

Evaluación del potencial de *Opuntia* sp. como sustrato para la obtención de azúcares fermentables para la generación de etanol.

PÉREZ-CADENA, Rogelio*†, ESPINOSA-SOLARES, Teodoro, MEDINA-MORENO, Sergio Alejandro, MARTÍNEZ, Alfredo, LIZARDI-JIMÉNEZ, Manuel Alejandro y TÉLLEZ-JURADO, Alejandro

Recibido 14 de Octubre, 2017; Aceptado 18 de Diciembre, 2017

Resumen

El nopal es el nombre común que reciben las cactáceas del género *Opuntia*, en México *Opuntia ficus indica*, es ampliamente cultivada. De entre los principales componentes del nopal se encuentra las espinas, el mucílago y la fibra la cual aumenta con la edad, por ello se evaluó el efecto de la relación sólidos/ácido y el tiempo, sobre la edad y variedad de *Opuntia* para la obtención de azúcares fermentables. Se observó inicialmente que tanto la cantidad de sólidos como la edad, tuvieron un efecto sobre la liberación de azúcares, llegándose a obtener hasta 45 g/L con un 10 % de sólidos y 80 min, sin embargo; el proceso de rehidratación limitó su solubilidad. En las variedades Energy, Atlixco, Milpa Alta y Azul Gigante se obtuvieron 15 g/L de ART en cladodios de 12 meses, mientras que los de 6 meses se observó un promedio de 10 g/L. En cuanto a la cantidad de azúcares, se observó en la variedad Milpa Alta 10 g/L de glucosa. Mientras que en la variedad Milpa alta y Energy presentaron la mayor cantidad de azúcares fermentables con un 52.23 y 31.21 % representados principalmente como glucosa lo que representó 23.23 y 9.71 g/100 g de sólidos.

Opuntia, Variedad, Hidrólisis, Azúcares reductores.

Abstract

Nopal is the common name given to cacti from the genus *Opuntia*, in Mexico *Opuntia Ficus Indica*, is widely cultivated. Among the main components of nopal is the thorns, mucilage and fiber which increases with age, thus assessed the effect of the relationship solid/acid and time, on the age and variety of *Opuntia* for obtaining fermentable sugars. It was initially observed that both the amount of solids and age, had an effect on the release of sugars, reaching to obtain up to 45 g/L with 10% solids and 80 min, however; The rehydration process limited its solubility. In the varieties Energy, Atlixco, Milpa Alta and giant Blue were obtained 15 g/L of ART in Cladodes of 12 months, while those of 6 months was observed an average of 10 g/L. As for the quantity of sugars, it was observed in the Milpa variety High 10 g/L of glucose. While in the Milpa Alta and Energy Variety they presented the highest amount of fermentable sugars with a 52.23 and 31.21% represented mainly as glucose which represented 23.23 and 9.71 g/100 g of solids.

Opuntia, Variety, Hydrolysis, Reducing Sugars.

Citación: PÉREZ-CADENA, Rogelio*†, ESPINOSA-SOLARES, Teodoro, MEDINA-MORENO, Sergio Alejandro, MARTÍNEZ, Alfredo, LIZARDI-JIMÉNEZ, Manuel Alejandro & TÉLLEZ-JURADO, Alejandro. Evaluación del potencial de *Opuntia* sp. como sustrato para la obtención de azúcares fermentables para la generación de etanol. Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología. 2017, 1-2: 8-23

* Correspondencia al autor (email: rogelioperez@upp.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

El nopal es el nombre común que reciben las cactáceas del género *Opuntia*, de las cuales han sido reconocidas 377 especies, de estas; 48 especies son utilizadas por el hombre; 24 especies se usan para el consumo directo; 6 especies como nopal tunero; 15 especies como nopal para forraje y 3 especies como nopal verdulero. De todas las especies reconocidas, la más común y cultivada en distintas partes del mundo es *Opuntia ficus indica* (Ornelas, 2011). En México esta variedad es cultivada en 29 entidades federativas, existiendo 50,000 productores directos en 14 estados quienes producen alrededor de 723 000 toneladas en 12,500 hectáreas (CNSPNT, 2013).

De entre las muchas aplicaciones de *Opuntia* se encuentran algunos como hospedante del insecto cochinilla (*Dactylopius coccus*), los nopalitos se utilizan para elaborar preparaciones antidiabéticas, sus flores son usadas para preparar bebidas diuréticas y los frutos son utilizados para preparar jugos, jaleas, miel, mermeladas y pastas, además de la obtención de aceite de sus semillas (Reyes-Agüero, Aguirre R., and Valiente-Banuet 2006). Como alimento funcional, los frutos y los cladodios son una fuente importante de: fibra, hidrocoloides (mucílagos), pigmentos (betalaínas y carotenoides), Ca y K, y vitamina C; compuestos muy apreciados para una dieta saludable (Valencia-Sandoval, Brambila-Paz, and Mora-Flores 2010). La composición química del nopal es muy variable en función de la especie, edad de los cladodios y época del año. En base Humeda, presenta altos niveles de agua en su composición, con un 91.8 %; siguiéndole en porcentaje los carbohidratos con un 5.5 % y por último las cenizas con un 1.58 % (Ornelas, 2011). De entre los principales componentes del nopal se encuentra el mucílago.

Este hidrocolóide, es un polisacárido cuyo peso molecular oscila en 13×10^6 g/mol y está compuesto por polisacáridos similares a las pectinas. El contenido de azúcares en estos polisacáridos se encuentra en proporciones aproximadas de 47 % de L-arabinosa, 18 % de D-galactosa, 7 % de L-ramnosa, y 23 % de D-xilosa como el principal azúcar además del 5% de ácido D-galacturónico (Cárdenas, Higuera-Ciapara, and Goycoolea 1997). La estructura primaria del mucílago del nopal sugiere una cadena lineal con cadenas repetidas de enlaces (1-4)- β -D-ácido galacturónico y enlaces α -(1-2)-L-ramnosa con cadenas laterales de trisacáridos formados por enlaces β -(1-6) D-galactosa unidas a residuos de L-ramnosa.

La presencia de residuos laterales a la cadena principal de galactosa presenta ramificaciones de composición compleja conteniendo residuos de L-arabinosa con enlaces (1-5) a residuos de grupos de oligosacáridos de D-xilosa (Cárdenas, Higuera-Ciapara, and Goycoolea 1997). Además del mucílago, el nopal es una fuente natural con un alto contenido de fibra compuesta por una red bilateral de residuos lignocelulósicos que con la edad se endurece y le proporcionan una constitución rígida, aumentando el grosor e intensificando el color (Aquino et al. 2012). Actualmente en México existen acciones concretas dirigidas a la obtención de biogás, en Michoacán opera un biodigestor industrial funcionando como empresa privada en proceso de alcanzar su óptima escala comercial y rentabilidad económica. En el país, los estados competidores en materia de bioenergéticos a base de nopal para la producción de biogás se encuentran el estado de Zacatecas, Aguascalientes, Michoacán y Sinaloa (Ramírez, Sosa, and Santos 2012).

