



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

**ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN E
IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN NOPAL (*Opuntia ficus-
indica* Mill.) CULTIVAR ATLIXCO DESESPINADO**

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA
I.A. Diana Carolina Franco Vásquez

DIRECTORA DE TESIS
Dra. Elsa Bosquez Molina

ASESORES
Dra. Rosa Isela Ventura Aguilar
Dr. José Ramón Verde Calvo

Ciudad de México. Septiembre 2017

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Ciudad de México a 7 de septiembre del 2017

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis

**ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
FLAVONOIDES EN NOPAL (*Opuntia ficus-indica* Mill.) CULTIVAR ATLIXCO
DESESPINADO**

Que presentó

I.A Diana Carolina Franco Vásquez

Comité Tutorial:

Director: Dra. Elsa Bosquez Molina

Asesor: Dra. Rosa Isela Ventura Aguilar

Asesor: Dr. José Ramón Verde Calvo

Jurado:

Presidente: Dr. José Ramón Verde Calvo



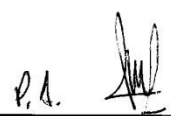
Secretario: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar



Vocal: Dra. Rosa Isela Ventura Aguilar



Vocal: Dr. Daniel Méndez Iturbide





ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO
DE EXTRACCIÓN E
IDENTIFICACIÓN DE
FLAVONOIDEOS EN NOPAL
(Opuntia ficus-indica Mill.)
cv. ATLIXCO DESESPINADO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 7 del mes de septiembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE RAMON VERDE CALVO
DRA. ROSA ISELA VENTURA AGUILAR
DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ
DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
DE: DIANA CAROLINA FRANCO VASQUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



REVISÓ
[Signature]
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS
[Signature]
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE
[Signature]
DR. JOSE RAMON VERDE CALVO

VOCAL
[Signature]
DRA. ROSA ISELA VENTURA AGUILAR

VOCAL
[Signature]
DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ

SECRETARIO
[Signature]
DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía en el camino y fortalecerme siempre.

A mis padres, que con su ejemplo, amor, fortaleza y confianza han alentado cada uno de mis pasos; gracias papá y mamá por todo su esfuerzo y grandes enseñanzas, los amo inmensamente.

A mis hermanos, quienes me motivan a seguir adelante, gracias por su amor y apoyo incondicional. Los amo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por permitirme realizar mis estudios de posgrado en la Maestría en Biotecnología, gracias a todos los profesores que hicieron parte de todo este proceso.

Especialmente a la Dra Elsa Bosquez Molina, muchas gracias por darme la oportunidad y confianza de trabajar con usted, además del apoyo, la paciencia, asesoría y disposición para realizar esta tesis.

Al Dr. José Ramón Verde Calvo, muchas gracias por la asesoría y disposición prestada a lo largo de todo el proyecto, así como las observaciones y sugerencias realizadas al presente escrito.

A la Dra. Rosa Isela Ventura Aguilar gracias por la asesoría en el montaje de varias de las técnicas ensayadas en el proyecto, además por la gestión realizada para facilitar el acceso al laboratorio de espectrometría de masas en el IPN, finalmente, gracias por su revisión y sugerencias del presente escrito.

Al Dr. Héctor Escalona Buendía, muchas gracias primero por toda la información y asesoría oportuna en el proceso de ingreso a la Maestría en Biotecnología lo cual me permitió formar parte de ésta; además, gracias por la asesoría estadística prestada durante todo el proyecto.

A Eliot, quien con su apoyo y constante motivación me permitieron superar las dificultades y compartir las alegrías.

A la familia Olivos Peralta, por su hospitalidad y siempre disposición en apoyarme.

A los doctores y compañeros de los laboratorios de frutas y hortalizas, enología, metabolitos secundarios y farmacología, quienes me enseñaron y apoyaron durante el desarrollo del presente trabajo.

A Omar, gracias por la asesoría prestada durante todo el proyecto.

Se reconoce el apoyo experimental del CNMN-IPN en la realización de los trabajos presentados.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 El Nopal.....	2
2.2 Composición química.....	2
2.3 Compuestos fenólicos.....	3
2.3.1 Flavonoides	5
2.4 Métodos de cuantificación	11
2.4.1 Fenoles totales	11
2.4.2 Flavonoides totales.....	12
2.5 Proceso de extracción e identificación de flavonoides	13
2.5.1 Purificación de flavonoides	16
2.5.2 Separación e identificación de flavonoides.....	17
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo General.....	21
5.2 Objetivos específicos.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1. Material biológico.....	23
6.2. Contenido de fenoles totales.....	23
6.3. Contenido de flavonoides totales	23
6.4. Evaluación del proceso de extracción de flavonoides	24
6.4.1. Manejo de la muestra	24
6.4.2. Método de extracción y tipo de disolvente	25
6.4.3. Evaluación de la proporción muestra/volumen de disolvente en extracción con hidrólisis ácida.....	27

6.4.4.	Evaluación del proceso de purificación	27
6.5	Evaluación de tiempos de hidrólisis en la identificación de compuestos fenólicos	29
6.6	Análisis estadístico	29
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1.	Fenoles totales	30
7.2.	Flavonoides totales.....	30
7.3.	Evaluación del proceso de extracción de flavonoides	31
7.3.1.	Manejo de la muestra	31
7.3.2.	Método de extracción y tipo de disolvente	32
7.3.3.	Evaluación de la relación muestra y el volumen de disolvente en extracción con hidrólisis ácida.....	36
7.3.4	Evaluación del proceso de purificación (PP)	38
7.4.	Efecto del tiempo de calentamiento durante la hidrólisis.....	44
7.4.1.	Efecto del tiempo de calentamiento en el contenido de fenoles totales.....	45
7.4.2.	Efecto del tiempo de calentamiento en la determinación de flavonoides totales. 46	
7.4.3.	Efecto del tiempo de calentamiento en los compuestos observados por cromatografía en capa fina (prueba cualitativa).	47
7.4.4.	Identificación de flavonoides por espectrometría de masas	48
8.	CONCLUSIONES.....	55
9.	PERSPECTIVAS	56
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	57
11.	ANEXOS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos.	4
Figura 2. Estructura del flavonoide	5
Figura 3. Mecanismo de oxidación de la quercetina	7
Figura 4. Estabilidad de flavonoides asociada a su estructura química	11
Figura 5. Reacción entre el radical DPPH• y un antioxidante para formar DPPH	17
Figura 6. Diagrama general del desarrollo experimental	22
Figura 7. Espectro de la región (200-600 nm) de muestras frescas y liofilizadas	32
Figura 8. Comparación espectral de extracto metanólico e hidrolizado	33
Figura 9. (A). Cromatograma a longitud de onda corta (254nm). (B). Cromatograma revelado con DPPH 0.04% (p/v)	34
Figura 10. Espectro de masas de la extracción metanólica	35
Figura 11. Espectros de masas de la extracción con hidrólisis ácida.	35
Figura 12. Espectro de masa del extracto relación 1:50 (p/v)	37
Figura 13. Espectro de masa del extracto relación 1:100 (p/v)	37
Figura 14. Cromatografía en capa fina de los procesos de purificación PP-1, PP-2 y PP-3.	40
Figura 15. Barrido espectral de las fracciones F1, F2, FB2, Fc.	41
Figura 16. Espectro de masas de la fracción F2.	42
Figura 17. Espectro de masas de la fracción F3.	42
Figura 18. Espectro de masas de la fracción FB2.	43
Figura 19. Espectro de masas de la fracción Fc.	43
Figura 20. Contenido de fenoles y flavonoides totales en nopal cultivar Atlixco sometido a diferentes tiempos de calentamiento	46
Figura 21. Evaluación de tiempos de hidrólisis por CCF (longitud de onda corta 254 nm)	47
Figura 22. Evaluación de tiempos de hidrólisis por CCF (longitud de onda larga 366 nm)	48
Figura 23. Evaluación tiempos de hidrólisis por cromatografía en capa fina. Revelado con DPPH 0.04% (v/v)	48
Figura 24. Espectro de masas. Hidrólisis sin calentamiento	49
Figura 25. Espectro de masas. Hidrólisis con 0.5 h de calentamiento	49
Figura 26. Espectro de masas. Hidrólisis con 1 h de calentamiento	50
Figura 27. Espectro de masas. Hidrólisis con 2 h de calentamiento	50
Figura 28. Espectro de masas. Hidrólisis con 4 h de calentamiento	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de <i>O. dillenii</i> y <i>O. ficus-indica</i> en 100 g de muestra	3
Cuadro 2. Estructura química de los principales grupos de flavonoides	8
Cuadro 3. Disolventes empleados en la extracción de flavonoides	14
Cuadro 4. Fracciones de los procesos de purificación por extracción en fase sólida	28
Cuadro 5. Evaluación proceso de purificación por cromatografía en capa fina	39
Cuadro 6. Comparación de masa exacta experimental y teórica de las fracciones de los procesos de purificación.	43
Cuadro 7. Compuestos identificados por espectrometría de masas bajo diferentes tiempos de hidrólisis.....	51

RESUMEN

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular ubicuos en las plantas, en las que se encuentran generalmente unidos a otros tipos de compuestos, lo cual dificulta la identificación de los mismos. El interés sobre este tipo de polifenoles radica en sus propiedades funcionales, tal como la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, pues actúan como antioxidantes, antiinflamatorios, antibióticos, etc. Particularmente en nopal, los flavonoides identificados mayoritariamente corresponden a glucósidos de isoramnetina, los cuales han sido asociados por su actividad antiproliferativa sobre células en cáncer de colon.

La importancia de los flavonoides ha generado el desarrollo de diferentes técnicas analíticas que permitan caracterizarlos, sin embargo, en la actualidad no existe una metodología estandarizada para la obtención de éstos, debido a que dicho proceso se ve afectado por diversos factores, entre los que se incluyen el tipo de matriz, los flavonoides específicos a estudiar y las condiciones técnicas del análisis.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue estandarizar el proceso de obtención e identificación de flavonoides contenidos en cladodios de nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. cultivar Atlixco, considerando la importancia socioeconómica y nutrimental de este producto en el país, permitiendo con ello incrementar el conocimiento sobre las propiedades funcionales que ofrece.

La investigación contempló en su etapa preliminar el análisis del contenido de fenoles y flavonoides totales. Posteriormente se evaluaron las etapas para la obtención de los flavonoides específicos de interés en nopal, contemplando la comparación de formas para el manejo de la muestra (fresca y liofilizada), métodos de extracción (metanólica y con hidrólisis ácida), proceso de purificación, así como 5 tiempos de calentamiento (sin calentamiento, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 horas) del método de extracción seleccionado, monitoreando cada una de las etapas mediante barridos espectrales, cromatografía en capa fina y espectrometría de masas.

El contenido de fenoles y flavonoides totales en los cladodios de nopal cultivar Atlixco fue de 1.41 ± 0.19 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g nopal fresco y de 193.7 ± 9.7 µg equivalentes de quercetina (EQ) / g nopal fresco, respectivamente.

Las condiciones metodológicas establecidas para la obtención de los flavonoides de interés en nopal cultivar Atlixco fueron las siguientes: la muestra debe liofilizarse; la extracción debe hacerse con hidrólisis ácida (0.5 g nopal liofilizado + 20 mL metanol 62.5%+ 5 mL HCl 6M; reflujo a 65°C por 2 h); es indispensable realizar un proceso de purificación utilizando un eluyente constituido por una mezcla de agua: metanol: acetonitrilo (25:25:50). La evaluación del periodo de calentamiento durante la hidrólisis ácida permitió una extracción diferenciada de flavonoides.

Con la metodología anterior se logró pre-identificar la posible presencia de los flavonoides quercetina después de 0.5 h; kaempferol e isoramnetina, así como los ácidos fenólicos simples ferúlico y cafeico después de 2 h y vitexina a las 4 horas de calentamiento. La confirmación de la existencia de estos compuestos en el nopal estudiado está sujeta a análisis complementarios por HPLC- masas.

ABSTRACT

Flavonoids are low molecular weight compounds that occur in plants, which are generally linked to other types of compounds, making difficult to identify them. Interest in this type of polyphenols lies on its functional properties such as the prevention of chronic-degenerative diseases since they act as antioxidants, anti-inflammatories, antibiotics, etc. Particularly in nopal, the identified flavonoids mostly correspond to isoramnetin glucosides, which have been associated because of their antiproliferative activity on colon cancer cells.

The importance of flavonoids has led to the development of different methods for studying them, however, there is no an unique methodology to obtain them, due to the fact that several factors are involved including the type of matrix, the specific flavonoids to be studied, and technical conditions of analysis.

Based on the above, the present study aimed to standardize a methodology to extract and identify the flavonoids content in cladodes of nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. cultivar Atlixco because of the socioeconomic and nutritional importance of this product in Mexico, allowing to increase the knowledge about the functional properties offered by this commodity.

This study consisted in an initial analysis of the content of phenols and total flavonoids. The following stages were then evaluated for obtaining the specific flavonoids of interest in nopal, such as ways for sample handling (fresh and freeze-dried), extraction methods (methanolic and through an acid hydrolysis), purifying-process, as well as heating times of the selected extraction method (no heating, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 hours). Each stage was verified through spectral sweeps, thin layer chromatography and mass spectrometry.

The content of phenols and total flavonoids in the nopal cladodes (*Opuntia ficus-indica* Mill.) Atlixco cultivar was 1.41 ± 0.19 mg of gallic acid (EAG) / g fresh nopal and 193.7 ± 9.7 μ g of quercetin (EQ) / g fresh nopal, respectively.

The methodological conditions established for obtaining the flavonoids of interest in nopal cultivar Atlixco were as follows: the sample should be freeze-dried; the extraction must be done through an acid hydrolysis (0.5 g lyophilized nopal + 20 mL methanol 62.5% + 5 mL 6M HCl, reflux at 65 ° C for 2 h). It is essential to carry out a purifying process using an eluent constituted by a mixture of water: methanol: acetonitrile (25:25:50), which in this case was the

most selective. The evaluation of the heating time during the acid hydrolysis allowed a differentiated extraction of flavonoids.

With this methodology, the flavonoids kaempferol, isorhamnetin, quercetin and vitexin as well as the ferulic and caffeic simple phenolic acids were pre-identified. Corroboration of these compounds must be confirmed by complementary analysis by liquid chromatograph/ mass spectrometry.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la promoción de la salud a través del consumo de frutas y hortalizas se debe a la presencia de diferentes compuestos, los cuales previenen enfermedades cardiovasculares y carcinogénicas; estos efectos protectores se han atribuido en gran parte a antioxidantes tales como la vitamina C, los carotenos y los compuestos fenólicos (Miean y cols., 2001; Mustafa y cols., 2010).

De manera particular, existe especial interés en los compuestos fenólicos debido a que se encuentran ubicuamente en los vegetales y cuya potente actividad antioxidante se debe principalmente a sus propiedades redox. Dentro de este grupo de compuestos, los flavonoides han sido ampliamente estudiados, confirmando sus efectos farmacológicos (antioxidante, antiinflamatorio, antitrombótico, antialérgico y anticarcinogénico) (Rice-Evans y cols., 1996; Martínez-Flórez y cols., 2002; Kuti, 2004; Watson y cols., 2010).

Los flavonoides constituyen un amplio grupo de compuestos formados por dos anillos aromáticos (A y B) unidos a través de un heterociclo de tres carbonos (C); su clasificación está dada por las diferencias estructurales en el heterociclo, donde se diferencian de acuerdo con el grado de insaturación y oxidación del mismo. Generalmente se encuentran conjugados con azúcares y otros tipos de compuestos, lo cual dificulta la extracción e identificación de los mismos (Martínez y cols., 2002; de Rijke y cols., 2006; Routray y Orsat, 2012).

El estudio de estos compuestos ha implicado el desarrollo de técnicas confiables y precisas en las que se deben considerar factores como el tipo de tejido, así como la cantidad y estabilidad de los flavonoides presentes; sin embargo, hasta el momento no se tiene un método estandarizado para obtenerlos y evaluarlos en cualquier producto (de Rijke y cols., 2006; Rowtray y Orsat, 2012; Côté y cols., 2016).

De acuerdo con la importancia ya mencionada que tienen los flavonoides y de que existe información documentada de la presencia de sistemas antioxidantes no enzimáticos (carotenoides y fenoles totales) en el nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill.), la presente investigación se centró en estandarizar un proceso de extracción de los flavonoides presentes en esta especie para el cultivar Atlixco.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El Nopal

El nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill.) pertenece a la familia de las *Cactáceas*, género *Opuntia*, subfamilia *Opuntioideae*; es originario del continente americano, registrándose alrededor de 200 - 300 especies del género *Opuntia*, de las cuales México tiene aproximadamente 100 especies, siendo *ficus-indica* la más cultivada en el mundo (Rodríguez-Fuentes, 2009; Chauhan y cols., 2010).

El nopal es producido y comercializado en diferentes lugares del mundo como África, Australia y en países del Mediterráneo, algunas partes de Asia y América, siendo México el principal productor y el único país en donde éste es consumido como verdura (FAO, 1995; Sáenz y cols., 2004; Stintzing y Carlie, 2005; Servicios y FAO, 2006; Guzmán-Loaiza y cols., 2007).



