |
|-------------|---------------------------|--------------|------------------------|---------------|
| | Amplitud (%) | Tiempo (min) | ABTS | DPPH |
| | | | mgEAA/100 g | µmolET/100 g |
| 1 | 85 | 10 | 66.15 ± 4.07 | 246.10 ± 0.92 |
| 2 | 90 | 5 | 55.98 ± 3.13 | 141.76 ± 3.90 |
| 3 | 90 | 15 | 59.93 ± 4.45 | 167.02 ± 1.14 |
| 4 | 85 | 10 | 68.12 ± 6.59 | 236.01 ± 3.22 |
| 5 | 92 | 10 | 55.84 ± 2.36 | 101.63 ± 4.68 |
| 6 | 80 | 5 | 66.07 ± 2.17 | 267.07 ± 7.37 |
| 7 | 85 | 10 | 68.37 ± 3.92 | 245.05 ± 2.37 |
| 8 | 78 | 10 | 65.99 ± 5.01 | 289.26 ± 0.26 |
| 9 | 85 | 17 | 65.78 ± 0.37 | 260.09 ± 1.33 |
| 10 | 80 | 15 | 66.91 ± 3.20 | 284.96 ± 0.93 |
| 11 | 85 | 10 | 67.73 ± 0.40 | 277.55 ± 1.71 |
| 12 | 85 | 10 | 67.44 ± 3.89 | 245.08 ± 2.92 |
| 13 | 85 | 3 | 67.63 ± 0.00 | 250.05 ± 1.99 |

Se puede apreciar que los valores de actividad antioxidante se encontraron entre 55.84 y 68.37 mgEAA/100 g para la determinación de ABTS; y 101.63 y 289.26 µmolET/100 g para la prueba de DPPH. En comparación con el rendimiento de

extracción, la actividad antioxidante fue mayor con las combinaciones de una amplitud de 85 % y un tiempo de 10 min (tratamiento 7) para la determinación de ABTS, y de 78 % y 10 min (tratamiento 8) para la determinación de DPPH. Esto se debe al efecto que tienen las condiciones de extracción por termoultrasonido utilizadas, sobre la actividad antioxidante del aceite.

7.4. Efecto de las condiciones de extracción de termoultrasonido sobre la actividad antioxidante del aceite de semillas de tuna

Para evaluar los efectos de las condiciones de extracción de aceite de semillas de tuna, por termoultrasonido, sobre la actividad antioxidante, se realizaron gráficas tridimensionales de superficie de respuesta, las cuales se exponen en la Figura 11. Se observa que el porcentaje de amplitud, fue la condición que influyó sobre la actividad antioxidante del aceite en ambas determinaciones (ABTS y DPPH), es decir, mientras mayor es el porcentaje de amplitud menor es la actividad antioxidante que presenta el aceite.

En cuanto al tiempo, en la Figura 11 se puede apreciar que éste tuvo un comportamiento lineal independientemente del porcentaje de amplitud utilizado para cada tratamiento. Esto quiere decir que la aplicación del tiempo no afectó la actividad antioxidante del aceite, ya sea por la determinación de ABTS o DPPH, ya que esta se mantuvo constante a pesar del aumento o disminución del tiempo empleado para la extracción.

Como se mencionó anteriormente, en este estudio se manejó un modelo polinomial de segundo orden para predecir la actividad antioxidante del aceite, mediante un análisis de regresión lineal múltiple de los datos experimentales, y se utilizó R^2 para considerar la adecuación del modelo. El valor de R^2 debe ser tan cerca como sea posible de la unidad y al menos de 0.80 para asegurar un buen ajuste del modelo (Ho y col., 2014).

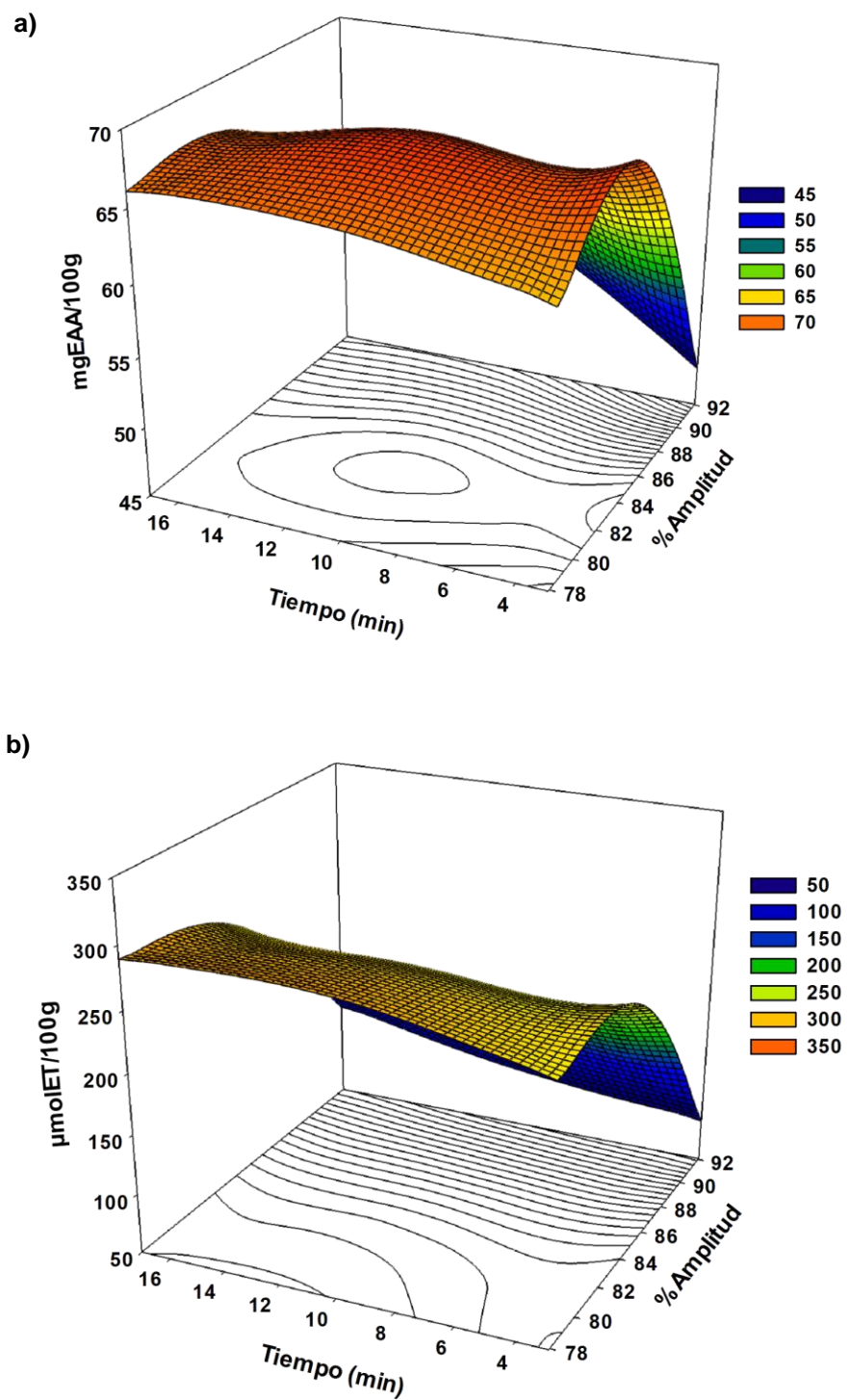


Figura 11. Efectos de los tratamientos de termoultrasonación sobre la actividad antioxidante por a) ABTS y b) DPPH del aceite de semilla.

Los valores de R^2 para las determinaciones de ABTS y DPPH, mostrados en la Tabla 12; fueron de 0.93 y 0.96, respectivamente, lo que indica que los promedios obtenidos en el estudio se ajustaron al modelo matemático de superficie de respuesta.

Tabla 12. Coeficientes de regresión de las condiciones de extracción por termoultrasonido sobre la actividad antioxidante.

| Coeficiente | ABTS | DPPH |
|-------------|------------------------|------------------------|
| a_0 | 67.562964 ^a | 249.96199 ^a |
| a | -3.927762 ^b | -63.57459 ^a |
| t | 0.2724311 | 7.1702572 |
| at | 0.77572 | 1.8421052 |
| aa | -3.719624 ^b | -29.77102 ^b |
| tt | -0.826106 | 0.0425804 |
| R^2 | 0.93 | 0.96 |

a : porcentaje de amplitud; t : tiempo; Niveles de significancia: ^a, $p < 0.0001$; ^b, $p < 0.001$; ^c, $p < 0.01$; ^d, $p < 0.05$.

Los coeficientes de regresión y las probabilidades significativas de los efectos lineales, cuadráticos y de interacción de las variables de respuesta sobre la actividad antioxidante del aceite, se presentan en la Tabla 12.

La amplitud influyó significativamente en la actividad antioxidante del aceite en su término lineal (< 0.0001 DPPH y < 0.001 ABTS) así como cuadrático (< 0.001 DPPH y ABTS), por lo cual la actividad antioxidante es sensible al porcentaje de amplitud; lo que se explicó anteriormente en la Figura 11.

Para determinar las condiciones óptimas de las variables de extracción de aceite de semillas de tuna por termoultrasonido, con una elevada actividad antioxidante, se realizó una superposición de las gráficas tridimensionales de superficie de respuesta expuestas en la Figura 11.

7.5. Optimización de las condiciones para la extracción de aceite de semillas de tuna por termoultrasonido

Las condiciones óptimas de extracción fueron seleccionadas de acuerdo a la superposición de las gráficas tridimensionales de superficie de respuesta, en las cuales, se observa el efecto de las variables de extracción sobre la actividad antioxidante del aceite de semillas de tuna recuperado por termoultrasonido.