En cuanto a la producción de etanol, existen reportes encaminados a la fermentación del jugo obtenido a partir de la fruta de nopal (tuna) para la obtención de vino empleando para ello microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia fermentans* con un rendimiento de 8.73 % v/v de etanol (Castellar et al. 2008; Rodríguez-Lerma et al. 2011). Bollók, Réczey, & Zacchi, (2000), mencionan que es posible obtener 55.3 mL de etanol a partir de la fermentación con *S. cerevisiae*; pero es necesario establecer criterios de optimización para la fermentación, algunos criterios pueden ser: contenido de etanol, compuestos volátiles, ácidos orgánicos, y compuestos que producen color (Navarrete-Bolaños et al. 2013). En el presente trabajo se evaluó el efecto de variables como la relación sólidos/ácido y el tiempo de hidrólisis ácida sobre la edad y variedad de *Opuntia* como criterio de evaluación del potencial para la obtención de azúcares reductores y su posible uso como sustrato para la generación de etanol.

Materiales y Métodos

Preparación de la materia prima

Seis variedades de nopal, Copena VI; Azul Gigante; Goliat; Atlixco, Energy y Milpa Alta de 6 y 12 meses de edad fueron cortados en cubos de 2 cm y secados a 60 ° C durante 72 h, posteriormente fueron molidos utilizando un molino de cereales comercial. La harina obtenida fue almacenada en bolsas plásticas y mantenidas en un lugar seco y fresco hasta su uso.

A partir de dos variedades de cladodio de nopal, se evaluó el efecto de factores como el tiempo, y el porcentaje de sólidos en la obtención de azúcares reductores totales (ART) y azúcares totales; manteniendo la concentración del ácido sulfúrico al 1 % y la temperatura a 121 °C como condiciones constantes, mientras que la cantidad de sólidos y la temperatura fueron evaluados en 1, 5 y 10 % p/v y 40, 60 y 80 min respectivamente; Los resultados fueron evaluados usando metodología de superficie de respuesta (RSM) para estudiar la influencia de los factores evaluados en la hidrólisis con el programa Statgraphics Centurion XVII.I.

Identificación y caracterización proximal de la composición de los hidrolizados de cladodios de nopal.

A partir de la harina de las 6 variedades de nopal se realizó la determinación de extractos totales, de acuerdo a la norma TAPPI 204 om-8 y TAPPI 207 om-93; cenizas con la norma TAPPI 211 om-93, lignina insoluble en ácido Con la norma TAPPI 222 om-88 y Holocelulosa de acuerdo a Browning (1967), modificada por Hernández, (2008).

Técnicas analíticas

La concentración de azúcares reductores fue determinada usando el método de ácido dinitrosalicílico descrito por Miller, (1959) y usando glucosa como estándar. La determinación de fenólicos totales fue llevada a cabo usando el método Folin-Ciocalteu descrito por De Ascensao & Dubery, (2003) usando ácido gálico como estándar.

La concentración de glucosa, galactosa, manosa, y fructosa y oligosacáridos fue determinada por HPLC con inyección automática de 5 μ L por muestra, usando una columna Rezex RCM Ca⁺ monosacáridos para el análisis inicial (Phenomenex), equipado con horno de temperatura controlada a 80 °C, la fase móvil fue agua grado HPLC a 0.6 mL/min y 0.3 mL/min respectivamente, la cuantificación se realizó previa elaboración de curvas de calibración para cada uno de los azúcares.

Resultados y discusiones

Análisis proximal de las seis variedades de *Opuntia*.

A partir de las variedades de nopal, Copena VI; Azul Gigante; Goliat; Atlixco, Energy y Milpa Alta, se obtuvieron 400 g de harina previamente secado, de cladodios de entre 1.5 y 2 kg de cada variedad por triplicado. De las seis variedades, inicialmente se realizó un análisis proximal para determinar su composición promedio de cada tipo de *Opuntia*, para ello se emplearon las normas TAPPI para determinar la cantidad de extraíbles totales, lignina, holocelulosa y cenizas, los resultados obtenidos se muestra en la tabla 1.

De las seis variedades se pudo observar que los cladodios de 6 meses presentaron mayor cantidad de compuestos extraíbles en agua, mientras que en cladodios de 12 meses esta cantidad disminuyó, siendo la variedad Copena VI y Milpa alta las variedades que presentaron mayor cantidad de extraíbles en agua, con un 47.75 y 50.38 % respectivamente.

	Humedad	Extraíbles en agua	Extraíbles en solvente	Lignina	Holocelulosa	Cenizas		
6 meses	Copena VI	8.30 ± 0.27	47.75 ± 1.14	6.12 ± 0.65	3.85 ± 0.78	17.53 ± 3.01	27.5 8 ± 0.24	
	Azul Gigante	9.29 ± 0.89	46.73 ± 4.96	5.41 ± 0.28	6.76 ± 0.54	30.06 ± 2.83	18.7 5 ± 0.07	
	Goliat	8.95 ± 0.96	39.72 ± 1.82	6.47 ± 0.54	8.43 ± 0.15	16.90 ± 2.59	21.3 8 ± 0.23	
	Atlixco	8.81 ± 0.70	46.28 ± 1.95	7.58 ± 1.21	6.62 ± 1.22	19.28 ± 3.40	17.7 5 ± 0.01	
	Energy	8.01 ± 0.16	45.57 ± 0.42	6.43 ± 0.61	6.05 ± 0.60	21.19 ± 1.29	19.2 3 ± 0.69	
	Milpa alta	8.33 ± 0.06	50.38 ± 2.93	2.60 ± 0.24	2.58 ± 0.00	18.53 ± 1.76	14.5 7 ± 0.12	
	12 meses	Copena VI	8.40 ± 0.27	38.45 ± 2.49	5.80 ± 0.55	5.10 ± 0.45	13.60 ± 0.77	27.8 2 ± 0.50
		Azul Gigante	8.12 ± 0.89	43.48 ± 7.96	9.29 ± 1.14	10.02 ± 0.75	23.15 ± 2.96	19.9 5 ± 0.52
		Goliat	8.44 ± 0.96	40.91 ± 2.25	8.44 ± 1.01	10.84 ± 1.87	17.26 ± 1.48	22.4 7 ± 0.18
		Atlixco	7.17 ± 0.70	38.35 ± 3.23	8.78 ± 1.40	6.59 ± 0.28	15.68 ± 1.85	18.0 5 ± 0.25
		Energy	8.68 ± 0.16	40.84 ± 3.37	7.93 ± 1.54	8.84 ± 1.66	15.42 ± 0.27	21.6 4 ± 0.37
		Milpa alta	7.81 ± 0.06	43.49 ± 3.83	7.97 ± 0.57	12.46 ± 0.94	21.99 ± 1.36	18.6 2 ± 0.08

Tabla 1. Composición porcentual de seis variedades de *Opuntia* en base seca.

De acuerdo a Cai et al. (2008) en la extracción con agua de *Opuntia* variedad Milpa Alta, la principal sustancia extraíble son polisacáridos con pesos moleculares de 4 373 430, 63 366 y 1938 Da para tres fracciones obtenidas; con rendimientos observados de 0.654 %; de estos. Uno de los principales polisacáridos presentes en el género *Opuntia* es el mucílago el cual es una cadena compleja compuesta de diferentes tipos de oligosacáridos principalmente disacáridos y trisacáridos (Cárdenas, Higuera-Ciapara, and Goycoolea 1997).

