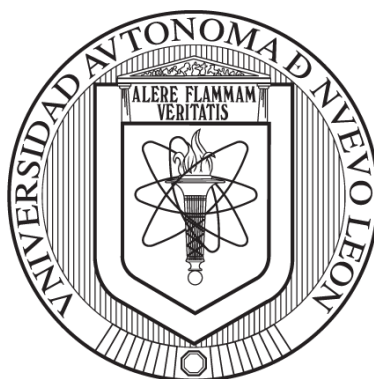


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EVALUACIÓN DEL NOPAL COMO MATERIA PRIMA PARA LA  
OBTENCIÓN DE BIOPRODUCTOS Y BIOENERGÉTICOS

POR:

KENIA AYLÍN CARRILLO VERÁSTEGUI

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN PROCESOS SUSTENTABLES

2021

## ÍNDICE

Índice.....	i
Índice de tablas .....	iii
Índice de figuras .....	iv
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes .....	2
2.1. Nopal como materia prima agroindustrial.....	3
2.1.1. Descripción botánica .....	5
2.1.2. Composición fisicoquímica .....	6
2.1.3. Producción agrícola.....	7
2.1.4. Usos actuales .....	8
2.2. Tecnologías para el aprovechamiento del nopal.....	9
2.2.1. Producción de bioenergéticos .....	9
2.2.2. Obtención de bioproductos.....	13
3. Justificación.....	22
4. Aportación científica.....	23
5. Hipótesis y preguntas que se propone responder.....	23
6. Objetivos .....	24
6.1. Objetivo general .....	24
6.2. Objetivos específicos .....	24
7. Metodología .....	25
7.1. Plan de trabajo .....	25
7.2. Actividad 1. Caracterización proximal de biomasa de <i>Opuntia</i> .....	26
7.2.1. Propósito .....	26
7.2.2. Diseño experimental.....	26
7.2.3. Programa de seguimiento y análisis .....	26
7.2.4. Procedimientos y técnicas .....	26
7.3. Actividad 2. Obtención de extractos con mejor capacidad antioxidante...	31
7.3.1. Propósito .....	31
7.3.2. Diseño experimental.....	31
7.3.3. Programa de seguimiento y análisis .....	31
7.3.4. Procedimientos y técnicas .....	32
7.4. Actividad 3. Producción de biometano utilizando biomasa de <i>Opuntia</i> spp.	34
7.4.1. Propósito .....	34
7.4.2. Diseño experimental.....	34
7.4.3. Programa de seguimiento y análisis .....	35
7.4.4. Procedimientos y técnicas .....	35
7.5. Actividad 4. Producción de biohidrógeno utilizando biomasa de <i>Opuntia</i> spp.	37
7.5.1. Propósito .....	37
7.5.2. Diseño experimental.....	37
7.5.3. Programa de seguimiento y análisis .....	38
7.5.4. Procedimientos y técnicas .....	38
8. Resultados y discusiones.....	39

8.1. Actividad 1. Caracterización proximal de biomasa de <i>Opuntia</i> .....	39
8.2. Actividad 2. Obtención de extractos con mejor capacidad antioxidante...	40
8.3. Actividad 3. Producción de biometano utilizando biomasa de <i>Opuntia</i> spp. 47	
8.4. Actividad 4. Producción de biohidrógeno utilizando biomasa de <i>Opuntia</i> spp. 52	
9. Conclusiones.....	57
Referencias .....	58
Anexos .....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Trabajos en Conricyt de <i>Opuntia ficus-indica</i> y sus derivados en campos de la ciencia en el periodo hasta octubre de 2020. ....	2
Tabla 2. Composición química proximal de cladodios de <i>Opuntia</i> . ....	7
Tabla 3. Países con mayor área para el cultivo de <i>Opuntia</i> spp. (Inglese <i>et al.</i> , 2018). ....	8
Tabla 4. Área sembrada y cultivada, toneladas y valor de producción de los tres principales productos del cultivo de nopal. Promedio de 2014-2018 (SIAP, 2020). 8	8
Tabla 5. Condiciones de operación para la digestión anaerobia de <i>Opuntia</i> spp.. 12	12
Tabla 6. Compuestos fenólicos comúnmente encontrados en <i>Opuntia</i> spp.....	18
Tabla 7. Características fisicoquímicas de los principales flavonoides encontrados en extractos de nopal. ....	19
Tabla 8. Condiciones de obtención de extractos y resultados.....	19
Tabla 9. Parámetros para la caracterización de <i>Opuntia</i> spp.....	26
Tabla 10. Parámetros para la caracterización del extracto. ....	31
Tabla 11. Diseño de experimentos para la producción de biometano con <i>Opuntia</i> spp. ....	34
Tabla 12. Diseño de experimentos para la producción de biometano con residuos de extracción de <i>Opuntia</i> spp.....	34
Tabla 13. Parámetros por analizar en la digestión anaerobia. ....	35
Tabla 14. Diseño experimental para la producción de biohidrógeno.....	37
Tabla 15. Diseño experimental para la producción de biohidrógeno utilizando residuos sólidos de la extracción de <i>Opuntia</i> spp. ....	37
Tabla 16. Parámetros para analizar en la fermentación oscura de <i>Opuntia</i> spp... 38	38
Tabla 17. Resultados de caracterización de tres especies de <i>Opuntia</i> . ....	39
Tabla 18. Caracterización de los extractos crudos de tres especies de <i>Opuntia</i> . . 40	40
Tabla 19. Comparación de técnicas de extracción en la obtención de compuestos fenólicos totales.....	45
Tabla 20. Caracterización del inóculo utilizado para la digestión anaerobia de dos especies de <i>Opuntia</i> .....	47
Tabla 21. Parámetros cinéticos de la ecuación de la cinética de primer orden para el rendimiento de la producción de metano con dos especies de <i>Opuntia</i> a tres RIS. ....	47
Tabla 22. Comparación del rendimiento máximo con resultados de literatura. ....	49
Tabla 23. Parámetros cinéticos de primer orden para el rendimiento de metano del diseño experimental. ....	50
Tabla 24. Parámetros para las ecuaciones de Gompertz modificada, Boltzmann sigmoidal y primer orden para la producción de hidrógeno con biomasa de <i>Opuntia</i> spp. ....	52
Tabla 25. Parámetros cinéticos ajustados al modelo de Gompertz modificado y caracterización del efluente digerido. ....	54
Tabla 26. Parámetros de la ecuación de Gompertz modificada para el ajuste de la producción de hidrógeno para los residuos secos de la extracción y la biomasa sin pretratar.....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las tierras secas en México (SEMARNAT, 2018) .....	1
Figura 2. Especies de <i>Opuntia</i> identificadas en México. Tomadas de <a href="http://herbanwmex.net/">http://herbanwmex.net/</a> .....	3
Figura 3. Metabolismo CAM. Modificado de Inglesse <i>et al.</i> (2018). .....	4
Figura 4. <i>Opuntia ficus-indica</i> comercial. Imagen propia.....	5
Figura 5. <i>Opuntia engelmannii</i> nativa. Imágenes propias. ....	6
Figura 6. Estructura molecular del flavonol isorhamnetina. ....	15
Figura 7. Estructuras moleculares de a) glucósido quercitrina (quercetina + glucosa), b) La glicona es ramnosa y la aglicona es el flavonol quercetina, c) la degradación de quercetina produce ácido protocatecuico. ....	16
Figura 8. Etapas y actividades del plan de trabajo. ....	25
Figura 9. Efectos principales del diseño para a) azúcares totales y b) azúcares reductores. ....	42
Figura 10. Efectos principales del diseño para a) compuestos fenólicos totales y b) flavonoides totales.....	44
Figura 11. Efectos principales del diseño para a) el rendimiento de la extracción y b) porcentaje de captación de radicales libres DPPH. ....	46
Figura 12. Cinética del rendimiento acumulado de metano, usando a) O. comercial y b) O. nativa como sustrato a tres diferentes RIS. Ajustado al modelo de primer orden. ....	48
Figura 13. Rendimiento acumulado de metano a RIS 2.5 para a) la biomasa seca de tres tipos de <i>Opuntia</i> y b) los residuos sólidos de la extracción con solventes (RO, residuo de comercial; RN, residuo de nativa; RU, residuo de cultivada). ....	51
Figura 14. Ajuste de la producción acumulada de hidrógeno a RIS 0.2 para la especie a) comercial y b) cultivada. ....	53
Figura 15. Ajuste de la producción acumulada de hidrógeno a RIS 0.2 para a) biomasa seca y b) residuos sólidos de extracción. ....	56

## 1. INTRODUCCIÓN

México posee un gran potencial de aprovechar sus amplios recursos naturales, de transformarlos y de revalorizarlos con el fin de obtener productos de alto valor agregado. De acuerdo con el régimen de La Ley de Transición Energética (Ley de Transición Energética, 2015) que regula el aprovechamiento sustentable energético, así como las obligaciones en el caso de las energías limpias, México se fijó metas para la generación de electricidad a partir de fuentes renovables (SENER, 2018).

Estados Unidos y Brasil son los dos principales productores de biocombustibles en el mundo, con un 39.9 y 22.4% de la producción mundial en 2018 (BP, 2019), respectivamente. El inconveniente es que la materia prima del biocombustible en estos países son cultivos agrícolas como el maíz y la caña de azúcar, es decir, cultivos alimenticios.

Los problemas como la escasez de agua, el calentamiento global, la disminución de la tierra fértil para cultivo y las sequías han afectado a los cultivos en estos últimos años. Se dice entonces, que las regiones áridas y semiáridas en el mundo aumentarán más del tercio actual del área global terrestre. En México, como se muestra en la Figura 1, el 65 % de la superficie del territorio nacional son tierras secas: las zonas semiáridas (34.7%), áridas (18.9%), subhúmedas secas (10.8%) e hiperáridas (0.7%) (SEMARNAT, 2018).

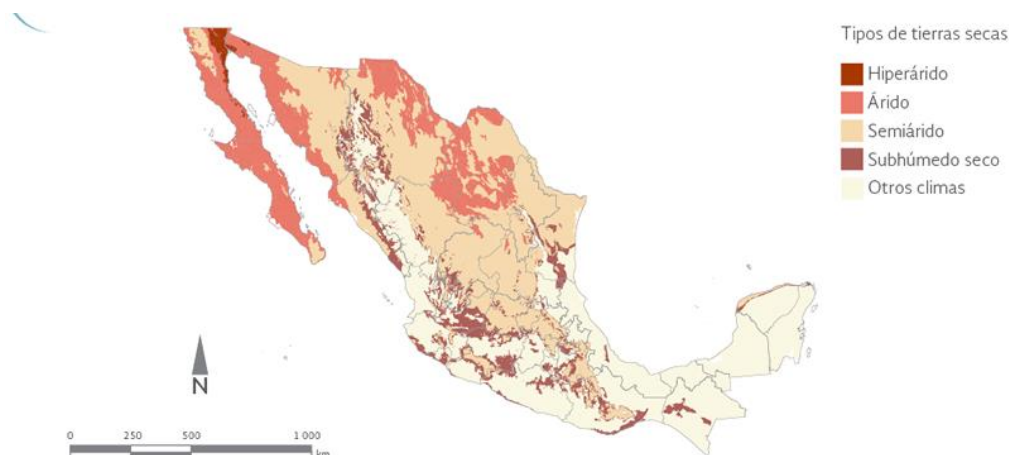


Figura 1. Distribución de las tierras secas en México (SEMARNAT, 2018)

La escasez del agua afecta directamente a las plantas con metabolismo C3 y C4, sin embargo, las plantas con metabolismo CAM (plantas suculentas) son resistentes a este problema y pueden ser una excelente alternativa como materia prima para distintos productos (como los bioenergéticos) en un futuro con poca accesibilidad al riego constante y grandes hectáreas de suelos pobres para la agricultura.

En México tenemos el nopal, proveniente de la familia *Cactaceae* y del género *Opuntia*; ésta planta es una buena opción debido a su rápida y eficaz adaptación al clima árido y su alto contenido de carbohidratos fibrosos o no fibrosos. Sus usos principales son como alimento para humanos y rumiantes, producción de farmacéuticos, cosméticos y colorantes, conservación y recuperación de suelos, y también producción de biocombustibles. Además, estudios recientes han deducido que una hectárea de nopal puede producir suficiente biometano para que dos casas en Brasil cubran sus requerimientos eléctricos, esto es 200 kWh/(mes casa) (Santos *et al.*, 2016); en México se considera que una vivienda de consumo bajo requiere 150 kWh/mes, mientras que una de consumo medio utiliza 300kWh/mes.

## 2. ANTECEDENTES

El nopal es una biomasa muy atractiva por sus características de planta crasulácea y por las aplicaciones de salud y bioenergéticas que se han desarrollado de manera relativamente reciente. En los últimos diez años, se ha trabajado con *Opuntia ficus-indica* en los siguientes campos y con la abundancia mostrada en la Tabla 1.

**Tabla 1. Trabajos en Conicyt de *Opuntia ficus-indica* y sus derivados en campos de la ciencia en el periodo hasta octubre de 2020.**

<b>Tecnología</b>	<b>Cantidad de artículos (palabras clave)</b>	<b>Cantidad de revisiones</b>
Obtención de extractos antioxidantes	195 (opuntia antioxidant)	9
Digestión anaerobia	12 (opuntia anaerobic digestion)	0
Fermentación oscura	0	0
Obtención de pectina	24 (opuntia pectin)	0
Pigmentos/colorantes	26 (opuntia pigment)	0

## 2.1. Nopal como materia prima agroindustrial

El nopal es un símbolo de identidad de México; desde los platillos que se elaboran hasta su presencia en la bandera nacional, junto al legendario mito de la fundación de la gran Tenochtitlán.

Pertenece al género *Opuntia*, el más diverso en la familia *Cactaceae* con una amplia distribución a lo largo del continente americano además de estar comúnmente asociados al tipo de vegetación llamado matorral xerófilo. En México existen 93 especies de *Opuntia* silvestre y 8 de *Nopalea*, de las cuales 62 son endémicas, una cantidad que hace suponer que este territorio es el centro de origen de la especie (Scheinvar *et al.*, 2007). Por otro lado, en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) se registraron 85 variedades de las cuales el 56 % son para la producción de tuna, el 36 % para xoconoxtle, 4 % nopalitos, 3 % colorantes y 1 % para forraje (SNICS, 2017). La especie de nopal económicamente más importante en el mundo es *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.; en México, las más utilizadas son *O. ficus-indica*, *O. joconoxtle*, *O. megacantha* y *O. streptacantha* (Inglese *et al.*, 2018).



Figura 2. Especies de *Opuntia* identificadas en México. Tomadas de <http://herbanwmex.net/>

El nopal es un cultivo perenne; su etapa productiva comienza a los 2 años después de la plantación, alcanza su potencial a los 5 años y tiene un periodo de producción al menos de 20 años.

Lo que caracteriza a las especies de *Opuntia*, o en general de la familia *Cactaceae*, es la habilidad para adaptarse al medio ambiente aún en condiciones de escasa disponibilidad de agua, variaciones extremas de la temperatura (zonas

áridas y semiáridas) y en suelos con baja fertilidad donde otros cultivos no pueden prosperar. Esto se debe a los cambios morfológicos y fisiológicos típicos del metabolismo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) donde la planta fija el dióxido de carbono como ácido málico y libera oxígeno por la noche para evitar pérdidas de agua, mientras que, durante el día, el ácido málico reservado se descarboxila y el dióxido de carbono liberado se convierte en glucosa a través de la fotosíntesis (Figura 2).

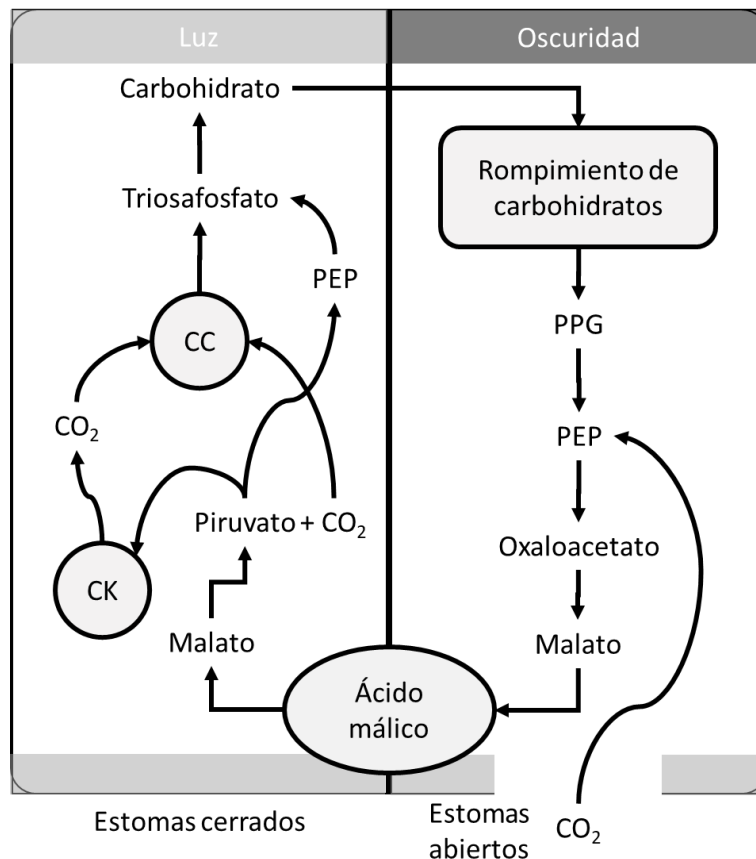


Figura 3. Metabolismo CAM. Modificado de Inglesse *et al.* (2018).

Las pencas del nopal (cladodios) están compuestas por un parénquima medular blanco en el tejido central, y el parénquima fotosintéticamente activo que contiene clorofila ubicado en el tejido de la corteza. Sus cladodios tienen forma de raqueta y está cubierta con espinas y tricomas, que forman la areola, característica de la familia *Cactaceae*. Las areolas son el origen de las flores y frutos. Los gloquideos (pequeñas espinas foliares delgadas, ubicadas en las areolas) están compuestos al 100% de celulosa cristalina, mientras que las espinas contienen 96%

de polisacáridos, distribuidos en 49.7% de celulosa y 50.3% de arabinano, y el resto siendo cenizas, lignina y ácidos grasos (Stintzing & Carle, 2005).

La producción y el manejo de cultivos de nopal generan de 4 a 8 ton ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> de desperdicio orgánico que se apila en el suelo sin algún tratamiento y, por lo tanto, generando gases de efecto invernadero. Tanto el nopal *Opuntia* como sus desechos representan una fuente renovable de biomasa y se pueden producir materias primas especiales y químicos de alto valor agregado, como mucílago, pectinas, biocombustibles y biofertilizantes (Quintanar-Orozco *et al.*, 2018).

### **2.1.1. Descripción botánica**

#### **2.1.1.1. *Opuntia ficus-indica***

Es una planta arbustiva de 2-5 m de altura y tallo castaño oscuro, verde o gris, cilíndrico de 30 a 45 cm de diámetro. Los segmentos o cladodios en que se divide esta planta (y la mayoría de las plantas de este género) son tallos ramificados en los que pueden crecer más segmentos, flores o frutos; éstos son planos, ovales u oblongos, de color verde.



**Figura 4. *Opuntia ficus-indica* comercial. Imagen propia.**

Estas plantas tienen dos clases de espinas que crecen en un mismo punto llamado areola; las espinas comunes, que son largas y duras, y los gloquidios, que son cortos y finos. Las espinas están ausentes o muy reducidas, blanquecinas a

bronceadas o ligeramente marrones, rectas a ligeramente curvas de 0.1-4 cm. Los glóquidos son amarillentos o marrones con la edad, de menos de 1.5 mm de largo (Pinkava, 2003).

#### 2.1.1.2. *Opuntia engelmannii*

Es una planta arbustiva de 1-3 m de altura, con tronco corto, a veces decumbente. Los cladodios son color verde-amarillo a verde-azulado, ovados a redondeados, alargados, de 15-40 cm de largo y 10-40 cm de ancho. Las espinas están distribuidas uniformemente, de color blanco a amarillo, generalmente rojo a marrón oscuro en bases extremas, gris o negro con la edad, de 1-6 por areola, ligeramente aplanadas, ausentes en las areolas inferiores. Los gloquidios son color amarillo a rojo marrón, gris o negro con la edad, ampliamente espaciados, de longitudes irregulares de hasta 12 mm de largo en forma de media luna (Pinkava, 2003).



Figura 5. *Opuntia engelmannii* nativa. Imágenes propias.

#### 2.1.2. **Composición fisicoquímica**

La pared celular vegetal varía dependiendo del tipo y especie de planta; por ejemplo, la pared celular primaria de plantas superiores está compuesta por celulosas y hemicelulosas conectadas por puentes de hidrógeno y, en la lámina media, donde una célula se une con otra, la pectina rodea la red de celulosa y hemicelulosa para asegurar la adhesión entre células (Bayar *et al.*, 2018).