2.2 Composición química

La composición química del nopal varía de acuerdo con las características propias de cada especie, variedad, cultivar, además del estado de desarrollo, época de la cosecha, condiciones ambientales y el tratamiento poscosecha empleado para su conservación (Guevara-Figueroa y cols., 2010; Astello-García y cols., 2015).

Pérez-Méndez y cols., (2015) reportaron diferencias morfológicas y en la composición química de nopal de las especies *O. dillenii* y *O. ficus-indica*, evidenciándose que *O. dillenii* posee cantidades significativamente mayores de ceniza, fibra total e insoluble, pH, acidez, ácido ascórbico, sodio y cobre; mientras que *Opuntia ficus-indica* destaca por su contenido significativamente mayor de compuestos fenólicos, calcio, magnesio, manganeso y cromo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química de *O. dillenii* y *O. ficus-indica* en 100 g de muestra
(Pérez-Méndez y cols., 2015)

Componente	<i>O.dillenii</i>	<i>O. ficus-indica</i>
Humedad (g)	92.0 ± 1.48	94.0 ± 0.78
Grados Brix (g)	4.58 ± 0.73	4.11 ± 0.74
Fibra total (g)	3.73 ± 0.91	2.7 ± 0.41
Fibra insoluble (g)	3.03 ± 0.85	2.20 ± 0.29
Proteína (g)	0.29 ± 0.10	0.30 ± 0.07
Cenizas (g)	1.23 ± 0.13	1.08 ± 0.11
pH	4.7 ± 0.06	4.64 ± 0.10
Acidez (mg)	338.2 ± 42.2	286.0 ± 56.2
Ácido ascórbico (mg)	3.14 ± 1.71	1.83 ± 0.33
Compuestos fenólicos (mg)	16.1 ± 4.21	128.8±29.4
Ca (mg)	157 ±26	177 ± 31
Mg (mg)	84.5 ± 37.3	94.1 ± 28.3
Fe (mg)	130 ± 66	130 ± 49
Cu (mg)	93 ± 34	63 ± 31
Zn (mg)	251 ± 219	368 ± 208
Mn (mg)	426 ± 387	780 ± 241
Cr (mg)	19 ± 5	27 6

La importancia de la presencia de constituyentes como el cromo y la fibra en el nopal, está asociada con sus propiedades hipoglucemiantes. Por otra parte, destaca la presencia de los compuestos fenólicos, los cuales son de interés por su potencial antioxidante y sus beneficios que en la salud (Quiñones y cols., 2012; El-Mostafa y cols., 2014).

2.3 Compuestos fenólicos

Son compuestos altamente distribuidos en el reino vegetal, conociéndose más de 8000. Se encuentran generalmente en las vacuolas, en donde están en forma libre o ligada a carbohidratos. La síntesis de estos compuestos es inducida por estímulos externos y se les

ha relacionado como elementos disuasorios de insectos y otros animales; en altas concentraciones le confieren a la planta una resistencia contra patógenos; otras funciones incluyen la aportación del color y el olor de las plantas para atraer polinizadores y de desempeñar un papel en la aclimatación al frío y la protección frente a la radiación UV (Dicko y cols., 2006; Hounsome y cols., 2008).

Estos compuestos se caracterizan por poseer uno o más anillos aromáticos o fenólicos, con uno o más grupos hidroxilos. Se clasifican con base en la estructura química de su núcleo básico, que es un anillo aromático (benceno) al cual está unido al menos un grupo funcional; de acuerdo, con esto se clasifican como fenoles simples, ácidos hidrobenczóicos, ácidos hidrocínámicos, cumarinas y flavonoides (Rice-Evans y cols., 1997; Watson y Preedy cols., 2010).

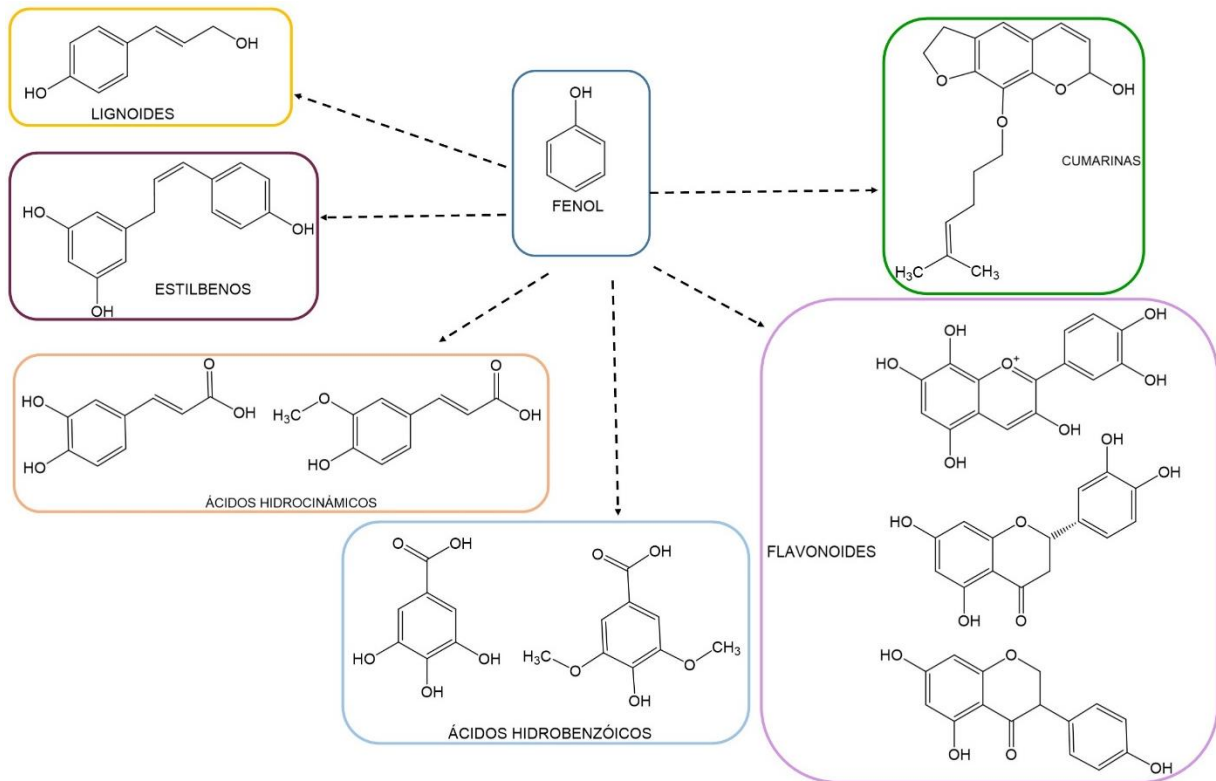


Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos (Granato y cols., 2016).

2.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son la clase más grande de los compuestos fenólicos que se encuentran de manera ubicua en todas las plantas, principalmente en las hojas y en general en los órganos expuestos a la luz solar, donde se producen generalmente como glucósidos. La cantidad y tipo de flavonoide depende principalmente del tipo de producto, clima, condiciones edáficas y de las prácticas de cultivo (Rice-Evans y cols., 1997; Martínez-Flórez y cols., 2002).

En las plantas estos compuestos ofrecen protección contra la radiación ultravioleta, microorganismos patógenos y herbívoros. El consumo de flavonoides ha sido asociado con propiedades funcionales en humanos, tales como disminución de enfermedades coronarias, acciones hepatoprotectoras, anticancerígenas, antivirales, sequestradores de radicales libres y capacidad antioxidante (Heim y cols., 2002; Granato y cols., 2016).

2.3.1.1 Estructura química y función

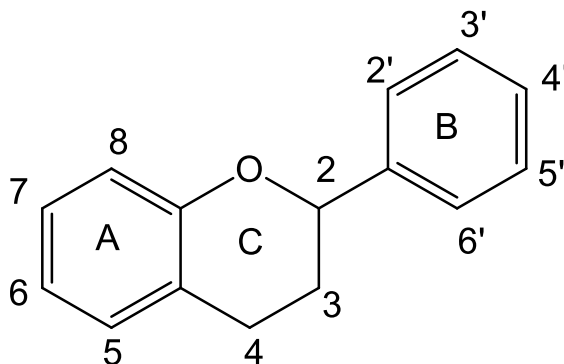


Figura 2. Estructura del flavonoide (Martínez-Flórez y cols., 2002)

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C3 de pirano (heterocíclico) (Figura 2). Típicamente el anillo A se representa en el lado de la izquierda de la figura, este anillo se origina a partir de la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, mientras que el anillo B proviene del *p*-coumaroil-CoA. Estos orígenes explican por qué el anillo A de la mayoría flavonoides es *o*-*meta* dihidroxilado o *meta*-trihidroxilado; el anillo B es típicamente *mono*-hidroxilado, *orto*-hidroxilado; o pueden

tener metil éter como sustituyente (Rice-Evans y cols., 1997; Martínez-Flórez y cols., 2002; Vermerris y Nicholso, 2008).

Los flavonoides pueden estar en forma libre (llamados agliconas), sin embargo, se encuentran mayoritariamente como glucósidos, especie química en donde la aglicona se encuentra unida a uno o más carbohidratos preferentemente en la posición del carbono 3 y con menor frecuencia en el carbono 7 del anillo A, siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico (Martínez-Flórez y cols., 2002; Vermerris y Nicholso, 2008).

Los glucósidos se pueden encontrar de dos formas: como O-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal), o como C-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono. Siendo los O-glucósidos son los mayoritarios. Los glicósidos son más solubles en agua, lo cual permite el almacenamiento de éstos en la vacuola celular (Rice-Evans y cols., 1997; Martínez-Flórez y cols., 2002; De Villiers y cols., 2015).

Características estructurales de los flavonoides asociados con su estabilidad y función antioxidante:

a) Sustituyentes hidroxilo: tanto el número como su disposición espacial influyen de forma determinante en la actividad antioxidante. La capacidad de eliminación de radicales libres y /o especies reactivas de oxígeno se atribuye a la alta reactividad de estos sustituyentes (Heim y cols., 2002).

Así por ejemplo, la presencia del catecol u *orto*-dihidroxi en el anillo B de la estructura, favorecen la actividad antioxidante del compuesto. En este caso la oxidación del flavonoide resultante (quinonas) (Figura 3) genera posteriormente intermediarios de degradación estables.

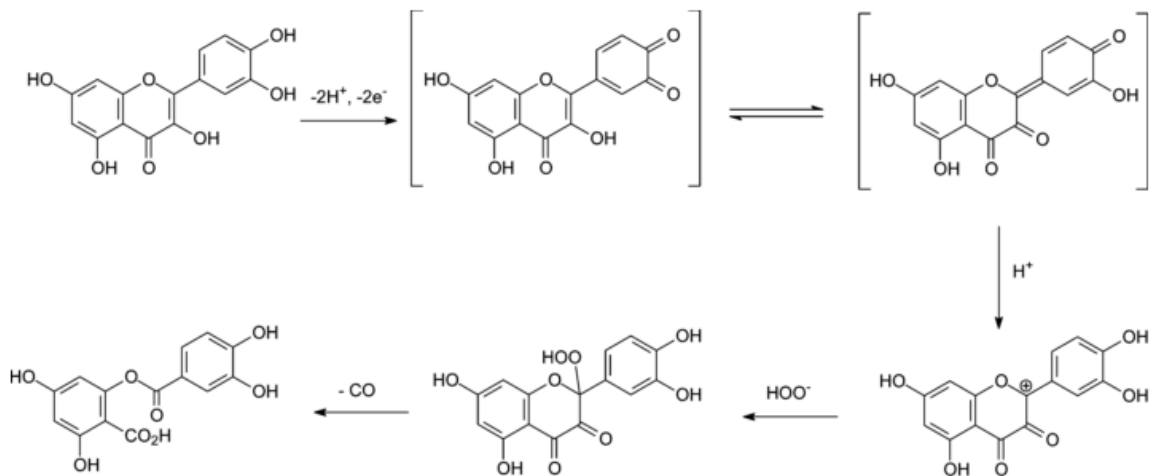


Figura 3. Mecanismo de oxidación de la quercetina (Krishnamachari y cols., 2002; Maini y cols., 2012)

Por otra parte, la presencia de sustituyentes OH en la posición 5 del anillo A también tiene una función antioxidante. Además, el heterociclo C contribuye con esta acción por la presencia de un OH libre en el carbono 3 y permite la conjugación de los anillos.

b) Presencia de un doble enlace en posición 2,3. Se ha determinado que esta característica de manera individual no afecta la capacidad antioxidante del flavonoide, sin embargo, al combinarse con la presencia del grupo carboxilo en la posición 4, aumenta esta propiedad (Heim y cols., 2002).

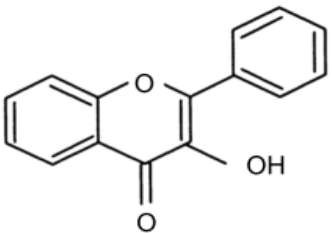
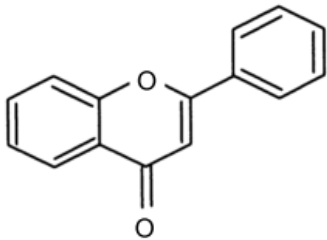
c) Presencia de la O-metilación disminuye la actividad antioxidante de los flavonoides, debido tanto a la hidrofobicidad como al impedimento estérico de estos grupos que perturban la planariedad del compuesto (Heim y cols., 2002).

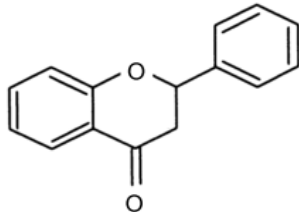
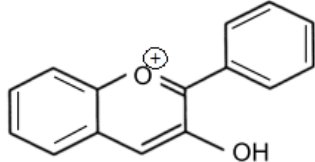
d) Presencia, número, posición y estructura de carbohidratos en el núcleo del flavonoide disminuye la propiedad antioxidante, lo cual se debe principalmente al impedimento estérico particularmente en el bloqueo del catecol en el anillo B (Martínez-Flórez y cols., 2002; Heim y cols., 2002).

2.3.1.2 Clasificación

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de los grupos hidroxifenólicos que los constituyen y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Éstos se clasifican como se muestra en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Estructura química de los principales grupos de flavonoides (Quiñones y cols., 2012)

NOMBRE	DESCRIPCIÓN	FUENTE	ESTRUCTURA
Flavonoles	Poseen un grupo ceto en el carbono 4 y una insaturación entre los carbonos 2 y 3. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el carbono 3. Son el grupo más ubicuo de los polifenoles presentes en los alimentos.	Frutas y hortalizas	
Flavonas	En su estructura poseen un grupo ceto en el carbono 4 y una insaturación entre los carbonos 2 y 3, carecen del grupo hidroxilo en el carbono 3. Son los flavonoides menos abundantes en los alimentos	Perejil, cáscara de diversas frutas	

Flavanonas	Son similares a las flavonas, tienen el anillo C saturado. Son un grupo minoritario en los alimentos.	Cítricos, tomate	
Antocianidinas	Presentan un OH en el carbono 3. Además tiene un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Es uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales.	Frutas, vino	

2.3.1.3 Propiedades funcionales

Los flavonoides representan una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana. Sus propiedades antioxidantes están dirigidas a contrarrestar radicales libres como el superóxido, peróxido lipídicos o hidroperóxido, bloqueando la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células; estas características son atribuidas a su estructura química y sus propiedades ácido base (Rice-Evans y cols., 1997; Martínez-Flórez y cols., 2002).

Además, pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han reportado efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. De aquí el creciente interés en los flavonoides en el área farmacológica (Rice-Evans y cols., 1997; Martínez-Flórez y cols., 2002).

2.3.1.4 Flavonoides en nopal

Gupta y cols., (2002) aislaron isoramnetina 3-O-glucósido, orientina, vitexina, isoramnetina-3-O-ramnósido de *Opuntia dillenii*. Así mismo, Stintzing y Carle en 2005 en su artículo de revisión reportan la presencia de quercetina, kaempferol, isoramnetina y 3-metil-quercetina que en cladodios de *O.basilaris*, *O. leucotricha* de Candolle, *O. lindheimeri* y *O.quimillo*.

Ventura y cols. (2013) reportaron la presencia de 7 compuestos fenólicos que podrían ser flavonoides en *Opuntia ficus-indica* Mill. en los cultivares Milpa Alta y Atlixco. No obstante, no se identificaron a qué tipo de compuesto fenólico correspondían. Así mismo, Antunes y cols. (2014) identificaron y cuantificaron glucósidos de isoramnetina, como y diglicósidos de isoramnetina, específicamente, isoramnetina glucosil-ramnosil-ramnósido, isoramnetina glucosil-ramnosil-pentósido, isoramnetina glucosil pentósido y isoramnetina-glucosil-ramnósido.

Además, Moussa-Ayoub y cols. (2014) indicaron que existen perfiles similares de flavonoles entre los cultivares de nopal *Opuntia ficus-indica* de una misma región climática, motivo por el cual los flavonoides podrían ser empleados en estudios quimiotaxonómicos de *Opuntia* spp.