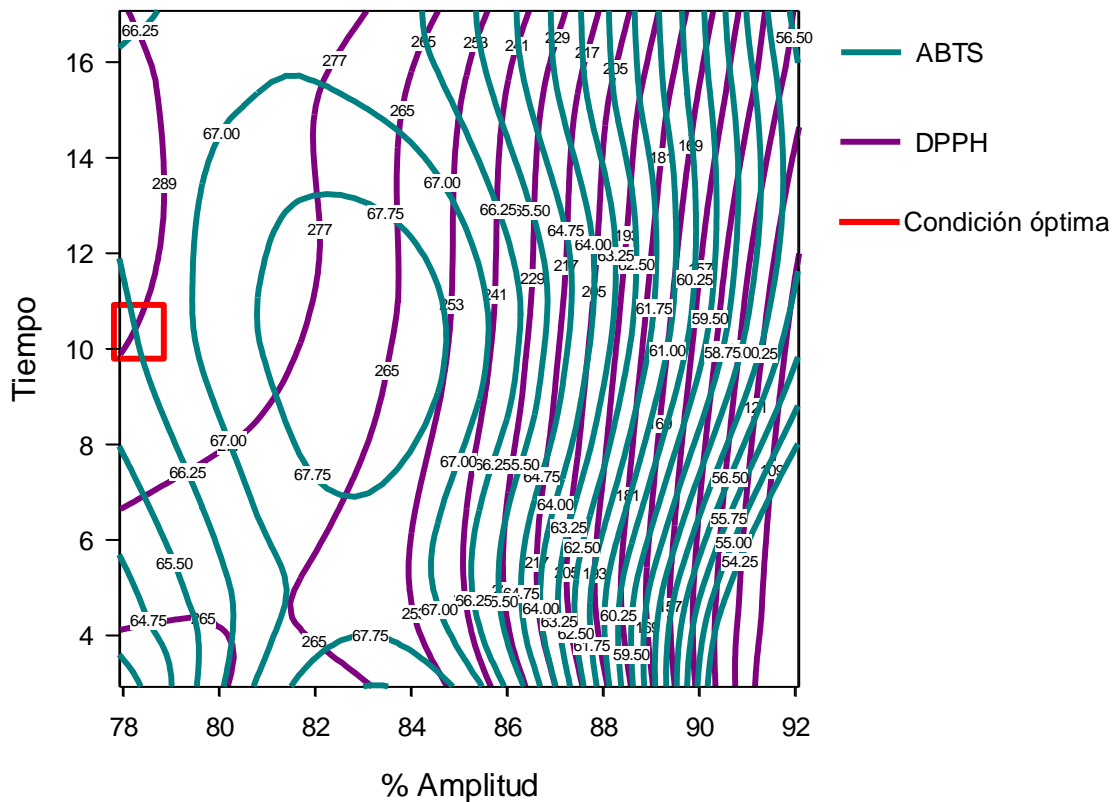


Figura 12. Condiciones óptimas de la termoultrasonificación para la extracción de aceite de semillas con elevada actividad antioxidante.

La Figura 12 muestra la optimización de la extracción por termoultrasonido del aceite de semillas, donde se consideró los valores más altos de actividad antioxidante adquiridos por las determinaciones de ABTS y DPPH. Los resultados obtenidos señalan que una amplitud de 78% y un tiempo de 10 min (tratamiento 8), son las condiciones óptimas para extraer el aceite de las semillas. En la zona óptima, los

valores de la actividad antioxidante fueron de 66.25 mgEAA/100 g aceite y 289 μ molET/100 g de aceite para ABTS y DPPH, respectivamente.

En base a los datos obtenidos, se realizó una extracción bajo las condiciones antes mencionadas (78 % amplitud; 10 min), con el fin de comprobar la reproducibilidad de este trabajo.

7.6. Reproducibilidad del modelo

En la Tabla 13 se exponen los valores predichos por el modelo de superficie de respuesta y los obtenidos en el análisis experimental.

Tabla 13. Reproducibilidad del modelo de superficie de respuesta

| Determinación | Valores predichos | Valores experimentales |
|---------------|--------------------|------------------------|
| ABTS | 66.25 ^a | 48.38 ^b |
| DPPH | 289 ^a | 202.13 ^b |

^{a,b}Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos de acuerdo a la prueba t – student para una muestra.

Se percibe que los valores experimentales de la actividad antioxidante por ambas determinaciones (ABTS y DPPH) fueron significativamente menores ($p < 0.05$) con respecto a los valores predichos por el modelo de superficie de respuesta.

7.7. Comparación del rendimiento, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana del aceite obtenido por los diferentes métodos de extracción

Como ya se mencionó anteriormente, los métodos que emplean disolventes han sido considerados como métodos estándares para la extracción de aceites. Los más comúnmente utilizados son el método de Soxhlet y el método de maceración (Bimakr y col., 2012), por lo que en este estudio se comparó la extracción optimizada de termoultrasonido con los métodos de Soxhlet y maceración, en términos de

rendimiento de extracción, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana del aceite de semillas de tuna.

7.7.1. Rendimiento de extracción

La comparación del rendimiento de aceite recuperado por termoultrasonido y los métodos convencionales se muestra en la Figura 13. Se ha comprobado mediante distintos estudios que la extracción asistida por ultrasonido es más eficiente que la extracción por métodos tradicionales (Azuola y Vargas, 2007; Goula, 2013), sin embargo los resultados de este estudio, indicaron que el rendimiento del aceite extraído por termoultrasonido fue significativamente menor que el obtenido por el método de Soxhlet y el recuperado por el método de maceración, con valores de 5.11 ± 0.46 %, 7.49 ± 0.00 % y 5.72 ± 0.15 %, respectivamente.

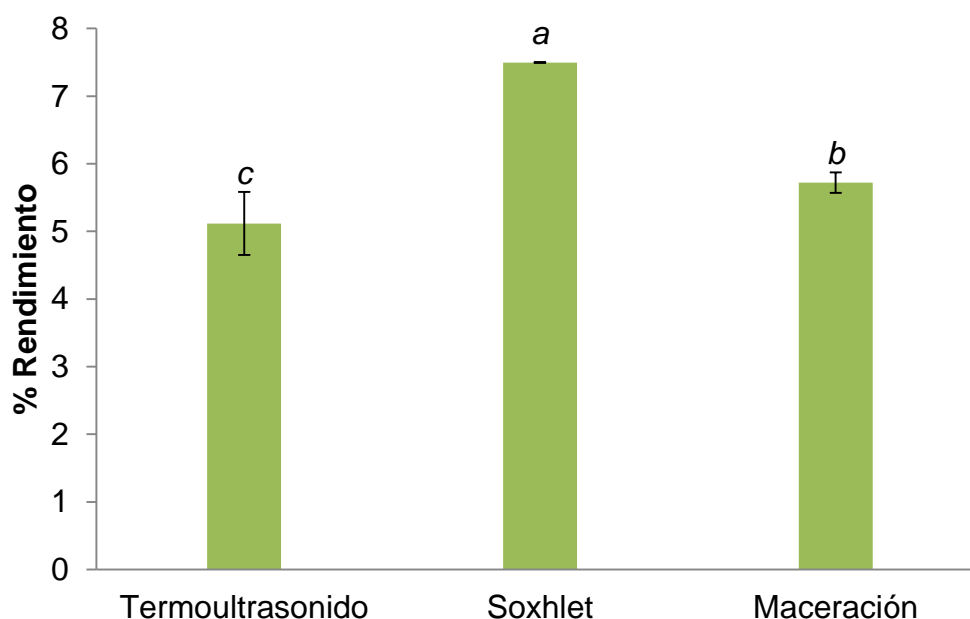


Figura 13. Rendimiento de extracción de aceite por los diferentes métodos de extracción. *a, b, c* Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

A diferencia de estos resultados, Goula (2013) obtuvo un mayor rendimiento con el método de extracción asistida por ultrasonido que con los convencionales, esto

puede ser debido al tipo de ultrasonido que utilizó para la extracción del aceite de semillas de granada, ya que, a comparación del utilizado en este estudio, no es un equipo cerrado y la muestra estuvo en contacto directo con el hexano al aplicarse la sonicación.

A pesar de los métodos utilizados para la extracción, los porcentajes de los aceites obtenidos son similares con los reportados en otros estudios realizados en las semillas de tuna de *Opuntia ficus indica* de 4.58 % (Labuschagne y Hugo, 2010), 5.5 % (Tlili y col., 2011), 6.5 % (Zine y col., 2013), sin embargo fueron menores a los de 8.4 % (Chougui y col., 2013), 8.93 % (Matthäus y Özcan, 2011) y 9.7 % (Yeddes y col., 2012).

Las diferencias en el contenido pueden ser debidas a las condiciones climáticas, ya que los factores medioambientales, tales como luz, temperatura y estrés hídrico, afectan los niveles de aceite (Matthäus y Özcan, 2011; Tlili y col., 2011). Otros factores que afectan son el lugar de origen (Zine y col., 2013), el cultivo y el método y las condiciones de extracción empleadas para su obtención (Ramadan y Mörsel, 2003; Yeddes y col., 2012). Los factores más importantes a considerar en este contexto, son las diferencias en las condiciones del proceso de extracción del aceite.

a) Tiempo de extracción

Como ya se mencionó anteriormente, el mayor rendimiento de aceite fue obtenido por el método de Soxhlet, esto se debe a que este método convencional mantiene la muestra en continuo contacto con el disolvente por un largo periodo de tiempo (4 – 6 horas), realizando ciclos repetidos de lavado de la muestra, con el fin de lograr la extracción de la mayor parte de la materia grasa (Kirk y col., 2002).