La composición del cladodio depende de factores de cultivo, como el sitio, la temporada, la edad, la hora de cosecha, entre otros; y, debido a esto, sus nutrientes

varían entre especies y variedades. En promedio, su contenido de humedad es de 90%; tiene un alto contenido de fibra soluble (18%base seca) y cenizas (20%base seca), donde los minerales esenciales más abundantes son potasio, calcio y magnesio. La fibra soluble incluye pectina, mucílago y algunas hemicelulosas; mientras la fibra insoluble incluye polisacáridos, hemicelulosas, celulosa y lignina (Peña-Valdivia y Sánchez Urdaneta, 2006). Se reportó también que los cladodios de nopal son una buena fuente de metabolitos antioxidantes, como los flavonoides, fenoles, vitaminas y carotenoides, además de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico y ácido málico (Stintzing y Carle, 2005).

**Tabla 2. Composición química proximal de cladodios de *Opuntia*.**

<b>Parámetro</b>	<b>Porcentaje en base seca</b>
Humedad* (% bh)	91.35 ± 2.79
Celulosa	15.69 ± 5
Hemicelulosa	19.85 ± 7.79
Lignina	8.51 ± 5.54
Cenizas	18.08 ± 3.93
Extractivos	26.65 ± 3.48
Nitrógeno total	0.85 ± 0.31
Proteínas	4.96 ± 3.88

Notas: \* porcentaje en base húmeda (% bh); los valores son promedios de los obtenidos en las siguientes referencias: Ávila-Lara, 2019; Kuloyo et al., 2014; Myovela et al., 2019; Quintanar-Orozco et al., 2018; Stintzing & Carle, 2005; Valenti et al., 2018; Yang et al., 2015.

### **2.1.3. Producción agrícola**

Debido a su alta adaptabilidad y diversidad ecológica, el nopal puede ser encontrado en diferentes partes del mundo además de América Latina, como el Mediterráneo, África, Oriente Medio, Australia e India. En América se encuentra distribuido desde Canadá hasta la Patagonia y se puede cultivar a diferentes altitudes desde el nivel del mar hasta los 5,100 m.

También se considera que *Opuntia ficus-indica* es la cactácea de mayor valor económico en el mundo. En la Tabla 3 se muestran los países con mayor área de cultivo de nopal en el mundo (Inglese *et al.*, 2018).

En América, México y Brasil son los países con una gran área de cultivo del cactus *Opuntia*. Brasil se dedica en su mayoría a la obtención de forraje siendo su proceso de producción el más eficiente en Sudamérica.

Por otro lado, en México existe la diversidad más amplia y el consumo más alto del mundo. En áreas semiáridas con suelos pobres son cosechadas especies

silvestres de nopal (como *O. robusta*, *O. leucotricha*, *O. hypriacantha* y *O. chaveña*) que ocupan aproximadamente 3 millones de hectáreas. La mayor producción de los cladodios jóvenes para consumo humano se encuentra en la zona central de México, en la delegación Milpa Alta de donde proviene la variedad más utilizada para este propósito (*Opuntia ficus-indica* Mill.).

**Tabla 3. Países con mayor área para el cultivo de *Opuntia* spp. (Inglese et al., 2018).**

<b>País</b>	<b>Superficie en ha Cultivada (silvestre)</b>
México	78,494 (3,000,000)
Túnez	600,000
Brasil	500,000
Etiopia	360,000
Marruecos	200,000
Argelia	30,000
Italia	15,000

En la Tabla 4 se muestra la superficie sembrada y cosechada, la producción y el valor de producción en México en 2018 de los tres principales productos derivados del cultivo del nopal. El total de superficie cosechada representa cerca del 96% de la superficie total sembrada, por lo que el 4% restante no tiene uso alguno. Además del área reportada en el SIAP, la Financiera Rural (2011) estiman 3 millones de hectáreas distribuidas en la zona norte del país que son utilizadas como forraje para ganado y procesamiento.

**Tabla 4. Área sembrada y cultivada, toneladas y valor de producción de los tres principales productos del cultivo de nopal. Promedio de 2014-2018 (SIAP, 2020).**

<b>Cultivo</b>	<b>Sembrado (ha)</b>	<b>Cosechado (ha)</b>	<b>Producción (ton)</b>	<b>Valor de producción (MDP)</b>
Nopal forrajero	16,901 ±373	14,767 ±2,699	172,224 ±18,694	73,299 ±10,320
Nopal verdura	12,573 ±281	11,952 ±498	826,133 ±15,332	1,810,532 ±231,443
Tuna	49,020 ±3,154	45,867 ±3,044	476,284 ±51,535	1,463,229 ±94,971
Total	78,494	72,586		

#### **2.1.4. Usos actuales**

El nopal tiene una gran variedad de usos, desde la industria de los alimentos, farmacéutica, como base de cosméticos y en la elaboración de productos de cuidado personal, como planta medicinal, así como para su uso la conservación del

suelo, forraje para ganado, producción de grana cochinilla, y actualmente para la industria energética (Aké Madera, 2015).

## **2.2. Tecnologías para el aprovechamiento del nopal**

Como ya se mencionó anteriormente, el nopal presenta una gran capacidad para crecer en suelos y condiciones de clima que para muchas especies de plantas resultan desfavorables, y una de las razones principales es su alta eficiencia de uso del agua.

En la literatura se han reportado diversos estudios con el fin de aprovechar los cladodios de nopal. Por ejemplo, el aislamiento de enzimas de interés industrial (Teixeira *et al.*, 2000), la obtención de biocombustibles como biogás, bioetanol y sólidos (Volpe *et al.*, 2018), la aplicación del mucílago del nopal para la remoción de turbidez en el agua (Olivero Verbel *et al.*, 2013), entre otros.

Por ello, el cultivo de especies de *Opuntia* en tierras marginales podría ser valorizado para la producción simultánea de alimentos funcionales para consumo humano, suplementos alimenticios y biomasa residual con potencial uso para la producción de bioenergéticos.

### **2.2.1. Producción de bioenergéticos**

El uso de cladodios para la producción de bioenergéticos ha recibido mucha atención debido a la alta demanda de energía renovable en el mundo y ante la proyección del uso limitado de agua en el futuro. Por ello, es de gran importancia que la obtención de estos biocombustibles a partir de los cladodios de nopal se estudie de manera intensiva.

Luego de recopilar información sobre la composición química de los cladodios del género *Opuntia* y discutir sobre el potencial de procesamiento de biomasa para la producción de etanol y biogás, Santos *et al.* (2016) confirmaron la alta composición de pectina y oxalato de calcio basándose en los contenidos de ácidos urónicos (10.7% bs) y ácido oxálico (10.3% bs). En cuanto a la producción de etanol, el resultado en el intervalo de 1490-1875 L ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> es bajo en comparación con las fuentes tradicionales como caña de azúcar (5300-9400 L ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) y remolacha azucarera (5000-6000 L ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>). El potencial estimado de

producción de biogás fue de 3717 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> y concluyeron que el nopal destaca con potencial para producción de biometano, siendo comparable a los cultivos energéticos tradicionales, como maíz, alfalfa y remolacha forrajera.

#### 2.2.1.1. Biogás

La producción de biogás utilizando distintas especies de *Opuntia* como materia prima ha sido investigada con anterioridad, llevando incluso a un proceso patentado (Aké Madera y Sosa López, 2013).

Quintanar-Orozco *et al.* (2018) evaluaron el efecto combinado de un pretratamiento alcalino y el ajuste de la relación C/N en el residuo de *Opuntia heliabravoana* Scheinvar con el fin de producir biogás y biofertilizante en reactores anaeróbicos. Como inóculo, se utilizó estiércol de conejo con agua en relación 1:3 v/v. Debido al alto contenido de humedad presente en el nopal (90%) no fue necesario adicionar más agua para el proceso, en el entendido de que la digestión anaerobia en sustrato sumergido se ha llegado a realizar hasta 15% de sólidos totales. Aun así, es valorizar sustratos con mayor contenido de sólidos totales (20-35 %) mediante un proceso denominado digestión anaerobia en sustrato sólido (Escamilla-Alvarado, 2014). Las condiciones de operación seguidas por los autores fueron tasa de carga orgánica de 2.31 kgSV m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> y tiempo de retención hidráulico de 36 d, esto durante 85 días de experimentación. Usaron un reactor control y un reactor con ajuste de C/N, ambos con 1.54 L de volumen de trabajo; estos produjeron 221 y 257 mL/gSV de biogás con porcentaje de metano de 61 y 65, respectivamente.

Ramírez-Arpide *et al.* (2018) estudiaron la viabilidad económica de la producción de biogás a través de la co-digestión de nopal y estiércol a escala de granja, donde se analizaron la producción de biogás, producción de electricidad y producción de metano a través del potencial para la mitigación de gases de efecto invernadero.

Calabrò *et al.* (2018) investigaron el efecto de los pretratamientos térmicos, alcalinos y acídicos en la composición química y el rendimiento de metano de la biomasa de *Opuntia ficus-indica*. Los rendimientos de metano oscilaron desde 289 a 604 NmL/gSVagregado. Concluyeron que únicamente el tratamiento con ácido

clorhídrico aumentó la generación de metano. A su vez, modelaron la producción acumulada de metano a través de la ecuación de Gompertz modificada.

La producción de biogás puede tener como sustrato mezclas de materias primas distintas, típicamente residuos agrícolas y agroindustriales. Tal es el caso de Valenti *et al.* (2018), quienes estudiaron la co-digestión de diferentes mezclas de pulpa de cítricos, orujo de aceituna, estiércol de aves de corral, ensilaje de esparceta italiana y cladodios frescos de *Opuntia*. Los mejores potenciales de biometano fueron de 250 y 260 Nm<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/tSV, sin embargo, las mezclas contenían tan solo el 15 % en peso seco de cladodios de *Opuntia*.

Las microalgas son una fuente competitiva con los cultivos energéticos debido a su alta captación de CO<sub>2</sub> durante su crecimiento, sin embargo, presenta como desventaja que, en el caso de producción de biogás, tiene baja degradabilidad y un problema en el balance de nutrientes, especialmente debido al alto contenido de nitrógeno. Ramos-Suárez *et al.* (2014) combinaron la biomasa de microalgas de *Scenedesmus* y los cladodios de *O. maxima* para optimizar la producción de biometano por digestión anaerobia. La combinación de 75 % (SV) de nopal y 25 % (SV) de biomasa de microalga obtuvo el mayor rendimiento de metano.

En el estudio de Jigar *et al.* (2011) se evaluó la producción de metano mediante digestión anaerobia de combinaciones de cladodios de *O. ficus-indica* y estiércol de vaca. Concluyeron que es ideal que los cladodios sean digeridos como co-sustrato junto al estiércol para la producción de biogás, sin embargo, si no hay disponibilidad de este último los cladodios pueden digerirse solos.

En la Tabla 5 se muestra una comparación de la literatura en la cual se utilizaron las pencas de *Opuntia* spp. como sustrato. Se observa que la RIS que predomina en las condiciones de operación está en un rango de 3 a 2, a temperatura de 38 °C.

**Tabla 5. Condiciones de operación para la digestión anaerobia de *Opuntia* spp.**

Sustrato	Inóculo	Condiciones de operación	Resultados	Referencia
<i>O. heliabravoana</i>	Estiércol de conejo y agua 1:3 v/v	Reactor: 1.54 L Alimentación diaria con tasa de carga orgánica 2.3 kgSV/m <sup>3</sup> d, TRH= 36 d, T= 20°C	257 mL/gSV con 65 % de metano 85 d de digestión	1
<i>O. ficus-indica</i>	Estiércol de vaca, residuos agrícolas y residuos lácteos	Reactor: 1.1 L RIS: 3 ± 0.67 T= 36 °C, 30 d	424 NmL/gSV 604 NmL/gSV	2
<i>O. sp</i>	Efluente de un digestor anaerobio comercial	Reactor: 1.5 L RIS: 2 T= 38 °C,	249.9 a 260.1 Nm <sup>3</sup> /tSV	3
<i>O. maxima</i>	Efluente anaerobio de PTAR	Reactor: 1 L RIS: 2 T= 37 °C, 40 d	360 L/kgSV	4
<i>O. ficus-indica</i>	Lodos anaerobios	Reactor: 150 mL RIS: 2 T= 39°C, 120 rpm, 40 d	300.8 mL/gSV	5

Referencias: 1. Quintanar-Orozco *et al.*, 2018; 2. Calabrò *et al.*, 2018; 3. Valenti *et al.*, 2018; 4. Ramos-Suárez *et al.*, 2014; 5. Lueangwattanapong *et al.*, 2020

#### 2.2.1.2. Otros biocombustibles

##### *Biohidrógeno*

Los experimentos de producción de biohidrógeno con *Opuntia* son aún escasos. Moreno-Dávila *et al.* (2011) estudiaron la producción fermentativa de hidrógeno en reactores por lote de lecho empacado para evaluar los factores ambientales en el rendimiento de la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales del procesamiento de lácteos. Como sustrato utilizaron tallos secos de *O. imbricata* junto a un cultivo mixto pretratado para la formación de biopelículas. El mejor rendimiento obtenido fue de 12.73 mmol H<sub>2</sub>/g DQO<sub>i</sub> cuando las condiciones fueron de DQO inicial 21.1 g, pH sin ajuste (11.32), y temperatura de 16 °C. Además, se mostró un aumento en la producción de metano de 0.35 a 0.75 g CH<sub>4</sub> /L para la temperatura de 35 a 55 °C.

##### *Bioetanol*

Kuloyo *et al.* (2014) estudiaron la producción de etanol usando el hidrolizado enzimático de cladodios de *O. ficus-indica* con *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* pretratados utilizando dos procedimientos: hidrólisis y fermentación separadas, y sacarificación y fermentación simultáneas. Las concentraciones de etanol que se obtuvieron de *K. marxianus* y *S. cerevisiae* fueron

19.5 y 20.6 g/L, respectivamente, representando 66 y 70 % de conversión teórica de azúcares totales. Sin embargo, la baja concentración de azúcares fermentables en el hidrolizado de *Opuntia* fue una gran limitante para la producción de bioetanol. Alencar *et al.* (2018) optimizaron la hidrólisis enzimática de dos especies de nopal para la producción de bioetanol; evaluaron el efecto del pretratamiento con agua o ácido diluido, y la influencia del surfactante Tween 80. Lo interesante es que ellos observaron que ni el pretratamiento ni la adición del surfactante fueron de gran significancia para aumentar los rendimientos de la hidrólisis enzimática. Las mejores condiciones de operación para la fermentación fueron a 33 °C por 8 h, una carga de celulosa de 10 FPU/g y 30 % p/v de carga de sólidos en ausencia de pretratamiento químico y pectinasa, con una eficiencia de hidrólisis enzimática promedio de 60 % y una eficiencia de fermentación de hidrolizados de 82.2%.

### **2.2.2. Obtención de bioproductos**

La tendencia al aumento de la resistencia a los antibióticos y las preocupaciones de seguridad atribuidas al uso de antioxidantes sintéticos han aumentado la demanda de compuestos bioactivos seguros y naturales, como son los extraídos de plantas. Es importante señalar que los antioxidantes sintéticos no aportan beneficios nutricionales, además de que se ha demostrado que son alergénicos, cancerígenos y causan anomalías en el ADN (Aruwa *et al.* 2019). En busca de disminuir los efectos secundarios que los productos químicos sintéticos implican, el interés en la medicina preventiva ha promovido el uso de nutraceuticos, que son compuestos bioactivos de origen vegetal con valores nutricionales destacables.

#### **2.2.2.1. Extractos antioxidantes**

Las altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno inducen efectos nocivos en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que puede causar cáncer, diabetes, envejecimiento, trastornos cardiovasculares y aterosclerosis. Los antioxidantes están presentes en diversos vegetales y tienen propiedades promotoras de la salud al prevenir la oxidación de las moléculas biológicas antes mencionadas. Por ello es preferible un consumo de alimentos ricos en antioxidantes para prevenir enfermedades degenerativas.

Las especies de *Opuntia* han presentado importantes actividades antioxidantes, además de actividades antiteratogénicas, antitumorales, anticancerígenas, neuroprotectoras, hepatoprotectoras y antiproliferativas. Entre los antioxidantes más efectivos aparecen los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Camarena-Rangel *et al.* 2017). Además, se sabe que los mexicanos han usado las pencas y frutas de *Opuntia* por sus beneficios medicinales, como el tratamiento de la arteriosclerosis, diabetes, gastritis e hiperglucemia.

Lee *et al.* (2002) determinaron la actividad antioxidante de un extracto base etanol obtenido de *O. ficus-indica* var. *Saboten*. Entre los métodos utilizados para evaluar esta actividad, se utilizó la inhibición de la peroxidación de lípidos, así como la eliminación de radicales libres, entre los cuales se utilizaron DPPH, radicales hidroxilos ( $\cdot\text{OH}$ ) y aniones superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Además, el extracto fue capaz de proteger el ADN plasmídico contra la rotura de la cadena inducida por los radicales hidroxilos en una mezcla de reacción de Fenton y, por otro lado, mostró una protección de esplenocitos de ratón significativa contra la citotoxicidad mediada por glucosa oxidasa. Concluyeron que la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el extracto de etanol (180.3 mg/g) se relacionaba con la intensidad de estas propiedades antioxidantes.

Dávila-Hernández *et al.* (2019) utilizaron un pretratamiento con microondas a 297 W por 5.5 min para favorecer la extracción de bioactivos (fenoles y flavonoides) a partir de endocarpio (mucílago y semillas) del xoconostle. Utilizando solo agua como solvente, a 5 °C y 10 min la extracción de fenoles y flavonoides totales tuvo un máximo de 12.92 y 5.64 mg/g, respectivamente.

Aruwa *et al.* (2019) estudiaron los perfiles de compuestos fenólicos y actividades biológicas de los extractos de la pulpa de tuna y su cáscara, además del efecto en métodos de secado sobre los rendimientos y bioactividades del extracto. Eligieron etanol, metanol y agua como solventes debido a que los compuestos polares como los polifenoles se pueden expresar mejor en solventes con alto índice de polaridad como estos. Los extractos de soluciones orgánicas a partir de cáscaras de tuna liofilizadas mostraron mejor actividad antioxidante y antimicrobiana en comparación con los extractos a partir de cáscaras de tuna

secadas en horno. El etanol y metanol diluyeron ácidos fenólicos polihidroxiados, ácido pinélico, flavonoides y otros componentes no identificados. Se reportó que la liofilización y las temperaturas  $\leq 50$  ° C minimizaron las pérdidas fitoquímicas y dieron mejores rendimientos de extracción.

Kim *et al.* (2013) utilizaron enzimas comerciales para remover el mucilago péptico de los cladodios de nopal (*Opuntia humifusa*) con el objetivo de mejorar la extracción y recuperación de sus componentes. La mejor condición de hidrólisis enzimática fue una combinación de Rapidase (DSM Food Specialties, Delft, The Netherlands) y Viscozyme (Novo Nordisk Ferment Ltd., Dittingen, Switzerland) en una relación 1:3 v/v que promovieron una menor viscosidad y alto contenido de azúcares totales y polifenoles. Se cuantificaron los flavonoles, como quercetina e isorhamnetina, los cuales contribuyeron al aumento de la capacidad antioxidante (DPPH) después de la hidrólisis.

En un estudio enfocado al cactus de *O. ficus-indica* como alimento, De Santiago *et al.* (2018) evaluaron el impacto de los métodos de cocción en la composición nutricional, la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos. Cuando los nopales se asaron o se cocieron mediante microondas, se incrementaron los ácidos fenólicos y flavonoides en aproximadamente tres veces a comparación con los nopales crudos. El 80% de los compuestos polifenólicos totales fueron flavonoides, siendo isorhamnetina (Figura 6) el más abundante.

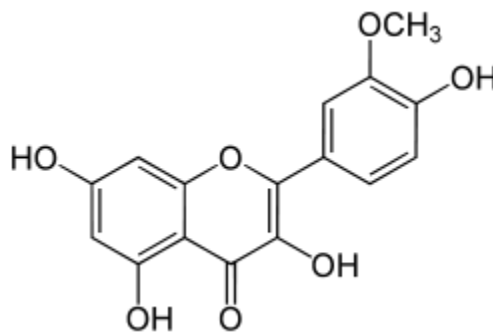


Figura 6. Estructura molecular del flavonol isorhamnetina.

En el estudio de du Toit *et al.* (2018) se determinó que el procesamiento de los cladodios de nopal tuvo una mayor influencia en el contenido de antioxidantes a comparación de la evaluación del tipo de cultivar. Los cladodios secos destacaron

por las concentraciones de compuestos fenólicos, caroteno, ácido ascórbico y betacianinas, además de sus altas actividades antioxidante y quelante.

Moussa-Ayoub *et al.* (2011) compararon dos pretratamientos en cáscara de tuna; un tratamiento ácido y un tratamiento enzimático (con pectinasas y celulasas). El propósito era identificar y cuantificar aglicones de flavonoles (Figura 4 a y b) y el desprendimiento de éstos dependiendo del tipo de pretratamiento. El glicósido principal de la cáscara de tuna, así como del jugo, es la isorhamnetina. Sus resultados demostraron que la hidrólisis ácida produjo ácido protocatecuico (Figura 4 c); sin embargo, la formación de este ácido provocó una disminución en la concentración los flavonoles.

