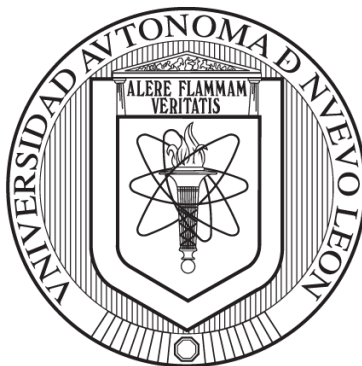


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



MODELO DE BIORREFINERÍA DE *Opuntia ficus-indica* PARA LA
PRODUCCIÓN DE ANTIOXIDANTES, HIDROCOLOIDES Y
BIOENERGÍAS

Por:

M. en C. Kenia Aylín Carrillo Verástegui

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN
CIENCIAS con Orientación en Procesos Sustentables

Febrero 2026

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido	i
Lista de tablas.....	iv
Lista de figuras.....	vii
Abreviaturas / nomenclatura	x
Resumen	xi
1 Introducción y Antecedentes.....	1
1.1 Biorrefinerías	3
1.1.1 Procesos aplicados a biorrefinerías y sus productos principales ..	4
1.1.2 Biomasa para biocombustibles y biorrefinerías	8
1.2 Generalidades de las especies de <i>Opuntia</i>	10
1.2.1 Metabolismo ácido de las crasuláceas	11
1.2.2 Producción en México y en el mundo	12
1.2.3 Características fisicoquímicas	14
1.3 Principales bioproductos potencialmente obtenidos de <i>Opuntia</i>	15
1.3.1 Antioxidantes	16
1.3.2 Mucílago	21
1.3.3 Pectina	23
1.3.4 Biogás	25
1.4 Antecedentes.....	28
2 Aportación científica	31
3 Hipótesis	32
4 Objetivos.....	32
4.1 Objetivo general	32
4.2 Objetivos específicos.....	32
5 Metodología	33
5.1 Plan de trabajo	33
5.2 Actividad 1. Extracción de compuestos antioxidantes a partir de la biomasa de <i>O. ficus-indica</i>	34
5.2.1 Propósito	34
5.2.2 Diseño experimental.....	34
5.2.3 Obtención y caracterización de cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	34
5.2.4 Actividad 1A. Extracción de compuestos fenólicos a partir de <i>O. ficus-indica</i> mediante solventes orgánicos	35

5.2.5	Actividad 1B. Extracción de compuestos fenólicos a partir de <i>O. ficus-indica</i> utilizando disolventes eutécticos profundos (DES)	39
5.3	Actividad 2. Extracción de hidrocoloides con biomasa de <i>O. ficus-indica</i>	41
5.3.1	Propósito	41
5.3.2	Diseño experimental	41
5.3.3	Procedimientos y técnicas	42
5.4	Actividad 3. Producción de hidrógeno por fermentación oscura de <i>O. ficus-indica</i> en lote	44
5.4.1	Propósito	44
5.4.2	Diseño experimental	44
5.4.3	Programa de seguimiento y análisis	44
5.4.4	Procedimientos y técnicas	45
5.5	Actividad 4. Efecto del tipo de inóculo hidrogenogénico sobre la fermentación oscura en lote	49
5.5.1	Propósito	49
5.5.2	Diseño experimental	49
5.5.3	Programa de seguimiento y análisis	50
5.5.4	Procedimientos y técnicas	50
5.6	Actividad 5. Producción de metano por digestión anaerobia de lodos fermentados hidrogenogénicos en semi-continuo	52
5.6.1	Propósito	52
5.6.2	Diseño experimental	52
5.6.3	Programa de seguimiento y análisis	52
5.6.4	Procedimientos y técnicas	53
5.7	Actividad 6. Evaluación de transformación de <i>O. ficus-indica</i> en bioproductos para escenarios de biorrefinería	55
5.7.1	Propósito	55
5.7.2	Diseño experimental	55
5.7.3	Definición de escenarios de comparación	55
6	Resultados y discusión	57
6.1	Actividad 1. Extracción de compuestos antioxidantes con biomasa de <i>O. ficus-indica</i>	58
6.1.1	Actividad 1A. Extracción de compuestos fenólicos a partir de <i>O. ficus-indica</i> mediante solventes orgánicos	58
6.1.2	Actividad 1B. Extracción de compuestos fenólicos a partir de <i>O. ficus-indica</i> mediante solventes eutécticos profundos (DES)	66

6.2	Actividad 2. Extracción de hidrocoloides con biomasa de <i>O. ficus-indica</i>	73
6.3	Actividad 3. Producción de hidrógeno por fermentación oscura de <i>O. ficus-indica</i> en lote.....	75
6.4	Actividad 4. Efecto del tipo de inóculo hidrogenogénico sobre la fermentación oscura en lote	78
6.5	Actividad 5. Producción de metano por digestión anaerobia de lodos fermentados hidrogenogénicos en semi-continuo	82
6.7.	Actividad 6. Evaluación de transformación de <i>O. ficus-indica</i> en bioproductos para escenarios de biorrefinería	87
7	Conclusiones	94
7.1	Perspectivas	96
8	Referencias.....	97
9	Anexos.....	109
9.1	Análisis estadísticos	109
9.1.1	Actividad 1.....	109
9.1.2	Actividad 3.....	115
9.2	Métodos y procedimientos adicionales	118
9.3	Materiales adsorbentes	121
9.4	Montaje de reactores de DA/FO en lote	131
9.5	Preparación y puesta en marcha de reactores inoculadores.....	132

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de operación de digestión anaerobia en lote de sustratos lignocelulósicos.....	7
Tabla 2. Parámetros de operación de fermentación oscura de residuos agroindustriales.....	8
Tabla 3. Métodos de extracción de compuestos antioxidantes (fenólicos) del cladodio de <i>Opuntia</i> spp.	18
Tabla 4. Extracción de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) utilizando solventes eutécticos profundos.....	21
Tabla 5. Métodos de extracción de mucilago de <i>Opuntia</i> reportados en la literatura.	22
Tabla 6. Extracción de pectina a partir de <i>Opuntia</i> en la literatura.....	24
Tabla 7. Producción de metano en lote utilizando <i>Opuntia</i>	26
Tabla 8. Antecedentes del aprovechamiento de <i>O. ficus-indica</i> para la obtención de productos de valor agregado.	29
Tabla 9. Parámetros para la caracterización de <i>O. ficus-indica</i>	35
Tabla 10. Parámetros para la caracterización de los extractos fenólicos.	36
Tabla 11. Método instrumental (gradiente) para la identificación de flavonoides de extractos hidrolizados y lavados de <i>O. ficus-indica</i>	39
Tabla 12. Solventes eutécticos profundos para evaluar en la extracción de compuestos fenólicos.	39
Tabla 13. Parámetros para análisis de sustrato y los sólidos digeridos de reactores de fermentación oscura.....	45
Tabla 14. Parámetros para análisis de sustrato y sólidos digeridos de reactores de re-fermentación con inóculos pretratados.....	50
Tabla 15. Parámetros para análisis de sustrato, inóculo y sólidos digeridos de reactores metanogénicos.....	53
Tabla 16. Caracterización de la biomasa de <i>O. ficus-indica</i> utilizada en el proyecto.	57
Tabla 17. Caracterización de los extractos de <i>O. ficus-indica</i> según el diseño experimental.	59

Tabla 18. Comparación con métodos de extracción de compuestos fenólicos a partir de <i>Opuntia</i> utilizando solventes orgánicos.....	62
Tabla 19. Concentración de agliconas de flavonoides en los extractos orgánicos hidrolizados de <i>O. ficus-indica</i>	64
Tabla 20. Comparación de cuantificación de flavonoides en extractos de <i>O. ficus-indica</i> por HPLC-DAD.	66
Tabla 21. Solventes eutécticos profundos para evaluar en la extracción de compuestos fenólicos.	67
Tabla 22. Cálculo de adición de agua para preparar el DES al 80 % en solución acuosa (cantidad conocida de agua).	68
Tabla 23. Concentración de agliconas en extractos hidrolizados de <i>O. ficus-indica</i> utilizando solventes eutécticos profundos.....	69
Tabla 24. Comparación del rendimiento de la extracción de flavonoides utilizando solventes eutécticos profundos en diferentes plantas.....	72
Tabla 25. Hidrocoloides obtenidos a partir de la biomasa de <i>O. ficus-indica</i>	73
Tabla 26. Parámetros de la fermentación oscura escalada de <i>O. ficus-indica</i> y del ajuste no lineal utilizando la ecuación de Gompertz modificada.	75
Tabla 27. Producción de biohidrógeno por fermentación oscura en lote de sustratos fácilmente degradables (bajo contenido de lignina).	77
Tabla 28. Parámetros del ajuste no lineal de los datos de la producción acumulada de hidrógeno utilizando la ecuación de Gompertz modificada.	79
Tabla 29. Propiedades iniciales del lodo del reactor y finales del fermentado para los cuatro reactores evaluados.	80
Tabla 30. Producción de biohidrógeno en dos etapas de fermentación utilizando sustratos orgánicos.....	81
Tabla 31. Caracterización inicial de los reactores metanogénicos.....	82
Tabla 32. Producción y rendimiento máximos de la digestión anaerobia por alimentación.....	83
Tabla 33. Producción de biogás en dos etapas (H-M) utilizando sustratos de diferente origen.	86

Tabla 34. Datos recopilados de cada actividad para realizar los balances de materia correspondientes a cada escenario.	87
Tabla 35. Balance de materia en el proceso de fermentación oscura.	88
Tabla 36. Balance de materia en el proceso de digestión anaerobia.....	89
Tabla 37. Balance de materia en la extracción de compuestos fenólicos utilizando solventes orgánicos al 80 %.	89
Tabla 38. Balance de materia en el proceso de extracción de hidrocoloides. ..	90
Tabla 39. Balance de materia en FO y DA después de la extracción de bioproductos.	91
Tabla 40. Indicadores de eficiencia para los escenarios de biorrefinería de nopal a productos de valor agregado.	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las tierras secas en el mundo. Tomado de SEMARNAT (2019).	1
Figura 2. Distribución de las tierras secas en México. Tomado de SEMARNAT (2018).	2
Figura 3. Tipos de procesos que se pueden incluir en biorrefinerías. Modificado de BioPlat & SusChem (2017).	4
Figura 4. Etapas de la digestión anaerobia y especies de microorganismos involucrados. Modificado de Bhatia et al. (2020).	6
Figura 5. Clasificación de biorrefinerías. Adaptado de Moncada et al. (2016) y Platt et al. (2021).	9
Figura 6. Diferencias entre el metabolismo de las plantas C3, C4 y CAM.	12
Figura 7. Producción de nopal forrajero en México en 2019. Porcentajes por 167 mil toneladas. Fuente: SIAP (2022)	13
Figura 8. Producción de nopal verdura en México en 2019. Fuente: SIAP (2022)	14
Figura 9. Partes de la planta de <i>O. ficus-indica</i>	15
Figura 10. Estructura básica de los flavonoides y sus clasificaciones. Modificado de Panche et al. (2016).	17
Figura 11. Aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA) y donadores de enlaces de hidrógeno (HBD) más utilizados para la preparación de disolventes eutécticos profundos (DES). Tomado de Smith et al. (2014).	19
Figura 12. Estructuras básicas de la pectina. Modificado de Harholt et al. (2010).	23
Figura 13. Modelo de biorrefinería de <i>Opuntia</i> spp. en Carrillo-Verástegui (2021).	28
Figura 14. Plan de trabajo.	33
Figura 15. Diseño experimental para la evaluación de la extracción de compuestos antioxidantes a partir de <i>O. ficus-indica</i> mediante solventes orgánicos.	36

Figura 16. Etapas de la actividad 2 para la extracción de hidrocoloides con <i>O. ficus-indica</i>	41
Figura 17. Diseño experimental para la evaluación de la extracción de hidrocoloides a partir cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	42
Figura 18. Esquema de extracción de hidrocoloides con biomasa de <i>O. ficus-indica</i> extraída.....	43
Figura 19. Diagrama del reactor de fermentación oscura de <i>O. ficus-indica</i>	44
Figura 20. Diagrama del proceso de la segunda fermentación oscura utilizando como inóculos los fermentados de la actividad 3 y evaluando tres tratamientos adicionales.....	49
Figura 21. Diagrama de digestión anaerobia de lodos fermentados de FO en régimen semi-continuo.....	52
Figura 22. Diagrama de escenarios de biorrefinería de <i>O. ficus-indica</i> (OFI)... ..	55
Figura 23. Extracción de extracción de compuestos fenólicos en: A) nopal seco (S) y nopal liofilizado (L), B) alternando el orden de los solventes (acetona y metanol, MA o AM) en la extracción secuencial de nopal seco, y C) utilizando metanol al 80 % vs metanol-acetona-agua 40:40:20.....	59
Figura 24. Efectos principales del solvente orgánico utilizado en la extracción de compuestos fenólicos; A) compuestos fenólicos totales, B) azúcares reductores, C) actividad antioxidante DPPH y D) actividad antioxidante ABTS.....	60
Figura 25. Efectos principales de la concentración del solvente utilizado en la extracción de compuestos fenólicos; A) compuestos fenólicos totales, B) azúcares reductores, C) actividad antioxidante DPPH y D) actividad antioxidante ABTS.	61
Figura 26. Concentración y perfil de agliconas de flavonoides en los extractos orgánicos hidrolizados de <i>O. ficus-indica</i>	65
Figura 27. Preparación de disolventes eutécticos profundos a atmosfera no-controlada.....	67
Figura 28. Segunda preparación de disolventes eutécticos profundos a temperatura y ambiente controlados.....	67
Figura 29. Preparación de disolventes eutécticos profundos al 80 % en agua.	68

Figura 30. Concentración y perfil de agliconas en extractos hidrolizados de <i>O. ficus-indica</i> utilizando solventes eutécticos profundos.....	70
Figura 31. Estructura química de los aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno utilizados para preparar los solventes eutécticos profundos. HBA: cloruro de colina y L-prolina. HBD: glicerol y xilitol.	71
Figura 32. Producción acumulada de hidrógeno (NmL H ₂) a partir de <i>O. ficus-indica</i> . Ajuste de datos: Ecuación de Gompertz modificada.	76
Figura 33. Producción acumulada de hidrógeno a partir de <i>O. ficus-indica</i> reutilizando el lodo fermentado como inóculo.	78
Figura 34. Producción acumulada de biogás por alimentación. Los puntos verdes representan la alimentación de nopal, mientras que los naranjas representan la alimentación de lodos de FO.	82
Figura 35. Producción y rendimiento máximo de biogás en la digestión anaerobia en semi-continuo.....	84
Figura 36. Escenario bioproductos; producción secuencial de biohidrógeno y biometano a partir de la fermentación anaerobia de <i>O. ficus-indica</i>	88
Figura 37. Escenario bioproductos; extracción secuencial de compuestos fenólicos e hidrocoloides a partir de <i>O. ficus-indica</i>	91
Figura 38. Escenario bioproductos + biocombustibles (Ax-C-H-M).	92

ABREVIATURAS / NOMENCLATURA

ABTS:	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AOV:	ácidos orgánicos volátiles
CAM:	metabolismo ácido de las crasuláceas
DA:	digestión anaerobia
DES:	disolventes eutécticos profundos
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EtOH:	etanol
FO:	fermentación oscura
GAE:	ácido gálico equivalente
HBA:	aceptor de enlaces de hidrógeno
HBD:	donador de enlaces de hidrógeno
HPLC:	cromatografía de líquidos de alta resolución
iF:	inóculo hidrogenogénico
iFL:	inóculo hidrogenogénico lavado
IFT:	inóculo hidrogenogénico tratado térmicamente
iFLT:	inóculo hidrogenogénico lavado y tratado térmicamente
IL:	líquido iónico
MeOH:	metanol
OFI:	<i>Opuntia ficus-indica</i>
RIS:	relación inóculo-sustrato
RLS:	relación líquido sólido
ST:	sólidos totales
SV:	sólidos volátiles

RESUMEN

Kenia Aylín Carrillo Verástegui
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de graduación: Febrero 2026

Título de la investigación: **MODELO DE BIORREFINERÍA DE *Opuntia ficus-indica* PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIOXIDANTES, HIDROCOLOIDES Y BIOENERGÍAS**

Número de páginas: 105

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias
con Orientación en Procesos Sustentables

Opuntia ficus-indica, comúnmente conocida como nopal, es un cultivo de gran importancia y abundancia en México; el género *Opuntia* en el continente americano es muy diverso, biodisponible y sus numerosas propiedades no únicamente medicinales demuestran su alto potencial de aprovechamiento en diferentes sectores industriales. En este contexto, el objetivo del proyecto fue diseñar y evaluar un modelo de biorrefinería integral que permitiera la valorización de la biomasa de *O. ficus-indica* mediante la extracción de compuestos antioxidantes, la obtención de hidrocoloides, y la producción de hidrógeno y biometano.

El proyecto consistió en tres etapas orientadas a generar información para la evaluación de escenarios de biorrefinería. En la primera etapa se obtuvieron bioproductos, específicamente antioxidantes y polisacáridos, a partir de cladodios secos de *O. ficus-indica* mediante extracción con solventes orgánicos y solventes eutécticos profundos (DES). En la segunda etapa se llevaron a cabo procesos complementarios: la producción de biohidrógeno a partir de nopal por fermentación oscura (FO), y la digestión anaerobia (DA) de efluentes de la FO en régimen semi-continuo. En la tercera etapa se evaluaron escenarios de biorrefinería para estimar el aprovechamiento integral del nopal.

En la etapa 1, la extracción de compuestos fenólicos se realizó en dos fases. En la primera se empleó la maceración con solventes orgánicos (acetona, metanol y etanol) a diferentes concentraciones. Los mejores resultados se obtuvieron con metanol y con acetona al 50 %, siendo acetona la que extrajo compuestos con mayor capacidad antioxidante DPPH y ABTS. Por otro lado, se evaluó el uso de los DES como alternativa a los solventes orgánicos, destacando los DES de cloruro de colina:xilitol y cloruro de colina:glicerol los cuales lograron incrementar la extracción de flavonoides 1.5 veces en comparación a los solventes orgánicos.

En esta etapa se obtuvieron hidrocoloides mediante extracción acuosa a temperatura ambiente y a 80 °C, la cual presentó mayor rendimiento, posiblemente debido a la solubilización simultánea del mucilago y una fracción de la pectina que está presente en la matriz vegetal.

Durante la segunda etapa, la producción en lote de biohidrógeno a partir de nopal fresco alcanzó un rendimiento de 96 mL H₂/gSV el cual es aproximadamente el 20 % del rendimiento teórico. La biomasa residual fue sometida a diferentes tratamientos para evaluar su uso como inóculo en un nuevo ciclo de FO; la biomasa sin tratar tuvo un mayor rendimiento a aquellos con tratamiento. Posteriormente, se utilizó la biomasa residual para alimentar un reactor de DA en semi-continuo para la producción de biogás; la alimentación de lodo digerido alcanzó un rendimiento superior al de la alimentación con nopal fresco.

Finalmente, en la etapa 3, se observó el índice de transformación más alto en el escenario de biorrefinería que integró los cuatro procesos presentados (Ax-C-H-M), esto en comparación con los escenarios de uno o dos procesos. La DA fue el proceso que más contribuyó al índice de transformación, mientras que la obtención de hidrocoloides aportó el mayor rendimiento.

Se considera que la reutilización de efluentes y la integración de procesos favorecen en gran manera la eficiencia y el rendimiento de los productos de la biorrefinería, lo cual posiciona al nopal como una alternativa sustentable atractiva para el desarrollo de bioprocesos. *O. ficus-indica* es una materia prima altamente viable para su aprovechamiento bajo un enfoque de biorrefinería, la cual permite la obtención en paralelo de bioproductos con alto valor agregado y biocombustibles.

FIRMA DEL ASESOR:

1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La sociedad ha contribuido a la mayoría de los problemas ambientales que combatimos hoy en día, como el calentamiento global, el cambio climático, el deterioro de los suelos, la escasez de agua y la disminución de recursos fósiles. Cerca del 40 % de la superficie terrestre está conformada por zonas áridas y se espera que, debido tanto a las actividades antropogénicas como los fenómenos meteorológicos, esta proporción aumente conforme el paso de los años (FAO, 2021). Los países con mayor extensión territorial de zonas climáticas áridas son Australia, Rusia, Estados Unidos de América y los países de la zona norte del continente africano (Figura 1).

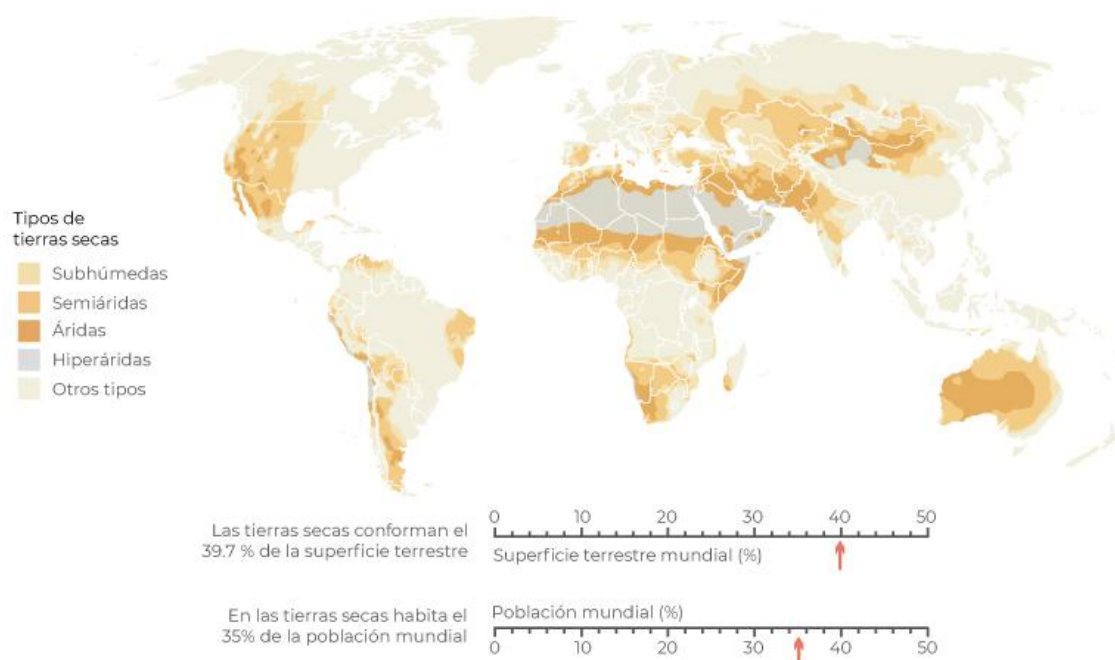


Figura 1. Distribución de las tierras secas en el mundo. Tomado de SEMARNAT (2019).

En el Informe de la Situación del Medio Ambiente en México, publicado por la SEMARNAT (2019) se resumen los tipos y cambios de suelo importante del país; entre lo más destacable, y a pesar de la gran diversidad de climas que tiene México, cerca de dos tercios del país son tierras secas, dividiéndose en zonas semiáridas (34.7 %), áridas (18.9 %), subhúmedas secas (10.8 %) e hiperáridas

(0.7%). Las tierras áridas se extienden desde la península de Baja California, la costa de Sonora, una zona del desierto chihuahuense; las semiáridas se ubican en el centro del país y sube por las Sierras Madre Oriental y Occidental hasta Nuevo León y Tamaulipas; las subhúmedas secas se encuentran en las sierras de Guerrero, Oaxaca y Chiapas; por último, las hiperáridas se concentran al noreste de Baja California (Figura 2).



Figura 2. Distribución de las tierras secas en México. Tomado de SEMARNAT (2018).

Debido a las principales características de las tierras secas, bajas precipitaciones y por consecuencia, sequías, olas de calor, vulnerabilidad a la erosión hídrica y eólica, baja fertilidad a causa de la falta de materia orgánica en el suelo, la flora nativa de estas zonas ha evolucionado para combatir estos problemas a la hora de su crecimiento. Estas plantas son llamadas suculentas y se diferencian de la mayoría debido a su metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés). Las plantas CAM tienen una oportunidad en el mercado global debido al futuro al que nos acercamos, donde hay poca accesibilidad a grandes cantidades de agua y los suelos deteriorados no-fértiles abundan debido a la sobreexplotación de los campos de cultivo (FAO, 2021).

Aunado a esto, en la actualidad tanto a nivel mundial como en el país, se han propuesto cambios para el aprovechamiento sustentable de la energía (Ley de

Transición Energética, 2015; SENER, 2018) de su producción y utilización, y se han descrito obligaciones para la generación de energías limpias (Masera Cerutti et al., 2011). De las fuentes de energía renovables que se conocen (como la eólica, hidráulica, geotérmica y solar) la bioenergía tiene la particularidad de provenir de la biomasa; esta se puede transformar y procesar de diferentes maneras, no solo aplicadas a la generación de energía, sino también a la obtención de productos de interés industrial.

1.1 BIORREFINERÍAS

Las fuentes de energía alternativas y sustentables se están investigando debido al incremento en el precio de los combustibles fósiles y el decremento de recursos naturales para su obtención. Los biocombustibles se encuentran entre las alternativas prometedoras de energía renovable, ya que se pueden producir a partir de una amplia variedad de materias primas y tienen un buen potencial para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, además de aumentar oportunidades comerciales y laborales (Ng et al., 2017; Rodríguez-Valderrama et al., 2020).

La producción concomitante de bioenergía, biocombustibles y bioproductos a partir de fuentes sustentables de materia prima es un tema que ha ganado gran atención recientemente debido a la importancia de aplicar los conceptos de economía circular en productos ampliamente utilizados en la actual era.

Las biorrefinerías comprenden la integración de procesos físicos, químicos, bioquímicos y térmicos con el fin de degradar biomasa para convertirla en productos con valor agregado (Moncada et al., 2016). La definición de una biorrefinería es “la integración de procesos físicos, químicos, bioquímicos y térmicos que, usando biomasa como materia prima, dan como productos bioenergéticos y químicos de valor agregado de manera simultánea” (Rodríguez-Valderrama et al., 2022).

1.1.1 Procesos aplicados a biorrefinerías y sus productos principales

Existen múltiples vías para la conversión de biomasa en productos de valor agregado, por lo que es importante integrar diversos tipos de procesos (Figura 3) para su conversión, como los térmicos, biológicos, catalíticos/químicos y físicos/mecánicos, para producir una amplia gama de productos (BioPlat & SusChem, 2017; Cherubini, 2010; Platt et al., 2021).

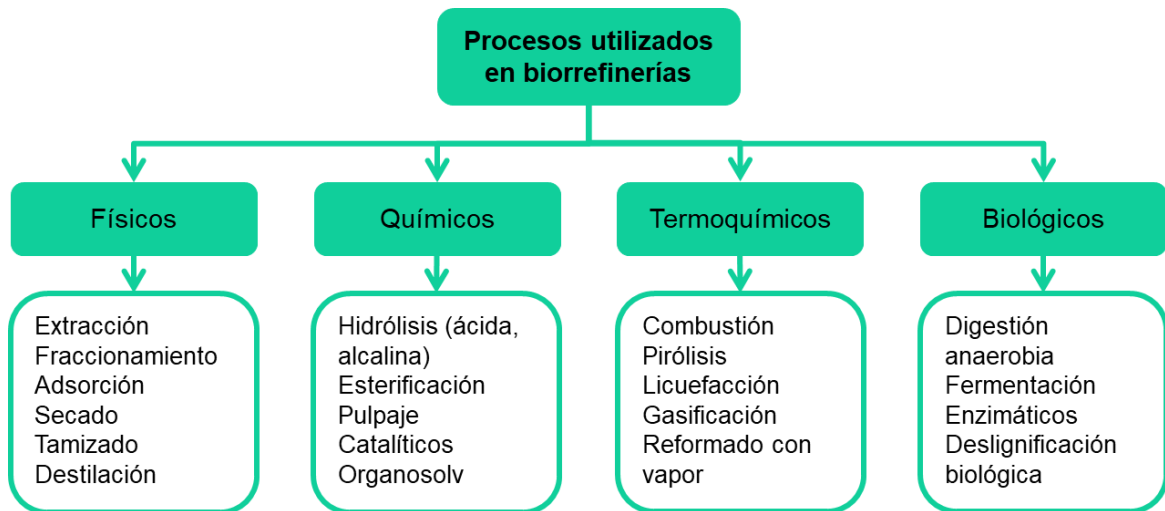


Figura 3. Tipos de procesos que se pueden incluir en biorrefinerías. Modificado de BioPlat & SusChem (2017).

1.1.1.1 Físicos o mecánicos

1.1.1.1.1 Fraccionamiento mecánico

El propósito de este pretratamiento es reducir el tamaño de partícula de la materia orgánica e incrementar el área superficial para mejorar los procesos de transferencia de masa en las siguientes etapas (Jędrzejczyk et al., 2019). Los procesos más utilizados para el fraccionamiento de la biomasa son la molienda, troceado y extrusión.

1.1.1.1.2 Extracción

Es un proceso en el que se separan uno o más compuestos (la(s) sustancia(s) objetivo) de una mezcla de sustancias (matriz multicomponente) utilizando un disolvente que tenga mayor compatibilidad con el compuesto objetivo. Los

procesos de extracción pueden llevarse a cabo con una matriz sólida (sólido-líquido) o en una matriz líquida (líquido-líquido).

1.1.1.2 Procesos químicos y catalíticos

1.1.1.2.1 Hidrólisis

En la hidrólisis de la materia orgánica (más utilizada en biomasa lignocelulósica) ocurre una descomposición de los polisacáridos complejos de la pared celular vegetal en sus monosacáridos o moléculas más simples (Verardi et al., 2012). Este proceso se lleva a cabo con agua y, en ocasiones, con un catalizador químico (ácido o alcalino).

1.1.1.2.2 Organosolv

Los pretratamientos con solventes a alta temperatura (140 – 200 °C) y presión (para evitar la evaporación del solvente) se utilizan principalmente para la deslignificación de la biomasa lignocelulósica (Kumari & Singh, 2018). Los solventes más utilizados son etanol, metanol, acetona o etilenglicol y usualmente son usados junto a un catalizador orgánico o inorgánico, ácidos o básicos.

1.1.1.3 Procesos termoquímicos

1.1.1.3.1 Pirólisis

La pirólisis es un proceso de degradación térmica de materia orgánica en ausencia de oxígeno a altas temperaturas (mayor a 400 °C) para la obtención de hidrocarburos ligeros, gas de síntesis, bioaceites y biocarbón (Mailaram et al., 2021).

1.1.1.3.2 Tratamiento hidrotermal

Los tratamientos hidrotermales aprovechan el agua a altas temperaturas y presiones para convertir la biomasa en productos como el biocarbón y el biocrudo. La carbonización hidrotermal es llevada a cabo entre 180 y 250 °C con el fin de obtener carbones con propiedades fisicoquímicas específicas; las principales

reacciones en este tratamiento son hidrólisis, deshidratación, descarboxilación, polimerización, aromatización y condensación. En la licuefacción hidrotérmica, ocurren estas reacciones a una temperatura mayor a 280 °C, y generalmente se obtiene como producto principal un biocrudo (Jędrzejczyk et al., 2019).

1.1.1.4 Procesos biológicos

1.1.1.4.1 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un proceso en el cual una comunidad microbiana degrada la materia orgánica en ausencia de oxígeno; este consiste en cuatro etapas (Figura 4): la hidrólisis de macromoléculas, la acidogénesis (donde los monómeros resultantes de la etapa anterior se transforman en ácidos volátiles intermediarios), la acetogénesis (donde estos intermediarios se convierten en hidrógeno y ácido acético) y la metanogénesis. Algunas referencias de la digestión anaerobia en lote se muestran en la Tabla 1; se destaca el trabajo de Lueangwattanapong et al. (2020) en el que evalúan distintas plantas con el metabolismo distintivo de *O. ficus-indica*.

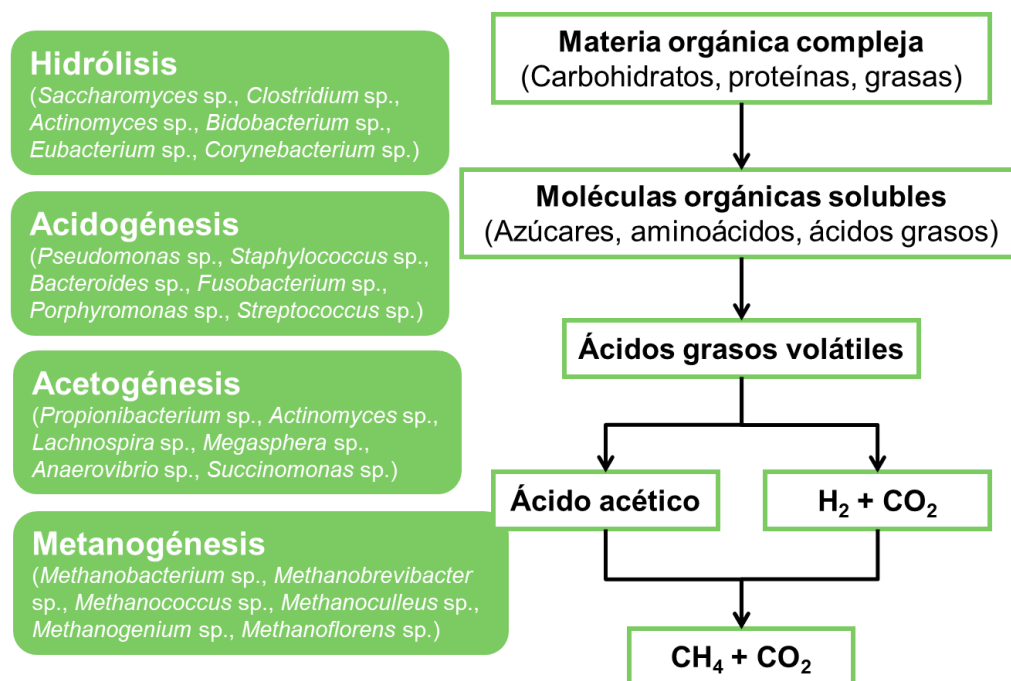


Figura 4. Etapas de la digestión anaerobia y especies de microorganismos involucrados. Modificado de Bhatia et al. (2020).

Tabla 1. Parámetros de operación de digestión anaerobia en lote de sustratos lignocelulósicos.

Sustrato	Inóculo	Condiciones de operación	Resultados	Referencias
<i>Ananas comosus</i>	Lodo anaerobio	Vop = 150 mL RIS = 2 (base SV) Top = 39 °C 120 rpm	B _{max} = 298.3 mL/gSV R _{max} = 17.75 mL/gSV-d λ = 1.02 d	(Lueangwattana et al., 2020)
<i>Agave angustifolia</i>			B _{max} = 376.9 mL/gSV R _{max} = 21.18 mL/gSV-d	
<i>Opuntia fragilis</i>			B _{max} = 296.9 mL/gSV R _{max} = 16.81 mL/gSV-d	
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>			B _{max} = 326.1 mL/gSV R _{max} = 26.54 mL/gSV-d	
<i>Zea mays</i>			B _{max} = 312.5 mL/gSV R _{max} = 15.71 mL/gSV-d λ = 1.45 d	
Residuos de comida	Lodo anaerobio	Vr = 5 L Vop = 3.5 L Top = 37 °C RIS = 1	B _{max} = 152 mL CH ₄ /g SV	(Gandhi et al., 2022)
Desperdicios sólidos de la industria citrícola	Estiércol	Vop = 250 L Top = 35 °C	B = 382 mL CH ₄ /g SV	(Rosas-Mendoza et al., 2021)

Notas: Vr, volumen de reactor; Vop, volumen de operación; Top, temperatura de operación; RIS, relación inóculo-sustrato; B_{max}, rendimiento máximo acumulado; R_{max}, tasa máxima de rendimiento

1.1.1.4.2 Fermentación oscura

La fermentación oscura consiste en la digestión anaerobia limitada en su última etapa, es decir, se evita la producción de metano inhibiendo las arqueas metanogénicas existentes en el inóculo anaerobio. Se le llama fermentación oscura para diferenciarlo de los otros procesos biológicos de producción de hidrógeno ya que la luz no es un requisito indispensable. Los productos principales son el hidrógeno, ácidos orgánicos volátiles y alcoholes, entre otros biocompuestos. El rendimiento teórico de hidrógeno es aproximadamente 500 mL H₂/g SV, sin embargo, en la práctica los rendimientos alcanzados llegan máximo a 300 mL H₂/g SV; en la Tabla 2 se muestran algunos parámetros más utilizados para la fermentación oscura de residuos agroindustriales, además de los resultados más relevantes.

Tabla 2. Parámetros de operación de fermentación oscura de residuos agroindustriales.

Sustrato	Inóculo	Condiciones de operación	Resultados	Referencias
Hidrolizado de residuos de comida y rastrojo de maíz	Lodo anaerobio (96 °C por 2 h)	Vr = 0.5 L Vop = 0.4 L RIS = 1.2	H _{max} = 223.8 mL H ₂ /g SV R _{max} = 2.6 mL H ₂ /g SV-h	(Rodríguez-Valderrama et al., 2020)
Residuo de pulpa de durazno	Lodo anaerobio (hervido por 1 h pH 5.9)	Vr = 250 mL Vop = 150 mL 5 % v/v de inóculo	H _{max} = 123.3 mL H ₂ /g COD R _{max} = 35.6 mL H ₂ /h	(Argun & Dao, 2017)
Puré de residuo de cebolla	Efluente de digestor productor de hidrógeno	Vr = 235 mL Vop = 70 g 10 % ST T = 35 °C 120 rpm	H _{max} = 151.6 mL H ₂ /g SV	(Panin et al., 2021)
Suero de queso y aguas residuales de molienda de aceituna	Lodo anaerobio (105 °C por 1.5 h)	Vop = 400 mL RIS = 0.4 T = 35 °C	H _{max} = 135.45 mL H ₂ /g COD	(Policastro et al., 2022)

Notas: Vr, volumen de reactor; Vop, volumen de operación; RIS, relación inóculo-sustrato; H_{max}, rendimiento acumulado máximo de hidrógeno; R_{max}, tasa máxima de rendimiento; SV, sólidos volátiles; COD, demanda química de oxígeno

1.1.1.4.3 Fotofermentación

Este es un proceso biológico en el que algunas bacterias fotosintéticas (*Rhodobium*, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*) utilizan la luz como fuente de energía para convertir el sustrato (usualmente ácidos orgánicos, alcoholes y azúcares) en hidrógeno. Es una gran área de oportunidad para aprovechar las corrientes de la biorrefinería con alto contenido de ácidos orgánicos, además de ser un proceso ampliamente investigado, eficiente y amigable con el medio ambiente (Hitam & Jalil, 2020).

1.1.2 Biomasa para biocombustibles y biorrefinerías

Nava-García y Doldán-García (2014) definen los cultivos energéticos como “cualquier cultivo agrícola, forestal o acuático, cuya producción parcial o total se utiliza como materia prima para generar energía aprovechable”. En los cultivos específicamente energéticos, teóricamente se aprovecharía el total de su

producción, incluidos sus residuos. Sin embargo, en cultivos con excedentes, como los agrícolas alimentarios, solamente dicho excedente se destinaría para uso energético. De los cultivos industriales también se puede usar toda o parte de su producción, sea o no excedente, dependiendo de las decisiones de los productores agrícolas o de las condiciones del mercado.

Si bien no existe un nombre definido para la materia prima de biorrefinerías, así como “cultivo energético” lo es para la producción de biocombustibles, el término biomasa es el más acertado para su aplicación. La biomasa es materia orgánica, comúnmente vegetal, que puede ser procesada para su transformación.

Las biorrefinerías se pueden clasificar de diferentes maneras (Figura 5), ya sea por la materia prima utilizada (por ejemplo: biorrefinería a base de maíz, biorrefinería a base de algas, etc.), o dependiendo del tipo de biomasa utilizada: de primera generación (cultivos energéticos, semillas oleaginosas comestibles, cultivos alimentarios, grasas animales), de segunda generación (biomasa lignocelulósica) y de tercera generación (algas y otros microorganismos) (Cherubini, 2010; Ng et al., 2017).

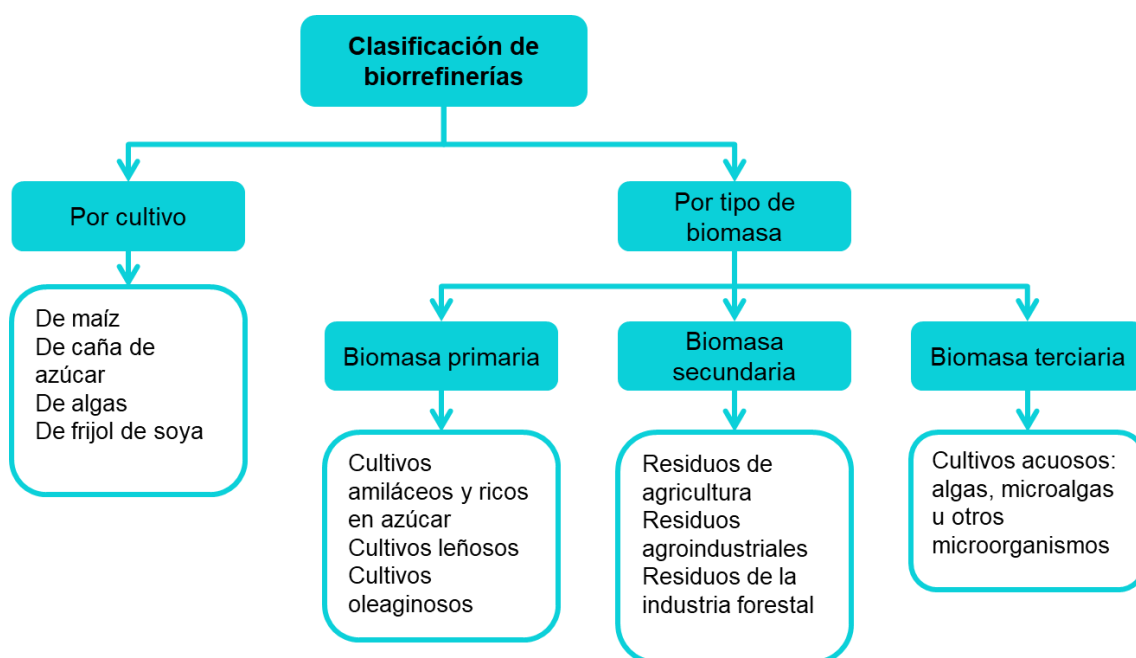


Figura 5. Clasificación de biorrefinerías. Adaptado de Moncada et al. (2016) y Platt et al. (2021).