Mientras que, en la extracción por termoultrasonido, se obtuvo el menor rendimiento de aceite (5.11 %), lo cual se puede atribuir al corto tiempo en el que se lleva a cabo la extracción por este método, sin embargo es similar con el obtenido por el método de maceración (5.72 %), a pesar de que este último emplea un largo periodo de

tiempo para la extracción del aceite (24 horas). Por lo antes mencionado, puede decirse que el tiempo, por sí solo, no es una condición influyente para la extracción del aceite.

b) Porcentaje de amplitud

En cuanto a la frecuencia de generación de las ondas sonoras (porcentaje de amplitud), en comparación con los métodos convencionales utilizados, en el fenómeno de cavitación, los efectos de vibración mecánica, para la generación de estas ondas en un medio líquido, pueden incrementar la efectividad de transferencia de masa, que mejora la eficiencia de la extracción (Ashokkumar y col., 2010). Es decir, como la onda ultrasónica viaja a través del medio líquido a alta amplitud, crecen y colapsan más burbujas en un corto tiempo, lo cual facilita la rehidratación del tejido, causando un agrandamiento de los poros de las paredes celulares, acelerando su ruptura y facilitando la penetración del disolvente (Vinatoru, 2001; Azuola y Vargas, 2007; Zhang y col., 2008). Lo cual indica que se pudo haber obtenido una mayor cantidad de aceite de las semillas con este método en menor tiempo comparado con los métodos de Soxhlet y maceración.

c) Temperatura

Samaram y col. (2013), quienes compararon el rendimiento del aceite de semillas de papaya por extracción asistida por ultrasonido y extracción por disolventes, encontrando un mayor porcentaje de recuperación de aceite con el método de Soxhlet; indican que una temperatura elevada incrementa el porcentaje del aceite recuperado. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el mayor rendimiento de aceite fue extraído por el método de Soxhlet, por lo que son comparables con los obtenidos por Samaram y col. (2013).

Sin embargo, durante el proceso de sonicación, las burbujas generadas en el fenómeno de cavitación incrementan la difusión de gases, debido al ciclo de compresión y expansión, los cuales hacen que la burbuja se expanda hasta alcanzar

un punto en donde la energía proporcionada por el ultrasonido no es suficiente para retener la fase de vapor en la burbuja, produciendo una rápida condensación. Las moléculas condensadas colisionan violentamente, creando un choque de ondas, que ocurren en un tiempo muy corto ($< 1 \mu\text{s}$). Este choque crea regiones de muy alta temperatura y presión que alcanza hasta $5,000 \text{ }^\circ\text{C}$ y $50,000 \text{ kPa}$ (Piyasena y col., 2003; Ashokkumar y col., 2010). Lo que indica que se puede obtener un porcentaje alto de aceite por este método.

No obstante, Zhang y col. (2008), quienes evaluaron la extracción asistida por ultrasonido del aceite de semillas de linaza, encontraron que las burbujas pueden colapsar fácilmente a temperaturas altas, reduciendo así la intensidad de la mejora de la transferencia de masa. Por otro lado Zhang y col. (2005), al estudiar las condiciones de la extracción asistida por ultrasonido en el aceite de semillas de pino coreano, encontraron que una temperatura elevada puede ser una desventaja para la estabilidad de los ácidos grasos insaturados, decreciendo la calidad del aceite y deteriorando los fitonutrientes presentes en él.

Es por lo anterior que, en este estudio la extracción del aceite se realizó a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, regulada mediante un recipiente de doble capa, razón por la cual es posible que se obtuviera aceite en menor cantidad que con el método Soxhlet. También es probable que al no utilizar temperaturas elevadas, la calidad de los ácidos grasos y el contenido de fitonutrientes de los aceites obtenidos por los métodos de termoultrasonido y maceración, sea mejor que el extraído por método de Soxhlet. Sin embargo es necesario realizar más estudios para comparar la calidad de los ácidos grasos del aceite de semillas de tuna recuperado por los diferentes métodos de extracción.

7.7.2. Actividad antioxidante

Los métodos para la determinación de actividad antioxidante, se basan en distintos sistemas generadores de radicales libres. Debido a la complejidad de los procesos

de oxidación, no existe un método que refleje completamente el perfil antioxidante de una muestra, por lo que es ideal trabajar con varios métodos (Agudo, 2010). Es por ello que en este estudio se utilizaron los métodos de ABTS y DPPH, los cuales pueden realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles (Agudo, 2010; Kedare y Singh, 2011; Elfalleh y col., 2012).

En la Figura 14, se expresan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método de capacidad de captación del radical ABTS^{•+}, del aceite obtenido por los diferentes métodos de extracción. Los resultados indicaron que el aceite obtenido por el método de termoultrasonido mostró un valor de actividad antioxidante significativamente menor (45.40 ± 0.67 mgEAA/100 g), que el obtenido por el método de Soxhlet (54.33 ± 0.84 mgEAA/100 g), mientras que con el del método de maceración no se observaron diferencias significativas (45.40 ± 0.50 mgEAA/100 g).

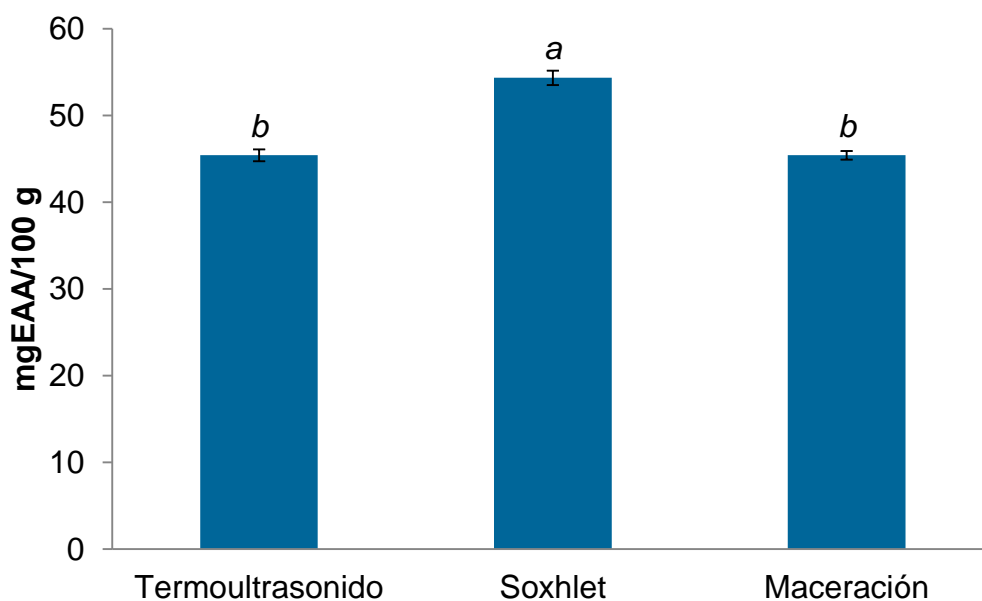


Figura 14. Actividad antioxidante por la determinación de ABTS del aceite de semilla de tuna verde extraído por los diferentes métodos. *a, b, c* Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

En cuanto a la actividad antioxidante determinada por el método de DPPH, el aceite extraído por termoultrasonido presentó un valor significativamente mayor ($183.88 \pm$

2.04 $\mu\text{molET}/100\text{ g}$) que el del aceite obtenido por maceración (155.89 ± 2.54 $\mu\text{molET}/100\text{ g}$), pero significativamente menor que el del aceite recuperado por Soxhlet (266.60 ± 1.97 $\mu\text{molET}/100\text{ g}$), tal como se muestra en la Figura 15.

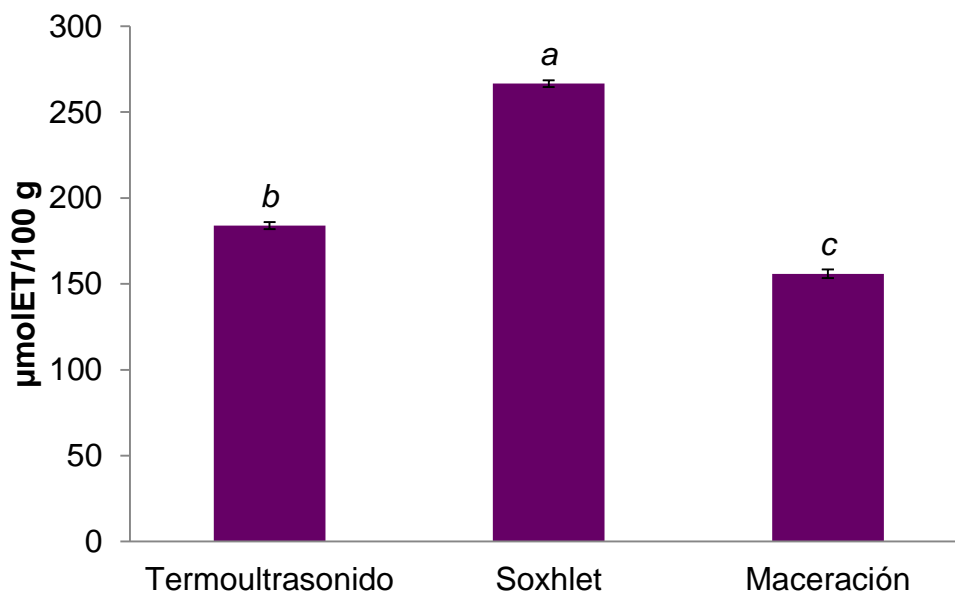


Figura 15. Actividad antioxidante por la determinación de DPPH del aceite de semilla de tuna verde extraído por los diferentes métodos. *a, b, c* Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Por el contrario de los resultados obtenidos en este estudio, observados en las Figuras 14 y 15, Bimakr y col. (2012), encontraron que el aceite de semilla de melón chino, recuperado por extracción asistida por ultrasonido, mostró valores mayores de actividad antioxidante que los adquiridos por el método de Soxhlet. Esto puede ser debido al tipo de ultrasonido que utilizaron en ese estudio para la extracción del aceite, ya que en comparación con el utilizado en esta investigación, no es un equipo cerrado y la muestra estuvo en contacto directo con el hexano al aplicarse la sonicación.