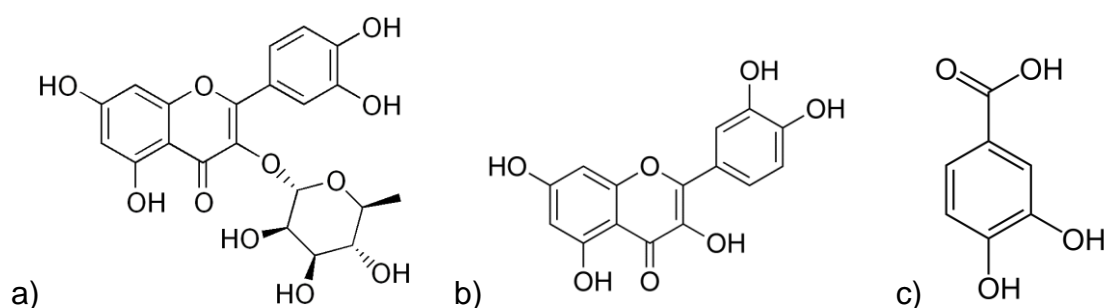


Figura 7. Estructuras moleculares de a) glicósido quercitrina (quercetina + glucosa), b) La glicona es ramnosa y la aglicona es el flavonol quercetina, c) la degradación de quercetina produce ácido protocatecuico.

Con el fin de evitar el uso de solventes orgánicos para la extracción de compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante, Shelembe *et al.* (2014) estudiaron la extracción bajo condiciones ácidas (pH 2) a partir de tanino condensado de salvado de trigo. Se evaluó el efecto protector de los extractos contra el daño oxidativo de la biomembrana utilizando la hemólisis de glóbulos rojos humanos inducida por AAPH como un modelo de sistema biológico y contra el daño oxidativo de la lipoproteína de baja densidad catalizada por cobre en relación con su composición fenólica y su actividad antioxidante.

Medina-Torres *et al.* (2011) evaluaron el efecto del proceso de secado por convección sobre los compuestos bioactivos que contiene *Opuntia ficus-indica*; algunos de éstos son los polifenoles, flavonoides, flavonoles, caroteno, ácido ascórbico, entre otros. Las mejores condiciones para la preservación de los compuestos anteriores fue un secado a temperatura de 45 °C con una velocidad de

flujo de aire de 3 m/s; la caracterización resultó en 41 g de fenoles, 23.4 de flavonoides, 0.54 g de  $\beta$ -caroteno y 0.28 g de ácido ascórbico por kg de muestra.

También se han identificado carotenoides en los cladodios de *Opuntia ficus-indica*. Jaramillo-Flores *et al.* (2003) determinaron los carotenoides  $\alpha$ -criptoxantina,  $\beta$ -caroteno y luteína, siendo ésta la más abundante en los cladodios de nopal. Estudiaron los efectos de tratamientos térmicos y observaron que la capacidad de extracción de estos pigmentos incrementaba, mientras que el contenido de fenólicos totales disminuyó; sin embargo, la actividad antioxidante no resultó afectada debido a esta disminución a causa de la relación de la concentración de carotenoides.

Ávila-Nava *et al.* (2014) identificaron quercetina, isorhamnetina y kaempferol en extractos de nopal. Adicionalmente, compararon su actividad antioxidante con otros productos agrícolas y concluyeron que el orden de mayor a menor fue el siguiente: café > ajo > nopal > ciruela > semillas de chía.

La fermentación ácido-láctica de pulpa de cladodios de *Opuntia ficus-indica* con cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* POM4 (Filannino *et al.* 2016) mejoró las características antioxidantes y de inmunomodulación (análisis *ex vivo* en células intestinales Caco-2/TC7). A pesar de llevarse a cabo la fermentación, los niveles de vitamina C y carotenoides permanecieron en el medio. Independientemente de la cepa que utilizaron, encontraron mayor actividad antioxidante para el extracto con agua, seguido del extracto con acetato de etilo y el extracto de hexano. Así mismo, los flavonoides kaempferol e isorhamnetina fueron identificados en los extractos de acetato de etilo.

Un resumen de los compuestos fenólicos obtenidos de extractos de *Opuntia* spp. se enlistan en la Tabla 6. Según la literatura, los ácidos fenólicos que más se reportan son el ácido ferúlico, piscídico, coumárico, pinélico y caféico; mientras que los flavonoides más abundantes son quercetina, kaempferol e isorhamnetina, además de sus derivados glucosidados.

**Tabla 6. Compuestos fenólicos comúnmente encontrados en *Opuntia* spp.**

Especie/variedad	Ácidos fenólicos	Flavonoides	Ref
<i>O. ficus-indica</i>	Ácido ferúlico Ácido 4-hidroxibenzóico	Quercetina Kaempferol Isorhamnetina	De Santiago <i>et al.</i> , 2018
<i>O. ficus-indica</i> var. Jalpa	-	Glicósidos de isorhamnetina	Rodríguez- Rodríguez, <i>et al.</i> (2015)
Frutas <i>O. ficus-indica</i>	Ácido piscídico; eucómico; pinélico Glucósidos de á. coumárico, cafeico, dihidroferúlico	Glicósidos de isorhamnetina, glicósidos de kaempferol Rutina, taxifolina	Aruwa <i>et al.</i> (2019a)
<i>O. ficus-indica</i>	Ácido piscídico. eucómico, coumárico. Glucósidos de á. cafeico	Isovitexina Glicósidos de isorhamnetina, kaempferol y quercetina	Aruwa <i>et al.</i> (2019b)
<i>O. ficus-indica</i> var. Milpa Alta	-	Quercetina Kaempferol Isorhamnetina	Medina-Torres <i>et al.</i> , 2011
<i>O. ficus-indica</i> ; <i>O. lindheimeri</i> ; <i>O. robusta</i> ; <i>O. streptacantha</i>	-	Glicósidos de isorhamnetina, glicósidos de kaempferol Isorhamnetina, kaempferol	Santos-Zea <i>et al.</i> , 2011
<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill.	-	Isorhamnetina Kaempferol	Filannino <i>et al.</i> , 2016

La isorhamnetina (derivado metilado de la quercetina) tiene el potencial de desarrollarse en el área farmacológica con el tratamiento de enfermedades causadas por estrés oxidativo debido a las propiedades estudiadas por Kandakumar y Manju (2017). De igual manera, Velloso *et al.* (2011) evaluaron las actividades antioxidantes y citotóxicas del kaempferol, quercetina e isoquercetina, donde concluyeron que, si bien se habla de estos compuestos como agentes terapéuticos, no están exentos a presentarse efectos secundarios al momento de su aplicación al ser humano. Las características fisicoquímicas más relevantes de estos flavonoides se encuentran enlistados en la Tabla 7.

**Tabla 7. Características fisicoquímicas de los principales flavonoides encontrados en extractos de nopal.**

Compuesto	Fórmula molecular	Punto de fusión	Solubilidad
Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	316-318 °C	Muy soluble en éter y metanol; soluble en etanol, acetona, piridina y ácido acético
Isorhamnetina	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	311-314 °C	Soluble en acetona, metanol, acetato de etilo y dimetil sulfóxido
Kaemferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	277-287 °C	Muy soluble en etanol, éter de etilo y acetona

A manera de resumen, en la Tabla 8 se muestran los principales resultados relevantes y sus condiciones de operación en cuanto a la extracción de antioxidantes en especies de *Opuntia*. La extracción con etanol como solvente es una de las más utilizadas, mientras que la enzimática y la asistida por microondas son un área de oportunidad debido a sus corto tiempos de extracción y relación sólido:líquido menor.

**Tabla 8. Condiciones de obtención de extractos y resultados.**

Biomasa	Tipo de extracción	Condiciones	Rendimientos	Ref
<i>O. ficus-indica</i> var. Saboten	Etanol absoluto	T ambiente, S:L 1:10, 3 d	FT: 180 mg GAE/g IC <sub>50</sub> : 9.3 µg/mL	Lee <i>et al.</i> , 2002
<i>O. humifusa</i> Raf.	Enzimática	30-40 °C, S:L 1:6 por 6 h	FT: 135 µg/mL IC <sub>50</sub> : 604.7 µg/mL	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>O. ficus-indica</i> pretratada en microondas	Consecutiva metanol, acetona y agua	T ambiente, S:L 1:10, 5 h	FT: 3.25 mg GAE/g DPPH: 0.65 µmol ET/g	De Santiago <i>et al.</i> , 2018
Endocarpio de <i>O. joconostle</i> pretratado en microondas	Etanol y agua	5 °C, S:L 1:10 por 10 min	FT: 12.92 mg GAE/g DPPH: 6.72 mmol ET/100g	Dávila- Hernández <i>et al.</i> , 2019
<i>O. ficus-indica</i>	Metanol, etanol, agua acidificada	22-25 °C, S:L 1:10, 18 h	FT: 10.5 mg GAE/g IC <sub>50</sub> : 65.8 mg/mL	Aruwa <i>et al.</i> , 2019

Notas: FT: fenoles totales; GAE: ácido gálico equivalente; IC<sub>50</sub>: concentración que produce una inhibición del 50% del radical libre DPPH; ET: Trolox equivalentes; S:L: Relación sólido:líquido

#### 2.2.2.1.2. Evaluación de antioxidantes en sistemas in vivo

Como ya se vio antes, el estudio del potencial antioxidante de extractos fenólicos derivados de plantas comúnmente se evalúa solo *in vitro*; sin embargo, estos no consideran los parámetros fisiológicos, bioquímicos y metabólicos. Estos estudios *in vivo* se han realizado en células eucariotas, ratones, peces y conejos, mientras que los ensayos clínicos en humanos aún son escasos.

La capacidad antioxidante ha sido una de las propiedades más estudiadas para diferentes especies de plantas, partes de éstas, sus extractos y ensayos de evaluación. Es un hecho que se deben estudiar las propiedades *in vitro*, sin embargo, hay estudios en donde se pueden ver capacidades prometedoras en donde falta una validación *in vivo*.

En el metabolismo humano, numerosos compuestos se convierten en sus formas activas, mientras que otros se inactivan o enlazan a biomoléculas que cambian su efecto original. Es por lo que el metabolismo aporta una contribución al potencial antioxidante, y ninguno de estos efectos pueden ser observados con ensayos *in vitro* o pueden obtenerse resultados falsos negativos y falsos positivos; por eso es importante realizar estudios *in vivo* y confirmar los resultados obtenidos *in vitro* (Martins *et al.*, 2016).

Para *O. ficus-indica*, se ha reportado que la ingesta ha promovido la liberación de insulina en suero, por lo que los extractos reducen glucosa en la sangre; los extractos de flores y cladodios tienen efectos hipoglucémicos debido a que tienen la capacidad de disminuir la velocidad de absorción intestinal de glucosa, atribuido a la viscosidad de la pectina. En ratas inducidas por hipercolesterolemia, los extractos de *Opuntia* han inhibido la enzima lipasa pancreática, resultando en la prevención de la absorción celular de ácidos grasos y evitando el aumento de colesterol total en la sangre (Aragona *et al.* 2018).

Los extractos de *Opuntia* son ricos en polifenoles y estos pueden mejorar condiciones patológicas como la obesidad y diabetes tipo II. Se han alimentado modelos murinos con un extracto rico en glucósido de isorhamnetina y han mostrado una reducción del peso corporal, niveles mínimos de colesterol total, LDH y HDL en suero y baja concentración de glucosa en la sangre, a comparación de ratones alimentados con una dieta alta en grasas (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2015).

#### 2.2.2.2. Pectina

El mucílago y la pectina son polisacáridos complejos que se componen principalmente de ácidos urónicos, arabinosa, xilosa, glucosa y galactosa, entre otros azúcares. Ambos son hidrocoloides de interés comercial en la industria alimentaria, farmacéutica y de cosméticos, para su uso como gelificantes,

emulsificantes y agentes espesantes. Debido a esto, han sido ampliamente estudiados con el fin de optimizar las condiciones y mejorar la extracción de éstos.

Por ejemplo, Tripodo *et al.* (2015) extrajeron la pectina mediante enzimas pectinolíticas comerciales. Si bien las eficiencias de extracción de pectina que obtuvieron fueron comparables en el mismo rango que las eficiencias con el método tradicional con ácido, la extracción enzimática permite operar a una menor temperatura y el tratamiento de purificación es más fácil. Alternativamente, las industrias de pectina existentes podrían usar cladodios como materia prima, además de la cáscara de limón utilizada comúnmente; por eso que es necesario caracterizar en profundidad la pectina de los cladodios para evaluar su calidad.

Para la purificación de los compuestos bioactivos, la extracción es la operación unitaria más importante. Los métodos de extracción que han sido investigados son la física utilizando agua en estado subcrítico, la enzimática y la llevada a cabo en agua acidificada, asistidas por microondas o ultrasonido. El único proceso industrial de obtención de pectina es mediante la extracción en agua acidificada. Siendo una de las técnicas más estudiadas debido al menor tiempo, menor energía y ahorro de costos, Bayar *et al.* (2017) investigaron la extracción de pectina asistida por ultrasonido, a partir de cladodios de *Opuntia ficus-indica* después de la remoción de mucílago. Las condiciones en que el rendimiento de extracción de pectina alcanzó 18% fueron: tiempo de sonicación de 70 min, temperatura de 70 °C, 1.5 de pH y carga de sólidos de 30 mg/L. La pectina resultante tuvo bajo grado de esterificación, alto contenido de ácido urónico, propiedades funcionales importantes y buena actividad anti-radicales.

Con el propósito de evaluar su futuro prometedor como aditivo en la industria alimentaria, se ha aislado pectina a partir de los cladodios de *O. ficus-indica* después de degradar el mucílago utilizando xilanasas y celulasas (Bayar *et al.* 2018). Sus mejores condiciones de 22 mL/g de carga de sólidos, relación celulasas:xilanasas 2:1 U/U y relación enzima:masa de 4 U/g dieron 17.9 % de rendimiento (masa seca de pectina/masa seca pretratada de cladodios).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cambio climático, el alza en la demanda energética y la disminución de la reserva de los combustibles fósiles han promovido la necesidad de estudiar los recursos renovables, como una fuente de energéticos y a su vez establecer los procesos productivos requeridos que ayuden a disminuir los impactos ambientales ocasionados por la satisfacción de las necesidades humanas. Por esto, es importante la búsqueda de alternativas para la obtención de productos de interés industrial (como los combustibles y compuestos químicos de valor agregado) que sean más amigables al medio ambiente y de esta manera favorecer el desarrollo sostenible del planeta. De los más divulgados en la actualidad, el metano y el hidrógeno han sido los más aclamados e investigados en el ámbito de los combustibles alternos obtenidos a partir de residuos vegetales, ya que se caracteriza la conversión de éstos últimos y su aplicación en la industria energética.

Desde la época prehispánica, el nopal ha destacado debido a sus propiedades nutricionales y medicinales, además de ser un cultivo con un alto rendimiento de producción y con bajos requerimientos de agua para su crecimiento. Es una planta muy versátil y resistente a condiciones climáticas desfavorables, por lo que se ha distribuido por todo el mundo, específicamente en regiones áridas. Si bien se utiliza en México y en ciertas partes del mundo como alimento, hay otras especies que pueden crecer de manera silvestre aún en suelos pobres en nutrientes.

Las diferentes especies y variedades de nopal han sido estudiadas también debido a su potencial como materia prima para la obtención de compuestos antioxidantes, especialmente compuestos fenólicos como los ácidos fenólicos y los flavonoides. De los compuestos más abundantes en *Opuntia* spp. son quercetina, kaempferol e isorhamnetina. Su uso como futuro medicamento para tratamiento de enfermedades degenerativas aún sigue investigándose.

Es debido a esto que se busca aprovechar los cladodios de nopal e investigar sus propiedades como materia prima para obtener productos de valor agregado, como lo son los biocombustibles y compuestos bioactivos.

#### **4. APORTACIÓN CIENTÍFICA**

El proyecto tiene como aportación científica el diseño de un esquema de biorrefinería para *Opuntia ficus-indica* que involucre el aprovechamiento y revalorización de esta materia prima con la finalidad de obtener extractos con buen potencial antioxidante, y la reutilización el residuo sólido como sustrato para la producción de biocombustibles.

#### **5. HIPÓTESIS Y PREGUNTAS QUE SE PROPONE RESPONDER**

Ho: El uso de una especie nativa de *Opuntia* de la región de Apodaca en un proceso de biorrefinería permitirá rendimientos de extracción de fenoles y producción de biohidrógeno y biometano comparables con el mismo proceso utilizando *Opuntia ficus-indica*.

Ha: La incorporación de obtención de extractos antioxidantes como etapa de pretratamiento permitirá obtener mayores producciones de biohidrógeno y biometano bajo un esquema de biorrefinería usando como sustrato *Opuntia ficus-indica*.

- ¿Las especies nativas y las cultivadas tienen características similares en su composición y posibilidad de transformación?
- ¿Existe un método de extracción que permita maximizar la obtención de compuestos fenólicos?
- ¿Los compuestos fenólicos extraídos tendrán una actividad antioxidante considerable?
- ¿La producción de hidrógeno y metano de *Opuntia* es comparable con otros procesos en literatura?

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Desarrollar un proceso de biorrefinería aplicado a *Opuntia ficus-indica* en el cual se obtengan como productos extractos antioxidantes, biometano y biohidrógeno.

### **6.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar proximalmente los cladodios de dos especies de *Opuntia* (nativa vs comercial) típicas de la región.
- Evaluar la extracción con etanol y metanol para la obtención de antioxidantes a partir de cladodios de *Opuntia*.
- Evaluar la producción de biohidrógeno y biometano a partir de cladodios de *Opuntia* (especie nativa vs comercial) y de los residuos de extracción.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Plan de trabajo

El proyecto se dividió en tres fases (Figura 8). La primera etapa consiste en la Actividad 1, donde se caracterizó la biomasa de *Opuntia* spp. antes y después del tratamiento con solventes. La segunda etapa fue el diseño de experimentos para la obtención de los extractos con capacidad antioxidante y su aplicación a un volumen escalado. En la etapa tres se realizaron cinéticas de producción de biometano y biohidrógeno, respectivamente; como sustrato se utilizaron la biomasa de *Opuntia* spp. seca y los residuos sólidos de la extracción secos.

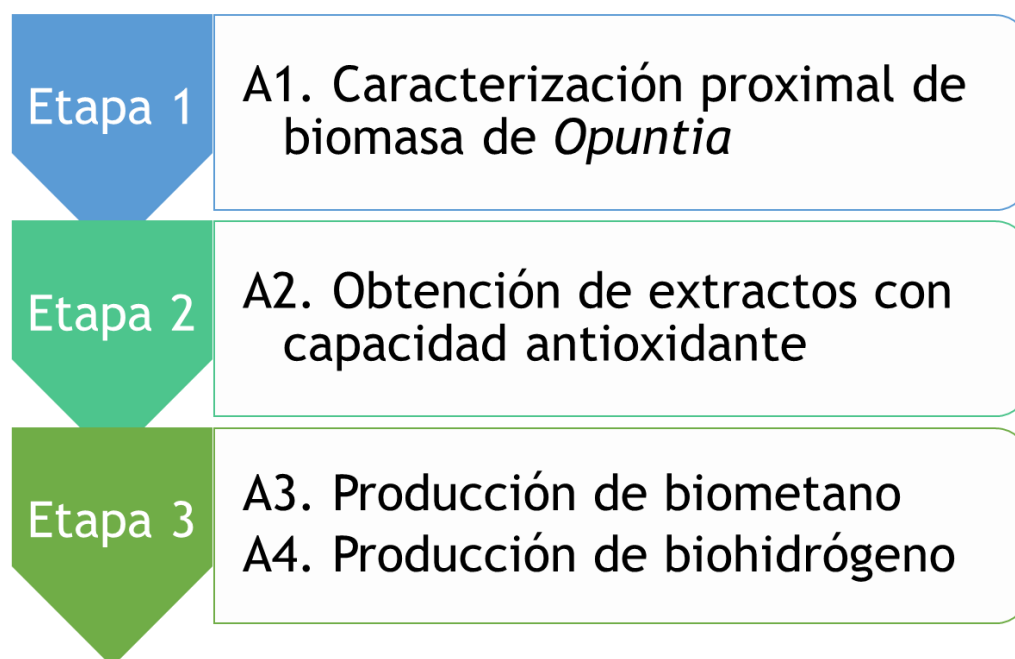


Figura 8. Etapas y actividades del plan de trabajo.

## 7.2. Actividad 1. Caracterización proximal de biomasa de *Opuntia*

### 7.2.1. Propósito

Caracterizar las biomásas secas de tres especies de *Opuntia*.

### 7.2.2. Diseño experimental

Esta actividad va a permitir conocer técnicas de caracterización básicas, además de proveer información sobre la composición lignocelulósica y características principales de tres especies de *Opuntia*.