El grado de estabilidad de los flavonoides depende de sus características estructurales. De acuerdo con ello, se ha reportado que las agliconas son menos estables que sus respectivos glucósidos, por lo que la elección del proceso de extracción se realiza en función del tipo de flavonoide de interés. En la Figura 4 se representa el grado de estabilidad de los flavonoides y agliconas reportadas en nopal considerando las características mencionadas asociadas con su estructura química.

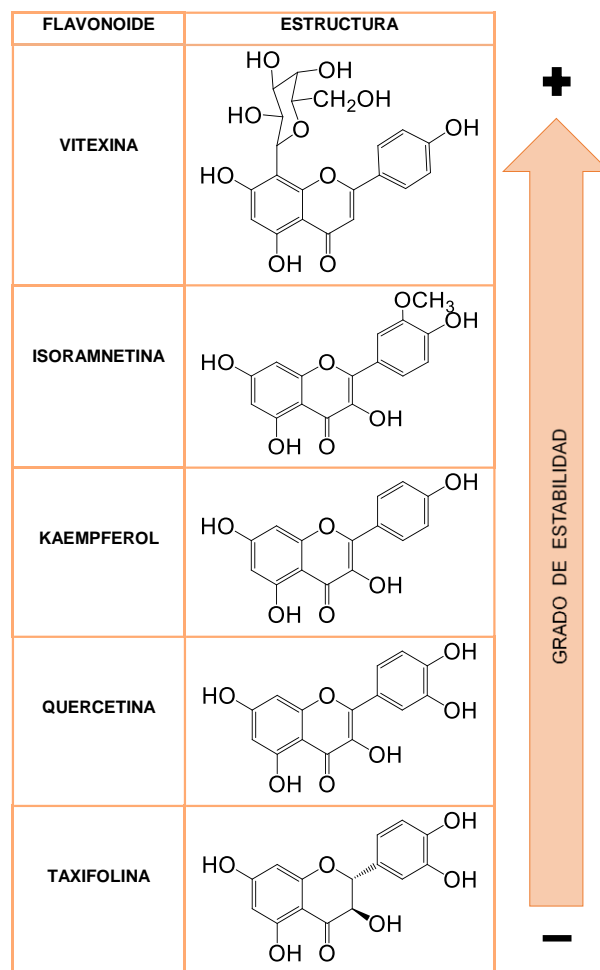


Figura 4. Estabilidad de flavonoides asociada a su estructura química

2.4 Métodos de cuantificación

2.4.1 Fenoles totales

Las técnicas reportadas para la determinación de fenoles totales se fundamentan en la generación de cromóforos mediante reacciones de óxido-reducción que pueden ser detectados espectrofotométricamente. Entre las técnicas más confiables y utilizadas se encuentran: Folin-Denis, Folin-Ciocalteu, azul de Prusia (PB) o método del ferricianuro y el método Fast Blue BB. En la actualidad, el método de Folin- Ciocalteu es el más empleado (Granato y cols., 2016)

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de compuestos oxidables como los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando un complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico; después en condiciones de pH básico se lleva a cabo la transferencia de electrones, donde el anión fenolato es oxidado y el molibdeno es reducido, ocurriendo un cambio de color de la solución de amarillo a azul (debido al desarrollo de un complejo azul metálico $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4]$, en condiciones de oscuridad. La intensidad del color azul desarrollado es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos a una longitud de onda de lectura entre 620 y 765 nm (Granato y cols., 2016).

2.4.2 Flavonoides totales

Para la determinación de flavonoides totales, anteriormente se utilizaba el acetato de plomo en un medio acuoso, con la posterior cuantificación del complejo metálico por gravimetría, sin embargo, con el tiempo se determinó que no era adecuado su uso no sólo por la toxicidad del reactivo sino también porque muchos de los flavonoides se mantenían en solución sin formar el complejo con el acetato de plomo.

En la actualidad no existe un método generalizado para la cuantificación del contenido de flavonoides totales en los alimentos; debido a esto se han desarrollado técnicas en las que emplean diferentes condiciones experimentales, como control del pH en el medio, tiempo de reacción y diferentes longitudes de onda (Granato y cols., 2016).

Además de las condiciones mencionadas, se recurre a la adición de reactivos específicos (llamados de desplazamiento) con la finalidad de que solo los flavonoides formen quelatos, los cuales generan un efecto batocrómico (desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores) que permite realizar la cuantificación e identificación de los flavonoides presentes (Olsen, 1990; Martinez, 2006). En este caso se encuentra el método con tricloruro de aluminio, que a continuación se describe.

Método de tricloruro de aluminio

Este método consiste en formar un complejo de aluminio-flavonoide. El aluminio reacciona con el hidroxilo del resto catecólico en el anillo B. Por lo que es posible cuantificar exclusivamente los flavonoides presentes en una matriz dada, evitando la interferencia de algunos ácidos fenólicos que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos

vegetales. Un inconveniente que se presenta es que la mayoría de los flavonoides tienen moléculas de glucósido en su estructura, lo que puede dificultar la correcta quelación con el tricloruro de aluminio (Granato y cols., 2016).

En diferentes reportes en los que se ha utilizado el tricloruro de aluminio, los complejos formados absorben en longitudes de onda entre 400- 510 nm de acuerdo con los reactivos empleados y el efecto batocrómico de éstos sobre el anillo B del flavonoide, sin embargo cualquier obstrucción de los grupos hidroxilo (de glicosilación o incluso metoxilación) en las posiciones 3, 5, 3' ó 4' impide la quelación con el $AlCl_3$, reduciendo el cambio batocrómico a 415-420 nm (Granato y cols., 2016).

2.5 Proceso de extracción e identificación de flavonoides

Dado que los compuestos fenólicos, en particular los flavonoides pueden existir libres o unidos a otro tipo de compuestos se utilizan diferentes técnicas para su extracción, dado que dicho proceso depende de factores como: el tipo y composición del material vegetal de estudio, la posición, el tipo de carbohidrato y el sitio de unión de éste en el núcleo del flavonoide, así como la complejidad de las propiedades químicas propias de los flavonoides, como lo es su polaridad, acidez, presencia de grupos hidroxilos y anillos aromáticos (Hertog y cols., 1992; Moussa-Ayoub y cols., 2011; Routray y cols., 2012). Con fundamento en lo mencionado a continuación se detallan los factores involucrados en la extracción de flavonoides.

1) Manejo de la muestra. El tratamiento de la muestra vegetal puede incluir la maceración, trituración, molienda u homogeneización y, en todos los casos, la finalidad es aumentar el área de contacto superficial entre el disolvente y la muestra que contiene los flavonoides dentro de las estructuras celulares. Posteriormente, el centrifugado, el vórtex y la agitación mecánica pueden aplicarse para incrementar las interacciones moleculares. Esta etapa puede hacerse a partir de material vegetal fresco o procesado, siempre que esto no altere la composición de los compuestos de interés; así, se puede incluir un secado o liofilizado, con la ventaja de obtener mayor rendimiento de componentes por unidad de peso de materia prima seca, además de incrementar su vida de anaquel (Routray y cols., 2012).

2) Método de extracción. El criterio de selección del mejor método de extracción está basado en la mayor recuperación del analito de interés, para lo cual la degradación del compuesto en los diferentes pasos de esta etapa deben ser mínimos, esto sumado al uso de una metodología simple y económica. La eficiencia del método de extracción depende del tiempo, la temperatura, tipo, proporción de disolventes y el tamaño de partícula de la muestra (Routray y cols., 2012).

Para la extracción de flavonoides se reporta el uso de disolventes, siendo el reflujo con equipo Soxhlet el más común, además de otros métodos como la extracción asistida por ultrasonido o microondas (Ajila y cols., 2011; Routray y Orsat, 2012; Oniszczyk y Olech, 2016).

La eficiencia de la extracción por disolvente depende de la solubilidad de los analitos en el disolvente de extracción. Debido a la variación en la polaridad de los flavonoides, los disolventes empleados pueden ser variados (Routray y cols., 2012).

Los flavonoides que poseen un gran número de grupos hidroxilos o glicósidos son considerados compuestos polares y en consecuencia requieren disolventes con igual polaridad, tales como: etanol, butanol, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), agua, metanol, metanol acidificado. Por su parte, las agliconas menos polares (con menor número de hidroxilos) son más solubles en éteres y cloroformo (Cuadro 3) (Cartaya y cols., 2001; Routray y cols., 2012).

Cuadro 3. Disolventes empleados en la extracción de flavonoides (Cartaya y cols., 2001)

Disolventes utilizados	Flavonoides solubles en el disolvente empleado
Agua, alcohol	Flavonoides glicósidos, antocianidinas y flavonoides sulfatos
Etanol, metanol y n-butanol	Agliconas flavonoides altamente hidroxiladas
Éter etílico, acetato de etilo y acetona	Agliconas flavonoides poco hidroxiladas
Éter de petróleo y cloroformo	Agliconas flavonoides altamente metoxiladas

De manera particular, ciertos flavonoides polares pueden aislarse fácilmente por extracción en metanol o metanol acidificado con HCl 0.1%, promoviendo el aislamiento en oscuridad y en condiciones frías para evitar su hidrólisis (Cartaya y cols., 2001; Vermerris y cols., 2008).

Adicionalmente se ha establecido que se pueden obtener flavonoides aglicona mediante una hidrólisis ácida o básica; en este caso el proceso de hidrólisis debe ser bien elegido y controlado; además, se ha reportado que la hidrólisis ácida permite la obtención de agliconas más fácilmente (Stalikas, 2007; Sani y cols.,2012).

El tiempo requerido para la hidrolisis completa depende del sitio de unión del carbohidrato en el núcleo del flavonoide; sin embargo el tiempo de exposición por ejemplo a HCl y la temperatura elevada podrían causar la degradación de las agliconas obtenidas (Moussa-youb y cols., 2011).

Hertog y cols. (1992) optimizaron el método de extracción empleando hidrólisis ácida para promover la separación de moléculas de flavonoles glucósidos, flavonoles glucurónicos y flavonas glucosiladas en productos vegetales como cebolla, arándanos, apio, etc. En esta investigación se estableció que para lograr la hidrólisis completa de flavonoles glucosilados se requiere de 2 horas de reflujo con una concentración de HCl 1.2 M en metanol al 50%; sin embargo, se reportó que manteniendo en reflujo por 4 horas con HCl 1.6 M se produce la pérdida de flavonoles; además, los alimentos con flavonoles glucurónicos requieren de una hidrólisis más severa empleando HCl 2 M en ebullición con metanol al 50% por un periodo de 2 horas para obtener la aglicona. Hay que señalar también que estos autores encontraron que las flavonas como luteína y apigenina resisten más la hidrólisis por lo que recomiendan utilizar una condición de reflujo en un medio más ácido (HCl 2 M) y metanol al 50% por 4 horas. Los C-glicósidos no se hidrolizan en estas condiciones de reflujo ácido pero pueden sufrir un reordenamiento, como en el caso de la vitexina (Martínez, 2006).

Después de la extracción con disolventes, generalmente debe concentrarse la muestra, teniendo cuidado con el grado de aplicación de este tratamiento, especialmente cuando se ha usado ácido para evitar la pérdida de los componentes más lábiles; por este motivo, se debe procurar emplear la temperatura más baja posible, empleando una atmósfera de nitrógeno o en condiciones de vacío con un rotavapor (Goodwin, 1976).

La extracción puede conducir a errores debido a factores como la presencia de otras sustancias, especialmente las de alto peso molecular, que podrían ser también extraídas causando interferencia; además, si la solución no es rápidamente tratada, la presencia de diferentes enzimas puede conducir a cambios en los flavonoides originalmente presentes. (Goodwin, 1976).

2.5.1 Purificación de flavonoides

Esta es una etapa importante dado que el extracto de las plantas puede contener diferentes tipos de sustancias que producen interferencia en la identificación de los flavonoides. Por lo tanto, se vuelve crucial eliminar las impurezas antes de proceder a su identificación y cuantificación (Routray y Orsat; 2012). La purificación de los compuestos fenólicos puede llevarse a cabo principalmente por procedimientos en fase sólida o líquido-líquido.

a) Extracción en fase sólida (SPE)

Es uno de los métodos comúnmente usados para el aislamiento, purificación y pre-concentración de fitoquímicos, especialmente los compuestos fenólicos. Aquí se emplea geles de sílice (C8 y C18 principalmente), donde las fibras de sílice recubiertas se utilizan para extraer analitos de la mezcla de la muestra. Las ventajas son: rapidez, reproducibilidad y obtención de extractos limpios en comparación con el procedimiento de extracción líquido-líquido clásico. La desventaja del uso de la separación en fase sólida es la restricción del tamaño de la muestra el cual oscila entre 2 a 4 veces el volumen del lecho de la columna (de Rijke y cols., 2006).

b) Extracción en fase líquido-líquido

En este método los extractos de plantas se secan a baja presión y temperatura, el residuo seco se lleva a ebullición, un posterior enfriamiento y filtrado. Los residuos son lavados con agua y desengrasados con éter de petróleo, la fase acuosa es extraída con éter dietílico y Na_2CO_3 al 5% para transformar el ácido fenólico en sales de sodio solubles en agua. Posteriormente, la capa bicarbonatada se acidifica con HCl y se extrae con éter dietílico. El extracto de éter resultante se lava con agua para eliminar el ácido y el agua se elimina mediante la adición de carbonato de sodio anhidro. La separación en las fases está en función de la partición de los compuestos. La purificación de fase líquido-líquido tiene muchas desventajas sobre la SPE, por ejemplo, el gran consumo de disolventes y el tiempo empleado en la manipulación de la muestra favorece su contaminación durante el proceso. La principal ventaja es su capacidad para trabajar con una gran cantidad de muestras en comparación con otras técnicas (de Rijke y cols., 2006).

2.5.2 Separación e identificación de flavonoides

Los métodos frecuentemente empleados para la separación e identificación de flavonoides son cromatográficos, tales como la cromatografía en capa fina (CCF), la cromatografía de líquidos (LC), la espectrometría de masas (MS) y otros menos comunes como son la cromatografía de gases (CG) y electroforesis capilar (EC).

Cromatografía en capa fina. Es útil para el monitoreo rápido de sustancias farmacológicamente activas en extractos vegetales, antes de su análisis detallado mediante técnicas instrumentales como LC-UV, especialmente porque se pueden analizar varias muestras. Generalmente se utiliza sílice como fase estacionaria. La detección de flavonoides se realiza principalmente usando luz UV a 350-365 ó 250-260 nm (de Rijke y cols., 2006).

Para la visualización de compuestos antioxidantes como los flavonoides en CCF se recomienda el uso de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) como revelador. La identificación de los antioxidantes se da por un cambio de coloración (morado a amarillo) debido a que durante la reacción del DPPH con los antioxidantes, el electrón impar del nitrógeno con que cuenta el DPPH (morado) acepta un átomo hidronio del compuesto antioxidante, obteniéndose la respectiva hidracina (amarilla) (Simonovska y cols., 2003; Sagar y cols., 2011).

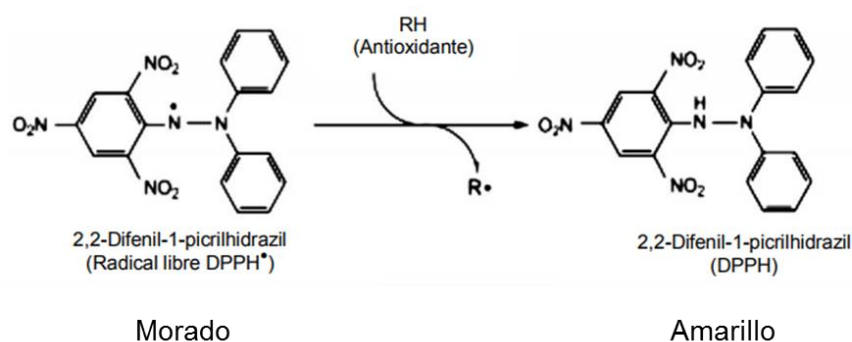


Figura 5. Reacción entre el radical DPPH• y un antioxidante para formar DPPH (Moon y Shibamoto, 2009).

Espectrometría de masas. Es una técnica que se basa en la separación a alto vacío de iones en fase gaseosa de acuerdo con su relación carga/masa (m/z). Hay diferentes tipos de espectrómetros, sin embargo, todos cuentan con los siguientes elementos: un sistema de

inyección de muestra, un sistema de ionización, un acelerador de iones mediante campo eléctrico, un analizador (donde los iones son separados de acuerdo con su relación m/z) y un detector (en el que las especies iónicas son detectadas en proporción a su abundancia) finalmente un procesador de señal (Harris, 2003, Hoffman y Stroobant, 2007).

Fuentes de ionización

Los sistemas de ionización más frecuentes en el estudio de flavonoides son la ionización química a presión constante (APCI) y la ionización por electrospray (ESI) combinada con la espectrometría en tándem (MS/MS) (March y Miao, 2004).