Por otro lado, considerando la frecuencia de generación de las ondas sonoras, cuando una onda de ultrasonido de gran amplitud, se mueve a través del disolvente, se crean y colapsan más burbujas. Bajo estas condiciones se puede promover la

liberación de compuestos con propiedades antioxidantes, por lo que la naturaleza y el nivel de estos compuestos dependen del % de amplitud utilizado (Da Porto y col., 2013). Sin embargo, también se pueden presentar cambios significativos en la composición del aceite debido al tratamiento ultrasónico utilizado (Chemat y col., 2004b; Jiménez y col., 2007).

Los efectos biofísicos del ultrasonido en soluciones acuosas son clasificados como efectos térmicos, de cavitación y efectos directos (Jana y col., 1990). El colapso de las burbujas en un periodo corto de tiempo, conduce a la acumulación de energía momentánea, donde la temperatura está por encima de los 5,000 °C y presiones de aproximadamente 50,000 kPa (Piyasena y col., 2003; Chemat y col., 2004c; Ashokkumar y col., 2010).

Este fenómeno puede causar la oxidación lipídica a través de tres mecanismos, los cuales pueden actuar solos o combinados. El primer mecanismo es puramente térmico, debido a las altas temperaturas originadas por la cavitación (Piyasena y col., 2003; Chemat y col., 2004c; Ashokkumar y col., 2010). El segundo es debido a la generación de radicales libres por sonolisis, y el tercero debido a las fuerzas mecánicas creadas por las microcorrientes y colapso de las ondas (Chemat y col., 2004c).

En cuanto al mecanismo térmico, es probable que al acumularse la energía causada por la cavitación, elevándose momentáneamente la temperatura a 5,000 °C, ocurriera la degradación de los compuestos bioactivos presentes en el aceite que son termosensibles (Bimakr y col., 2012), es decir la autooxidación de ácidos grasos, principalmente los ácidos linoleico y oleico, disminuyendo su concentración y expresando menor actividad antioxidante que con el método de Soxhlet.

Por otro lado, la aplicación de ultrasonificación a un medio líquido puede conducir a la formación de radicales libres, que pueden, o no ser, benéficos. El agua puede ser dividida, por el fenómeno de sonolisis, en OH^- y H^+ y se puede producir peróxido de hidrógeno (Earnshaw, 1998). Es posible que al aplicar la termoultrasonificación, para

la extracción del aceite, ocurrió la oxidación de algunos de sus componentes antioxidantes por los radicales OH^- y H^+ , ácidos grasos principalmente, presentando menor actividad antioxidante que el obtenido por el método de Soxhlet.

El aceite extraído por termoultrasonido mostró un valor significativamente mayor de actividad antioxidante por DPPH, que el adquirido del aceite por maceración (Figura 16), lo cual indica que, a pesar de la oxidación de una parte importante de compuestos bioactivos, generada a partir de los efectos biofísicos de la termoultrasonificación, la cantidad de compuestos antioxidantes aún presentes en el aceite de semillas de tuna, extraído por termoultrasonido, es mayor que los presentes en el aceite obtenido por maceración. Sin embargo, también es importante conocer la composición de dichos aceites, así como la concentración de sus componentes, por lo que se requiere realizar estudios posteriores.

7.7.3. Actividad antimicrobiana

Los agentes antimicrobianos tienen como principal objetivo, ejercer una acción letal (Calvo y Martínez – Martínez, 2009) o simplemente inhibir el crecimiento de microorganismos presentes en el alimento, por medio del control en los procesos naturales del deterioro de alimentos. Actualmente se sabe que los aceites tienen un uso potencial en los alimentos, especialmente en frutas y vegetales frescos, pueden llegar a convertirse en una alternativa natural para reducir, o suplir a los agentes antimicrobianos sintéticos en la industria alimentaria (Fisher y Phillips, 2008).

Estudios actuales reportan que los aceites son efectivos contra bacterias patógenas Gram negativas y Gram positivas, al igual que contra mohos, levaduras y algunos mohos que producen micotoxinas (Salman y col., 2008; Kesari y col., 2010; Reyes – Jurado y col., 2014). En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana contra dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y una Gram positiva (*Staphylococcus aureus*).

En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana del aceite de semillas de tuna, extraído por los diferentes métodos. Se observó que los aceites extraídos por los tres métodos, presentaron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana del aceite de semillas de tuna extraído por los diferentes métodos.

| | Diámetro de zona de inhibición (mm) | | |
|--|-------------------------------------|--------------|-----------|
| | Aceite | Control + | Control - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram positiva) | | | |
| Termoultrasonido | 9.17 ± 0.29 ^a | 18.89 ± 1.54 | ND |
| Soxhlet | 9.50 ± 0.87 ^a | 18.78 ± 1.64 | ND |
| Maceración | 9.78 ± 0.69 ^a | 18.11 ± 1.17 | ND |
| <i>Escherichia coli</i> (Gram negativa) | | | |
| Termoultrasonido | 7.78 ± 0.19 ^a | 15.56 ± 2.12 | ND |
| Soxhlet | 7.56 ± 0.19 ^a | 15.33 ± 2.65 | ND |
| Maceración | 7.56 ± 0.38 ^a | 14.00 ± 2.33 | ND |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram negativa) | | | |
| Termoultrasonido | ND | 12.56 ± 0.38 | ND |
| Soxhlet | ND | 12.22 ± 0.38 | ND |
| Maceración | ND | 12.78 ± 0.38 | ND |

66.67 µL aceite; Control +: Ampicilina (Disco 10 µg; *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) y Estreptomina (Disco 10 µg; *Pseudomonas aeruginosa*); Control -: Hexano; ND: Inhibición no detectada; ± Desviación estándar; ^{a, b, c} Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05) entre tratamientos.

El aceite obtenido por maceración, mostró una mayor zona de inhibición (9.78 mm) sobre *Staphylococcus aureus* que los extraídos por Soxhlet (9.50 mm) y termoultrasonido (9.17 mm), los cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla 14).

Con lo que respecta a *Escherichia coli*, los resultados indicaron que el aceite termoultrasonido presentó una mayor zona de inhibición (7.78 mm) que los aceites extraídos por Soxhlet (7.56 mm) y maceración (7.56 mm). Estos resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí (Tabla 14).

El no encontrar diferencias estadísticamente significativas, puede ser debido a la similitud en la concentración de los compuestos de los aceites obtenidos por cada método, ya que las propiedades antimicrobianas son debidas a los compuestos químicos presentes en los aceites. Considerando la gran variabilidad de estos compuestos, es probable que la actividad antimicrobiana que presentaron se atribuya a una acción combinada de varios de ellos sobre partes localizadas de las células microbianas (Reyes – Jurado y col., 2014; Zekaria, 2015). Por lo que se requiere identificar los compuestos antimicrobianos presentes en el aceite en estudios posteriores.

Cabe mencionar que las zonas de inhibición del aceite contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, fueron menores que las de los controles positivos, tal como puede ser visto en la Tabla 14, lo cual indica que dichos microorganismos son resistentes al aceite de semillas de tuna.

Por otro lado, el aceite obtenido por los tres métodos no presentó actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* a las concentraciones utilizadas (Tabla 14). Esto puede deberse a que la actividad antimicrobiana del aceite depende principalmente de los componentes químicos presentes en el aceite, el tipo de microorganismo al que va a atacar y a las características propias de la bacteria (Livermore, 2002; Salman y col., 2008; Reyes – Jurado y col., 2014; Zekaria, 2015).

Es posible que los componentes del aceite obtenido en este estudio pudieron ejercer su acción en algunas de las estructuras o funciones bacterianas de *Escherichia coli*, por ejemplo, inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, bloqueando los mecanismos de resistencia, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis de proteínas, bloqueando la síntesis o las funciones de los ácido nucleicos o inhibiendo la actividad de ciertas enzimas presentes en las bacterias (Livermore, 2002; Reyes – Jurado y col., 2014).

Generalmente los aceites son ligeramente más activos frente a bacterias Gram positivas que frente a las Gram negativas, sin embargo hay bacterias Gram

negativas más resistentes, debido principalmente a que su membrana externa es menos permeable. Los lipopolisacáridos presentes en dicha membrana son los responsables de esta permeabilidad, los cuales restringen la difusión de compuestos (Viuda – Martos y col., 2011; Feás y col., 2013; Reyes – Jurado y col., 2014; Zekaria, 2015). Por lo tanto, es posible que *Pseudomonas aeruginosa* sea más resistente, comparada con *Escherichia coli*.

Aunque también es posible que las paredes celulares de *Pseudomonas aeruginosa*, pudieran haber sufrido cambios estructurales de la fase logarítmica a la fase estacional, logrando una estructura dinámica que se puede adaptar a los cambios fisiológicos (Lv y col., 2011). Otra posibilidad de resistencia por parte de esta bacteria es la sobre regulación de los sistemas de exclusión, lo cuales expulsan del interior de la bacteria a compuestos antimicrobianos antes de que estos causen alguna desorganización de las estructuras bacterianas (Poole, 2001).