Las biorrefinerías que más llaman la atención de la industria y la investigación son aquellas de segunda generación, ya que su alimentación se basa en biomasa obtenida a partir del procesamiento, conversión o descomposición de la biomasa primaria. Lo ideal para una biorrefinería de este tipo de cultivos (aquellos que son de igual manera consumidos por los seres humanos) es que sea una instalación en la que se procese la parte de la planta que es destinada a alimento y posteriormente repartir los residuos agroindustriales a los diferentes procesos de “refinación” de la biomasa para aumentar su valor económico; la biorrefinería podría también funcionar como un clúster más que una única instalación.

1.2 GENERALIDADES DE LAS ESPECIES DE *OPUNTIA*

El cactus *Opuntia ficus-indica* (nopal, como se le conoce comúnmente) es uno de los símbolos de identidad más importantes de México. Perteneció a la familia Cactaceae y en la actualidad ha recibido gran interés como cultivo energético debido a su uso eficiente de agua y fertilizante, además de ser un cultivo que puede crecer y desarrollarse en condiciones adversas, como estrés hídrico, a comparación de otros cultivos.

En la época precolombina la planta se utilizaba principalmente para cosechar el fruto (tuna); luego empezó a recolectarse también la grana cochinilla usada para elaborar tintes. De esta manera, el cultivo de *Opuntia* evolucionó según las necesidades humanas hasta que, tanto las frutas como los cladodios (pencas, hojas alargadas) redujeron el tamaño y cantidad de sus espinas, dando lugar a la planta *Opuntia ficus-indica* que hoy en día se consume en el país y es la especie más importante para el comercio (Inglese et al., 2018).

Alrededor del mundo se conocen al menos 300 especies del género *Opuntia*, pero solo 10 especies son las más cultivadas con el fin de aprovecharse. Por ejemplo, otras especies cultivadas en México son *O. joconoxtle*, *O. megacantha* y *O. streptacantha*, además de *O. robusta*, *O. leucotricha*, *O. hyptiacantha* y *O. chaveña*, las cuales conforman las especies silvestres (Sáenz, 2006).

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* (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).

1.2.1 Metabolismo ácido de las crasuláceas

La mayoría de las plantas realizan su respiración mediante el metabolismo C3, en el cual la fijación del carbono se da por un compuesto de tres carbonos (ácido 3-fosfoglicérico); sin embargo, el crecimiento y adaptabilidad de plantas con este metabolismo se limitan a ambientes frescos y húmedos para evitar la fotorrespiración. Hay dos tipos de metabolismo en plantas que cubren este rubro. En el metabolismo C4 existe una separación física entre las reacciones dependientes de la luz (célula del mesófilo) y el ciclo de Calvin (célula de haz vascular).

Las plantas con metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) separan las reacciones dependientes de la luz y el uso del CO₂ en el tiempo; las células “respiran” por la noche, capturando el CO₂ y fijándolo como oxalacetato, y por el día realizan la fotosíntesis. La comparación de los metabolismos se puede observar en la Figura 6. Cabe resaltar que, en un cultivo bajo irrigación, *Agave* y *Opuntia* (plantas con CAM) requieren 5 veces menos cantidad de agua que plantas C3 y C4, manteniendo la misma productividad másica (Cushman et al., 2015).

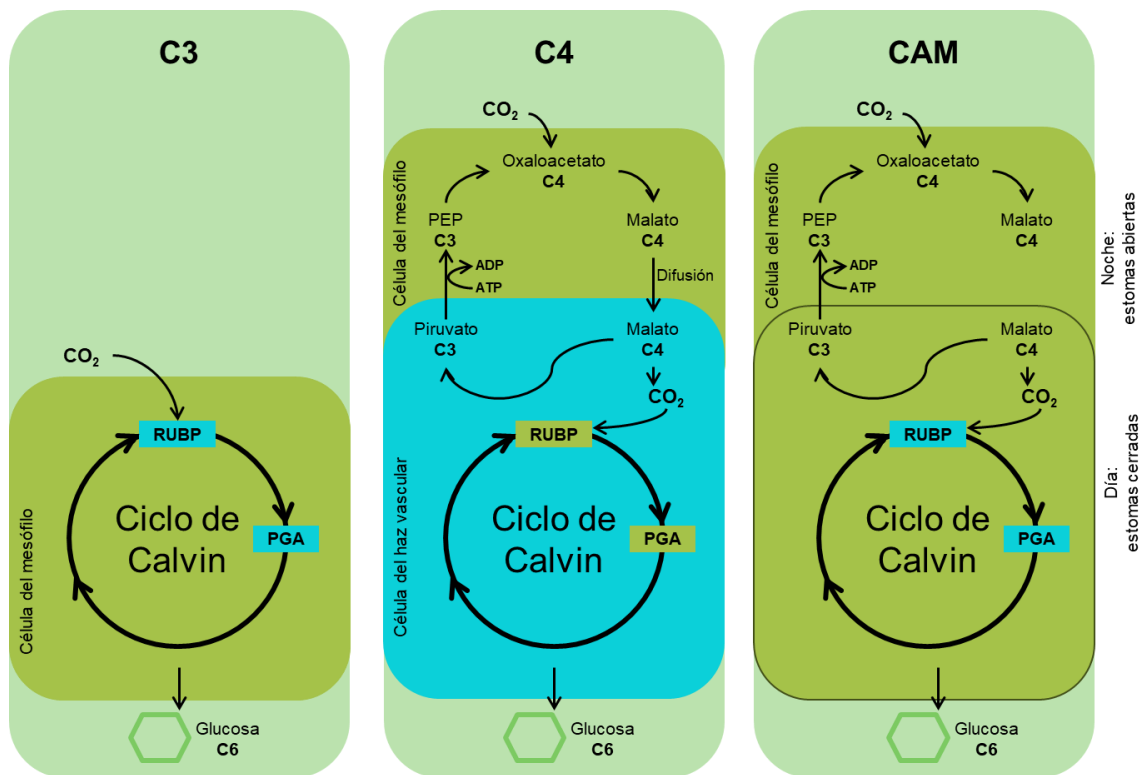


Figura 6. Diferencias entre el metabolismo de las plantas C3, C4 y CAM.

1.2.2 Producción en México y en el mundo

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 de hasta 5,100 msnm. También se considera que *O. ficus-indica* es la cactácea de mayor valor económico en el mundo. 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 (Inglese et al., 2018).

En México la diversidad de *Opuntia* es más amplia y el uso para consumo humano es el más alto del mundo (6.4 kg per cápita). La Financiera Rural (2011) estima que, en áreas semiáridas con suelos pobres, son cosechadas especies silvestres de nopal (i.e. *O. robusta*, *O. leucotricha*, *O. hypriacantha* y *O. chavena*)

que ocupan aproximadamente 3 millones de hectáreas, distribuidas principalmente en la zona norte del país y que se utilizan como forraje para ganado y procesamiento (Figura 7). La mayor producción de los cladodios jóvenes para consumo humano se encuentra en la zona central de México, especialmente en el estado de Morelos y la demarcación Milpa Alta de la Ciudad de México de donde proviene la variedad más utilizada para este propósito (*O. ficus-indica* Mill.) (Figura 8).

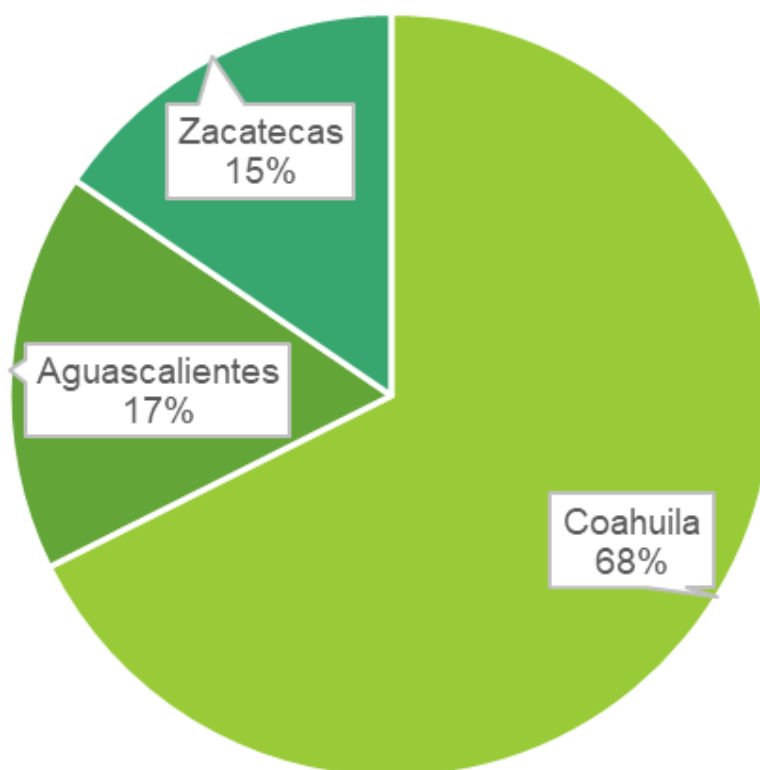


Figura 7. Producción de nopal forrajero en México en 2019. Porcentajes por 167 mil toneladas.
Fuente: SIAP (2022)

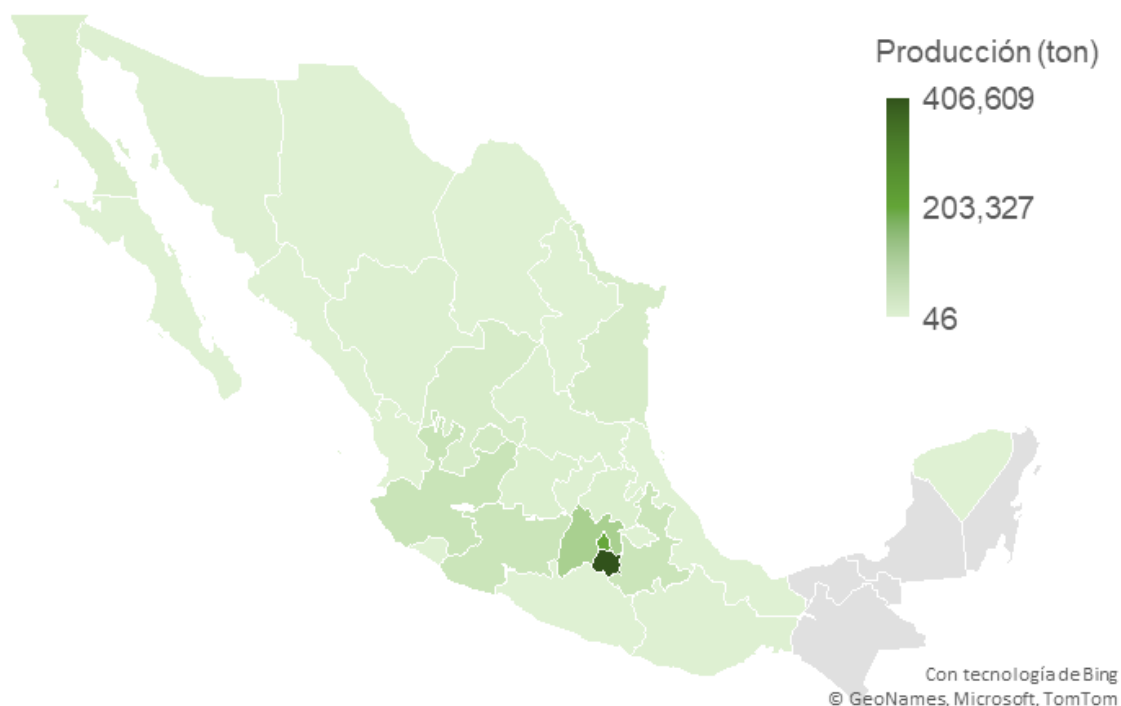


Figura 8. Producción de nopal verdura en México en 2019. Fuente: SIAP (2022)

1.2.3 Características fisicoquímicas

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 (Dávila-Aviña et al., 2019). En promedio, su contenido de humedad es de 90%; tiene un alto contenido de fibra soluble (18 %bs) y cenizas (20 %bs), 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 & Sánchez-Urdaneta, 2006). Se ha reportado 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).

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 (Figura 9). Las areolas son el origen de las flores y frutos. Los gloquidios (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 et al., 2001).

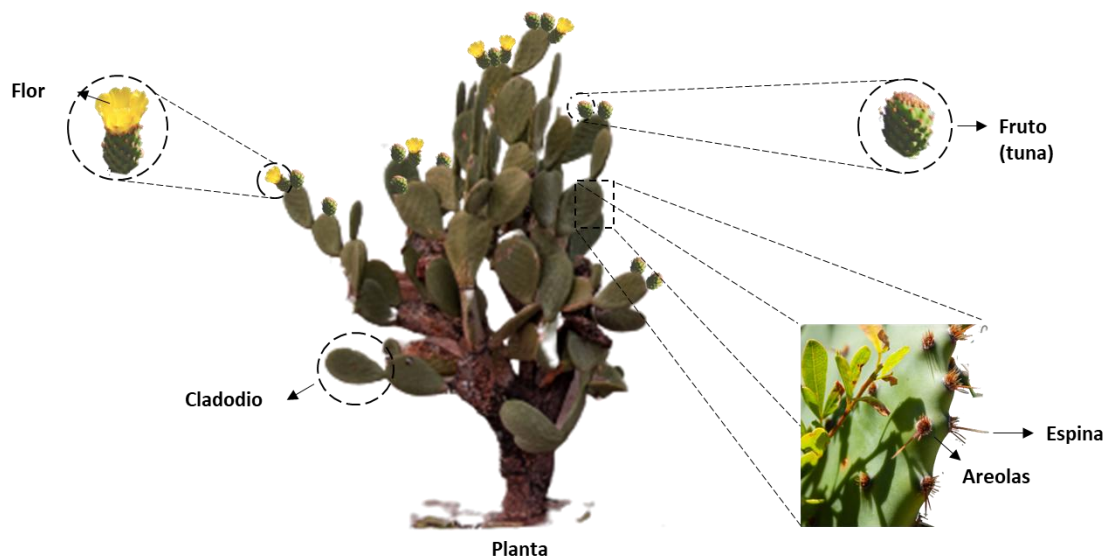


Figura 9. Partes de la planta de *O. ficus-indica*.

1.3 PRINCIPALES BIOPRODUCTOS POTENCIALMENTE OBTENIDOS DE *OPUNTIA*

Si bien la utilización de los cultivos de *Opuntia* intensivos se basa en la producción de nopal verdura, tuna, nopal forrajero y el procesamiento de estos, según el estudio de Bravo-Vinaja y Mendez-Gallegos (2016) en los últimos años el interés de investigación para esta planta se enfoca en las propiedades funcionales y actividades biológicas de ingredientes activos presentes en *Opuntia*; además, concluye que la información contenida en esa revisión bibliográfica

puede ayudar a la toma de decisiones y estrategias tanto en el área científica como en la tecnológica, sobre todo en los países donde esta especie es importante.

Siguiendo esta línea de datos, en ese trabajo se reunieron las palabras clave utilizadas en artículos científicos entre 2006 y 2015. Los resultados demostraron que el estudio de antioxidantes, betalaínas, mucilago, polisacáridos, flavonoides, fenólicos, pigmentos, polifenólicos y glicósidos son de los que más se tienen presentes. Debido a esto, se pudo definir la primera parte del trabajo que se enfoca en la obtención de bioproductos por medio de extracción con solventes, principalmente compuestos fenólicos y flavonoides, y de igual manera los polisacáridos.

1.3.1 Antioxidantes

Los antioxidantes son un sistema de defensa dentro del cuerpo que lo protege del daño de las especies reactivas de oxígeno, las cuales se producen con normalidad durante varios procesos fisiológicos. Existen tanto antioxidantes que se forman dentro del cuerpo (llamados endógenos) y antioxidantes que se obtienen a partir de la comida que se consume (exógenos).

En la actualidad, se ha recurrido a investigar nuevas formas de obtención de antioxidantes para consumo en alimentos debido a que la seguridad de los antioxidantes sintéticos se ha puesto a prueba, mostrando ser alérgicos, carcinogénico, provocan náusea y anormalidades en el ADN y esperma (Wojcik et al., 2010). Este nuevo enfoque se trata de encontrar fuentes naturales de antioxidantes que sean económicos y más cercanos a la naturaleza.

Los flavonoides son metabolitos secundarios de plantas que tienen una estructura polifenólica (Figura 10). Poseen misceláneos efectos positivos bioquímicos y antioxidantes asociados con varias enfermedades degenerativas como: cáncer, Alzheimer, aterosclerosis, entre otras.

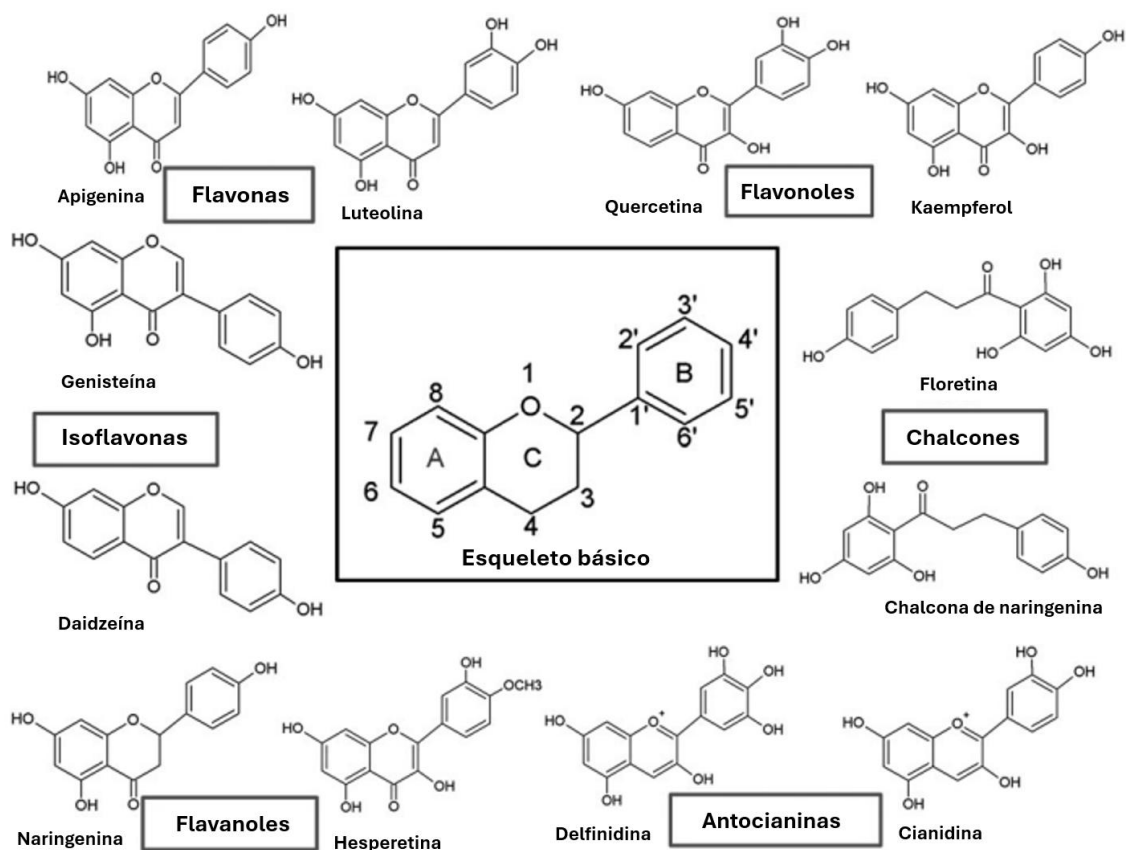


Figura 10. Estructura básica de los flavonoides y sus clasificaciones. Modificado de Panche et al. (2016).

Los flavonoides son parte importante de las actividades biológicas de las plantas, animales y las bacterias. Una de sus funciones principales es la protección contra estreses bióticos y abióticos, además de funcionar como filtros UV, como moléculas señal, compuestos alopáticos, agentes desintoxicantes y compuestos antimicrobianos (Winkel-Shirley, 2002).

La extracción de compuestos fenólicos, en específico de flavonoides, a partir de *Opuntia* ya se ha estudiado anteriormente (Tabla 3). Habitualmente se sigue una extracción secuencial con dos o tres solventes, que pueden ser metanol al 50 %, seguido de acetona al 70 % y finalmente agua. El orden difiere a lo que se describe generalmente, que es primero utilizar el solvente menos polar; se utilizan solventes ligeramente polares y más polares debido a la

naturaleza de los compuestos de interés. El extracto crudo total es aquel que está constituido por los extractos recuperados de los solventes utilizados.

Tabla 3. Métodos de extracción de compuestos antioxidantes (fenólicos) del cladodio de *Opuntia* spp.

Método de extracción	Resultados	Referencia
4 g de muestra seca + 50 mL MeOH 50 % x 2 h; 50 mL acetona 70 % x 2 h; 50 mL agua x 30 min.	CFT: 36.62 mg GAE/g FT: 4.83 mg rutina/g DPPH: 72 umol trolox/g ABTS: 778 umol trolox/g	De Santiago et al. (2021)
10 g de muestra + 50 mL MeOH 50% x 1 h; 50 mL acetona 70 % x 1 h; 50 mL agua x 15 min.	CFT: 929.8 mg GAE/mL DPPH: 0.3 mg/mL	Ávila-Nava et al. (2014)
10 g de muestra + 50 mL MeOH 50% x 1 h; 50 mL acetona 70 % x 1 h; 50 mL agua x 15 min.	CFT: 11.65 mg GAE/g DPPH: 12.24 mg/mL FRAP: 94.67 umol Fe (II)/g	Aruwa et al. (2019)
2 g de muestra + MeOH 80 % a relación sólido:líquido 1:10 por 2 h a T ambiente y 150 rpm.	CFT: 0.9 mg GAE/g	Santos-Zea et al. (2011)
500 mg de muestra + 40 mL MeOH 50 % x 1 h; 40 mL MeOH 70 % x 1 h a 25 °C.	CFT: 20.79 mg GAE/g FT: 2.13 mg rutina/g	Medina-Torres et al. (2011)
0.2 g muestra + 10 mL MeOH 50 % en baño de agua fría con ultrasonido x 30 min.	CFT: 1.5-9.2 mg GAE/g FT: 0.2-1.17 mg CE/g	Mabotja et al. (2021)
3 g muestra + 47 mL EtOH a T ambiente por 48 h en agitación mecánica.	CFT: 1.7-20 mg GAE/g FT: 0.5-9.8 mg QE/g	Guevara-Figueroa et al. (2010)

Notas: RSL, relación sólido-líquido; MeOH, metanol; EtOH, etanol; CFT, compuestos fenólicos totales; FT, flavonoides totales; DPPH, radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo; ABTS, ácido 2,2'-azino- bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico; FRAP, poder antioxidante de reducción férrica; GAE, ácido gálico equivalente; CE, catequina equivalente; QE, quercetina equivalente.

1.3.1.1 Disolventes eutécticos profundos

Estos nuevos solventes son mezclas eutécticas (del griego “buena fusión”) de sales (HBA, del inglés *hydrogen bond acceptor*) y donadores de enlaces de hidrógeno (HBD, por sus siglas en inglés), las cuales tienen un punto de fusión más bajo del que tendrían por separado. Según estudios relevantes en la última década (Ruesgas-Ramón et al., 2017), se ha demostrado que los disolventes eutécticos profundos (DES) son una buena alternativa a los solventes orgánicos tradicionales e incluso a los líquidos iónicos (IL); a parte de su baja volatilidad, baja inflamabilidad y bajo punto de fusión, los DES son más fáciles de preparar y

se componen principalmente de compuestos más amigables al ambiente que pueden provenir de materiales renovables (Xu et al., 2017).

El HBA más comúnmente utilizado es el cloruro de colina y los HBD más usados son urea, etilenglicol y glicerol (Figura 11). Los DES se pueden preparar mediante tres métodos: 1) calentamiento con agitación magnética hasta formar un líquido traslúcido o claro; 2) evaporación, en la que primero se disuelven los componentes en agua y posteriormente se lleva a un rotavapor hasta retirar toda el agua; y 3) liofilizado, de igual manera comienza con la disolución de los componentes en agua y posterior liofilización.

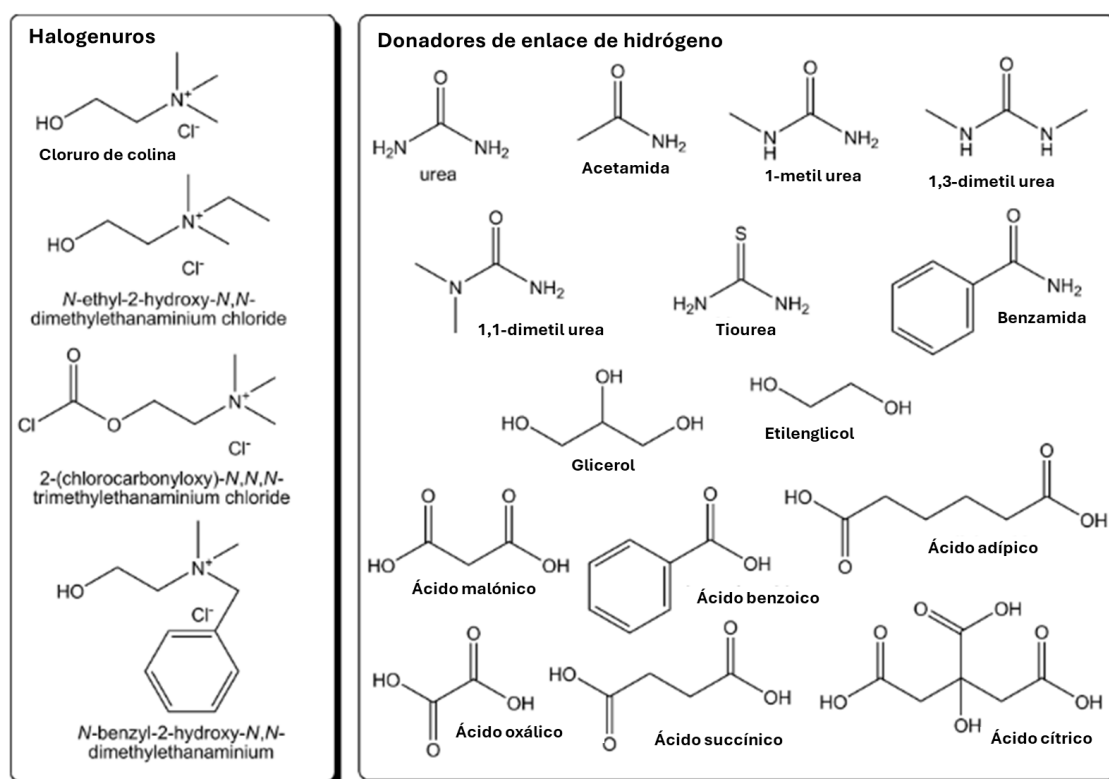


Figura 11. Aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA) y donadores de enlaces de hidrógeno (HBD) más utilizados para la preparación de disolventes eutécticos profundos (DES). Tomado de Smith et al. (2014).

Algunos de sus principales usos a lo largo de los últimos 25 años son la catálisis enzimática, purificación molecular, electroquímica, administración de fármacos, alternativa a líquidos iónicos, síntesis de zeolitas, procesos biocatalíticos, entre otros. También se encuentran en aumento los estudios de biodegradabilidad y toxicidad de los DES, biocatálisis, captura de dióxido de carbono, en biomedicina

y en extracción de compuestos de interés alimenticio y farmacológico (Paiva et al., 2014). En el caso del presente trabajo, nos enfocaremos en la extracción de flavonoides y de ácidos fenólicos.

Ünlü (2021) reportó la extracción de oleuropeína, ácido cafeico y luteolina a partir de hojas de oliva con el uso de NADES, además filtró las combinaciones de éstos para maximizar la cantidad de polifenoles, flavonoides y aumentar la actividad antiradical. También se realizó una optimización de las condiciones de extracción tomando como factores el % de NADES (disuelto en agua) y la relación sólido-líquido (RSL). Los mejores rendimientos se obtuvieron con cloruro de colina-fructosa-agua (5:2:5) extrayendo 187 mg/g de fenólicos y 12.75 mg/g de flavonoides; sin embargo, con glucosa-fructosa-agua (1:1:11) se obtuvieron mayores cantidades de oleuropeína y ácido cafeico (1630 mg/kg y 112 mg/kg, respectivamente), extraído a 75 °C, 47 % NADES y 63 mL/g por 1 h en baño ultrasónico.

Un punto en común que comparten la mayoría de los trabajos discutidos es que la extracción de estos compuestos fenólicos se favorece al añadir una cantidad de agua conocida a la solución del DES (Tabla 4). Esto permite que la viscosidad disminuya y que haya una mejor transferencia de masa para permear la materia orgánica. Por ejemplo, Ünlü et al. (2021) destacó que los rendimientos de fenólicos y flavonoides aumentaron al diluir el NADES a 50 %.

Podemos deducir entonces que, las condiciones de operación más influyentes en la extracción de compuestos fenólicos utilizando DES son: i) la disolución del DES en agua, ii) la relación líquido-sólido, iii) la temperatura y iv) la relación molar del DES.

Tabla 4. Extracción de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) utilizando solventes eutécticos profundos.

Materia prima	DES	Condiciones de operación	Resultados	Compuestos identificados	Ref
Hojas de olivo (<i>Olea europaea</i>)	Cloruro de colina-Glucosa-Agua 5:2:5	43 % DES 40 mL/g RLS 75 °C x 1 h 140 W, 37 kHz	187 mg GAE/g 12.75 mg ApE/g	Oleuropeína, ácido cafeico y luteolina	Ünlü, (2021)
Residuos de procesamiento de azafrán <i>Scutellaria baicalensis</i>	Ácido láctico-Glicina 5:1	55 % p/v DES 60 mL/g RLS 800 rpm 50 °C x 150 min	132 mg GAE/g	Kaempferol 3-O-soforosido, delfinidin 3,5-di-O-glucosido	Lakka et al. (2019)
	Ácido cítrico-prolina 1:1	60 % DES 20 mL/g RLS 40 °C x 1 h Ultrasonido x 30 min	82 mg wogonosido/g extracto	Baicalina, wogonina, wogonosido	Oomen et al. (2020)
Rizoma <i>Curcuma longa</i> L.	Mentol-ácido láctico 2:1	20 g DES/g muestra 40 °C Ultrasonido a 50 – 60 Hz x 2-3 h	13.5 mg QE/g	ND	Oliveira et al. (2021)
Vegetales, frutas y especias	Cloruro de acetilcolina-Ácido láctico 2:1	70 % DES 3 mL/g 60 °C x 45 min Ultrasonido 400 W	ND	Rutina, naringina, quercetina, hesperetina	Bajkacz & Adamek, (2018)
<i>Flos sophorae</i>	L-prolina-Glicerol 2:5	90 % DES 20 mL/g RLS 45 min Ultrasonido 330-450 W	126.7 mg QE/g 3.7 mg kae/g 13.3 mg isor/g	Quercetina, kaempferol, isorhamnetina	Nam et al. (2015)
<i>Platycladi cacumen</i>	Cloruro de colina-Ácido levulínico 1:2	90 % DES 40 mL/g RLS 30 min 50 °C Ultrasonido 200 W, 40 kHz	5 mg QE/g	Miricitrina, quercitrina, amentoflavona, hinokiflavona	Zhuang et al. (2017)
<i>Allium cepa</i> L.	Ácido glicólico-Prolina 3:1	70 % DES 30 g DES/ g muestra 50 °C x 30 min Sonicación 1 h	18.56 mg QE/L	Quercetina	Ciardi et al. (2021)

Notas: DES, solvente eutéctico profundo; RLS, relación líquido-sólido; GAE, ácido gálico equivalente; ApE, apigenina equivalente; kae, kaempferol; isor, isorhamnetina; QE, quercetina equivalente; ND, no determinado.

1.3.2 Mucílago

Aunque mucílago y pectina se usan indistintamente para referirse a los hidrocoloides tienen una diferencia composicional y biofuncional (Goycoolea & Cárdenas, 2003). El mucílago es un polisacárido constituido por moléculas de

monosacáridos como la glucosa, arabinosa, xilosa, ramnosa, galatosa y manosa, así como por ácidos urónicos unidos por enlaces glucosídicos. El mucílago se puede extraer de diferentes partes de las plantas, incluyendo rizomas, raíces y endospermos de semillas. Los mucilagos no solubles en agua se hinchan y absorben considerables cantidades de agua, pero solo los solubles en agua pueden formar soluciones viscosas. Estos compuestos se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, así como en la agricultura, la industria textil y la del papel (Ciudad-Mulero et al., 2019).

Tabla 5. Métodos de extracción de mucilago de *Opuntia* reportados en la literatura.

Biomasa	Preparación de la muestra	Proceso de extracción	Rendimiento	Referencia
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i> y <i>O. joconostle</i>	Extracción con acetona 5 mL/g x 12 h tres veces. Metanol 95 % 5 mL/g x 12 h tres veces.	Tres extracciones con agua desionizada a 80 °C por 1 h (35, 25 y 20 mL/g).	20.8 % mucilago BS	Cruz-Rubio et al. (2020)
Parénquima medular de cladodio de <i>O. spinulifera</i>	Separación manual del parénquima medular y trituración.	100 g de parénquima con 250 mL de agua destilada, 100 rpm a Tamb por 12 h; filtrar y adicionar un volumen igual de agua (tres veces). Precipitar: 100 mL del filtrado con tres volúmenes de EtOH.	2.56 % en BH de parénquima	Vargas Rodríguez et al. (2016)
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	Secado en horno con flujo de aire a 60 °C.	RSL 1/10 g/mL 25 °C por 90 min a 250 rpm Filtrar y precipitar con dos volúmenes de isopropanol por 12 h a 4 °C El precipitado se lava con EtOH y se seca a 50 °C por 24 h.	10.24 % BS	Bayar et al. (2016)
Parénquima medular de <i>O. ficus-indica</i>	El parénquima se corta en piezas pequeñas.	Agua a temperatura ambiente a relación de 1:2 v/v médula/agua por 24 h. Se filtra con una tela de nylon, se centrifuga y se precipita utilizando etanol en relación 3:1 etanol/gel. El precipitado se seca a 105 °C en un horno.	NR	Otálora et al. (2021)

Notas: BS, base seca; BH, base húmeda; NR, no reportado.

1.3.3 Pectina

La pectina es un copolímero compuesto por bloques diferenciables de heteropolisacáridos (Figura 12). Estos polisacáridos se pueden identificar como homogalacturonanos (más abundante), xilogalacturonanos, apiogalacturonanos, ramnogalacturonanos I (segundo más abundante) y ramnogalacturonanos II (Harholt et al., 2010). Estos bloques de heteropolisacáridos se comprenden de residuos de ácido galacturónico unidos por enlace $\alpha(1-4)$ y ramnosa $\alpha(1-2)$, con ramas laterales de $\beta(1-4)$ -D-galactosa o de L-arabinosa $\alpha(1-5)$. Además, algunas de las unidades carboxílicas C-6 de la columna vertebral del ácido galacturónico están esterificadas con grupos metoxilo, o existen como sal de ácido urónico. En general, el polímero de pectina contiene entre 300 y hasta unas 1000 unidades de sacáridos (150 kDa).

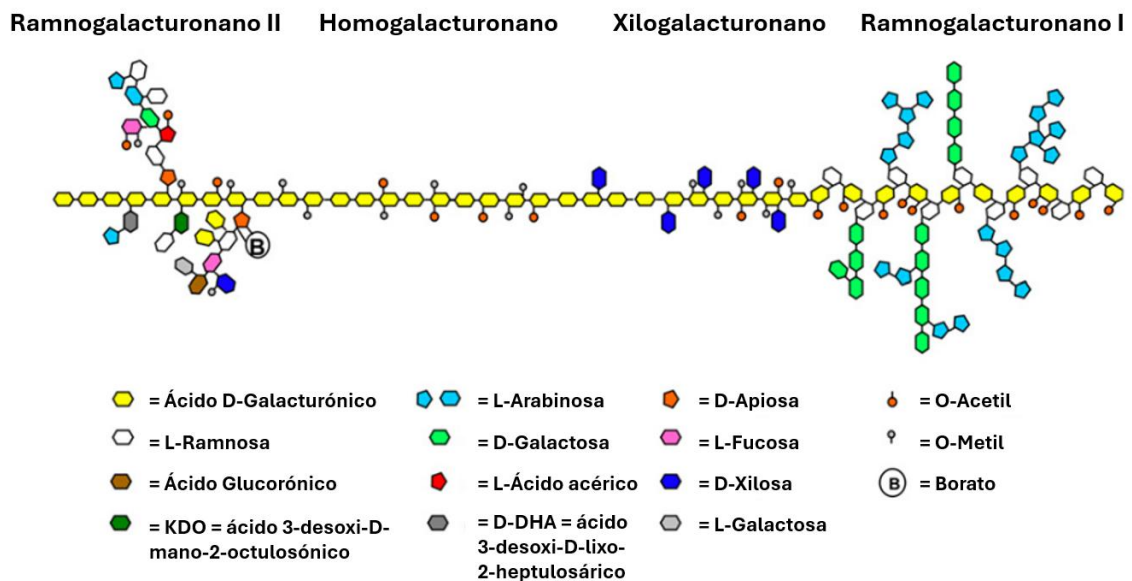


Figura 12. Estructuras básicas de la pectina. Modificado de Harholt et al. (2010).

Es el principal componente de las paredes primarias de las células vegetales no leñosas, y es abundante en la mayoría de los vegetales y frutas (Goycoolea y Cárdenas, 2003). Le confiere resistencia y flexibilidad a la pared celular, además de tener una serie de funciones biológicas fundamentales (señalización, proliferación celular, diferenciación y adhesión celular). Por ejemplo, las regiones ricas en ramnosa de las cadenas de pectina mejoran las interacciones moleculares entre las células y el polisacárido, mientras que las regiones ricas en

galactosa ramificada promueven la formación de estructuras enredadas (Ciriminna et al., 2015).

Actualmente la pectina se obtiene de cáscaras de cítricos, pulpa de manzana y remolacha azucarera; estas se secan hasta tener menos del 10 % de humedad, esto para evitar la degradación de la materia previo a su extracción. El procedimiento se lleva a cabo mediante hidrólisis ácida con ácidos minerales, comúnmente ácido clorhídrico, nítrico o sulfúrico, a 50-100 °C y pH 2-3. Después se filtra, se concentra y se precipita con alcohol isopropílico; éste se recupera por destilación y el residuo sólido se seca para obtener la pectina. En la Tabla 6 se enlistan trabajos de investigación enfocados en la obtención de pectina a partir de *Opuntia* como materia prima.

Tabla 6. Extracción de pectina a partir de *Opuntia* en la literatura.

Biomasa	Preparación de la muestra	Proceso de extracción	Rendimiento	Referencia
Tuna de <i>O. ficus-indica</i>	Extracción de grasas con tolueno-etanol 38-62 por 24 h. Extracción de mucilago con agua a temperatura ambiente.	Extracción secuencial con agua a 60 °C y con una solución acuosa de EDTA 0.5 % a 60 °C. Precipitado: 4 volúmenes EtOH.	PSA: 6.1 % BS	Habibi et al. (2004)
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	Secado en horno con flujo de aire a 60 °C. Extracción de mucilago con agua a 25 °C.	RLS 15 mL/g pH 2.8 con ácido clorhídrico 90 °C en baño de agua por 2 h Precipitado: 2 volúmenes de isopropanol	6.13 % BS	Bayar et al. (2016)
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	Secado a temperatura ambiente.	<i>Pectinas solubles en agua:</i> 10 % p/v a 60 °C, 500 rpm x 1.5 h; neutralizar con NaOH 5 N y precipitar con EtOH <i>Pectinas solubles quelantes:</i> residuo + EDTA 0.5 %, 80 °C x 1.5 h; neutralizar, luego precipitar con EtOH <i>Pectinas ácido-solubles:</i> segundo residuo + HCl 0.05 M a 50 °C x 1 h	PSA: 5.75 % PSQ: 0.21 % PAS: 0.11 % BS	Lefsih et al. (2016)
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	Secado en horno con flujo de aire a 60 °C. Extracción de mucilago con agua a 25 °C por 90 min	Extracción asistida por ultrasonido. RLS 30 mL/g pH 1.5 70 °C por 70 min.	18.14 % BS	Bayar et al. (2017)

Notas: PSA, pectinas solubles en agua; PSQ, pectinas solubles quelantes; PAS, pectinas ácido-solubles; RLS, relación líquido-sólido

1.3.4 Biogás

La producción de biogás utilizando distintas especies de *Opuntia* como materia prima ha sido investigada con anterioridad (Tabla 7), llevando incluso a una patente mexicana para el proceso y equipo necesario para la digestión anaerobia, en la cual se utilizan cactáceas diluidas del 3 al 5 % en agua (Aké Madera, 2015).

Opuntia comenzó a tomar aún más relevancia en el área de la biotecnología cuando se evaluó la producción de metano mediante digestión anaerobia de diferentes concentraciones de cladodios de *O. ficus-indica* y de estiércol de vaca (Jigar et al., 2011). El mayor rendimiento total de biogás fue de 14.2 L, utilizando 75 % de estiércol de vaca y 25 % de pencas de *Opuntia* en un reactor batch de 2.8 L, y el porcentaje de metano fue también el más alto con 69 %. 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.