Otro de los componentes evaluados fue la cantidad de lignina presente, la cual se presentó en cantidades menores al 8 % para las variedades de seis meses de edad, mientras que, para las variedades de 12 meses, la cantidad de lignina fue <12 % con un ligero aumento entre los 6 y 12 meses lo que indico que la edad es un factor determinante en la cantidad de lignina presente en la estructura de *Opuntia* (Tabla 1). Aquino et al. (2012) extrajeron la fibra de cladodios de nopal de un año de edad obteniendo hasta un 40 % de lignina en las fibras, demostrando que la cantidad presente de lignina cambia con la edad, factores edáficos, sitios de cultivo y época del año (Ginestra et al. 2009). Un aspecto importante en la composición de los cladodios de nopal de las variedades evaluadas fue el contenido de holocelulosa la cual comprende la cantidad de celulosa y hemicelulosa presente en la muestra, observándose que la cantidad de holocelulosa fue mayor en la variedad Azul Gigante con un 30 %, mientras que, a 12 meses, esta cantidad fue ligeramente menor con un 23.15 %, sin embargo; la cantidad de lignina mostró un aumento, de 6.72 a 10 %, lo que sugiere que con el incremento de la madurez de los cladodios, la cantidad de lignina aumenta así como la cantidad de holocelulosa debido probablemente a que el cladodio pasa a ser soporte de la planta aumentando su dureza (lignina) y cantidad de fibra (holocelulosa).

Del mismo modo se observó que las cenizas no tuvieron un aumento importante entre las dos edades, teniéndose un promedio de 20 % de cenizas en las variedades evaluadas. Malainine et al. (2003) encontraron que la cantidad de cenizas presentes en muestras de *O. ficus-indica* fue del 19 %, además de un 7.2 % de extraíbles en solventes y 3.6 % peso de lignina, estos resultados fueron similares a los reportados para las variedades de *Opuntia* evaluadas en este trabajo.

Por otro lado, Rodríguez-González et al. (2014) encontraron cantidades < 15% de cenizas en el mucílago obtenido de seis variedades de nopal, entre ellas se evaluaron; *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. ficus-indica*, *O. tomentosa*, *O. joconostle* y *O. atropes*, mientras que Aquino et al. (2012) encontraron hasta un 4 % de cenizas en las fibras obtenidas de los cladodios de *O. ficus-indica*, estos resultados sugieren que el mucílago es la principal fuente de cenizas se obtienen del mucílago y en menor proporción de la fibra, de tal forma que la suma de las dos cantidades son similares a los resultados mostrados en la tabla 1.

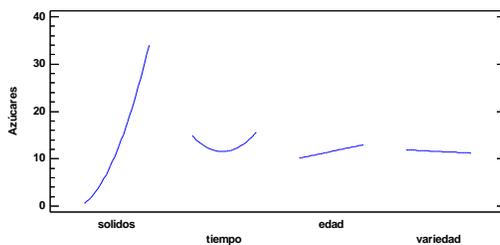
Efecto de la temperatura, sólidos, edad y variedad del cladodio de nopal sobre la obtención de azúcares.

Inicialmente se evaluó el efecto de la temperatura, y porcentaje de sólidos suspendidos en el proceso de hidrólisis ácida sobre las variedades Azul Gigante y Milpa Alta en el grado de obtención de azúcares reductores.

El análisis estadístico mostró que tanto la cantidad de sólidos como la edad, tuvieron un efecto sobre la liberación de azúcares ($p < 0.05$), lo que indicó que a medida que se aumentó la concentración de sólidos en el proceso de hidrólisis, se obtuvieron mayor cantidad de azúcares totales liberados llegando a obtener hasta 45 g/L con un 10 % de sólidos y 80 min.

Por otro lado, para cladodios de 12 meses de edad se observó un aumento en promedio de 5 g/L con respecto al obtenido con cladodios de 6 meses. Este efecto se observó de manera similar tanto para los cladodios de la variedad Azul Gigante como para la variedad Milpa Alta. Por lo tanto, no se observaron diferencias significativas entre la cantidad de azúcares totales liberados para las dos variedades estudiadas ($p < 0.05$) (Gráfica 1).

Este resultado indicó que el proceso de hidrólisis ácida, fue efectiva en ambas variedades de nopal (Gráfica 1); sin embargo, experimentalmente se observó que, a mayor cantidad de sólidos, el proceso de rehidratación de la harina de nopal limitó la solubilidad de estos lo que originó un bajo mezclado. Esto pudo deberse principalmente a que el mucílago presente en la harina de cladodio al rehidratarse mostró propiedades viscoelásticas, efecto que es dependiente de la concentración del mucílago en cada muestra (Medina-Torres 2000; León-Martínez et al. 2011), lo que origino a una limitación en la homogenización de la mezcla de reacción inicial para la hidrólisis ya que el mucílago forma agregados moleculares (Cárdenas, Higuera-Ciapara, and Goycoolea 1997). De acuerdo con Ginestra et al. (2009) el mucílago está presente tanto en las frutas como en los cladodios en al rededor de 14 % en peso seco, cuya función fisiológica principal es el de regular el contenido de agua en la célula y el flux de calcio en la planta (Nobel, Cavelier, and Andrade 1992).

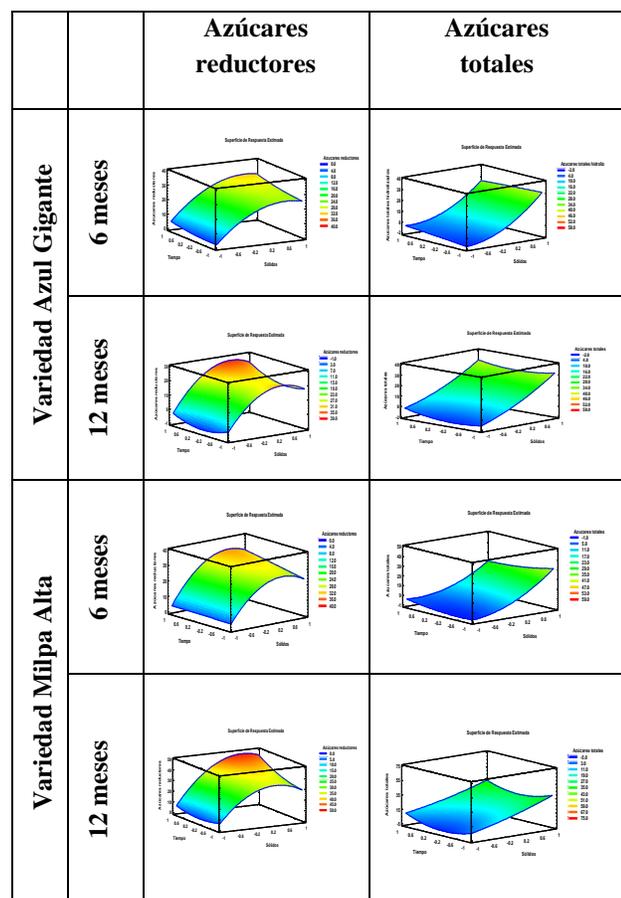


Gráfica 1. Gráfico de efectos principales para la obtención de azúcares totales.