A) Ionización química a presión constante: En este sistema el analito es introducido a un nebulizador donde se crea una atomización fina mediante un haz de nitrógeno a alta velocidad; las gotas formadas son desplazadas por el gas a través de un tubo de cuarzo caliente el cual transfiere calor a las gotas permitiendo la vaporización tanto de la fase móvil como de la muestra, luego de llevarse a cabo la desolvatación de la muestra ésta es llevada a lo largo de un electrodo de descarga (corona) donde es ionizada. El proceso de ionización emplea una corriente de electrones que ioniza un gas que transfiere la carga al analito (Hoffman y Stroobant, 2007).

B) Ionización por electrospray: Este sistema de ionización se produce mediante la aplicación de un campo eléctrico fuerte a presión atmosférica. El campo eléctrico se obtiene aplicando una diferencia de potencial de 3-6 kV induciendo una acumulación de la carga en la superficie del líquido que se romperá para formar gotas que son posteriormente eliminadas por acción de una corriente de gas nitrógeno caliente. El disolvente presente en las gotas se evapora gradualmente encogiéndolas, aumentando su carga por unidad de volumen. Los iones son dirigidos al espectrómetro de masas por medio de campos eléctricos (Hoffman y Stroobant, 2007).

C) Espectrometría en tándem (MS/MS): Es un método que implica al menos dos etapas de análisis por masas; para realizarlo se utiliza generalmente un primer analizador con el que se aísla el ion en estudio que es fragmentado para generar otros iones y fragmentos neutros que son analizados mediante un segundo espectro (Hoffman y Stroobant, 2007).

Analizadores de masas

Otro elemento importante que conforma el espectrómetro de masas es el analizador; los más comunes son el de cuadrupolos, de trampa iónica y de tiempo de vuelo.

A) Cuadrupolos: Este analizador emplea campos eléctricos solamente para separar los iones de acuerdo a su relación m/z . Un cuadrupolo consiste en cuatro polos o varillas a través de las cuales se hacen pasar los iones a separar, los polos reciben una corriente directa fija y voltajes de radio-frecuencia alternante. Dependiendo del campo eléctrico producido, solamente los iones con cierta relación de m/z serán dirigidos al detector (Hoffman y Stroobant, 2007).

B) Trampa iónica: Es un analizador en el que los iones están confinados en un espacio mediante combinaciones de campos eléctricos, el almacenamiento se da de acuerdo a la relación m/z estipulada (Hoffman y Stroobant, 2007).

C) Tiempo de vuelo: Es un analizador simple que mide el tiempo de los iones acelerados a energías cinéticas conocidas sobre una distancia fija conocida; debido a que el tiempo es una función de la masa, esta última se puede calcular (Hoffman y Stroobant, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que el nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. posee sistemas antioxidantes de tipo enzimático y no enzimático, entre este último se encuentran compuestos como los carotenoides y fenoles totales tales como ácidos fenólicos y flavonoides.

En particular, los flavonoides son un grupo de compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, a los cuales se les han atribuido diferentes propiedades funcionales; sin embargo, en la literatura no se reporta una metodología generalizada para la obtención de éstos, considerando que para su extracción deben ser tenidos en cuenta diferentes factores como tipo de material vegetal, así como la estructura del flavonoide de interés. Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende estandarizar una metodología que permita la identificación de los flavonoides del nopal, lo cual permitirá ampliar el conocimiento de sus componentes y de su capacidad antioxidante, abriendo la posibilidad de emplear dichos compuestos como perfil y huella digital para la denominación de origen.

4. HIPÓTESIS

La identificación de los flavonoides de nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. cultivar Atlixco estará en función del manejo de la muestra, el tipo de disolvente, así como de la temperatura, el tiempo y el pH durante el proceso de extracción.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Estandarizar una metodología para la obtención e identificación de flavonoides en *Opuntia ficus-indica* Mill. cultivar Atlixco desespinado.

5.2 Objetivos específicos

1. Establecer el manejo del material vegetal antes del proceso de extracción que permita la obtención de los compuestos de interés.
2. Determinar las condiciones óptimas de temperatura, tiempo y tipo de disolvente en la extracción para la extracción de flavonoides de nopal.
3. Seleccionar el proceso de purificación eficiente para los extractos de nopal que facilite la eliminación de los compuestos que generan interferencia con los flavonoides de interés.
4. Identificar los flavonoides del nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. cultivar Atlixco por espectrometría de masas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presenta el desarrollo experimental llevado a cabo en la presente investigación, en el cual se buscó establecer las condiciones necesarias para la extracción e identificación de flavonoides en nopal *Opuntia ficus indica* Mill. cultivar. Atlixco desespinado.

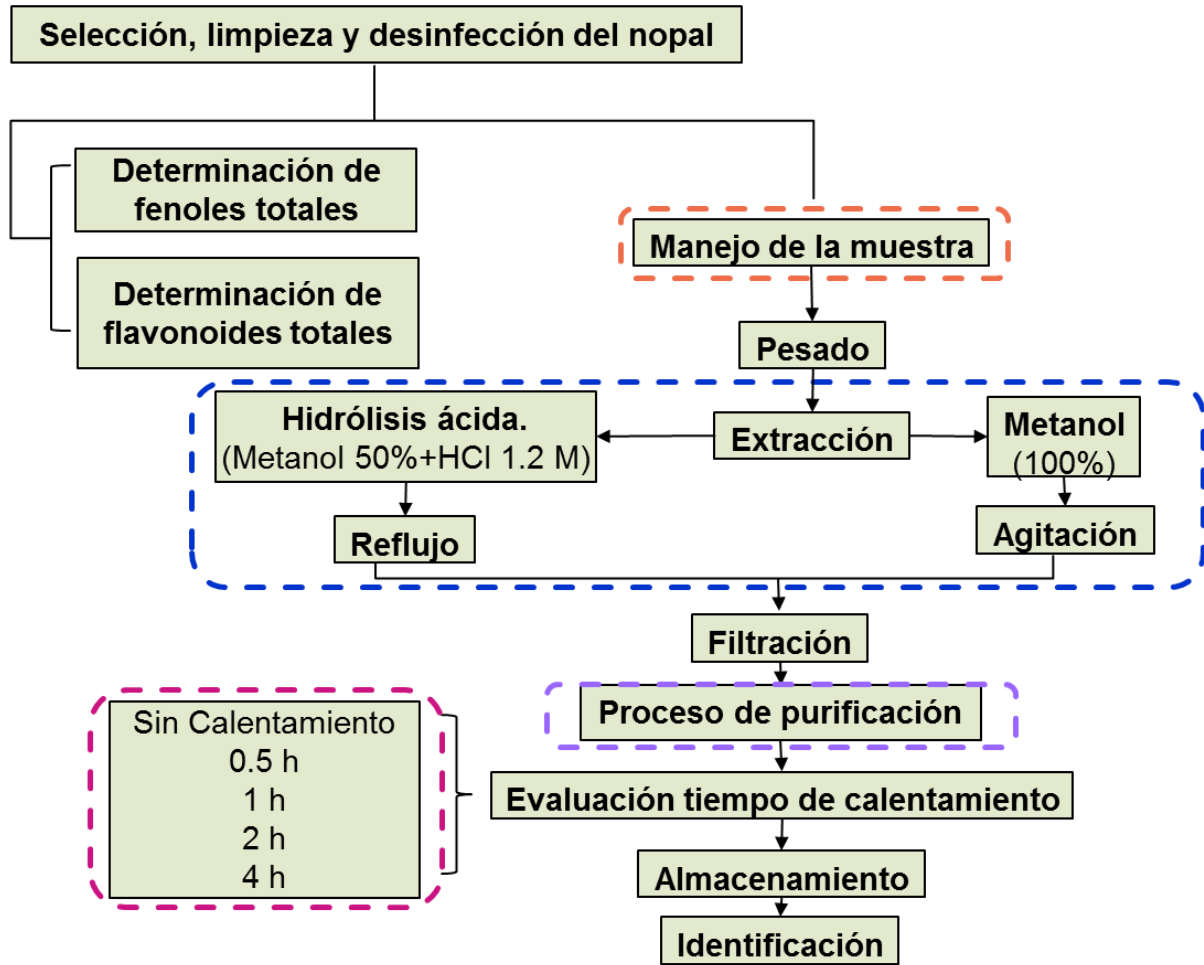


Figura 6. Diagrama general del desarrollo experimental

6.1. Material biológico

Los cladodios de nopal cultivar Atlixco se compraron desespinados en la Central de Abasto de la Ciudad de México y posteriormente se transportaron al laboratorio de frutas y hortalizas, donde se procedió a seleccionarlos por tamaño, color homogéneo y por ausencia de defectos. Los nopales seleccionados se desinfectaron mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm por 3 minutos; posteriormente se eliminó el exceso de agua. Finalmente, se formaron las unidades experimentales las cuales estuvieron constituidas por 3 nopales y dos repeticiones.

6.2. Contenido de fenoles totales

La determinación del contenido de fenoles totales se realizó usando el método de Folin-Ciocalteu, empleando la metodología descrita por Velioglu y cols. (1998). Ésta consistió en pesar 1 g de muestra de nopal fresco, el cual se mezcló con 10 mL de metanol (Meyer®, México) al 80%, homogeneizando la mezcla con un politrón (OMNI international GLH, Estados Unidos) durante un minuto, posteriormente se centrifugó a 1095 x g por 25 minutos con una centrifuga Solbat V115 (Solbat, México). El sobrenadante se decantó y aforó a 10 mL con metanol 80%. La mezcla de reacción estuvo constituida por 0.1 mL del sobrenadante y 0.75 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (HYCEL, México) los cuales reaccionaron durante 5 minutos; después, 0.75 mL de una solución de carbonato de sodio (Fermont, México) al 6% (p/v) fueron adicionados. La reacción se llevó en oscuridad a temperatura ambiente durante 90 minutos; finalmente, se tomó lectura de la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro Jenway 6705 (Bibby Scientific, Reino Unido).

La curva estándar fue construida en un intervalo de 20 a 120 ppm empleando una solución de ácido gálico (Meyer®, México) (ANEXO A). El contenido de fenoles totales se reportó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de nopal fresco.

6.3. Contenido de flavonoides totales

La determinación del contenido de flavonoides totales se realizó siguiendo la metodología propuesta por Chougui y cols., (2013). Esta se llevó a cabo a partir de 1 g de muestra de nopal fresco que se mezcló con 10 mL de metanol (Meyer®, México) al 80%, homogeneizando la mezcla con un politrón (OMNI international GLH, Estado Unidos) durante un minuto y se centrifugó a 1095 x g 25 minutos en una centrifuga Solbat V115 (Solbat,

México). El sobrenadante se decantó y aforó a 10 mL con metanol 80%. Posteriormente, 2 mL del sobrenadante fueron mezclados con 2 mL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Meyer®, México) 2% (p/v). La reacción se incubó en la oscuridad durante 30 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Jenway 6705 (Bibby Scientific, Reino Unido) a una longitud de onda de 430 nm (Chougui y cols., 2013).

El contenido de flavonoides totales fue calculado empleando una curva estándar de quercetina (Sigma Aldrich, Estados Unidos) en un intervalo de concentración 9 a 30 ppm (ANEXO B). Los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de quercetina (EQ) por gramo de nopal fresco.

6.4. Evaluación del proceso de extracción de flavonoides

Con la finalidad de establecer un proceso de extracción y purificación, se realizaron experimentos exploratorios durante las siguientes etapas: manejo de la muestra, evaluación del método de extracción y proceso de purificación para determinar las condiciones necesarias en la obtención de los flavonoides de interés. La evaluación de diferentes factores en cada una de éstas constituyó el principal objetivo del presente trabajo ya que los resultados obtenidos en cada una de ellas fueron determinantes para normar criterios y tomar la decisión de la siguiente etapa.

6.4.1. Manejo de la muestra

La evaluación del manejo de la muestra consistió en comparar nopal fresco y liofilizado con la finalidad de establecer el procesamiento que permita una mayor extracción de los compuestos de interés. Para el análisis de la muestra de nopal fresco, se partió de secciones de nopal de cada unidad experimental que posteriormente fueron cortadas en cuadros, se pesaron 10 y 25 g, respectivamente. Para la obtención del nopal liofilizado los nopales de cada unidad experimental fueron cortados en cubos y separados en muestras de 10 g, las cuales se congelaron a -40°C y liofilizaron en una liofilizadora FREEZONE 4.5 (Labconco, Estados Unidos), durante 3 días, 8 horas por día.

Las muestras de nopal fresco y liofilizado fueron empleadas en el proceso de extracción con hidrólisis ácida por reflujo.

La extracción con hidrólisis ácida se realizó de acuerdo con la metodología de Mustafa y cols., (2010) con algunas modificaciones. Ésta consistió en homogenizar las muestras de nopal fresco o liofilizado con 20 mL de metanol al 62.5% (v/v) empleando un politron OMNI International GLH (OMNI international GLH, Estados Unidos). Luego se adicionaron 5 mL del ácido clorhídrico 6 M (Meyer®, México); la mezcla se mantuvo en reflujo por 2 horas a 65°C; posteriormente se centrifugó a 1095 x g por 25 minutos empleando una centrifuga Solbat V115 (Solbat, México) y el sobrenadante fue almacenado para su posterior análisis.

La evaluación de las muestras se llevó a cabo mediante el barrido espectral de los extractos obtenidos con hidrólisis ácida, el cual se realizó en un espectrofotómetro Jenway 6705 (Bibby Scientific, Reino Unido) que fue programado para registrar las absorbancias de los extractos entre las longitudes de onda 200 a 700 nm.

6.4.2. Método de extracción y tipo de disolvente

La evaluación del método de extracción consistió en comparar dos metodologías. En la primera de ellas se empleó metanol (Meyer®, México) como disolvente y la segunda se realizó con hidrólisis ácida por reflujo. La elección de las metodologías se basó en que ambas permiten la obtención de diferentes tipos de flavonoides.

La extracción metanólica consistió en mezclar 1 g de nopal liofilizado con 100 mL de metanol (Meyer®, México) puro. La mezcla se agitó en la oscuridad durante 4 horas a 1000 rpm y se centrifugó a 1095 x g durante 15 minutos empleando una centrifuga Solbat V115 (Solbat, México). Finalmente, el sobrenadante obtenido se llevó a sequedad empleando una campana de extracción.

Por otra parte, la extracción con hidrólisis ácida por reflujo (2 h) se realizó siguiendo la metodología descrita por Mustafa y cols., (2010) modificando en ésta la cantidad de muestra y volumen de disolventes empleados. 1 g de nopal liofilizado se adicionó a 80 mL de metanol 62.5% (v/v) y 20 mL de HCl 6M (1.2 M en solución), la mezcla se centrifugó a 1095 x g durante 15 minutos empleando una centrifuga Solbat V115 (Solbat, México) y el sobrenadante obtenido se llevó a sequedad empleando una campana de extracción.

Ambos extractos obtenidos (metanólico y procedente de la hidrólisis) se analizaron a través de un barrido espectral y cromatografía en capa fina. Para lo cual, las muestras se resuspendieron en 3 mL de metanol (Meyer®, México). El barrido se realizó en un espectrofotómetro Jenway 6705 (Bibby Scientific, Reino Unido) en un rango de 200 a 800 nm,

El monitoreo de los extractos metanólico e hidrolizados por cromatografía en capa fina se realizó con la finalidad de identificar cualitativamente las diferencias en su composición y de establecer si los compuestos presentes son de tipo antioxidante; para ello se utilizaron cromatoplasmas de SILICAGEL 60 F 254 (Merck, Alemania). Se empleó como sistema de elución diclorometano: metanol en una relación 80:20 (v:v). Para visualización de los componentes se utilizó luz ultravioleta (254 nm) y el cromatofolio se reveló de acuerdo con la metodología propuesta por Simonovka y cols., (2003), empleando una solución reveladora de DPPH (Sigma Aldrich, Estados Unidos) 0.04% (p/v). Así mismo, el sobrenadante de ambos extractos se analizó por espectrometría de masas.

Para el análisis por espectrometría de masas se empleó un equipo micro TOF-Q (BRUKER, Estados Unidos) equipado con fuente de ionización asistida por electrospray (ESI) modo negativo. La adquisición y procesamiento de los datos se realizó empleando el sistema Bruker Compass DataAnalysis 4.1. Los parámetros de adquisición fueron: rango de detección de masas 50 a 3000 m/z, polaridad negativa, voltaje del capilar 2700 V, empleando Nitrógeno como gas de secado y nebulizado a caudales aproximadamente de 4 Lmin⁻¹, una presión de 0.4Bar y temperatura de 180°C. Finalmente, se empleó una radio frecuencia de 150.0 Vpp en la celda de colisión para los análisis de fragmentación.

La identificación preliminar de todos los compuestos por espectrometría de masas se realizó comparando la masa exacta obtenida con la teórica, complementado con el uso de las bases de datos (ChemSpider y ChEBI) en las que se asoció la masa exacta con las respectivas estructuras químicas.

6.4.3. Evaluación de la proporción muestra/volumen de disolvente en extracción con hidrólisis ácida.

Dado que la hidrólisis ácida facilita la obtención de la forma de aglicona de los flavonoides, se procedió a evaluar el efecto de la relación cantidad de muestra y volumen del disolvente (p: v) en el proceso de extracción con hidrólisis ácida por reflujo.