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 *O. heliabravoana* Scheinvar con el fin de producir biogás y biofertilizante en reactores anaeróbicos. Se utilizó estiércol de conejo con agua en relación 1:3 v/v como inóculo. 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. Usaron un reactor control y un reactor con ajuste de C/N de 1.54 L de volumen de trabajo y se alimentaron cada día con 2.31 kg-SV/(m³d) y tiempo de retención hidráulico de 36, durante 85 días; estos produjeron 221 y 257 mL/g-SV de biogás con contenido de metano de 61 y 65 %, respectivamente.

Otro tipo de estudio que se encontró fue el efecto de los pretratamientos térmicos, alcalinos y acídicos en la composición química y el rendimiento de metano de la biomasa de *O. ficus-indica* (Calabrò et al., 2018). Los rendimientos de metano oscilaron entre 289 y 604 NmL/gSV. 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 (Valenti et al., 2018). Este es el caso de 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 Nm³CH₄/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 CO₂ 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. Debido a esto, en un artículo combinaron la biomasa de microalgas de *Scenedesmus* y los cladodios de *O. maxima* para optimizar la producción de biometano por digestión anaerobia. Al combinar 75 % (SV) de nopal y 25 % (SV) de biomasa de microalga se obtuvo el mayor rendimiento de metano (Ramos-Suárez et al., 2014).

Tabla 7. Producción de metano en lote utilizando *Opuntia*.

Sustrato	Inóculo	Condiciones de operación	Resultados	Referencias
<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 – 604 NmL/g SV	Calabrò et al. (2018)
<i>O. sp</i>	Efluente de un digestor anaerobio comercial	Reactor: 1.5 L RIS: 2 T= 38 °C,	249.9 - 260.1 Nm ³ /tSV	Valenti et al. (2018)
<i>O. maxima</i>	Efluente anaerobio de PTAR	Reactor: 1 L RIS: 2 T= 37 °C, 40 d	360 L/kg SV	Ramos-Suárez et al. (2014)
<i>O. ficus-indica</i>	Lodos anaerobios	Reactor: 150 mL RIS: 2 T= 39°C, 120 rpm, 40 d	300.8 mL/g SV	Lueangwattana pong et al. (2020)
<i>O. ficus-indica</i>	Rumen de vaca	Reactor: 250 mL T= 31 °C 30 d	315 – 702 mL/g SV	Myovela et al. (2019)

Notas: RIS, relación inóculo sustrato; T, temperatura; SV, sólidos volátiles

Además de artículos basados en la experimentación en laboratorio, se encontraron estudios que analizaban la viabilidad económica de la producción de

biogás a partir de la digestión de nopal y estiércol, tomando en cuenta la producción de electricidad y la obtención de metano resultante de este proceso (Ramírez-Arpide et al., 2019). Otro estudio más del mismo autor se enfocaba en el análisis de ciclo de vida de la producción de biogás a partir de las pencas de nopal y de estiércol de vaca; evaluaron los impactos ambientales de un escenario base y tres escenarios alternativos con diferentes sistemas agrícolas y estrategias de almacenamiento del digestato (Ramírez-Arpide et al., 2018). Ellos se enfocaron primordialmente en las emisiones directas del cultivo en el campo, utilizando un sistema orgánico y uno convencional.

Por otro lado, los experimentos de producción de biohidrógeno con *Opuntia* son aún escasos. De manera específica se ha estudiado la producción fermentativa de hidrógeno en reactores por lote de lecho empacado para evaluar factores ambientales en el rendimiento de la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales del procesamiento de lácteos (Moreno-Dávila et al., 2011). Como sustrato utilizaron tallos secos de *O. imbricata* junto a un cultivo mixto pretratado para la formación de biopelículas.

Recientemente en nuestro grupo de investigación (Carrillo-Verástegui et al., 2022) se utilizaron tres tipos de *Opuntia* para su evaluación como sustrato de fermentación oscura para la producción de biohidrógeno; además, se evaluaron la RIS y el uso de sólidos de *Opuntia* extraídos. La mejor producción de biohidrógeno (438 mL H₂) se obtuvo con *O. ficus-indica* var. Copena utilizando una RIS de 0.2. Sin embargo, este trabajo todavía tiene áreas de oportunidad con el fin de mejorar la producción de hidrógeno, como el ajuste de sólidos y su acoplamiento a un sistema de digestión anaerobia del sólido digerido.

1.4 ANTECEDENTES

Anteriormente en el grupo de trabajo se analizó un modelo de biorrefinería (Figura 13) para nopal en el cual se evaluaron dos procesos principales: la extracción de compuestos antioxidantes y la producción de biocombustibles (Carrillo-Verástegui, 2021). Los resultados más relevantes indican que se pueden obtener más de un compuesto antioxidante en la etapa de extracción y, posteriormente se puede utilizar el sólido resultante (residuo) para un uso posterior en digestión anaerobia sin disminuir en demasía el rendimiento de biometano (aproximadamente un 5 %). Esto da lugar a nuevas propuestas de biorrefinería de nopal, en las cuáles más productos de valor agregado se “refinan” de la biomasa de *O. ficus-indica*; se pueden obtener antioxidantes e hidrocoloides, mejorar la producción de hidrógeno y acoplar este proceso a uno de digestión anaerobia para maximizar la producción de biocombustibles gaseosos, además de aprovechar corrientes secundarias de “desecho” o de “residuos” para obtener otros productos de valor agregado.

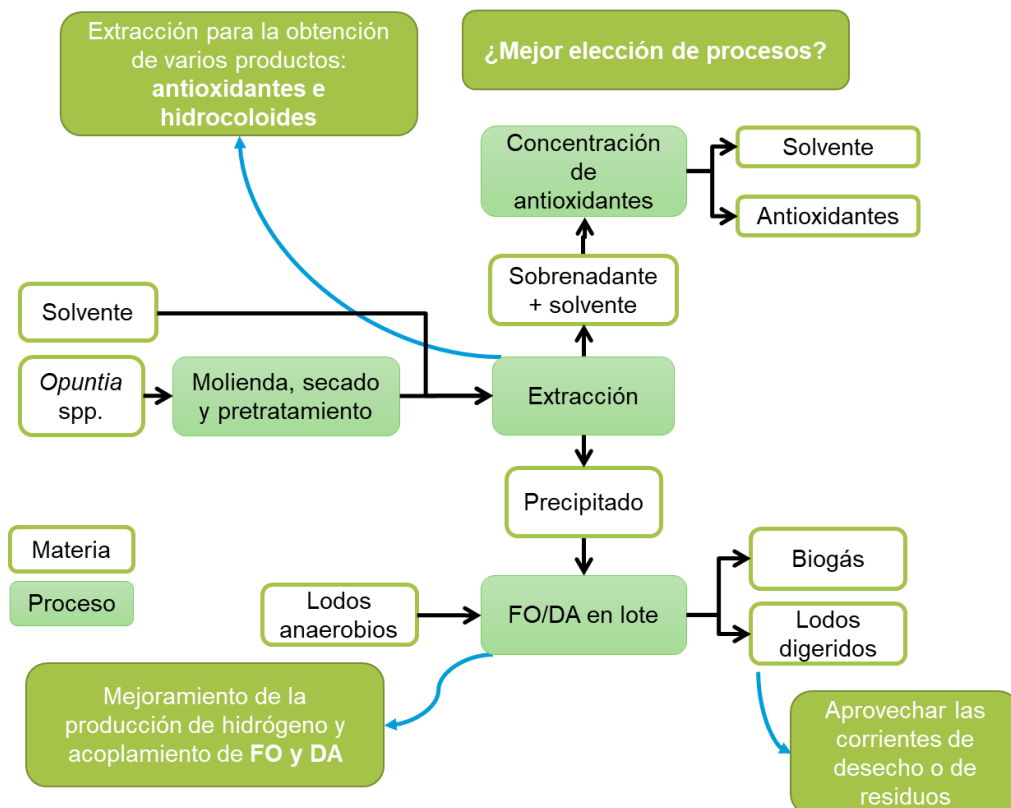


Figura 13. Modelo de biorrefinería de *Opuntia* spp. en Carrillo-Verástegui (2021).

Tabla 8. Antecedentes del aprovechamiento de *O. ficus-indica* para la obtención de productos de valor agregado.

Referencia	Alcance del trabajo
Bayar et al. (2016)	Extracción de polisacáridos a partir de cladodios de <i>O. ficus-indica</i> . Obtención de mucilago y pectina para su uso como suplemento alimenticio o para la industria farmacéutica.
De Santiago et al. (2021)	Métodos de extracción de biocompuestos para cladodios de <i>O. ficus-indica</i> : agua, etanol 80 %, etanol y extracción sucesiva con metanol 50 %, acetona 70 % y agua.
Calabrò et al. (2018)	Potencial de biometano de <i>O. ficus-indica</i> y el efecto de pretratamientos térmicos, alcalinos y acídicos.
Volpe et al. (2018)	Producción de carbón a partir de la carbonización hidrotérmica de <i>O. ficus-indica</i> . Enfoque a combustible .
Ramírez-Arpide et al. (2018)	Análisis de ciclo de vida para la producción de biogás mediante la co-digestión de cladodios de nopal con estiércol de vaca.
Ávila-Lara (2019)	Pretratamientos químicos y enzimáticos de <i>O. ficus-indica</i> y Agave salmiana para producción de ácido succínico . Recuperación de oxalato de calcio
Margain Sato Matsumoto (2019)	Potencial de <i>O. ficus-indica</i> como biomasa capaz de suministrar múltiples productos: alimentos, productos de interés farmacéutico. Valorización integral de la planta; modelo de biorrefinería .

Estos productos que se mencionan se han obtenido independientemente en la literatura (Tabla 8). Por ejemplo, Bayar et al. (2016) obtuvieron mucilago, pectina y una fracción de mucilago péptico a partir de cladodios de *O. ficus-indica*, los cuales concluyeron que pueden utilizarse como surfactante y antioxidantes naturales para suplemento alimenticio o para su uso en la industria farmacéutica. Por otro lado, Calabrò et al. (2018) evaluó el potencial de biometano de biomasa de *O. ficus-indica* pretratada químicamente; incluso utilizando los cladodios sin pretratamiento, obtuvieron 420 NmL CH₄/g SV, lo cual ya es mayor que el rendimiento teórico de metano. Incluso se han evaluado los impactos ambientales de la producción de biogás con nopal con estiércol de vaca (Ramírez-Arpide et al., 2018); el indicador del potencial de calentamiento global de la producción de biogás utilizando nopal fue menor que para los reportados para otros sustratos similares como el maíz, desperdicios de cocina, residuos de la industria de alimentos, remolacha azucarera y sus hojas, entre otros. Volpe et

al. (2018) sometieron a carbonización hidrotermal los cladodios de *O. ficus-indica* y evaluaron como la temperatura, el tiempo de reacción y la relación biomasa-agua utilizada en la reacción afectaba las propiedades del carbón obtenido. Margain Sato Matsumoto (2019) en su trabajo concluye que las biorrefinerías de nopal son viables ya que plantea el aprovechamiento totalmente integral de esta planta, comenzando con sus productos principales de alimento (cladodios y tunas), el uso de los residuos de nopal para digestión anaerobia y la recirculación de los lodos de esta etapa previa para cumplir su ciclo como fertilizante para el propio cultivo; también demuestra otros productos que pueden ser importantes dependiendo del mercado local donde se desarrolle el proyecto. Previamente, en el grupo de trabajo Ávila-Lara (2019) desarrolló la producción de ácido succínico utilizando cladodios de *O. ficus-indica* adicionando pretratamientos ácidos y enzimáticos. Como se puede resumir en los antecedentes, mucho se ha investigado de los métodos de aprovechamiento del nopal; sin embargo, ninguno ha reunido estos métodos en un proceso operativo para su máximo aprovechamiento, lo que se pretende lograr con este trabajo.

2 APORTACIÓN CIENTÍFICA

El nopal es una planta versátil y con gran potencial de valorización; sus principales ventajas son el uso eficiente del agua, la subsistencia en condiciones adversas, la composición química y la alta disponibilidad en tierras áridas y semiáridas. *O. ficus-indica* se caracteriza por su alto contenido de fibra y compuestos bioactivos, lo que hace esta planta un sustrato con potencial para la producción de biocombustibles y otros productos de valor agregado para el área farmacéutica, cosmética y de alimentos.

Este proyecto explora nuevas rutas para el aprovechamiento del nopal con el objetivo de valorizar cada una de las corrientes residuales de los procesos involucrados. El enfoque de esta biorrefinería es hacia los compuestos antioxidantes, hidrocoloides y bioenergéticos.

Se realizará una evaluación de los solventes orgánicos más utilizados y su concentración para la extracción de compuestos fenólicos a partir de *O. ficus-indica*. Se utilizarán por primera vez en el grupo de trabajo los disolventes eutécticos profundos para la extracción de compuestos fenólicos a partir de *Opuntia*. Se obtendrán hidrocoloides a partir de los residuos después de la extracción con solventes orgánicos. Se evaluará el procedimiento secuencial de fermentación oscura y digestión anaerobia como estrategia alternativa al uso de *Opuntia* fresco, además de evaluar la refermentación oscura en lote.

Con el modelo de biorrefinería propuesto se buscará alcanzar rendimientos similares a los de literatura para la extracción de compuestos antioxidantes e hidrocoloides con uso potencial en las industrias farmacéutica, de alimentos y cosmética, además de generar biocombustibles mediante la digestión secuencial de los residuos sólidos de la extracción.

Este proyecto se realizó a nivel laboratorio con el fin de evaluar en términos de rendimiento el potencial de aprovechamiento de *O. ficus-indica* mediante procesos biotecnológicos en un modelo de biorrefinería, integrando un ciclo de bioeconomía circular.

3 HIPÓTESIS

Existe un escenario de biorrefinería para la producción de antioxidantes, hidrocoloides, biohidrógeno y biometano de *O. ficus-indica* con un índice de transformación de sustrato equiparable o superior al existente para la sola producción de metano.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar un modelo de biorrefinería para la producción de compuestos fenólicos antioxidantes, hidrocoloides, materiales adsorbentes y bioenergéticos (biohidrógeno y biometano) a partir de *O. ficus-indica*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer **antioxidantes** mediante extracción secuencial con **solventes orgánicos** y mediante extracción con **disolventes eutécticos profundos**.
- Extraer **hidrocoloides** a partir de la **biomasa cruda** y de la **biomasa residual** de la extracción de compuestos fenólicos.
- **Integrar** los procesos de producción secuencial de hidrógeno y metano para *Opuntia* fresca.
- Evaluar **escenarios** de biorrefinería a partir de *O. ficus-indica* utilizando indicadores que consideren la eficiencia de procesos.

5 METODOLOGÍA

5.1 PLAN DE TRABAJO

El proyecto consta de tres etapas (Figura 14), cada una enfocada a la obtención de productos o evaluación de la biorrefinería a partir de cladodios de *O. ficus-indica*. La primera etapa se basa en procesos de acondicionamiento de la biomasa, que consisten en la extracción secuencial de compuestos antioxidantes y pectina mediante el uso de solventes y métodos convencionales y verdes, evaluando sus propiedades físicas, químicas y biológicas. En la segunda etapa, se analizó la producción secuencial de hidrógeno y metano por medio de un arreglo de biorreactores en lote-semicontinuo. En la tercera etapa, se consideró la evaluación de escenarios de biorrefinería basados en la obtención de los bioproductos y biocombustibles.

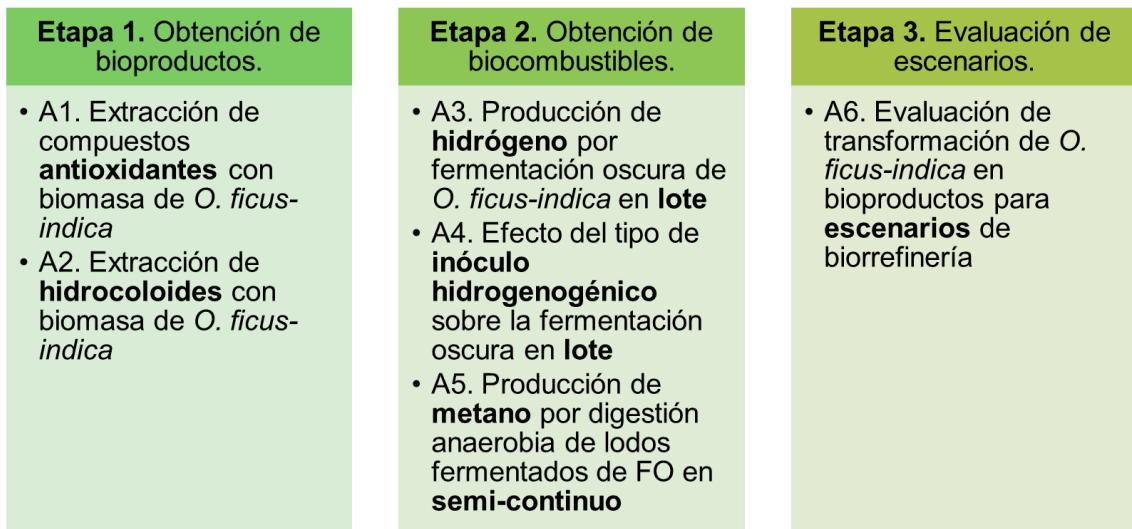


Figura 14. Plan de trabajo.

5.2 ACTIVIDAD 1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE LA BIOMASA DE *O. FICUS-INDICA*

5.2.1 Propósito

Comparar el rendimiento de compuestos fenólicos en la extracción con dos grupos de solventes: extracción convencional con solventes orgánicos y extracción con disolventes eutécticos profundos.

5.2.2 Diseño experimental

La actividad se dividió en dos partes. La actividad 1A comprende la extracción de compuestos antioxidantes por maceración de *O. ficus-indica* con tres diferentes solventes orgánicos a tres concentraciones. Posteriormente, la actividad 1B consiste en la preparación de disolventes eutécticos profundos (DES) y la extracción de biocompuestos utilizando estos disolventes, evaluando los cuatro DES obtenidos a partir de datos de la literatura.

5.2.3 Obtención y caracterización de cladodios de *O. ficus-indica*

Los cladodios de *Opuntia ficus-indica* var. Atlixco se recolectaron de un campo (N19°33'37" O101°25'32") de cultivo al amanecer (entre 7 y 8 a.m.). Se seleccionaron pencas de 6 meses a la misma altura de la planta, de color y tamaño uniforme (20-25 cm), sin imperfecciones, que no hayan dado fruto. Se tomaron dos grupos de 5 plantas. Se recolectaron dos cladodios de la primera, tercera y quinta planta de cada grupo; después se recolectaron tres cladodios aleatoriamente de entre las cinco plantas del grupo.

Se lavaron y desinfectaron con cloro (Cloralex, 5 % de hipoclorito de sodio) y etanol al 80 %. Se le retiraron las espinas y gloquidios manualmente con cuchillo, se cortaron en cubos de aproximadamente 1 cm, se licuaron y se dejó en un refractario hasta sequedad en un horno de convección forzada con recirculación a 60 °C para evitar cambios en su composición química. Los cladodios secos se molieron y tamizaron a un tamaño de partícula de 250 µm; se guardaron

herméticamente a temperatura ambiente hasta su uso y se caracterizaron conforme a los siguientes métodos en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros para la caracterización de *O. ficus-indica*.

Parámetro	Método	Referencia
Humedad y cenizas	Gravimétrico	(APHA-AWWA-WEF, 2017)
pH	Potenciométrico	(Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1992)
Celulosa, hemicelulosa y lignina	Gravimétrico	(AOAC International, 2003)
Nitrógeno total	Digestión y titulación	(AOAC International, 2003)
Análisis elemental		(Ávila-Lara, 2019)
Metales pesados (K, Na, Ca, Fe, Mn, Mg, Zn, Ni, Cu, Pb, Cd, Cr)	Absorción atómica/ICP	(AOAC International, 2003)

5.2.4 Actividad 1A. Extracción de compuestos fenólicos a partir de *O. ficus-indica* mediante solventes orgánicos

5.2.4.1 Propósito

Evaluar el rendimiento de compuestos fenólicos en la extracción con solventes orgánicos habituales a partir de los cladodios de *O. ficus-indica*.

5.2.4.2 Diseño experimental

La biomasa seca de los cladodios de *Opuntia* se pesó en vasos de precipitado y, a continuación, se sometió a extracción mediante maceración con un disolvente orgánico en una proporción de biomasa-disolvente de 1:10 (g/mL) durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C) y agitación orbital de 150 rpm. Posteriormente, se centrifugó por 15 min a 10,000 rpm y el sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 1. El diseño experimental fue de dos factores con tres niveles: Se evaluaron tres solventes orgánicos (acetona, metanol y etanol) a tres concentraciones (50, 80 y 100 % v/v) (Figura 15) y los ensayos se realizaron por duplicado.

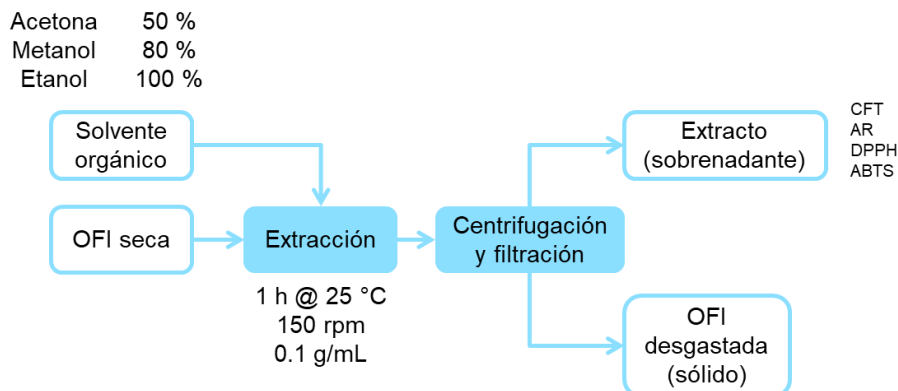


Figura 15. Diseño experimental para la evaluación de la extracción de compuestos antioxidantes a partir de *O. ficus-indica* mediante solventes orgánicos.

Notas: OFI, *O. ficus-indica*; CFT, compuestos fenólicos totales; AR, azúcares reductores; DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; ABTS, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

5.2.4.3 Programa de seguimiento y análisis

Los ensayos de extracción se llevarán a cabo por duplicado. El sobrenadante de cada extracto (nombrados con la primer letra del solvente y seguido del porcentaje en volumen, e.g. A50, E80, etc.) se caracterizará según lo estipulado en la Tabla 10.

Tabla 10. Parámetros para la caracterización de los extractos fenólicos.

Parámetro	Técnica	Referencia
Compuestos fenólicos totales	Colorimétrica (Folin-Ciocalteu)	(Kechegar et al., 2017)
Flavonoides totales	Colorimétrica (AlCl ₃)	(Mabotja et al., 2021)
Actividad antioxidante	DPPH, ABTS	(Bobo-García et al., 2015) (De Santiago et al., 2021)
Perfil de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides)	HPLC-DAD	-

5.2.4.4 Procedimientos y técnicas

5.2.4.4.1 Compuestos fenólicos totales (Folin-Ciocalteu)

La cuantificación de compuestos fenólicos se llevó a cabo modificando el método colorimétrico reportado por Kechegar et al., (2017). La muestra se diluye apropiadamente en agua destilada y se toma una alícuota de 125 µL. Posteriormente se añaden 500 µL de agua destilada y 125 µL del reactivo Folin-Ciocalteu; se agita previo a la adición de 1 mL de Na₂CO₃ 7 % y 1 mL de agua

destilada. Finalmente, se agita en vortex y se deja reaccionar por 90 min a temperatura ambiente en un lugar oscuro. La medición se lleva a cabo a 760 nm, el estándar utilizado es ácido gálico (curva de calibración: 4–200 mg GAE/L) y los resultados se expresan en mg de ácido gálico equivalente por gramo de muestra en base seca (mg GAE/g).

5.2.4.4.2 Flavonoides totales

Este método se basó en el realizado por Mabotja et al. (2021). Se utilizaron 250 µL de muestra diluida en 1.6 mL de agua destilada en un tubo de ensayo; posteriormente se añaden 75 µL de nitrito de sodio al 5 % p/v y se deja reaccionar por 5 min. Luego se añaden 75 µL de cloruro de aluminio al 10 % p/v y se deja reposar por otros 5 min. Finalmente, se añaden 500 µL de NaOH 1 M y se deja reaccionar por 30 min. La absorbancia de las muestras se lee a 510 nm y la curva de calibración se realiza con quercetina.

5.2.4.4.3 Actividad antioxidante DPPH

Se llevó a cabo mediante el método en microplaca de Bobo-García et al. (2015). Una alícuota de 20 µL de muestra diluida apropiadamente se agrega a 180 µL de una solución de DPPH (0.15 mM en metanol; absorbancia de aproximadamente 0.7 a 515 nm). Se deja reaccionar por 40 min a temperatura ambiente en oscuridad y la absorbancia se mide a 515 nm. El blanco es de 20 µL de agua con 180 µL de metanol y el control es de 20 µL de agua en 180 µL de solución DPPH después de 40 min. El % de captación de DPPH se calcula de la siguiente manera:

$$\% DPPH = 100 \left[1 - \frac{A_{muestra} - A_{blanco}}{A_{control} - A_{blanco}} \right] \quad (1)$$

5.2.4.4.4 Actividad antioxidante ABTS

El método por seguir es el reportado por De Santiago et al. (2021). Para generar la solución de radicales libres ABTS•+, se combina la solución de persulfato de potasio 0.36 mM con una solución de ABTS 0.9 mM preparada en buffer salino

de fosfatos (PBS, pH 7.4); esta solución se guarda en oscuridad por 12 h. Antes de su uso, la solución ABTS•+ se ajusta con PBS hasta una absorbancia de 0.7 a 734 nm.

Se toma una alícuota de 100 µL del extracto diluido en agua desmineralizada y se añade a 2 mL de la solución de ABTS•+. Después de 18 min de reacción, se mide la absorbancia a 734 nm.

5.2.4.4.5 Perfil de compuestos fenólicos por HPLC-DAD

Previo a la medición por HPLC, los extractos se hidrolizaron con HCl 3.2 M por 30 min en baño maría (85 °C) para liberar los flavonoides de su glicósido (Santos-Zea et al., 2011); por cada mg de extracto seco, se utilizaron 100 µL de ácido. A continuación, al extracto hidrolizado se le realizó una limpieza utilizando un cartucho para separación en fase sólida (SPE) HyperSep C-18 de 100 mg. El procedimiento comenzó con el lavado del cartucho con 1 mL de MeOH y su acondicionamiento con 1 mL de agua desionizada. A continuación, se cargó la muestra hidrolizada diluida (volumen del hidrolizado más 1 mL de agua desionizada); posteriormente, se lavó la muestra con 1 mL de MeOH 25 % en agua desionizada y finalmente, los compuestos retenidos en la fase sólida se eluyeron con 1 mL de MeOH. Se llevó a sequedad y se resuspendió a 1 mg de peso seco del extracto hidrolizado por mL de fase móvil.

La cuantificación de flavonoides se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos Waters equipado con una bomba binaria (Modelo 1525) con degasificador, un automuestreador (Modelo 717plus), un detector con arreglo de fotodiodos (PDA, Modelo 2996) y software Empower 3. La columna utilizada fue una Phenomenex C-18 (100 Å, 5 µm) con una precolumna C-18 (4 x 3 mm) y el volumen de inyección de 20 µL. La fase móvil fue ácido fórmico 0.1 % (A) y metanol (B) a 0.5 mL/min. El método instrumental (Tabla 11) comenzó con 30 % de A; a los 15 min, 60 % de A; a los 20 min, 63 % A; se mantuvo a 63 % de A hasta los 30 min; a los 32 min, 70 % de A y se mantuvo así hasta los 35 min.

Tabla 11. Método instrumental (gradiente) para la identificación de flavonoides de extractos hidrolizados y lavados de *O. ficus-indica*.

Tiempo	% A	% B
0	30	70
15	60	40
20	63	37
30	63	37
32	70	30
35	70	30

La detección de los componentes se lleva a cabo a 330 nm para quercetina, kaempferol e isorhamnetina. Se realizaron curvas de calibración, a cinco niveles por triplicado, de cada uno de los compuestos a cuantificar.

5.2.5 Actividad 1B. Extracción de compuestos fenólicos a partir de *O. ficus-indica* utilizando disolventes eutécticos profundos (DES)

5.2.5.1 Preparación de DES

Para la preparación de DES para la extracción de compuestos fenólicos de *O. ficus-indica* se consideró a aquellos con mejores rendimientos para diferentes flavonoides de una variedad de plantas (Tabla 4). De acuerdo con lo reportado por Nam et al. (2015), estos DES se prepararon mezclando sus componentes HBA, HBD y agua a las relaciones molares definidas en la Tabla 12, en un vaso de precipitado a 60 °C por 0.5–2 h, hasta formar un líquido homogéneo. Para todos los casos, la relación molar del agua es el 20 % en peso del DES correspondiente.

Tabla 12. Solventes eutécticos profundos para evaluar en la extracción de compuestos fenólicos.

DES	HBA	HBD	Relación molar (HBA:HBD:H ₂ O)
ChCl-X	Cloruro de colina	Xilitol	5:2:15
ChCl-G	Cloruro de colina	Glicerol	1:1:3.5
Pro-X	L-Prolina	Xilitol	2:3:10.5
Pro-G	L-Prolina	Glicerol	2:5:10.5

Para la extracción de flavonoides a partir de biomasa seca de *O. ficus-indica* se utilizó una relación sólido-líquido de 1:20, es decir, se mezclaron en un tubo

hermético 250 mg de nopal seco con 5 mL del DES apropiadamente preparado y diluido al 80 %. Los tubos con la mezcla se colocaron en una plancha de calentamiento a 70 °C por una hora. Posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se trasvasaron a tubos de plástico para centrifugar la mezcla a 10,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se recuperó con micropipeta y las muestras se guardaron en refrigeración hasta su análisis.

5.2.5.2 Programa de seguimiento y análisis

El análisis correspondiente del extracto será el mismo que para la sección 5.2.4.3.

5.2.5.3 Procedimientos y técnicas

Las técnicas se describen en la sección 5.2.4.4, con un ligero cambio en la hidrólisis previo a la cuantificación por HPLC. La hidrólisis de los extractos de DES se diluyeron 1:1 con agua destilada (287 µL DES + 287 µL agua) y posteriormente se agregaron 600 µL de HCl 3.2 M en un frasco hermético para llevar a cabo la reacción de hidrólisis en baño maría a 85 °C por 30 min.

5.3 ACTIVIDAD 2. EXTRACCIÓN DE HIDROCOLOIDES CON BIOMASA DE *O. FICUS-INDICA*

5.3.1 Propósito

Comparar el rendimiento en la obtención de hidrocoloides a partir de biomasa cruda y biomasa residual de *O. ficus-indica*, empleando dos métodos de extracción: uno a temperatura ambiente y otro con calentamiento. Asimismo, evaluar la viabilidad de integrar los procesos de obtención de antioxidantes e hidrocoloides, analizando tanto realización por separado como de su manera secuencial, utilizando los residuos de extracción de antioxidantes como materia prima para la extracción de hidrocoloides.

5.3.2 Diseño experimental

Esta actividad se dividió en dos etapas: en la primera se evaluó la extracción de hidrocoloides a partir de *O. ficus-indica* utilizando agua a dos temperaturas diferentes para calcular la cantidad de heteropolisacárido recuperado; mientras que, en la segunda parte, se realizó la misma extracción de hidrocoloides, esta vez obtenidos de una biomasa residual mediante un tren de extracciones con solventes orgánicos (acetona y metanol).

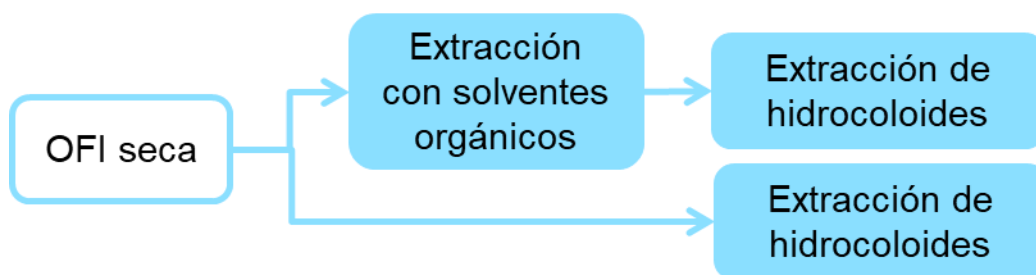


Figura 16. Etapas de la actividad 2 para la extracción de hidrocoloides con *O. ficus-indica*.

5.3.3 Procedimientos y técnicas

5.3.3.1 Extracción de hidrocoloides con biomasa cruda de *O. ficus-indica*

Para la extracción de hidrocoloides (Figura 17) a temperatura ambiente, se colocaron 4 g de cladodios secos en un matraz Erlenmeyer con 40 mL de agua destilada a 25 °C y se dejó por 2 h en agitación constante a 200 rpm en una plancha con agitación magnética. En cuanto a la extracción con calentamiento, previo a la extracción, se calentó el agua destilada a 80 °C en una plancha con agitación magnética; una vez mantenida la temperatura del agua, se agregó el polvo de los cladodios a la misma relación sólido-líquido de 1:10 (4 g de cladodios secos y 40 mL de agua destilada) y se mantuvo en agitación a 200 rpm por 2 h.

Al finalizar la extracción (y dejar enfriar a temperatura ambiente), la mezcla se llevó a centrifugar por 15 min a 9500 rpm. Posteriormente, el sobrenadante se filtró al vacío con papel Whatman No. 1 y lo recuperado se precipitó con 3 volúmenes de etanol absoluto por 12 h. El precipitado se recuperó al filtrar al vacío la solución sobre papel Whatman No. 1 y éste se llevó a sequedad en horno a 60 °C por 24 h.

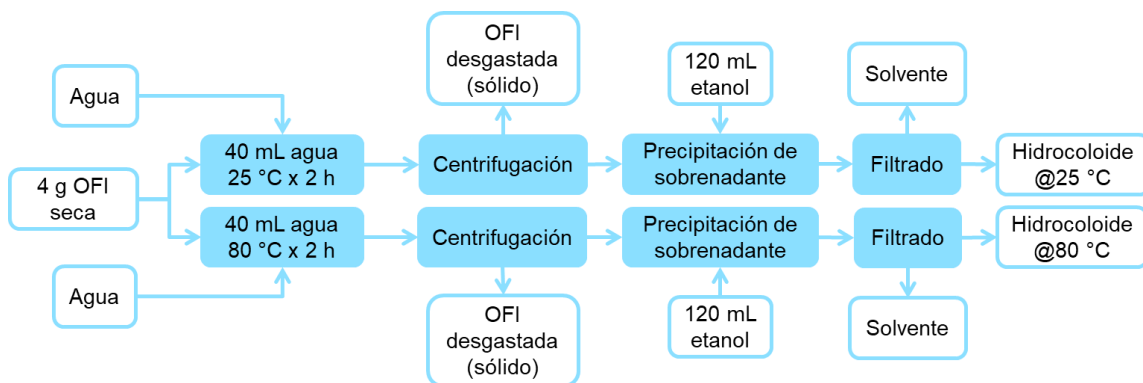


Figura 17. Diseño experimental para la evaluación de la extracción de hidrocoloides a partir cladodios de *O. ficus-indica*.

Se calculó el rendimiento másico del hidrocoloide obteniendo el peso seco del hidrocoloide obtenido y dividiéndolo entre la masa seca de *O. ficus-indica* utilizada.

5.3.3.2 Extracción de hidrocoloides con biomasa de *O. ficus-indica* extraída

Se tomaron 10 g de muestra de cladodios secos y se extrajeron con 100 mL de acetona por 1 h a temperatura ambiente en una incubadora orbital; al terminar esta extracción, la suspensión se centrifuga por 15 min a 9500 rpm y el sobrenadante se recupera y se guarda en refrigeración. Por otra parte, el sólido se resuspende en 100 mL de metanol para continuar con una segunda extracción por 1 h a temperatura ambiente y agitación orbital; de igual manera, la suspensión se centrifuga por 15 min a 9500 rpm y el sobrenadante se guarda. El sólido resultante se somete a una tercera extracción, esta vez separándose en extracción con agua a temperatura ambiente y extracción con agua caliente. Esta se llevó a cabo por 2 h a sus respectivas temperaturas y a finalizar de nuevo se centrifuga y el sobrenadante se recupera para precipitar los hidrocoloides con 3 volúmenes de etanol frío por toda la noche.

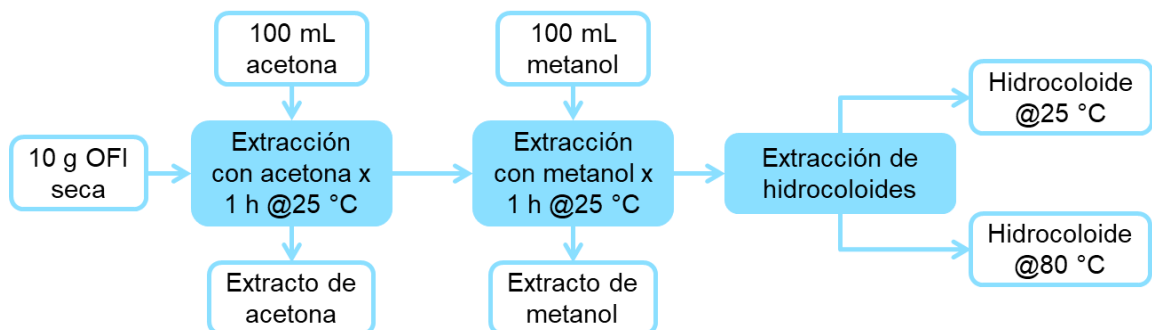


Figura 18. Esquema de extracción de hidrocoloides con biomasa de *O. ficus-indica* extraída.

5.4 ACTIVIDAD 3. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR FERMENTACIÓN OSCURA DE *O. FICUS-INDICA* EN LOTE

5.4.1 Propósito

Escalar la producción de hidrógeno en sistema por lotes a partir de OFI, utilizando las condiciones óptimas previamente determinadas por el grupo de trabajo, con el objetivo de evaluar su factibilidad a mayor escala y mejorar el rendimiento en la generación de hidrógeno.

5.4.2 Diseño experimental

Se realizó el escalado del proceso de fermentación de biomasa de *Opuntia*, pasando de una cantidad inicial de 50 a 150 g (Figura 19). Este escalado se lleva a cabo para evaluar la reproducibilidad y eficiencia del proceso a mayor escala, así como para optimizar las condiciones operativas. Se realizó un incremento en tres veces de la masa total del reactor, además del volumen del reactor utilizado en Carrillo-Verástegui et al. (2022); cabe resaltar que este escalamiento no siguió las reglas heurísticas de escalamiento de reactores, únicamente se escaló el volumen del reactor (de 120 a 500 mL) y la masa de operación (de 50 a 150 g).

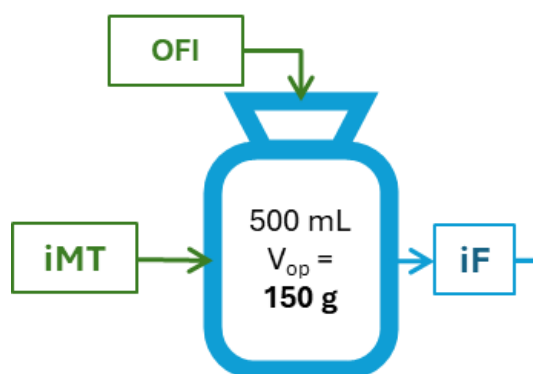


Figura 19. Diagrama del reactor de fermentación oscura de *O. ficus-indica*.
Notas: OFI, *Opuntia ficus-indica*; iMT, inóculo metanogénico tratado térmicamente; iF, fermentado; Vop, volumen de operación

5.4.3 Programa de seguimiento y análisis

En la Tabla 13 se muestran los análisis que se llevaron a cabo en principalmente en el lodo fermentado y el gas producido.

Tabla 13. Parámetros para análisis de sustrato y los sólidos digeridos de reactores de fermentación oscura.

Parámetro	Método	Alimentación	Lodo	Biogás	Referencias
pH	Potenciométrico	1/lote	1/lote	NA	NMX-AA-25-1984
Perfil de sólidos	Gravimétrico	1/lote	1/lote	NA	APHA/AWWA/WEF, 2012
Alcalinidad total	Titulación	1/lote	1/lote	NA	Anderson y Yang, 1992
Producción de hidrógeno	Desplazamiento volumétrico con NaOH 1 M	NA	NA	1/6 h	Carrillo-Verástegui et al., 2022

5.4.4 Procedimientos y técnicas

5.4.4.1 Reactivación inóculo UANL

El inóculo UANL es un lodo digerido del reactor madre operado en el CIByN, Apodaca, Nuevo León; se formó con el método “tres tercios” (Escamilla-Alvarado, 2014) utilizando lodos de antiguos digestores anaerobios, lodos de planta de tratamiento de aguas residuales y estiércol de vaca en la misma proporción. Fue alimentado con residuos de frutas y verduras, se controló el pH a 7.5 en promedio y se ajustó la relación Al/AP hasta 0.3 aproximadamente regulando con una mezcla de bicarbonato de sodio y fosfato de potasio, durante 3 meses.

5.4.4.2 Preparación de reactor inoculador “tres tercios”

Se preparó utilizando estiércol de vaca, tierra de jardín y lodos aerobios de planta de tratamiento de aguas residuales. La tierra de jardín se obtuvo excavando aproximadamente a 20 cm de profundidad en los jardines del Cinvestav Unidad Zacatenco. Los lodos se obtuvieron del Centro de Tratado de Aguas Residuales AGIVSA ubicada en Av. Acueducto de Guadalupe, Gustavo A. Madero, 07790, Ciudad de México; estos se dejaron sedimentar y se decantó el agua separada para dejar un lodo más espeso. Este reactor se dejó en arranque un mes y se aclimató con licuado de nopal.

5.4.4.3 Montaje de reactores hidrogenogénicos

El ensayo de producción de hidrógeno en lote con *O. ficus-indica* se llevó a cabo en matraces Kitasato de 500 mL adaptados con tapones de hule y mangueras a

un frasco captador de CO₂ (solución de NaOH 2 M) y a otro frasco medidor de biogás de 1000 mL.