Por otro lado, se observó que el tiempo de hidrólisis no tuvo un efecto en la obtención de azúcares, encontrándose que no existieron diferencias significativas entre los azúcares totales obtenidos a 40 y 80 min (Gráfica 1), adicionalmente se observó que existió una disminución en la cantidad de azúcares totales a los 60 min de hidrólisis, obteniéndose hasta 30 g/L con un 10 % de sólidos y una edad de 12 meses en comparación con los obtenidos bajo las mismas condiciones, pero con 40 y 80 min, se observaron resultados similares al comparar las variedades estudiadas. Estos resultados coincidieron con los reportados por Idrees et al. (2014) quienes observaron que a altas temperaturas y bajos tiempos de residencia se obtenía un máximo en la hidrólisis, así mismo observaron que con una concentración de 1 y 2 % de ácido sulfúrico por tres horas a 121 ° C se alcanzaba 27.25 y 29.19 g/L respectivamente. Estos resultados fueron comparables con la cantidad de azúcares obtenidos a 5 % de sólidos usados tanto para la variedad Azul Gigante y Milpa alta durante el tratamiento por 40 min de donde se obtuvieron 29 y 35 g/L respectivamente. Contrario al efecto de los factores evaluados Jeevan et al. (2011) mencionan que la concentración de ART se incrementa cuando son usadas altas temperaturas y altos tiempos de reacción, sin embargo; durante su trabajo experimental observaron que aunque la reacción se llevó a cabo por largo tiempo no se observó un incremento en la cantidad de azúcares pero si un ligero incremento en la cantidad de compuestos inhibitorios.

La disminución en la cantidad de carbohidratos liberados durante la hidrólisis en el tratamiento con 60 min puede deberse a la formación de compuestos inhibitorios posterior a la hidrólisis inicial del mucílago presente en la harina de los cladodios.

Motivo por el cual a mayor tiempo de reacción la cantidad de azúcares vuelve a aumentar, esto es debido posiblemente a una continua hidrólisis de la hemicelulosa y celulosa presente en las muestras de cladodios de nopal, sin embargo; dejar que el proceso se lleve a cabo durante más tiempo puede causar una sobre degradación de azúcares y lignina, originando compuestos inhibitorios tales como ácidos orgánicos furanos y fenoles (Shahbazi and Zhang 2010; Silvério 2013).

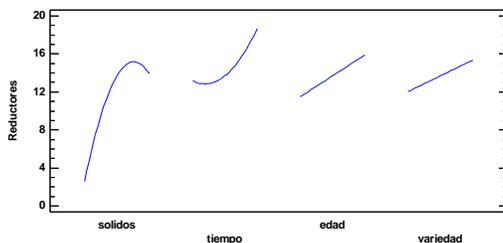


Gráfica 2. Efecto del % de sólidos y la temperatura de hidrólisis sobre la cantidad de azúcares totales y azúcares reductores liberados.

Al comparar el efecto de los factores estudiados sobre la cantidad de azúcares reductores totales (ART) (Gráfica 2) se observó que contrario a los azúcares totales, a mayor cantidad de sólidos existe una ligera disminución en la cantidad de azúcares reductores, esto pudo deberse principalmente a que durante el tratamiento ácido favoreció la destrucción de la estructura del material lignocelulósico, liberando únicamente los azúcares presentes en la hemicelulosa sin afectar directamente la lignina y la celulosa (Silvério 2013); de tal manera que únicamente la hemicelulosa y el mucílago son los principales azúcares hidrolizados y estos disminuyen ligeramente con un 10 % de sólidos. Los resultados mostraron que, tanto para las dos variedades estudiadas como para la edad de 12 meses de los cladodios, se obtuvieron 28.94 y 28.12 g/L a 5 y 10% de sólidos respectivamente para la variedad Azul Gigante, mientras que se obtuvo 35 y 29 g/L bajo las mismas condiciones para la variedad Milpa Alta. Estos resultados sugieren que con el uso de un 5% de sólidos se puede obtener una cantidad de azúcares reductores mayor en comparación a los obtenidos con un 10 % de sólidos (Gráfica 3), resultados similares fueron reportado por Idrees et al. (2014) quienes observaron que a medida que aumentó la concentración de sustrato (water hyacinth plants)

La cantidad de azúcares reductores incrementó mientras que el rendimiento en la hidrólisis disminuyó, de tal forma que la 40 g/L de sustrato el rendimiento de la hidrólisis fue del 74 % y a medida que la concentración de sólidos aumentó a 50 g/L el rendimiento de la hidrólisis disminuyó a 70 % esto puede deberse principalmente a limitaciones el proceso de transporte de masa en la matriz sólida del sustrato aunado a la degradación de los azúcares por el proceso de reacción.

Aunado a estos resultados y como se mencionó anteriormente; se observó que la edad y la variedad, es un factor importante en la cantidad de azúcares reductores liberados durante la hidrólisis química. Del análisis de resultados; se observó que en promedio aumentó de 20 a 30 g/L en las variedades estudiadas y de un 25 g/L hasta 35 g/L en las edades de 6 y 12 meses para ambas variedades, en este caso el efecto fue más notable que con los azúcares totales, debido que la cantidad de fibra contenido en los cladodios depende de algunos factores como la variedad, y la edad de la planta además del periodo de corte y tipo de clima en el cual se han cultivado (Ribeiro et al. 2010). Adicionalmente; Ribeiro et al. (2010) observaron que existió una diferencia significativa en la cantidad de azúcares para las variedades de cladodios analizados encontrando hasta el doble de azúcares presentes en cladodios cuaternarios obtenidos de periodos secos y lluviosos. Este efecto se debe principalmente a que la red bilateral de tejido lignocelulósico se incrementa conforme va madurando aumentando su constitución rígida e intensificando su color (Aquino et al. 2012).



Gráfica 3. Efecto de las variables sobre la cantidad de azúcares reductores liberados.

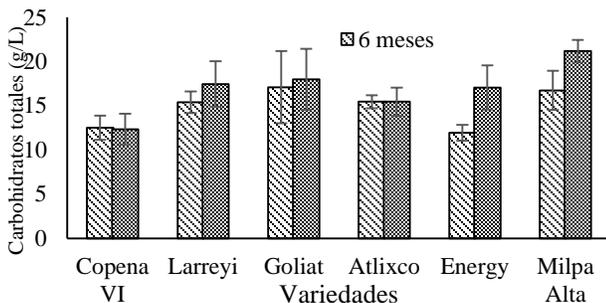
En general, los factores analizados en este experimento exploratorio permitieron identificar que además el ácido a concentraciones diluidas, la temperatura, la concentración de sólidos, variedad, edad y el tiempo empleado en el tratamiento son factores que permiten una disminución en el contenido de hemicelulosa residual maximizando la hidrólisis de los cladodios de nopal.

Efecto del proceso de hidrólisis sobre las seis variedades de nopal.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis exploratorio tanto de hidrólisis como de análisis de azúcares presentes en las muestras, las mejores condiciones para tener la mayor cantidad de azúcares liberados fueron utilizando el 5 % (p/v) de sólidos, con un tiempo de reacción de 40 min. Bajo estas condiciones se realizó el mismo tratamiento para las 6 variedades de cladodio de 6 y 12 meses de edad propuestas inicialmente.