### 7.2.3. Programa de seguimiento y análisis

En la Tabla 9 se muestran los métodos necesarios para el posterior análisis de la biomasa de *Opuntia* spp.

Tabla 9. Parámetros para la caracterización de *Opuntia* spp.

Parámetro	Método	Referencia
Sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas	Gravimétrico	APHA/AWWA/WEF (2012)
Fibra dietética total	Gravimétrico-enzimático	AOAC/AACC (2001)
Celulosa, holocelulosa y lignina	Gravimétrico	AOAC (1992)
Nitrógeno total Kjeldahl	Digestión y titulación	AOAC (1992)
pH	Potenciométrico	NMX-AA-25-1984
Análisis termogravimétrico	Térmico	Ávila-Lara <i>et al.</i> (2014)
Absorción atómica/ICP (Ca, Mg, Cu, Fe, Pb, K, Zn)		AOAC (1992)

### 7.2.4. Procedimientos y técnicas

#### 7.2.4.1. Recolección y preparación de *Opuntia* spp. para ensayos presuntivos

Se utilizaron dos especies de *Opuntia*; una especie comercial, que se obtuvo del Mercado Estrella en Monterrey, Nuevo León (cultivada en Milpa Alta), y una especie nativa, que fue recolectada de los alrededores del Parque de Investigación e Innovación Tecnológica, en Apodaca, Nuevo León.

Una vez recolectados, se le quitaron las espinas con navaja, se lavaron con agua de grifo y se desinfectaron con etanol al 70%; después se cortaron en cuadros y se licuaron. La masa líquida se colocó en bandejas de vidrio y se dejó secar al aire libre de 3 a 5 días. La biomasa seca se molió en un molino manual de hierro y

se tamizó a un tamaño de partícula menor a 20 micras. Éstas muestras se guardaron en un frasco hermético y se almacenaron a temperatura ambiente.

#### 7.2.4.2. *Recolección y preparación de Opuntia ficus-indica para ensayos finos de extracción de antioxidantes*

Las pencas de *Opuntia ficus-indica* var. Copena se obtuvieron de un campo de producción para autoconsumo en General Zepeda, Coahuila (N25°23'0" O101°27'13", altitud 1460 msnm), en otoño (30 de octubre) entre 8 y 9 a.m. Se seleccionaron pencas de 6 meses, de buena calidad sin imperfecciones (que no tuvieran plaga, cortes o cicatrices, deformidades), que no hayan dado frutos. Se recolectaron 2 cladodios de cada planta muestreada, cada 5 plantas en la misma dirección del surco y 5 plantas en la dirección perpendicular, todos de la misma altura de esta y pencas de tamaños iguales (i.e. 20 cm de largo por 15 cm de ancho) (du Toit *et al.*, 2018). En total se recolectaron 20 kg. Se le quitaron las espinas, se lavaron con agua de grifo y desinfectaron con etanol grado industrial al 70%, se cortaron en cuadrados y se licuaron (TAPISA T3L). Después, la masa líquida se llevó a liofilizar (-50 °C, 0.12 mbar, liofilizador Labconco 7753022), y una vez seca se llevó a reducción de tamaño en un procesador de alimentos (Hamilton Beach).

El pH se determinó diluyendo la materia seca en agua destilada, en una relación 1:5 p/v muestra/agua con un medidor de pH (Conductronic PC45, México).

#### 7.2.4.3. *Determinación de sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas*

Se pesaron cápsulas de porcelana previamente mantenidas a peso constante ( $P_0$ ). Se tomaron 0.5-1 g de muestra y se colocaron en la cápsula ( $P_1$ ), se dejan secar hasta tener peso constante a 103-105 °C por 12 h. Después, se pasaron a un desecador para enfriar y pesar ( $P_2$ ). Se calculó el peso de los sólidos totales contenidos en la muestra por diferencia de peso.

$$\% ST = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} * 100$$

La cápsula se lleva a la mufla a 550 °C por 2 h. Se pasaron a un desecador para dejar enfriar y posteriormente pesar ( $P_3$ ). Se calculó el peso de los sólidos volátiles y las cenizas por diferencia de pesos.

$$\% SV = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_0} * 100$$

$$\% Ceniza = \frac{P_3 - P_0}{P_2 - P_0} * 100$$

#### 7.2.4.4. *Fibra dietética total, soluble e insoluble*

La determinación de la fibra dietética se lleva a cabo mediante el método de enzimático-gravimétrico. La muestra seca se digiere enzimáticamente con  $\alpha$ -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa.

Si solo se quiere determinar la fibra dietética total, después de la digestión se precipita la fibra soluble con etanol, se filtra la solución, se seca el residuo y se pesa. Para determinar fibra soluble e insoluble por separado, primero la solución digerida se filtra y el residuo se lava con agua destilada caliente; en este caso, el residuo es la fibra dietética insoluble (FDI). Luego, el filtrado se combina con el agua de lavado y se precipita con etanol para la determinación de fibra dietética soluble (AOAC, 1995).

#### 7.2.4.5. *Determinación de celulosa*

Previo a los ensayos, se llevaron a secar los filtros Gooch con filtro de fibra de vidrio al horno por 2 horas a 75°C (P<sub>0</sub>). Se pesan 0.2-0.5 g de muestra en un tubo de ensayo (M). Se agregan 7 mL de ácido acético a 70% v/v y 0.5 mL de ácido nítrico concentrado. Se llevan a baño maría por 30 minutos con agitación. La disolución fría se filtra a vacío y el filtro Gooch con los sólidos se lleva al horno a 105°C por dos horas hasta obtener peso constante (P<sub>1</sub>).

$$\% Celulosa = \frac{P_1 - P_0}{M} * 100$$

#### 7.2.4.6. *Determinación de holocelulosa*

Se lleva a secar a 75°C por 2 horas los filtros Gooch necesarios para el ensayo junto con sus respectivos filtros de fibra de vidrio (P<sub>0</sub>). En un tubo de ensayo se pesan aproximadamente 0.2-0.5 g de muestra (M). Se deja reposar la muestra con 10 mL de hipoclorito de sodio por media hora o hasta que la disolución se decolore. La disolución se filtra a vacío y se lava luego con etanol y agua en una proporción de 2:1. Se lleva el filtro con la muestra sólida a secar a 105°C por dos horas hasta peso

constante ( $P_1$ ). Si se desea descartar las cenizas, el filtro se lleva a la mufla a 550°C por dos horas ( $P_2$ ).

$$\% \text{ Holocelulosa} = \frac{P_1 - P_0}{M} * 100$$

$$\% \text{ Holocelulosa}_{\text{sin cenizas}} = \frac{P_1 - P_2}{M} * 100$$

#### 7.2.4.7. *Determinación de lignina*

Se llevan a secar los filtros Gooch con filtro de fibra de vidrio al horno por 2 horas a 75°C ( $P_0$ ). Se pesan 0.2-0.5 g de muestra en un tubo de ensayo (M). Se agregan 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% v/v frío. Se colocan en un baño “maría” a 30°C agitando cada minuto por una hora. Las muestras se lavaron con agua destilada y se colocaron en matraces Erlenmeyer con tapones de algodón a calentamiento de 100°C por dos horas. Se recupera el sólido por filtrado a vacío y los filtros se secan a 105°C por dos horas en el horno hasta peso constante ( $P_1$ ).

$$\% \text{ Lignina} = \frac{P_1 - P_0}{M} * 100$$

#### 7.2.4.8. *Nitrógeno total Kjeldahl*

Para determinar el nitrógeno total se lleva a cabo el método Kjeldahl el cual consiste en tres etapas: la digestión de la muestra donde el nitrógeno orgánico se convierte a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; la destilación del digestato, donde el NH<sub>3</sub> es destilado y retenido en un vaso receptor; y la titulación de la solución obtenida para determinar la cantidad de nitrógeno presente.

#### 7.2.4.9. *Análisis elemental, análisis termogravimétrico y análisis por absorción atómica*

El análisis elemental orgánico determina las cantidades de carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre y oxígeno presentes. Se basa en la combustión de la muestra y los gases que se generan son analizados mediante cromatografía de gases para determinar la proporción de los elementos en la muestra. El análisis se llevó a cabo en un analizador elemental Perkin Elmer 240, se determinaron las fracciones en masa de C, H, N y S, y por diferencia se calculó el oxígeno (Ávila-Lara, 2019).

El análisis termogravimétrico consiste en medir la masa, ya sea pérdida o ganancia, de una muestra cuando se somete a un programa de temperatura; está relacionada con la pérdida de componentes volátiles, descomposición de polímeros, combustión de carbón y residuos, entre otros. Se llevó a cabo en un equipo de análisis termogravimétrico (TGA Q 500, TA Instruments, E.E.U.U.), el programa de temperatura fue de 30 a 700 °C con rampa de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera oxidante (Rodríguez-Valderrama, 2018).

Con el fin de determinar metales pesados (tales como Ca, Mg, K, Zn, Fe y Pb) presentes en la muestra, se analizó la materia prima mediante espectroscopía de absorción atómica. Consiste en atravesar un haz de radiación electromagnética (puede ser monocromático o policromático) por el área de atomización de la muestra que contiene las moléculas monoatómicas de interés; éstos absorberán radiación y por lo tanto habrá una diferencia que se puede cuantificar.

### 7.3. Actividad 2. Obtención de extractos con mejor capacidad antioxidante

#### 7.3.1. Propósito

En esta actividad se evaluó el efecto del tipo de solvente en la variedad y cantidad de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos de *Opuntia* spp.

#### 7.3.2. Diseño experimental

Los siguientes experimentos se realizaron utilizando dos solventes: etanol (EtOH) y metanol (MeOH) en soluciones concentradas y en diluidas al 80 %. El extracto resultante se sometió a pruebas de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, azúcares reductores totales, azúcares totales, actividad antioxidante mediante captura de radicales libres DPPH y determinación de fenoles y flavonoides por HPLC. Además, con el fin de separar los compuestos fenólicos y flavonoides de interés en una fase alcohólica, se realizó una extracción en fase sólida. El lavado acuoso del cartucho se usó para determinar azúcares reductores.

Los sólidos residuales del procedimiento de extracción se utilizaron en las actividades 3 y 4 para los experimentos de producción de biogás.

#### 7.3.3. Programa de seguimiento y análisis

Las extracciones se realizaron por duplicado y en cada experimento el filtrado se utilizó para determinar los parámetros enlistados en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros para la caracterización del extracto.

Parámetro	Método	Referencia
Fenoles totales	Colorimétrico	Dávila-Hernández <i>et al.</i> , 2019
Flavonoides totales	Colorimétrico	Pawar y Dasgupta, 2018
Actividad antioxidante	Colorimétrico	Pawar y Dasgupta, 2018
Determinación de fenoles y flavonoides	HPLC-DAD	Kim <i>et al.</i> , 2013
Azúcares reductores	Colorimétrico	Miller <i>et al.</i> , 1959
Azúcares totales	Colorimétrico	Dubois <i>et al.</i> , 1951

### **7.3.4. Procedimientos y técnicas**

#### *7.3.4.1. Procedimiento de extracción con solventes*

La biomasa seca, molida y tamizada (250 micras) de *Opuntia ficus-indica* (O. comercial), *Opuntia engelmannii* (O. nativa) y *Opuntia ficus-indica* var. Copena (O. cultivada) se colocó en botellas serológicas con el solvente correspondiente en carga de sólidos de 0.1 g/mL (5 g de biomasa y 50 mL de solvente). La extracción se llevó a cabo en una incubadora orbital (PRENDO INO-650 M, México) a 150 rpm y temperatura ambiente (22-25 °C) por 1 h. La solución resultante se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min y el sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 1 y se guardó en tubos Corning para su análisis, mientras que el sólido residual se utilizó para los experimentos de producción de biogás.

#### *7.3.4.2. Procedimiento de extracción en fase sólida*

Para separar los azúcares de los compuestos fenólicos, se realizó una extracción en fase sólida, donde se utilizaron cartuchos C18 (Strata C18-E, Phenomenex); primero se limpiaron con 3 mL de metanol, luego se acondicionan agregando de 3 a 6 mL de HCl 0.1%. Se agregaron 1.5 mL de la solución muestra (extracto seco diluido en metanol) y después se lavó el cartucho con 1.5 mL de HCl 0.1%; esta solución (3 mL) se evaluará para azúcares reductores y totales. Se utilizaron 3 mL de metanol para eluir los compuestos fenólicos retenidos en el cartucho. Ambas soluciones se analizaron para capacidad antioxidante DPPH. Para lavar el cartucho se utilizaron 3 mL de la solución de metanol más HCl 0.1 % y 3 mL de agua destilada (Michalkiewicz *et al.*, 2008).

#### *7.3.4.3. Determinación de fenoles totales*

Para cuantificar los compuestos fenólicos totales se utilizará el método colorimétrico con el reactivo Folin-Ciocalteu. Consiste en agregar 0.250 mL del reactivo Folin-Ciocalteu a 1 mL de muestra, se deja reposar por 5 min. Después se agregan 0.750 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20 %p/v y se deja reaccionar por 90 min en ausencia de luz. Se mide la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Jenway 7315) (Rodríguez-Valderrama, 2018). El blanco utilizado fue agua destilada y la concentración de la

muestra se midió comparando su valor contra el de una curva de calibración con ácido gálico de 5-50 mg/L.

#### 7.3.4.4. *Determinación de flavonoides totales*

Se mezclaron 50 uL de muestra, 10 uL de cloruro de aluminio al 10 %, 150 uL de etanol al 95 % y 10 uL de acetato de sodio 1 M. La mezcla se agitó y se incubó por 40 min a temperatura ambiente y en oscuridad (Pawar y Dasgupta, 2018). La absorbancia se leyó a 415 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). El blanco que se utilizó fue etanol al 80 % y se prepararon estándares de quercetina de 5-100 ug/mL.

#### 7.3.4.1. *Determinación de la actividad antioxidante DPPH*

Se mezclaron 20 uL de muestra con 180 uL de solución DPPH al 0.1 mM en metanol. Esta mezcla se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. La absorbancia se mide a 517 nm (Pawar y Dasgupta, 2018). Los resultados se expresaron en la concentración del extracto que inhibe el 50% del radical libre DPPH (IC<sub>50</sub>). El porcentaje de la actividad captadora de radicales libres DPPH se calcularon con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ captación} = \frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} * 100$$

#### 7.3.4.2. *Determinación de azúcares reductores totales*

La concentración de azúcares reductores se obtuvo mediante el procedimiento según Miller (1959). Se mezclaron 0.5 mL del extracto diluido y 1.5 mL de la solución DNS; se colocaron a baño maría por 5 min y posteriormente se hizo un choque térmico con agua en hielo. Después, se agregaron 3 mL de agua destilada y se midió la absorbancia a 550 nm.

#### 7.3.4.3. *Determinación de azúcares totales*

La concentración de azúcares totales se calculó con la metodología según Dubois (1951). Se mezclaron 0.5 mL del extracto diluido y 0.5 ml de fenol al 8%, se agitó y se agregaron rápidamente 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Después de dejar enfriar por 30 min, se midió la absorbancia a 490 nm.

## 7.4. Actividad 3. Producción de biometano utilizando biomasa de *Opuntia* spp.

### 7.4.1. Propósito

Comparar la producción de metano mediante digestión anaerobia a partir de pencas secas de dos especies de *Opuntia* y a partir de los sólidos residuales de la extracción de biocompuestos.

### 7.4.2. Diseño experimental

Se realizarán experimentos presuntivos para observar la producción de biometano mediante la digestión anaerobia de *O. comercial* y *O. nativa*. En estos se evaluará el potencial de producción de metano utilizando 3 relaciones inóculo sustrato y a partir de dos sustratos provenientes de pencas de *Opuntia* (comercial y nativa) a temperatura controlada.

**Tabla 11. Diseño de experimentos para la producción de biometano con *Opuntia* spp.**

Sustrato	Relación inóculo/sustrato	Condiciones de operación
Pencas secas de <i>Opuntia</i> comercial (Oc)	2.5, 1.5, 0.5	Temperatura= 35 °C V= 50 mL Agitación = manual una vez al día
Pencas secas de <i>Opuntia</i> nativa (On)		

Posteriormente, se realizó la digestión anaerobia de la biomasa residual del mejor método de extracción obtenido en la Actividad 2 y su producción acumulada se comparó con la digestión de las pencas secas de la actividad presuntiva.

**Tabla 12. Diseño de experimentos para la producción de biometano con residuos de extracción de *Opuntia* spp.**

Sustrato	Relación inóculo/sustrato	Condiciones de operación
Pencas secas de <i>Opuntia</i> comercial (Oc)	2.5	Temperatura= 35 °C V= 50 mL Agitación = manual una vez al día
Pencas secas de <i>Opuntia</i> nativa (On)		
Pencas secas de <i>Opuntia</i> cultivada (Ou)		
Residuos sólidos de extracción de <i>Opuntia</i> comercial (Rc)	2.5	Agitación = manual una vez al día
Residuos sólidos de extracción de <i>Opuntia</i> nativa (Rn)		
Residuos sólidos de extracción de <i>Opuntia</i> cultivada (Ru)	2.5, 1.5, 0.5	

### 7.4.3. Programa de seguimiento y análisis

En la Tabla 13 se muestran los parámetros evaluados en el inóculo, en el sustrato y en el digestato final.

Tabla 13. Parámetros por analizar en la digestión anaerobia.

Parámetro	Método	Periodicidad	Referencia
pH	Potenciométrico	Inicial/final	NMX-AA-25-1984
Sólidos totales, volátiles y cenizas	Gravimétrico	Inicial/final	APHA/AWWA/WEF (2012)
Ácidos grasos volátiles	Titulación	Final	Anderson y Yang (1992)
Alcalinidad total	Titulación	Final	Anderson y Yang (1992)
Metano	Desplazamiento volumétrico con NaOH	Diario	Rodríguez-Valderrama, 2018

### 7.4.4. Procedimientos y técnicas

#### *Preparación del inóculo*

Se utilizó como inóculo los lodos de un digestor anaerobio montado bajo el método Poggi-Varaldo (Escamilla-Alvarado, 2014) operado por el grupo de trabajo con alimentación semanal de residuos de verduras y frutas a tiempo de retención másico de 40 días. Se caracterizó mediante los siguientes análisis: pH, perfil de sólidos, alcalinidad y ácidos grasos volátiles.

#### *Preparación del sustrato (Opuntia spp. y sólidos residuales de extracción)*

Las pencas secas de las diferentes especies de *Opuntia* caracterizadas se utilizaron en la digestión anaerobia a un tamaño de partícula de 210  $\mu\text{m}$ . En cuanto a los residuos del proceso de extracción, una vez centrifugado y retirado el sobrenadante se recuperaron los residuos sólidos, los cuales se llevaron a sequedad en el horno a 105 °C por 24 h. Una vez secos, se molieron en un molino para café y se tamizaron al tamaño de partícula de 210  $\mu\text{m}$ .

#### *Montaje experimental de los ensayos presuntivos para la producción de biometano*

El ensayo de potencial de biometano se llevó a cabo por duplicados en botellas serológicas de 124 mL. El volumen de operación se mantuvo fijo en 50 mL. El sustrato correspondiente se agregó después del inóculo, asegurando las RIS que se propusieron en el diseño de experimentos (Tabla 11 y Tabla 12). Se utilizó un

duplicado de controles para la digestión anaerobia donde sólo se colocó el inóculo. Las botellas se cerraron con tapón y se sellaron con un agrafe de aluminio.

El ensayo se realizó en incubadora (Isotemp Incubator, Fisher Scientific) a 35 °C y la agitación de los reactores fue diaria al momento de la medición. Ésta se llevó a cabo mediante el método de probeta invertida, donde el biogás atraviesa una solución de NaOH 1 M.

## 7.5. Actividad 4. Producción de biohidrógeno utilizando biomasa de *Opuntia* spp.

### 7.5.1. Propósito

Comparar la producción de hidrógeno mediante fermentación oscura a partir de pencas secas de dos especies de *Opuntia* y a partir de los sólidos residuales de la extracción de biocompuestos.

### 7.5.2. Diseño experimental

Se realizaron experimentos presuntivos para conocer la producción de hidrógeno mediante la fermentación oscura de *O. comercial* y *O. cultivada*. Se evaluó el potencial de producción de hidrógeno utilizando 3 relaciones inóculo sustrato y a partir de dos sustratos provenientes de pencas de *Opuntia* (comercial y cultivada) a temperatura controlada.

**Tabla 14. Diseño experimental para la producción de biohidrógeno.**

Sustrato	Relación inóculo/sustrato	Condiciones de operación
Pencas secas de <i>Opuntia</i> comercial (Oc)	1, 0.6, 0.2	Temperatura= 35 °C V= 50 mL Agitación = manual una vez al día
Pencas secas de <i>Opuntia</i> cultivada (Oc)		

De igual manera a la actividad anterior, se evaluará el potencial de producción de hidrógeno utilizando la biomasa residual del mejor método de extracción obtenido en la Actividad 2, y su producción acumulada se comparó con la mejor condición de fermentación oscura utilizando las tres especies estudiadas por separado.