Se compararon las relaciones de muestra/volumen de disolvente 1:50 y 1:100 (p:v). El proceso de extracción con hidrólisis ácida se realizó siguiendo la metodología propuesta por Mustafa y cols., (2010) y el sobrenadante obtenido fue analizado por espectrometría de masas.

6.4.4. Evaluación del proceso de purificación

Se evaluaron tres procesos de purificación (PP-1, PP-2, PP-3) con el objetivo de determinar cuál de ellos era más efectivo. Previo a la evaluación del proceso de purificación, se realizó la extracción con hidrólisis ácida por reflujo. El sobrenadante obtenido en la extracción se concentró a un volumen final de 4 mL con nitrógeno gaseoso.

Los procesos de purificación se realizaron por extracción en fase sólida. Para la técnica se utilizó una Columna Octadecyl BAKERBOND™spe (J.T. Baker, Estados Unidos) la cual se activó con 3 mL de metanol, después se adicionaron 3 mL del extracto hidrolizado concentrado; finalmente se hicieron eluciones ordenadas de las diferentes mezclas de disolventes Cuadro 4.

El índice de polaridad total (P') en cada fracción fue calculado a partir de la ecuación $P' = F_a * P'_a + F_b * P'_b + F_c * P'_c$, en donde F_i y P'_i representan la proporción volumétrica y el índice de polaridad de cada uno de los disolvente puros en cada fracción Touchstone, 1992).

Cuadro 4. Fracciones de los procesos de purificación por extracción en fase sólida

PROCESO DE PURIFICACIÓN	CÓDIGO	TIPO DE FRACCIONES	ÍNDICE DE POLARIDAD TOTAL
PP-1	F1	Agua (100%)	9.0
	F2	Agua: metanol (50:50)	7.8
	F3	Agua: metanol: acetonitrilo (25:25:50)	7.0
	F4	Metanol: acetonitrilo (50:50)	6.4
	F5	Acetonitrilo (100)	6.2
PP-2	FA1	Agua (100%)	9.0
	FB2	Metanol (100%)	6.6
PP-3	Fa	Agua	9.0
	Fb	Agua acidificada (pH=2)	8.97
	Fc	Metanol: acetonitrilo (2:1)	6.47

Las fracciones obtenidas de cada uno de los procesos de purificación se analizaron por cromatografía en capa fina, barrido espectral y espectrometría de masas.

El análisis por cromatografía en capa fina (CCF) se realizó empleando cromatoplasmas de SILICAGEL 60 F 254 (Merck, Alemania). La fase móvil fue de diclorometano: metanol en una relación 80:20 (v:v). Para visualización de los componentes se utilizó luz ultravioleta (254 nm) y el cromatofolio se reveló de acuerdo a la metodología propuesta por Simonovka y cols. (2003), empleando una solución reveladora de DPPH 0.04% (p/v), con la finalidad de establecer las fracciones que contenían compuestos de tipo antioxidante.

Las fracciones que revelaron compuestos antioxidantes en el ensayo por CCF se analizaron por medio de un barrido espectral de 200 a 390 nm en un espectrofotómetro Jenway 6705 (Bibby Scientific, Reino Unido) y por espectrometría de masas. Finalmente, la fracción que se encontró selectiva y en la que se identificó el mayor número de compuestos de interés fue establecida en la metodología de extracción de flavonoides en nopal cultivar. Atlixco.

6.5 Evaluación de tiempos de hidrólisis en la identificación de compuestos fenólicos

Dado que se ha demostrado que los flavonoides son frecuentemente caracterizados a partir de sus respectivas agliconas se procedió a variar los tiempos de calentamiento durante la extracción con hidrólisis ácida en la metodología propuesta por Mustafa y cols. (2010) con la finalidad de extraer el mayor número de flavonoides en nopal cultivar. Atlixco. Los niveles del factor de tiempo de calentamiento ensayados fueron sin calentamiento, 0.5, 1, 2 y 4 horas a 65°C. El sobrenadante obtenido fue concentrado a un volumen final de 4 mL con nitrógeno y posteriormente, se realizó el PP-1 del que se recuperaron cada una de las fracciones las cuales se llevaron a sequedad con nitrógeno gaseoso.

La evaluación de los tiempos de hidrólisis se centró sobre la fracción 3 (F3), obtenida del PP-1. Los análisis se realizaron cuantitativamente mediante la determinación de fenoles y flavonoides totales y cualitativamente con cromatografía en capa fina y espectrometría de masas.

Para el análisis por CCF se utilizaron cromatoplacas de SILICAGEL 60 F 254 nm (Merck, Alemania). Como sistema de elución se empleó diclorometano: metanol en una relación 90:10 (v:v); para la visualización de los componentes se utilizó luz ultravioleta a 254 y 366 nm, posteriormente el cromatofolio se reveló de acuerdo a la metodología propuesta por Simonovka y cols. (2003), empleando una solución reveladora de DPPH (Sigma Aldrich, Estados Unidos) 0.04% (p/v).

6.6 Análisis estadístico

Los resultados cuantitativos se analizaron en un diseño completamente al azar (DCA) y la comparación de medias se llevó a cabo por la prueba de Tukey ($P < 0.05$), empleando el paquete IBM® SPSS® Statistics (IBM, Estados Unidos) para el análisis de datos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Fenoles totales

El contenido de fenoles totales en nopal *Opuntia ficus-indica* cultivar Atlixco fue de 1.41 ± 0.19 mg EAG/ g nopal fresco. Este valor se encuentra dentro de los niveles reportados por otros autores como Ventura-Aguilar y cols. (2013) quienes reportaron 2 mg EAG/ g nopal fresco para el mismo cultivar. Así mismo Pérez Méndez y cols. (2015) obtuvieron 1.28 mg EAG/ g en nopal *Opuntia ficus-indica* de origen Español. La diferencia en la cantidad de fenoles obtenidos se debe principalmente a dos factores, el primero en relación al clima, y las condiciones de cultivo y el segundo atribuible a la metodología seguida para su análisis desde el manejo de la muestra, las técnicas y tipo de disolvente empleado para la extracción (Nuutila y cols., 2002; Stintzing y Carle, 2005; Routray y Orsat, 2012).

En la literatura existen reportes del contenido fenólico del nopal en base seca en un rango de 0.012-1.076 mg EAG/ g nopal fresco; sin embargo, estos valores no son comparable con los resultados obtenidos, considerando que las diferencia podría deberse principalmente al manejo de la muestra (proceso de deshidratación, secado e incluso condiciones de transporte de los mismo) (Bensadón y cols., 2010; Guevara-Figueroa y cols., 2010)

El contenido fenólico del nopal cultivar Atlixco es similar a 1.189 y 1.010 mg EAG/ g fresco reportado en col y cebolla, además mayor a 0.134 y 132 mg EAG/ g fresco de lechuga y zanahoria, todos producidos en China (Bahorun y cols., 2004).

7.2. Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales fue de 193.7 ± 9.7 μ g EQ/ g de nopal fresco. Con respecto a los reportes que existen, la cantidad total determinada fue mayor que los 3.1 mg EQ/ g_{bs} (124 μ g EQ/g de nopal fresco) y menor que los 9.8 mg EQ/ g_{bs} (equivalentes a 392 μ g EQ/g de nopal fresco) reportados para cladodios de las variedades mexicanas manso y blanco, respectivamente (Guevara-Figueroa y cols., 2010). Las diferencias encontradas se atribuyen principalmente a que se tratan de variedades diferentes, aunado a la diferencia en las técnicas de extracción y cuantificación empleadas.

El contenido de flavonoides totales en vegetales como cebolla, brócoli, tomate, coliflor, lechuga y zanahoria de origen chino se encuentra en un rango de 45-944 μ g EQ/g fresco. De

acuerdo con esto, el contenido determinado en nopal cultivar Atlixco está dentro del rango establecido (Bahorun y cols., 2004).

Cabe mencionar que en la literatura existe poca evidencia de la determinación de flavonoides totales en cladodios de nopal. La escasa información se debe principalmente a que no existe un método establecido para evaluar el contenido total de flavonoides (Granato cols., 2016). El empleo de métodos espectrofotométricos es lo más común; sin embargo las metodologías varían desde el tipo de reactivos hasta los estándares empleados para la cuantificación, siendo la rutina y quercetina los más empleados (Bahorun y cols., 2004; Loizzo y cols., 2012; Chougui y cols., 2013; Granato y cols., 2016).

7.3. Evaluación del proceso de extracción de flavonoides

7.3.1. Manejo de la muestra

Al comparar el manejo de la muestra fresca contra la liofilizada se determinó que el nopal debe ser liofilizado ya que como se ilustra en la Figura 7, hubo un desplazamiento en las absorbancias (aumentándolas) en el extracto con nopal liofilizado, lo cual es indicativo de que hay una mayor cantidad de compuestos que absorben en la región UV (200-400nm), siendo esto característico de los flavonoides debido a la presencia de grupos aromáticos en el núcleo de los mismos. Cabe mencionar que el empleo de la muestra liofilizada no sólo facilita el procesamiento de la misma, sino que se evita la degradación y cambios estructurales de los flavonoides, además, aumenta el área de contacto de los analitos con el disolvente (de Rijke y cols., 2006; Stalikas, 2007; Routray y Orsat, 2012).

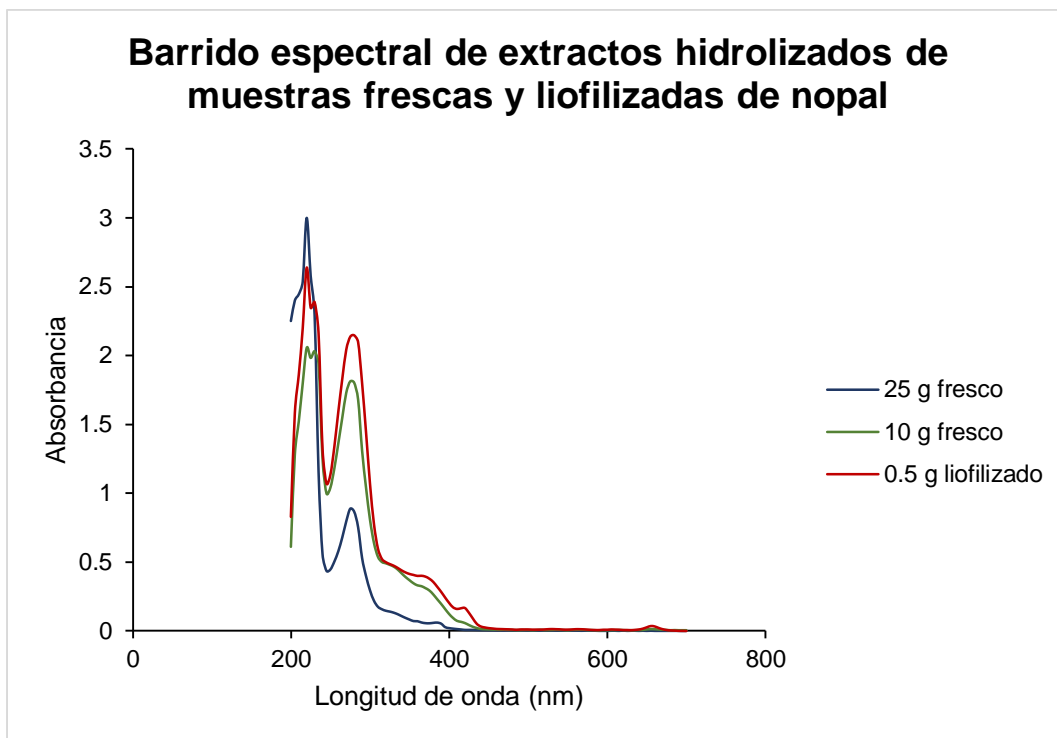


Figura 7. Espectro de la región (200-600 nm) de muestras frescas y liofilizadas

7.3.2. Método de extracción y tipo de disolvente

Análisis por barrido espectrofotométrico.

Como se aprecia en la Figura 8 el barrido espectral de los extractos metanólico e hidrolizado es diferente. Así, en el extracto hidrolizado se encontró una mayor cantidad de compuestos que absorben en la región ultravioleta (200-400 nm), zona en la cual absorben los flavonoides; mientras que con la extracción metanólica se observaron compuestos que absorben tanto en la región ultravioleta (200-400 nm) como en la visible (400-700 nm). Dicha diferencia era de esperarse, dado que la composición de los extractos depende tanto de la elección del método de extracción como del tipo de disolvente empleado, el cual influye en la solubilidad de los compuestos de tipo fenólico.

Otros factores que afectan la solubilidad son el grado de polimerización (glucosilación, acilación, esterificación) y las interacciones de éstos con compuestos como azúcares y proteínas, los cuales dificultan la solubilidad de los flavonoides; por lo anterior, es congruente

que se hayan obtenido mejores resultados con la hidrólisis ácida, dado que con ésta se consigue hidrolizar principalmente enlaces o-glucosídicos de compuestos que se encuentran unidos al núcleo del flavonoide, favoreciendo con ello la solubilidad (Oniszczyk y Podgórski, 2015; Côté y cols., 2016).

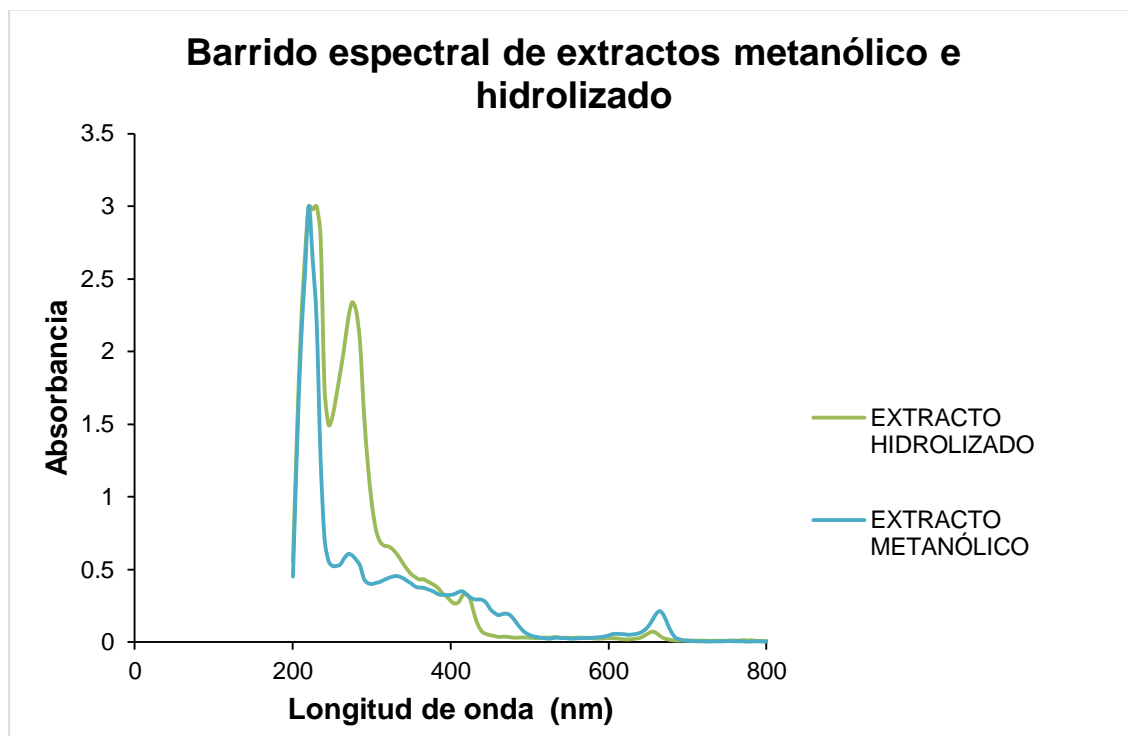


Figura 8. Comparación espectral de extracto metanólico e hidrolizado

Análisis en cromatografía capa fina

El resultado obtenido con el barrido espectral fue confirmado en el cromatograma en CCF a una longitud de onda corta (254 nm) (Figura 9A) y empleando como revelador DPPH (Figura 9B). Los resultados indicaron que al observar el cromatofolio en una longitud de onda corta se observaron un mayor número de compuestos separados en el extracto hidrolizado (H en la figura), mientras que sólo dos en el metanólico (M en la figura). Además, se pudo identificar que la mayoría de los componentes del extracto hidrolizado fueron más polares y se quedaron retenidos en el punto de aplicación, mientras que unos pocos compuestos menos polares fueron desplazados fácilmente por la fase móvil (diclorometano: metanol,

80:20); por el contrario, el extracto metanólico presentó compuestos de polaridad intermedia y alta.