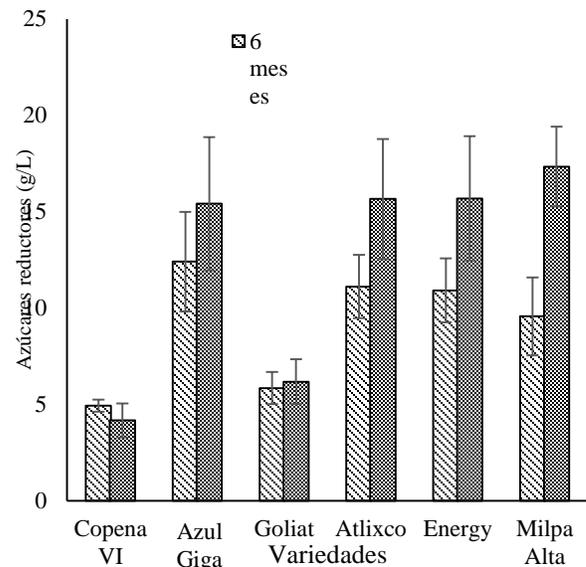
Al cuantificar la cantidad de azúcares totales en las 6 variedades bajo las condiciones seleccionadas previamente, se realizó un análisis de varianza que permitió identificar la variabilidad de azúcares debido a factores como la edad y variedad del cladodio. El análisis mostró que no existen diferencias significativas entre los azúcares totales liberados durante la hidrólisis para las dos edades de los cladodios ($p < 0.05$) las concentraciones medias globales fueron de 14.84 y 16.89 g/L para 6 y 12 meses de desarrollo respectivamente, lo que indicó que la variedad está relacionada fuertemente con la cantidad de azúcares totales que se pueden obtener en el tratamiento seleccionado.

Con el tratamiento ácido se pueden obtener hasta 21 g/L de carbohidratos totales para la variedad Milpa Alta, seguido de la variedad Goliat, Azul Gigante y Atlixco con concentraciones de 17.9, 17.45 y 17.05 g/L respectivamente (Gráfica 4), entre estas variedades de cladodio de nopal se observaron diferencias significativas (de acuerdo al método LSD). Por otro lado, la variedad que presentó menor cantidad de azúcares totales fue la variedad Copena VI y Energy con concentraciones menores a 17 g/L (Gráfica 4).



Gráfica 4. Carbohidratos totales libreados en el proceso de hidrólisis química a 5% de sólidos.

En cuanto a la cuantificación de los azúcares reductores analizados en las muestras hidrolizadas, el análisis de varianza, mostró que tanto la edad como la variedad de los cladodios mostró un efecto sobre los azúcares reductores, en este caso el análisis de ANOVA mostró que las variedades Energy, Atlixco, Milpa Alta y Azul Gigante no presentaron diferencias significativas entre ellas, obteniéndose 15 g/L en cladodios de 12 meses, mientras que con cladodios de 6 meses se observó un promedio de 10 g/L, por otro lado las variedades Copena VI y Goliat no presentaron diferencias significativas con 5 g/L. Los resultados en azúcares totales obtenidos para la variedad Copena VI fueron 5 g/L menores a la cantidad de azúcares reductores determinados por el método de DNS (Gráfica 5).

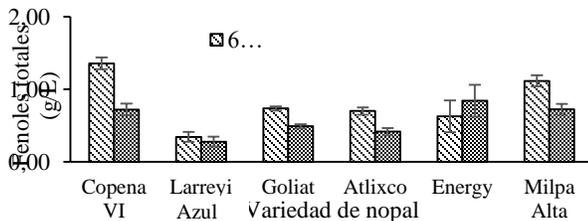


Gráfica 5. Azúcares reductores libreados en el proceso de hidrólisis química a 5 % de sólidos

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que los rendimientos obtenidos por hidrólisis ácida fueron de 30 % para todas las variedades, lo que sugiere que el proceso de hidrólisis degrada inicialmente los polisacáridos de los que está compuesto la biomasa, principalmente el mucílago que se encuentra formando parte importante de la composición de los cladodios de nopal. En un estudio realizado por Batista et al. (2003), evaluaron el proceso de degradación de tres variedades de cactáceas, observando que los azúcares solubles y los ácidos orgánicos son los compuestos de más fácil degradación mientras que los azúcares presentes en la fibra neutral se degradaron más lentamente.

Otro de los aspectos importantes a considerar en el proceso de extracción de azúcares por el proceso de hidrólisis ácida fue la cuantificación de compuestos fenólicos que se pueden obtener del proceso de degradación del material lignocelulósico.

De las seis variedades evaluadas se observó que la cantidad de compuestos fenólicos fue menor en las variedades con edad de 12 meses mientras que esta cantidad fue mayor en las seis variedades con una edad de 6 meses, de las primeras; la variedad Azul Gigante, seguido de la variedad Atlixco y Goliat no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) con un valor de 0.28, 0.41 y 0.41 g/L de equivalentes de Acido Gálico (EAG), mientras que; las variedades Energy, milpa Alta y Copena V1 presentaron 0.84, 0.72 y 0.72 g EAG/L respectivamente (Gráfica 6). De acuerdo a lo descrito por de Amorim et al. (2012), los compuestos fenólicos en plantas son de dos o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático producidos como metabolitos secundarios compuestos principalmente por taninos, flavonoides y cumarinas; estos son liberados parcialmente durante la degradación de la lignina por tratamiento ácido (Andary et al. 2013).



Gráfica 6. Compuestos fenólicos presentes en los hidrolizados obtenidos de las 6 diferentes variedades de Opuntia.

En base seca, se pudo determinar que la variedad Atlixco y Azul Gigante presentaron una disminución de compuestos fenólicos en el medio hidrolizado para cladodios de un año de edad con 0.89 y 0.59 mg por cada 100 g de biomasa seca, y para las variedades Copena V1 y Milpa alta estos compuestos fenólicos se presentaron en la misma cantidad que fue de 1.54 mg/100 g, por otro lado, se observó de igual forma que en la variedad Energy la cantidad de compuestos fenólicos aumento de 1.34 a 1.8 mg/100 g de biomasa entre las edades de 6 y 12 meses.

En un estudio realizado por Guevara-Figueroa et al. (2010) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de 12 variedades de *Opuntia*, comerciales y silvestres, encontrando para las variedades silvestre morado, tempranillo y cristalino las concentraciones fueron de 19.9; 19.4 y 17.8 mg EAG/g, estas cantidades son similares a las reportadas en este trabajo (Tabla 2), Es posible que estas diferencias se deban principalmente a que la temperatura de secado de los cladodios originaron una pérdida de compuestos fenólicos (Guevara-Figueroa et al. 2010).