**Tabla 15. Diseño experimental para la producción de biohidrógeno utilizando residuos sólidos de la extracción de *Opuntia* spp.**

Sustrato	Relación inóculo/sustrato	Condiciones de operación
Pencas secas de <i>Opuntia</i> comercial (Oc)	0.2	Temperatura= 35 °C V= 50 mL Agitación = manual una vez al día
Pencas secas de <i>Opuntia</i> nativa (On)		
Pencas secas de <i>Opuntia</i> cultivada (Ou)	0.2	Agitación = manual una vez al día
Residuos sólidos de extracción de <i>Opuntia</i> comercial (Rc)		
Residuos sólidos de extracción de <i>Opuntia</i> nativa (Rn)	1, 0.6, 0.2	
Residuos sólidos de extracción de <i>Opuntia</i> cultivada (Ru)		

### 7.5.3. Programa de seguimiento y análisis

En la Tabla 16 se muestran los parámetros que fueron evaluados en el inóculo, en el sustrato y en el digestato final.

Tabla 16. Parámetros para analizar en la fermentación oscura de *Opuntia* spp.

Parámetro	Método	Periodicidad	Referencia
pH	Potenciométrico	Inicial/final	NMX-AA-25-1984
Sólidos totales, volátiles y cenizas	Gravimétrico	Inicial/final	APHA/AWWA/WEF (2012)
Ácidos grasos volátiles	Titulación	Final	Anderson et al. (1992)
Alcalinidad total	Titulación	Final	Anderson et al. (1992)
Hidrógeno	Desplazamiento volumétrico con NaOH	Diario	

### 7.5.4. Procedimientos y técnicas

#### *Preparación del inóculo*

En este caso, el inóculo Poggi-Varaldo del digestor del grupo de trabajo (descrito en la Actividad 3), se sometió a un tratamiento térmico con la finalidad de inhibir/eliminar las arqueas metanogénicas. Este tratamiento consistió en colocar el inóculo necesario en un matraz elrenmeyer y dejarlo a baño maría a 96 °C por 2 h (Rodríguez-Valderrama, 2018).

#### *Preparación del sustrato (Opuntia spp. y sólidos residuales de extracción)*

La preparación de la materia prima utilizada se realizó conforme a lo descrito en el subtema homónimo de la Actividad 3.

#### *Montaje experimental de producción de hidrógeno*

El ensayo de producción de hidrógeno se llevó a cabo por duplicados en botellas serológicas de 124 mL. El volumen de operación se mantuvo en 50 mL en todos los experimentos. El sustrato y el inóculo pretratado se colocaron en los recipientes dependiendo de las RIS propuestas en la Tabla 14 y Tabla 15. Se utilizó un duplicado de controles para la fermentación oscura donde sólo se colocó el inóculo. Las botellas se cerraron con tapón y se sellaron con un agrafe de aluminio.

El ensayo se realizó en una cámara de fermentación a 35 °C, la agitación de los reactores fue diaria y la producción se midió con el desplazamiento de una solución de NaOH 1M en probetas invertidas.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 8.1. Actividad 1. Caracterización proximal de biomasa de *Opuntia*

La caracterización proximal de los cladodios de tres tipos de *Opuntia* clasificados dependiendo de su obtención se resume en la Tabla 17.

Tanto el porcentaje de humedad como el de cenizas son altos, lo que es característico en las plantas con metabolismo CAM, ya que el calcio (uno de los minerales más abundantes en *Opuntia*) está presente en forma de ácido oxálico y se relaciona con el metabolismo de la pectina (Stintzing y Carle, 2005).

**Tabla 17. Resultados de caracterización de tres especies de *Opuntia*.**

Parámetro	Comercial	Nativa	Cultivada
Humedad (%bh)	94.5	86.3	90.5
Sólidos volátiles (%bs)	78.5	77.4	73.7
Cenizas (%bs)	21.5	22.6	26.3
Celulosa (%bs)	9.18	5.8	16.2
Hemicelulosa (%bs)	11.7	34.7	F/A
Lignina (%bs)	2.29	4.7	F/A
Fibra dietética total	F/A	F/A	F/A
NKT (%bs)	1.17	1.45	F/A
pH	4.95	6.98	4.43
Fósforo (%bs)	0.067	0.315	F/A
Potasio (%bs)	2.14	3.91	F/A
Sulfatos (%bs)	0.51	0.66	F/A
Poder calorífico (kcal/kg)	3045	3186	F/A

Nota: F/A, falta analizar; bh, base húmeda; bs, base seca.

## 8.2. Actividad 2. Obtención de extractos con mejor capacidad antioxidante

En la Tabla 18 se muestra la caracterización de los extractos alcohólicos de los tres tipos de *Opuntia* estudiados. Se evaluaron estadísticamente seis respuestas mediante un diseño factorial general 3x2x2, donde los factores con sus correspondientes niveles fueron: especie de *Opuntia* (comercial, nativa y cultivada), solvente orgánico (metanol y etanol) y concentración del solvente (100 y 80 %).

**Tabla 18. Caracterización de los extractos crudos de tres especies de *Opuntia*.**

Especie de <i>Opuntia</i>	Concentración %	Solvente	AT g/L	AR g/L	CFT mg GAE/g	Rendimiento g/L	FT mg QE/g	DPPH % captación
Comercial	100	MeOH	0.53	0.64	3.68	5.89	0.49	18.00
		EtOH	0.14	0.13	1.15	1.44	0.22	5.68
	80	MeOH	2.06	1.37	8.99	20.49	1.67	58.52
		EtOH	2.00	1.45	7.49	14.29	1.59	47.69
Nativa	100	MeOH	1.08	0.57	1.32	10.18	0.27	22.09
		EtOH	0.25	0.39	0.66	2.49	0.11	1.64
	80	MeOH	2.71	0.84	2.66	16.41	0.45	52.12
		EtOH	2.77	0.86	2.66	11.78	0.46	45.14
Cultivada	100	MeOH	0.98	1.27	0.74	4.78	0.64	28.83
		EtOH	0.22	0.45	0.44	1.36	0.52	19.39
	80	MeOH	3.49	2.92	6.25	14.11	0.67	39.22
		EtOH	3.31	3.33	4.76	11.30	0.83	34.41

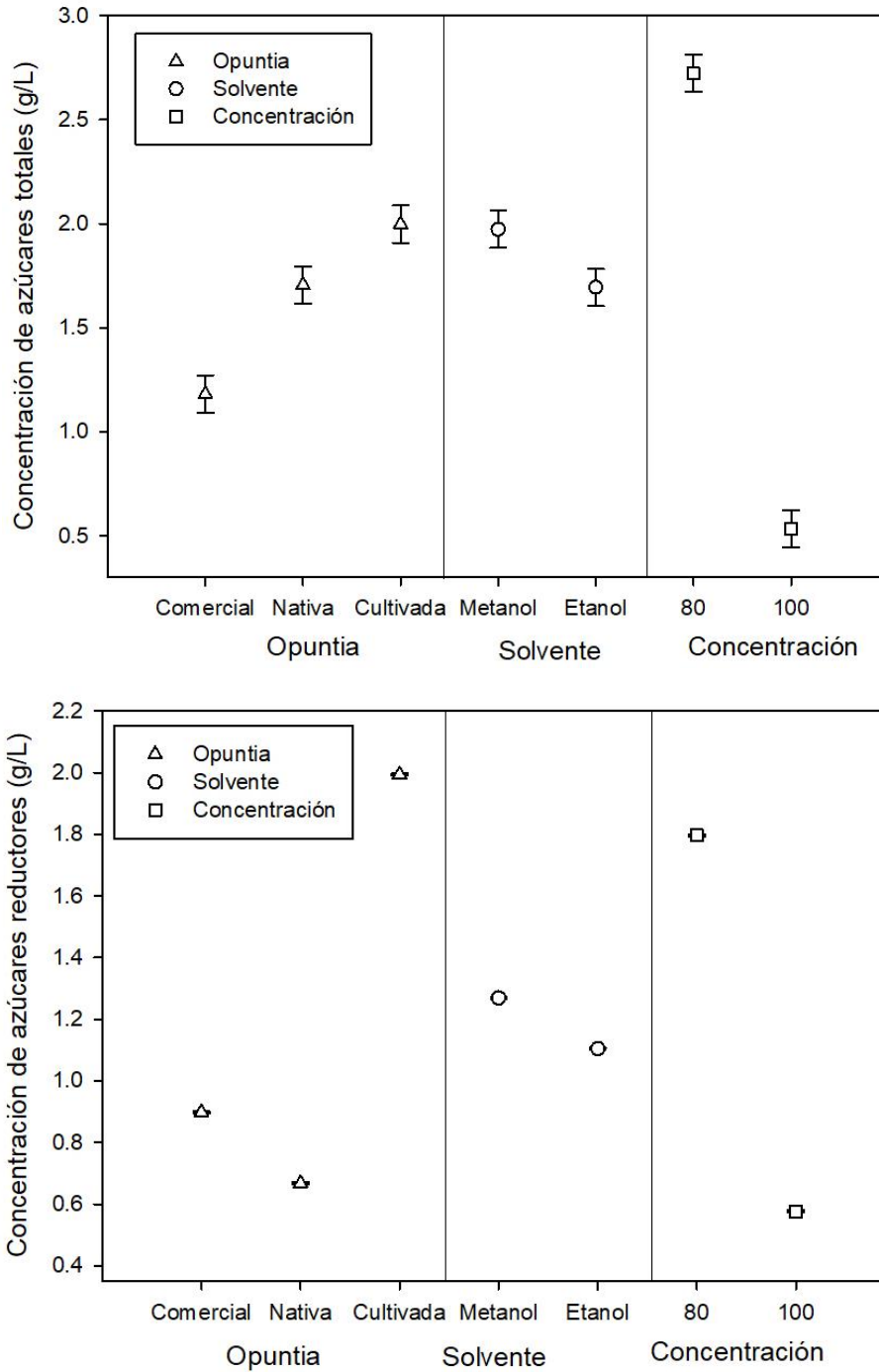
Notas: AT, azúcares totales; AR, azúcares reductores; CFT, compuestos fenólicos totales; FT, flavonoides totales; GAE, ácido gálico equivalente; QE, quercetina equivalente

Los azúcares totales y reductores se comportaron de manera similar; los extractos de metanol y etanol al 80 % de cualquier tipo de *Opuntia* dieron mayores concentraciones de azúcares totales. En este caso, la cultivada y la comercial, con metanol y etanol al 80 % resultaron en un rango de 2.71 a 3.49 g/L; mientras que, para azúcares reductores los mejores resultados varían entre 1.37 y 3.33 g/L.

Si bien la concentración de azúcares totales y reductores muestra que los azúcares también pueden ser liberados con este tipo de pretratamiento, aunque en una menor proporción comparada con una hidrólisis ácida, los compuestos y características de mayor interés en este proyecto son los compuestos fenólicos totales, los flavonoides totales y la capacidad antioxidante DPPH. Las mejores concentraciones de fenólicos totales son 8.99 y 7.49 mg GAE/g para el nopal

comercial, con metanol y con etanol al 80 %, respectivamente. También, la especie cultivada con metanol al 80 % se acerca a las concentraciones anteriores con 6.25 mg GAE/g. Otro parámetro importante es el rendimiento de la extracción, esto quiere decir la relación entre el extracto seco y la solución obtenida después de centrifugar y filtrar el solvente. El metanol al 80 % fue el solvente que tuvo el mayor rendimiento en las tres especies de nopal, en un rango de 14.11-20.49 g/L. Los peores rendimientos (1.36-2.49 g/L) fueron aquellos en los que se usó etanol al 100 %.

Como se mencionó anteriormente, cada respuesta del diseño fue evaluada mediante un análisis de varianza. Para la concentración de AT, las interacciones entre tipo de *Opuntia* y solvente, y los tres factores (*Opuntia*, solvente y concentración) no fueron significativas para el modelo (Tabla A1). En la Figura 9a se muestran los efectos principales para esta respuesta. El comportamiento del factor concentración es similar en todas las demás respuestas; se demuestra que para cualquier tipo de nopal y de solvente, la concentración que da mayores concentraciones de AT, AR, CFT, FT, mayor rendimiento y actividad antioxidante DPPH, es la de 80 %. El tipo de nopal que en promedio obtuvo mayor concentración de AT fue la cultivada, mientras que el mejor solvente fue el metanol y la mejor concentración de solvente fue de 80 %.



**Figura 9. Efectos principales del diseño para a) azúcares totales y b) azúcares reductores.**

Mediante el análisis de varianza de AR se obtuvo que todos los factores junto a sus interacciones son significantes para el modelo (Tabla A2). Los efectos principales para los AR liberados por medio de la extracción con solventes se muestran en la Figura 9b. Aquí se observa que para el tipo de solvente y la concentración de este

sigue la misma tendencia que para AT. La diferencia radica en que la especie cultivada libera el doble de AR que la comercial y la nativa.

En la Figura 10 se encuentran los efectos principales para la concentración de CFT y de FT; similar caso al de los AT y AR, este par de respuestas tienen el mismo comportamiento y van de la mano debido a que, en efecto, los flavonoides son compuestos con elementos fenólicos. Los puntos más altos para ambos factores fueron para *Opuntia* comercial utilizando metanol al 80 %. Sin embargo, en el análisis de varianza hay una diferencia en los factores no significantes para su respectivo modelo. Para CFT el único factor no significativo fue el de la interacción del solvente y la concentración (Tabla A3); mientras que en el caso de los FT el no significativo fue el de la interacción de los tres factores (Tabla A4).

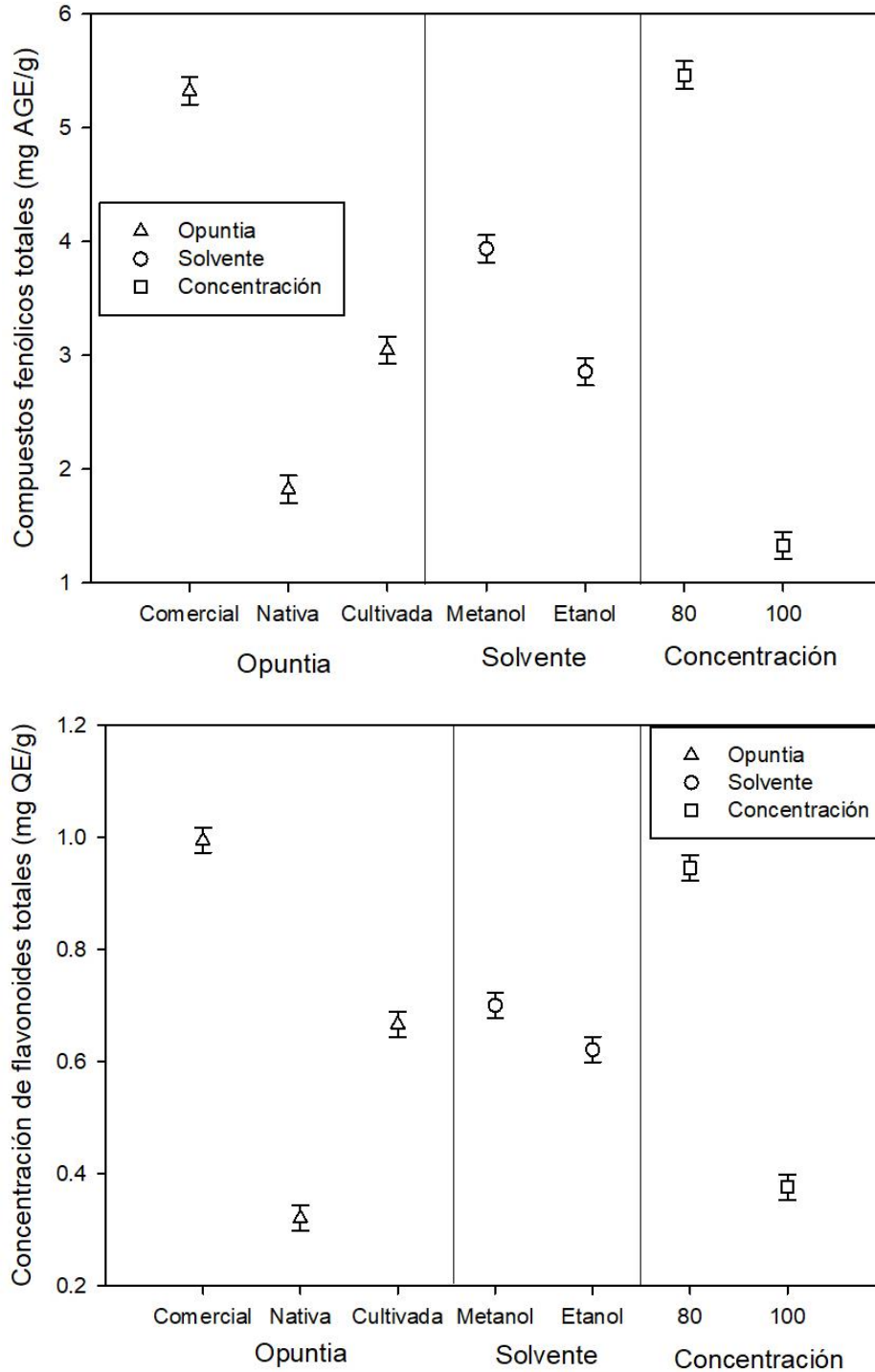


Figura 10. Efectos principales del diseño para a) compuestos fenólicos totales y b) flavonoides totales.

Uno de los parámetros que más se toman en cuenta para la obtención de extractos antioxidantes son los CFT, por lo que en la Tabla 19 se muestran resultados publicados en literatura. La mayoría utiliza la relación S:L de 1:10, como solventes

los que dan mayores concentraciones de fenólicos son el agua acidificada y metanol y etanol al 80 %, como se ha comprobado en este trabajo.

**Tabla 19. Comparación de técnicas de extracción en la obtención de compuestos fenólicos totales.**

<b>Biomasa</b>	<b>Condiciones de operación</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	S:L 1:10 Metanol y etanol al 80 % 12 h	CFT: 7.23 - 9.86 mg GAE/g	Aruwa <i>et al.</i> , 2019
Tunas de <i>O. joconostle</i>	Pretratamiento con microondas, agua a 5 °C por 10 min S:L 1:10	CFT: 9 – 13 mg GAE/g FT: 2.6 – 5.6 mg CE/g	Dávila Hernández <i>et al.</i> , 2019
<i>O. ficus-indica</i>	Etanol 70 % por 5 d a T amb S:L 1:10	CFT: 86 mg GAE/g FT: 4.8 mg QE/g	Dávila Aviña <i>et al.</i> , 2018
<i>O. comercial</i> <i>O. ficus-indica</i>	Metanol y etanol al 80 % 1 h a T amb	CFT: 2.66 – 8.99 mg GAE/g FT: 0.45 – 1.67 mg QE/g	Este trabajo

Notas: CFT, compuestos fenólicos totales; FT, flavonoides totales; GAE, ácido gálico equivalente; CE, catequina equivalente; QE, quercetina equivalente

Como se puede ver en la Figura 11, el comportamiento del rendimiento y la captación de radicales DPPH es parecido. El tipo de *Opuntia* no afecta significativamente ambos parámetros y, por otro lado, seguimos viendo el patrón donde los mejores resultados son para extracción con metanol al 80 %. Para el rendimiento, el factor no significativo para el modelo es la interacción del tipo de solvente con su concentración; mientras que para el porcentaje de captación de radicales DPPH el factor no significativo fue el tipo de nopal utilizado, y se puede observar de mejor manera en el gráfico de efectos principales.