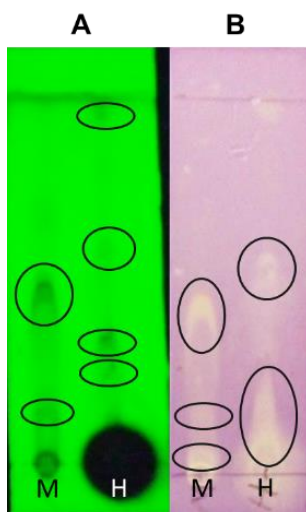


Figura 9. (A). Cromatograma a longitud de onda corta (254nm). (B). Cromatograma revelado con DPPH 0.04% (p/v)

Al utilizar DPPH se pudo observar que los compuestos presentes en ambos extractos (metanólico e hidrolizado) fueron de tipo antioxidante, apreciándose la presencia de manchas amarillas (Figura 9B) (Naczki y Shahidi, 2004; Naczki y Shahidi, 2006).

El posterior análisis por espectrometría de masas de los extractos metanólico e hidrolizado crudos (Figura 10 y 11) no reveló la presencia de posibles compuestos fenólicos reportados en nopal, considerado que las relaciones carga/masa de los iones detectados no estuvieron asociadas con masas exactas teóricas de compuestos de este tipo en las bibliotecas empleadas (ChemSpider y ChEBI). Sin embargo, sí se observaron señales de relaciones carga/masa distintas en los respectivos extractos, lo cual indica que la composición es diferente.

Extracto metanólico crudo

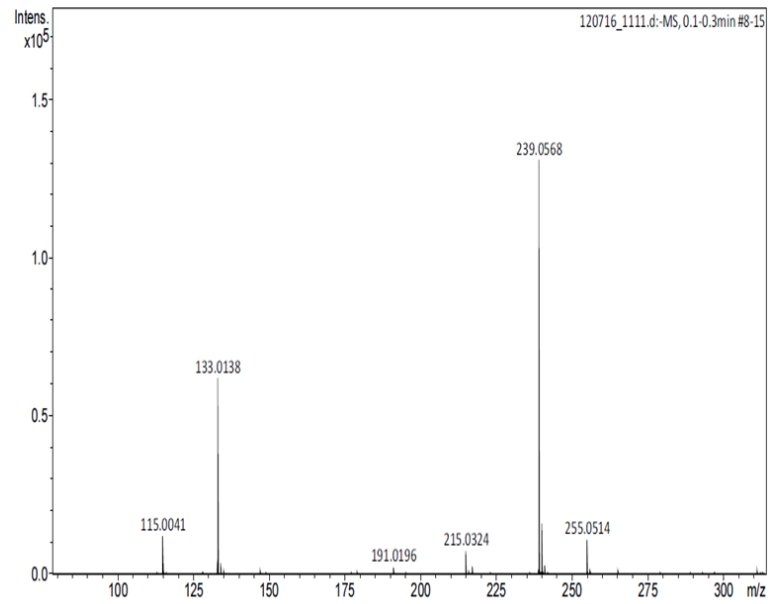


Figura 10. Espectro de masas de la extracción metanólica

Extracto hidrolizado crudo

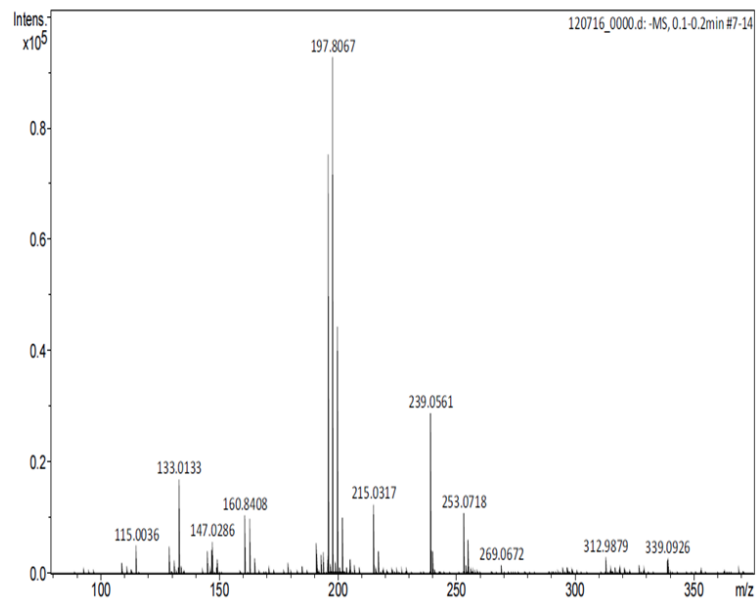


Figura 11. Espectros de masas de la extracción con hidrólisis ácida.

Como fue mencionado, la solubilidad de los compuestos fenólicos depende de la naturaleza química y polaridad de los compuestos; además, los polifenoles pueden formar complejos con otros componentes de la planta tales como proteínas y carbohidratos, lo cual afecta la solubilidad de los mismos; otros factores que tienen influencia en dicha propiedad son la polaridad del disolvente, tiempos y temperatura de extracción (Naczk y Shahidi, 2006)

Un factor adicional que influyó sobre los resultados obtenidos en el extracto hidrolizado fue la temperatura (65°C) a la cual se llevó a cabo la hidrólisis ácida. Dicho factor resultó importante dado que la extracción a alta temperatura permitió el aumento de la solubilidad asociado a un incremento de las interacciones intermoleculares y de la tasa de difusión de los solutos en el disolvente empleado; además, conjuntamente se provoca un aumento en la presión que puede ocasionar la ruptura de las células, favoreciendo la disponibilidad de los compuestos (Routray y Orsat., 2012; Aires y cols., 2017).

De acuerdo con los resultados obtenidos, las interacciones de los compuestos fenólicos con compuestos de otro tipo pudieron haber limitado la solubilidad de los mismos en la extracción metanólica; por el contrario, la hidrólisis ácida favoreció la ruptura de enlaces químicos entre los compuestos presentes, lo cual facilitó la solubilidad de un mayor tipo de componentes de la muestra; aunado a ello, existe literatura reportada que recomienda ampliamente esta metodología para la obtención de flavonoides agliconas, ya que con éstos se facilita la identificación de los flavonoides presentes, por lo anterior, se continuó utilizando la hidrólisis ácida en los posteriores experimentos (Hertog y cols., 1992; Nuutila y cols., 2002; Santos-Zea y cols., 2011).

7.3.3. Evaluación de la relación muestra y el volumen de disolvente en extracción con hidrólisis ácida.

Como se aprecia en los espectros de masas obtenidos de las relaciones muestra y volumen del disolvente evaluadas (Figura 12 y 13), en el extracto hidrolizado crudo con una relación 1:50 (p:v) (Figura 12) se sugiere la presencia de ácido *trans*-cafeico (m/z : 179.0359) y kaempferol (m/z :285.0403). Es posible que este último compuesto se encuentre considerando que en el espectro se obtuvo un pico con m/z 239 que podría corresponder a un fragmento del mismo (March y Miao, 2004); mientras que en el extracto con la relación 1:100 (p:v) (Figura 13), a pesar de encontrarse el ión m/z 239, no se apreció algún posible

compuesto de tipo fenólico. Las diferencias en los extractos confirmó la influencia del factor volumen del disolvente en la extracción de compuestos fenólicos. La asociación de los compuestos propuestos se realizó de acuerdo con los bajos errores que se obtuvieron al comparar las masas exactas teóricas con las experimentales.

Extracto hidrolizado crudo relación 1:50

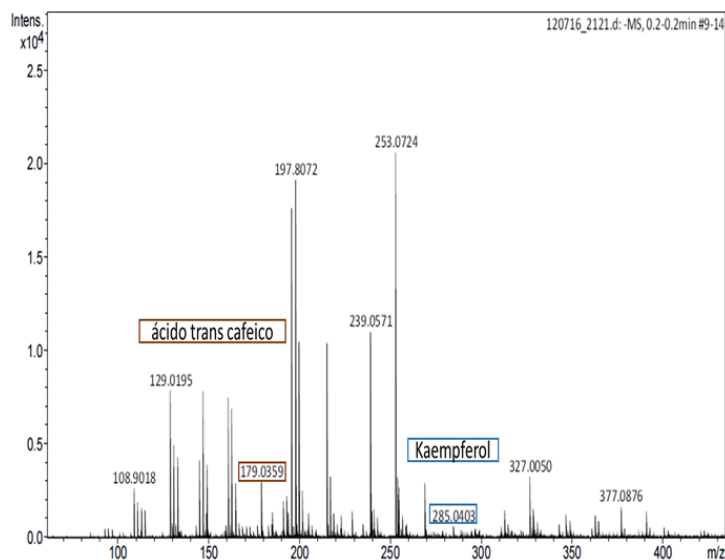


Figura 12. Espectro de masa del extracto relación 1:50 (p/v)

Extracto hidrolizado crudo relación 1:100

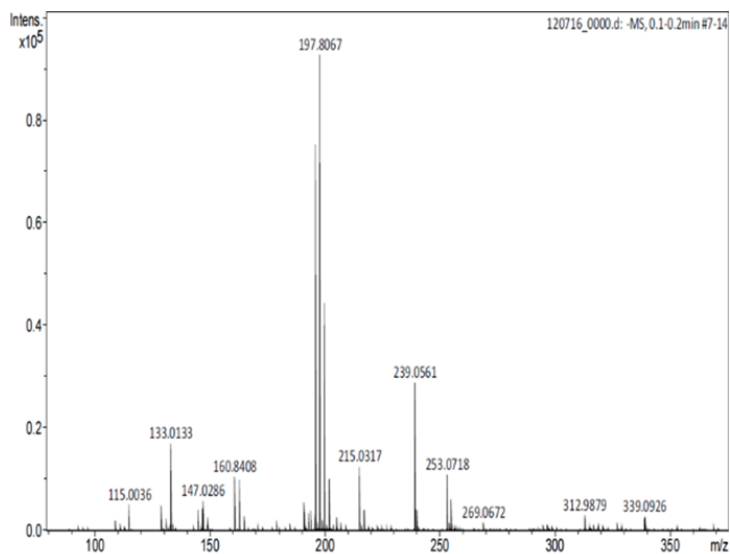


Figura 13. Espectro de masa del extracto relación 1:100 (p/v)

La baja intensidad que se aprecia en el espectro de masas del ácido *trans*-cafeico y del kaempferol en comparación con la alturas de las relaciones de masa/carga (m/z) restantes estarían indicando la interferencia de otro tipo de compuestos que limitan la identificación de los fenólicos de interés, por lo cual se hace necesario el aislamiento o purificación en una etapa posterior (Naczk y Shahidi, 2006; Ajila y cols., 2011; Granato y cols., 2016).

Lo anterior justificó la decisión de continuar la investigación con el extracto hidrolizado en las condiciones de trabajo (0.5 g nopal liofilizado, 20 mL metanol 62.5% (v/v), 5 mL HCl 6 M, 65 °C, 2 h) y la evaluación de diferentes procesos de purificación.

7.3.4 Evaluación del proceso de purificación (PP)

Los resultados cualitativos obtenidos para la determinación del mejor proceso de purificación se presentan en el Cuadro 5. Los compuestos revelados por CCF en cada uno de los procesos de purificación estudiados se observan en la Figura 14.

En el Cuadro 5 se resalta con sombreado las fracciones en las que se detectaron compuestos con función antioxidante. En el PP-1 fueron la F2 y F3; en el PP-2 la fracción FB2 y en el PP-3 la fracción Fc. También se aprecia que las polaridades correspondientes a esas fracciones son de 7.8, 7, 6.6 y 6.47 (Touchstone, 1992), respectivamente, lo que indicó que la polaridad de los compuestos de interés se encuentra en el intervalo de 6-8, es decir que tienen a ser más polares, lo cual fue confirmado en los posteriores análisis de las respectivas fracciones (resultados que se presentan más adelante).

Cuadro 5. Evaluación proceso de purificación por cromatografía en capa fina

PROCESO DE PURIFICACIÓN	CÓDIGO	TIPO DE FRACCIONES	RESULTADO CROMATOGRÁFICO
PP-1	F1	Agua (100%)	ausencia compuestos antioxidantes
	F2	Agua: metanol (50:50)	presencia compuestos antioxidantes
	F3	Agua: metanol: acetonitrilo (25:25:50)	presencia compuestos antioxidantes
	F4	Metanol: acetonitrilo (50:50)	ausencia compuestos antioxidantes
	F5	Acetonitrilo (100)	ausencia compuestos antioxidantes
PP-2	FA1	Agua (100%)	ausencia compuestos antioxidantes
	FB2	Metanol (100%)	presencia compuestos antioxidantes
PP-3	Fa	Agua	ausencia compuestos antioxidantes
	Fb	Agua acidificada (pH=2)	ausencia compuestos antioxidantes
	Fc	Metanol: acetonitrilo (2:1)	presencia compuestos antioxidantes

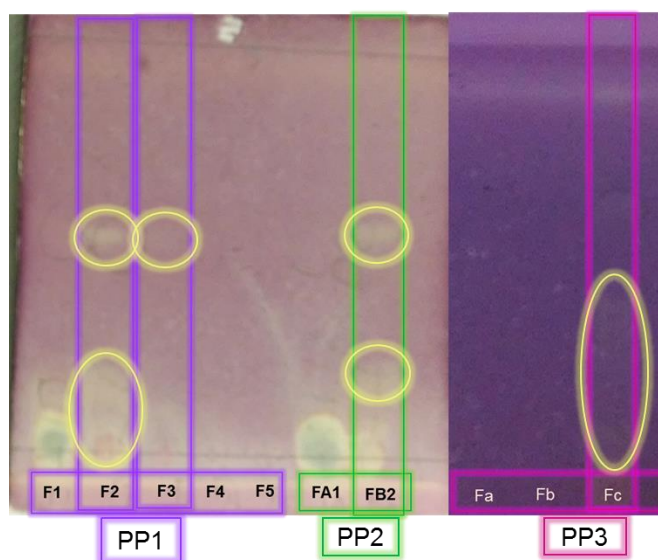


Figura 14. Cromatografía en capa fina de los procesos de purificación PP-1, PP-2 y PP-3. Fase móvil diclorometano: metanol (80:20)

Barridos espectrales de las fracciones

En la Figura 15 se ilustran los barridos espectrales de las fracciones que presentaron compuestos de tipo antioxidante (F2, F3, FB2 y Fc) se observó que en **F2** (fracción agua:metanol) hubo una mayor cantidad y variedad de compuestos que absorbieron en toda la región ultravioleta, y que generaron interferencia con los compuestos fenólicos; por su lado, en **F3** (fracción agua:metanol:acetonitrilo) se observó una mayor selectividad atendiendo a que hubo un pico con una absorbancia de 0.8 a los 280 nm, cayendo rápidamente a la línea base del barrido, esta absorbancia corresponde a una de las zonas de máxima absorbancia (270-290 nm) de los flavonoides, lo que permite la identificación de los mismos; los barridos espectrales en **FB2** y **Fc** mostraron similitud con el anterior, sin embargo, la absorbancia de los picos fue de 0.65 y 0.70, además se observaron otros tipos de compuestos que absorben en la región ultravioleta (Cartaya y Reynaldo, 2001; Ajila y cols., 2011; Côté y cols., 2016).

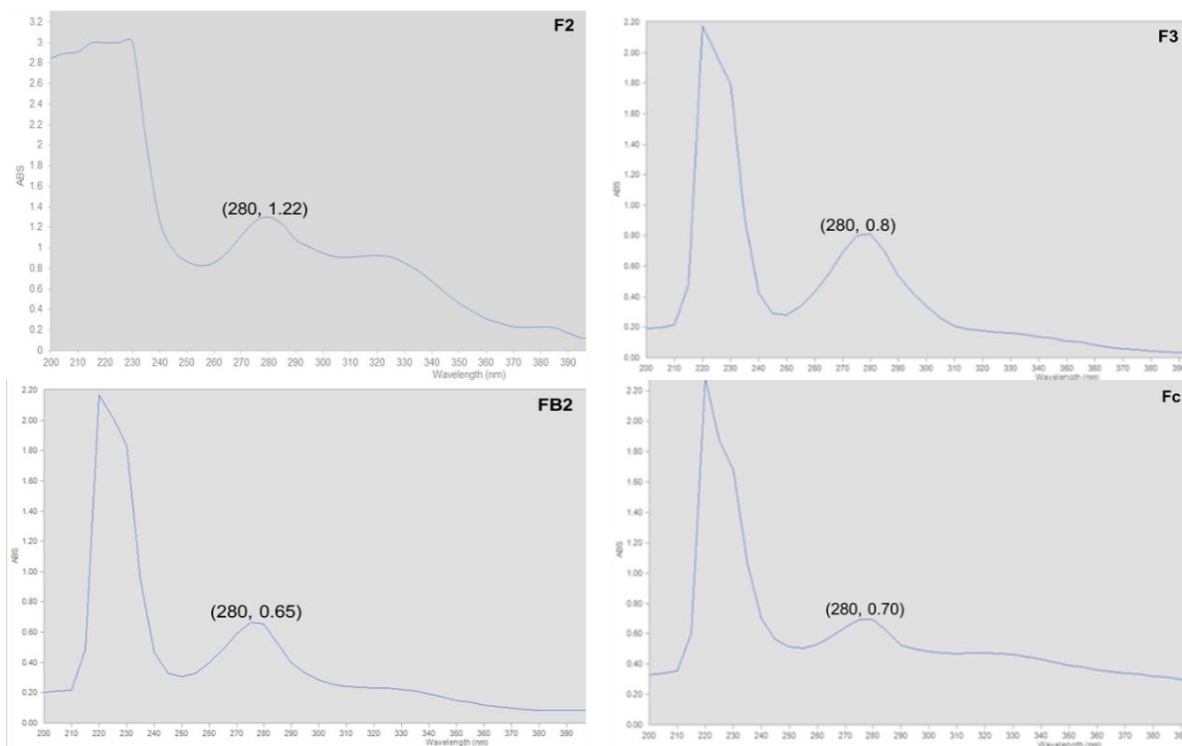


Figura 15. Barrido espectral de las fracciones F1, F2, FB2, Fc.