Lo anterior no quiere decir que el aceite no tenga efecto contra este microorganismo, sino que pudiera haber un efecto retardado de la actividad antimicrobiana, por lo que para lograr el mismo efecto que en las otras bacterias, es posible que se requiera de un mayor tiempo de exposición al aceite o una mayor concentración de este (Reyes – Jurado y col., 2014).

También se evaluó la CMI de los aceites obtenidos por los diferentes métodos de extracción (Tabla 15). La CMI evalúa la cantidad mínima del agente antimicrobiano que impide el crecimiento visible de un número concreto de UFC del microorganismo (Reyes – Jurado y col., 2014).

Los valores de la CMI para *Escherichia coli*, de los aceites extraídos por termoultrasonido, Soxhlet y maceración fueron 28.74, 29.22 y 29.39 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectivamente, mientras que para *Staphylococcus aureus*, fueron de 13.03, 13.45 y 11.58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivamente, los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 15).

Tabla 15. Concentración mínima inhibitoria del aceite de semillas de tuna obtenido por los diferentes métodos de extracción.

| Microorganismo | Termoultrasonido | Soxhlet | Maceración |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 28.74 ± 1.16 ^a | 29.22 ± 1.17 ^a | 29.39 ± 0.39 ^a |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 13.03 ± 1.99 ^a | 13.45 ± 1.19 ^a | 11.58 ± 2.71 ^a |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ND | ND | ND |

CMI dada en µg/µL; ND: Inhibición no detectada; ± Desviación estándar; ^{a, b, c} Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05) entre tratamientos.

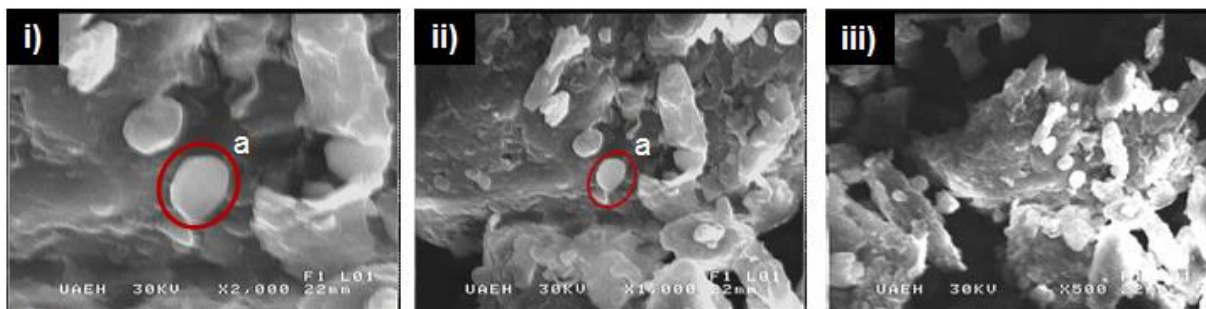
Staphylococcus aureus fue la bacteria más sensible al aceite de semillas de tuna (Tabla 15). Se ha reportado que las bacterias Gram negativas son más resistentes a antimicrobianos de origen vegetal, tal como los aceites, que las bacterias Gram positivas, esto puede deberse a las diferencias estructurales de las paredes celulares de la bacteria, anteriormente mencionadas (Viuda – Martos y col., 2011; Feás y col., 2013; Reyes – Jurado y col., 2014; Zekaria, 2015). *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva, por lo que una sola pared celular haciéndola más susceptible a la acción de los antimicrobianos.

7.8. Efecto de la termoultrasonificación sobre la estructura de la semilla de tuna evaluado por microscopía electrónica de barrido

Varios métodos de extracción producen cambios físicos distinguibles en el material estudiado (Chemat y col., 2004b), por lo que en este estudio, para entender el mecanismo del termoultrasonido utilizado para la extracción del aceite de semillas de tuna verde, se realizó una evaluación de la semilla por MEB.

Las micrografías del polvo de la semilla, antes y después de ser sometido al tratamiento por termoultrasonido, se muestran en las Figuras 16A y 16B respectivamente, a las magnificaciones de a) 2,000X, b) 1,000X y c) 500X; en las cuales se puede observar claramente el daño celular causado por el tratamiento de termoultrasonido, así como percibir las variaciones en la forma y tamaño de las partículas.

A)



B)

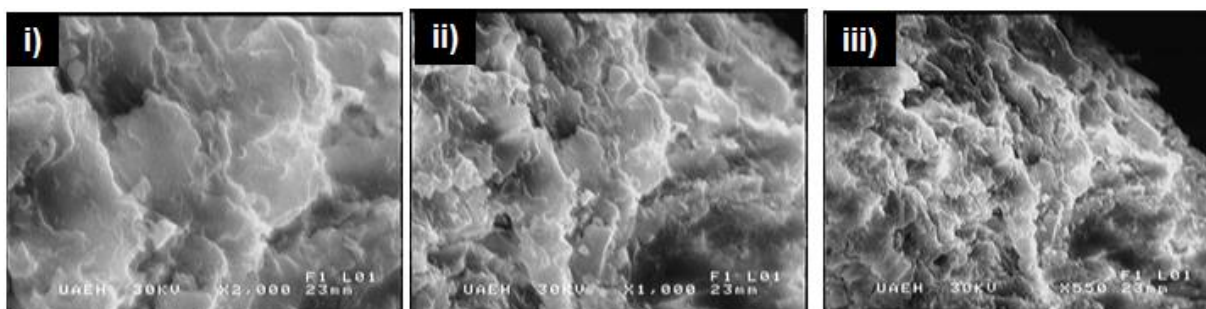


Figura 16. Micrografías de la estructura del polvo de la semilla de tuna A) antes y B) después del tratamiento por termoultrasonido. a) 2,000X, b) 1,000X, c) 500X. a. Gránulo de almidón.

En la Figura 16A se pueden identificar estructuras de la pared celular de la semilla integra, a pesar de la molienda previa. También se pueden apreciar algunos de los almidones bien definidos. A diferencia de ésta, en la Figura 16B se observan los cambios estructurales sobre la superficie del polvo, notándose que no hay partes celulares relevantes que puedan ser identificadas. Esto debido a que el fenómeno de cavitación, de la extracción por termoultrasonido, es capaz de fragmentar todas las estructuras de los tejidos celulares de la semilla (Earnshaw, 1998; Vinatoru, 2001).

Ho y col. (2014) obtuvieron resultados parecidos a los de este estudio cuando evaluaron las semillas de Misai Kucing, argumentado que las delgadas paredes celulares no son capaces de resistir el estrés causado por las condiciones de extracción por la ultrasonificación, principalmente a la presión y temperatura generadas por el colapso de las microburbujas de cavitación, y con ello facilitando el rompimiento de dichas estructuras.

Al igual que Ho y col. (2014), Li y col. (2012) y Zhang y col. (2008), evaluaron los efectos de la ultrasonicación sobre la microestructura de la semillas de isatide y linaza, respectivamente; encontrando que el procedimiento del ultrasonido rompe las estructuras de las semillas, y con ello mejora la eficiencia de la transferencia del aceite de la semilla al disolvente.

VIII. Conclusiones

El rendimiento de extracción del aceite por termoultrasonido, es proporcional al aplicar un mayor porcentaje de amplitud, independientemente del tiempo.

La actividad antioxidante del aceite obtenido por termoultrasonificación, es significativamente influida por el porcentaje de amplitud, aumentando al disminuir el porcentaje de amplitud. Se observa el mismo efecto en los dos métodos de evaluación de actividad antioxidante utilizados (ABTS y DPPH).

La metodología de superficie de respuesta permitió la optimización del proceso de extracción de aceite de semillas por termoultrasonido, con elevada actividad antioxidante. La condición óptima de proceso obtenida fue de 78 % de amplitud durante 10 min.

El rendimiento de extracción de aceite obtenido por termoultrasonido es un proceso eficaz ya que el tiempo requerido para realizar la extracción es menor, comparado con los métodos convencionales.

La actividad antioxidante por ABTS del aceite extraído por termoultrasonido, se comportó de manera similar ($p > 0.05$) al obtenido por maceración.

El aceite extraído por termoultrasonido presenta mayor actividad antioxidante por la determinación de DPPH comparado con el aceite por maceración.

La extracción de aceite por Soxhlet presenta mayor actividad antioxidante (ABTS y DPPH) comparado con termoultrasonido y maceración.

El aceite de semillas de tuna presenta actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, sin embargo no se observan diferencias significativas entre los métodos de extracción utilizados.

Los aceites obtenidos por los tres métodos de extracción no presentan inhibición contra *Pseudomonas aeruginosa*.

La MEB demuestra que la termoultrasonificación fragmenta la estructura de la semilla de tuna facilitando la extracción del aceite.

El termoultrasonido es un método alternativo para la extracción de aceite de semillas de tuna, teniendo ciertas ventajas en cuestión de tiempo de proceso que los métodos convencionales utilizados, y obteniendo un aceite que conserva sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, las cuales pueden ser utilizadas con fines alimenticios favoreciendo la salud humana.

IX. Recomendaciones

Al realizar la extracción de aceite de semillas de tuna por termoultrasonido se obtiene una fase acuosa, la cual podría poseer actividad antioxidante, por lo que es necesario evaluar su actividad antioxidante así como su actividad antimicrobiana.

Se sugiere realizar más determinaciones de actividad antimicrobiana sobre *Pseudomonas aeruginosa* utilizando concentraciones más elevadas de aceite.