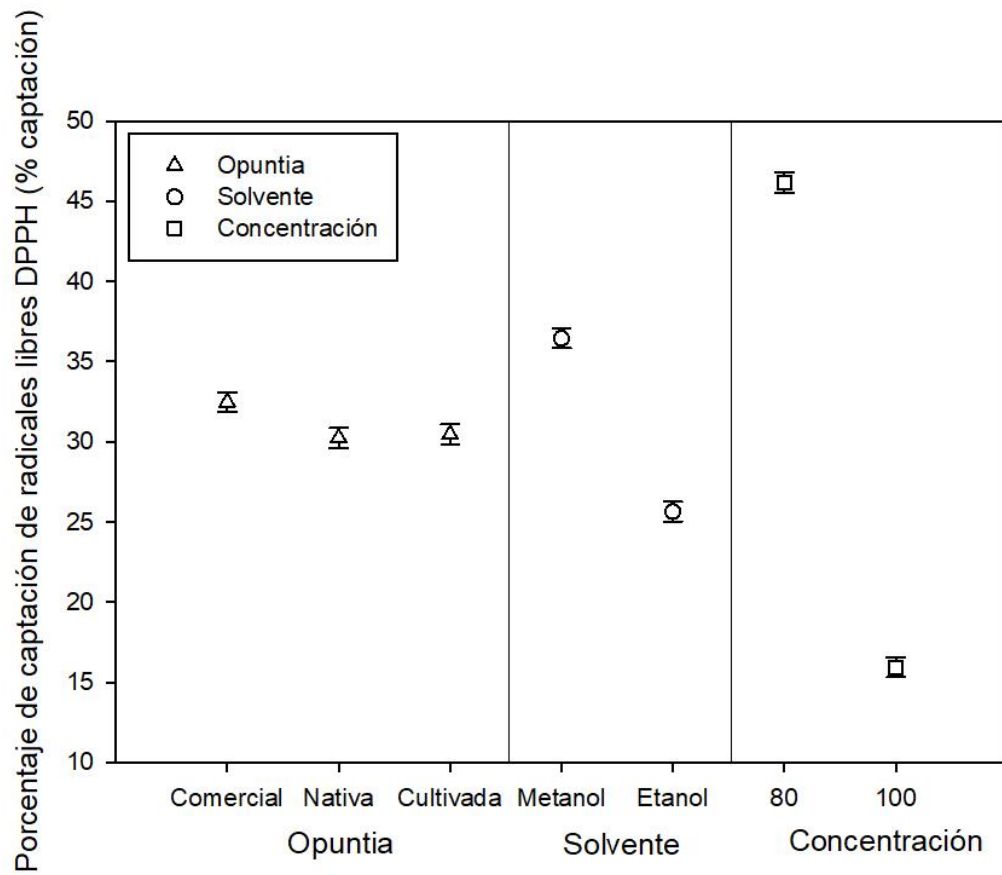
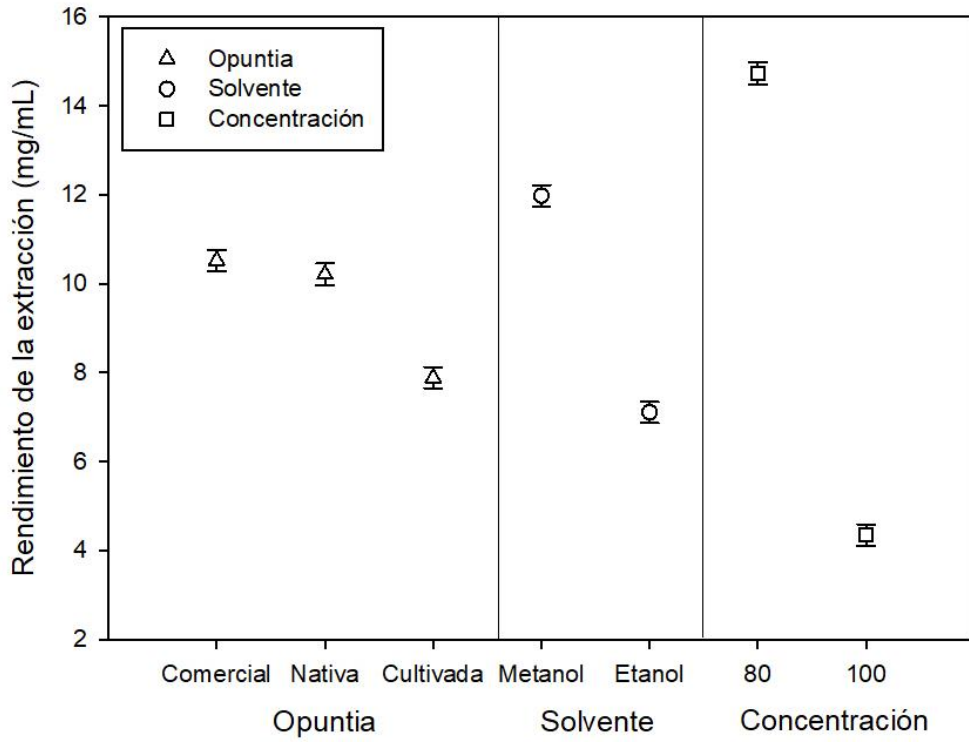


Figura 11. Efectos principales del diseño para a) el rendimiento de la extracción y b) porcentaje de captación de radicales libres DPPH.

### 8.3. Actividad 3. Producción de biometano utilizando biomasa de *Opuntia* spp.

La primera parte de esta actividad comprende la digestión anaerobia de dos tipos de *Opuntia*, la comercial y la nativa, a tres RIS con el fin de evaluar la producción y el rendimiento máximo de metano. La caracterización del inóculo utilizado se muestra en la Tabla 20.

**Tabla 20. Caracterización del inóculo utilizado para la digestión anaerobia de dos especies de *Opuntia*.**

Humedad %bh	ST %bh	SV %bs	Ceniza %bs	pH	Alcalinidad mg CaCO <sub>3</sub> /L	AGVs mg CH <sub>3</sub> COOH/L
85.83	14.17	33.90	66.10	7.82	6810	612

Nota: ST, sólidos totales; SV, sólidos volátiles; AGVs, ácidos grasos volátiles

En la Figura 12 se muestra el rendimiento acumulado de metano a lo largo del tiempo para la biomasa de *Opuntia* comercial y nativa a tres RIS diferentes, junto al ajuste a la ecuación de la cinética de primer orden. En la Tabla 21 se enlistan los parámetros cinéticos para este primer diseño experimental y la caracterización final del efluente de cada reactor. La RIS que dio mejores resultados para la especie comercial como para la nativa fue la de 2.5, con la cual sus rendimientos máximos fueron 552 y 432 mL CH<sub>4</sub>/gSV, respectivamente. Estos resultados son comparables (Tabla 22) con los obtenidos por Calabrò *et al.* (2018) quienes obtuvieron 430 y 600 mL CH<sub>4</sub>/gSV utilizando *O. ficus-indica* y el hidrolizado de esta, respectivamente, a RIS de 3. Ramos-Suarez *et al.* (2014) realizaron co-digestión de un alga junto a *O. maxima* en relación 25:75 y RIS 2, con lo que obtuvieron un rendimiento máximo de 360 mL CH<sub>4</sub>/gSV.

**Tabla 21. Parámetros cinéticos de la ecuación de la cinética de primer orden para el rendimiento de la producción de metano con dos especies de *Opuntia* a tres RIS.**

Parámetros	Comercial			Nativa		
	2.5	1.5	0.5	2.5	1.5	0.5
B <sub>max</sub> (mL CH <sub>4</sub> /gSV)	551.92	338.13	110.81	432.33	370.79	143.03
k (d <sup>-1</sup> )	0.25	0.39	1.12	0.25	0.20	0.12
R <sup>2</sup>	0.9733	0.9874	0.9997	0.9858	0.9844	0.9186
ST (%bh)	13.43	13.60	18.52	14.66	15.41	19.24
SV (%bs)	33.48	36.29	43.90	32.06	34.79	41.97
pH	8.09	7.77	6.91	8.11	8.04	7.36
Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	8235	9475	16130	9300	8500	8.75
AGVs (mg CH <sub>3</sub> COOH/L)	543	1185	5550	954	552	1302
Alfa	0.35	0.65	8.29	0.43	0.36	0.73

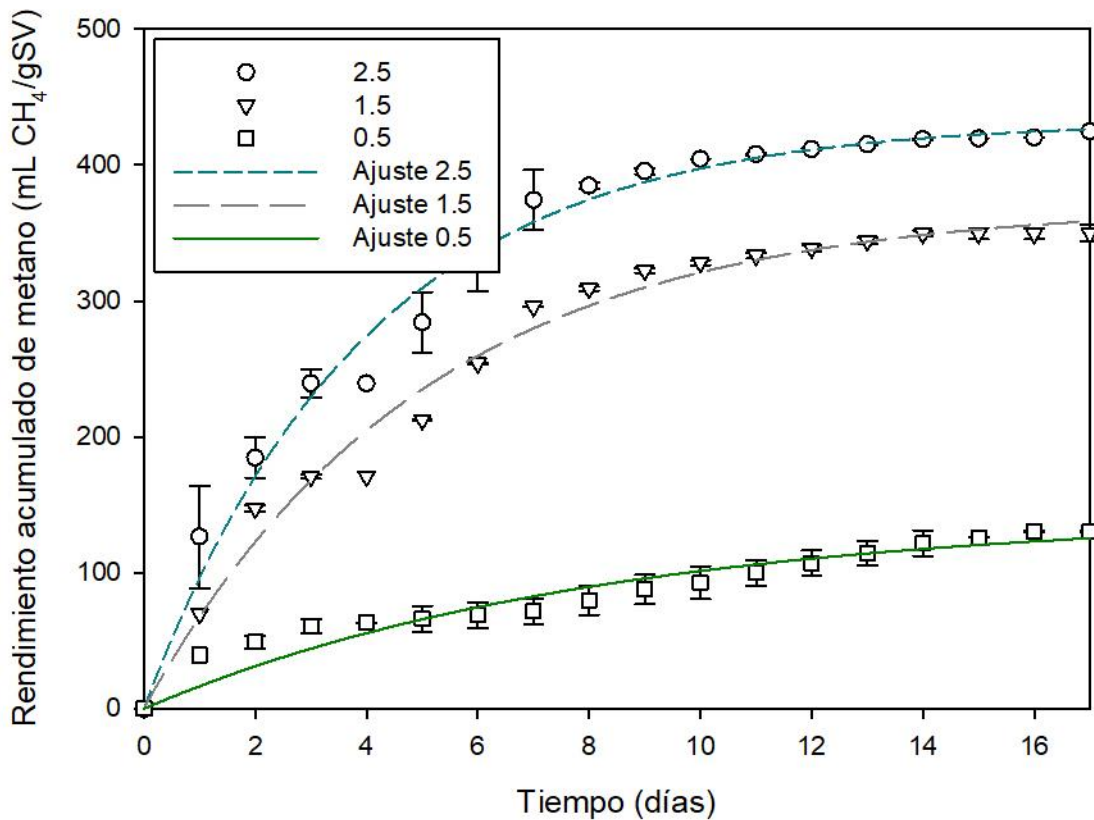
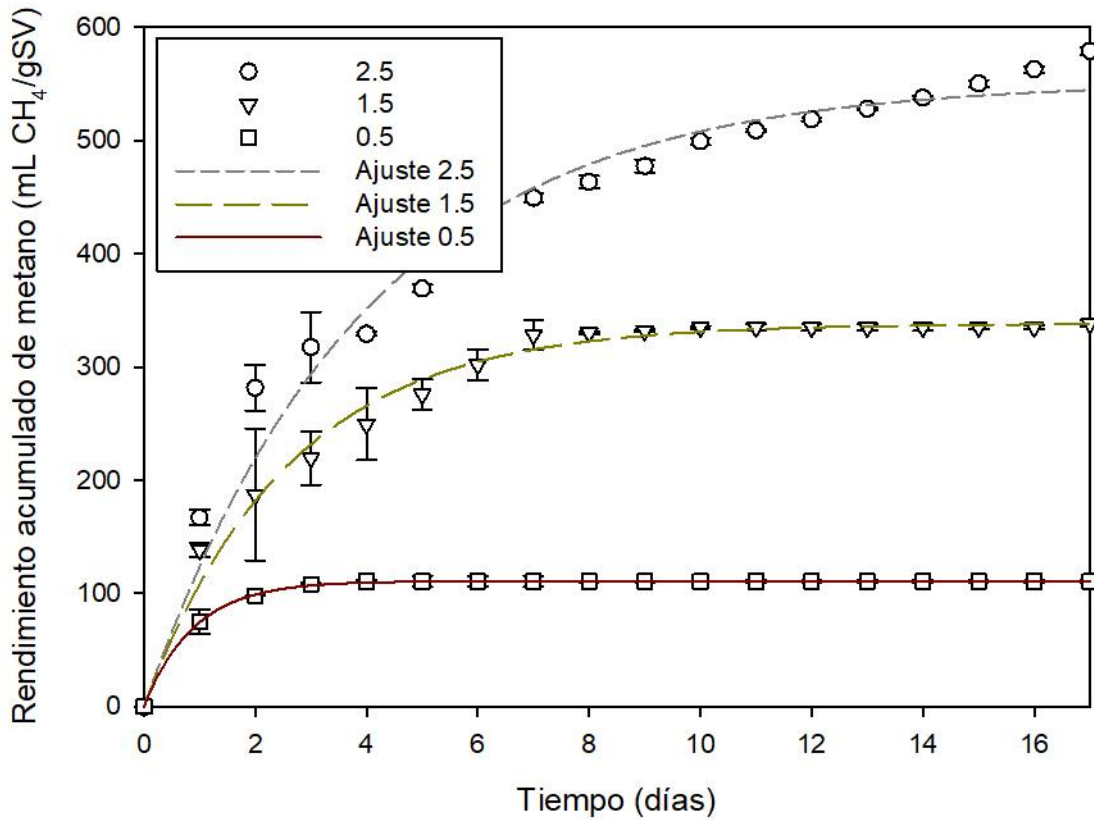


Figura 12. Cinética del rendimiento acumulado de metano, usando a) O. comercial y b) O. nativa como sustrato a tres diferentes RIS. Ajustado al modelo de primer orden.

Los resultados también son comparables con el grupo de trabajo; Rodríguez-Valderrama (2018) produjo metano a partir de hidrolizados sólidos de residuos de frutas y vegetales en co-digestión con rastrojo de maíz a RIS 4, obteniendo 342 mL CH<sub>4</sub>/gSV. Además, Hernández-Zavala,(2020) obtuvo 325 mL CH<sub>4</sub>/gSV utilizando lodos de nejayote como sustrato a RIS 0.5.

**Tabla 22. Comparación del rendimiento máximo con resultados de literatura.**

<b>Sustrato</b>	<b>RIS</b>	<b>Rendimiento (mL CH<sub>4</sub>/gSV)</b>	<b>Referencia</b>
<i>O. ficus-indica</i>	3	430-600	Calabrò <i>et al.</i> , 2018
<i>O. maxima</i> + <i>Scenedesmus</i>	2	360	Ramos-Suárez <i>et al.</i> , 2014
<i>O. ficus-indica</i>	2	300	Lueang <i>et al.</i> , 2020
Residuos de frutas y verduras + rastrojo de maíz	4	342	Rodríguez-Valderrama, 2018
Nejayote	0.5	325	Hernández-Zavala, 2020
<i>Opuntia</i> comercial	2.5	552	Este trabajo
<i>Opuntia</i> nativa	2.5	432	Este trabajo

En la segunda parte de esta actividad se evaluó la producción y el rendimiento de metano usando los residuos sólidos de la extracción, comparándolos a la par con la digestión de la biomasa seca original. Los parámetros para el ajuste a primer orden se muestran en la Tabla 23. Se puede resaltar una diferencia significativa entre el comportamiento de las RIS en la primera parte de esta actividad ya que, para la digestión de las especies comercial y nativa, el rendimiento de metano para RIS de 0.5 fue el más bajo; por otro lado, el rendimiento para el residuo sólido de cultivada fue el mayor de las tres RIS evaluadas con 535 mL CH<sub>4</sub>/gSV. Este comportamiento atípico entre dos experimentos se puede deber a la diferencia de las actividades metanogénicas en el mismo inóculo, ya que en el primer experimento se utilizó tres días después de alimentar al reactor madre, mientras que en el segundo experimento el reactor se había dejado sin alimentar una semana. Esta disminución en la actividad metanogénica también se puede observar en las diferentes constantes de velocidad de reacción. En el primer experimento promedian en 0.25 d<sup>-1</sup>, un 30 % mayor a la velocidad de reacción promedio del segundo experimento, aproximadamente 0.175 d<sup>-1</sup>.

**Tabla 23. Parámetros cinéticos de primer orden para el rendimiento de metano del diseño experimental.**

Sustrato	RIS	B <sub>max</sub> (mL CH <sub>4</sub> /gSV)	k (d <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
	2.5	401.471	0.179	0.990
RU	1.5	414.300	0.165	0.988
	0.5	535.686	0.052	0.997
RO	2.5	411.821	0.164	0.988
RN	2.5	419.039	0.181	0.980
O	2.5	458.548	0.177	0.998
N	2.5	457.865	0.190	0.990
U	2.5	404.128	0.202	0.993

Notas: O, comercial; N, nativa; U, cultivada; RU, residuo de cultivada; RO, residuo de comercial; RN, residuo de nativa

El rendimiento máximo para la digestión a RIS 2.5 de la biomasa de *Opuntia* resultó entre 404-458 mL CH<sub>4</sub>/gSV, mientras que los residuos de extracción están entre 401-419 mL CH<sub>4</sub>/gSV. La diferencia de aproximadamente el 6 % puede confirmar que en la extracción con solventes se pierde una parte de azúcares fácilmente digeribles, como la pectina o el mucílago, que se encuentran en grandes cantidades en las plantas con metabolismo CAM.

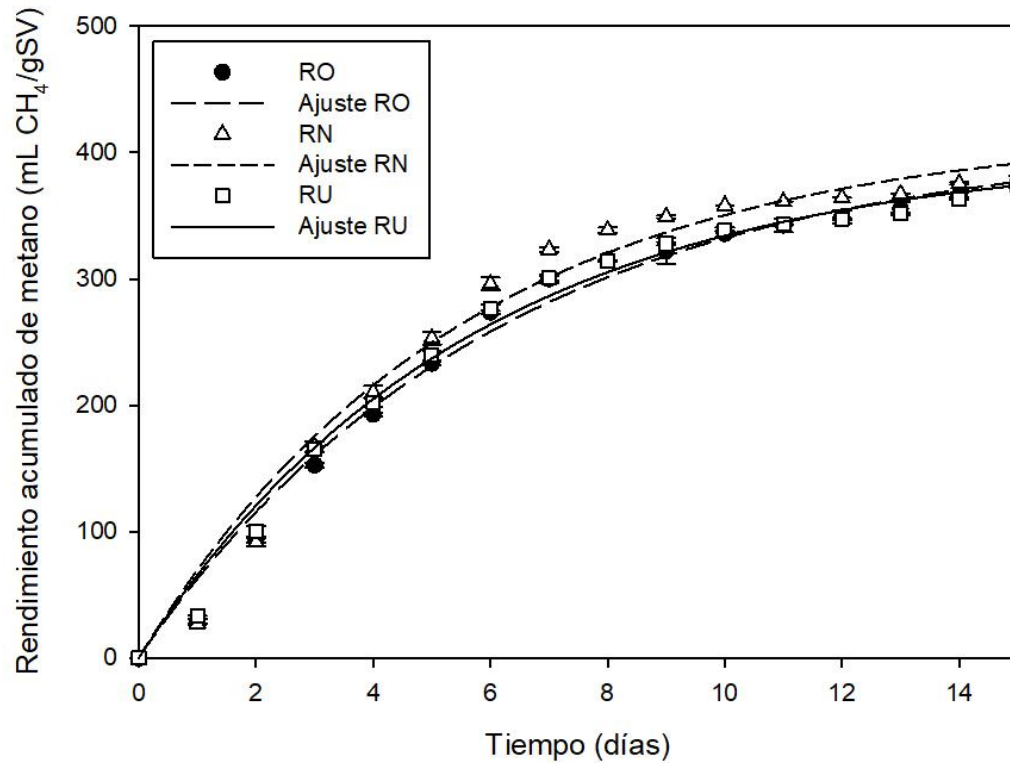
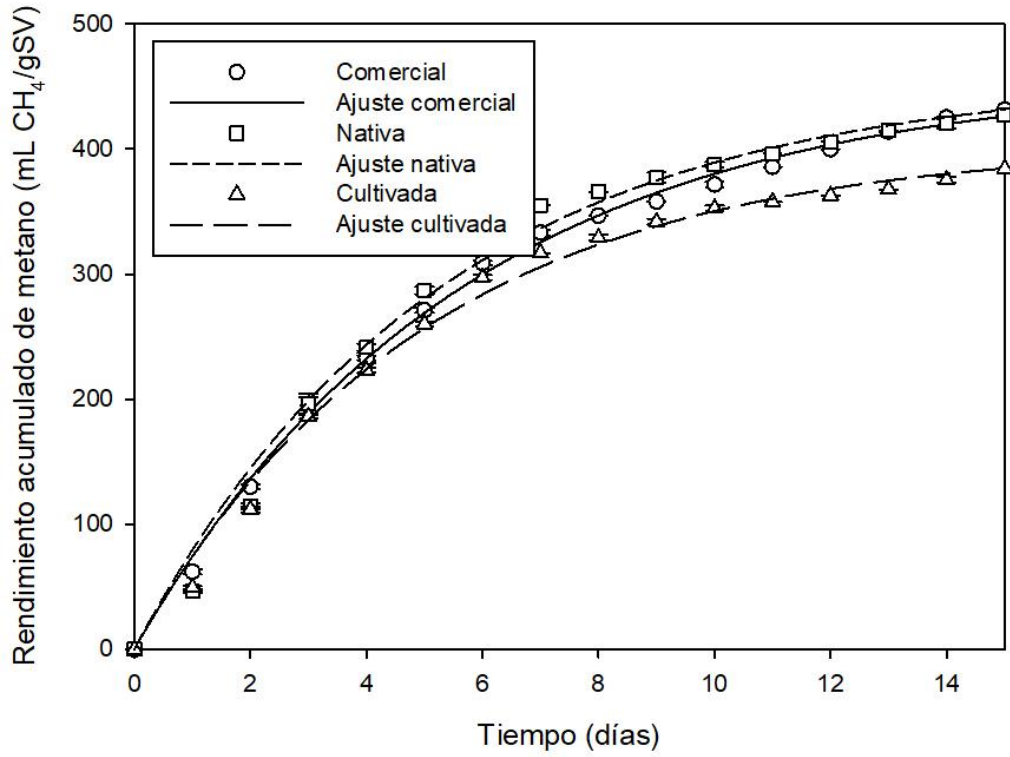


Figura 13. Rendimiento acumulado de metano a RIS 2.5 para a) la biomasa seca de tres tipos de Opuntia y b) los residuos sólidos de la extracción con solventes (RO, residuo de comercial; RN, residuo de nativa; RU, residuo de cultivada).