Se prepararon tres reactores fermentadores en lote a las mismas condiciones de operación (triplicado) con un volumen de trabajo de 150 g. El inóculo utilizado se pretrató térmicamente a 95 °C por 1 h. Los reactores se alimentaron con una suspensión en agua (10 % de ST) del lote seco de *O. ficus-indica* a una RIS de 0.2 y se incubaron a 37 °C.

La medición de hidrógeno se realizó mediante el método de desplazamiento volumétrico, haciendo pasar el gas por la trampa de NaOH y posteriormente desplazar una solución de salmuera acidificada en un frasco medidor. El volumen de hidrógeno registrado se normalizó (0°C y 1 atm) utilizando la Ecuación (2), donde 585 mmHg es la presión atmosférica promedio de la Ciudad de México.

$$V_N = V_D \times \frac{273}{273 + T_{OP}} \times \frac{585}{760} \quad (2)$$

V_N: volumen desplazado normalizado (NL)

V_D: volumen desplazado (L)

T_{OP}: temperatura de operación (°C)

La medición de la producción de hidrógeno se realizó durante aproximadamente 70 h o hasta cuando la diferencia del volumen de producción fuese mínima. Una muestra de cada reactor de FO se recolectó para análisis y posteriormente los lodos se guardaron para la posterior Actividad 4.

5.4.4.4 Perfil de sólidos

Se calcularon los sólidos totales (**ST**) y volátiles (**SV**) de las muestras mediante el método gravimétrico. Se agregan entre 1 a 5 g de muestra (**M**) en un crisol de porcelana previamente mantenido a peso constante (**P₀**). Éste se dispone en un horno de secado a 105 °C por 3 horas o hasta alcanzar el peso constante (**P₁**). Después, el crisol con la muestra seca se lleva a calcinar en una mufla a 550 °C por 3 horas; luego de apagar la mufla, se espera a que baje a temperatura

ambiente para volver a pesar (P_2). Todos los pesos se registraron con una balanza analítica.

$$\% ST = \left[\frac{g ST}{100 g BH} \right] = \frac{P_1 - P_0}{M} \times 100 \quad (3)$$

$$\% SV = \left[\frac{g SV}{100 g ST} \right] = \frac{P_1 - P_2}{P_1 - P_0} \times 100 \quad (4)$$

5.4.4.5 Determinación de pH

Se solubilizan 5 g de una muestra (húmeda) en 25 mL de agua destilada, se mezclan en un tubo Corning de 50 mL y se mide el pH en un potenciómetro previamente calibrado (diario).

5.4.4.6 Determinación de alcalinidad y ácidos grasos volátiles

Posterior a la medición de pH, la muestra se centrifugó a 9000 rpm por 15 min. Se mezclaron 5 mL de la solución sobrenadante y se mezclaron con 25 mL de agua destilada en un vaso de precipitados ($V_M = 30$ mL). Éste se colocó sobre una plancha con agitación magnética y se tituló con HCl **0.1 N** hasta pH de 5.75; el volumen de ácido gastado hasta este punto se registró como V_1 y este corresponde a la alcalinidad por bicarbonatos o alcalinidad parcial. La titulación se continuó hasta pH 4.3 y el volumen gastado de pH 5.75 a 4.3 se registró como V_2 , alcalinidad por ácidos grasos volátiles o alcalinidad intermedia.

$$V_T = V_1 + V_2 \quad (5)$$

$$\frac{AI}{AP} = \frac{V_2}{V_1} \quad (6)$$

$$Alcalinidad\ total = \left[\frac{mg\ CaCO_3}{L} \right] = \frac{V_T \times N \times 50 \times 1,000}{V_M} \quad (7)$$

V_T : volumen total de ácido gastado hasta pH 4.3 (mL)

N : normalidad de la solución estándar (0.1 N)

V_M : volumen de la muestra (30 mL)

50: factor para convertir eq/L a mg $CaCO_3$ /L

1,000: factor para convertir mL a L

Al finalizar la titulación para alcalinidad, la muestra se baja a pH 3 con el mismo HCl 0.1 N sin registrar el volumen. La muestra se vertió a un matraz bola de fondo plano y se llevó a una plancha de calentamiento junto con un condensador; la mezcla se calentó hasta hervir por 3 min y, al terminar, de inmediato se llevó a enfriar el matraz en un baño de agua fría. Una vez a temperatura ambiente, se tituló la solución desde pH 4.3 hasta 6.5 con NaOH **0.1** N; este volumen se registró como **V_b**.

$$AGV = \left[\frac{mg \text{ ácido acético} - eq}{L} \right] = \frac{V_b \times N \times 60 \times 1,000}{V_M} \quad (8)$$

V_b: volumen total de NaOH 0.1 N gastado hasta pH 6.5 (mL)

N: normalidad de la solución estándar (0.1 N)

V_M: volumen de la muestra (30 mL)

60: factor para convertir eq/L a mg ácido acético-eq/L

1,000: factor para convertir mL a L

5.4.4.7 Ajuste cinético no-lineal de la producción acumulada de hidrógeno

Los datos de producción se graficaron en SigmaPlot v.11 y se realizó un ajuste no-lineal a la ecuación de Gompertz modificada (9) para calcular la producción de hidrógeno máxima acumulada.

$$H = H_{max} \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{max} e}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (9)$$

H: producción de hidrógeno a tiempo t (mL H₂)

H_{max}: producción de hidrógeno máxima acumulada (mL H₂)

R_{max}: tasa de producción de hidrógeno máxima acumulada (mL H₂/h)

λ: fase de latencia (h)

e: es 2.718

5.5 ACTIVIDAD 4. EFECTO DEL TIPO DE INÓCULO HIDROGENOGENICO SOBRE LA FERMENTACIÓN OSCURA EN LOTE

5.5.1 Propósito

Evaluar la estrategia de re-fermentación los efluentes fermentados tratados en un nuevo ciclo de producción de hidrógeno.

5.5.2 Diseño experimental

Se ensayaron los siguientes inóculos en fermentación oscura en lote (Figura 20) de *O. ficus-indica* a una RIS de 0.2:

- Inóculo F (iF): Biomasa fermentada de la hidrogenogénesis de *O. ficus-indica*.
- Inóculo F traterm (iFT): Inóculo F tratado térmicamente
- Inóculo F lavado (iFL): Inóculo F lavado con agua – extracción de AOVs
- Inóculo F lavado + traterm (iFLT): Inóculo F lavado con agua y tratado térmicamente

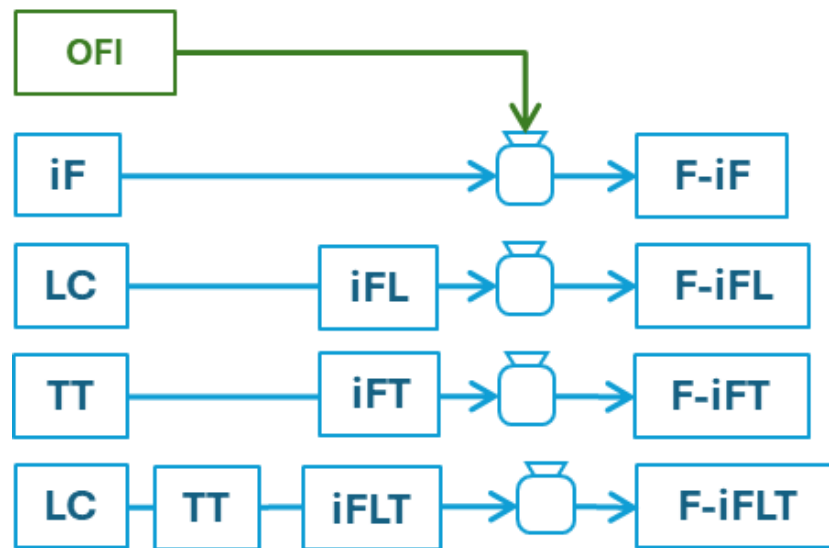


Figura 20. Diagrama del proceso de la segunda fermentación oscura utilizando como inóculos los fermentados de la actividad 3 y evaluando tres tratamientos adicionales.

5.5.3 Programa de seguimiento y análisis

Debido a que el experimento fue un sistema de fermentación oscura en lote al igual que la actividad anterior, se realizaron análisis similares. Estos se pueden observar en la Tabla 14.

Tabla 14. Parámetros para análisis de sustrato y sólidos digeridos de reactores de re-fermentación con inóculos pretratados.

Parámetro	Método	Alimentación	Lodo	Biogás	Referencias
pH	Potenciométrico	1/lote	1/lote	NA	NMX-AA-25-1984
Perfil de sólidos	Gravimétrico	1/lote	1/lote	NA	APHA/AWWA/WEF, 2012
Alcalinidad total	Titulación	1/lote	1/lote	NA	Anderson y Yang, 1992
Producción de hidrógeno	Desplazamiento volumétrico con NaOH 1 M	NA	NA	1/6 h	Carrillo-Verástegui et al., 2022

5.5.4 Procedimientos y técnicas

5.5.4.1 Preparación de inóculos hidrogenogénicos

Los lodos fermentados de la etapa anterior (iH) se separaron en cuatro partes iguales: inóculo F (iF), inóculo F traterm (iFT), inóculo F lavado (iFL) e inóculo F lavado + traterm (iFLT).

Para preparar el iFT se colocó el iF en un matraz y se realizó un choque térmico en baño maría por 1 h.

El iFL se preparó lavando tres veces el iF con agua destilada. Primero se centrifuga el iF y el sobrenadante se recupera (Li); se agregaron 20 mL de agua destilada al sólido centrifugado y se mezclaron en vortex para posteriormente centrifugar nuevamente y recuperar el sobrenadante (L1), así sucesivamente hasta tener 3 aguas de lavado más el sobrenadante inicial. Terminando de recuperar el L3, se agrega agua destilada hasta aproximar los ST a los del inóculo inicial.

El iFLT se prepara con el mismo método de lavado anteriormente explicado y posterior choque térmico en baño maría por 1 h.

5.5.4.2 Montaje de reactores hidrogenogénicos

Se prepararon tres reactores en lote con cada uno de los cuatro inóculos con un volumen de operación de 100 g utilizando el mismo montaje de la actividad 3.

Nuevamente, los reactores fueron alimentados con una suspensión en agua (10 % ST) del lote seco de *O. ficus-indica* a RIS de 0.2 e incubado a 37 °C hasta las 70 h o cuando la diferencia del volumen de producción fuese despreciable en aproximadamente 5 %.

5.6 ACTIVIDAD 5. PRODUCCIÓN DE METANO POR DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LODOS FERMENTADOS HIDROGENOGENÉTICOS EN SEMI-CONTINUO

5.6.1 Propósito

Evaluar el efecto de la alimentación de los lodos fermentados provenientes de la FO de *O. ficus-indica* en la producción de metano en régimen semicontinuo para aplicar la estrategia de biorrefinería H-H-M.

5.6.2 Diseño experimental

Se trabajaron tres reactores utilizando como inóculo los lodos del reactor tres tercios (ver anexos para más información de los reactores inoculadores) en un sistema semicontinuo de lote alimentado en el cual se mantuvo un volumen de operación de 500 g (Figura 21). La alimentación de estos reactores se llevó a cabo dos veces a la semana (cada 3 y 4 días) y se analizaron las purgas en pH, alcalinidad, AGVs y perfil de sólidos. El volumen de biogás se midió diariamente mediante el método de probeta invertida.

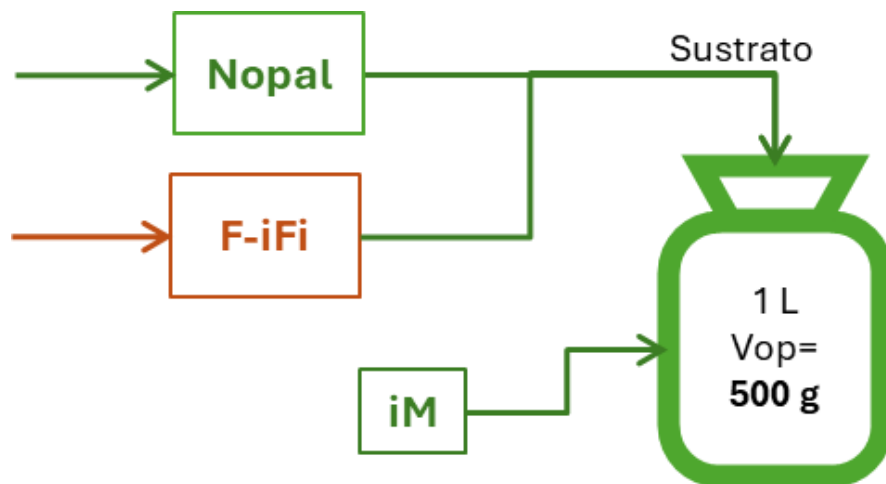


Figura 21. Diagrama de digestión anaerobia de lodos fermentados de FO en régimen semi-continuo.

5.6.3 Programa de seguimiento y análisis

En la Tabla 15 se muestran los análisis y la frecuencia de los análisis para los lodos y el biogás obtenidos de la digestión anaerobia en semi-continuo.

Tabla 15. Parámetros para análisis de sustrato, inóculo y sólidos digeridos de reactores metanogénicos.

Parámetro	Método	Alimentación	Lodos	Biogás	Referencia
pH	Potenciométrico	1/lote	2/sem	NA	NMX-AA-25-1984
Perfil de sólidos	Gravimétrico	1/lote	1/sem	NA	APHA/AWWA/WEF, 2012
Alcalinidad total	Titulación	1/lote	2/sem	NA	Anderson y Yang, 1992
Producción de biogás	Desplazamiento volumétrico con salmuera acidificada	NA	NA	1/día	Carrillo-Verástegui et al., 2022

5.6.4 Procedimientos y técnicas

5.6.4.1 Montaje y puesta en marcha de reactores metanogénicos

Se prepararon tres reactores con 500 g de inóculo del reactor tres tercios. La alimentación de estos reactores para la producción de metano en semicontinuo fue la mezcla de lodos digeridos de la Actividad 4 (lodos de los reactores iF, iFL, iFT e iFLT) intercalada cada dos semanas con alimentación de licuado de nopal a 40 d de TRM en una incubadora a 37 °C.

Utilizando la M_{teo} (500 g) y el TRM (40 d) se calcula el flujo másico teórico de alimentación del sustrato (m_i) en unidades de g BH_{alim}/d:

$$m_i = \frac{M_{teo}}{TRM} \quad (10)$$

La masa de alimentación se calcula multiplicando el flujo másico de alimentación por la cantidad de días hasta la siguiente alimentación, en este caso cada 3 o 4 días:

$$M_{alim} = m_i \Delta t \quad (11)$$

Debido a que estos reactores operaban con masa fija (500 g), antes de cada alimentación se realizaban purgas calculadas de la siguiente manera, M_{exp} siendo la masa experimental del reactor antes de ser purgada y alimentada:

$$M_{purga} = M_{exp} - M_{teo} + M_{alim} \quad (12)$$

Con el fin de comparar resultados, se calculó la tasa de carga orgánica utilizando el flujo másico en unidades de sólido volátil alimentado y el volumen de operación del reactor:

$$B_v = \frac{\dot{m}}{V_R} = \frac{Q \times C_S}{V_R} \quad (13)$$

B_v : Tasa de carga orgánica (g SV_{alim} /kg-d)

$\dot{m}$: flujo másico (g SV_{alim} /d)

V_R : volumen de operación (kg)

Q : flujo de alimentación (m^3 /d)

C_S : concentración de sustrato (kg/m^3)

La medición del biogás se realizó con el método de desplazamiento volumétrico y, en lugar de NaOH, se hizo pasar por una trampa de salmuera acidificada antes de pasar hacia el frasco medidor. Diariamente se registró el volumen desplazado por cada reactor individualmente (por triplicado) y se normalizó (0 °C y 1 atm) utilizando la Ecuación (2).

5.7 ACTIVIDAD 6. EVALUACIÓN DE TRANSFORMACIÓN DE *O. FICUS-INDICA* EN BIOPRODUCTOS PARA ESCENARIOS DE BIORREFINERÍA

5.7.1 Propósito

Evaluar el aprovechamiento del nopal a partir de diferentes trenes de tratamiento de *O. ficus-indica* posibles, tomando en cuenta los procesos presentados en este trabajo para la obtención de bioproductos y bioenergéticos, y la combinación de estos.

5.7.2 Diseño experimental

Se definieron tres escenarios de biorrefinería con base en los principales resultados obtenidos en las actividades previas. Se realizaron balances de materia correspondientes a cada escenario para calcular indicadores de aprovechamiento del nopal, utilizando relación de alimentación, rendimiento, producción y extrapolaciones para cada proceso.

5.7.3 Definición de escenarios de comparación

Se propusieron los escenarios de biorrefinería (Figura 22) tomando en cuenta las etapas en las que está dividido este trabajo, i.e. biocombustibles y bioproductos:

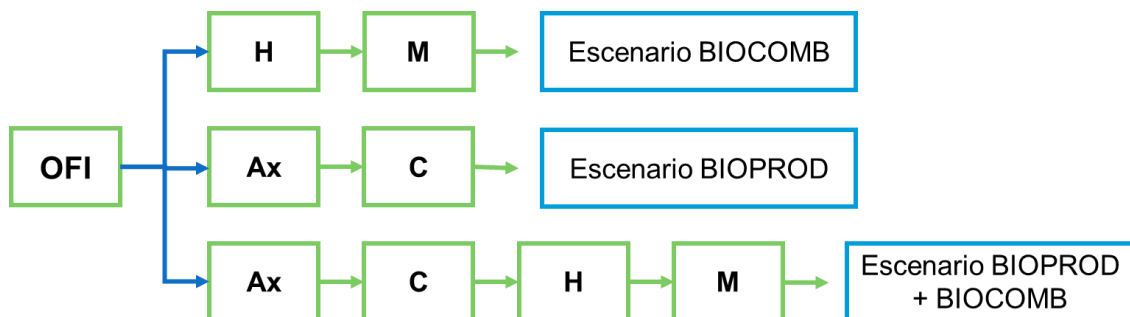


Figura 22. Diagrama de escenarios de biorrefinería de *O. ficus-indica* (OFI).
H: hidrogenogénesis (fermentación oscura), M: metanogénesis (digestión anaerobia), Ax: antioxidantes (extracción de fenólicos), C: hidrocoloides (extracción de hidrocoloides).
BIOCOMB: biocombustibles, BIOPROD: bioproductos.

- Escenario Biocombustibles (BIOCOMB o H-M):
 - Producción de hidrógeno y metano mediante un proceso secuencial de fermentación oscura y digestión anaerobia

- Escenario Bioproductos (BIOPROD o Ax-C):
 - Extracción secuencial de compuestos fenólicos e hidrocoloides utilizando solventes orgánicos.
- Escenario Bioproductos y biocombustibles (BIOPROD + BIOCOMB o Ax-C-H-M):
 - Extracción de biocompuestos, compuestos fenólicos e hidrocoloides, con reutilización de biomasa para producción de biocombustibles, biohidrógeno y biometano.

Se evaluó el aprovechamiento de cada escenario generando un nuevo índice de transformación de materia prima en el total de productos generados (Ecuación (14), el índice de productos principales que se enfoca en los productos con mayor valor comercial (Ecuación (15)) y el factor ambiental nombrado por Ruiz-Mercado et al. (2012) que muestra cuántos residuos se generan por masa de producto obtenido (Ecuación (16)).

$$\text{Índice de transformación de sustrato} = \frac{\sum_i^n m_{\text{productos}}}{m_{\text{OFIalim,seca}}} \quad (14)$$

$$\text{Índice de productos principales} = \frac{\sum_i^n m_{\text{productos principales}}}{m_{\text{OFIalim}}} \quad (15)$$

$$\text{Factor ambiental} = \frac{\sum_i^n m_{\text{no producto-no agua fuera del proceso}}}{m_{\text{productos}}} \quad (16)$$

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como materia prima principal, se utilizaron cladodios secos de *O. ficus-indica*. En la Tabla 16 se muestra una caracterización del pulverizado de nopal. El secado y pulverizado del nopal se realizó con el fin de preservar el sustrato, sin riesgos de fermentación indeseada ni degradación de compuestos importantes para su evaluación. El porcentaje de humedad de los cladodios frescos fue de 93.6 %, lo cual está en el rango de lo ya reportado en literatura (Maki-Díaz et al., 2015). La cantidad de sólidos volátiles sugiere que el nopal es un buen sustrato para la producción de biocombustibles por fermentación ya que, parecido a la demanda química de oxígeno, estos pueden representar la materia orgánica disponible para su degradación. Los compuestos extraíbles (pueden ser tanto polisacáridos solubles como compuestos fenólicos, entre otros) representan más de la mitad del peso seco de la biomasa, lo que significa que la menor parte del nopal es recalcitrante, por ejemplo, conteniendo un 9.14 % en sólidos totales de lignina.

Tabla 16. Caracterización de la biomasa de *O. ficus-indica* utilizada en el proyecto.

	Unidades	<i>O. ficus-indica</i> cladodios secos
Sólidos totales	g ST/100 g H	91.35 ± 0.13
Sólidos volátiles	g SV/100 g ST	81.36 ± 0.12
Celulosa	g/100 g ST	10.60 ± 0.15
Hemicelulosa	g/100 g ST	7.67 ± 0.10
Lignina	g/100 g ST	9.14 ± 0.38
Extraíbles	g/100 g ST	53.95
pH	-	5.09
Nitrógeno	% p	2.06
Fósforo	% p	0.22
Potasio	% p	4.38
Cadmio	mg/kg	<0.5
Cromo	mg/kg	9.8
Cobre	mg/kg	5.4
Plomo	mg/kg	<2
Níquel	mg/kg	2.9
Zinc	mg/kg	19.1
Azufre	% p	0.32
Arsénico	mg/kg	<1
Mercurio	mg/kg	<1

6.1 ACTIVIDAD 1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES CON BIOMASA DE *O. FICUS-INDICA*

6.1.1 Actividad 1A. Extracción de compuestos fenólicos a partir de *O. ficus-indica* mediante solventes orgánicos

Se determinó la forma de secado de nopal más adecuada, la secuencia de los solventes para el tren de extracción y la comparación entre sistemas binarios y ternarios de solventes orgánicos.

Al evaluar los compuestos fenólicos de la extracción de nopal seco en horno y liofilizado con el mismo tratamiento de solventes, no hubo diferencia significativa entre éstos; se puede ver el análisis de varianza para un factor en los anexos. Esto también se muestra de manera gráfica en la Figura 23A. Debido a que no hay diferencias notables entre sus rendimientos, se decidió realizar los experimentos siguientes utilizando nopal seco, bajo la consideración de evitar los mayores gastos energéticos de un liofilizado a comparación con el secado al aire libre o con horno solar.

En la Figura 23B se observa el efecto del orden de los solventes en un tren de tratamiento de dos extracciones. Según el análisis estadístico, existe una diferencia ligeramente significativa ($p = 0.0489$) en el rendimiento total de compuestos fenólicos obtenidos, siendo mayor con el tren de acetona-metanol. Al analizar estos rendimientos por solvente, hay una diferencia significativa aún mayor ($p = 0.0002$) siendo el solvente con mayor capacidad para extracción de compuestos el primero en el tren de tratamiento. Sin embargo, se prefiere el orden acetona-metanol, ya que la acetona al extraer inicialmente remueve la mayoría de las clorofilas (compuestos menos polares) previo a la extracción de compuestos fenólicos.

Similarmente, en la Figura 23C no hay diferencia significativa entre el rendimiento de la extracción de compuestos fenólicos utilizando una mezcla binaria (metanol al 80 %) a una mezcla terciara de solventes orgánicos en fase acuosa (incluyendo acetona) ($p = 0.53$).

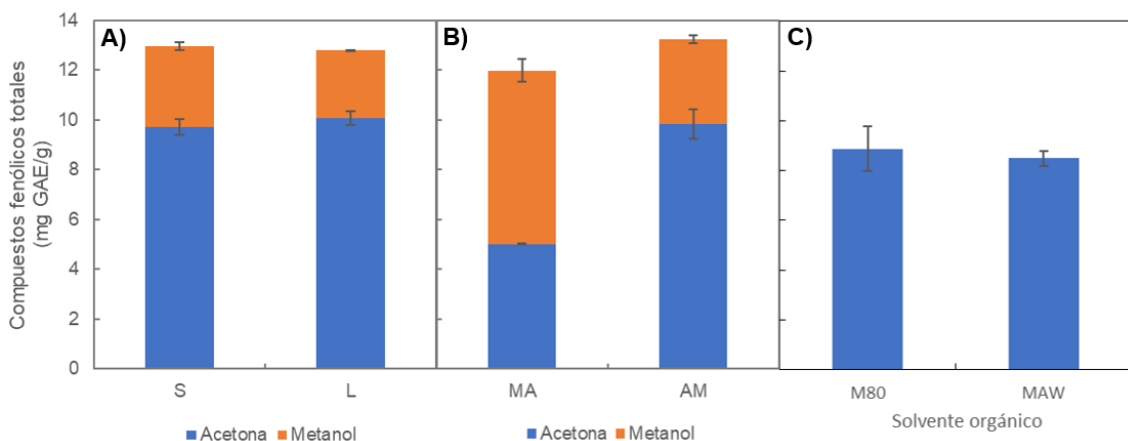


Figura 23. Extracción de extracción de compuestos fenólicos en: A) nopal seco (S) y nopal liofilizado (L), B) alternando el orden de los solventes (acetona y metanol, MA o AM) en la extracción secuencial de nopal seco, y C) utilizando metanol al 80 % vs metanol-acetona-agua 40:40:20.

En la Tabla 17 se muestra la caracterización de los extractos obtenidos mediante el diseño experimental factorial 3x3 propuesto en el que se evaluaron tres solventes orgánicos a tres concentraciones. La primera letra en el código de muestra significa el solvente orgánico utilizado, mientras que el número es la concentración de éste. La muestra extraída con metanol al 50 % dio la más alta concentración de fenólicos totales (12.91 mg GAE/g).

Tabla 17. Caracterización de los extractos de *O. ficus-indica* según el diseño experimental.

Muestra	TPC (mg GAE/g)	% DPPH	% ABTS	AR (g DEX/L)
A100	0.93 ± 0.36	6.02 ± 1.31	8.95 ± 0.00	0.73 ± 0.10
A80	7.94 ± 0.60	25.17 ± 1.75	76.42 ± 3.19	5.95 ± 0.18
A50	12.18 ± 0.70	36.34 ± 1.82	97.67 ± 0.00	10.58 ± 0.38
M100	2.17 ± 0.02	12.15 ± 1.24	52.45 ± 0.99	2.41 ± 0.08
M80	8.38 ± 0.40	27.64 ± 0.44	97.74 ± 0.99	8.17 ± 0.08
M50	12.91 ± 0.39	29.18 ± 1.16	95.41 ± 0.77	9.22 ± 0.31
E100	0.78 ± 0.04	5.82 ± 1.02	31.52 ± 1.76	0.41 ± 0.00
E80	6.55 ± 0.42	17.45 ± 0.87	85.37 ± 2.86	5.84 ± 0.06
E50	11.92 ± 1.39	29.90 ± 0.00	96.19 ± 1.65	7.88 ± 0.07

Notas: TPC, compuestos fenólicos totales; GAE, ácido gálico equivalente; AR, azúcares reductores; DEX, dextrosa equivalente; ND, no detectado.

Por otro lado, el extracto utilizando acetona al 50 % obtuvo las más altas actividades antioxidantes tanto DPPH como ABTS; esto puede deberse también a la alta concentración de kaempferol en el extracto. Si queremos proponer una

extracción secuencial para a mejorar la concentración de compuestos fenólicos extraídos a menor tiempo y menor temperatura de lo reportado en bibliografía, se puede utilizar acetona al 50 % para extraer clorofilas y kaempferol, luego extraer con metanol al 80 % para obtener quercetina, y finalmente, una maceración con agua para separar las fibras solubles o hidrocoloides.

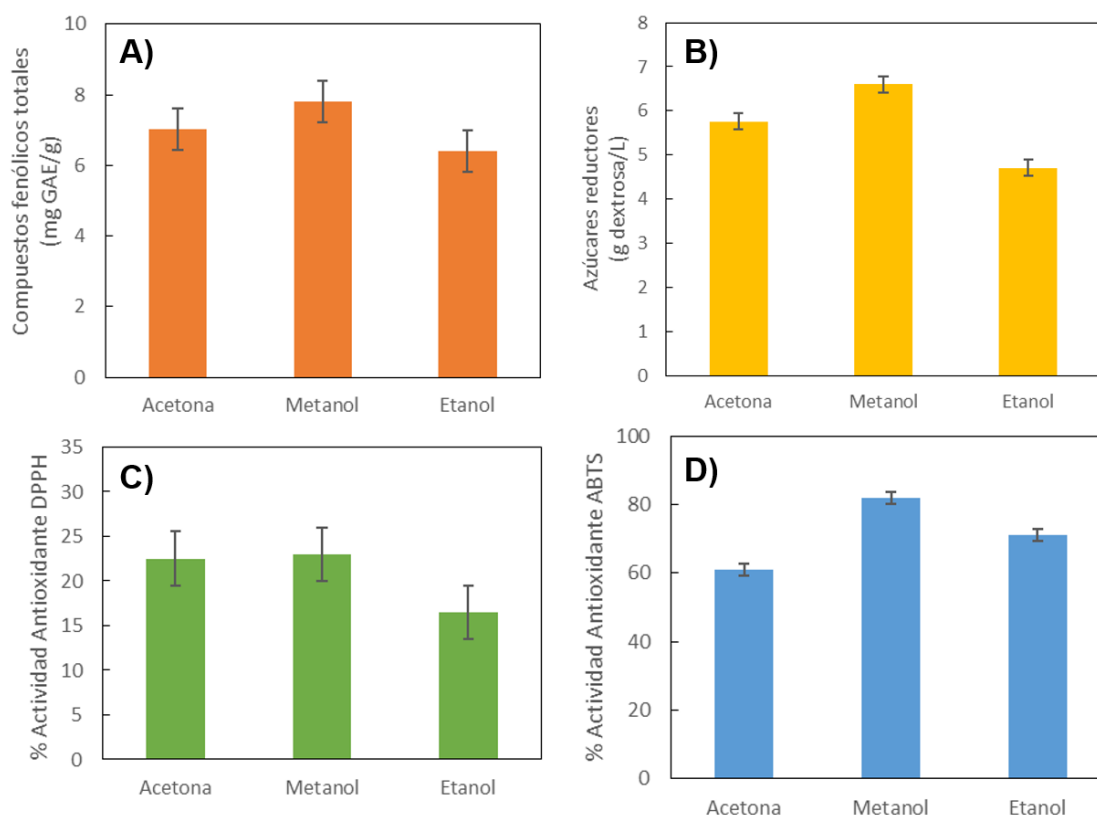


Figura 24. Efectos principales del solvente orgánico utilizado en la extracción de compuestos fenólicos; A) compuestos fenólicos totales, B) azúcares reductores, C) actividad antioxidante DPPH y D) actividad antioxidante ABTS.

Si bien los resultados numéricos permiten identificar una tendencia, a continuación, se presentan de manera gráfica mediante el cálculo de los efectos principales los cuales se realizan promediando las respuestas de cada factor; tomando de ejemplo el tipo de solvente como factor, el efecto principal es la diferencia entre el rendimiento de fenólicos para acetona, etanol y metanol (por separado), promediado entre las tres concentraciones. En la Figura 24 se muestran dichos efectos principales del tipo de solvente orgánico utilizado en la extracción sobre las cuatro respuestas a analizar. No hay una diferencia a simple

vista entre los solventes, sin embargo, se pueden ver mejores resultados con metanol para todas las respuestas. Cuando se analizó el diseño factorial, para todas las respuestas, el tipo de solvente es un factor significativo ($p = 0.004$), lo que contrasta con el análisis de efectos principales.

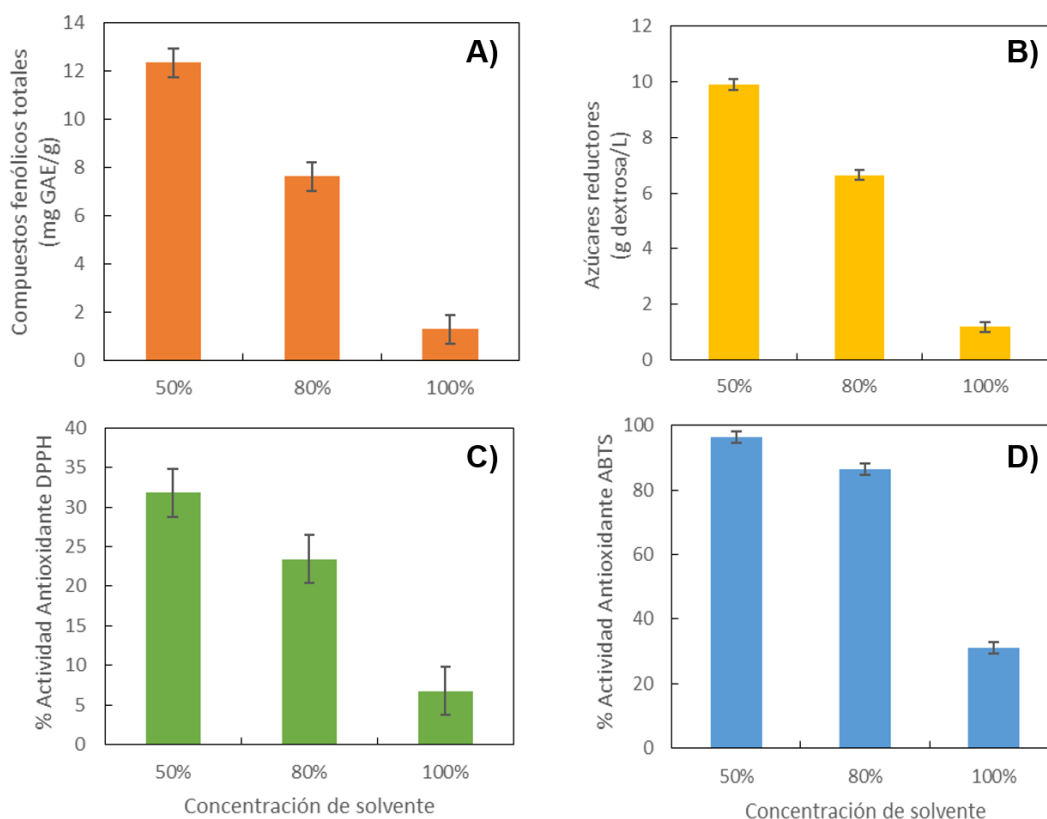


Figura 25. Efectos principales de la concentración del solvente utilizado en la extracción de compuestos fenólicos; A) compuestos fenólicos totales, B) azúcares reductores, C) actividad antioxidante DPPH y D) actividad antioxidante ABTS.

En la Figura 25 se muestran los efectos principales de la concentración de solvente en la extracción; el análisis de varianza muestra que este es significativo para todas las respuestas ($\alpha < 0.0001$). Se observa que, dentro del rango evaluado, una menor concentración favorece una mayor obtención de compuestos fenólicos y azúcares, así como una mayor actividad antioxidante. Esto puede deberse a la presencia de flavonoides glicosilados que son más polares y, por lo tanto, más fácilmente extraíbles en soluciones acuosas.

Además, hay una diferencia notable entre los porcentajes de captación de radicales DPPH (Figura 25C) contra los ABTS (Figura 25D). Esto se puede

relacionar con el medio de reacción de cada método: el ensayo con radicales libres DPPH se lleva a cabo generalmente en metanol o etanol, mientras que el ensayo con radicales libres ABTS se realiza en condiciones acuosas. Esto quiere decir que ciertos compuestos bioactivos pueden o no pueden ser solubles en el medio de reacción y por consiguiente expresan mayor o menor actividad antioxidante dependiendo de la solubilidad compuesto.

También las propiedades de cada radical juegan un papel importante en la captación de radicales libres; por ejemplo, el ABTS es un radical que inicialmente se tiene que formar mediante una reacción, mientras que el DPPH es un radical estabilizado por sí solo. Estos pueden tener afinidades diferentes contra otros compuestos presentes en las muestras, como lo son los carbohidratos y lípidos, entre otros.

Tabla 18. Comparación con métodos de extracción de compuestos fenólicos a partir de *Opuntia* utilizando solventes orgánicos.

Muestra	Extracción	TPC	Referencia
<i>O. ficus-indica</i> var. Atlixco	3 g + 30 mL solvente al 50 % por 1 h a 150 rpm @ 25 °C	12.34 mg GAE/g	Este trabajo
<i>O. ficus-indica</i>	5 g + 50 mL EtOH 80 % por 12 h @ 22-25 °C	10.16 mg GAE/g	Aruwa et al. (2019)
<i>O. ficus-indica</i> var. Milpa Alta	500 mg + 40 mL MeOH 50 % por 1 h @ 25 °C + 40 mL MeOH 70 % por 1 h @ 25 °C	Secado a 45 °C: 40.97 mg GAE/g Secado a 65 °C: 17.34 mg GAE/g	Medina-Torres et al. (2011)
<i>O. robusta</i> var. Turpin	0.2 g + 10 mL MeOH 50 % por 30 min en ultrasonido	9.19 mg GAE/g	Mabotja et al. (2021)
<i>O. ficus-indica</i>	Extracción de cladodios frescos con agua 1:1	4.5 mg GAE/g	de Wit et al. (2019)
<i>O. ficus-indica</i>	25 g + 300 mL EtOH por 6 h en soxhlet	24.84 mg GAE/g	Msaddak et al. (2015)
<i>O. ficus-indica</i>	4 g + 20 mL ácido fórmico 0.1 % en MeOH 80 % por 3 min a 25,000 rpm	33.9 mg GAE/g	Rocchetti et al. (2018)
<i>O. ficus-indica</i>	2 g + 50 mL MeOH 80 % en baño ultrasónico por 30 min	14.47 mg GAE/g	Missaoui et al. (2020)

Notas: TPC, compuestos fenólicos totales; GAE, ácido gálico equivalente; EtOH, etanol; MeOH, metanol; rpm, revoluciones por minuto

Los resultados de compuestos fenólicos totales (TPC) obtenidos con solventes al 50 % son comparables con los resultados encontrados en literatura (Tabla 18). Por ejemplo, Medina-Torres et al. (2011) realizó una extracción en dos partes, una con MeOH al 50 % y otra con MeOH al 70 % con los cladodios de *O. ficus-indica* secados a 65 °C; la diferencia del rendimiento se puede deber a la doble extracción, específicamente de la maceración al 70 % de MeOH y su alta relación sólido líquido, la cual hace más disponible a extracción los componentes de la matriz de la planta. También se puede deducir que la extracción con únicamente agua (de Wit et al., 2019) no extrae compuestos fenólicos totales competentes con los obtenidos con una solución acuosa de solventes orgánicos y son comparables con aquellos extraídos con solventes a una concentración del 80 %. Cabe resaltar que en algunos los métodos utilizados en la literatura requerían una maceración prolongada y temperaturas mayores a la ambiente (Aruwa et al., 2019b; Msaddak et al., 2015).

Como ensayo exploratorio, se realizó un análisis cualitativo por HPLC-DAD de los extractos de *O. ficus-indica*. Para todos los solventes y sus concentraciones, se observaron picos con intensidades mayores a los flavonoides que se buscaban (quercetina, isorhamnetina y kaempferol), pero que presentaban espectro de absorción UV-vis típicos de flavonoides. Se pueden identificar dos bandas principales; la primera está relacionada con el anillo B de la estructura del flavonoide o cinamoil (300–390 nm) y la segunda banda pertenece al anillo A o benzoil (250–280 nm) (Nistor & Butnariu, 2023).

Debido a que en este primer ensayo no se observaron intensidades cuantificables de los flavonoides cercanos a su esqueleto básico (C6-C3-C6), se decidió realizar una hidrólisis de los extractos, ya que generalmente estos se encuentran unidos a compuestos poliméricos, principalmente a los carbohidratos (Acosta-Estrada et al., 2014). Compuestos con más anillos aromáticos tienden a unirse más fuertemente a macromoléculas como la celulosa más que aquellos compuestos aromáticos de un solo anillo aromático.

Tabla 19. Concentración de agliconas de flavonoides en los extractos orgánicos hidrolizados de *O. ficus-indica*.

Muestra	Rendimiento ($\mu\text{g/g}$ de nopal seco)		
	Quercetina	Kaempferol	Isorhamnetina
A100	9.90 ± 1.23	16.49 ± 0.52	101.65 ± 4.46
A80	21.42 ± 2.30	39.08 ± 0.11	483.18 ± 0.93
A50	16.60 ± 2.44	35.64 ± 2.27	272.72 ± 32.22
E100	ND	10.00 ± 1.41	39.42 ± 4.93
E80	16.61 ± 1.43	40.26 ± 2.83	495.00 ± 42.65
E50	15.03 ± 2.99	34.23 ± 7.70	353.87 ± 63.58
M100	ND	11.19 ± 0.24	44.28 ± 4.53
M80	11.44 ± 0.33	21.78 ± 0.36	218.84 ± 5.02

Los extractos con solventes orgánicos acetona y etanol al 80 % hidrolizados obtuvieron las mayores concentraciones de flavonoides, principalmente la isorhamnetina (Tabla 19). Según literatura (Tabla 20), el metanol al 80 % es el solvente más utilizado para obtener quercetina (flavonoide) para muchas de las plantas estudiadas, sin embargo, para esta especie y variedad de *O. ficus-indica* utilizada, los extractos de metanol obtuvieron menores rendimientos entre los tres solventes sin importar su concentración; esto se puede observar de manera gráfica en la Figura 26.

También, hay una tendencia notable en el total de flavonoides extraídos, en la que el mayor rendimiento se extrae con 80 % de solvente y, a continuación, el rendimiento parece disminuir junto a la concentración de este. Esto quiere decir que hay un máximo en este rango de pureza del solvente orgánico utilizado, el cual podría optimizarse mediante un diseño experimental más robusto como un diseño central compuesto.