Se recomienda determinar la composición del aceite para identificar los compuestos que presentan las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del aceite, identificar los componentes que pudieran afectar la utilización de este aceite en la industria alimentaria como aditivo alimenticio, tal como la presencia y concentración de metales, así como realizar pruebas toxicológicas de dicho aceite.

X. Referencias

- Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H. E. y El – Hamahmy, R. M. (2007). Egyptian mango by – product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103, 1141 – 1152.
- Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Lei, S., Khan, M. A. y Zeng, X. (2014). Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics sonochemistry*, 21, 984 – 990.
- Adam, F., Abert – Vian, M., Peltier, G. y Chemat, F. (2012). “Solvent – free” ultrasound – assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A Green, clean and scalable process. *Bioresource Technology*, 114, 457 – 465.
- Aday, M. S., Temizkan, R., Büyükcan, B. y Caner, C. (2012). An innovative technique for extending shelf life of strawberry: Ultrasound. *LWT – Food Science and Technology*, 30, 1 – 9.
- Agudo, M. L. 2010. Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. Recuperado en: http://www.anpebadajoz.es/autodidacta/autodidacta_/numero_9_archivos/l_a_medina.pdf archivos
- Aguirre, J. J., De la Gaza, T. H., Zugasti, C. A., Belmares, C. R. y Aguilar, C. N. (2013). The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus – indica*) skin in reflux system using response surface methodology. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3, 436 – 442.
- Al – Juhaimi, F. y Özcan, M. M. (2013). Determination of some mineral contents of prickly pear (*Opuntia ficus – indica* L.) seed flours. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, 3659 – 3663.
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P. y Mason, T. J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 261 – 265.

- Allaf, T., Tomao, V., Ruiz, K. y Chemat, F. (2013). Instant controlled pressure drop technology and ultrasound assisted extraction for sequential extraction of essential oil and antioxidants. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 239 – 246.
- Allahghadri, T., Rasooli, I., Owlia, P., Nadooshan, M. J., Ghazanfari, T., Taghizadeh, M. y Alipoor, A. S. D. (2010). Antimicrobial property, antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. *Journal of Food Science*, 75, 54 – 61.
- Anise, M., Mirolo, G., Beralda, P. y Lippe, G. (2013). Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene *in vitro* bioaccessibility. *Food Chemistry*, 13, 458 – 463.
- AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th ed. Gaithersburg, MD: AOAC international.
- Ara, K. M., Karami, M. y Raofie, F. (2014). Application of response surface methodology for the optimization of supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound – assisted extraction of *Capparis spinosa* seed oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, 85, 173 – 182.
- Ashokkumar, M., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., Lee, J., Palmer, M. y Zisu, B. (2010). The ultrasonic processing of dairy products – An overview. *Dairy Science and Technology*, 90, 147 – 168.
- Aybastier, Ö., Işık, E., Şahin, S. y 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.
- Azuola, R. y Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en marcha*, 20, 30 – 40.
- Bensadón, S., Hervert – Hernández, D., Sáyago – Ayerdi, S. G. y Goñi, I. (2010). By – Products of *Opuntia ficus – indica* as a Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 210 – 216.
- Bhatt, M. R. y Nagar, P. S. (2013). Evaluation of physicochemical property and fatty acid composition of *Opuntia elatior* seed oil. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 15, 13 – 19.

- Bimarkr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Adzahan, N. M., Sarker, M. Z. I. y Ganjloo, A. (2012). Optimization of ultrasound – assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa hispida*) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition. *Molecules*, 17, 11748 – 11762.
- Boukeloua, A., Belkhiri, A., Djerrou, Z., Bahri, L., Boulebda, N. y Hamidi, P. Y. 2012. Acute toxicity of *Opuntia ficus indica* and *Pistacia lentiscus* seed oils in mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 9: 607 – 611.
- Cai, W., Gu, X. y Tang, J. (2008). Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. *Carbohydrate Polymers*, 74, 403 – 410.
- Calvo, J. y Martínez – Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27, 44 – 52.
- Cerezal, P. y Duarte, G. (2005). Algunas características de tunas (*Opuntia ficus – indica* (L.) Miller) cosechadas en el altiplano andino de la 2ª región de Chile. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 35, 34 – 60.
- Cervantes – Cardoza, V., Rocha – Guzmán, N. E., Gallego - Infante, J. A., Rosales – Castro, M., Medina – Torres, L. y González – Laredo, R. F. (2010). Actividad antioxidante de extractos de semilla de tres variedades de manzana (*Malus domestica* Borkh -Rosaceae-). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9, 446 – 456.
- Chemah, T. C., Aminah, A., Noriham, A. y Wan, A. W. M. (2010). Determination of pitaya seeds as a natural antioxidant and source of essential fatty acids. *International Food Research Journal*, 17, 1003 – 1010.
- Chemat, F., Grondin, I., Costes, P., Moutoussamy, L., Sing, A. S. C. y Smadja, J. (2004c). High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 281 – 285.

- Chemat, F., Grondin, I., Sing, A. S. C. y Smadja, J. (2004b). Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 13 – 15.
- Chemat, S., Lagha, A., AitAmar, H., Bartels, P. V. y Chemat, F. (2004a). Comparison of conventional and ultrasound – assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavor and Fragrance Journal*, 19, 188 – 195.
- Choe, E. y Min, B. D. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5, 169 – 186.
- Chougui, N., Tamendjari, A., Hamidj, W., Hallal, S., Barras, A., Richard, T. y Larbat, R. (2013). Oil composition and characterization of phenolic compounds of *Opuntia ficus – indica* seeds. *Food Chemistry*, 139, 796 – 803.
- Cruz – Cansino, N. S., Ramírez – Moreno, E., León – Rivera, J. E., Delgado – Olivares, L., Alanís – García, E., Ariza – Ortega, J. A., Manríquez – Torres, J. J. y Jaramillo – Bustos, D. P. (2015). Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 277 – 286.
- Da Porto, C., Porretto, E. y Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound – assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1076 – 1080.
- Dawidiwicz, A. L., Wianowska, D. y Baraniak, B. (2006). The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT – Food Science and Technology*, 39, 308 – 315.
- DGAPEAS. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. 2011. *Monografía del Nopal y la Tuna*. México. Recuperado de [http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/MonografiaNopal-Tuna\(jul11\).pdf](http://www.financiararural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/MonografiaNopal-Tuna(jul11).pdf)
- Earnshaw, R. G. (1998). Ultrasound: a new opportunity for food preservation. En: *Ultrasound in food processing*. 1a. Povey, M. J. W y Mason, T. J. Editorial Black Academic and Professional, Estados Unidos. pp: 183 – 192.

- El – Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M. H. S., ... y Cherkaoui – Malki, M. (2014). Nopal catus (*Opuntia ficus – indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19, 14879 – 14901.
- Elfalleh, W., Hannachi, H. Tlili, N., Yahia, Y., Nasri, N. y Ferchich, A. (2012). Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 4724 – 4730.
- Ennouri, M., Evelyne, B., Laurence, M. y Hamadi, A. (2005). Fatty acid composition and rheological behavior of prickly pear seed oils. *Food chemistry*, 93, 431 – 437.
- Ennouri, M., Fetoui, H., Bourret, E., Zeghal, N., Guerhazi, F. y Attia, H. (2006). Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 2. Influence of seed supplemented diet on rats. *Bioresource Technology*, 97, 2136 – 2140.
- Feás, X., Estevinho, L. M., Salinero, C., Vela, P., Sainz, M. J., Vázquez – Tato, M. P. y Seijas, J., A. (2013). Triacylglyceride, antioxidant and antimicrobial features of virgin *Camellia oleífera*, *C. reticulata* and *C. sasanqua* oils. *Molecules*, 18, 4573 – 4587.
- FIA Ministerio de agricultura. 2011. *Tuna (Opuntia ficus – indica)*. Chile. Recuperado de <http://www.provar.uchile.cl/doc/TUNA%202011.pdf>
- Fisher, K. y Philips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156 – 164.
- Gai, Q. Y., Jiao, J., Mu, P. S., Wang, W., Luo, M., Li, C. Y., ... y Fu, Y. J. (2013). Microwave – assisted aqueous enzymatic extraction of oil from *Isatis indigota* seeds and its evaluation of physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 45, 303 – 311.
- Gámiz, E., Soriano, M., Delgado, G., Párraga, J. y Delgado, R. (2002). Estudio morfológico de talcos con microscopio electrónico de barrido (sem). Aplicaciones farmacéuticas. *Ars Pharmaceutica*, 43, 173 – 185.