Análisis por espectrometría de masas

El análisis realizado a las mismas fracciones (Figura 16-19), confirmó que aunque F2, FB2 y Fc presentan posibles compuestos de tipo fenólico, la fracción constituida por agua: metanol: acetonitrilo (F3) (Figura 17) es en la que se encontró el mayor número de probables compuestos de este tipo, tales como los flavonoides kaempferol (m/z : 285.0401) e isoramnetina (m/z : 315.0511) y ácidos fenólicos simples como ácido *trans*-cafeico (m/z : 179.0350) y ferúlico (m/z : 193.0501); por su parte en la fracción F2 (Figura 16) formada por agua: metanol se identificó una relación m/z : 179.0354 que podría corresponder al ácido *trans*-cafeico; mientras que en FB2 (Figura 18) conformada por metanol, se encontraron únicamente posibles ácidos fenólicos simples como *trans*-cafeico (m/z : 179.0355) y ferúlico (m/z : 193.0497); finalmente en la Fc (Figura 19) de metanol:acetonitrilo se identificaron probablemente isoramnetina (m/z : 315.0502) y ácido *trans*-cafeico (m/z : 193.0347). El bajo error obtenido al comparar la masa exacta teórica y experimental de las especies iónicas seleccionadas permitió pre-identificar los compuestos propuestos (Cuadro 6).

De manera particular, la relación de m/z: 315 podría pertenecer a la isoramnetina, al considerar que en el espectro ms: ms obtenido (ms: ms 315, 300) (Anexo C), el fragmento m/z 300 estaría correspondiendo a la pérdida del grupo metilo en la estructura.

Por otra parte, March y Miao (2004) reportaron diferentes especies iónicas del patrón de fragmentación para el kaempferol (ANEXO D) tales como 285, 239, 215, que se observaron en la fracción 3 (F3), lo que sugiere que este compuesto se podría encontrar en la muestra.

La composición específica determinada por espectrometría de masas en las fracciones radicó en la polaridad de cada una de ellas y la afinidad a éstas de los diferentes compuestos fenólicos que fueron identificados (Stalikas, 2007; Ajila y cols., 2011).

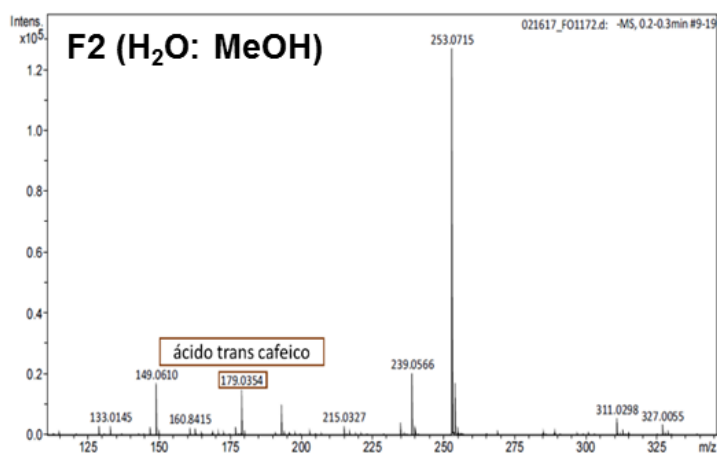


Figura 16. Espectro de masas de la fracción F2.

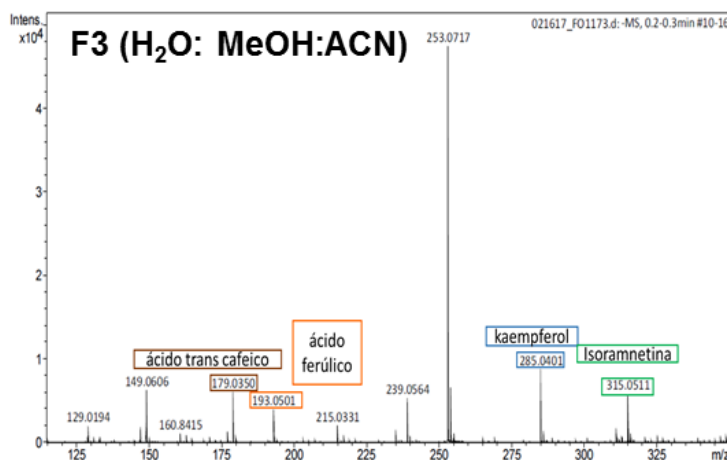


Figura 17. Espectro de masas de la fracción F3.

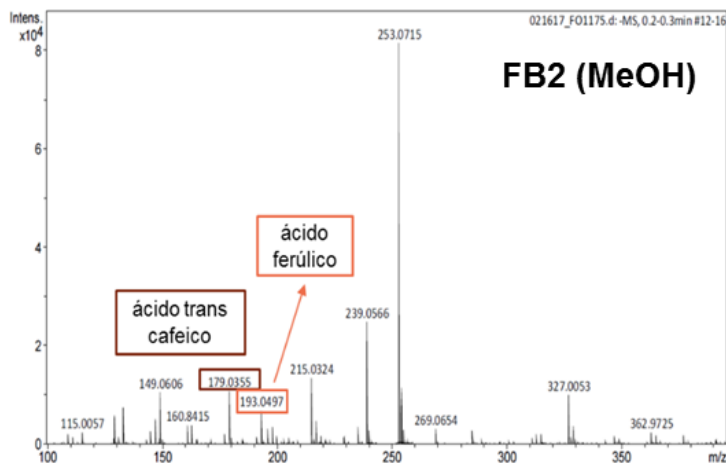


Figura 18. Espectro de masas de la fracción FB2.

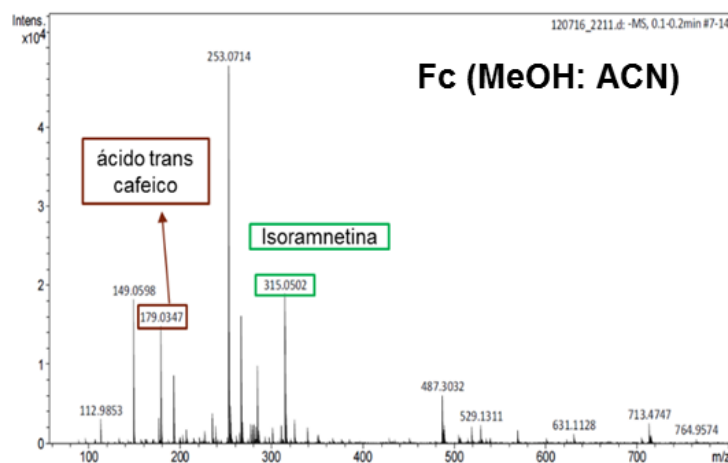


Figura 19. Espectro de masas de la fracción Fc.

Cuadro 6. Comparación de masa exacta experimental y teórica de las fracciones de los proceso de purificación.

TIPO DE MUESTRA	COMPUESTOS	M/Z EXPERIMENTAL	M/Z TEÓRICO	ERROR
F2	Ácido <i>trans</i> -cafeico	179.0354	179.035	1.8
F3	Ácido <i>trans</i> -cafeico	179.035	179.035	-0.3
	Ácido ferúlico	193.0501	193.0506	1
	Kaempferol	285.0401	285.0405	0.2
	Isoramnetina	315.0511	315.051	-0.4
FB2	Ácido <i>trans</i> -cafeico	179.0355	179.035	5.2
	Ácido ferúlico	193.0493	193.0506	2.7
Fc	Ácido <i>trans</i> -cafeico	179.0347	179.035	2.2
	Isoramnetina	315.0502	315.051	2.7

Los compuestos que fueron preliminarmente identificados en nopal cultivar Atlixco son similares con los reportados para otras variedades de nopal (Guevara-Figueroa y cols., 2010), en donde se ha encontrado ácido ferúlico (m/z: 193), ácido cafeico (m/z:179), ácido siríngico (m/z: 197), p-cumárico (m/z:163), entre otros; además Santos-Zea y cols. (2011) detectaron por espectrometría de masas ESI modo positivo flavonoides como kaempferol (m/z: 287), y diferentes glucósidos de isoramnetina con m/z: 339,479, 625. Estos reportes indican que los posibles compuestos fenólicos detectados en el presente estudio si pueden encontrarse en el nopal cultivar Atlixco

Los resultados obtenidos de la evaluación del proceso de purificación confirmó la importancia que tiene esta etapa durante el proceso de extracción de compuestos fenólicos, dado que posiblemente permitió eliminar compuestos como ácidos orgánicos y vitamina C, entre otros, que generalmente interfieren en la identificación de los metabolitos secundarios (Stalikas, 2007; Ajila y cols., 2011; Côté y cols., 2016).

De lo anterior se concluyó que la fracción F3 (agua: metanol: acetonitrilo) del PP-1 fue la más adecuada para el análisis de los compuestos de interés. De aquí que fue la fracción seleccionada para el posterior experimento en el que se evaluó si el efecto de diferentes tiempos de calentamiento durante el proceso de hidrólisis producía un cambio en la composición fenólica.

7.4. Efecto del tiempo de calentamiento durante la hidrólisis

Se ha reportado que la estabilidad de los flavonoides depende fundamentalmente del tipo de flavonoide y grupos sustituyentes en el núcleo del mismo (Biesaga, 2011; Biesaga y Pyrzyńska, 2013). Por otro lado, existe información ampliamente documentada de que para la extracción de este tipo de compuestos se utiliza comúnmente una hidrólisis ácida que permite la obtención mayoritaria de los flavonoides en su forma de aglicona (Nuutila y cols., 2002; Stalikas, 2007; Ajila y cols., 2011; Sani y cols., 2012). Sin embargo, también se ha reportado que, de acuerdo con las características estructurales de los flavonoides de interés, deben emplearse diferentes tiempos de hidrólisis con el fin de obtener sus respectivas agliconas (Hertog y cols., 1992). Por lo anterior, en la presente investigación se realizó una exploración para determinar si el tiempo de calentamiento empleado (65 °C, 2h) limitó la obtención de otros flavonoides.

Los resultados de las determinaciones de fenoles, flavonoides totales, cromatografía en capa fina y análisis por espectrometría de masas para cada uno de los cinco tiempos evaluados (sin calentamiento, 0.5h, 1h, 2h y 4h) se presentan a continuación.

7.4.1. Efecto del tiempo de calentamiento en el contenido de fenoles totales.

En el análisis estadístico (ANEXO E) se consideraron únicamente los datos correspondientes de los tiempos 0, 0.5, 1 y 2 horas, los resultados arrojaron que no existe diferencia significativa entre los tiempos 0.5 y 2 h ni entre 0 y 1 h.

Como se observa en la figura 20, el menor contenido fenólico se obtuvo en las hidrólisis sin calentamiento (79.14 ± 10.38 μg EAG/ g nopal fresco) y después de una hora de calentamiento (118.53 ± 0.00 μg EAG/ g nopal fresco) mientras que, el mayor contenido se obtuvo a la 0.5 y 2 h siendo éste de 182.26 ± 0.56 μg EAG/ g nopal fresco y 171.62 ± 17.30 μg EAG/ g nopal fresco, respectivamente. Estos resultados confirman la importancia del aumento de la temperatura en la extracción de los polifenoles, condición que facilita la obtención de los mismos por el aumento en su solubilidad y las interacciones entre el analito con el disolvente (Ajila y cols., 2011).

En el contenido de fenoles totales determinado a las 4 h de calentamiento se observó una amplia desviación estándar, lo cual confirmó lo reportado en la literatura donde se ha establecido que tiempos prolongados afectan la reproducibilidad de la técnica debido a la integridad de este tipo de compuestos (Stalikas, 2007).

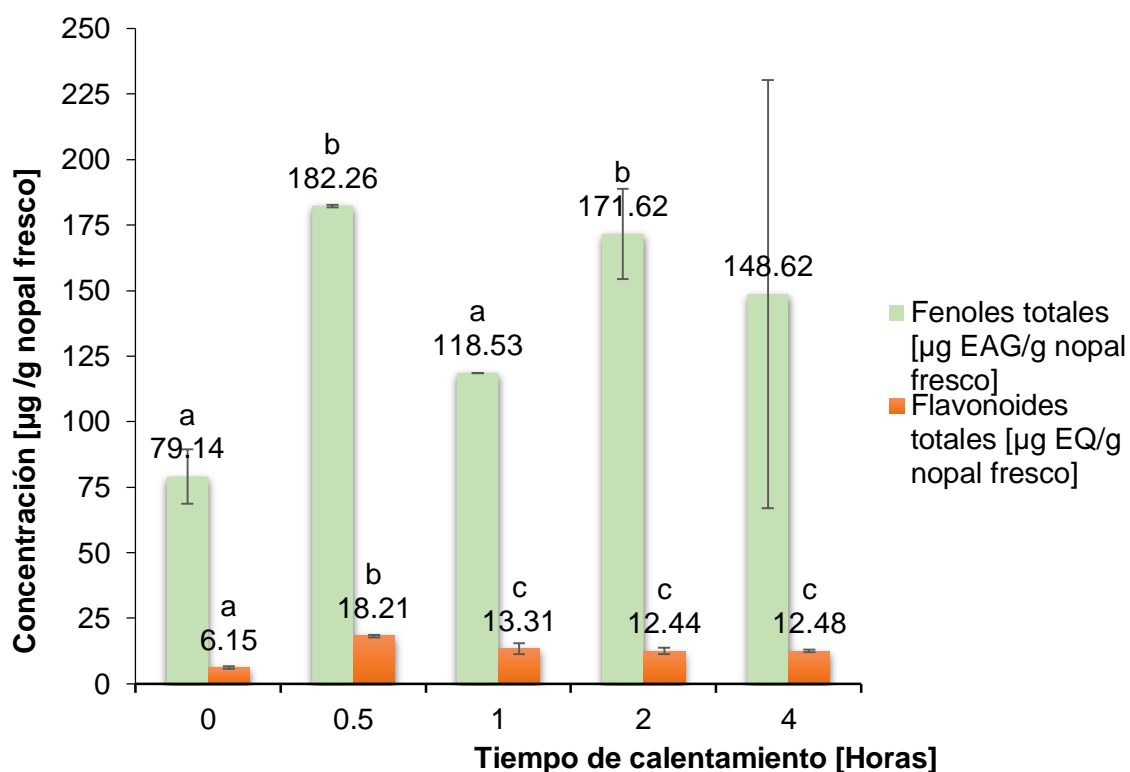


Figura 20. Contenido de fenoles y flavonoides totales en nopal cultivar Atlixco sometido a diferentes tiempos de calentamiento

7.4.2. Efecto del tiempo de calentamiento en la determinación de flavonoides totales.

En la Figura 20 se aprecia que el menor contenido de flavonoides ($6.15 \pm 0.55 \mu\text{g EQ/g}$ nopal fresco) se registró en la muestra sin calentamiento, y el mayor ($18.21 \pm 0.48 \mu\text{g EQ/g}$ nopal fresco) se obtuvo a las 0.5 horas de calentamiento. Estos resultados son coherentes con los contenidos mínimo y máximo de fenoles totales. A 1 hora de calentamiento el contenido de flavonoides disminuyó aproximadamente en un 27% pero se mantuvo estadísticamente constante ($p < 0.05$) (ANEXO F) durante las 2 y 4 h de calentamiento posteriores. Los resultados del análisis de fenoles y flavonoides totales confirmaron que la extracción de éstos debe realizarse con calentamiento (65°C)

7.4.3. Efecto del tiempo de calentamiento en los compuestos observados por cromatografía en capa fina (prueba cualitativa).

En las cromatoplasmas de la Figura 21 se presentan las bandas detectadas en la región UV de la F3 para cada uno de los tiempos de calentamiento evaluados. Se aprecia claramente que en la extracción sin calentamiento no se detectaron compuestos que absorbieran en la región ultravioleta. A las 0.5, 1, 2 y 4 h de calentamiento se observaron 3 bandas, las cuales indican la presencia de compuestos que absorben en esta región, que pueden ser compuestos fenólicos de interés, en donde las intensidades de las mismas varían en cada uno de los tiempos evaluados.