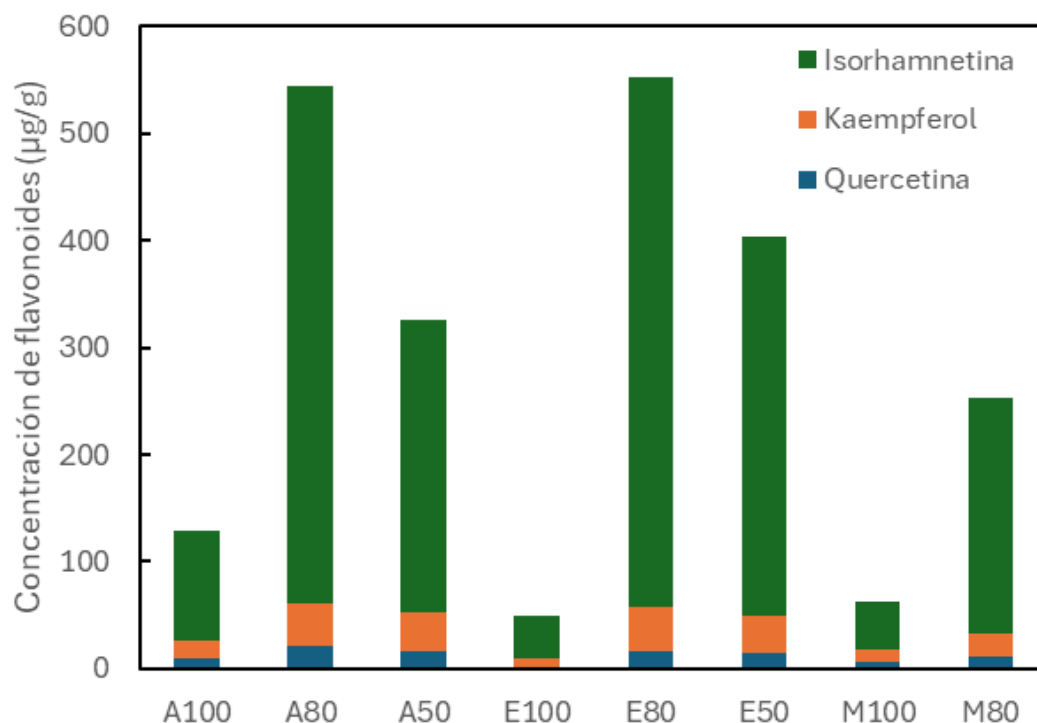


Figura 26. Concentración y perfil de agliconas de flavonoides en los extractos orgánicos hidrolizados de *O. ficus-indica*.

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los flavonoides presentes en las plantas se encuentran en su forma glicosilada, por lo que es evidente que su extracción sea abundante cuando se utilizan solventes afines a los azúcares, es decir, ligeramente acuosos. Por ello, podemos observar que cuando los solventes orgánicos se encuentran puros, hay una mínima recuperación de flavonoides en comparación a los del 80 y 50 %. El glicosil-rhamnosido de isorhamnetina es el flavonoide glicosilado más abundante en el extracto de *O. ficus-indica* (Santos-Zea et al. 2011). También se encontraron otros flavonoides glicosilados como quercetina 3-O-glucósido, kaempferol 3-O-glucósido, kaempferol 3-O-rutinósido, isorhamnetina 3-O-glucósido, isorhamnetina 3-O-neohesperidósido (Msaddak et al., 2017).

Tabla 20. Comparación de cuantificación de flavonoides en extractos de *O. ficus-indica* por HPLC-DAD.

Muestra	Extracción	Hidrólisis	Cuantificación de flavonoides (µg/g)	Referencia
<i>O. ficus-indica</i> var. Atlixco	3 g + 30 mL EtOH 80 % por 1 h a 150 rpm @ 25 °C	HCl 3.2 M, 30 min @ 85 °C	Q: 16.61 K: 40.26 I: 495	Este trabajo
<i>O. ficus-indica</i> var. Villanueva (secado 60 °C por 8-9 h)	2 g + 20 mL MeOH 80% por 2 h a 150 rpm	HCl 3.2 M, 20 min @ 85 °C	K: 475 I: 654	Santos-Zea et al. (2011)
<i>O. ficus-indica</i>	4 g + 50 mL MeOH 50 % x 2 h; + 50 mL acetone 70 % x 2 h; + 50 mL agua x 30 min	HCl 1.5 M, 2 h @ 90 °C	Q: 8.6 K: 10.2 I: 106.7	De Santiago et al. (2018)
<i>O. ficus-indica</i> var. Milpa Alta	2 g + 10 mL EtOH + 4 mL agua	HCl concentrado x 3 h en reflujo	Secado a 45 °C: Q: 510 K: 760 I: 858 Secado a 65 °C: Q: 13 I: 254	Medina-Torres et al. (2011)

Notas: Q, quercetina; K, kaempferol; I, isorhamnetina; MeOH, metanol; EtOH, etanol; HCl, ácido clorhídrico

6.1.2 Actividad 1B. Extracción de compuestos fenólicos a partir de *O. ficus-indica* mediante solventes eutécticos profundos (DES)

La preparación de los DES fue una parte crucial para la siguiente parte de la actividad que es la extracción. Por ello, primero se prepararon los siguientes DES propuestos según su afinidad para los flavonoides reportados en *O. ficus-indica* como se explicó en la revisión de la literatura. Si bien cada uno de estos solventes se lograron preparar a atmosfera abierta (Figura 27, en vasos de precipitado, sin cerrar) a las condiciones que se muestran en la Tabla 21, se decidió preparar un segundo lote de solventes, esta vez con atmósfera controlada; sin embargo, el tiempo a las condiciones reportadas excedió de lo descrito y los DES conformados por xilitol no se formaron, en cambio, se cristalizaron (Figura 28). Es importante que la preparación de los DES sea en condiciones sumamente controladas, ya que los componentes utilizados son altamente higroscópicos, eso quiere decir que fácilmente van a capturar humedad del ambiente.

Tabla 21. Solventes eutécticos profundos para evaluar en la extracción de compuestos fenólicos.

HBA	HBD	Relación molar	Condiciones de preparación	Apariencia
L-Prolina	Glicerol	2:5	Agitación x 2 h	Líquido transparente claro
Cloruro de colina	Glicerol	1:1	70 °C x 3 h	Líquido transparente claro
L-Prolina	Xilitol	2:3	Agitación x 2 h	Líquido transparente amarillo
Cloruro de colina	Xilitol	5:2	70 °C x 3 h	Líquido transparente amarillo

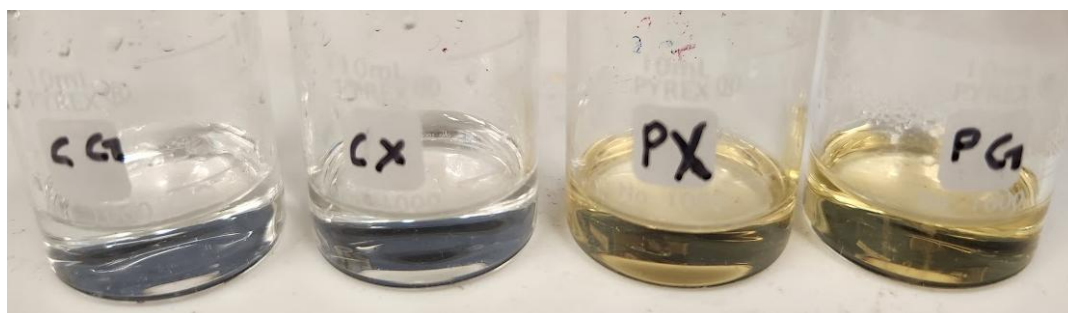


Figura 27. Preparación de disolventes eutécticos profundos a atmosfera no-controlada.

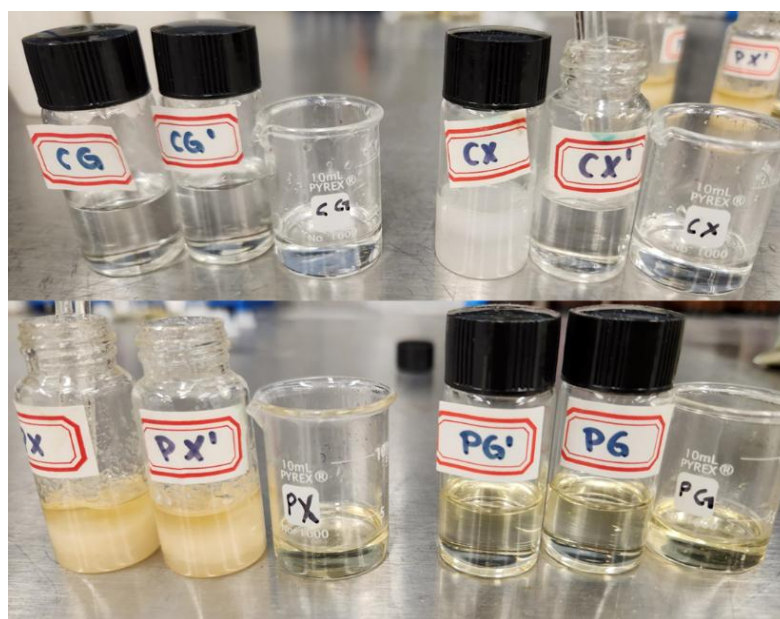


Figura 28. Segunda preparación de disolventes eutécticos profundos a temperatura y ambiente controlados.

Debido a esto y a la formación de puentes de hidrógeno en los DES, se decidió preparar éstos con una cantidad conocida de agua, de tal manera que el DES

que se forme tenga un 20 % en peso de agua y 80 % en peso de sus componentes. La cantidad en gramos y su relación molar se observan en la Tabla 22. Estos DES necesitaron únicamente agitación y, en el caso de los que contenían xilitol, calentamiento leve a 60 °C por 1 h (Figura 29).

Tabla 22. Cálculo de adición de agua para preparar el DES al 80 % en solución acuosa (cantidad conocida de agua).

DES	Cloruro de colina	L-prolina	Glicerol	Xilitol	Agua
ChCl-G 1:1:3.5	2.8425	-	1.8749	-	1.2826
ChCl-X 5:2:15	3.2919	-	-	1.4349	1.2732
Pro-G 2:5:10.5	-	1.5704	3.1405	-	1.2890
Pro-X 2:3:10.5	-	1.5776	-	3.1274	1.2949

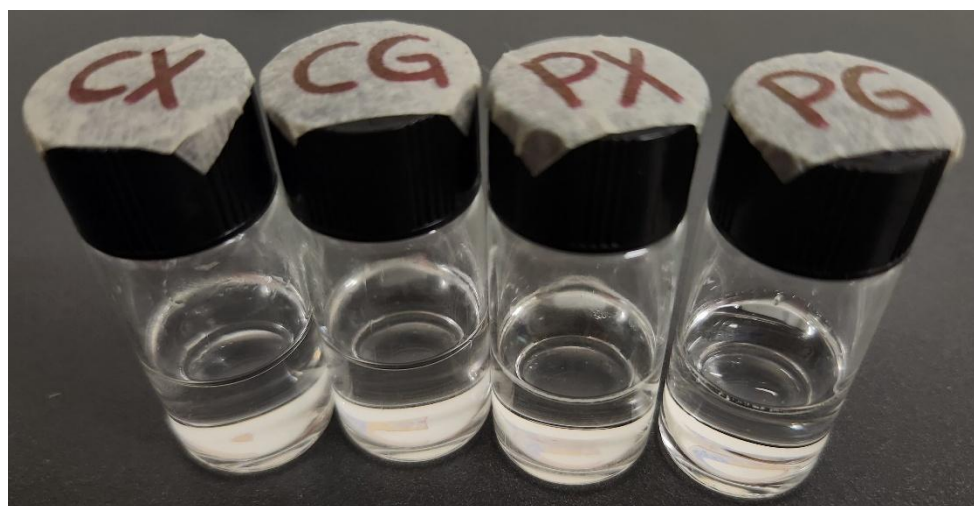


Figura 29. Preparación de disolventes eutécticos profundos al 80 % en agua.

Los compuestos fenólicos se extrajeron de *O. ficus-indica* utilizando los cuatro DES obtenidos al 80 % en agua; se maceró a 70 °C con agitación magnética y, luego de la separación del sobrenadante con centrifugación, se hidrolizó el extracto para cuantificar flavonoides por HPLC-DAD. Al comparar la extracción de flavonoides con la actividad anterior, se pudo ver un aumento en la recuperación de isorhamnetina en aproximadamente 1.5 veces, 722.8 µg/g con eChCl-X al 80 % (Tabla 23) y 495 µg/g con EtOH al 80 %; esto puede deberse a

que los DES son capaces de extraer compuestos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos debido a sus interacciones moleculares.

Tabla 23. Concentración de agliconas en extractos hidrolizados de *O. ficus-indica* utilizando solventes eutécticos profundos.

Muestra	Rendimiento ($\mu\text{g/g}$ de nopal seco)		
	Quercetina	Kaempferol	Isorhamnetina
eChCl-X	28.66 ± 0.87	74.47 ± 5.81	722.82 ± 80.31
eChCl-G	29.46 ± 3.06	78.96 ± 18.07	715.95 ± 187.21
ePro-X	32.15 ± 3.76	43.10 ± 6.68	238.00 ± 64.26
ePro-G	19.65 ± 2.27	28.63 ± 6.70	150.66 ± 78.32

Los mejores rendimientos para la extracción de flavonoides fueron los DES que se prepararon con cloruro de colina como HBA (Figura 30). Estos resultados superaron en aproximadamente cuatro veces a los obtenidos con los DES constituidos con L-prolina como HBA, lo cual se puede explicar observando las características hidrofílicas de las estructuras químicas de los componentes de los DES (Figura 31). El cloruro de colina es más hidrofílico debido a que es una sal iónica y, por lo tanto, forma enlaces de hidrógeno más fuertes con el agua y con el HBD correspondiente al DES; en cambio la L-prolina, si bien es hidrofílica, no es iónica, además de contener un anillo cíclico que reduce parcialmente su afinidad por el agua.

Como se mencionó en la extracción con solventes orgánicos, los flavonoides encontrados fueron obtenidos de la hidrólisis del extracto debido a que, en el nopal, éstos se encuentran en su mayoría unidos a uno o varios azúcares, i.e. son compuestos glicosilados. Es por esta razón que los DES constituidos con cloruro de colina como HBA fueron los mejores: porque, tanto ChCl-X como ChCl-G son DES altamente polares y por consiguiente pueden solubilizar a los flavonoides altamente polares como son los flavonoides glicosilados.

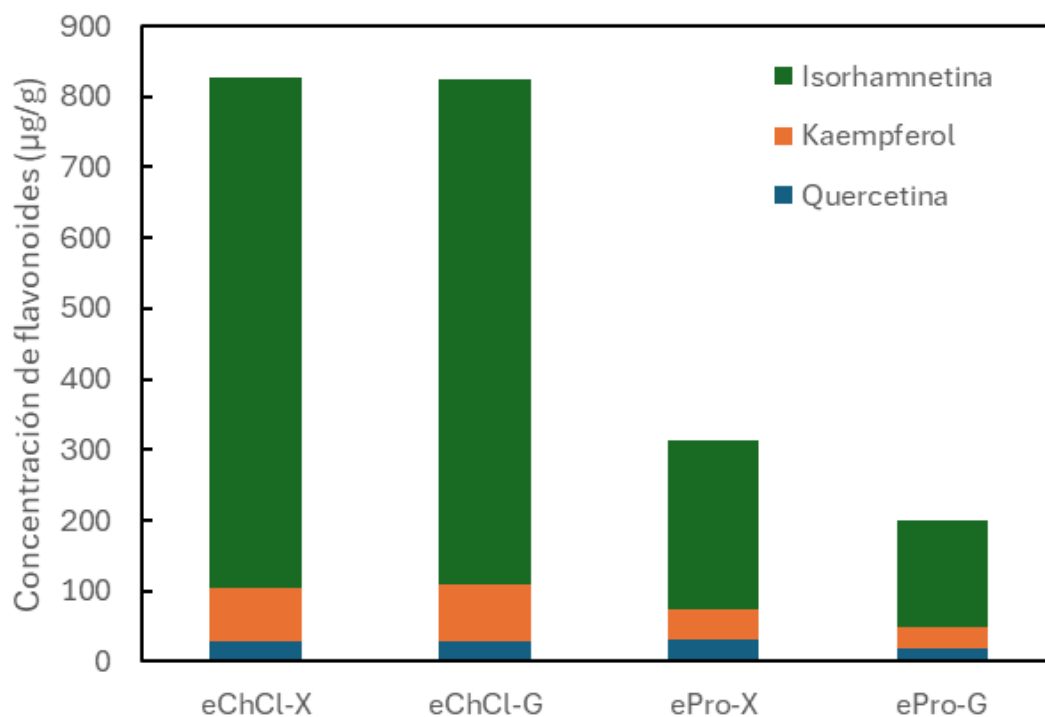


Figura 30. Concentración y perfil de agliconas en extractos hidrolizados de *O. ficus-indica* utilizando solventes eutécticos profundos.

Los DES con L-prolina como HBA serán más afines para extraer flavonoides de plantas que se constituyan de flavonoides libres, como sucedió en el trabajo de Duan et al. (2016). Si bien analizaron una lista amplia de DES para la extracción de metabolitos secundarios de plantas, concluyeron que la extracción de flavonoides (en plantas medicinales chinas, *Epimedii Folium*) fue altamente influenciada por los DES con prolina como HBA. Estas observaciones no son coincidentes con el presente trabajo ya que los rendimientos con cloruro de colina como HBA fueron mayores que los de prolina; entonces se puede teorizar que, al igual que la extracción con solventes orgánicos, la obtención de ciertos compuestos de interés depende de la composición de la planta utilizada y de qué tan accesibles sean éstos.

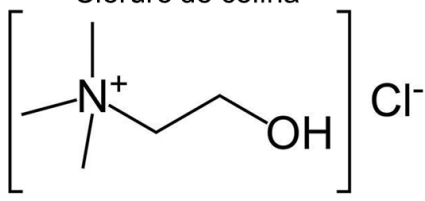
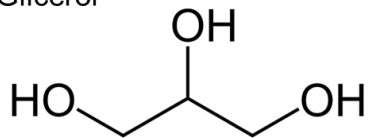
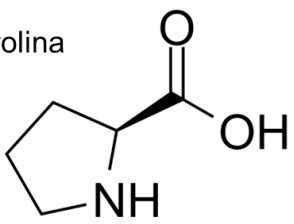
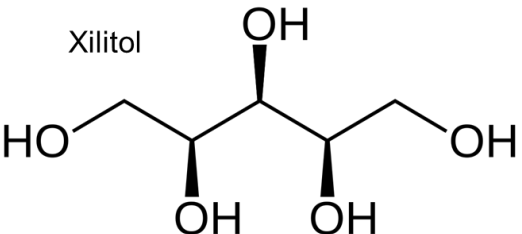
Aceptor de enlaces de hidrógeno	Donador de enlaces de hidrógeno
Cloruro de colina 	Glicerol 
L-prolina 	Xilitol 

Figura 31. Estructura química de los aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno utilizados para preparar los solventes eutécticos profundos. HBA: cloruro de colina y L-prolina. HBD: glicerol y xilitol.

Según la literatura (Tabla 24), después de elegir el mejor DES para la planta de estudio, lo más importante a elegir es la relación sólido-solvente y el porcentaje de dilución del DES en agua. Por ejemplo, para *Flos sophorae* la mejor concentración de DES fue 90 % y para las hojas de aceituna fue de aproximadamente el 50 %. Las razones principales por las que se diluye el DES en agua es para controlar algunas características fisicoquímicas como su viscosidad y su polaridad con el fin de lograr una mejor afinidad con los compuestos de interés (El Achkar et al., 2019).

Ünlü (2021) utilizaron NaDES para extraer oleuropeína y ácido cafeico de las hojas de aceituna. El NaDES que extrajo mayor cantidad de polifenoles fue el de cloruro de colina-fructosa-agua (5:2:5) con 187 mg GAE/g. Sin embargo, con el de glucosa-fructosa-agua (1:1:11) se obtuvieron 1630.8 mg/kg de oleuropeína y 112.77 mg/kg de ácido cafeico, lo cual es un aumento en la concentración en 30 % de lo obtenido con MeOH, 1221.17 mg/kg de oleuropeína.

Tabla 24. Comparación del rendimiento de la extracción de flavonoides utilizando solventes eutécticos profundos en diferentes plantas.

Muestra	DES	Extracción	Concentración de flavonoides	Referencia
<i>O. ficus-indica</i> var. Atlixco	Cloruro de colina:Xilitol:Agua 5:2:15 Cloruro de colina:Glicerol:Agua 1:1:3.5	250 mg + 5 mL DES al 80 % por 1 h @ 70 °C (+ hidrólisis y SPE)	800 µg flav/g	Este trabajo
Hojas de aceituna	Glucosa:Fructosa:Agua 1:1:11	63 mL/g, DES 47 % por 1 h @ 75 °C	1631 µg oleuropeína/g	Ünlü (2021)
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Ácido cítrico:Prolina 1:1	100 mg + 2 mL DES 60 % por 1 h @ 40 °C + ultrasonido (SPE)	152 mg flav/g de extracto	Oomen et al. (2020)
<i>Flos sphorae</i>	L-prolina:Glicerol 2:5	50 mg + 1 mL DES 90 % en ultrasonido por 45 min (+hidrólisis y SPE)	140 mg flav/g	Nam et al. (2015)
<i>Cacumen platycladi</i>	Cloruro de colina:Ácido levulinico 1:2 L-Prolina:Ácido levulinico 1:2	25 mg + 1 mL DES 90% + ultrasonido a 50 °C por 30 min	5 mg quercitrina/g	Zhuang et al. (2017)

Notas: DES, solvente eutéctico profundo; SPE, extracción en fase sólida; flav, flavonoides

6.2 ACTIVIDAD 2. EXTRACCIÓN DE HIDROCOLOIDES CON BIOMASA DE *O. FICUS-INDICA*

Esta actividad se dividió en dos partes; en la primera se evalúa la temperatura de extracción del hidrocoloide del nopal mediante maceración con agua a 25 y a 80 °C, y su efecto en el rendimiento y composición de este polisacárido. De igual manera para la segunda parte, se evalúa la temperatura de extracción del hidrocoloide extraído de la biomasa proveniente de un tren de extracción con solventes orgánicos, esto con el fin de recuperar en tres etapas los diferentes compuestos obtenibles de esta planta. En la Tabla 25 se puede observar que, para ambos casos, el hidrocoloide con mayor rendimiento fue aquel que se extrajo a una temperatura de 80 °C. Esto se puede deber a que, además del mucilago fácilmente extraíble con agua, la temperatura ayudó a la hidrólisis parcial de la pectina para su recuperación.

Tabla 25. Hidrocoloides obtenidos a partir de la biomasa de *O. ficus-indica*.

Biomasa	Proceso de extracción	Rendimiento (% p/p)	Referencia
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i> var. Atlixco	1:10 g/mL a 25 o 80 °C por 2 h y 200 rpm 3 vol etanol por 12 h, filtrado y secado	H25: 10.8 H80: 13.4 AM25: 17.1 AM80: 18.6	Este trabajo
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	1:4 g/mL en peso fresco por 12 h a T amb + 20 min a 80 °C Etanol o isopropanol 2:3, filtrado y secado	EtOH: 19 ISOP: 23.2	Mannai et al. (2023)
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i> var. Copena	1:10 g/mL, pH 3 a 90 °C por 1 h 1.5 vol de 2-isopropanol	Mucilago: 7 Pectina: 13.9	Peña-Valdivia & Sánchez-Urdaneta (2006)
Cladodios de <i>O. streptacantha</i>	1:1.5 g/mL, 90 °C por 5 min Etanol, filtrado y secado	Mucilago: 19.01	Reyes-Reyes et al. (2019)
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	Prevía extracción de mucilago 1:30 g/mL, 70 °C por 70 min en sonicación y pH 1.5 2 vol isopropanol por 12 h	Pectina: 18.64	Bayar et al. (2017)
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	Cladodios licuados, 80 °C y 500 rpm por 120 min 3 vol de etanol por 12 h	Mucilago: 6.91	Felkai-Haddache et al. (2016)

Notas: H25, extraído a 25 °C; H80, extraído a 80 °C; AM25, extraído a 25 °C después de extracción con acetona y metanol; EtOH, etanol; ISOP, isopropanol

Según Peña-Valdivia y Sánchez-Urdaneta (2006), la variedad Atlixco presentaba la menor cantidad de mucilago y pectina a comparación de otras

variedades como Copena V y Mordaza. También se menciona que las variedades preferidas por los consumidores suelen ser las que contienen menor cantidad de mucilago como Atlixco, Copena F1, Polotitlan y Solferin o; por consiguiente, las variedades con mayor rendimiento de hidrocolodes pueden ser utilizadas para su uso industrial. También se discute que, al hervir los cladodios, el rendimiento de pectina incrementaba en la variedad Milpa Alta.

De igual manera que la extracción de compuestos fenólicos, la extracción de hidrocoloides se ha llevado a cabo asistida por microondas y por ultrasonidos para irrumpir la pared celular de las plantas. Por ejemplo, Felkai-Haddache et al. (2016) tuvo un rendimiento del 8.8 % al extraer mucilago utilizando microondas con una potencia de 700 W y 5 min de exposición. Bayar et al. (2017) obtuvo un mayor rendimiento de pectina utilizando sonicación y un ajuste de pH, lo cual es común en la extracción de pectina con el fin de hidrolizar parcialmente su unión a la pared celular.

Por otro lado, Mannai et al. (2023) evaluó etanol e isopropanol como solventes para precipitar el mucilago obtenido de la extracción acuosa de los cladodios de *O. ficus-indica*; menciona que tanto el método de extracción como la purificación, el secado y la molienda del sustrato o del producto pueden modificar la estructura y composición del hidrocoloide extraído. En ese trabajo, se obtiene un mayor rendimiento al utilizar isopropanol como solvente precipitante, sin embargo, la composición bioquímica de los productos no fue afectada significativamente.

Los rendimientos de hidrocoloides en este trabajo son comparables con los discutidos anteriormente, incluso después de utilizar la biomasa extraída previamente con solventes orgánicos para la extracción de compuestos fenólicos.

6.3 ACTIVIDAD 3. PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR FERMENTACIÓN OSCURA DE *O. FICUS-INDICA* EN LOTE

Para arrancar los fermentadores productores de hidrógeno, se deben primero asegurar reactores anaerobios inoculadores capaces de mantener una producción constante de biomasa y biogás. El inóculo UANL (R1) se reactivó por un mes con un pulso de sacarosa y después se acondicionó con nopal licuado desde 100 de TRM hasta 50. De igual manera, se montó un reactor utilizando lodos de planta de tratamiento de aguas residuales, tierra de jardín y estiércol de vaca, llamado inóculo tres tercios (R2). Éste se acondicionó por dos semanas sin alimentación y un pulso de sacarosa. A partir del mes, se comenzó a acondicionar con nopal licuado para su posterior uso. La información completa de los reactores madre, su alimentación y producción se pueden encontrar en los anexos.

Se realizó el escalamiento de la producción de hidrógeno a partir de *O. ficus-indica* utilizando las mejores condiciones de operación reportadas en el grupo de trabajo (Carrillo-Verástegui et al., 2022) haciendo uso del inóculo UANL reactivado y pretratado térmicamente. La producción máxima acumulada de hidrógeno (Figura 32) fue de 828.3 mL H₂ correspondiente a un rendimiento máximo de 96.47 mL H₂/g SV (Tabla 26).

Tabla 26. Parámetros de la fermentación oscura escalada de *O. ficus-indica* y del ajuste no lineal utilizando la ecuación de Gompertz modificada.

Parámetros	Unidades	iMT	Carrillo-Verástegui et al. (2022)
H_{max}	NmL H ₂	828.3	435.6
	NmL H ₂ /g SV	96.47	41.02
R_{max}	NmL H ₂ /h	65.7	10.3
	NmL H ₂ /g SV-h	7.66	
λ	h	13.6	8.3
R²	–	0.997	
pHi – pHf	–	6.7 – 6.17	NR – 6.2
AOVs	mg/L	157	25.35
STi	g ST/100 g BH	10.44	NR
SVi	g SV/100 g ST	65.29	NR
STf	g ST/100 g BH	7.82	16.74
SVf	g SV/100 g ST	57.65	49.13

Notas: H_{max}, producción máxima de hidrógeno; R_{max}, tasa de producción máxima de hidrógeno; λ, fase de latencia; AOVs, ácidos orgánicos volátiles; STi, sólidos totales iniciales; SVf, sólidos volátiles finales; BH, base húmeda; NR, no reportado.

Con el escalamiento realizado (tres veces el volumen de operación de la referencia), se esperaba un aumento proporcional de la producción máxima. Sin embargo, tanto para la producción como el rendimiento de hidrógeno, aumentaron en 1.9 y 2.2 veces, respectivamente, a comparación con lo reportado en Carrillo-Verástegui et al. (2022). Por lo contrario, se observó una relación indirecta con la concentración de AOVs, la cual fue 157 mg/L y esta fue 6.28 veces mayor al reactor con volumen de operación de 50 g, lo cual corresponde a aproximadamente al doble del escalamiento realizado. Esto podría explicarse con la humedad del reactor, ya que en este trabajo se utilizó aproximadamente 10 % de ST iniciales, mientras que en el trabajo anterior los sólidos iniciales fueron mayores a los reportados como finales (>16.74 % ST).

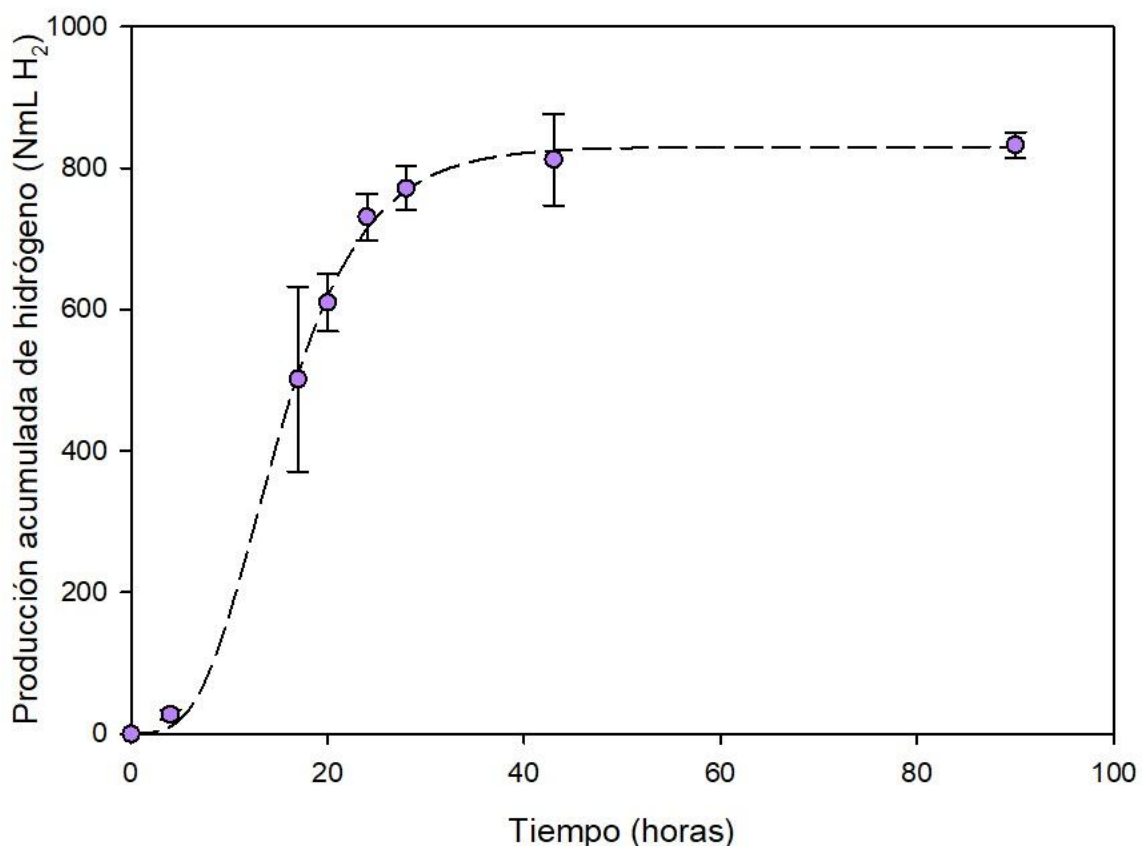


Figura 32. Producción acumulada de hidrógeno (NmL H₂) a partir de *O. ficus-indica*. Ajuste de datos: Ecuación de Gompertz modificada.

Debido a que no hay suficiente documentación en la fermentación oscura de nopal, se realizó una comparación con la producción de hidrógeno utilizando sustratos fácilmente fermentables (Tabla 27). El rendimiento máximo de hidrógeno es comparable con el obtenido por Panin et al. (2021) utilizando residuos de cebolla; en su trabajo utilizan la misma concentración de ST del reactor y RIS de 0.63, con los cuales obtuvieron 151.67 mL H₂/g SV. De manera similar, Thi Nguyen et al. (2021) evaluaron desperdicios alimenticios como sustrato a RIS 0.13; obtuvieron 137.73 mL H₂/g SV después de una fase de latencia equivalente a aproximadamente un cuarto de aquella obtenida en este trabajo al utilizar nopal. La razón principal es la composición de los desperdicios de comida, ya que comúnmente son sustratos fácilmente degradables y con bajos contenidos de lignina y otros compuestos recalcitrantes.

Tabla 27. Producción de biohidrógeno por fermentación oscura en lote de sustratos fácilmente degradables (bajo contenido de lignina).

Sustrato	Condiciones de operación	Resultados	Referencia
Cladodios secos de <i>O. ficus-indica</i>	Batch 37 °C pH 6 RIS 0.2 150 g ST _R 10 %	H _{max} = 90.76 mL H ₂ /g SV R _{max} = 65.7 mL H ₂ /h λ = 13.6 h	Este trabajo
Residuo de cebolla	Batch 35 °C pH 7 RIS 0.63 70 g ST _R 10 % 120 rpm	H _{max} = 151.67 mL H ₂ /g SV	Panin et al. (2021)
Desperdicios de alimentos	Batch 35 °C pH 7.2 RIS 0.13 60 mL	H _{max} = 137.73 mL H ₂ /g SV λ = 3.9 h	Thi Nguyen et al. (2021)
Desperdicios de alimentos	Batch 55 °C pH 4.5 RIS 2 600 mL 3.4 g SV/L sustrato	H _{max} = 61 mL H ₂ /g SV R = 0.7 mL/h λ = 113.6 h	Ghimire et al. (2016)
Cáscara de naranja	Batch 35 °C pH 7 RIS 0.6 70 mL	H _{max} = 68.94 mL H ₂ /g SV	López Hernández (2023)
Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos	Batch 55 °C pH 7 RIS 0.5 500 mL 6 g SV/L sustrato	H _{max} = 62.5 mL H ₂ /g SV	Alavi-Borazjani et al. (2021)

Notas: H_{max}, producción máxima de hidrógeno; R_{max}, tasa de producción máxima de hidrógeno; λ, fase de latencia; RIS, relación inóculo sustrato; ST_R, sólidos totales del reactor

6.4 ACTIVIDAD 4. EFECTO DEL TIPO DE INÓCULO HIDROGENOGENICO SOBRE LA FERMENTACIÓN OSCURA EN LOTE

En la Figura 33 se demuestra que la utilización del inóculo fermentado directamente (iF; sin tratamiento posterior a la primera FO) en un segundo proceso de fermentación oscura fue el inóculo que tuvo mayor producción máxima de hidrógeno (268.5 NmL H₂) y rendimiento máximo (40.82 NmL H₂/g SV); el análisis de varianza muestra que hay una diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.003$) y, con la prueba t por pares, confirmamos que iF es la que más demuestra esta diferencia a comparación de los otros tratamientos. El lavado del inóculo (iFL), el tratamiento térmico (iFT) y la combinación de estos dos (iFLT) alcanzaron alrededor de 120 NmL H₂ y 18 NmL H₂/g SV, lo cual es la mitad de la producción y rendimientos obtenidos con iF.

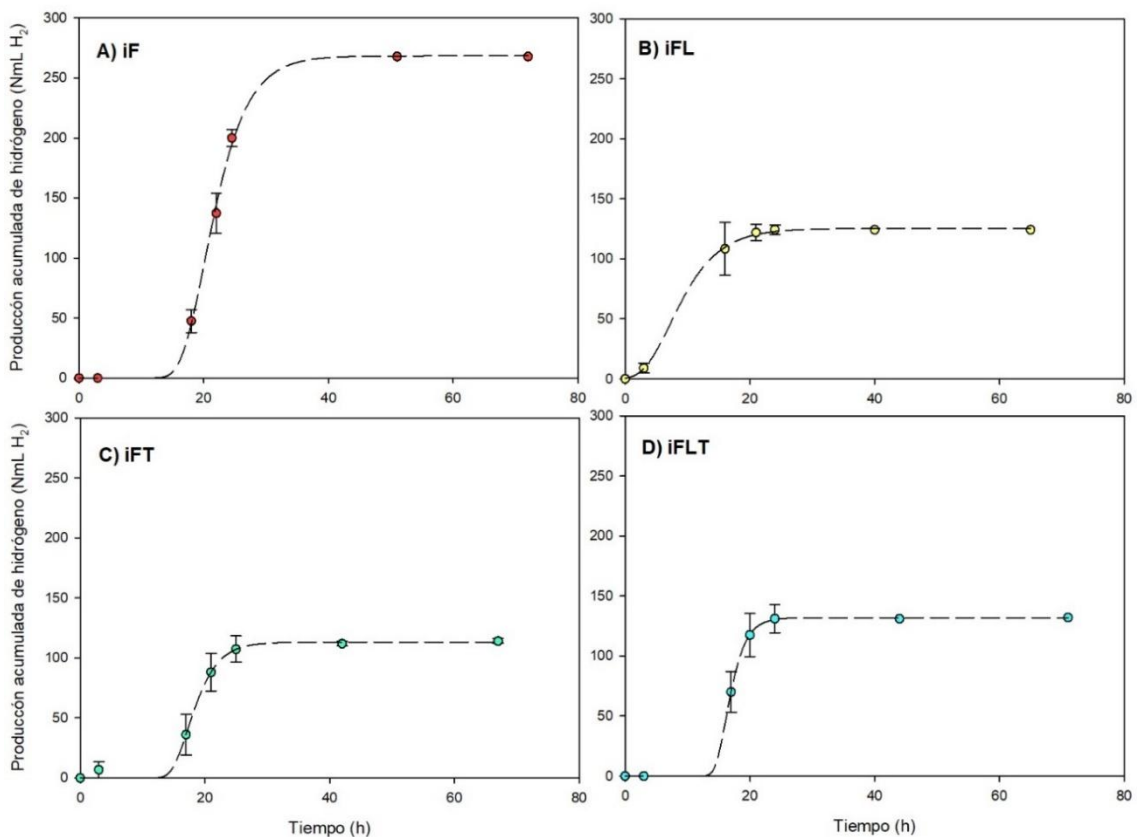


Figura 33. Producción acumulada de hidrógeno a partir de *O. ficus-indica* reutilizando el lodo fermentado como inóculo.

A) iF: inóculo sin tratamiento; B) iFL: inóculo fermentado lavado con agua destilada y centrifugado; C) iFT: inóculo fermentado tratado térmicamente; D) iFLT: inóculo fermentado lavado con agua destilada, centrifugado y tratado térmicamente.

Por otro lado, considerando la re-fermentación (las dos etapas o ciclos de fermentación oscura), la producción y el rendimiento acumulado total para el ciclo F-iF fue de 1096.65 NmL H₂; y 131.58 NmL H₂/g SV; la segunda etapa aporta cerca del 24 % y 31 % de la producción y el rendimiento acumulado total, respectivamente.

Tabla 28. Parámetros del ajuste no lineal de los datos de la producción acumulada de hidrógeno utilizando la ecuación de Gompertz modificada.

Parámetros	Unidades	iF	iFL	iFT	iFLT
H_{max}	NmL H ₂	268.35	125.99	112.21	131.69
	NmL H ₂ /g SV	40.82	19.12	17.03	19.99
R_{max}	NmL H ₂ /h	26.02	10.52	16.11	27.90
	NmL H ₂ /g SV-h	3.95	1.6	2.45	4.24
λ	h	20.22	7.33	17.32	16.20
R²	-	0.998	0.999	0.996	0.999

Notas: H_{max}, producción máxima de hidrógeno; R_{max}, tasa de producción máxima de hidrógeno; L, fase de latencia; AOVs, ácidos orgánicos volátiles; SV, sólidos volátiles.

La producción acumulada máxima de los tres pretratamientos del iF, i.e. iFL, iFT, e iFLT, fue aproximadamente el 50 % de la obtenida con el iF (Tabla 28), por lo que no es necesario hacer un tratamiento adicional al lodo fermentado de la primera etapa de fermentación oscura para aumentar el rendimiento de hidrógeno en la segunda etapa. Los inóculos iFL e iFLT generaron un subproducto adicional que consiste en una solución de AOVs con concentraciones de entre 119 y 200 mg/L (Tabla 29). Estos AOVs pueden ser aprovechados en procesos de fotofermentación (López-Hernández, 2022) para obtener un mayor rendimiento total de hidrógeno o como sustrato para obtención de otros productos de valor agregado con la aplicación de distintos procesos biotecnológicos, como la obtención de polihidroxicanoatos con bacterias fotosintéticas (Liang et al., 2024), producción de electricidad con celdas de combustible microbianas o conversión de AOVs a lípidos para la producción de biodiesel (Sekoai et al., 2021).

Tabla 29. Propiedades iniciales del lodo del reactor y finales del fermentado para los cuatro reactores evaluados.