- Gao, M. y Liu, C. (2005). Comparison techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1461 – 1463.
- Ghafoor, K., Al – Juhaimi, F. Y. y Choi, Y. H. (2012). Supercritical fluid extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape (*Vitis labrusca* B.) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 407 – 414.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y. y Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound – assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4988 – 4994.
- Ghazi, Z., Ramdai, M., Fauconnier, M. L., El Mahi, B. y Cheikh, R. (2013). Fatty acids sterols and Vitamin E composition of seed oil of *Opuntia ficus indica* and *Opuntia dillenii* from Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 4, 967 – 972.
- Gómez – López, V. M., Orsolani, L., Martínez – Yépes, A. y Tapia, M. S. (2010). Microbiological and sensory quality of sonicated calcium – added orange juice. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 808 – 813.
- Goula, A. M. (2013). Ultrasound – assisted extraction of pomegranate seed oil – Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering*, 117, 492 – 498.
- Griffith, M. P. (2004). The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus – indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany*, 91, 1915 – 1921.
- Guevara, A. J. C. (2009). Efectos biofuncionales del Nopal y la Tuna. *Horticultura Internacional*, 71, 18 – 19.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E. y Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, 371 – 382.
- Gurrieri, S. Miceli, L., Lnaza, M. C., Tomaselli, F., Bonomo, R. P. y Rizzarelli, E. (2000). Chemical Characterization of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*)

- and Perspectives for the Storage of Its Juice. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 5424 – 5431.
- Habibi, Y., Heux, L., Mahrouz, M. y Vignon, M. R. (2008). Morphological and structural study of seed pericarp of *Opuntia ficus – indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Polymers*, 72, 102 – 112.
- Herceg, Z., Lelas, V., Jambrak, A. R., Vukušić, T. y Levaj, B. (2013). Influence of thermo – sonication on microbiological safety, color and anthocyanins content of strawberry juice. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 4, 26 – 37.
- Herrero, A. M. y Romero de Ávila, M. D. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 50, 71 – 74.
- Ho, S. K., Tan, C. P., Thoo, Y. Y., Abas, F. y Ho, C. W. (2014). Ultrasound – assisted extraction of antioxidants in Misai Kucing (*Orthosiphon stamineus*). *Molecules*, 19, 12640 – 12659.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Hussain, S. T. S. y Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108, 986 – 995.
- İnce, A. E., Şahin, S. y Şümnü, S. G. (2013). Extraction of phenolic compounds from Melissa using microwave and ultrasound. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 69 – 75.
- Janay, A. K., Agarwal, S. y Chatterjee, S. N. (1990). Membrane lipid peroxidation by ultrasound: Mechanism and implications. *Journal of Biosciences*, 15, 211 – 215.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T. y Sakariah, K. K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36, 117 – 122.
- Jiménez – Aguilar, D. M., Mújica – Paz, H. y Welti – Chanes, J. (2014). Phytochemical characterization of prickly pear (*Opuntia* spp.) and of its nutritional and functional properties: A review. *Current Nutrition & Food Science*, 10, 57 – 69.

- Jiménez, A., Beltrán, G. y Uceda, M. (2007). High – power ultrasound in olive paste pretreatment. Effect on process yield and virgin olive oil characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 725 – 731.
- Jolalpa, B. L. J., Aguilar, Z. A., Ortiz, B. O. y García, L. L. (2011). Producción y comercialización de tuna en fresco bajo diferentes modalidades en Hidalgo, México. *Revista mexicana de agronegocios*, 28, 605 – 614.
- Judde, A., Villeneuve, P., Rossignol – Castera, A. y Le Guillou, A. (2003). Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 1209 – 1215.
- Jun, H. I., Cha, M. N., Yang, E. I., Choi, D. G. y Kim, Y. S. (2013). Physicochemical properties and antioxidant activity of Korean Cactus (*Opuntia humifusa*) cladodes. *Horticultural Environment Biotechnology*, 54, 288 – 295.
- Kabas, O., Ozmerzi, A. y Akinci, I. (2006). Physical properties of cactus pear (*Opuntia ficus indica* L.) grown wild in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 73, 198 – 202.
- Karki, B., Lamsal, B. P., Jung, S., van Leeuwen, J. H., Pometto III, A. L., Grewell, D. y Khanal, S. K. (2010). Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. *Journal of Food Engineering*, 96, 270 – 278.
- Kaur, M., Kaur, A. y Sharma, R. (2012). Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A review. *Journal of applied pharmaceutical science*, 02, 15 – 18.
- Kedare, S. B. y Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *journal of Food Science and Technology*, 48, 412 – 422.
- Kesari, V., Das, A. y Rangan, L. (2010). Physico – chemical characterization and antimicrobial activity from seed oil of *Pongamia pinnata*, a potential biofuel crop. *Biomass and Bioenergy*, 34, 108 – 115.
- Kgatla, T. E., Howard S. S. y Hiss D. C. (2010). The Effects of Processing and Preservation on the Sensory Qualities of Prickly Pear Juice. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 68, 881 – 868.
- Khoobchandani, M., Ojeswi, B. K., Ganesh, N., Srivastava, M. M., Gabbanini, S., Matera, R., Iori, R y Valgimigli, L. (2010). Antimicrobial properties and analytical

- profile of traditional *Eruca sativa* seed oil: Comparison with various aerial and root plant extracts. *Food Chemistry*, 120, 217 – 224.
- Kiesling, R. (2013). Historia de la *Opuntia ficus – indica*. En: *Actas de la Segunda Reunión para el Aprovechamiento Integral de la Tuna y otras Cactáceas y 1ª Reunión Sudamericana CACTUSNET FAO – ICARDA*. M.A. Nazareno, M.J. Ochoa, y J.C. Dubeaux Jr. Termas de Río Hondo, Santiago del Estero, Argentina.
- Kirk, S. R., Sawyer, R. y Egan, H. (2002). Métodos químicos generales. En: *Composición y análisis de alimentos*. Compañía editorial continental, México. pp: 25 – 29.
- Koprivnjak, O., Škevin, D., Valić, S., Majetić, V. Petričević, S. y Ljubenkov, I. (2008). The antioxidant capacity and oxidative stability of virgin olive oil enriched with phospholipids. *Food Chemistry*, 111, 121 – 126.
- Koshani, R., Ziaee, E., Niakousari, M. y Golmakani, M. T. (2014). Optimization of thermal and thermosonication treatments on pectin methyl esterase inactivation of sour orange juice (*Citrus aurantium*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 39, 567 – 573.
- Kosińska, A., Karamać, M., Estrella, I., Hernández, T., Bartolomé, B. y Dykes, G. A. (2012). Phenolic compound profiles and antioxidant capacity of *Persea americana* Mill. peels and seeds of two varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60, 4613 – 4619.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini – Filho, J. y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25, 726 – 732.
- Labuschagne, M. T. y Hugo, A. (2010). Oil content and fatty acid composition of cactus pear seed compared with cotton and grape seed. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 93 – 100.
- Lafont, J. J., Páez, M. S. y Portacio, A. A. (2011). Extracción y caracterización fisicoquímica del aceite de la semilla (Almendra) del marañón (*Anacardium occidentale* L). *Información Tecnológica*, 22, 51 – 58.

- Li, T., Qu, X., Zhang, Q. y Wang, Z. Z. (2012). Ultrasound – assisted extraction and profile characteristics of seed oil from *Isatis indigotica* Fort. *Industrial Crops and Products*, 35, 98 – 104.
- Liu, W., Fu, Y. J., Zu, Y. G. Tong, M. H., Wu, Nan, Liu, X. L. y Zhang, S. (2009). Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity. *Food Chemistry*, 114, 334 – 339.
- Livermore, D. M. (2002). Multiple mecanismos of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare?. *Clinical infections diseases*, 34, 634 – 640.
- Lozano, L. (2011). Ecofisiología de la tuna (*Opuntia ficus – indica* (L.) Mill.) *Horticultura Argentina*, 30, 37 – 52.
- Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. y Li, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations. *Food Research International*, 44, 3057 – 3064.
- Majhenič, L., Škerget, M. y Knez, Ž. 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*. 104: 1258 – 1268.
- Martínez, O. C. M. y Ceballos, R. C. A. (2012). Determinación de actividad antioxidante en aceite de semillas de uva isabella (*Vitis labrasca*) extraído con CO₂ supercrítico. Tesis profesional. Universidad del Valle. Colombia. Pág: 40 – 46.
- Matthäus, B. y Özcan, M. M. (2011). Hábitat effects on yield, fatty acid composition and tocopherol contents of prickly pear (*Opuntia ficus – indica* L.) seed oils. *Scientia Horticulturae*, 131, 95 – 98.
- Medina – Torres, L., Gallegos – Infante, J. A., Gonzalez – Laredo, R. F. y Guzman – Rocha, N. E. (2008). Drying kinetics of *nopal* (*Opuntia ficus – indica*) using three different methods and their effect on their mechanical properties. *LTW – Food Science and Technology*, 41, 1183 – 1188.
- Méndez, G. S. J. y García, H. J. (2006). La tuna: Producción y diversidad. *CONABIO. Biodiversitas*, 68, 1 – 5.

- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl – hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26, 211 – 219.
- Morales, F. J. y Jiménez – Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to color and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 1119 – 1125.
- Muñoz, A., Caminiti, I. M., Palgan, I., Pataro, G., Noci, F., Morgan, D. J., ... y Lyng, J. G. (2012). Effects on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice treated by combinations of pulsed light and thermosonication. *Food Research International*, 45, 299 – 305.
- Nair, M. K. M., Vasudevan, P. y Venkitanarayanan, K. (2005). Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 16, 395 – 398.
- Nawirska – Olszańska, A., Kita, A., Biesiada, A., Sokół – Łętowska, A. y Kucharska, A. Z. (2013). Characteristics of antioxidant activity and composition of pumpkin seed oils in 12 cultivars. *Food Chemistry*, 139, 155 – 161.
- Neria, C. R. (2015). Estudio de la optimización por termoultrasonido en la extracción de contenido de antioxidantes a partir de residuos de mango (*Mangifera indica* L.), utilizando la metodología de superficie de respuesta (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo, México.
- Ochoa, C. E. y Guerrero, J. A. (2012). Efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre la calidad de tuna roja (*Opuntia ficus – indica* (L.) Miller). *Información Tecnológica*, 23, 117 – 128.
- Ordoñez, J. A., Aguilera, M. A., García, M. L. y Sanz, B. (1987). Effect of combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Research*, 54, 61 – 67.
- Ozcan, B., Esen, M., Sangun, M. K., Coleri, A. y Caliskan M. (2010). Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *Journal of Environmental Biology*, 31, 637 – 641.