Por otro lado, Santos-Zea et al. (2011), evaluaron el contenido de compuestos fenólicos en 9 variedades de *Opuntia*, obtenidos por un proceso de extracción seguido de una hidrólisis, observando que 5 variedades presentaron la misma cantidad de fenólicos en un valor de 905.1 μg EAG/g equivalente a una tercera parte de lo obtenido en las variedades estudiadas, esta diferencia puede deberse principalmente al proceso de obtención de los compuestos fenólicos. Algunos compuestos fenólicos como el ácido felúrico, ácido *p*-cumárico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido caféico, ácido salicílico y ácido gálico han sido identificados en muestras de nopal (Guevara-Figueroa et al. 2010), aunque han sido reportados algunos otros compuestos flavonoides y fenólicos (Stintzing and Carle 2005)

	mg EAG/100g	
	6 meses	12 meses
Copena VI	2.90	1.54
Azul Gigante	0.73	0.59
Goliat	1.57	1.05
Atlixco	1.50	0.89
Energy	1.34	1.80
Milpa Alta	2.39	1.54

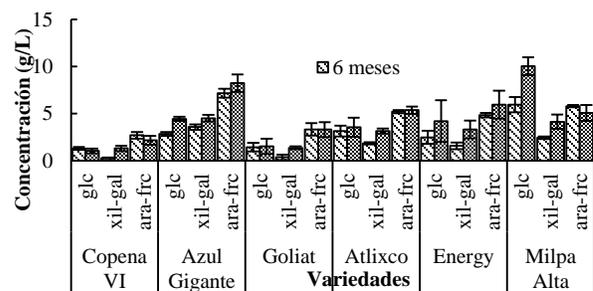
Tabla 2. Composición en base seca de compuestos fenólicos presentes en las seis variedades y dos edades de Opuntia

Se realizó un análisis por HPLC de las muestras obtenidas por hidrólisis bajo las condiciones previamente seleccionadas como un ensayo preliminar para determinar el perfil de azúcares presentes en cada muestra, los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 7. Se encontró que para la variedad Copena V1 se detectaron bajas cantidades de azúcares simples, seguido de la variedad Goliat con concentraciones de 1 y 1.5 g/L de glucosa, la variedad Atlixco presentó una cantidad de 3.54 g/L mientras que en las variedades Azul Gigante y Energy se observaron cantidades similares de 4.53 y 4.2 g/L respectivamente para este azúcar; adicionalmente, se observó en la variedad Milpa Alta una cantidad de 10 g/L, la cual fue mayor a la observada para las demás variedades evaluadas. Por otro lado, en menor cantidad se observó la presencia de la mezcla de xilosa y galactosa en 1.3 g/L para Copena VI y Goliat, 3.3 g/L en la variedad Goliat y Atlixco y 4.3 g/L para Milpa Alta y Azul Gigante.

La máxima cantidad de azúcares tales como la arabinosa y la fructosa se encontraron en la variedad Azul Gigante con 8.23 g/L, seguido de la variedad Energy, Atlixco y Milpa Alta con concentraciones de 5.95, 5.26 y 5.06 g/L respectivamente (Gráfica 7). Resultados similares fueron obtenidos por Kuloyo et al. (2014) quienes bajo condiciones similares a las aquí reportadas (1.5 % de H₂SO₄; 30 % p/v de sólidos, 120 °C, 50 min) encontraron por litro, 7.4 g glucosa, 3.9 g xilosa, 2.3 g galactosa, 4.0 g arabinosa y 5.0 g fructosa, los cuales fueron corroborados y reportados por Akanni et al. (2015) al obtener resultados similares. Se realizó un análisis por HPLC de las muestras obtenidas por hidrólisis bajo las condiciones previamente seleccionadas como un ensayo preliminar para determinar el perfil de azúcares presentes en cada muestra, los resultados obtenidos se muestran en la Gráfica 7.

Se encontró que para la variedad Copena V1 se detectaron bajas cantidades de azúcares simples, seguido de la variedad Goliat con concentraciones de 1 y 1.5 g/L de glucosa, la variedad Atlixco presentó una cantidad de 3.54 g/L mientras que en las variedades Azul Gigante y Energy se observaron cantidades similares de 4.53 y 4.2 g/L respectivamente para este azúcar; adicionalmente, se observó en la variedad Milpa Alta una cantidad de 10 g/L, la cual fue mayor a la observada para las demás variedades evaluadas. Por otro lado, en menor cantidad se observó la presencia de la mezcla de xilosa y galactosa en 1.3 g/L para Copena VI y Goliat, 3.3 g/L en la variedad Goliat y Atlixco y 4.3 g/L para Milpa Alta y Azul Gigante.

La máxima cantidad de azúcares tales como la arabinosa y la fructosa se encontraron en la variedad Azul Gigante con 8.23 g/L, seguido de la variedad Energy, Atlixco y Milpa Alta con concentraciones de 5.95, 5.26 y 5.06 g/L respectivamente (Gráfica 7). Resultados similares fueron obtenidos por Kuloyo et al. (2014) quienes bajo condiciones similares a las aquí reportadas (1.5 % de H₂SO₄; 30 % p/v de sólidos, 120 °C, 50 min) encontraron por litro, 7.4 g glucosa, 3.9 g xilosa, 2.3 g galactosa, 4.0 g arabinosa y 5.0 g fructosa, los cuales fueron corroborados y reportados por Akanni et al. (2015) al obtener resultados similares.



Gráfica 7. Determinación preliminar de azúcares obtenidos en los hidrolizados de los cladodios de nopal.

De los azúcares observados por HPLC se pudo determinar la cantidad de azúcares que se pueden obtener de los cladodios de las diversas variedades evaluadas en base seca, observándose que; de las 6 variedades estudiadas, la variedad Milpa alta y Energy presentaron la mayor cantidad de azúcares fermentables con un 52.23 y 31.21 % representados principalmente como glucosa lo que represento 23.23 y 9.71 g/100 g de sólidos del cladodio de nopal en base seca respectivamente. Por otra parte, de las variedades Azul Gigante y Goliat se pudieron obtener 20.78 y 18.74 g de azúcares fermentables y en menor proporción la variedad Milpa Alta (Tabla 3), mientras que para la variedad Atlixco se encontró que en la hidrólisis ácida se pueden obtener 8.2 g de glucosa por cada 100 g de sustrato, lo que equivale al 29.43 % de azúcares fermentables.

	Copena VI	Azul Gigante	Goliat	Atlixco	Energy	Milpa Alta	Extractos de Opuntia (Ginestra et al. 2009b)	Pulpa de nopal (Majdoub, Roudesli, y al. 2003a, 2004)	Opuntia ficus-indica (Kuloyo et al. 2014)	Cabada (García-Aparicio et al. 2011)
Glc*	2.39	10.27	3.50	8.20	9.71	23.23	15.3	1.9	23.1	37.1
Xil-Gal	3.01	10.40	3.15	7.25	7.62	9.55	5.3	20.1	10.3	22.5
Ara-Frc	4.99	19.05	7.62	12.40	13.77	11.70	4.074	15	8.6	3.8
Carbohidratos totales	10.39	39.72	14.27	27.85	31.10	44.48	24.67	37.00	42.0	63.40
% de azúcares fermentables	22.97	25.87	24.51	29.43	31.21	52.23	62.01	5.14	55.0	58.52

*azúcares fermentables

Tabla 3. Composición de azúcares en base seca g/100 g de biomasa en las variedades de cladodio de nopal evaluadas.