Parámetros	Inicial				Final			
	RiF	RiFL	RiFT	RiFLT	RiF	RiFL	RiFT	RiFLT
ST (g ST/100 g BH)	10.02	8.76	9.61	8.38	8.6	8.55	9.43	7.04
SV (g SV/100 g ST)	65.61	77.32	75.42	79.49	72.26	78.98	74.92	74.72
SV (g SV/100 g BH)	6.57	6.77	7.25	6.66	6.21	6.75	7.06	5.26
pH	5.33	5.24	5.73	5.2	4.84	4.8	5.54	5.59
AOVs (mg/L)	NA	NA	NA	NA	83.57	17.32	109.05	33.23
AOVs L (mg/L)	NA	118.93	NA	199.74	NA	NA	NA	NA

Notas: el prefijo R en los ensayos significa “reactor”, i.e. la mezcla del inóculo y del sustrato; AOVs, ácidos orgánicos volátiles; STi, sólidos totales iniciales; SVf, sólidos volátiles finales; BH, base húmeda; NA, no analizado/no aplica.

De las referencias con sistemas similares (Tabla 30) , Muñoz-Páez et al. (2012) exploraron el potencial de la fermentación hidrogenogénica en sustrato sólido con venteo intermitente en dos etapas con lavado de su segundo sustrato; esto se debió a que, al finalizar su primera fermentación oscura, se determinó una alta concentración de biomasa en los sólidos gastados y supusieron que los metabolitos orgánicos inhibían la producción de hidrógeno en un determinado tiempo. La re-fermentación de los sólidos gastados y lavados lograron producir 14.5 % de lo obtenido con la primer reactor. En comparación con el presente trabajo, lo que se reutilizó fue el inóculo y no el sustrato; en la re-fermentación utilizando iF como inóculo se obtuvo 32.4 % del biohidrógeno producido en la primera etapa.

Lunprom et al. (2019) realizaron un proceso en lote secuencial utilizando fermentación anaerobia en fase sólida y fermentación oscura utilizando *Chlorella* sp.; se encontró que ceca del 70 % del rendimiento total de hidrógeno provenía de la fermentación en fase sólida, lo cual convierte a este tipo de proceso en lo más viable cuando se requiera de la operación de reactores hidrogenogénicos a partir de microalgas.

Regueira Marcos et al. (2025) utilizó el proceso de fermentación oscura impulsada por lactato en su primer reactor, sin embargo, no hubo producción detectada. Observaron que a medida que disminuían el tiempo de residencia

hidráulico, la productividad del sistema de lactato-hidrógeno aumentaba a 4.4 L H₂/L-d (HRT = 6 h). Sin embargo, se logró mayor rendimiento al utilizar una sola etapa (alimentación del reactor de hidrógeno) 39.5 mL H₂/g SV a HRT 12 h.

Tabla 30. Producción de biohidrógeno en dos etapas de fermentación utilizando sustratos orgánicos.

Sustrato	Primer etapa	Segunda etapa	Referencia
Cladodios de <i>O. ficus-indica</i>	FO de nopal (batch) V = 500 mL (Vop = 150 g) T = 37 °C RIS = 0.2 10 % ST HY = 90.76 mL H ₂ /g SV	FO de iF (batch) V = 500 mL (Vop = 100 g) T = 37 °C RIS = 0.2 10 % ST HY = 40.82 mL H ₂ /g SV	Este trabajo
Residuos de origen doméstico	Reactor de lactato CSTR T = 37 °C V = 1.1 L (Vop = 0.9 L) pH = 3.5 (sin producción de H ₂)	Reactor de hidrógeno CSTR T = 37 °C V = 1.2 L (Vop = 0.8 L) pH = 5 HPR = 4.4 L H ₂ /L-d HY = 22.9 mL H ₂ /g SV	Regueira-Marcos et al. (2025)
Biomasa de microalga <i>Chlorella</i> sp. TISTR 8411	ASSF (batch) 51.5 % ST pH = 6 RIS = 0.27 HY = 11.6 mL H ₂ /g SV	ASSF residuos (batch) T = 35 °C Sustrato = 40 g SV/L pH = 6 RIS = 0.066 150 rpm HY = 4.6 mL H ₂ /g SV	Lunprom et al. (2019)
Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos	SSAHF-IV (batch) V = 250 mL (Vop = 100 g; 20 g ino + 80 g sus) T = 37 °C HP = 16.6 mmol H ₂ = 371.84 mL H ₂ = 127.12 mL H ₂ /g SV	SSAHF-IV (batch) Sólidos gastados pH = 6.3 HP = 2.4 mmol H ₂ = 53.8 mL H ₂ = 38.4 mL H ₂ /g SV	Muñoz-Páez et al. (2012)

Notas: HPR: hydrogen production rate; HY: hydrogen yield; CSTR; continuous stirred tank reactor; ASSF: anaerobic solid-state fermentation; RIS: relación inóculo sustrato; SSAHF-IV: solid substrate anaerobic hydrogenogenic fermentation with intermittent venting; a condiciones de temperatura y presión estándar, 1 mol de H₂ es equivalente a 22.4 L de H₂;

6.5 ACTIVIDAD 5. PRODUCCIÓN DE METANO POR DIGESTIÓN ANAEROBIA DE LODOS FERMENTADOS HIDROGENOGENICOS EN SEMI-CONTINUO

Los reactores semi-continuos de producción metanogénica se pusieron en marcha utilizando el inóculo “tres tercios”. Como se describe en el apartado de la preparación de los reactores inoculadores, el reactor madre “tres tercios” se mantuvo en arranque por un mes y posteriormente fue alimentado por 3 meses con licuado de nopal. Luego del tiempo de arranque y aclimatación, se alimentó por 55 días a un TRM de 40 días aplicando una alimentación intercalada de nopal fresco y lodos fermentados (iFi) para simular la recuperación del reactor metanogénico. La alimentación de los reactores se llevaba a cabo cada 3 - 4 días (dos veces a la semana). La caracterización inicial y las condiciones de operación del ensayo metanogénico se pueden ver en la Tabla 31.

Tabla 31. Caracterización inicial de los reactores metanogénicos.

Parámetro	Unidades	Valor
TRM	d	40
Masa de reactor	g	500
ST	g ST/100g BH	13.50
SV	g SV/100g ST	29.57
pH	-	8.06
Alcalinidad	mg CaCO ₃ /L	1128.33
AI/AP	-	0.45

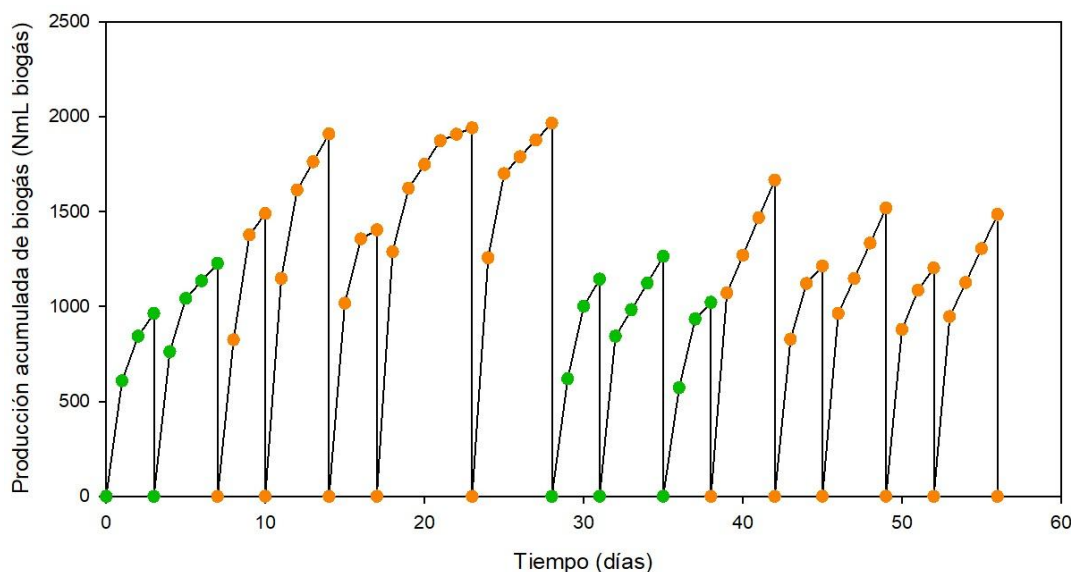


Figura 34. Producción acumulada de biogás por alimentación. Los puntos verdes representan la alimentación de nopal, mientras que los naranjas representan la alimentación de lodos de FO.

En la Figura 34 podemos observar gráficamente la producción acumulada de biogás (promedio del triplicado) del reactor metanogénico; la producción de biogás procedente de la alimentación de los sólidos fermentados fue mayor a aquella que se generó al alimentar el reactor con nopal.

Tabla 32. Producción y rendimiento máximos de la digestión anaerobia por alimentación.

Sustrato- no. de alim	Producción (NmL)	Rendimiento (NmL/g SV)	pH	IA/PA
N-1	962.57 ± 153.23	525.82 ± 83.71	8.55 ± 0.09	0.31 ± 0.02
N-2	1226.94 ± 6.78	502.68 ± 2.78	8.18 ± 0.13	0.39 ± 0.07
F-1	1489.04 ± 17.06	628.07 ± 7.20	8.01 ± 0.14	0.38 ± 0.11
F-2	1909.32 ± 31.31	604.00 ± 9.90	8.19 ± 0.15	0.32 ± 0.10
F-3	1403.18 ± 24.44	591.85 ± 10.31	8.05 ± 0.17	0.42 ± 0.14
F-4	1940.95 ± 31.31	614.01 ± 9.90	8.22 ± 0.04	0.32 ± 0.07
F-5	1965.81 ± 52.94	621.87 ± 16.75	8.05 ± 0.13	0.35 ± 0.02
N-3	1143.33 ± 28.22	468.43 ± 11.56	7.98 ± 0.07	0.34 ± 0.06
N-4	1263.09 ± 54.79	517.49 ± 22.45	8.35 ± 0.06	0.29 ± 0.03
N-5	1021.32 ± 75.59	557.91 ± 41.29	7.93 ± 0.03	0.31 ± 0.02
F-6	1665.29 ± 23.81	606.55 ± 8.67	8.47 ± 0.04	0.26 ± 0.05
F-7	1213.38 ± 17.93	589.27 ± 8.71	8.02 ± 0.12	0.27 ± 0.07
F-8	1518.42 ± 11.74	553.06 ± 4.28	8.36 ± 0.20	0.19 ± 0.01
F-9	1202.08 ± 32.03	583.78 ± 15.56	8.02 ± 0.12	0.36 ± 0.07
F-10	1484.52 ± 57.92	540.71 ± 21.10	8.06 ± 0.15	0.35 ± 0.09

Notas: N, nopal; F, lodos de fermentación oscura; SV, sólidos volátiles; IA/PA, alcalinidad intermedia/alcalinidad parcial

Los valores numéricos de la producción y rendimiento máximo por alimentación del reactor, además del pH y la relación IA/PA se muestran en la Tabla 32. El rendimiento máximo de biogás en la primera etapa de alimentación de nopal fue de 514 NmL biogás/g SValim, mientras que para la primer alimentación del lodo digerido fue de 611.96 NmL biogás/g SValim; el rendimiento de biogás en la digestión anaerobia aumentó aproximadamente 20 % cuando se utilizaron los lodos fermentados como alimentación a comparación del nopal fresco. Esto quiere decir que, además de no disminuir el rendimiento de biogás cuando se agrega una alimentación de lodos digeridos de fermentación oscura en el reactor de digestión anaerobia, da un aumento tanto en la producción como en el rendimiento de biogás; esto se puede deber a que, además de la hidrólisis

de la biomasa del nopal en la FO, el lodo proveniente de la etapa anterior mantenga ciertos microorganismos (hidrogenogénicos o hidrogenotróficos ¿?) que pueden trabajar en sinergia con el inóculo metanogénico de la digestión anaerobia.

En promedio, el pH se mantuvo en 8.17, lo cual mantiene un ambiente deseable para la producción de biometano en estas condiciones de operación. La producción y el rendimiento máximo por alimentación, además de la relación IA/PA se puede observar gráficamente en la Figura 35.

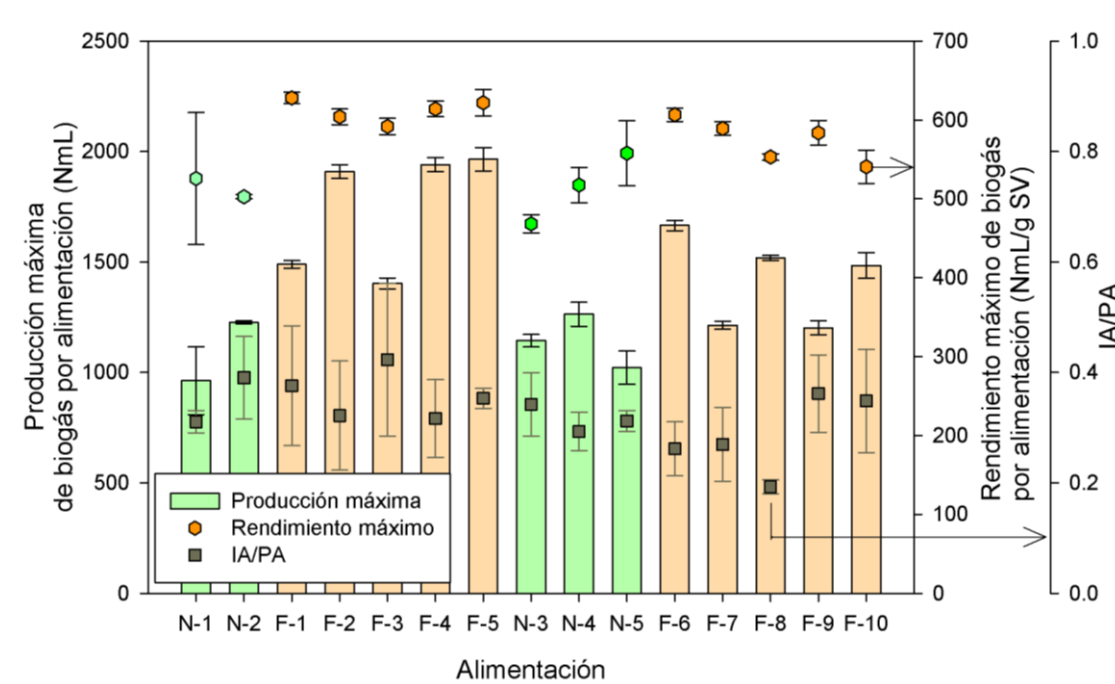


Figura 35. Producción y rendimiento máximo de biogás en la digestión anaerobia en semi-continuo.

Debido a que no hay referencias directas sobre la fermentación oscura de *O. ficus-indica*, por consecuencia tampoco se han encontrado artículos que mencionen el uso del nopal para un proceso hidrogenogénico-metanogénico en dos etapas (H-M); sin embargo, la evaluación de este tren de tratamiento ha sido trabajada para otros sustratos, principalmente para residuos orgánicos (Tabla 33). En su mayoría, los sistemas aquí mostrados se trabajaron de manera semi-continua, a temperatura mesofílica, los reactores hidrogenogénicos monitoreados a pH 5.5 y los reactores metanogénicos a 7.5, aproximadamente.

Zahedi et al. (2016) estudiaron la actividad en las comunidades microbianas durante los procesos de producción de hidrógeno y de metano en un proceso de co-digestión en dos etapas; en este se utilizaron lodos activados y la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos. En comparación con el presente trabajo, la producción específica de hidrógeno (29 L H₂/kg TVS) obtenida por Zahedi et al. (2016) es menor en aproximadamente cuatro veces a comparación del rendimiento de hidrógeno (131.58 mL H₂/g SV) del proceso en lote en dos etapas para *O. ficus-indica*. En cuanto al desempeño de la digestión anaerobia de los efluentes de FO, y suponiendo que la concentración de metano en el biogás obtenido con nopal fue del 50 %, los rendimientos son comparables con aquellos provenientes de los desechos orgánicos a pesar de que ambos (hidrogenogénesis y metanogénesis) se realizaron a temperatura ligeramente termofílica, lo cual, según literatura, favorece la producción de biogás.

Rios-Del Toro et al. (2021) utilizaron hidrolizados detoxificados de bagazo de agave para la producción de hidrógeno y metano en dos etapas, en la cual los efluentes del reactor de hidrógeno se utilizaron como sustrato para el reactor metanogénico. Como conclusión, sugieren que la detoxificación del hidrolizado solo se prefiere cuando desea obtenerse hidrógeno como producto principal.

Tanto Ríos-Del Toro et al. (2021) como Montiel-Corona y Razo-Flores (2018) utilizaron hidrolizados de bagazo de agave para la producción secuencial de hidrógeno y metano; los resultados de ambos procesos son comparables con el presente trabajo, lo cual destaca al compararse con sustratos hidrolizados ya que resta una etapa de pretratamiento necesario para el mismo rendimiento por cantidad de sustrato.

De manera similar, Rafieenia et al. (2018) evaluaron el efecto del pretratamiento del inóculo hidrogenogénico con aceite usado en la producción de hidrógeno y metano en dos etapas en lote; el rendimiento de hidrógeno alcanza el rendimiento máximo aproximadamente a las 40 h, lo cual también se observa en los resultados presentados anteriormente para la producción de hidrógeno con *O. ficus-indica*.

Tabla 33. Producción de biogás en dos etapas (H-M) utilizando sustratos de diferente origen.

Sustrato	Hidrogenogénesis	Metanogénesis	Referencia
<i>O. ficus-indica</i>	FO (batch en 2 etapas) RIS = 0.2 ST = 10 % BH V = 500 mL (Vop = 150 g) T = 37 °C HY = 131.58 mL H ₂ /g SV	DA (TRM = 40 d) OLR = 1.4 g SV/kg-d Alimentación semi-continua (3-4 días) V = 1 L (500 g) T = 37 °C BY = 611.96 mL biogás/g SValim	Este trabajo
Fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos	CSTR Vop = 3.5 L T = 55 °C Alimentación semi-continua (diaria) OLR = 16 kg TVS/m ³ -d HRT = 3 d pH = 4.75 HVPR = 0.432 L H ₂ /L-d SHP = 29 L H ₂ /kg TVS	CSTR (70 días) Vop = 18.5 L T = 55 °C Alimentación semi-continua (diaria) OLR = 3 kg TVS/m ³ -d HRT = 16 d pH = 7.97 MVPR=0.59 L CH ₄ /L-d SMP = 287 L CH ₄ /kg TVS	Zahedi et al. (2016)
Hidrolizados detoxificados de bagazo de agave	AnSBR Vop = 1.4 L T = 37 °C pH = 5.5 HVPR = 20.3 mL H ₂ /L-h HY = 0.8 mol H ₂ /mol azúcar (99.46 mL H ₂ /g SV)	AnSBR metanogénico Vop = 1.6 L T = 37 °C pH 7.3 MVPR = 0.44 L CH ₄ /L-d MY = 0.22 L CH ₄ /g COD	Rios-Del Toro et al. (2021)
Hidrolizados de bagazo de agave	CSTR (continuo) Vop = 1 L T = 35 °C 150 rpm pH = 5.5 OLR = 44 g COD/L-d HRT = 6 h HY = 105 mL H ₂ /g bagazo	UASB (continuo) Vop = 1.25 L T = 23- 25 °C pH = 7 OLR = 20 g COD/L-d HRT = 14 h MY = 225 mL CH ₄ /g bagazo	Montiel Corona & Razo-Flores (2018)
Desperdicios de alimentos (inóculo pretratado con aceite de cocina usado)	Batch FO V = 500 mL (Vop = 250 mL) pH = 5.5 5 g SV/L FW T = 35 °C t = 96 h HY = 76.1 mL H ₂ /g SV	Batch DA V = 500 mL (Vop = 250 mL) pH = 7 5 g SV/L lodo T = 35 °C t = 32 d MY = 598.2 mL CH ₄ /g SV	Rafieenia et al. (2018)

Notas: FO, fermentación oscura; DA, digestión anaerobia; RIS, relación inóculo sustrato; HY, rendimiento de hidrógeno; BY, rendimiento de biogás; OLR, organic loading rate; HRT, hydraulic retention time; HVPR, hydrogen volume production rate; SHP, specific hydrogen production; SMP, specific methane production; TVS, total volatile solids; ST, sólidos totales; BH, base húmeda; AnSBR, anaerobic sequencing batch reactor; MY, methane yield; COD, chemical oxygen demand; a condiciones de temperatura y presión estándar, 1 mol de H₂ es equivalente a 22.4 L de H₂; TRM, tiempo de residencia másico;

6.7. ACTIVIDAD 6. EVALUACIÓN DE TRANSFORMACIÓN DE *O. FICUS-INDICA* EN BIOPRODUCTOS PARA ESCENARIOS DE BIORREFINERÍA

Los escenarios de biorrefinería permitieron evaluar el mejor conjunto de procesos para maximizar el aprovechamiento de la biomasa de *O. ficus-indica* y para la obtención de diversos productos de valor agregado. En cada escenario fue fundamental hacer uso de los datos enlistados en la Tabla 34 para realizar cada uno de los balances de materia por proceso y por conjunto de procesos.

Tabla 34. Datos recopilados de cada actividad para realizar los balances de materia correspondientes a cada escenario.

Parámetro	Dato	Unidades
Relación inóculo-sustrato	0.2	g SVino/g SVsus
Rendimiento de hidrógeno en FO	96.47	mL H ₂ /g SValim
Sólidos volátiles de <i>O. ficus-indica</i>	0.8136	g SV/g ST
Sólidos totales del inóculo pretratado	0.0927	g ST/g BH
Sólidos volátiles del inóculo pretratado	0.3077	g SV/g ST
Densidad relativa de hidrógeno	0.09	mg H ₂ /mL H ₂
Densidad relativa de metano	0.72	mg CH ₄ /mL CH ₄
Densidad relativa de dióxido de carbono	1.98	mg CO ₂ /mL CO ₂
Sólidos totales de los lodos de FO	0.0782	g ST/g BH
Sólidos volátiles de los lodos de FO	0.5765	g SV/g ST
Rendimiento de biogás en DA	612	mL biogás/g SValim
Rendimiento del extracto	22.61	mg extracto/mL
Rendimiento de compuestos fenólicos	7.62	mg GAE/g nopal
Densidad del etanol	0.79	g/mL
Densidad del etanol al 80 %	0.86	g/mL
Rendimiento de hidrocoloide	0.186	g/g biomasa

Para los cálculos en el proceso de fermentación oscura, se utilizaron los sólidos volátiles iniciales del sustrato y del inóculo, la RIS, la producción máxima de hidrógeno y la suposición de que el biogás obtenido fue 50 % en volumen hidrógeno y dióxido de carbono; se convirtieron los volúmenes de ambos gases a peso utilizando la densidad relativa de los gases a presión y temperatura estándar. El balance de materia para la fermentación oscura se muestra en la Tabla 35.

El balance de materia en el digestor anaerobio (Tabla 36) tomó en cuenta el rendimiento de biogás en DA igual a 612 mL de biogás/g SV alimentado y una concentración equimolar de biometano y de dióxido de carbono. También, se corrigió el biogás producido relacionándolo con la cantidad de SV de la salida del

reactor hidrogenogénico. En el escenario Biocombustibles donde hay producción de hidrógeno y metano (Figura 36), el rendimiento de nopal aumenta de 0.71 % (hidrógeno) o 12.7 % (metano) a 16.39 %. Cuando se toma en cuenta el dióxido de carbono generado, al aprovechamiento es el 75.08 % del nopal alimentado al proceso H-M.

Tabla 35. Balance de materia en el proceso de fermentación oscura.

Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Masa del componente			% masa del total
		g BH	g	g SV	
Entrada al FO	<i>O. ficus-indica</i>	96.41	9.40	7.65	6.27
	-Agua	-	87.01	-	58.01
	Inóculo anaerobio P	53.59	4.97	1.53	3.31
	-Agua	-	48.62	-	32.41
Total		150	150	9.18	
Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Volumen mL	Masa g	% masa del total	
Salida gaseosa del FO	Hidrógeno	737.79	0.07	4.35	
	Dióxido de carbono	737.79	1.46	95.65	
Total		1475.57	1.53		
Masa del componente					
		g BH	g	g SV	
Salida sólida de la FO	Lodos FO	148.47	11.61	6.69	
	-Agua	x	136.86		
Total		148.47	148.47		

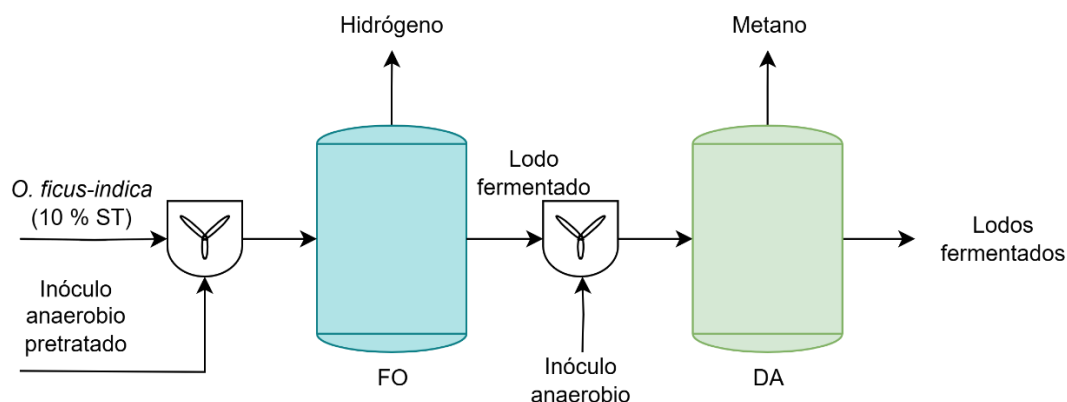


Figura 36. Escenario bioproductos; producción secuencial de biohidrógeno y biometano a partir de la fermentación anaerobia de *O. ficus-indica*.

Tabla 36. Balance de materia en el proceso de digestión anaerobia.

Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Masa del componente			% del total
		g BH	g	g SV	
Entrada a DA	Lodos FO	148.47	11.61	6.69	0.69
	-Agua	-	136.86	-	8.11
	Inóculo anaerobio	1538.7	160.02	56.89	9.48
	-Agua	-	1378.69	-	81.72
Total		1687.19	1687.19	63.59	
Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Volumen mL	Masa g	% masa del total	
Salida gaseosa de DA	Metano	2048.21	1.47	26.67	
	Dióxido de carbono	2048.21	4.06	73.33	
Total		4096.42	5.53		
		Masa del componente			
		g BH	g	g SV	
Salida sólida de DA	Lodos DA	1681.66	182.12	56.77	
	-Agua	-	1499.54	-	
Total			1681.66		

Notas: el biogás se supuso 50 % metano; se realizaron los cálculos a partir de los lodos fermentados obtenidos en la fermentación oscura.

Por otro lado, al realizar un balance de materia en el proceso de extracción de compuestos fenólicos (Tabla 37), se calcularon las corrientes utilizando el rendimiento del extracto crudo (22 mg/mL) y el rendimiento de los compuestos fenólicos totales, que en promedio fue 7.62 mg GAE/g de nopal seco para la extracción utilizando solventes orgánicos al 80 %. El escenario de antioxidantes por sí solo transforma únicamente el 6.35 % de la masa de nopal en biocompuestos, esto tomando en cuenta el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos equivalentes a ácido gálico. Si se calcula el aprovechamiento con la masa total, utilizando la masa de extracto crudo, se obtiene un 18.84 % de rendimiento con respecto al nopal seco.

Tabla 37. Balance de materia en la extracción de compuestos fenólicos utilizando solventes orgánicos al 80 %.

Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Masa g	Volumen mL	% masa del total
Entrada a Ax	<i>O. ficus-indica</i>	3	-	10.73
	Solvente orgánico	18.96	24	67.81
	Agua	6	6	21.46
Total		27.96	30	
		Volumen	Masa	

Nombre de la corriente	Componente de la corriente	mL	g	% masa del total
Salida sobrenadante	Extracto crudo	-	0.57	2.66
	-Fenólicos	-	0.19	0.90
	Solvente + agua	24.02	20.66	97.34
Total			21.23	
Salida sólido	Biomasa exA	-	2.43	36.15
	Solvente+agua	5	4.30	63.85
Total			6.73	

Al realizar el balance en la extracción de hidrocoloides (Tabla 38) se utilizó el rendimiento de 18.6 % obtenido de la extracción secuencial y a 80 °C. Entonces, en el escenario bioproductos, el rendimiento aumentó a 33.94 % (Figura 37), afectado principalmente por el rendimiento de hidrocoloides. Este escenario tiene el menor factor ambiental de todos los evaluados, es decir, el que menos residuos genera; este factor se calcula con la cantidad real de residuos producidos en el proceso (todo lo que no es el producto deseado, sin tomar en cuenta el agua) entre la cantidad de producto obtenido.

Tabla 38. Balance de materia en el proceso de extracción de hidrocoloides.

Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Masa g	Volumen mL	% masa del total
Entrada a C	Biomasa exA	2.43	-	2.35
	Agua caliente	24.35	24.35	23.47
	Etanol	76.94	97.39	74.18
Total		103.72		
Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Volumen mL	Masa g	% masa del total
Salida sólido	Hidrocoloide	-	0.45	18.60
	Biomasa exC	-	1.98	81.40
Total			2.43	
Salida sobrenadantes	Etanol	97.39	76.94	
	Agua	24.35	24.35	
Total		121.74	101.29	

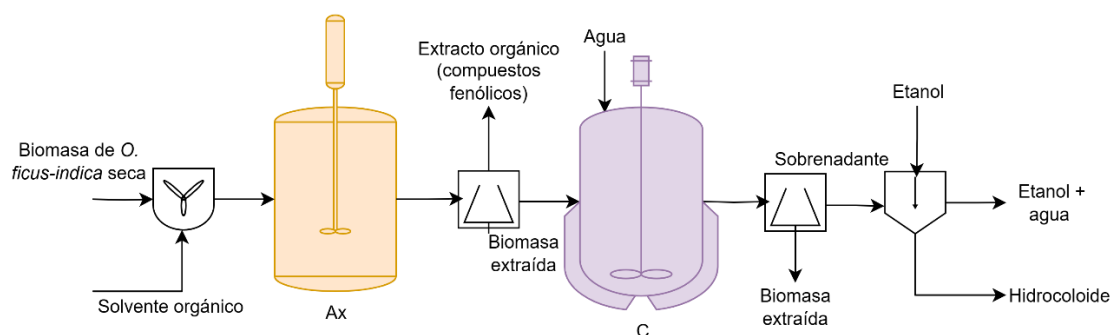


Figura 37. Escenario bioproductos; extracción secuencial de compuestos fenólicos e hidrocoloides a partir de *O. ficus-indica*.

Ahora bien, cuando los escenarios de bioproductos y biocombustibles se unen (Figura 38), el rendimiento de los productos principales aumenta a 44.6 %, mientras que, al tomar en cuenta el dióxido de carbono, el rendimiento del nopal aumenta a 82.91 %; esto quiere decir que aproximadamente el 17 % de la biomasa de nopal queda sin utilizar, según los balances de materia realizados (Tabla 39).

Tabla 39. Balance de materia en FO y DA después de la extracción de bioproductos.

Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Masa del componente			% del total
		g BH	g	g SV	
Entrada al FO	Biomasa exC	1.98	1.98	1.61	6.37
	-Agua	-	17.84	-	57.31
	Inóculo anaerobio P	11.31	1.05	0.32	3.37
	-Agua	-	10.26	-	32.96
Total		13.29	31.12	1.93	
Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Volumen mL	Masa g	% masa del total	
Salida gaseosa del FO	Hidrógeno	155.55	0.0140	4.35	
	Dióxido de carbono	155.55	0.3080	95.65	
Total		311.11	0.3220		
Masa del componente					
		g BH	g	g SV	
Salida sólida de la FO	Lodos FO	30.80	2.41	1.39	
	-Agua	-	28.39	-	
Total		30.80	30.80		

Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Masa del componente			% del total
		g BH	g	g SV	
Entrada a DA	Lodos FO	30.80	2.41	1.39	0.69
	-Agua	-	28.39	-	8.11
	Inóculo anaerobio	319.23	33.20	11.80	9.48
	-Agua	-	286.03	-	81.72
Total		350.03	350.03	13.19	

Nombre de la corriente	Componente de la corriente	Volumen mL	Masa g	% masa del total
Salida gaseosa de DA	Metano	424.93	0.31	26.67
	Dióxido de carbono	424.93	0.84	73.33
Total		849.86	1.15	

Masa del componente				
		g BH	g	g SV
Salida sólida de DA	Lodos DA	348.89	37.78	11.78
	-Agua	-	311.10	-
Total			348.89	

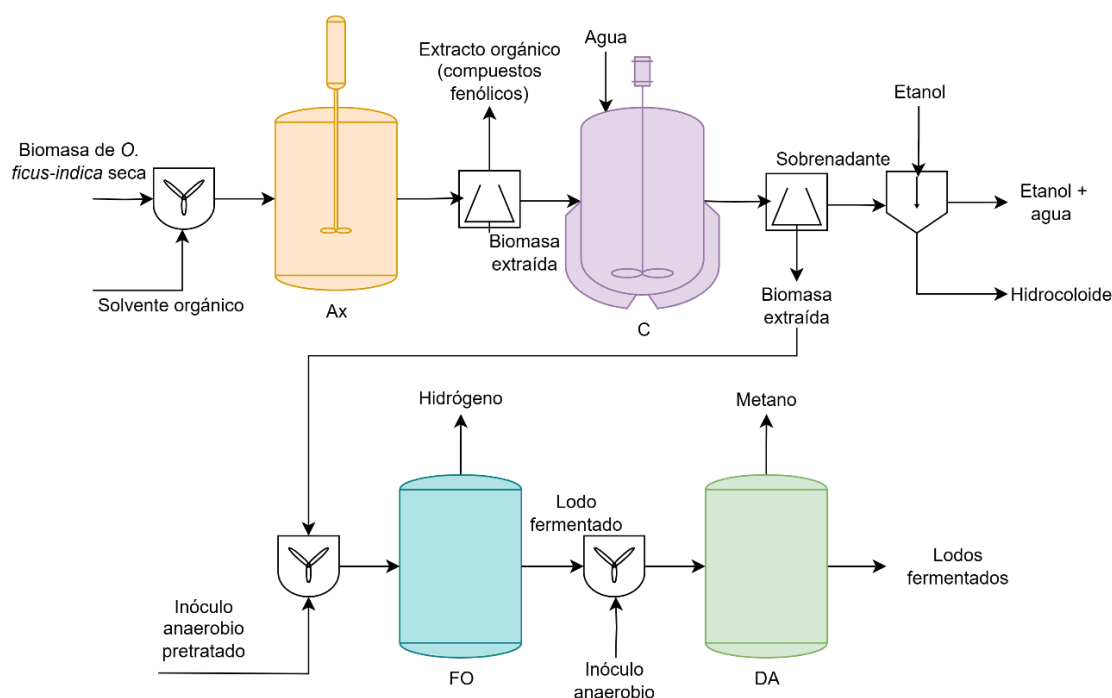


Figura 38. Escenario bioproductos + biocombustibles (Ax-C-H-M).

Como se puede ver en la Tabla 40, el escenario que más aprovecha la biomasa de *O. ficus-indica* es el Ax-C-H-M (escenario bioproductos + biocombustibles) delante del escenario H-M y el Ax-C. Además, en este escenario tenemos la mayor cantidad de productos principales obtenidos, los cuales son los

compuestos antioxidantes, los hidrocoloides, biohidrógeno y biometano, además de los lodos fermentados que pueden todavía ser aprovechados.

Tabla 40. Indicadores de eficiencia para los escenarios de biorrefinería de nopal a productos de valor agregado.

Escenario	ITS	IPP	IPP/ITS	IA
H	0.160	0.007	0.044	7.721
H-M	0.740	0.162	0.219	26.202
M	0.469	0.125	0.267	33.435
Ax	0.188	0.064	0.337	4.307
Ax-C	0.339	0.214	0.632	1.947
Ax-C-H-M	0.822	0.445	0.541	15.328
Ax21	0.171	0.075	0.439	4.857
M21 ^{SV} alim	0.852	0.227	0.267	8.556
M21 ^{SV} reactor	0.243	0.065	0.267	30.282
M21 ^{SV} remov	0.993	0.265	0.267	7.322

Notas: IPP, índice de productos principales; ITS índice de transformación de sustrato; IA, índice ambiental

7 CONCLUSIONES

Actividad 1 A.

Al evaluar únicamente los compuestos fenólicos, los mejores solventes fueron acetona y metanol al 50 % con aproximadamente 12 mg GAE/g y la mejor actividad antioxidante DPPH (34 %) y ABTS (97 %). La actividad antioxidante de los extractos aumentó conforme la disminución de la concentración de los solventes, i.e. con solventes acuosos; los hidrocoloides también aportan actividad antioxidante, además de los compuestos fenólicos glicosilados.

Para caracterizar los flavonoides contenidos en los extractos fue necesario realizar una hidrólisis ácida. La aglicona de flavonoide más abundante en todos los extractos, sin depender del tipo de solvente ni la concentración, fue la isorhamnetina, seguido en menor cantidad el kaempferol y la quercetina. La mayor recuperación de flavonoides fue con etanol al 80 % con rendimientos de isorhamnetina, kaempferol y quercetina de 495.0, 40.3 y 16.6 µg/g de nopal seco, respectivamente.

Actividad 1 B.

Se realizó por primera vez la extracción de compuestos fenólicos a partir del nopal utilizando DES enfocados a la obtención de flavonoides; de los DES propuestos, aquellos con cloruro de colina fueron más selectivos para isorhamnetina, kaempferol y quercetina, encontradas después de la hidrólisis ácida de los extractos de *O. ficus-indica*. Específicamente, los mejores extractos fueron los obtenidos con cloruro de colina:xilitol y cloruro de colina:glicerol, con rendimientos de isorhamnetina, kaempferol y quercetina de 722.82, 74.47 y 28.66, y 715.95, 78.96 y 29.46 µg/g de nopal seco, respectivamente. Los DES extrajeron 1.5 veces más agliconas de flavonoides que el mejor extracto con solventes orgánicos.

Actividad 2.

La temperatura de extracción de hidrocoloides mejoró en 2.6 % el rendimiento (10.8 a 13.4 %); sin embargo, cuando se llevó a cabo la maceración con la biomasa extraída con solventes orgánicos, solo hubo un 1.5 % de diferencia en el rendimiento (17.1 a 18.6 %). Estos son comparables a los discutidos en la

literatura con distintas variedades de *Opuntia*, además aumentó cuando se realizaron extracciones de acetona y metanol previo a la maceración con agua.

Actividad 3.

El escalamiento de la producción de hidrógeno en lote a partir de *O. ficus-indica* se llevó a cabo alcanzando una producción máxima acumulada de 828.3 mL H₂ y un rendimiento máximo de 90.76 mL H₂/g SV, duplicando los valores obtenidos anteriormente en el grupo de trabajo.

Actividad 4.

La re-fermentación contribuye con un 31 % del rendimiento acumulado total cuando se suman los rendimientos de la primera fermentación oscura (de la Actividad 3) y su segunda etapa, cuando se reutiliza una parte del reactor como inóculo para un segundo ciclo de fermentación oscura. Además, es un proceso que difiere con los reportados en literatura, en el cual se realiza una segunda fermentación agregando inóculo nuevo.

Aunque esta reutilización del inóculo puede ser técnicamente posible, la biomasa inoculadora continuará agotándose, ocasionando que la producción también disminuya de manera considerable. Como investigación a futuro, sería valioso establecer cuántos ciclos de reutilización de los fermentados en lote se pueden llevar a cabo sin afectar la viabilidad económica del proceso.

Actividad 5.

La digestión anaerobia en régimen semi-continuo de los sólidos re-fermentados produjeron 611.96 NmL de biogás por gramo de SV alimentado, lo cual fue mayor al rendimiento que se obtuvo cuando se alimentó con OFI, 514 NmL biogás/g SV. El método de alimentación sugerido puede aplicarse en el escenario de falta de sustrato, tanto para falta de OFI como falta de lodos fermentados en la biorrefinería.

Actividad 6.

El escenario que aprovecha en su mayoría la biomasa del nopal es el Ax-C-H-M, con un 44.6 % de rendimiento con los productos principales y el 82.91 % de aprovechamiento de nopal con el subproducto más abundante que es el dióxido de carbono presente en el biogás de FO y DA.

7.1 PERSPECTIVAS

- Optimización de la extracción de flavonoides a partir de cladodios de *O. ficus-indica* (o tuna y su cáscara) con solventes orgánicos, evaluando el porcentaje de solvente acuoso utilizado, temperatura, tiempo (cinética); optimizar la hidrólisis del extracto para la cuantificación de agliconas de flavonoides por HPLC-DAD.
- Optimización de la extracción de flavonoides a partir de cladodios de *O. ficus-indica* con solventes eutécticos profundos, evaluando porcentaje de solvente acuoso, temperatura y tiempo, utilizando los DES aquí definidos (cloruro de colina-xilitol o cloruro de colina-glicerol).
- Caracterización de hidrocoloides para potencial aplicación.
- Producción de biometano en semi-continuo utilizando lodos de fermentación oscura de *O. ficus-indica* a diferentes tiempos de residencia másicos.
- Análisis de ciclo de vida y evaluación tecnoeconómica para el modelo de biorrefinería de nopal.
- Tratamiento hidrotermal de biomasa de *O. ficus-indica* para la producción de biocarbón y bioaceites.