#### 8.4. Actividad 4. Producción de biohidrógeno utilizando biomasa de *Opuntia* spp.

El potencial de biohidrógeno mediante fermentación oscura para *Opuntia* spp. como sustrato no está reportado en la literatura, por lo que es de suma importancia conocer la producción y el rendimiento máximo que puede alcanzar esta biomasa. En la Tabla 24 se muestran los parámetros para las ecuaciones más utilizadas para ajustar el comportamiento de una cinética de producción de hidrógeno. El modelo que estadísticamente da un mejor ajuste a las curvas es el de la ecuación de Gompertz modificada. Un dato interesante que nos da la ecuación de Boltzmann sigmoideal es el  $t_{50}$ , el tiempo en el que se alcanza el 50 % de la producción máxima acumulada; la fase lag y el  $t_{50}$  es menor para RIS 1 y 0.6 sin embargo, la producción de ambos fue mucho menor a comparación de las de RIS 0.2. La especie cultivada muestra ser mejor que la comercial por 14 % en términos de producción máxima acumulada, y en 40 % en fase lag. El ajuste de los tres modelos a los datos experimentales de los ensayos de comercial y cultivada a RIS 0.2 se muestran en la Figura 14.

Tabla 24. Parámetros para las ecuaciones de Gompertz modificada, Boltzmann sigmoideal y primer orden para la producción de hidrógeno con biomasa de *Opuntia* spp.

Parámetros	Comercial			Cultivada		
	1	0.6	0.2	1	0.6	0.2
<i>Gompertz modificada</i>						
$h_{max}$ (mL H <sub>2</sub> )	64.017	78.557	368.974	68.655	78.530	435.609
$r_{max}$ (mL H <sub>2</sub> /h)	2.814	6.337	12.784	2.207	3.820	10.344
$\lambda$ (h)	14.621	11.570	14.132	9.222	4.469	8.310
R <sup>2</sup>	0.999	0.984	0.979	0.994	0.990	0.993
<i>Boltzmann sigmoideal</i>						
$h_{max}$ (mL H <sub>2</sub> )	63.006	78.000	360.969	66.394	77.517	424.087
$r_{max}$ (mL H <sub>2</sub> /h)	2.767	6.237	13.137	2.177	3.902	10.458
$t_{50}$ (h)	26.731	18.005	29.082	24.982	15.194	30.053
R <sup>2</sup>	0.997	0.974	0.973	0.988	0.979	0.986
<i>Primer orden</i>						
$h_{max}$ (mL H <sub>2</sub> )	115.973	100.141	509.015	121.981	86.163	545.846
k (1/h)	0.013	0.031	0.016	0.013	0.046	0.018
R <sup>2</sup>	0.886	0.891	0.908	0.945	0.965	0.957

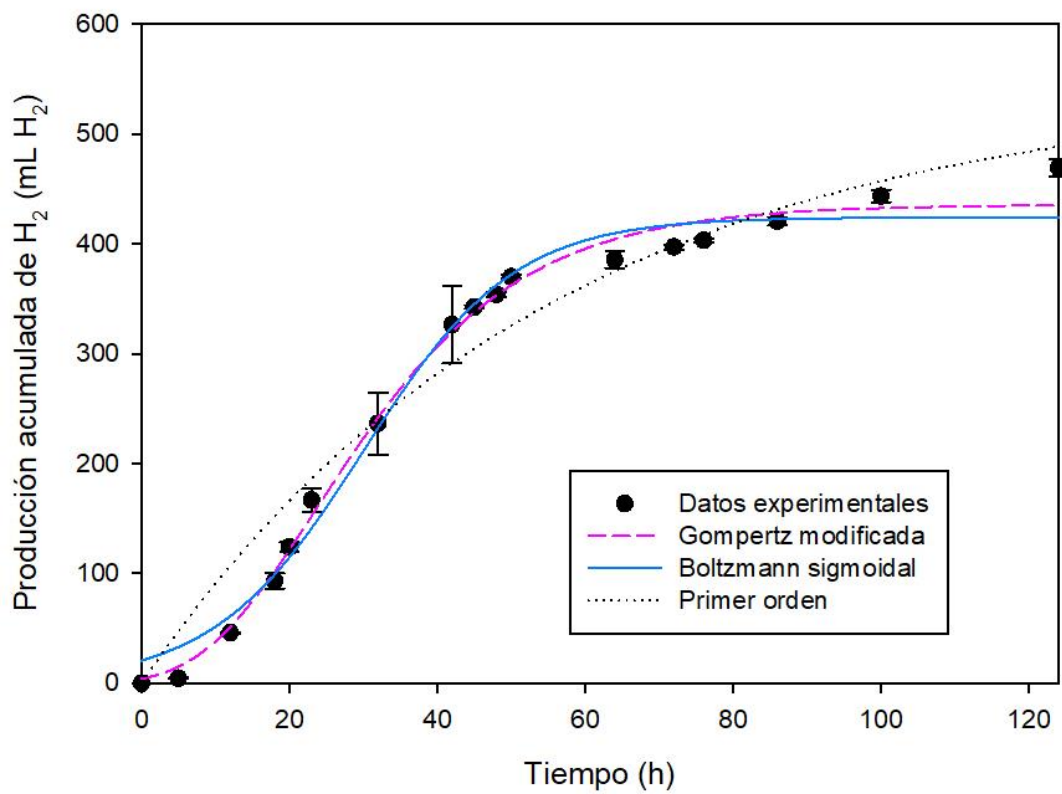
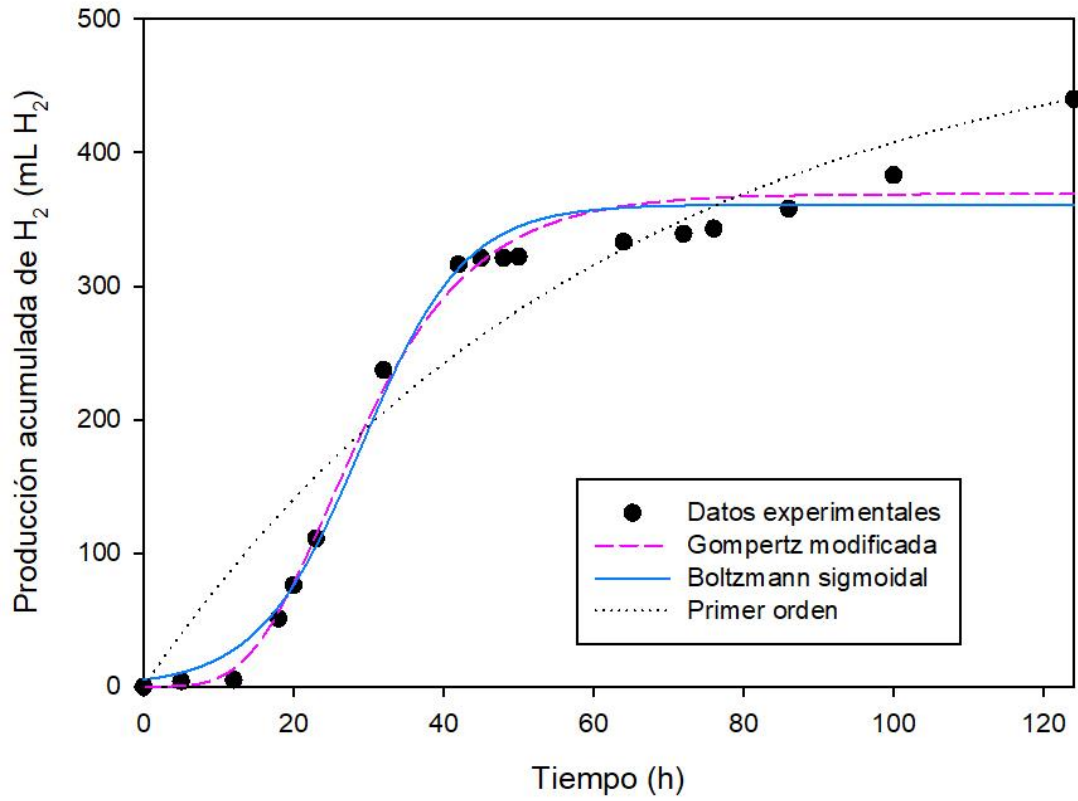


Figura 14. Ajuste de la producción acumulada de hidrógeno a RIS 0.2 para la especie a) comercial y b) cultivada.

En la Tabla 25 se muestra la caracterización final del digestato para cada uno de los ensayos. Se puede resaltar la alta concentración de AGVs para ambas especies a RIS 0.2; estos ácidos volátiles se pueden incorporar a un proceso de fotofermentación para la producción de hidrógeno.

**Tabla 25. Parámetros cinéticos ajustados al modelo de Gompertz modificado y caracterización del efluente digerido.**

Parámetros	Comercial			Cultivada		
	1	0.6	0.2	1	0.6	0.2
$h_{max}$ (mL H <sub>2</sub> )	64.02	78.56	368.97	68.66	78.53	435.61
$r_{max}$ (mL H <sub>2</sub> /h)	2.81	6.34	12.78	2.21	3.82	10.34
$\lambda$ (h)	14.62	11.57	14.13	9.22	4.47	8.31
R <sup>2</sup>	0.9985	0.9837	0.9786	0.9937	0.9897	0.9929
ST (%bh)	12.29	14.18	15.94	12.95	14.72	16.74
SV (%bs)	42.84	47.09	57.76	40.59	44.38	49.13
pH	7.35	6.95	6.04	6.95	6.46	6.20
Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	8890	10900	14375	8855	9825	11325
AGVs (mg CH <sub>3</sub> COOH/L)	3276	4200	6510	2952	4050	5070

En cuanto al segundo ensayo en el que se utilizaron los residuos sólidos de extracción, se presentó el mismo fenómeno que para la digestión anaerobia, donde los residuos sólidos resultaron en 50 % menor producción máxima que la biomasa seca sin pretratar en el caso de la especie cultivada, que fue la mejor en el ensayo anterior. Los parámetros cinéticos para el modelo de Gompertz modificado de esta serie de experimentos se encuentra en la Tabla 26.

**Tabla 26. Parámetros de la ecuación de Gompertz modificada para el ajuste de la producción de hidrógeno para los residuos secos de la extracción y la biomasa sin pretratar.**

Sustrato	RIS	$h_{max}$ (mL H <sub>2</sub> )	$r_{max}$ (mL H <sub>2</sub> /h)	$\lambda$ (h)	R <sup>2</sup>
RU	1	61.63	1.73	34.45	0.9935
	0.6	80.93	3.16	30.87	0.9946
	0.2	228.59	40.57	40.67	0.9703
RO	0.2	180.89	4.91	29.61	0.9967
RN	0.2	318.47	9.60	36.55	0.984
O	0.2	269.53	10.89	26.71	0.9947
N	0.2	317.08	8.43	32.60	0.986
U	0.2	448.54	10.34	32.35	0.9386

No obstante, el ensayo que utilizó residuos de cultivada mostró la mayor tasa máxima de producción de hidrógeno, que se puede observar en la Figura 15b como una curva pronunciada aproximándose a una línea recta que inicia en el fin de su fase lag. Entre las especies investigadas, el residuo de extracción que tuvo mejor producción de hidrógeno fue la nativa con 318 mL H<sub>2</sub>.

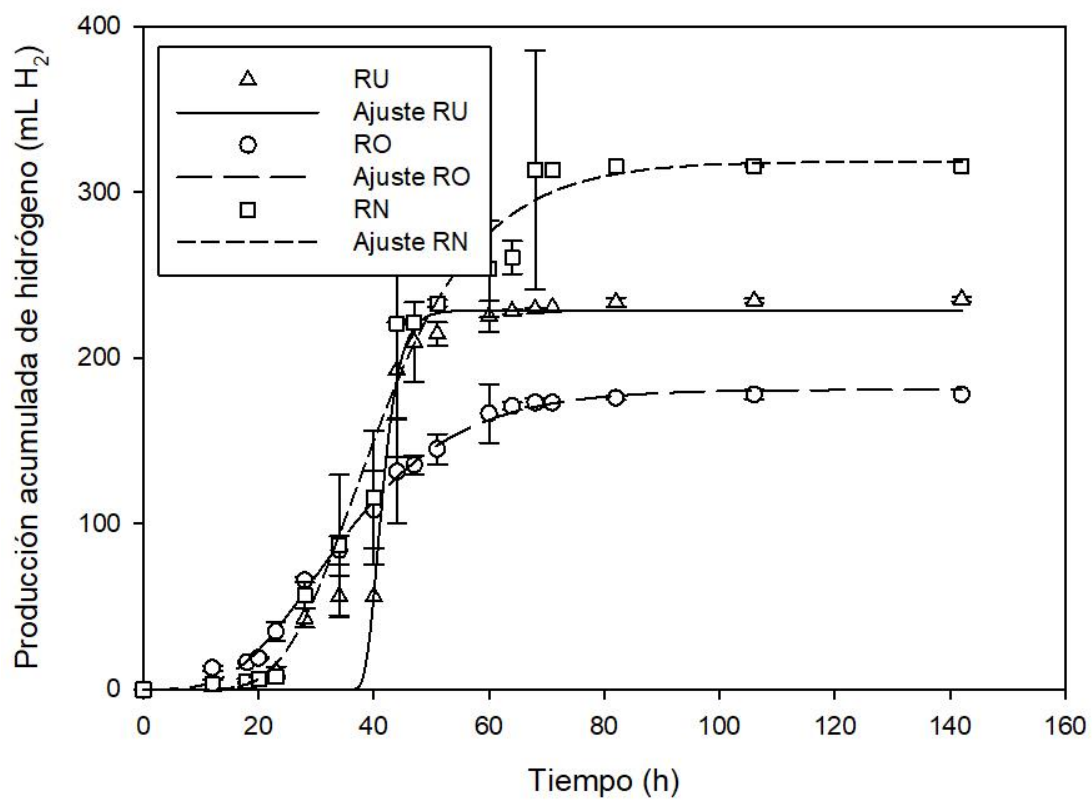
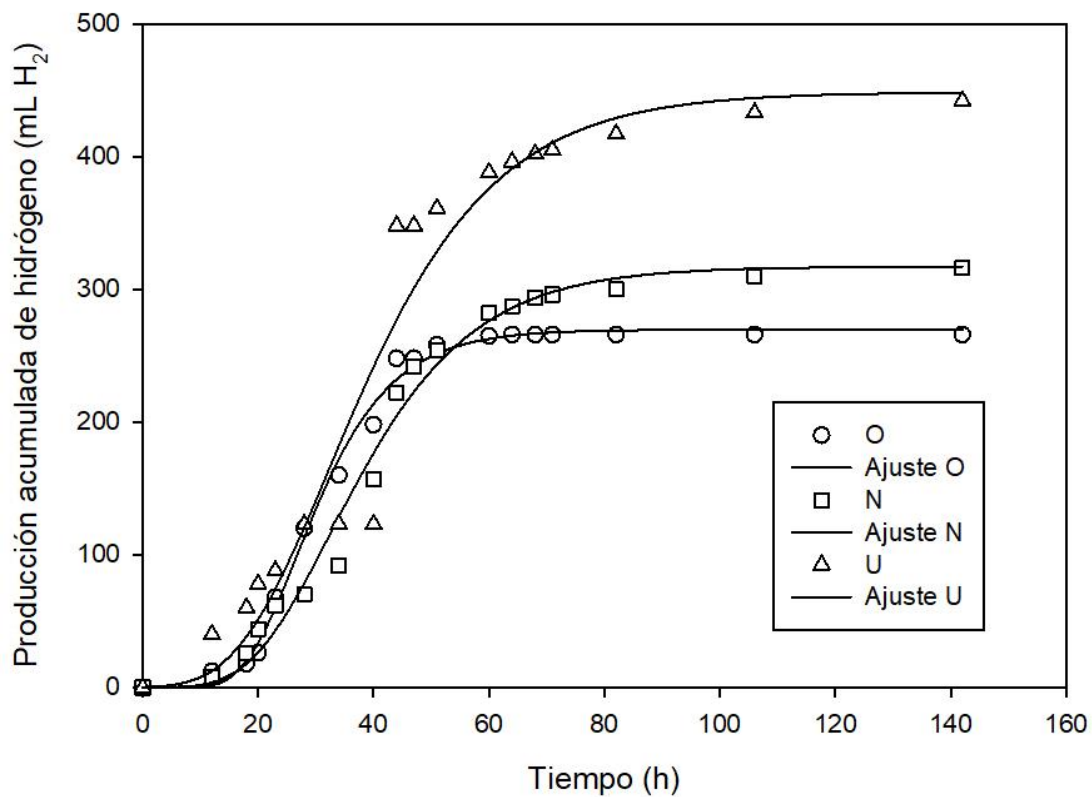


Figura 15. Ajuste de la producción acumulada de hidrógeno a RIS 0.2 para a) biomasa seca y b) residuos sólidos de extracción.

## 9. CONCLUSIONES

- Las mejores condiciones para la extracción de compuestos antioxidantes para las especies de *Opuntia* fueron al utilizar metanol al 80 %.
- El tipo de *Opuntia* que dio los mejores resultados para todas las respuestas del diseño fue el comercial; a pesar de esto, las tres especies estudiadas tienen la capacidad de captación de radicales libres DPPH similar, por lo que lo crucial al momento de la obtención de extractos antioxidantes es la elección del solvente y su concentración.
- El máximo rendimiento para la digestión anaerobia de las especies comercial y nativa fue de 552 y 432 mL CH<sub>4</sub>/gSV respectivamente, utilizando RIS de 2.5, los cuales fueron comparables con los resultados de literatura.
- La producción máxima de hidrógeno mediante fermentación oscura de las especies comercial y cultivada utilizando RIS 0.2 fueron de 369 y 435 mL H<sub>2</sub> respectivamente.

## REFERENCIAS

- Aké Madera, M. A. (2015). El oro verde de México. El Santo Grial de las Energías Renovables.
- Aké Madera, M. A., & Sosa López, R. (2013). Proceso y Equipo para la Obtención de Biogás a Partir de Cactáceas por Medio de Digestión Anaeróbica.
- Alencar, B. R. A., Dutra, E. D., Sampaio, E. V. de S. B., Menezes, R. S. C., & Morais, M. A. (2018). Enzymatic hydrolysis of cactus pear varieties with high solids loading for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 250, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.042>
- Anderson, G. K., & Yang, G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environment Research*, 64(1), 53–59.
- Aragona, M., Lauriano, E. R., Pergolizzi, S., & Faggio, C. (2018). *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as a source of bioactivity compounds for health and nutrition. *Natural Product Research*, 32(17), 2037–2049.
- Aruwa, C. E., Amoo, S. O., & Kudanga, T. (2019). Extractable and macromolecular antioxidants of *Opuntia ficus-indica* cladodes: Phytochemical profiling, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany*, 125, 402–410.
- Aruwa, Christiana Elejo, Amoo, S., & Kudanga, T. (2019). Phenolic compound profile and biological activities of Southern African *Opuntia ficus-indica* fruit pulp and peels. *LWT - Food Science and Technology*, 111, 337–344.
- Ávila-Lara, A. I. (2019). Evaluación de bagazo de Agave tequilana Weber variedad azul y de *Opuntia ficus-indica* en pretratamientos químicos y enzimáticos para su aplicación en la producción de ácido succínico. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ávila-Nava, A., Calderón-Oliver, M., Medina-Campos, O. N., Zou, T., Gu, L., Torres, N., Tovar, A. R., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes scavenges reactive oxygen species in vitro and enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Functional Foods*, 10, 13–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.009>
- Bayar, N., Bouallegue, T., Achour, M., Kriaa, M., Bougatef, A., & Kammoun, R. (2017). Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties. *Food Chemistry*, 235, 275–282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.029>
- Bayar, N., Friji, M., & Kammoun, R. (2018). Optimization of enzymatic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica* cladodes after mucilage removal. *Food Chemistry*, 241, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.051>
- BP. (2019). BP Statistical Review of World Energy. <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2019-full-report.pdf>
- Calabrò, P. S., Catalán, E., Folino, A., Sánchez, A., & Komilis, D. (2018). Effect of three pretreatment techniques on the chemical composition and on the methane yields of *Opuntia ficus-indica* (prickly pear) biomass. *Waste Management and Research*, 36(1), 17–29.
- Camarena-Rangel, N. G., Barba-De la Rosa, A. P., Herrera-Corredor, J. A., & Santos-Díaz, M. S. (2017). Enhanced production of metabolites by elicitation in *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia megacantha*, and *Opuntia streptacantha* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(2), 289–298.
- Dávila-Hernández, G., Sánchez-Pardo, M. E., Gutiérrez-López, G. F., Necoechea-Mondragon, H., & Ortiz-Moreno, A. (2019). Effect of microwave pretreatment on bioactive compounds extraction from xoconostle (*Opuntia joconostle*) by-products. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 18(1), 191–204.
- De Santiago, E., Domínguez-Fernández, M., Cid, C., & De Peña, M. P. (2018). Impact of cooking process on nutritional composition and antioxidants of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 240, 1055–1062.
- du Toit, A., de Wit, M., Osthoff, G., & Hugo, A. (2018). Antioxidant properties of fresh and processed cactus pear cladodes from selected *Opuntia ficus-indica* and *O. robusta* cultivars. *South African Journal of Botany*, 118, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.06.014>
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167.