Resultados similares han sido reportados por Ginestra et al. (2009b) quienes obtuvieron a partir de muestras de cladodios, 36.3 g de azúcares totales por cada 100 g de muestra, encontrando principalmente azúcares como glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y ramnosa en cantidades de 15.3, 1.9, 4.0, 3.4, 1.4 y 0.7 g respectivamente. Por otra parte Majdoub et al. (2001) observó que la composición de azúcares en cladodios de nopal varía en función de la parte de nopal analizada y del método de obtención de los extractos de tal forma que una extracción acuosa produce en mayor cantidad ramnosa>arabinosa>galactosa>ácido galacturónico>galactosa>xilosa>manosa>glucosa.

Esta amplia variación en la composición de los azúcares presentes puede deberse a la contaminación de los cladodios con otros compuestos que se originan en la pared celular o que el método de purificación no es completamente efectivo (Sáenz, Sepúlveda, and Matsuhira 2004). Complementario a esto, es posible que las muestras estudiadas por estos autores hayan sido variedades con espinas, estas estructuras de acuerdo con (Malainine et al. 2003a) están compuestas en un 96% de polisacáridos compuestos principalmente por celulosa y arabinosa en un 49.7 y 50.3 % respectivamente lo que incrementa la concentración de estos azúcares. Contrario a estos resultados, a las muestras estudiadas en el presente trabajo no presentaron espinas o fueron mínimas, debido a que los productos de los cladodios son de uso comercial, motivo por el cual no se cuantificaron cantidades elevadas de estos azúcares.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de las seis variedades de nopal, se determinó que la mejor edad para aprovechar los cladodios de nopal fue de un año de edad, debido al aumento en la cantidad de azúcares reductores evaluados como equivalentes de glucosa, los cuales se pueden obtener directamente por hidrólisis ácida; así mismo, el análisis de la composición de las variedades de nopal no permitió identificar una variedad para ser estudiada.

Sin embargo; permitió describir la composición de la biomasa, por otro lado, aunque las variedades Azul Gigante, Atlixco, Energy y Milpa Alta no presentaron una diferencia significativa en la cantidad de ART, si hubo diferencia en la cantidad de compuestos fenólicos que se pueden obtener por un proceso de hidrólisis de tal forma que las variedades Azul gigante y Atlixco presentaron menor cantidad de compuestos fenólicos los cuales pueden tener un efecto negativo en el proceso de fermentación por microorganismos con esta capacidad metabólica.

La variabilidad en la cantidad de azúcares obtenidos puede deberse principalmente a la composición de su estructura en cuanto a la hemicelulosa y lignina presente, así como al efecto producido por la hidrólisis del material lignocelulósico, y la degradación los azúcares presentes. Estos resultados coincidieron con la cantidad de azúcares reductores cuantificados (Gráfica 5) y la alta cantidad de compuestos fenólicos observados (Gráfica 6). Ya que durante el tratamiento ácido, se convierte la hemicelulosa y celulosa a azúcares simples y posteriormente estos se convierten en otros compuestos químicos originados de la degradación de azúcares y lignina, creando compuestos inhibitorios tales como ácidos orgánicos, furanos y fenoles (Shahbazi and Zhang 2010).

Conclusiones

El análisis exploratorio permitió identificar que el porcentaje de sólidos tuvo un efecto sobre la cantidad de azúcares liberados durante la hidrólisis ácida; además del tiempo, la edad y la variedad de los cladodios empleados.

En cuanto a la cantidad de azúcares obtenidos, la variedad Milpa Alta genero libero la mayor cantidad de glucosa en comparacion a las demás variedades, de tal forma que tanto la variedad Milpa alta como Energy presentaron la mayor cantidad de azúcares fermentables con un 52.23 y 31.21 % representados principalmente como glucosa lo que representó 23.23 y 9.71 g/100 g de sólidos. Haciendo de estos sustratos una opción viable en la producción de azúcares para la obtención de etanol bajo condiciones de fermentación.

Referencias

Akanni, Gabriel B., James C. du Preez, Laurinda Steyn, and Stephanus G. Kilian. 2015. "Protein Enrichment of an *Opuntia Ficus-Indica* Cladode Hydrolysate by Cultivation of *Candida Utilis* and *Kluyveromyces Marxianus*." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95 (5): 1094–1102. doi:10.1002/jsfa.6985.

Amorim, Elba Lucia Cavalcanti de, Valerium Thijan Nobre de Almeida de Castro, Joabe Gomes de Melo, Allan Jonathan Chernichiarro Correa, and Tadeu Jose da Silva Peixoto Sobrinho. 2012. "Standard Operating Procedures (SOP) for the Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds Contained in Plant Samples." In *Latest Research into Quality Control*, 47–66. InTech. doi:10.5772/51686.

- Andary, Jeanne, Jaqueline Maalouly, Rosette Ouaini, Hanna Chebib, Marc Beyrouthy, Douglas N Rutledge, and Naim Ouaini. 2013. "Advances in Crop Science and Technology Phenolic Compounds from Diluted Acid Hydrolysates of Olive Stones: Effect of Overliming" 1 (1): 1–7. doi:10.4172/acst.1000103.
- Aquino, G. L. V., R. J. Rodríguez, R. A. M. Méndez, A. Hernández, and S. E. 2012. "Extracción Y Caracterización de Fibra de Nopal (Opuntia Ficus Indica)." *Nat Y Des* 12 (1): 48–62. http://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/files/NatyDes_Vol-10-1-Art4.pdf.
- Ascensao, Ana R F D C De, and Ian A. Dubery. 2003. "Soluble and Wall-Bound Phenolics and Phenolic Polymers in Musa Acuminata Roots Exposed to Elicitors from Fusarium Oxysporum F.sp. Cubense." *Phytochemistry* 63 (6): 679–86. doi:10.1016/S0031-9422(03)00286-3.
- Batista, Angela M., Arif F. Mustafa, Tim McAllister, Yuxi Wang, Henry Soita, and John J. McKinnon. 2003. "Effects of Variety on Chemical Composition, in Situ Nutrient Disappearance and in Vitro Gas Production of Spineless Cacti." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83 (5): 440–45. doi:10.1002/jsfa.1393.
- Bollók, M, K Réczey, and G Zacchi. 2000. "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Spruce to Ethanol." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84–86: 69–80. doi:10.1385/ABAB:84-86:1-9:69.
- Cai, Weirong, Xiaohong Gu, and Jian Tang. 2008. "Extraction, Purification, and Characterization of the Polysaccharides from Opuntia Milpa Alta." *Carbohydrate Polymers* 71 (3): 403–10. doi:10.1016/j.carbpol.2007.06.008.
- Cárdenas, A, I Higuera-Ciapara, and F M Goycoolea. 1997. "Rheology and Aggregation of Cactus (Opuntia Ficus-Indica) Mucilage in Solution." *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 2 (February): 152–59.
- Castellar, M. R., J. M. Obón, M. Alacid, and J. A. Fernández-López. 2008. "Fermentation of Opuntia Stricta (Haw.) Fruits for Betalains Concentration." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (11): 4253–57. doi:10.1021/jf703699c.
- Ginestra, Giovanna, Mary L. Parker, Richard N. Bennett, Jim Robertson, Giuseppina Mandalari, Arjan Narbad, Rosario B. Lo Curto, Giuseppe Bisignano, Craig B. Faulds, and Keith W. Waldron. 2009a. "Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [Opuntia Ficus-Indica (L.) Mill.]." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (21): 10323–30. doi:10.1021/jf9022096.
- Guevara-Figueroa, Teresita, Hugo Jiménez-Islas, María L. Reyes-Escogido, Anne G. Mortensen, Bente B. Laursen, Li-Wei Lin, Antonio De León-Rodríguez, Inge S. Fomsgaard, and Ana P. Barba de la Rosa. 2010. "Proximate Composition, Phenolic Acids, and Flavonoids Characterization of Commercial and Wild Nopal (Opuntia Spp.)." *Journal of Food Composition and Analysis* 23 (6): 525–32. doi:10.1016/j.jfca.2009.12.003.