8 REFERENCIAS

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093>
- Aké Madera, M. (2015). “El oro verde de México”. *El Santo Grial de las Energías Renovables*.
- Alavi-Borazjani, S. A., Tarelho, L. A. da C., & Capela, M. I. (2021). Parametric optimization of the dark fermentation process for enhanced biohydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste using Taguchi method. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(41), 21372–21382. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.04.017>
- AOAC International. (2003). *Official Methods of Analysis* (15th ed., Vol. 1, Issue Volume 1). AOAC. <https://doi.org/10.7312/seir17116-004>
- APHA-AWWA-WEF. (2017). *Standard methods for the Examination of Water and Wastewater* (R. B. Baird, A. D. Eaton, & E. W. Rice (eds.); 23rd ed.). American Public Health Association.
- Argun, H., & Dao, S. (2017). Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: Effect of inoculum addition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4), 2569–2574. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.225>
- Aruwa, C. E., Amoo, S. O., & Kudanga, T. (2019a). Extractable and macromolecular antioxidants of *Opuntia ficus-indica* cladodes: Phytochemical profiling, antioxidant and antibacterial activities. *South African Journal of Botany*, 125, 402–410. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.007>
- Aruwa, C. E., Amoo, S. O., & Kudanga, T. (2019b). Phenolic compound profile and biological activities of Southern African *Opuntia ficus-indica* fruit pulp and peels. *Lwt*, 111(May), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.028>
- Ávila-Lara, A. I. (2019). *Evaluación del 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. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.009>
- Azhar, B., Angkawijaya, A. E., Santoso, S. P., Gunarto, C., Ayucitra, A., Go, A. W., Tran-Nguyen, P. L., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2020). Aqueous synthesis of highly adsorptive copper–gallic acid metal–organic framework. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75927-4>
- Azhar, B., Avian, C., & Tiwikrama, A. H. (2023). Green synthesis optimization with artificial intelligence studies of copper–gallic acid metal–organic framework and its application in dye removal from wastewater. *Journal of Molecular Liquids*, 389(August), 122844. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122844>
- Bajkacz, S., & Adamek, J. (2018). Development of a Method Based on Natural

- Deep Eutectic Solvents for Extraction of Flavonoids from Food Samples. *Food Analytical Methods*, 11(5), 1330–1344. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1118-5>
- 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. <https://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(August 2017), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.051>
- Bayar, N., Kriaa, M., & Kammoun, R. (2016). Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus indica* cladodes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.042>
- Bhatia, R. K., Ramadoss, G., Jain, A. K., Dhiman, R. K., Bhatia, S. K., & Bhatt, A. K. (2020). Conversion of Waste Biomass into Gaseous Fuel: Present Status and Challenges in India. *Bioenergy Research*, 13(4), 1046–1068. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10137-4>
- BioPlat, & SusChem. (2017). *Manual sobre Biorrefinerías en España*.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Bravo-Vinaja, A., & Mendez-Gallegos, S. (2016). Production and trends of scientific research on cactus pear in mainstream journals. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 18(September 2017), 87–102.
- 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. <https://doi.org/10.1177/0734242X17741193>
- Ley de Transición Energética, Diario Oficial de la Federación 1 (2015). <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LTE.pdf>
- Carrillo-Verástegui, K.A., Escamilla-Alvarado, C., Escárcega-González, C. E., Cano-Gómez, J. J., Paniagua-Vega, D., Nava-Bravo, I., & Ríos-Leal, E. (2022). Biohydrogen potential assessment of *Opuntia* spp.: Effect of inoculum-to-substrate ratio and residual biomass evaluation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(70), 30085–30096. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.06.138>
- Carrillo-Verástegui, Kenia Aylín. (2021). *Evaluación del nopal como materia prima para la obtención de bioproductos y bioenergéticos*. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Choudhary, M., Kumar, R., & Neogi, S. (2020). Activated biochar derived from *Opuntia ficus-indica* for the efficient adsorption of malachite green dye, Cu⁺² and Ni⁺² from water. *Journal of Hazardous Materials*, 392(August 2019), 122441. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122441>
- Ciardi, M., Ianni, F., Sardella, R., Di Bona, S., Cossignani, L., Germani, R., Tiecco, M., & Clementi, C. (2021). Effective and selective extraction of quercetin from onion (*Allium cepa* L.) skin waste using water dilutions of acid-based deep eutectic solvents. *Materials*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/ma14216465>
- Ciriminna, R., Chavarría-Hernández, N., Rodríguez-Hernández, A. I., & Pagliaro, M. (2015). Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Ciudad-Mulero, M., Fernández-Ruiz, V., Matallana-González, M. C., & Morales, P. (2019). Dietary fiber sources and human benefits: The case study of cereal and pseudocereals. In *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 90). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.002>
- Cruz-Rubio, J. M., Mueller, M., Loeppert, R., Viernstein, H., & Praznik, W. (2020). The effect of cladode drying techniques on the prebiotic potential and molecular characteristics of the mucilage extracted from *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia joconostle*. *Scientia Pharmaceutica*, 88(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/scipharm88040043>
- Cushman, J. C., Davis, S. C., Yang, X., & Borland, A. M. (2015). Development and use of bioenergy feedstocks for semi-arid and arid lands. *Journal of Experimental Botany*, 66(14), 4177–4193. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv087>
- Dávila-Aviña, J., Gallegos-Ruiz, B., García, S., & Heredia, N. (2019). Comparison of total polyphenol content, antioxidant activity, and antimicrobial potential among nine cactus pear (*Opuntia* spp.) cultivars and their by-products. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 20, 113–127.
- 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(June 2017), 1055–1062. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.039>
- De Santiago, E., Juárez, I., Cid, C., & De Peña, M. P. (2021). Extraction of (Poly)phenolic Compounds of Cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) Cladodes. *Food Analytical Methods*, 14(6), 1167–1175. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01946-6>
- de Wit, M., du Toit, A., Osthoff, G., & Hugo, A. (2019). Cactus pear antioxidants: a comparison between fruit pulp, fruit peel, fruit seeds and cladodes of eight different cactus pear cultivars (*Opuntia ficus-indica* and *Opuntia robusta*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 2347–2356. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00154-z>
- Dranca, F., Vargas, M., & Oroian, M. (2020). Physicochemical properties of pectin from *Malus domestica* ‘Fălticeni’ apple pomace as affected by non-conventional extraction techniques. *Food Hydrocolloids*, 100(September

- 2019), 105383. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105383>
- Duan, L., Dou, L. L., Guo, L., Li, P., & Liu, E. H. (2016). Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(4), 2405–2411. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00091>
- El Achkar, T., Fourmentin, S., & Greige-Gerges, H. (2019). Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *Journal of Molecular Liquids*, 288, 111028. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111028>
- Elhleli, H., Mannai, F., Ben Mosbah, M., Khiari, R., & Moussaoui, Y. (2020). Biocarbon derived from *Opuntia ficus indica* for p-nitrophenol retention. *Processes*, 8(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pr8101242>
- 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*. Cinvestav.
- FAO. (2021). *Forestería en tierras secas. ¿Qué Son Las Zonas Secas?* <http://www.fao.org/dryland-forestry/background/what-are-drylands/es/>
- Felkai-Haddache, L., Remini, H., Dulong, V., Mamou-Belhabib, K., Picton, L., Madani, K., & Rihouey, C. (2016). Conventional and Microwave-Assisted Extraction of Mucilage from *Opuntia ficus-indica* Cladodes: Physico-Chemical and Rheological Properties. *Food and Bioprocess Technology*, 9(3), 481–492. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1640-7>
- Gandhi, B. P., Otite, S. V., Fofie, E. A., Lag-Brotons, A. J., Ezemonye, L. I., Semple, K. T., & Martin, A. D. (2022). Kinetic investigations into the effect of inoculum to substrate ratio on batch anaerobic digestion of simulated food waste. *Renewable Energy*, 195, 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.05.134>
- Ghimire, A., Sposito, F., Frunzo, L., Trabaly, E., Escudié, R., Pirozzi, F., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2016). Effects of operational parameters on dark fermentative hydrogen production from biodegradable complex waste biomass. *Waste Management*, 50, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.044>
- Gollakota, A. R. K., Kishore, N., & Gu, S. (2018). A review on hydrothermal liquefaction of biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81(August 2016), 1378–1392. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.178>
- Goycoolea, F. M., & Cárdenas, A. (2003). Pectins from *Opuntia* spp.: A short review. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 5(January 2003), 17–29.
- Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M. L., Mortensen, A. G., Laursen, B. B., Lin, L. W., De León-Rodríguez, A., Fomsgaard, I. S., & Barba de La Rosa, A. P. (2010). Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.12.003>
- Habibi, Y., Heyraud, A., Mahrouz, M., & Vignon, M. R. (2004). Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research*, 339(6), 1119–1127.

<https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.02.005>

- Harholt, J., Suttangkakul, A., & Scheller, H. V. (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*, 153(2), 384–395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>
- Hitam, C. N. C., & Jalil, A. A. (2020). A review on biohydrogen production through photo-fermentation of lignocellulosic biomass. In *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01140-y>
- Iftikhar, K., Siddique, F., Ameer, K., Arshad, M., Kharal, S., Mohamed Ahmed, I. A., Yasmin, Z., & Aziz, N. (2023). Phytochemical profiling, antimicrobial, and antioxidant activities of hydroethanolic extracts of prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit and pulp. *Food Science & Nutrition*. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3226>
- Inglese, P., Mondragon-Jacobo, C., Nefzaoui, A., & Sáenz, C. (2018). *Ecología del cultivo, manejo y usos del Nopal*.
- Jędrzejczyk, M., Soszka, E., Czapnik, M., Ruppert, A. M., & Grams, J. (2019). Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. In *Second and Third Generation of Feedstocks* (pp. 143–196). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815162-4.00006-9>
- Jigar, E., Sulaiman, H., Asfaw, A., & Bairu, A. (2011). Study on renewable biogas energy production from cladodes of *Opuntia ficus indica*. *Science*, 1(December), 44–48.
- Kechebar, M. S. A., Karoune, S., Laroussi, K., & Djellouli, A. (2017). Phenolic Composition and Antioxidant Activities of *Opuntia ficus Indica* L. Cladodes Related to Extraction Method. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(6), 744–749. <https://doi.org/10.25258/phyto.v9i6.8171>
- Kumari, D., & Singh, R. (2018). Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90(May 2017), 877–891. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.111>
- Lakka, A., Grigorakis, S., Karageorgou, I., Batra, G., Kaltsa, O., Bozinou, E., Lalas, S., & Makris, D. P. (2019). Saffron processing wastes as a bioresource of high-value added compounds: Development of a green extraction process for polyphenol recovery using a natural deep eutectic solvent. *Antioxidants*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/antiox8120586>
- Lavado-Meza, C., Fernandez-Pezua, M. C., Gamarra-Gómez, F., Sacari-Sacari, E., Angeles-Suazo, J., & Dávalos-Prado, J. Z. (2023). Single and Binary Removals of Pb(II) and Cd(II) with Chemically Modified *Opuntia ficus indica* Cladodes. *Molecules*, 28(11), 4451. <https://doi.org/10.3390/molecules28114451>
- Lefsih, K., Delattre, C., Pierre, G., Michaud, P., Aminabhavi, T. M., Dahmoune, F., & Madani, K. (2016). Extraction, characterization and gelling behavior enhancement of pectins from the cladodes of *Opuntia ficus indica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 645–652. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.046>
- Liang, J., Zhang, P., Zhang, R., Chang, J., Chen, L., Zhang, G., & Wang, A. (2024). Bioconversion of volatile fatty acids from organic wastes to produce high-value products by photosynthetic bacteria: A review. *Environmental Research*, 242(September 2023), 117796.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117796>

- Liu, Z., & Zhang, F. S. (2009). Removal of lead from water using biochars prepared from hydrothermal liquefaction of biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1–3), 933–939. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.085>
- López-Hernández, B. N. (2022). *Producción Fotofermentativa de Hidrógeno a partir de Efluentes de Pretratamientos y Bioprocesos: Pruebas de Concepto y Evaluación de Impacto Ambiental* (Vol. 5). Universidad Autónoma de Nuevo León.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122262>
- Lunprom, S., Phanduang, O., Salakkam, A., Liao, Q., & Reungsang, A. (2019). A sequential process of anaerobic solid-state fermentation followed by dark fermentation for bio-hydrogen production from *Chlorella* sp. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(6), 3306–3316. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.06.012>
- Mabotja, M. B., Venter, S. L., Du Plooy, C. P., Kudanga, T., & Amoo, S. O. (2021). Phytochemical content, antioxidant, alpha-glucosidase inhibitory and antibacterial activities of spineless cactus pear cultivars. *Plants*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/plants10071312>
- Mailaram, S., Kumar, P., Kunamalla, A., Saklecha, P., & Maity, S. K. (2021). Biomass, biorefinery, and biofuels. In *Sustainable Fuel Technologies Handbook* (pp. 51–87). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822989-7.00003-2>
- Maki-Díaz, G., Peña-Valdivia, C. B., García-Nava, R., Arévalo-Galarza, M. L., Calderón-Zavala, G., & Anaya-Rosales, S. (2015). Características físicas y químicas de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) para exportación y consumo nacional. *Agrociencia*, 49(1), 31–51.
- Mannai, F., Elhleli, H., Yilmaz, M., Khiari, R., Belgacem, M. N., & Moussaoui, Y. (2023). Precipitation solvents effect on the extraction of mucilaginous polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): Structural, functional and rheological properties. *Industrial Crops and Products*, 202(May), 117072. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117072>
- Margain Sato Matsumoto, P. K. (2019). *Estudio sobre la viabilidad técnica de biorefinerías de Opuntia ficus-indica*. Universidad de Sevilla.
- Masera Cerutti, O., Coralli, F., García Bustamante, C., Riegelhaupt, E., Arias Chalico, T., Vega Gregg, J., Díaz Jiménez, R., Guerrero Pacheco, G., & Cecotti, L. (2011). *La bioenergía en México: Situación actual y perspectivas*.
- Medina-Torres, L., Vernon-Carter, E. J., Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, 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. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4271>
- Missaoui, M., D'Antuono, I., D'Imperio, M., Linsalata, V., Boukhchina, S., Logrieco,

- A. F., & Cardinali, A. (2020). Characterization of Micronutrients, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Prickly Pear Cladodes as Functional Ingredient. *Molecules*, 25(9), 2176. <https://doi.org/10.3390/molecules25092176>
- Moncada, J., Aristizábal, V., & Cardona, C. A. (2016). Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.009>
- Montiel Corona, V., & Razo-Flores, E. (2018). Continuous hydrogen and methane production from Agave tequilana bagasse hydrolysate by sequential process to maximize energy recovery efficiency. *Bioresource Technology*, 249(October 2017), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.032>
- Moreno-Dávila, I. M. M., Ríos-González, L. J., Garza-García, Y., de la Garza, J. A. R., & Rodríguez-Martínez, J. (2011). Biohydrogen production from dairy processing wastewater by anaerobic biofilm reactors. *African Journal of Biotechnology*, 10(27), 5320–5326. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i27>
- Msaddak, L., Abdelhedi, O., Kridene, A., Rateb, M., Belbahri, L., Ammar, E., Nasri, M., & Zouari, N. (2017). Opuntia ficus-indica cladodes as a functional ingredient: bioactive compounds profile and their effect on antioxidant quality of bread. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0397-y>
- Msaddak, L., Siala, R., Fakhfakh, N., Ayadi, M. A., Nasri, M., & Zouari, N. (2015). Cladodes from prickly pear as a functional ingredient: Effect on fat retention, oxidative stability, nutritional and sensory properties of cookies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(8), 851–857. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1095862>
- Muñoz-Páez, K. M., Ríos-Leal, E., Valdez-Vazquez, I., Rinderknecht-Seijas, N., & Poggi-Varaldo, H. M. (2012). Re-fermentation of washed spent solids from batch hydrogenogenic fermentation for additional production of biohydrogen from the organic fraction of municipal solid waste. *Journal of Environmental Management*, 95(SUPPL.), 355–359. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.01.017>
- Myovela, H., Mshandete, A. M., & 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. <https://doi.org/10.5897/ajb2018.16652>
- Nam, M. W., Zhao, J., Lee, M. S., Jeong, J. H., & Lee, J. (2015). Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: Application to flavonoid extraction from Flos sophorae. *Green Chemistry*, 17(3), 1718–1727. <https://doi.org/10.1039/c4gc01556h>
- Nava-García, F. J., & Doldán-García, X. R. (2014). Cultivos Energéticos. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 11, 25–34. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-54722014000100002
- Ng, D. K. S., Ng, K. S., & Ng, R. T. L. (2017). Integrated Biorefineries. In *Encyclopedia of Sustainable Technologies* (Vol. 4, pp. 299–314). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10138-1>
- Nistor, A. N., & Butnariu, M. (2023). Physical Properties and Identification of

- Flavonoids by Ultraviolet-Visible Spectroscopy. *International Journal of Biochemistry & Physiology*, 8(2). <https://doi.org/10.23880/ijbp-16000239>
- Oliveira, G., Marques, C., de Oliveira, A., de Almeida dos Santos, A., do Amaral, W., Ineu, R. P., Leimann, F. V., Peron, A. P., Igarashi-Mafra, L., & Mafra, M. R. (2021). Extraction of bioactive compounds from *Curcuma longa* L. using deep eutectic solvents: In vitro and in vivo biological activities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 70(April). <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102697>
- Oomen, W. W., Begines, P., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2020). Natural Deep Eutectic Solvent Extraction of Flavonoids of *Scutellaria baicalensis* as a Replacement for Conventional Organic Solvents. *Molecules*, 25(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules25030617>
- Otálora, M. C., Wilches-Torres, A., & Gómez Castaño, J. A. (2021). Extraction and physicochemical characterization of dried powder mucilage from *Opuntia ficus-indica* cladodes and aloe vera leaves: A comparative study. *Polymers*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/polym13111689>
- Ouhammou, M., Nabil, B., Hidar, N., Ouaabou, R., Bouchdoug, M., Jaouad, A., & Mahrouz, M. (2021). Chemical activation of the skin of prickly pear fruits and cladode *Opuntia megacantha*: Treatment of textile liquid discharges. *South African Journal of Chemical Engineering*, 37(November 2020), 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.04.006>
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. (2014). Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2(5), 1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Panin, S., Setthapun, W., Elizabeth Sinsuw, A. A., Sintuya, H., & Chu, C. Y. (2021). Biohydrogen and biogas production from mashed and powdered vegetable residues by an enriched microflora in dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(27), 14073–14082. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.09.246>
- Peña-Valdivia, C. B., & Sánchez-Urdaneta, A. B. (2006). Nopalito and Cactus Pear (*Opuntia* Spp.) Polysaccharides: Mucilage and pectin. *Acta Horticulturae*, 728, 241–248. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2006.728.34>
- Pezhhanfar, S., Farajzadeh, M. A., Hosseini-Yazdi, S. A., & Mogaddam, M. R. A. (2023). The application of CuGA MOF in a food safety monitoring procedure specialized for parsley juice with no dilution via extraction and preconcentration of its pesticides. *Microchemical Journal*, 191(February), 108819. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108819>
- Platt, R., Bauen, A., Reumerman, P., Geier, C., Ree, R. Van, Gursel, I. V., Garcia, L., Behrens, M., Bothmer, P. von, Howes, J., Panchaksharam, Y., Vikla, K., Sartorius, V., & Annevelink, B. (2021). *EU Biorefinery Outlook to 2030* (Issue February). <https://doi.org/10.2777/103465>
- Policastro, G., Lamboglia, R., Fabbicino, M., & Pirozzi, F. (2022). Enhancing Dark Fermentative Hydrogen Production from Problematic Substrates via the Co-

- Fermentation Strategy. *Fermentation*, 8(12).
<https://doi.org/10.3390/fermentation8120706>
- Ponnusamy, V. K., Nagappan, S., Bhosale, R. R., Lay, C. H., Duc Nguyen, D., Pugazhendhi, A., Chang, S. W., & Kumar, G. (2020). Review on sustainable production of biochar through hydrothermal liquefaction: Physico-chemical properties and applications. *Bioresource Technology*, 310(March).
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123414>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2845-x>
- Rafieenia, R., Pivato, A., & Lavagnolo, M. C. (2018). Effect of inoculum pre-treatment on mesophilic hydrogen and methane production from food waste using two-stage anaerobic digestion. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(27), 12013–12022.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.04.170>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.180>
- Ramírez-Arpide, F. R., Espinosa-Solares, T., Gallegos-Vázquez, C., & Santoyo-Cortés, V. H. (2019). Bioenergy production from nopal cladodes and dairy cow manure on a farm-scale level: Challenges for its economic feasibility in Mexico. *Renewable Energy*, 142, 383–392.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.04.093>
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.02.064>
- Regueira-Marcos, L., Muñoz, R., & García-Depraect, O. (2025). Biogenic hydrogen production from household food waste via lactate-driven dark fermentation: A comparative study of single-stage and two-stage configurations. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(5), 117672. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117672>
- Reyes-Reyes, M., Salazar-Montoya, J. A., Rodríguez-Páez, L. I., & Ramos-Ramírez, E. G. (2019). In vitro fermentation of oligosaccharides obtained from enzymatic hydrolysis of *Opuntia streptacantha* mucilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(6), 2883–2891.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9501>
- Rios-Del Toro, E. E., Arreola-Vargas, J., Cardenas-López, R. L., Valdez-Guzmán, B. E., Toledo-Cervantes, A., González-Álvarez, V., & Méndez-Acosta, H. O. (2021). Two-stage semi-continuous hydrogen and methane production from undetoxified and detoxified acid hydrolysates of agave bagasse. *Biomass and Bioenergy*, 150(December 2020).

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106130>

- Rocchetti, G., Pellizzoni, M., Montesano, D., & Lucini, L. (2018). Italian *Opuntia ficus-indica* cladodes as rich source of bioactive compounds with health-promoting properties. *Foods*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/foods7020024>
- Rodríguez-Romero, J. A., Mendoza-Castillo, D. I., Reynel-Ávila, H. E., De Haro-Del Rio, D. A., González-Rodríguez, L. M., Bonilla-Petriciolet, A., Duran-Valle, C. J., & Camacho-Aguilar, K. I. (2020). Preparation of a new adsorbent for the removal of arsenic and its simulation with artificial neural network-based adsorption models. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(4), 103928. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103928>
- Rodríguez-Valderrama, S., Escamilla-Alvarado, C., Magnin, J.-P., Rivas-García, P., Amézquita-García, H. J., & Cano-Gómez, J. J. (2022). Photo-fermentative hydrogen production from organic acids mixtures evaluated through predictive models for *Rhodobacter capsulatus* strains. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 37, 39–53. <https://doi.org/10.20937/RICA.54356>
- Rodríguez-Valderrama, S., Escamilla-Alvarado, C., Rivas-García, P., Magnin, J. P., Alcalá-Rodríguez, M. M., & García-Reyes, R. B. (2020). Biorefinery concept comprising acid hydrolysis, dark fermentation, and anaerobic digestion for co-processing of fruit and vegetable wastes and corn stover. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(23), 28585–28596. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08580-z>
- Rosas-Mendoza, E. S., Alvarado-Vallejo, A., Vallejo-Cantú, N. A., Snell-Castro, R., Martínez-Hernández, S., & Alvarado-Lassman, A. (2021). Batch and semi-continuous anaerobic digestion of industrial solid citruswaste for the production of bioenergy. *Processes*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/pr9040648>
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C., & Durand, E. (2017). Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3591–3601. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01054>
- Ruiz-Mercado, G. J., Smith, R. L., & Gonzalez, M. A. (2012). Sustainability indicators for chemical processes: I. Taxonomy. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(5), 2309–2328. <https://doi.org/10.1021/ie102116e>
- Sáenz, C. (2006). *Utilización agroindustrial del nopal*. FAO.
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf200944y>
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (1992). *Determinación del pH - Método potenciométrico*. NMX-AA-25-1984.
- Sekoai, P. T., Ghimire, A., Ezeokoli, O. T., Rao, S., Ngan, W. Y., Habimana, O., Yao, Y., Yang, P., Yiu Fung, A. H., Yoro, K. O., Daramola, M. O., & Hung, C. H. (2021). Valorization of volatile fatty acids from the dark fermentation waste Streams-A promising pathway for a biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 143(May 2020), 110971. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110971>

- SEMARNAT. (2019). *Informe de la situación del medio ambiente en México* (Edición 20). SEMARNAT.
- SENER. (2018). *Reporte de Avance de Energías Limpias Primer Semestre 2018*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/418391/RAEL_Primer_Semestre_2018.pdf
- Sharma, S., Mittal, Di., Verma, A. K., & Roy, I. (2019). Copper-Gallic Acid Nanoscale Metal-Organic Framework for Combined Drug Delivery and Photodynamic Therapy. *ACS Applied Bio Materials*, 2(5), 2092–2101. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00116>
- SIAP. (2022). *Anuario estadístico de la producción agrícola*. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
- Srivatsav, P., Bhargav, B. S., Shanmugasundaram, V., Arun, J., Gopinath, K. P., & Bhatnagar, A. (2020). Biochar as an eco-friendly and economical adsorbent for the removal of colorants (Dyes) from aqueous environment: A review. *Water (Switzerland)*, 12(12), 1–27. <https://doi.org/10.3390/w12123561>
- 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. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400071>
- Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2001). Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research and Technology*, 212(4), 396–407. <https://doi.org/10.1007/s002170000219>
- Thi Nguyen, M. L., Hung, P. C., Vo, T. P., Lay, C. H., & Lin, C. Y. (2021). Effect of food to microorganisms (F/M) ratio on biohythane production via single-stage dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(20), 11313–11324. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.127>
- Ünlü, A. E. (2021). Green and Non-conventional Extraction of Bioactive Compounds from Olive Leaves: Screening of Novel Natural Deep Eutectic Solvents and Investigation of Process Parameters. *Waste and Biomass Valorization*, 12(10), 5329–5346. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01411-3>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.06.098>
- Vargas Rodríguez, L., Arroyo Figueroa, G., Herrera Méndez, C. H., Pérez Nieto, A., García Vieyra, M. I., & Rodríguez Núñez, J. R. (2016). Physical properties of mucilage prickly pear. *Acta Universitaria*, 26(NE-1), 8–11. <https://doi.org/10.15174/au.2016.839>
- Venkatachalam, C. D., Ravichandran, S. R., & Sengottian, M. (2021). Lignocellulosic and algal biomass for bio-crude production using hydrothermal liquefaction: Conversion techniques, mechanism and process conditions: A review. *Environmental Engineering Research*, 27(1), 200555–0. <https://doi.org/10.4491/eer.2020.555>

- Verardi, A., De, I., Ricca, E., & Calabr, V. (2012). Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. *Bioethanol*. <https://doi.org/10.5772/23987>
- 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(June 2017), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.072>
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 218–223. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X)
- Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I., & Wozniak, L. (2010). A Review of Natural and Synthetic Antioxidants Important for Health and Longevity. *Current Medicinal Chemistry*, 17(28), 3262–3288. <https://doi.org/10.2174/092986710792231950>
- Xu, P., Zheng, G. W., Zong, M. H., Li, N., & Lou, W. Y. (2017). Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0165-5>
- Zahedi, S., Solera, R., Micolucci, F., Cavinato, C., & Bolzonella, D. (2016). Changes in microbial community during hydrogen and methane production in two-stage thermophilic anaerobic co-digestion process from biowaste. *Waste Management*, 49, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.016>
- Zeraati, M., Rahdar, A., Medina, D. I., & Sargazi, G. (2021). Synthesis of Al-Based Metal-Organic Framework in Water With Caffeic Acid Ligand and NaOH as Linker Sources With Highly Efficient Anticancer Treatment. *Frontiers in Chemistry*, 9(November 2021), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.784461>
- Zhuang, B., Dou, L. L., Li, P., & Liu, E. H. (2017). Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi* *Cacumen*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.049>

9 ANEXOS

9.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

9.1.1 Actividad 1.

Extracción con nopal seco vs. nopal liofilizado

Tabla A1. Análisis de varianza del efecto del tipo de secado del nopal sobre la extracción de fenólicos con acetona.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.12607645	1	0.12607645	1.37465111	0.36176326	18.512821
Dentro de los grupos	0.18343048	2	0.09171524			
Total	0.30950693	3				

Tabla A2. Análisis de varianza del efecto del tipo de secado del nopal sobre la extracción de fenólicos con metanol.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0248405	1	0.0248405	0.16381344	0.72485295	18.5128205
Dentro de los grupos	0.30327794	2	0.15163897			
Total	0.32811844	3				

Orden de solventes en extracción secuencial de nopal seco

Tabla A3. Análisis de varianza del efecto del orden de solventes sobre la extracción de fenólicos con metanol.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	18.8933103	1	18.8933103	172.092949	0.00019498	7.70864742
Dentro de los grupos	0.439142	4	0.1097855			
Total	19.3324523	5				

Tabla A4. Análisis de varianza del efecto del orden de solventes sobre la extracción de fenólicos con acetona.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	34.7107523	1	34.7107523	194.977414	0.00015257	7.70864742
Dentro de los grupos	0.71209791	4	0.17802448			
Total	35.4228502	5				

Tabla A5. Análisis de varianza del efecto del orden de solventes sobre la extracción de fenólicos con acetona y metanol.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2.3868384	1	2.3868384	7.82634503	0.0489331	7.70864742
Dentro de los grupos	1.2198994	4	0.30497485			
Total	3.60673779	5				

Extracción M80 vs MAW

Tabla A6. Análisis de varianza del efecto del tipo de solvente utilizado sobre la extracción de compuestos fenólicos.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.21001938	1	0.21001938	0.46914055	0.53101165	7.70864742
Dentro de los grupos	1.79067346	4	0.44766836			
Total	2.00069284	5				

Diseño de experimentos 3x3

Tabla A7. Diseño de experimentos para la extracción con solventes orgánicos.

Factor 1	Factor 2
A: Solvente	B: Concentración [%]
Metanol	50
Etanol	80
Acetona	100

Tabla A8. Análisis de varianza de los efectos del tipo de solvente utilizado y su concentración sobre la obtención de compuestos fenólicos totales.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	374.52	4	93.63	272.47	< 0.0001	significant
A-Solvente	5.98	2	2.99	8.7	0.004	
B-Concentración	368.54	2	184.27	536.25	< 0.0001	
Residual	4.47	13	0.3436			
Lack of Fit	1.08	4	0.27	0.7175	0.6009	not significant
Pure Error	3.39	9	0.3763			
Cor Total	378.99	17				

Std. Dev.	0.5862	R²	0.9882
Mean	7.08	Adjusted R²	0.9846
C.V. %	8.27	Predicted R²	0.9774
		Adeq Precision	40.3028

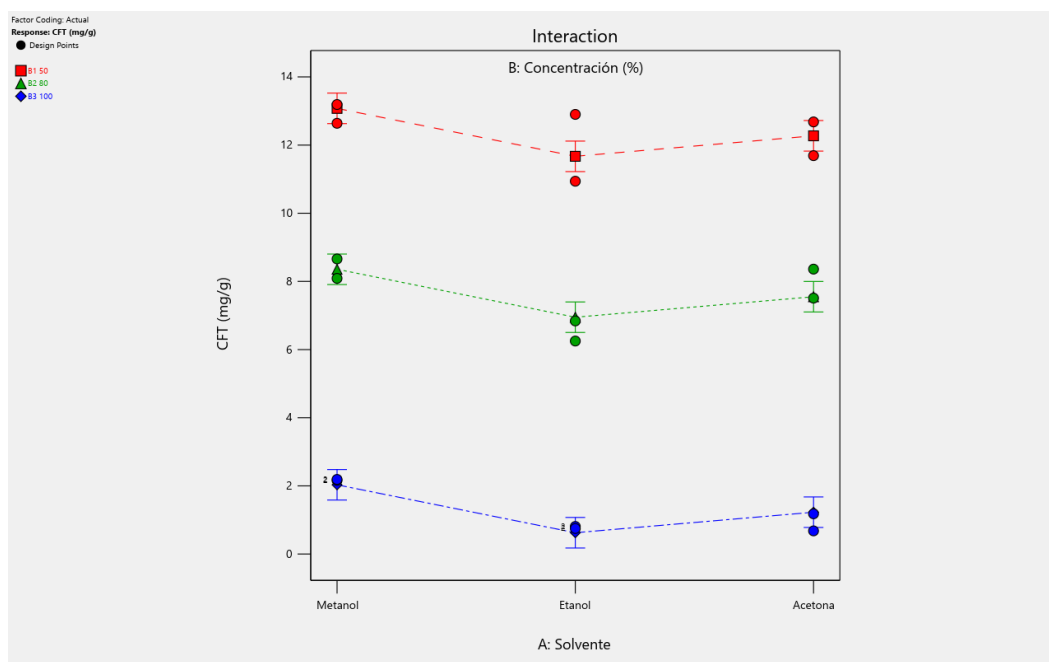


Figura A1. Gráfico de interacciones de los efectos del tipo de solvente utilizado y su concentración sobre la obtención de compuestos fenólicos totales.

Tabla A9. Análisis de varianza de los efectos del tipo de solvente utilizado y su concentración sobre la obtención de azúcares reductores.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	221.45	8	27.68	828.76	< 0.0001	significant
A-Solvente	10.8	2	5.4	161.61	< 0.0001	
B-Concentración	202.57	2	101.28	3032.43	< 0.0001	
AB	8.08	4	2.02	60.51	< 0.0001	
Pure Error	0.3006	9	0.0334			
Cor Total	221.75	17				

Std. Dev.	0.1828	R²	0.9986
Mean	5.69	Adjusted R²	0.9974
C.V. %	3.21	Predicted R²	0.9946
		Adeq Precision	78.7365

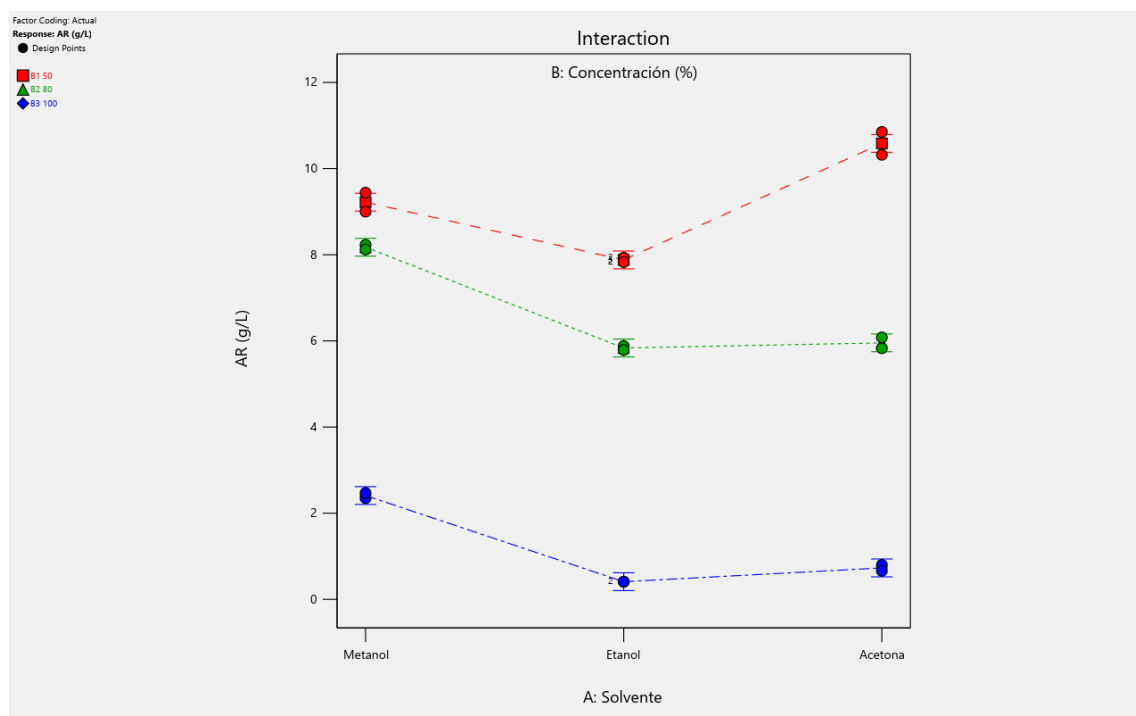


Figura A2. Gráfico de interacciones de los efectos del tipo de solvente utilizado y su concentración sobre la obtención de azúcares reductores.

Tabla A10. Análisis de varianza de los efectos del tipo de solvente utilizado y su concentración sobre la actividad antioxidante DPPH de los extractos.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	1830.26	8	228.78	24.8	< 0.0001 significant
A-Solvente	196.74	2	98.37	10.66	0.0042
B-Concentración	1511.58	2	755.79	81.92	< 0.0001
AB	121.94	4	30.49	3.3	0.063
Pure Error	83.03	9	9.23		
Cor Total	1913.3	17			

Std. Dev.	3.04	R²	0.9566
Mean	20.42	Adjusted R²	0.918
C.V. %	14.88	Predicted R²	0.8264
		Adeq Precision	14.2076

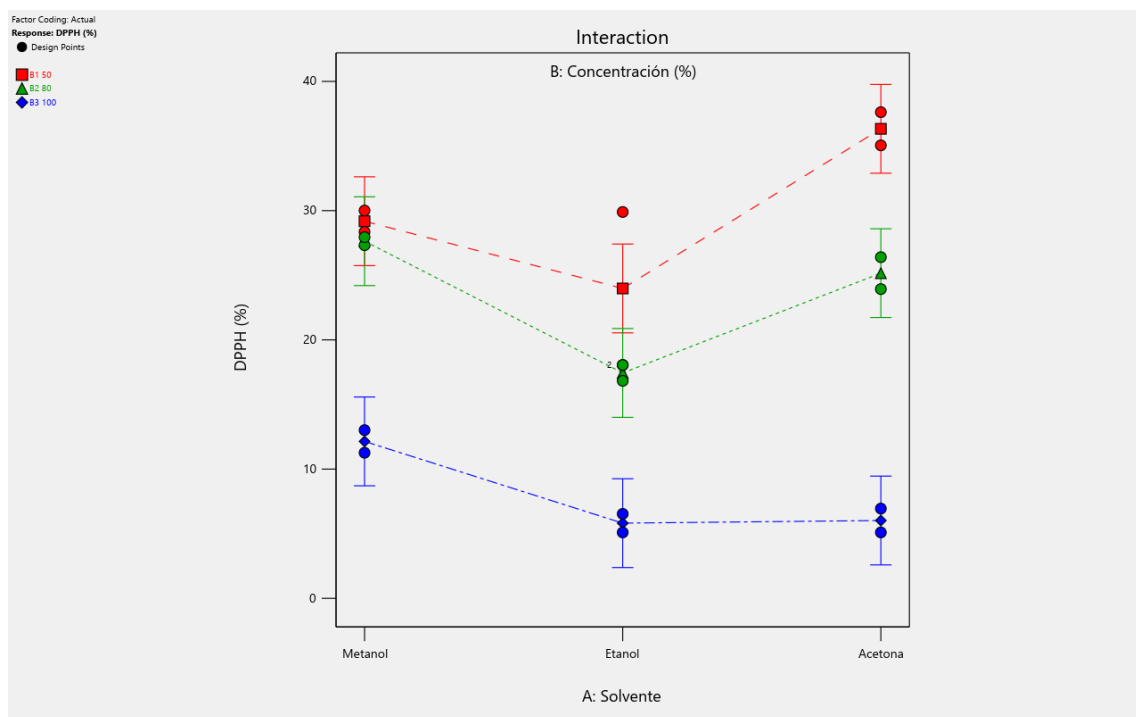


Figura A3. Gráfico de interacciones de los efectos del tipo de solvente utilizado y su concentración sobre la actividad antioxidante DPPH de los extractos.

Tabla A11. Análisis de varianza de los efectos del tipo de solvente utilizado y su concentración sobre la actividad antioxidante ABTS de los extractos.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	17305.71	8	2163.21	738.62	< 0.0001 significant
A-Solvente	1311.63	2	655.81	223.92	< 0.0001
B-Concentración	14941.84	2	7470.92	2550.9	< 0.0001
AB	1052.24	4	263.06	89.82	< 0.0001
Pure Error	26.36	9	2.93		
Cor Total	17332.06	17			

Std. Dev.	1.71	R²	0.9985
Mean	71.32	Adjusted R²	0.9971
C.V. %	2.4	Predicted R²	0.9939
		Adeq Precision	73.5016

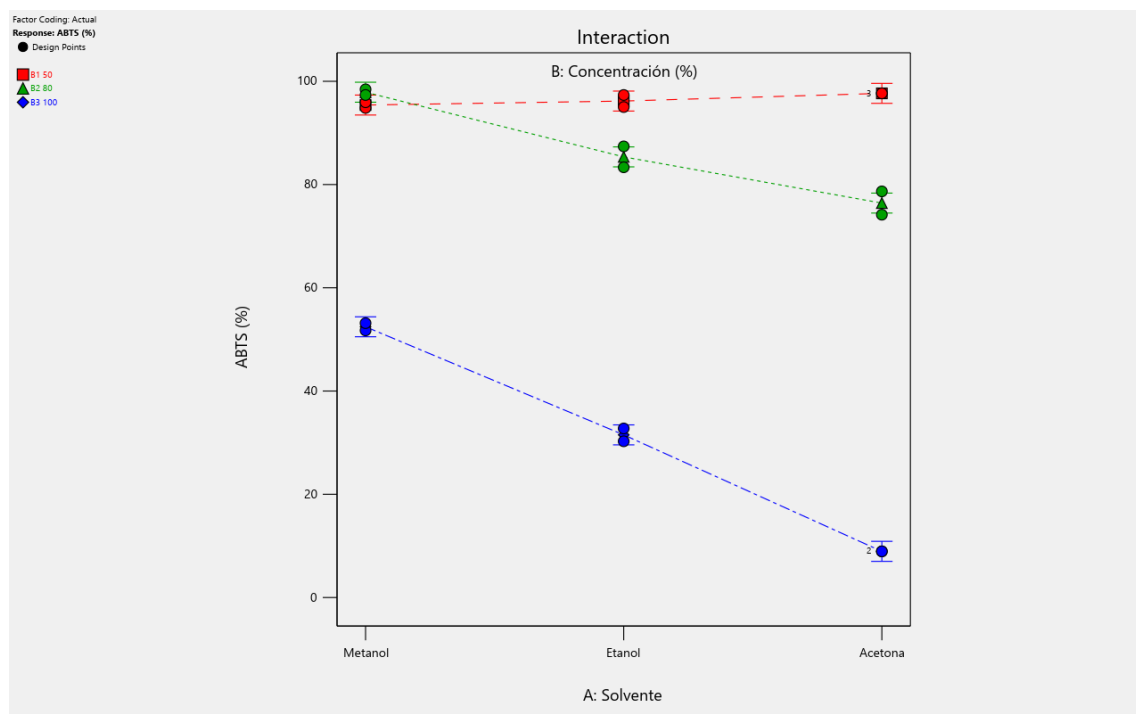


Figura A4. Gráfico de interacciones de los efectos del tipo de solvente utilizado y su concentración sobre la actividad antioxidante ABTS de los extractos.