- Escamilla-Alvarado, C. (2014). Integración de un proceso modelo de biorrefinería para la obtención de hidrógeno, metano, enzimas y sacarificados a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Filannino, P., Cavoski, I., Thlien, N., Vincentini, O., De Angelis, M., Silano, M., Gobbetti, M., & Dicagno, R. (2016). Lactic acid Fermentation of Cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica* L) generates flavonoid derivatives with antioxidant and anti-inflammatory properties. *PLoS ONE*, 11(3), 1–22. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152575>
- Financiera Rural. (2011). Monografía del nopal y la tuna.
- Inglese, P., Jacobo, C. M., Nefzaoui, A., & Sáenz, C. (2018). Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal. ICARDA; FAO.
- Jaramillo-Flores, M. E., González-Cruz, L., Cornejo-Mazón, M., Dorantes-álvarez, L., Gutiérrez-López, G. F., & Hernández-Sánchez, H. (2003). Effect of Thermal Treatment on the Antioxidant Activity and Content of Carotenoids and Phenolic Compounds of Cactus Pear Cladodes (*Opuntia ficus-indica*). *Food Science and Technology International*, 9(4), 271–278.
- Jigar, E., Sulaiman, H., Asfaw, A., & Bairu, A. (2011). Study on renewable biogas energy production from cladodes of *Opuntia ficus indica*. *Journal of Food and Agricultural Science*, 1(3), 44–48.
- Kandakumar, S., & Manju, D. V. (2017). Pharmacological Applications of Isorhamnetin: A Short Review. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, Volume-1(Issue-4), 672–678.
- Kim, J. H., Lee, H. J., Park, Y., Ra, K. S., Shin, K. S., Yu, K. W., & Suh, H. J. (2013). Mucilage removal from cactus cladodes (*Opuntia humifusa* Raf.) by enzymatic treatment to improve extraction efficiency and radical scavenging activity. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 337–342.
- Kuloyo, O. O., du Preez, J. C., García-Aparicio, M. del P., Kilian, S. G., Steyn, L., & Görgens, J. (2014). *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(12), 3173–3183.
- Lee, J. C., Kim, H. R., Kim, J., & Jang, Y. S. (2002). Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6490–6496.
- Ley de Transición Energética, Diario Oficial de la Federación 1 (2015).
- Lueangwattanapong, K., Ammam, F., Mason, P. M., Whitehead, C., McQueen-Mason, S. J., Gomez, L. D., Smith, J. A. C., & Thompson, I. P. (2020). Anaerobic digestion of Crassulacean Acid Metabolism plants: Exploring alternative feedstocks for semi-arid lands. *Bioresource Technology*, 297, 122262.
- Martins, N., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 1–12.
- Medina-Torres, L., Vernon-Carter, E. J., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzman, N. E., Herrera-Valencia, E. E., Calderas, F., & Jiménez-Alvarado, R. (2011). Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1001–1005.
- Michalkiewicz, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*, 1187(1–2), 18–24.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Moreno-Dávila, I. M. M., Ríos-González, L. J., Garza-García, Y., Rodríguez-de la Garza, J. A., & Rodríguez-Martínez, J. (2011). Biohydrogen production from dairy processing wastewater by anaerobic biofilm reactors. *African Journal of Biotechnology*, 10(27), 5320–5326.
- Moussa-Ayoub, T. E., El-Samahy, S. K., Kroh, L. W., & Rohn, S. (2011). Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. *Food Chemistry*, 124(3), 1177–1184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.032>

- Myovela, H., Mshandete, A., & Imathiu, S. (2019). Enhancement of anaerobic batch digestion of spineless cacti (*Opuntia ficus indica*) feedstock by aerobic pre-treatment. *African Journal of Biotechnology*, 18(1), 12–22.
- Olivero Verbel, R. E., Mercado Martínez, I. D., & Montes Gazabón, L. E. (2013). Remoción de la turbidez del agua del río Magdalena usando el mucílago del nopal *Opuntia ficus-indica*. *Producción + Limpia*, 8(1), 19–27.
- Pawar, S. S., & Dasgupta, D. (2018). Quantification of phenolic content from stem-bark and root of *Hugonia mystax* Linn. using RP-HPLC. *Journal of King Saud University - Science*, 30(3), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.09.002>
- Peña-Valdivia, C. B., & Sánchez Urdaneta, A. B. (2006). Nopalito and Cactus Pear (*Opuntia* Spp.) Polysaccharides: Mucilage and pectin. *Acta Horticulturae*, 728, 241–248.
- Pinkava, D. J. (2003). Cactaceae Cactus Family, Part Six.. *Opuntia* P. Miller Prickly-Pears. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 35(2), 137–150. <http://www.jstor.org/stable/40019715>
- Quintanar-Orozco, E. T., Vázquez-Rodríguez, G. A., Beltrán-Hernández, R. I., Lucho-Constantino, C. A., Coronel-Olivares, C., Montiel, S. G., & Islas-Valdez, S. (2018). Enhancement of the biogas and biofertilizer production from *Opuntia heliabravoana* Scheinvar. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(28), 28403–28412.
- Ramírez-Arpide, F. R., Demirer, G. N., Gallegos-Vázquez, C., Hernández-Eugenio, G., Santoyo-Cortés, V. H., & Espinosa-Solares, T. (2018). Life cycle assessment of biogas production through anaerobic co-digestion of nopal cladodes and dairy cow manure. *Journal of Cleaner Production*, 172, 2313–2322.
- Ramos-Suárez, J. L., Martínez, A., & Carreras, N. (2014). Optimization of the digestion process of *Scenedesmus* sp. and *Opuntia maxima* for biogas production. *Energy Conversion and Management*, 88, 1263–1270.
- Rodríguez-Rodríguez, C., Torres, N., Gutiérrez-Urbe, J. A., Noriega, L. G., Torre-Villalvazo, I., Leal-Díaz, A. M., Antunes-Ricardo, M., Márquez-Mota, C., Ordaz, G., Chavez-Santoscoy, R. A., Serna-Saldivar, S. O., & Tovar, A. R. (2015). The effect of isorhamnetin glycosides extracted from *Opuntia ficus-indica* in a mouse model of diet induced obesity. *Food and Function*, 6(3), 805–815.
- Rodríguez-Valderrama, S. (2018). Enfoque de biorrefinería para la producción de hidrógeno y metano a partir de residuos orgánicos. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldivar, S. O. (2011). Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7054–7061.
- Santos, T. do N., Dutra, E. D., Gomes do Prado, A., Leite, F. C. B., de Souza, R. de F. R., dos Santos, D. C., Moraes de Abreu, C. A., Simões, D. A., de Moraes, M. A., & Menezes, R. S. C. (2016). Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. *Biomass and Bioenergy*, 85, 215–222.
- Scheinvar, L., Olalde, G., Gámez, N., Sánchez-Cordero, V., Linaje, M., Segura, S., Gallegos, C., Filardo, S., & Olvera, D. (2007). Biodiversidad de las especies silvestres mexicanas de *Opuntia* spp. y *Nopalea* spp. (cactaceae). *Recursos Fitogénicos Del Nopal*, 36–59.
- SEMARNAT. (2018). Información de la Situación del Medio Ambiente en México. <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe18/index.html>
- SENER. (2018). Reporte de Avance de Energías Limpias Primer Semestre 2018.
- Shelembe, J. S., Cromarty, D., Bester, M., Minnaar, A., & Duodu, K. G. (2014). Effect of acidic condition on phenolic composition and antioxidant potential of aqueous extracts from sorghum (*Sorghum Bicolor*) Bran. *Journal of Food Biochemistry*, 38(1), 110–118.
- SIAP. (2020). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- SNICS. (2017). Nopales, cultivo emblemático de México.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2005). Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(2), 175–194.
- Teixeira, G., Santana, A. R., Salomé Pais, M., & Clemente, A. (2000). Enzymes of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller with potential industrial applications-I. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 88, 299–312.

- Tripodo, M. M., Occhiuto, F., Galati, E. M., Lanuzza, F., & Mondello, F. (2015). Enzymatic extraction of pectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes. *Acta Horticulturae*, 1067, 393–397.
- Valenti, F., Porto, S. M. C., Selvaggi, R., & Pecorino, B. (2018). Evaluation of biomethane potential from by-products and agricultural residues co-digestion in southern Italy. *Journal of Environmental Management*, 223, 834–840.
- Velloso, J. C. R., Regasini, L. O., Khalil, N. M., Da Silva Bolzani, V., Khalil, O. A. K., Manente, F. A., Netto, H. P., & De Faria Oliveira, O. M. M. (2011). Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. *Eletica Quimica*, 36(2), 7–20.
- Volpe, M., Goldfarb, J. L., & Fiori, L. (2018). Hydrothermal carbonization of *Opuntia ficus-indica* cladodes: Role of process parameters on hydrochar properties. *Bioresource Technology*, 247, 310–318.
- Yang, L., Lu, M., Carl, S., Mayer, J. A., Cushman, J. C., Tian, E., & Lin, H. (2015). Biomass characterization of Agave and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 76, 43–53.

## ANEXOS

### Anexo 1. Tabla de ANOVA para las respuestas del diseño factorial general para la extracción de compuestos fenólicos a partir de *Opuntia* spp. con solventes

Tabla A1. ANOVA del diseño factorial general para los azúcares totales presentes en el sobrenadante en la extracción de *Opuntia* spp. con solventes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor p
Modelo	34.19	11	3.11	90.20	< 0.0001
A-Opuntia	2.74	2	1.37	39.77	< 0.0001
B-Solvente	0.77	1	0.77	22.42	0.0005
C-Concentración	28.74	1	28.74	834.06	< 0.0001
AB	0.06	2	0.03	0.91	0.4280
AC	1.25	2	0.63	18.18	0.0002
BC	0.54	1	0.54	15.72	0.0019
ABC	0.08	2	0.04	1.14	0.3531
Error	0.41	12	0.03		
Total	34.60	23			

Tabla A2. ANOVA del diseño factorial general para los azúcares reductores presentes en el sobrenadante en la extracción de *Opuntia* spp. con solventes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor p
Modelo	21.78	11	1.98	613.18	< 0.0001
A-Opuntia	8.03	2	4.01	1243.07	< 0.0001
B-Solvente	0.16	1	0.16	50.11	< 0.0001
C-Concentración	8.91	1	8.91	2760.20	< 0.0001
AB	0.02	2	0.01	3.44	0.0660
AC	3.70	2	1.85	572.38	< 0.0001
BC	0.69	1	0.69	212.36	< 0.0001
ABC	0.27	2	0.14	42.25	< 0.0001
Error	0.04	12	0.00		
Total	21.82	23			

Tabla A3. ANOVA del diseño factorial general para los compuestos fenólicos totales presentes en el sobrenadante en la extracción de *Opuntia* spp. con solventes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor p
Modelo	183.49	11	16.68	143.95	< 0.0001
A-Opuntia	50.50	2	25.25	217.91	< 0.0001
B-Solvente	7.01	1	7.01	60.48	< 0.0001
C-Concentración	102.49	1	102.49	884.52	< 0.0001
AB	2.93	2	1.47	12.66	0.0011
AC	19.11	2	9.55	82.45	< 0.0001
BC	0.04	1	0.04	0.37	0.5549
ABC	1.40	2	0.70	6.04	0.0153
Error	1.39	12	0.12		
Total	184.88	23			

Tabla A4. ANOVA del diseño factorial general para los flavonoides totales presentes en el sobrenadante en la extracción de *Opuntia* spp. con solventes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor p
Modelo	5.43	11	0.49	244.43	< 0.0001
A-Opuntia	1.82	2	0.91	449.91	< 0.0001
B-Solvente	0.04	1	0.04	18.51	0.0010
C-Concentración	1.95	1	1.95	964.17	< 0.0001
AB	0.04	2	0.02	9.57	0.0033
AC	1.52	2	0.76	375.37	< 0.0001
BC	0.07	1	0.07	35.01	< 0.0001
ABC	0.00	2	0.00	0.66	0.5364
Error	0.02	12	0.00		
Total	5.45	23			

Tabla A5. ANOVA del diseño factorial general para el rendimiento de la extracción de *Opuntia* spp. con solventes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor p
Modelo	874.65	11	79.51	345.09	< 0.0001
A-Opuntia	33.23	2	16.61	72.10	< 0.0001
B-Solvente	142.11	1	142.11	616.74	< 0.0001
C-Concentración	645.84	1	645.84	2802.94	< 0.0001
AB	9.93	2	4.97	21.55	0.0001
AC	37.18	2	18.59	80.69	< 0.0001
BC	0.60	1	0.60	2.61	0.1321
ABC	5.76	2	2.88	12.50	0.0012
Error	2.76	12	0.23		
Total	877.42	23			

Tabla A6. ANOVA del diseño factorial general para la actividad antioxidante DPPH de los extractos de *Opuntia* spp. con solventes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor p
Modelo	2230.95	11	202.81	132.02	< 0.0001
A-Opuntia	7.36	2	3.68	2.40	0.1332
B-Solvente	213.90	1	213.90	139.24	< 0.0001
C-Concentración	1676.43	1	1676.43	1091.28	< 0.0001
AB	13.82	2	6.91	4.50	0.0349
AC	288.11	2	144.06	93.77	< 0.0001
BC	19.53	1	19.53	12.71	0.0039
ABC	11.80	2	5.90	3.84	0.0514
Error	18.43	12	1.54		
Total	2249.39	23			

## **Anexo 2. Técnicas adicionales**

### *Cromatografía en capa fina para identificación de azúcares*

Bayar et al. (2018) hace cromatografía en capa fina para medir azúcares en pectina extraída de cladodios de Opuntia. Se hace una hidrólisis de 10 mg de pectina con 2 mL de ácido trifluoroacético 2 M por 8 h a 100 °C. Se depositan 15 uL de la muestra en placas de CCF; la fase móvil es una mezcla de cloroformo/ácido acético/agua en una relación volumétrica de 6:7:1. Después, las placas se tiñeron rociando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% v/v en etanol e incubando durante 15 min en el horno a 105 °C. Se utilizaron ramnosa, arabinosa, galactosa, xilosa, glucosa y manosa como estándares.

### *Cromatografía en capa fina para identificación de actividad antioxidante con DPPH*

Este procedimiento se realizó por el método bioautográfico descrito por Gu et al. (2009). Una alícuota de la solución metanólica del extracto (1 mg/mL, 3 mL) se depositaron como puntos o bandas en las placas de CCF. La CCF se realizó en una cámara presaturada con la solución de solvente n-hexano:tolueno:acetato de etilo:ácido fórmico (2:5:2.5:0.5) como fase acarreadora hasta que el frente del solvente alcance 1 cm antes del extremo de las placas. Las placas se retiraron de la cámara y se dejaron secar al aire por 30 min antes de atomizar una solución DPPH\* metanol 2.54 mM. Las bandas con actividad antioxidante se observaron como bandas blancas-amarillas en fondo morado. Cada placa se monitoreó bajo luz UV a 254 y 366 nm.

### *Cromatografía en capa fina para la detección de compuestos fenólicos y flavonoides*

Una placa de 10 x 1.5 cm se activó por calentamiento a 100 °C por 10 min, dejándose enfriar a temperatura ambiente. Se dibujaron líneas a 1.5 cm del borde de las placas. Se gotearon los extractos sobre la línea usando pipetas capilares. Las placas se colocaron en una cámara de vidrio con un solvente acarreador. El frente del solvente se dejó ascender hasta 1 cm antes del extremo de la placa. Las placas se removieron de la cámara, marcándose con un lápiz el frente del solvente. Se dejaron secar al aire y después se roció una solución de cloruro de aluminio en etanol al 1 %, de nuevo se dejó secar y luego se observó bajo luz UV a 365 nm. Los

cromatogramas se marcaron y se calcularon los factores de retención. El solvente compuesto por metanol-cloroformo-hexano (7:2:1 v/v/v) produjo las mejores separaciones.

#### *Cromatografía preparativa en placa fina*

Se utilizaron placas de vidrio recubiertas con silica gel, de 20 x 20 cm. Como solvente de fase móvil se utilizó metanol-cloroformo-hexano (7:2:1 v/v/v). Cada extracto etanólico se colocó como banda a 1.5 cm del borde en su respectiva placa de CCF y se dejó secar, después dejando la placa en la cámara de desarrollo. Al finalizar, se retiraron de la cámara cuando el solvente descendió hasta tres cuartos de la longitud de la placa y la posición del solvente se marcó de inmediato (Gwatidzo et al., 2018).

#### *Determinación de ácidos fenólicos por HPLC-DAD*

La cuantificación de compuestos fenólicos se realizará mediante HPLC con un detector de matriz de diodos e inyección automática. El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando una columna analítica de fase inversa C<sub>18</sub> (150x4.6mm i.d., tamaño de partícula 3.5 µm, Water Corp, Massachusetts, USA) (Dávila-Hernández et al., 2019) a temperatura constante de 30 °C con un volumen de inyección de 20 mL. La fase móvil A consiste en una solución de ácido fórmico al 3% (v/v) en agua, y el eluyente B es acetonitrilo al 100%. La velocidad de flujo es de 0.8 mL/min con un gradiente lineal de 5% a 30% de B durante 35 min. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 280 nm. Los compuestos fenólicos se cuantificaron utilizando estándares externos disueltos en metanol/agua 80:20 v/v para la curva de calibración. Los estándares fueron quercetina, catequina, ácido caféico, ácido vanílico, ácido serínico y ácido cumárico (Dávila-Hernández et al., 2019; Osorio-Esquivel et al., 2011).

#### *Determinación de compuestos fenólicos por HPLC-MS*

Los compuestos fenólicos son extraídos de la biomasa por medio de una solubilización en HCl. Se mezclan 20 mg de extracto liofilizado en 5 mL de HCl 2M,

sellados y calentados en un baño de agua a 98 °C por 1 h. Se deja enfriar y después se realiza extracción dos veces con 5 mL de acetato de etilo utilizando un embudo de separación. Las fracciones se agrupan y luego se evaporan a sequedad en un evaporador rotativo al vacío a 30 °C. El residuo de la evaporación se re-disuelve en 1 mL de metanol y se filtra a través de un filtro de politetrafluoroetileno de 0.2 mm y se almacena a 4 °C hasta su análisis. (Shelembe et al., 2012).

El análisis de HPLC se llevó a cabo en una columna de fase inversa (250x4.6mm i.d., 5µm tamaño de partícula, YMC-Pack ODS AM-303). La fase móvil A es 0.1% de ácido acético en agua HPLC y la fase B es 0.1% de ácido acético en acetonitrilo. Los disolventes se administraron con un gradiente lineal de la siguiente manera: 8-10% B (2 min), 10-30% B (25 min), 30-90% B (23 min), 90-100% B (2 min), 100-8% B (2 min) y 8% B (7 min). El tiempo total fue de 61 min con un volumen de inyección de 20 µL y velocidad de flujo de 0.8 mL/min. Los compuestos fenólicos se detectaron a 280 nm.

El sistema de HPLC se acopló a un espectrómetro de masas de trampa de iones de triple cuadrupolo/lineal (triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer, model 4,000 Q TRAP LC/MS/MS system). El volumen de inyección fue de 20 µL y las condiciones de la introducción del solvente fueron las mismas que en el HPLC, excepto que la temperatura de la columna se fijó en 40 °C y el detector de longitud de onda a 190-600 nm. Las condiciones para la operación del espectrómetro de masas se indican a continuación: La temperatura de fuente se mantuvo a 400 °C, el voltaje del spray de iones a -4,000 V (modo negativo). Se utiliza nitrógeno a 35 psi como gas nebulizador (GS1), a 40 psi como gas calentador (GS2) y a 23 psi como gas cortina (CUR). El descifrado (DP) y el potencial de entrada (EP) se establecieron en -60 y -10 V, respectivamente. La masa de los compuestos se escaneó de m/z 70 Da a m/z 1,200 Da en 0.75 s y los datos se adquirieron y monitorearon por Analyst software versión 1.5.