- Patil, S., Jolly, C. I. y Narayanan, S. (2003). Free radical scavenging activity of *Acaica catechu* and *Rotula aquatica*: implications in cancer therapy. *Indian drugs*, 40, 328 – 332.
- Pereira, S. C. M., Almeida, F. S., Veiga Jr, V. F., Goulart de Lima, D. B. P., Dantas, M. A. C., Pereira, S. D. y Silva, J. A. (2014). Characterization of atomized extract of *Opuntia ficus – indica* (L.) Mill. and assessment of its pharmaceutical potential. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 32, 195 – 203.
- Piyasena, P., Mohareb, E. y McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 207 – 216.
- Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3, 255 – 264.
- Prieto – García, F., Filardo – Kerstup, S., Pérez – Cruz, E., Beltrán – Hernández, R., Román – Gutiérrez, A. y Méndez – Marzo, M. (2006). Caracterización física y química de semillas de Opuntias (*Opuntia spp*) cultivadas en el estado de Hidalgo, México. *Bioagro*, 18, 163 – 169.
- Prieto, G. F., Filardo, K. S., Román, G. A. D., Méndez, M. M. A. y Pérez, C. E. (2008). Caracterización fisicoquímica de semillas de opuntias (*O. imbricata* sp y *O. matudae* sp) cultivadas en el estado de Hidalgo, México. *Revista institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo*, 27, 76 – 84.
- Rabhi, A., Falleh, H., Limam, F., Ksouri, R., Abdelly, C. y Raies, A. (2013). Upshot of the ripening time on biological activities, phenol content and fatty acid composition of Tunisian *Opuntia ficus – indica* fruit. *African Journal of Biotechnology*, 12, 5875 – 5885.
- Ramadan, M. F. y Mörsel, J. T. (2003). Oil cactus pear (*Opuntia ficus – indica* L.). *Food Chemistry*, 82, 339 – 345.
- Reyes – Agüero, J. A., Aguirre – Rivera, J. R. y Hernández, H. M. (2005). Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus – indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia*, 39, 395 – 408.

- Reyes – Jurado, F., Palou, E. y López – Malo, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8, 68 – 78.
- Ronald, S. K. (2002). Aceites y Grasas. En: *Composición y análisis de alimentos de Pearson*. CECSA.
- Saenz, C. (2000). Processing technologies: an alternative for cactus pear (*Opuntia* spp.) fruits and cladodes. *Journal of Arid Enviroments*, 46, 209 – 225.
- Sáenz, C. (2013a). Opuntias as a natural resource. En: *Agro – industrial utilization of cactus pear*. FAO. Rome.
- Sáenz, C. (2013b). Chemical composition and characteristics of *Opuntia* spp. En: *Agro – industrial utilization of cactus pear*. FAO. Rome.
- Sáenz, C. (2013c). Utilization of *Opuntia* spp fruits in food products. En: *Agro – industrial utilization of cactus pear*. FAO. Rome.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2005). Pliegos de condiciones para el uso de la marca oficial México calidad suprema en tuna. Recuperado de: http://www.mexicocalidadsuprema.org/assets/galeria/PC_046_2005_Tuna.pdf
- Salman, M. T., Khan, R. A. y Shukla, I. (2008). Antimicrobial activity of *Nigella sativa* Linn. seed oil against multi – drug resistant bacteria from clinical isolates. *Natural Product Radiance*, 7, 10 – 14.
- Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P. y Ghazali, H. M. (2013). Ultrasound – assisted extraction (UAE) and solvent extraction of papaya seed oil: yield, fatty acid composition and triacylglycerol profile. *Molecules*, 18, 12474 – 12487.
- Shenoy, R. y Shirwaikar, A. (2002). Anti – inflammatory and free radical scavenging studies of *Hyptis suaveolens* (labiatae). *Indian drugs*, 39, 574 – 577.
- Simopoulos, A. P. (2004). Omega – 3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants. *Biological Research*, 37, 263 – 277.
- Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C. S. y Catalan, C. (2005). Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract

- of *Nigella sativa* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2297 – 2306.
- Stanisavljević, I. T., Lazić, M. L. y Veljković, V. B. (2007). Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 646 – 652.
- Sumaya – Martínez, M. T., Cruz – Jaime, S., Madrigal – Santillán, E., García – Paredes, J. D., Cariño – Cortés, R., Cruz – Cansino, N., Valadez – Vega, C., Martínez – Cardenas, L. y Alanís – García, E. (2011). Betalain, acid ascorbic, phenolic contents and antioxidant properties of purple, red, yellow and white cactus pears. *International journal of molecular sciences*, 12, 6452 – 6468.
- Tian, Y, Xu, Z., Zheng, B. y Lo, Y. M. (2013). Optimization of ultrasonic – assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 202 – 208.
- Tlili, N., Bargougui, A., Elfalleh, W., Triki, S. y Nasri, N. (2011). Phenolic compounds, protein, lipid content and fatty acids compositions of cactus sedes. *Journal of Medicine Plants Research*, 5, 4519 – 4524.
- UIB. Universidad de las Islas Baleares. (2010). Evaluar los alimentos con ultrasonido para garantizar su calidad. Recuperado de: <http://www.uib.es/servei/comunicacio/sc/projectes/arxiu/nousprojectes/ultrasons/ultrasonidos.doc>
- Ulusoy, B. H., Colak, H. y Hampikyan, H. (2007). The use of ultrasonic waves in food technology. *Research Journal of Biological Sciences*, 2, 491 – 497.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. y Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 161 – 169.
- Vinatoru, A. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303 – 313.
- Viuda – Martos, M., Mohamady, M. A., Fernández – López, J., Abd ElRazik, K. A., Omer, E. A., Pérez – Alvarez, J. A. y Sendra, E. (2011). *In vitro* antioxidant and

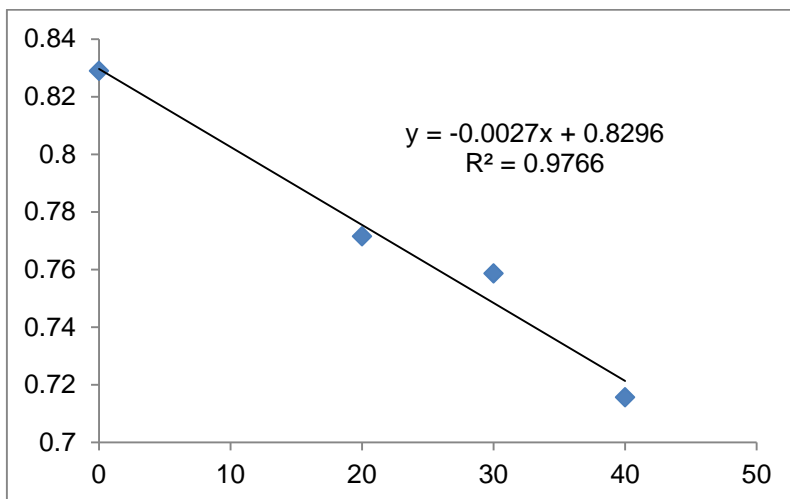
- antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, 22, 1715 – 1722.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. y Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound – assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106, 804 – 810.
- Wu, H., Hulbert, G. J. y Mount, J. R. (2001). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 211 – 218.
- Wu, J., Gamage, T. V., Vilku, K. S., Simons, L. K. y Mawson, R. (2008). Effect of thermosonication on quality improvement of tomato juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 186 – 195.
- Yahia, E. M. y Mondragon – Jacobo, C. (2011). Nutritional components and anti – oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia spp.*). *Food Research International*, 44, 2311 – 2318.
- Yañez, M. J. (2014). Fundamentos de la microscopia electrónica. En: *Principios y prácticas de la microscopia electrónica*. Sorrivias de Lozano, V., Yañez, M. J. y Morales, A. Bahía Blanca. pp: 57 – 99.
- Yeddes, N., Chérif, J. K., Jrad, A., Barth, D. y Trabelsi – Ayadi, M. (2012). Supercritical SC – CO₂ and Soxhlet n – Hexane extract of Tunisian *Opuntia ficus indica* seeds and fatty acids analysis. *Journal of Lipids*, 2012, 1 – 6.
- Zafra – Rojas, Q. Y., Cruz – Cansino, N., Ramírez – Moreno, E., Delgado – Olivares, L., Villanueva – Sánchez, J. y Alanís – García, E. (2013). Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus – indica*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1283 – 1288.
- Zafra, R. Q. Y. (2015). Optimización de la extracción de antioxidantes de un residuo de zarzamora (*Rubus fruticosus*), empleando termoultrasonido para su utilización como aditivo en yogurt (Tesis de maestría). Instituto de Ciencias Agropecuarias. Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.

- Zainol, M. K., Abd – Hamid, A., Yusof, A. y Muse, R. (2003). Antioxidant activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) urban. *Food Chemistry*, 81, 575 – 581.
- Zekaria, D. (2015). Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos. Recuperado en: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1182855355a.pdf
- Zhang, T., Wang, Z. y Chen, X. (2005). Ultrasound – assisted extraction of seed oil of Korean pine. *Journal of Forestry Research*, 16, 140 – 142.
- Zhang, Z. S., Wang, L. J., Li, D., Jiao, S. S., Chen, X. D. y Mao, Z. H. (2008). Ultrasound – assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 62, 192 – 198.
- Zine, S., Gharby, S. y El Hadek, M. (2013). Physicochemical characterization of *Opuntia ficus – indica* seed oil from Morocco. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 10, 99 – 105.

XI. Anexos

Anexo 1

Curva de calibración para la determinación de ABTS



Anexo 2

Curva de calibración para la determinación de DPPH