9.1.2 Actividad 3.

Tabla A12. Análisis de varianza del efecto del pretratamiento del inóculo hidrogenogénico sobre la producción de hidrógeno en fermentación oscura en lote.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	35150.4241	3	11716.808	13.6019059	0.0026326	4.3468314
Dentro de los grupos	6029.865	7	861.409286			
Total	41180.2891	10				

Tabla A13. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la producción de hidrógeno con los inóculos iF e iFL.

	iF	iFL
Media	267.75	124.266667
Varianza	206.045	749.823333
Observaciones	2	3
Varianza agrupada	568.563889	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	6.59177605	
P(T<=t) una cola	0.00355282	
Valor crítico de t (una cola)	2.35336343	
P(T<=t) dos colas	0.00710564	
Valor crítico de t (dos colas)	3.18244631	

Tabla A14. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la producción de hidrógeno con los inóculos iF e iFT.

	iF	iFT
Media	267.75	111.833333
Varianza	206.045	217.943333
Observaciones	2	3
Varianza agrupada	213.977222	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	11.6761426	
P(T<=t) una cola	0.00067483	
Valor crítico de t (una cola)	2.35336343	
P(T<=t) dos colas	0.00134965	
Valor crítico de t (dos colas)	3.18244631	

Tabla A15. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la producción de hidrógeno con los inóculos iF e iFLT.

	iF	iFLT
Media	267.75	131.033333
Varianza	206.045	1944.14333
Observaciones	2	3
Varianza agrupada	1364.77722	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	4.05397626	
P(T<=t) una cola	0.01352066	
Valor crítico de t (una cola)	2.35336343	
P(T<=t) dos colas	0.02704133	
Valor crítico de t (dos colas)	3.18244631	

Tabla A16. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la producción de hidrógeno con los inóculos iFL e iFT.

	iFL	iFT
Media	124.266667	111.833333
Varianza	749.823333	217.943333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	483.883333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0.69224986	
P(T<=t) una cola	0.26343374	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.52686747	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

Tabla A17. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la producción de hidrógeno con los inóculos iFT e iFLT.

	iFT	iFLT
Media	111.833333	131.033333
Varianza	217.943333	1944.14333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1081.04333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0.7151964	
P(T<=t) una cola	0.25700661	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.51401322	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

Tabla A18. Prueba de t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la producción de hidrógeno con los inóculos iFL e iFLT.

	iFL	iFLT
Media	124.266667	131.033333
Varianza	749.823333	1944.14333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	1346.98333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-0.225808	
P(T<=t) una cola	0.41620964	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P(T<=t) dos colas	0.83241928	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

9.2 MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS ADICIONALES

Extracción sucesiva de compuestos bioactivos utilizando solventes orgánicos

El procedimiento se llevará a cabo conforme a lo descrito por De Santiago et al. (2021). La biomasa seca de los cladodios de *Opuntia* se colocará en vasos de precipitado. De acuerdo con la Fig. 10, primero se extraerán 4 g de muestra con 40 mL de metanol al 80 % por 1 h; a continuación, se centrifugará y el sobrenadante se filtrará con papel Whatman No. 1. Mientras, el residuo se volverá a someter a una extracción con 50 mL de acetona al 70 % por 1 h; de igual manera se centrifugará, el sobrenadante se filtrará y el residuo se extraerá con 50 mL de agua destilada por 30 min. Todos los pasos de la extracción secuencial se llevarán a cabo con agitación mecánica (150 rpm) en una incubadora orbital a temperatura ambiente (22-25 °C).

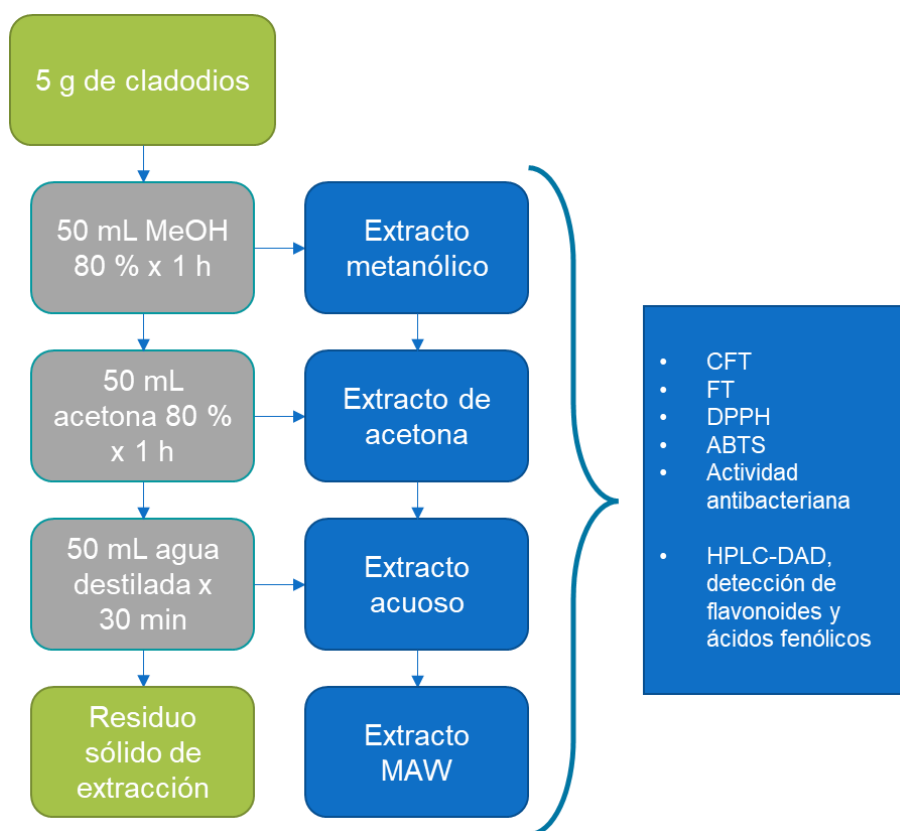


Figura A5. Tren de extracción con solventes orgánicos.

Elección del mejor DES para la extracción de compuestos fenólicos a partir de O. ficus-indica

Se realizará una extracción base (unificando las estudiadas en literatura) utilizando una relación líquido-sólido de 20 mL/g, 80 % de DES a 60 °C en un baño de agua por 30 min. Se centrifugará en un microtubo de 2 mL a por 20 min. La suspensión se filtrará a través de un filtro de acetato-celulosa de 0.45 μ m y se diluirá con el mismo volumen de agua. Con el fin de tener una extracción control, se llevará a cabo el mismo procedimiento con metanol al 80 % como solvente.

Mejoramiento de condiciones de operación para la extracción de compuestos fenólicos a partir de O. ficus-indica

Para este experimento, se utilizará el mejor DES del experimento anterior. Se llevará a cabo un diseño 2² tomando como factores a) la relación líquido-sólido 20 – 60 mL/g y b) % de DES en agua 50 – 90 %. La temperatura (60 °C) y el tiempo (30 min) se mantuvieron constantes.

Actividad antibacteriana de extractos

La actividad antibacteriana se va a determinar mediante la concentración mínima inhibitoria usando microdiluciones. Se utilizará una bacteria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) y Gram-negativa (*Escherichia coli*). Cada cultivo se mantendrá en medio agar Mueller Hinton en cajas Petri; posteriormente, se inocularán en caldo Mueller Hinton y se incubarán a 37 °C por 24 h. Se colocan cantidades iguales de agua destilada (100 μ L) y extracto en la primera columna de la microplaca y se diluyen en dos a través de los pozos para preparar diferentes concentraciones. Luego, se inoculan con 100 μ L de solución bacteriana; como control positivo se utilizará quercetina o ácido gálico, como control negativo se utiliza metanol al 50 %. La placa se incuba a 37 °C por 24 h y, para finalizar, se agregan 40 μ L de cloruro de p-iodonitrotetrazoium. El crecimiento bacteriano se indica con un color rosa, mientras que los inhibidos no presentan cambio a la adición (Mabotja et al., 2021).

Azúcares totales

Se realizará modificando la metodología de Chow y Landhausser (2004), utilizando el método fenol-sulfúrico. Se homogenizan utilizando un vortex 0.5 mL de la muestra con 0.5 mL de fenol al 5 % en un tubo de ensayo. Luego se agregan 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado de golpe y se deja se enfriar por 30 min. La absorbancia se lee a 490 nm. La curva de calibración se realiza con dextrosa (20 – 100 mg/L).

Ácido urónico

Bayar et al. (2016) utiliza el siguiente método. Se mezclan 0.2 mL de una solución de pectina y 1.2 mL de ácido sulfúrico con 120 mM de tetraborato de sodio. Las muestras se calientan a baño de agua en ebullición por 20 min. Luego, los tubos se enfrían en un baño de hielos y se agregan 100 uL de un reactivo de carbazol (1 % en etanol); se vuelven a calentar con agua en ebullición por 20 min y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Se lee la absorbancia a 525 nm y la curva de calibración se realiza con soluciones de ácido galacturónico (25 – 200 ug/mL).

Grado de esterificación

Se realizará con el método utilizado por Bayar et al. (2017). Se disuelven 200 mg de pectina en 2 mL de etanol y 20 mL de agua desionizada a 40 °C por 2 h. Cuando se disuelvan por completo, se agregan tres gotas de fenolftaleína. La solución se titula con NaOH 0.1 M (V_1) y se añaden 10 mL de NaOH 0.1 M. La solución se cubre y se deja en agitación a temperatura ambiente por 2 h. Luego, se añaden 10 mL de HCl 0.1 M y se agita hasta que desaparezca el color rosa. Por segunda vez, la solución se titula con NaOH 0.1 M (V_2). Se realizará el siguiente cálculo:

$$\% DE = 100 \left[\frac{V_2}{V_1 + V_2} \right] \quad (17)$$

Análisis por espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Con el fin de conocer los grupos funcionales mayoritarios en los hidrocoloides obtenidos, se llevará a cabo la caracterización estructural utilizando el espectro del FT-IR en el rango de 400–4000 cm^{-1} con una resolución de 5 cm^{-1} .

El grado de esterificación de la pectina se puede estimar también por FT-IR tomando el área de la banda de 1730 cm^{-1} , que corresponde a los grupos carboxílicos esterificados, y la suma de las áreas de las bandas a 1730 y 1600 cm^{-1} , los cuales corresponden al número total de grupos carboxílicos (Dranca et al., 2020). Se puede calcular de la siguiente manera:

$$\% DE = 100 \left[\frac{A_{1730}}{A_{1730} + A_{1600}} \right] \quad (18)$$

9.3 MATERIALES ADSORBENTES

La adsorción es un fenómeno físico en el cual un sólido atrapa una molécula afín a las características de éste. Si bien existen distintos tipos de adsorción, la adsorción líquido-sólido es de las más importantes debido a su aplicación al tratamiento de aguas (como tratamiento terciario para eliminación de compuestos orgánicos y de metales pesados). De los sólidos más comúnmente utilizados para eliminar contaminantes en medio acuoso, el carbón activado es de los principales debido a su porosidad, estabilidad térmica y área superficial variable (Elhleli et al., 2020).

El carbón activado se puede obtener de carbón mineral, pero también a partir de materia vegetal como rastrojo de maíz, cáscaras de plátano, nejayote, cascarillas, cortezas, raíces, entre otros tipos de biomasa. El proceso principal con el cual se obtiene el carbón con biomasa es la pirólisis. Para *Opuntia* se han estudiado la activación de carbones obtenidos mediante este método (Tabla A19); sin embargo, no hay trabajos en los cuales se obtenga a partir de la carbonización hidrotermal, el cual es un proceso que se lleva a cabo a menores temperaturas y con subproductos con potencial industrial.

Tabla A19. Obtención de carbón activado utilizando *Opuntia* y contaminantes evaluados.

Adsorbente	Contaminante	Capacidad máxima de adsorción (mg/g)	Referencia
Carbón activado de <i>O. ficus-indica</i> (NaOH)	Cu^{2+}	49	(Choudhary et al., 2020)
	Ni^{2+}	44	
	Verde de malaquita	1341	

Carbón activado de la cáscara de tuna de <i>O. megacantha</i> (H ₃ PO ₄)	Índice de azul de metileno	865	(Ouhammou et al., 2021)
	Numero de iodo	2182	
Carbón activado de <i>O. ficus-indica</i> (NaOH)	p-nitrofenol	14.9	(Elhleli et al., 2020)
Carbón activado de <i>O. ficus-indica</i> (ZnCl ₂)	Arsénico	8.17	(Rodríguez-Romero et al., 2020)

Tratamiento hidrotermal

En los procesos hidrotermales, como su nombre lo indica, se utiliza agua como medio de reacción para descomponer la materia orgánica. Esto permite el uso directo de la biomasa húmeda para evitar las etapas con alto consumo energético como lo es el secado o deshidratación.

La licuefacción hidrotermal (HTL por sus siglas en inglés) comprende la conversión termoquímica de la biomasa en combustibles líquidos por medio del procesamiento en agua caliente a presión; las condiciones de operación son entre 250–380 °C y 4–22 MPa (Gollakota et al., 2018).

Los productos principales son el biocrudo (en mayor cantidad), gases de síntesis y biocarbón, además de compuestos solubles en agua; sus rendimientos dependen del tipo de biomasa y las condiciones de operación utilizadas. Las reacciones de despolimerización que ocurren son fragmentación, hidrólisis, deshidratación, desoxigenación, aromatización y repolimerización (Venkatachalam et al., 2021).

El biocarbón obtenido con estos procesos hidrotermales (hidrocarbón) tiene propiedades únicas con las cuales promete ser un mejor candidato que el biocarbón obtenido por medio de pirólisis. Algunas de sus aplicaciones son: como biocombustible, adsorción de metales (Liu & Zhang, 2009), adsorción de colorantes (Srivatsav et al., 2020), tratamiento de aguas residuales, alimento para animales, o como aditivo en la digestión anaerobia (Ponnusamy et al., 2020).

Armazones organometálicos

Los armazones organometálicos (metal-organic frameworks, MOFs) son polímeros de coordinación formados por iones metálicos y ligandos orgánicos; estos forman una estructura tridimensional con grandes áreas superficiales, de

hasta 10,000 m²/g, lo cual los hace ideales para su uso en almacenamiento o separación de gases.

Una de las mejoras sugeridas para la producción de MOFs es la utilización de solventes más respetuosos con el medio ambiente, además de la generación de materiales menos tóxicos. Se puede lograr buscando opciones distintas a los solventes habituales en este campo, como la dimetilformamida, y sustituirlos por agua. Además, también se propone realizar la reacción de síntesis a temperatura y presión ambiente, o reducir la temperatura de activación para evitar la formación de subproductos indeseados (Zeraati et al., 2021).

De los biocompuestos interesantes y disponibles para su extracción a partir de *Opuntia ficus-indica* se han reportado ácidos fenólicos como: ácido gálico, benzoico, siringico, tánico, cafeico, málico y ferúlico; además de flavonoides como: quercetina, kaempferol, vanilina, rutina, isorhamnetina y apigenina (Aruwa et al., 2019a; Iftikhar et al., 2023). Estos compuestos, esencialmente los ácidos fenólicos pueden ser utilizados como ligandos orgánicos en la síntesis de armazones organometálicos, diseñando así una “síntesis verde” en la que se utilizan los extractos acuosos o alcohólicos como base para su preparación. El ácido gálico se ha encontrado en mayor proporción en los extractos de *O. ficus-indica*, por lo que se realizó una búsqueda bibliográfica que resultó en cuatro síntesis de un MOF con ácido gálico como ligando orgánico (Tabla A20).

Tabla A20. Armazones organometálicos con ácido gálico como ligando orgánico.

Referencia	Síntesis	Aplicación	Resultados
(Azhar et al., 2023)	2.5 mmol AG H en 5 mL NaOH 0.95 M (relación molar 1.9 NaOH a GA) 2.5 mmol CuCl ₂ 2H ₂ O en 5 mL H ₂ O Ambas mezclas se agitaron y calentaron a 90 °C y 200 rpm durante 1 h. La solución metálica se añadió gota a gota a la solución de ligando en condiciones isotérmicas y se calentó durante 2 h. El sólido marrón oscuro resultante se lavó 5 veces con 40 mL de agua desionizada. El sólido marrón oscuro resultante se lavó 5 veces con 40 mL de agua desionizada.	Remoción de Pararosanilina de soluciones acuosas	Los parámetros óptimos de relación molar NaOH-AG, temperatura y tiempo de reacción fueron 1.8, 108 °C y 1.5 h; con ellos se obtuvo un 60 % de rendimiento y un 59.2 % de cristalinidad. La temperatura tiene una fuerte correlación con las respuestas.
(Azhar et al., 2020)	2.5 mmol AG en 5 mL NaOH 1.1 M 2.5 mmol CuCl ₂ 2H ₂ O en 5 mL H ₂ O La solución de metal se añadió gota a gota a la solución de ligando. Esta mezcla se mezcló durante 2 h a temperatura constante de 90 °C. Los sólidos de color marrón oscuro obtenidos se lavaron con agua desionizada 5 veces. Los sólidos se liofilizaron.	Remoción de azul de metileno y rojo congo	MOF mesoporoso con área superficial de 198.22 m ² /g, diámetro de poro de 8.6 nm y estabilida térmica de 219 °C. Capacidad de adsorción: MB: 124.64 mg/g CR: 344.54 mg/g 5 ciclos de adsorción-desorción >90%.
(Sharma et al., 2019)	0.22 g aerosol OT solubilizado en agua dd + 400 uL de n-butanol 200 uL acetato de cobre 0.1 M + 200 uL AG 0.1 M en DMF a temperatura constante de entre 70 - 80 °C. Reacción durante 12 h, adición de etanol para precipitar las partículas.	Administración de fármacos	
(Pezhhanfar et al., 2023)	20 mmol CuCl ₂ 2H ₂ O en 40 mL H ₂ O (disuelto con sonicación) se colocó en una bureta 44 mmol NaOH en 40 mL de H ₂ O y se añadieron 20 mmol de ácido gálico. El matraz se colocó en un baño de agua con agitación a 90 °C. El contenido de la bureta se añadió gota a gota. Una vez terminado el contenido de la bureta, la suspensión se agitó durante 2.5 h para completar la reacción. El sólido se separó de la solución por filtración y lavado con agua desionizada 5 veces (con 10 mL).	Eliminación de pesticidas del jugo de perejil	

Obtención de biocarbón mediante tratamiento hidrotermal de *O. ficus-indica*

Propósito

Producir y caracterizar un biocarbón a partir de la carbonización hidrotermal de *O. ficus-indica* y del residuo de digestión anaerobia (R-DA).

Diseño experimental

Obtención de biocarbón de O. ficus-indica

Se propone un diseño factorial para evaluar el efecto de la temperatura y la relación sólido líquido en la composición, características y potenciales aplicaciones del carbón obtenido a partir de la carbonización hidrotermal del cladodio de *O. ficus-indica*. Los factores y niveles por evaluar serán los propuestos en la Tabla A21.

Tabla A21. Diseño experimental para la carbonización hidrotermal de *O. ficus-indica*.

Factores	Niveles	
Temperatura (°C)	220	260
Relación sólido-líquido (g/mL)	0.1	0.2

Programa de seguimiento y análisis

El biocarbón se caracterizará mediante los siguientes parámetros (Tabla A22) para elegir las mejores condiciones de carbonización hidrotermal.

Tabla A22. Parámetros para la caracterización de los carbones obtenidos de *O. ficus-indica*.

Parámetros	Método	Referencia
Características texturales	Fisisorción de nitrógeno	-
Grupos funcionales superficiales	FT-IR	-
Cuantificación de grupos funcionales ácidos y básicos	Titulación Boehm	(Elhleli et al., 2020)
Punto de carga cero	Potenciométrico	(Lavado-Meza et al., 2023)

Procedimientos y técnicas

Punto de carga cero

Para medir el pH del punto de carga cero (pH_{ZCN}) se preparan varios tubos Corning con una cantidad de volumen conocida (25 mL) con solución acuosa de

NaCl (0.01 M) a valores de pH de 2, 4, 6, 8, 10 y 12; el pH inicial se reguló utilizando soluciones acuosas de NaOH o HCl 0.1 M). Se burbujea nitrógeno para estabilizar el pH y evitar la disolución de CO₂. Posteriormente, se agregan 0.1 g del biocarbón en cada uno de los tubos y se agitan durante 24 h a temperatura ambiente. Al finalizar, se mide el pH (pH_f) de la solución y se grafica ΔpH (pH_i - pH_f) en función del pH_i. El pH_{ZCN} será aquel valor de pH que cruce el eje X (Elhleli et al., 2020).

Titulación Boehm

Se agregan 750 mg de la muestra a 25 mL de las soluciones de carbonato de sodio, bicarbonato de sodio e hidróxido de sodio (0.05 M). Las soluciones se agitan a temperatura ambiente por 24 h y posteriormente se filtran para eliminar el carbón. Se toman 10 mL de cada filtrado y, para los de NaOH y NaHCO₃ se agregan 20 mL de solución de HCl 0.05 M, mientras que para el de Na₂CO₃ se agregan 30 mL de HCl 0.05 M. Se determinan los puntos de neutralización añadiendo NaOH 0.05 M y usando un conductímetro. El número de grupos funcionales superficiales de carbono (n_{CSF}) se calcula tomando en cuenta que el Na₂CO₃ niega los grupos carboxílicos y lactónicos mostrados en la ecuación (19, el NaHCO₃ niega los grupos carboxílicos en la ecuación (20, y el NaOH niega los grupos fenólicos, lactónicos y carboxílicos en la ecuación (20:

$$n_{CSF} = \frac{1}{m} \left[2[B]V_B - \frac{V_B}{V_p} ([HCl]V_{HCl} - [NaOH]V_{NaOH}) \right] \quad (19)$$

$$n_{CSF} = \frac{1}{m} \left[[B]V_B - \frac{V_B}{V_p} ([HCl]V_{HCl} - [NaOH]V_{NaOH}) \right] \quad (20)$$

Donde **[B]** y **V_B** son la concentración y el volumen de la base mezclada con el carbón, **V_P** es el volumen retirado de la solución básica después de la filtración, **[HCl]** y **V_{HCl}** son la concentración y el volumen de solución de HCl añadida a la muestra tomada de la muestra original, y **[NaOH]** y **V_{NaOH}** son la concentración y el volumen de NaOH usado para titular.

La cantidad de sitios básicos se determina usando HCl 0.05 M. El procedimiento es el mismo al anteriormente mencionado, y el exceso de HCl se titula con NaOH 0.05 M:

$$\text{Grupos básicos totales} = \frac{1}{m} [[HCl]_0 V_A - [NaOH] V_{NaOH}] \quad (21)$$

Donde V_A y $[HCl]_0$ son el volumen y la concentración de HCl mezclada con el carbón, y V_{NaOH} y $[NaOH]$ son el volumen y la concentración de NaOH usado en la titulación.

Síntesis de un armazón organometálico con extracto de *O. ficus-indica*

Propósito

Utilizar los compuestos fenólicos en el extracto de *Opuntia* como precursor o ligando orgánico en la síntesis de armazones organometálicos.

Diseño experimental

Síntesis del armazón organometálico Cu-GA (cobre-ácido gálico)

Se siguió la metodología propuesta por Azhar et al. (2020) que consiste en preparar las soluciones de la sal metálica y del ligando orgánico por separado. Se utilizaron 2.5 mmol de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.4262 g) en 5 mL de agua desionizada a 80 °C. A parte, en un recipiente roscado, se pesaron 2.5 mmol de ácido gálico monohidratado (0.4704 g) en 5 mL de una solución de NaOH 1 M. A esta solución se le fue agregando gota a gota (utilizando una pipeta Pasteur) la solución de la sal metálica en agitación magnética constante de 300 rpm a 80 °C por 2 h.

El sólido de la mezcla se lavó 3 veces (3 volúmenes) con agua desionizada; después de cada lavada, se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min y el sobrenadante se decantó para posteriormente agregar el agua de lavado y agitar vigorosamente antes de repetir el proceso. El sólido café oscuro se dejó secar en horno a 105 °C por 12 h.

Síntesis de Cu-GA MOF: Adición de sal metálica

Se realizó un par de síntesis del Cu-GA para identificar si afectaba significativamente la adición gota a gota de la sal metálica. Se propuso el mismo procedimiento, uno con la adición de la sal metálica utilizando una pipeta Pasteur, y otro vertiendo la solución directamente.

Síntesis de Cu-GA MOF: Escalamiento

La síntesis se escaló 4 veces con respecto a los ensayos anteriores; i.e. se utilizaron 10 mmol de ácido gálico en 20 mL de una solución de NaOH 0.9 M y 10 mmol de cloruro de cobre en 20 mL de agua desionizada. Ésta última se colocó en una bureta, mientras que la solución del ácido gálico se colocó en una plancha de calentamiento con agitación. La solución metálica se dejó añadir gota a gota durante 15 min. Al finalizar el volumen, el recipiente se cerró y se dejó reaccionar a 80 °C por 1.5 h. El sólido se lavó 3 veces (2 volúmenes) con agua desionizada, centrifugando y decantando el sobrenadante. El sólido café se secó en un horno a 105 °C por 12 h.

Síntesis de Cu-GA MOF con extracto de Opuntia

Primero se llevó a cabo la extracción de compuestos fenólicos por maceración de 10 g de nopal seco en 100 mL de metanol al 80 %, en un baño de ultrasonidos por 2 h. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min y el sobrenadante se filtró con papel filtro Whatman no. 1. Se determinó la cantidad de compuestos fenólicos totales utilizando el método de Folin-Ciocalteu, lo cual nos dio 1 g/L de ácido gálico equivalente. Esto quiere decir que en 90 mL de sobrenadante hay aproximadamente 90 mg de algún compuesto fenólico.

Resultados

Con el propósito de utilizar el extracto de *O. ficus-indica* para la síntesis de un material adsorbente, se realizó una búsqueda bibliográfica en la que se plasmaron los principales compuestos fenólicos obtenidos de su extracto y su posible participación en la síntesis de un armazón organometálico. Se encontró que el ácido gálico (que representa el ácido fenólico más abundante en los

extractos de *Opuntia*) puede formar MOFs con cobre al utilizar $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. En la Figura A6 se pueden observar picos característicos en $2\theta = 10.22, 13.43, 20.19, 22.32, 31.45, 33.47$ y 41.93° , que se asemejan a los reportados anteriormente por Azhar et al. (2020) y Sharma et al. (2019) (Figura A7).

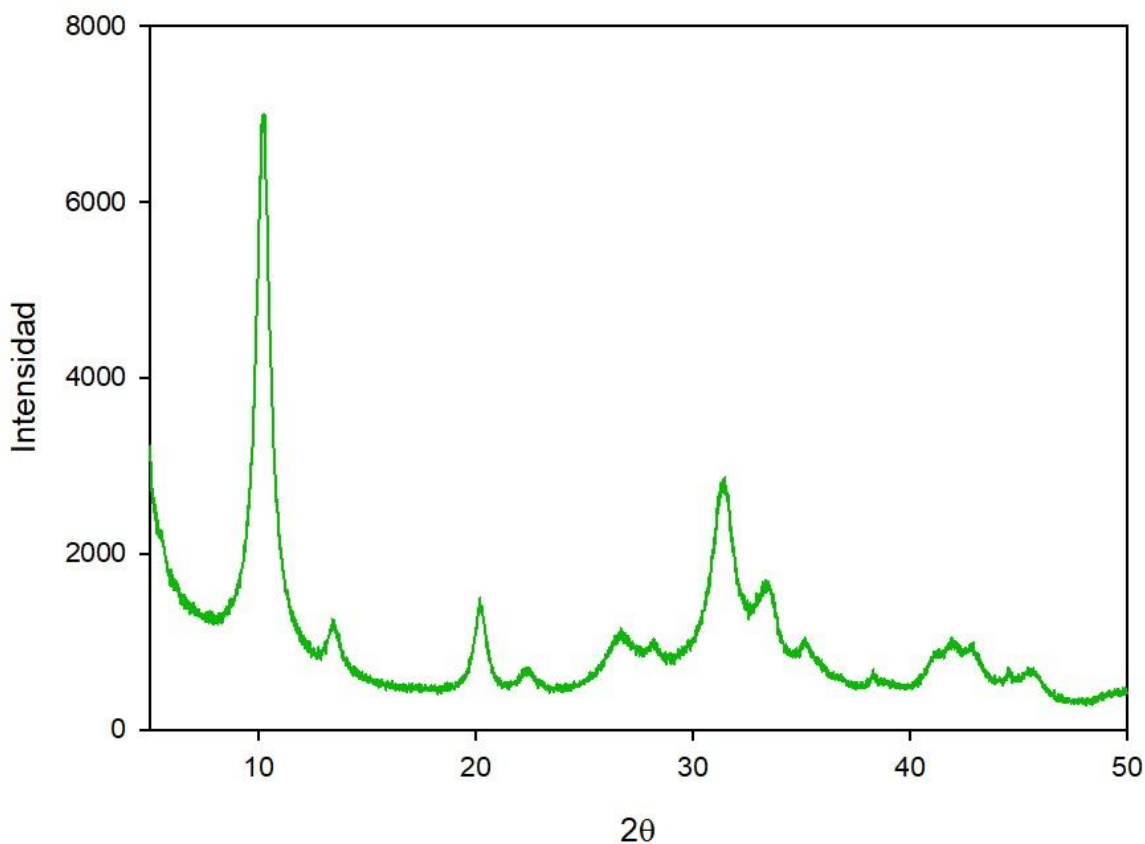


Figura A6. Patrón de difracción de rayos X del armazón organometálico Cu-GA.

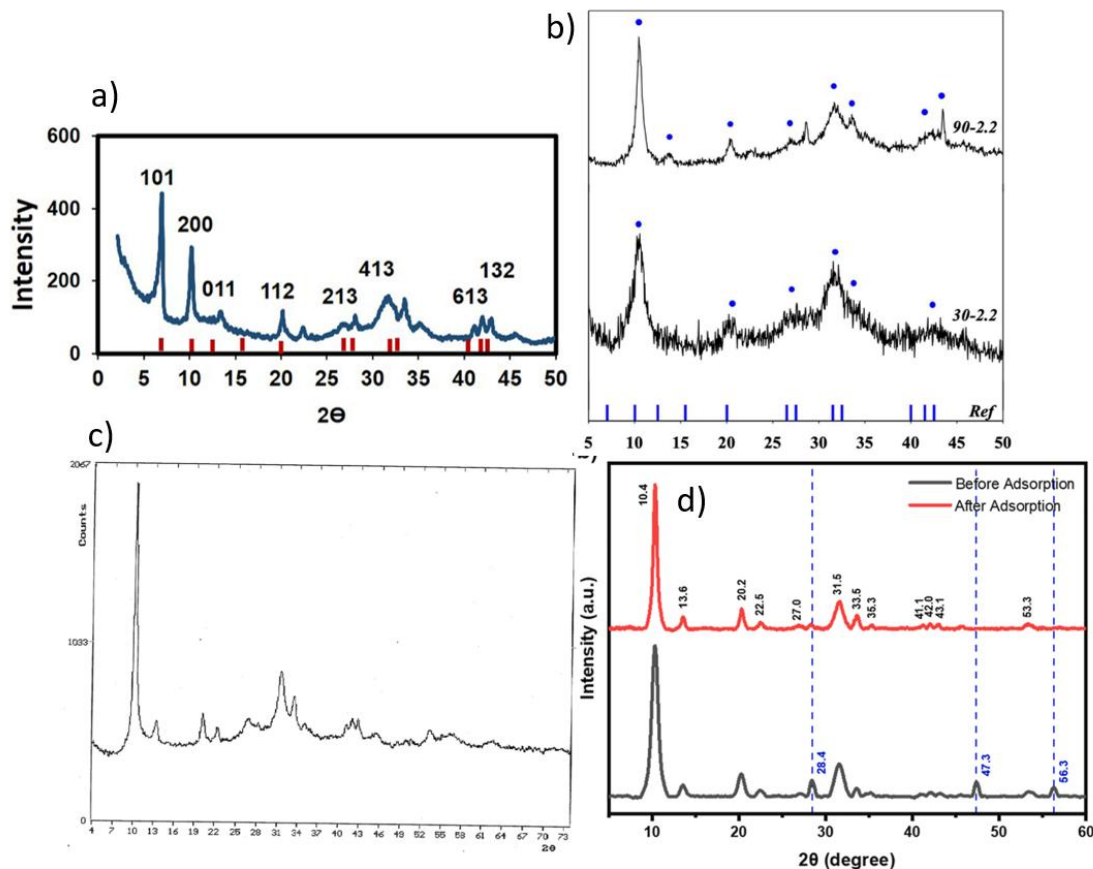


Figura A7. Patrones de difracción de rayos X del armazón organometálico sintetizado Cu-GA en a) Sharma et al. (2019), b) Azhar et al. (2020), c) Pezhhanfar et al. (2023), y d) Azhar et al. (2023).

Síntesis Cu-GA MOF: Adición de sal metálica

Pudimos observar que, al verter la solución, la reacción no se llevaba a cabo ya que al centrifugar el primer lavado se lograba separar un polvo blanco, presuntamente ácido gálico sin reaccionar u óxido de cobre precipitado. La adición lentamente de la sal metálica y la agitación constante ayudan a que el cobre pueda interactuar libremente con el ácido gálico desprotonado para evitar la precipitación de subproductos no deseados como el óxido de cobre. Los rendimientos alcanzados (64.4 y 62.1 %) fueron similares y ligeramente mayores a los reportados por Azhar et al. (2023).

9.4 MONTAJE DE REACTORES DE DA/FO EN LOTE

Para comenzar con el cálculo del montaje de los reactores (de digestión anaerobia o fermentación oscura), debemos saber:

- Sólidos totales (**ST_{sus}**) y sólidos volátiles (**SV_{sus}**) del sustrato
- Sólidos totales (**ST_{ino}**) y sólidos volátiles (**SV_{ino}**) del inóculo
- Masa de operación del reactor (**m_{op}**)
- Relación inóculo sustrato (**RIS**)

La RIS está en unidades de SV_{ino}/SV_{sus}. Para facilitar el cálculo de la cantidad de inóculo y de sustrato a utilizar, los ST se representan en g ST/g BH y los SV en g SV/g ST. Es necesario realizar el perfil de sólidos tanto del sustrato como del inóculo para continuar con el montaje de los reactores.

Primero, utilizando la RIS y una base de cálculo de la masa de inóculo en SV del reactor (m_{inoSV}), se calcula m_{susSV}:

$$m_{susSV} = \frac{m_{inoSV}}{RIS} \quad (22)$$

Luego, utilizando ST y SV de inóculo y sustrato se calculan m_{susBH} y m_{inoBH}:

$$m_{susBH} = \frac{m_{susSV}}{SV_{sus}ST_{sus}} \quad (23)$$

$$m_{inoBH} = \frac{m_{inoSV}}{SV_{ino}ST_{ino}} \quad (24)$$

Posteriormente se calcula la masa total del reactor que se utilizará como base de cálculo para obtener la masa de sustrato y de inóculo cuando ya se tiene una masa de operación especificada.

$$m_{total} = m_{inoBH} + m_{susBH} \quad (25)$$

$$m^*_{susBH} = \frac{m_{op}m_{susBH}}{m_{total}} \quad (26)$$

$$m^*_{inoBH} = \frac{m_{op}m_{inoBH}}{m_{total}} \quad (27)$$

Si se necesitan ajustar los ST en el reactor, se calculan los ST del reactor inicial:

$$ST_{reactor} = \frac{m_{inoST} + m_{susST}}{m_{total}} \quad (28)$$

El caso más común es diluir el sustrato, por lo que se hará una regla de tres utilizando los sólidos volátiles del sustrato inicial; se cambiarán arbitrariamente los sólidos totales del sustrato diluido para obtener el porcentaje deseado

9.5 PREPARACIÓN Y PUESTA EN MARCHA DE REACTORES INOCULADORES

Para arrancar los fermentadores productores de hidrógeno, se deben primero asegurar reactores anaerobios inoculadores capaces de mantener una producción de biomasa y biogás. A continuación, en la X y X se pueden observar tanto la producción como la productividad del reactor inoculador UANL (R1). Este inóculo se reactivó por un mes con un pulso de sacarosa y después se acondicionó con nopal licuado desde 100 de TRM hasta 50.

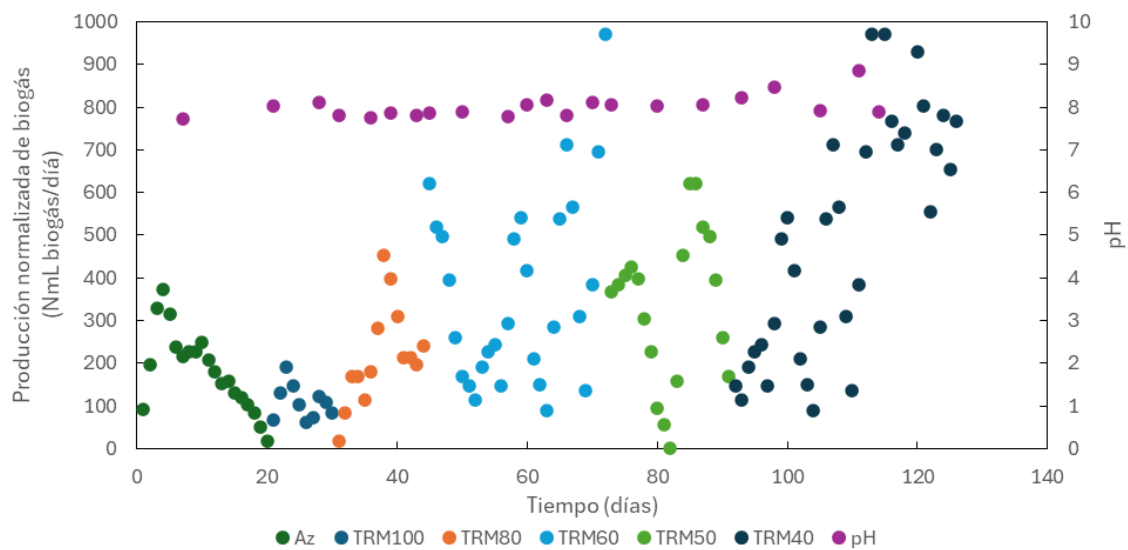


Figura A8. Producción normalizada de biogás (NmL biogás/día) del reactor UANL (o R1). Promedio ponderado.

Tabla A23. Resultados promedio por alimentación del reactor madre UANL (R1).

Etapa de alimentación	Días	Producción promedio	Productividad promedio	pH	IA/PA
		(NmL biogás/d)	(NmL biogás/d·kg _R)		
Az	20	179.59	152.00	7.88	
TRM 100	11	101.68	76.68	7.97	0.36
TRM 80	14	229.99	162.80	7.82	0.40
TRM 60	28	389.17	264.43	7.98	0.41
TRM 50	19	324.13	353.50	8.05	0.41
TRM 40	51	679.46	514.95	8.17	0.45

De igual manera, se montó un reactor utilizando lodos de planta de tratamiento de aguas residuales, tierra de jardín y estiércol de vaca. Éste se acondicionó por dos semanas sin alimentación y un pulso de sacarosa. A partir del mes, se comenzó a alimentar con nopal licuado para su posterior uso. En la X y X se muestran la producción de biogás y la productividad de este reactor (R2).

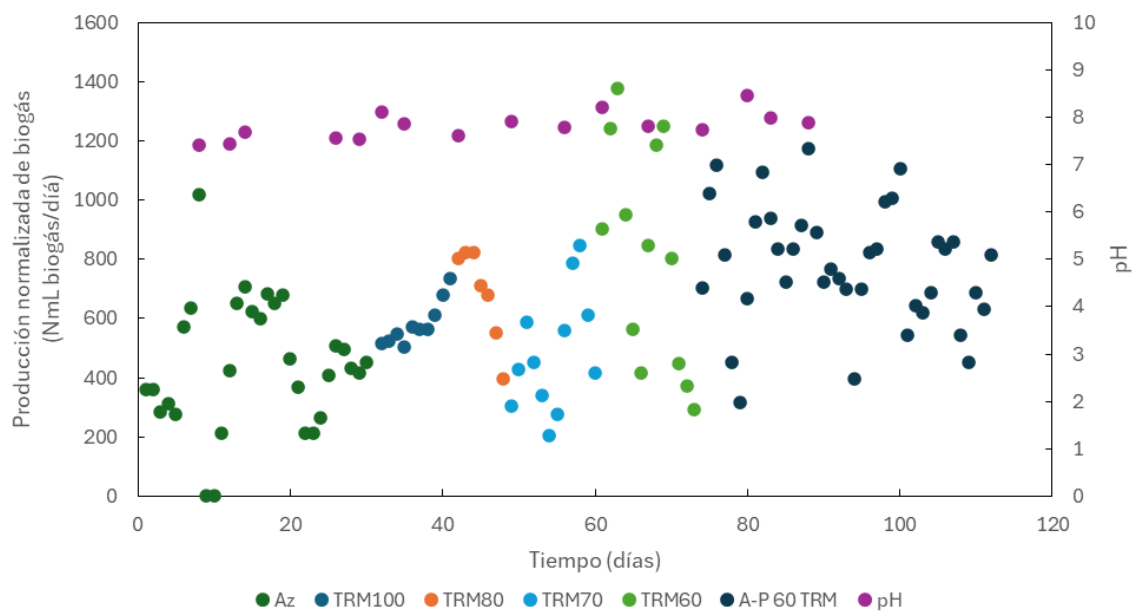


Figura A9. Producción de biogás normalizada (NmL biogás) del reactor 3/3 (o R2).

Tabla A24. Resultados promedio por alimentación del reactor madre tres tercios (R2).

Etapa de alimentación	Días	Producción promedio (NmL biogás/d)	Productividad promedio (NmL biogás/d·kg _R)	pH	IA/PA
Az	28	456.35	289.23	7.62	0.69
TRM 100	10	604.99	353.34	7.73	0.514
TRM 80	7	619.76	339.47	7.92	0.462
TRM 70	13	475.81	247.88	7.97	0.53
TRM 60	14	779.54	375.16	7.93	0.58
A-P TRM 60	39	775.78	400.50	7.97	0.47