- Idrees, M., A. Adnan, S. A. Bokhari, and F. A. Qureshi. 2014. "Production of Fermentable Sugars by Combined Chemo-Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Material for Bioethanol Production." *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 31 (2): 355–63. doi:10.1590/0104-6632.20140312s00002415.
- Jeevan, P, R Nelson, and a Edith Rena. 2011. "Optimization Studies on Acid Hydrolysis of Corn Cob Hemicellulosic Hydrolysate for Microbial Production of Xylitol." *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1 (4): 114–23.
- Kuloyo, Olukayode O, James C. du Preez, Maria del Prado García-Aparicio, Stephanus G. Kilian, Laurinda Steyn, and Johann Görgens. 2014. "Opuntia Ficus-Indica Cladodes as Feedstock for Ethanol Production by *Kluyveromyces Marxianus* and *Saccharomyces Cerevisiae*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30 (12): 3173–83. doi:10.1007/s11274-014-1745-6.
- León-Martínez, F.M., J. Rodríguez-Ramírez, L.L. Medina-Torres, L.L. Méndez Lagunas, and M.J. Bernad-Bernad. 2011. "Effects of Drying Conditions on the Rheological Properties of Reconstituted Mucilage Solutions (*Opuntia Ficus-Indica*)." *Carbohydrate Polymers* 84 (1): 439–45. doi:10.1016/j.carbpol.2010.12.004.
- Majdoub, Hatem, Sadok Roudesli, and André Deratani. 2001. "Polysaccharides from Prickly Pear Peel and Nopals of *Opuntia Ficus-Indica*: Extraction, Characterization and Polyelectrolyte Behaviour." *Polymer International* 50 (5): 552–60. doi:10.1002/pi.665.
- Malainine, Mohamed E., Alain Dufresne, Danièle Dupeyre, Mostafa Mahrouz, Roger Vuong, and Michel R. Vignon. 2003a. "Structure and Morphology of Cladodes and Spines of *Opuntia Ficus-Indica*. Cellulose Extraction and Characterisation." *Carbohydrate Polymers* 51 (1): 77–83. doi:10.1016/S0144-8617(02)00157-1.
- Medina-Torres, L. 2000. "Rheological Properties of the Mucilage Gum (*Opuntia Ficus Indica*)." *Food Hydrocolloids* 14 (5): 417–24. doi:10.1016/S0268-005X(00)00015-1.
- Miller, Gail Lorenz. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* 31 (3): 426–28. doi:10.1021/ac60147a030.
- Navarrete-Bolaños, J. L., E. Fato-Aldeco, K. Gutiérrez-Moreno, J. E. Botello-Álvarez, H. Jiménez-Islas, and R. Rico-Martínez. 2013. "A Strategy to Design Efficient Fermentation Processes for Traditional Beverages Production: Prickly Pear Wine." *Journal of Food Science* 78 (10). doi:10.1111/1750-3841.12237.
- Nobel, Park S., Jaime Cavellier, and Jose Luis Andrade. 1992. "Mucilage in Cacti: Its Apoplastic Capacitance, Associated Solutes, and Influence on Tissue 5." *Journal of Experimental Botany*. doi:10.1093/jxb/43.5.641.
- Ramírez, J. C., R. Sosa, and B. Santos. 2012. "Producto Nopal Y Tuna Del Estado de Michoacán, A.C." SAGARPA, 1–73. siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/14/.../anexo_2251-5-2013-08-9.pdf.
- Reyes-Agüero, J.A., J.R. Aguirre R., and A. Valiente-Banuet. 2006. "Reproductive Biology of *Opuntia*: A Review." *Journal of Arid Environments* 64 (4): 549–85. doi:10.1016/j.jaridenv.2005.06.018.

Ribeiro, Erika Maria de Oliveira, Nicácio Henrique da Silva, José Luiz de Lima Filho, Júlio Zoe de Brito, and Maria da Paz Carvalho da Silva. 2010. "Study of Carbohydrates Present in the Cladodes of *Opuntia Ficus-Indica* (Fodder Palm), according to Age and Season." *Ciência E Tecnologia de Alimentos* 30 (4): 933–39. doi:10.1590/S0101-20612010000400015.

Rodríguez-González, Sarahi, Hector E. Martínez-Flores, Carla K. Chávez-Moreno, Lourdes. I. Macías-Rodríguez, Eder Zavala-Mendoza, M.G. Garnica-Romo, and Luis Chacón-García. 2014. "Extraction and Characterization of Mucilage From Wild Species of *O Puntia*." *Journal of Food Process Engineering* 37 (3): 285–92. doi:10.1111/jfpe.12084.

Rodríguez-Lerma, G. K., K. Gutiérrez-Moreno, M. Cárdenas-Manríquez, E. Botello-Álvarez, H. Jiménez-Islas, R. Rico-Martínez, and J. L. Navarrete-Bolaños. 2011. "Microbial Ecology Studies of Spontaneous Fermentation: Starter Culture Selection for Prickly Pear Wine Production." *Journal of Food Science* 76 (6). doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02208.x.

Sáenz, Carmen, Elena Sepúlveda, and Betty Matsuhira. 2004. "Opuntia Spp Mucilage's: A Functional Component with Industrial Perspectives." *Journal of Arid Environments* 57 (3): 275–90. doi:10.1016/S0140-1963(03)00106-X.

Santos-zea, Liliana, Janet A Guti, Sergio O Serna-saldivar, De Monterrey, Avenida Eugenio, and Garza Sada. 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: 7054–61.

Shahbazi, A., and B. Zhang. 2010. "Dilute and Concentrated Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass." In *Bioalcohol Production*, 156:143–58. Elsevier. doi:10.1533/9781845699611.2.143.

Silvério, Silvio. 2013. "Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization." Edited by Anuj Chandel, May. *InTech*, 275. doi:10.5772/1490.

Stintzing, Florian C., and Reinhold Carle. 2005. "Cactus Stems (*Opuntia Spp.*): A Review on Their Chemistry, Technology, and Uses." *Molecular Nutrition & Food Research* 49 (2): 175–94. doi:10.1002/mnfr.200400071.

Valencia-Sandoval, Karina, José de J Brambila-Paz, and José S. Mora-Flores. 2010. "Evaluación Del Nopal Verdura Como Alimento Funcional Mediante Opciones Reales." *Agrociencia* 44 (8): 955–63.