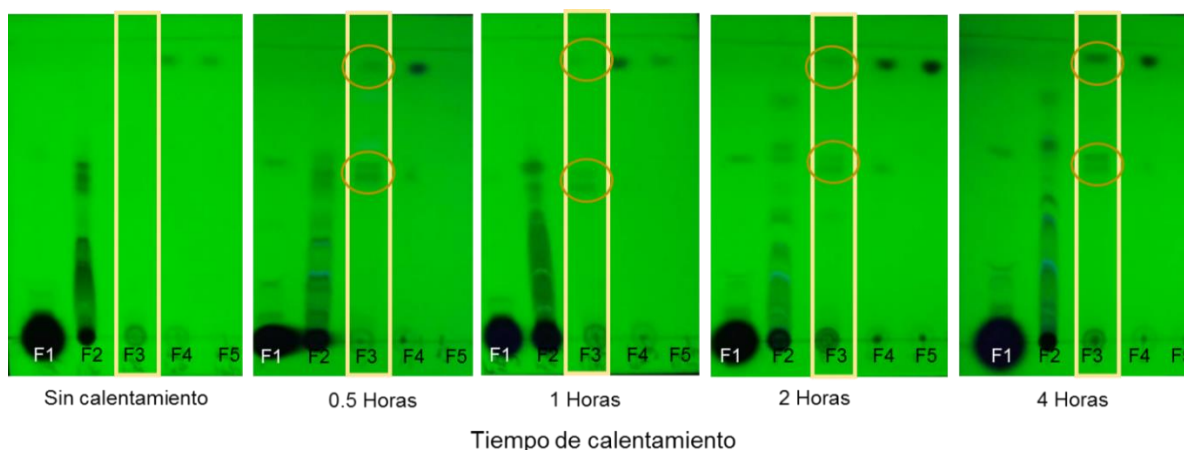


Figura 21. Evaluación de tiempos de hidrólisis por CCF (longitud de onda corta 254 nm)

El análisis de la misma cromatoplasma a una longitud de onda larga (366 nm) permitió identificar los tipos de compuestos presentes de acuerdo con la coloración de las bandas. Así, en la Figura 22 se observan en las muestras tratadas sin calentamiento y con 1 hora de calentamiento bandas azules fluorescentes, mientras que en los tiempos 0.5, 2 y 4 horas se encontraron tanto bandas azules como amarillo fluorescentes. De acuerdo con la literatura, las coloraciones de las bandas encontradas son específicas de flavonoides (azules y amarillo fluorescentes), y la diferencia en el color indica la presencia de diferente tipo de flavonoides (Verlag y Heidelberg, 1970; Tuschstone, 1992; Stalikas, 2007).

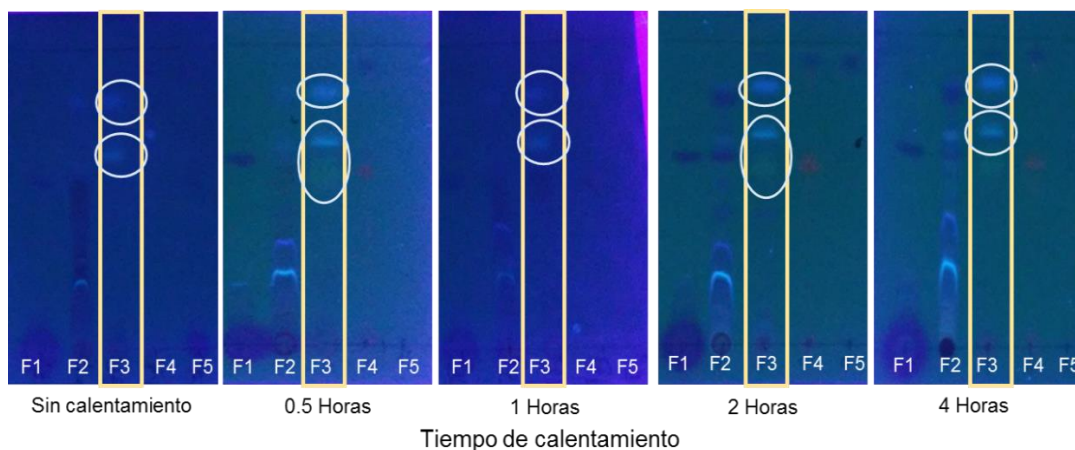


Figura 22. Evaluación de tiempos de hidrólisis por CCF (longitud de onda larga 366 nm)

Por su parte, el revelado de la cromatoplaque con DPPH (Figura 23) permitió confirmar que los compuestos presentes en la fracción F3 son de tipo antioxidante, atendiendo a que las bandas de coloración amarilla son características para compuestos de este tipo cuando se emplea el DPPH como revelador, tal como fue explicado anteriormente (Sagar y cols., 2011).

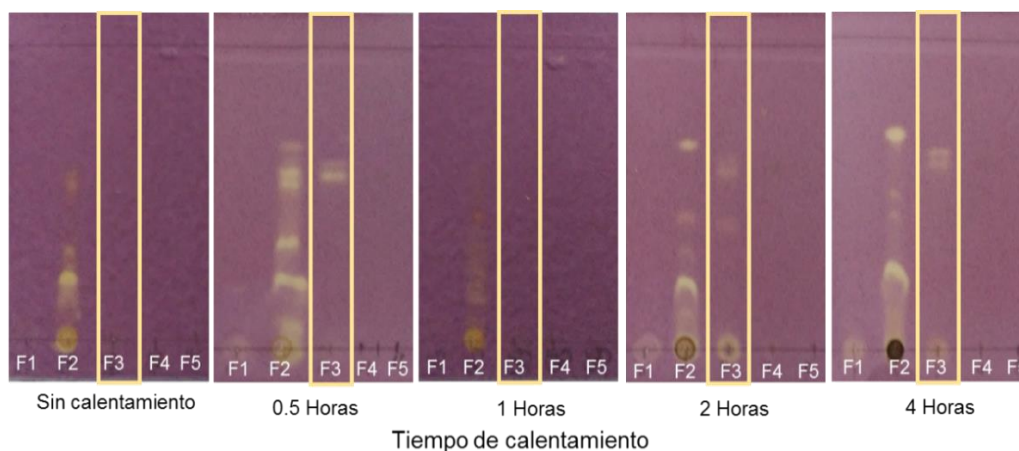


Figura 23. Evaluación tiempos de hidrólisis por cromatografía en capa fina. Revelado con DPPH 0.04% (v/v)

7.4.4. Identificación de flavonoides por espectrometría de masas

En las Figuras 24-28 se muestran los espectros correspondientes a la composición detectada en cada uno de los tiempos de calentamiento estudiados, además en el Cuadro 7

se presentan en forma integrada los posibles compuestos fenólicos identificados y la comparación de masa exacta teórica y la experimental con la cual se propuso la identidad de los compuestos. En términos generales, estos resultados son una evidencia clara del efecto del tiempo de hidrólisis en la extracción de flavonoides específicos de la muestra en estudio.

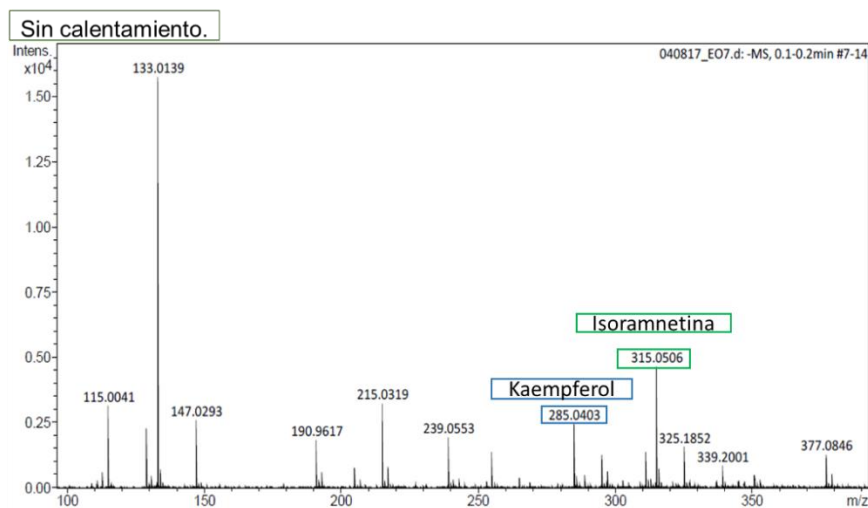


Figura 24. Espectro de masas. Hidrólisis sin calentamiento

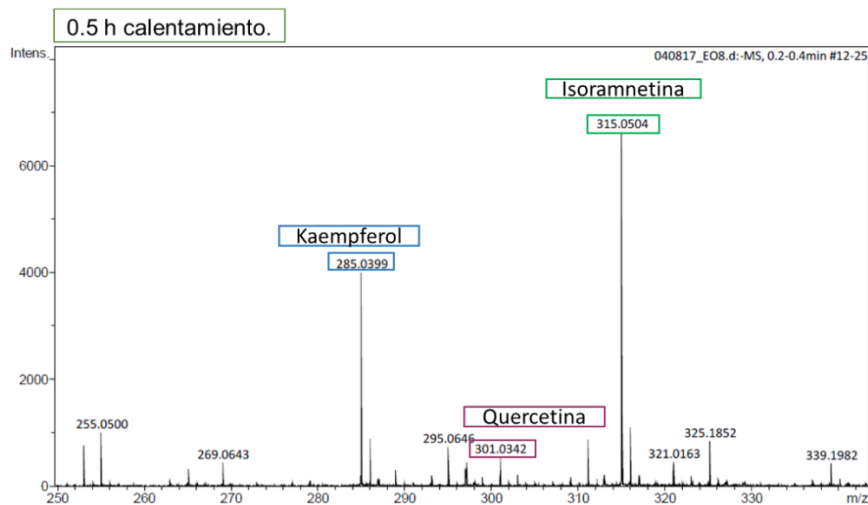


Figura 25. Espectro de masas. Hidrólisis con 0.5 h de calentamiento

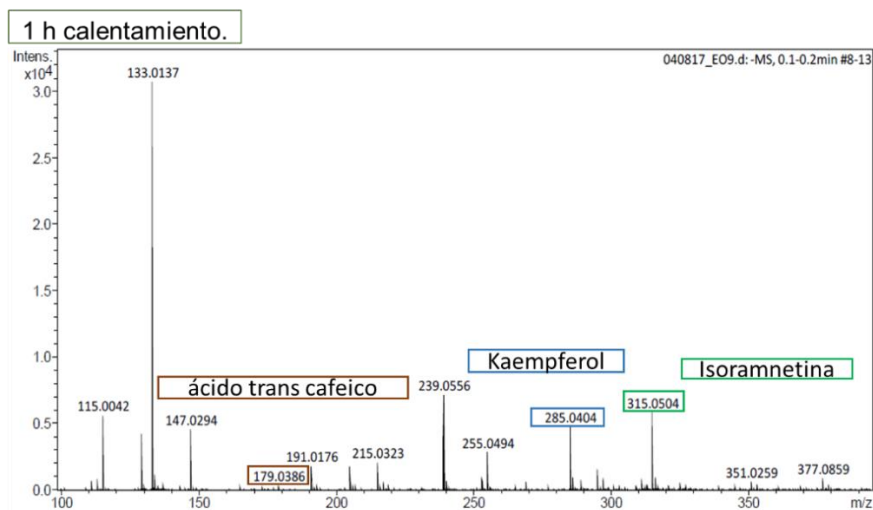


Figura 26. Espectro de masas. Hidrólisis con 1 h de calentamiento

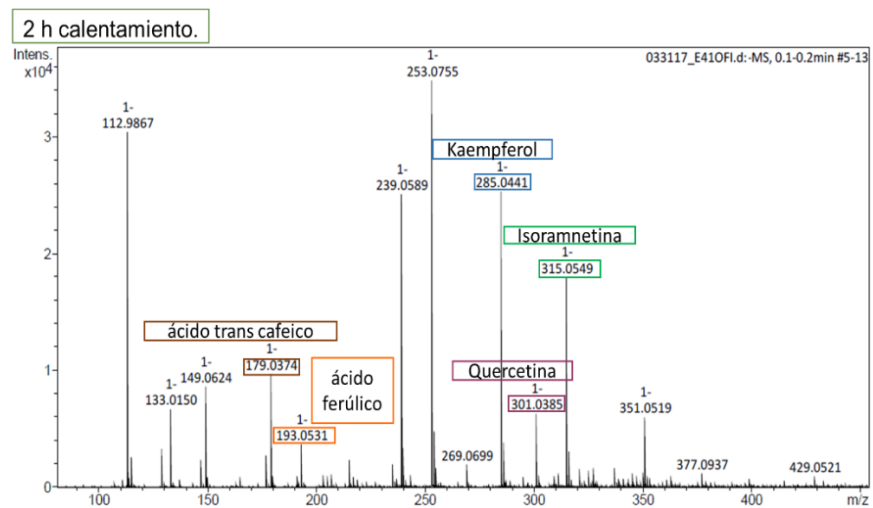


Figura 27. Espectro de masas. Hidrólisis con 2 h de calentamiento

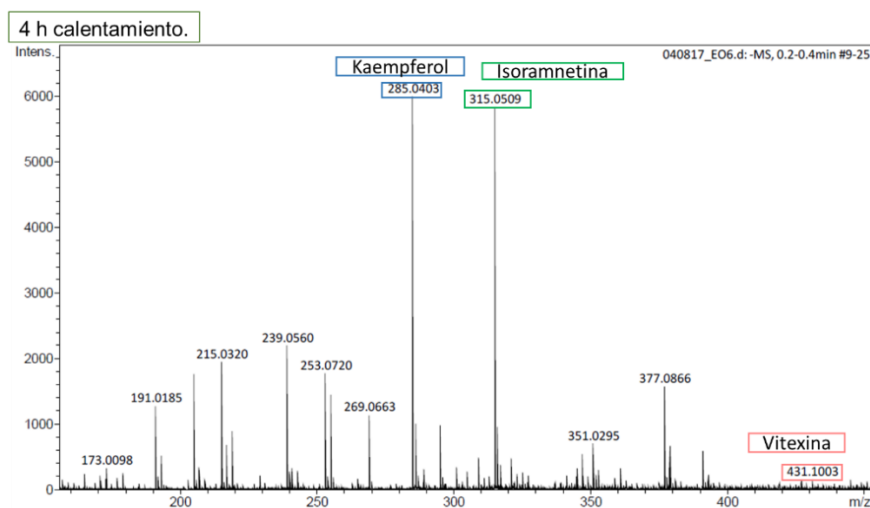


Figura 28. Espectro de masas. Hidrólisis con 4 h de calentamiento

Cuadro 7. Compuestos identificados por espectrometría de masas bajo diferentes tiempos de hidrólisis

TIEMPO DE HIDRÓLISIS Ó CALENTAMIENTO [h]	COMPUESTOS IDENTIFICADOS	M/Z EXPERIMENTAL	M/Z TEÓRICO	ERROR ppm
Sin calentamiento	Kaempferol	285.0403	285.0405	-0.7
	Isoramnetina	315.0506	315.0510	0.3
0.5	Kaempferol	285.0399	285.0405	-1.8
	Quercetina	301.0342	301.0354	3.9
	Isoramnetina	315.0504	315.0510	3.9
1	Ácido <i>trans</i> - cafeico	179.0386	179.0350	-20.6
	Kaempferol	285.0404	285.0405	-0.7
	Isoramnetina	315.0504	315.0510	1.7

2	Ácido <i>trans</i> -cafeico	179.0374	179.035	14.1
	Ácido ferúlico	193.0531	193.0506	11.7
	Kaempferol	285.0441	285.0405	13.8
	Quercetina	301.0385	301.0354	9.4
	Isoramnetina	315.0549	315.051	-12.3
4	Kaempferol	285.0403	285.0405	-1.2
	Isoramnetina	315.0509	315.0510	-0.3
	Vitexina	431.1003	431.0984	-4.4

En la presente investigación pudo observarse que los flavonoides kaempferol e isoramnetina posiblemente están presentes en todos los tiempos de hidrólisis, indicando que estos compuestos pueden extraerse aún sin aplicar calor y que son muy estables a tiempos prolongados de hidrólisis a 65°C. La estabilidad de estas agliconas se atribuye al tipo, número y posición de sustituyentes que se encuentran unidos a su núcleo, principalmente en el anillo B del flavonoide. Bajo este contexto, ambos flavonoides presentan un único sustituyente OH en este anillo, lo cual los hace más estables, debido a que se ha reportado que el aumento de estos sustituyentes genera compuestos intermediarios de degradación de los flavonoides. Cabe enfatizar que en el caso de la isoramnetina existe un grupo metilo adicional en carbono 3', lo cual disminuye la actividad antioxidante del compuesto, contribuyendo a mantenerlo estable (Hertog y cols., 1992; Balasundram y cols., 2006; Biesaga, 2011; Maini y cols., 2012)..

La quercetina se detectó a la media hora y también a las dos horas de calentamiento. Esto podría indicar que a partir de tiempos cortos de hidrólisis es posible obtener la aglicona y al prolongar el tiempo su presencia es más detectable debido a la hidrólisis de otros diferentes glucósidos de quercetina; sin embargo, el hecho de que no se detectó a la hora de transcurrida la hidrólisis podría deberse a la degradación de la aglicona previamente obtenida debido a la posición de los sustituyentes OH en el anillo B, que favorece la

formación de *orto* quinonas y otros intermedarios conduciendo de esta manera la degradación de las agliconas obtenidas (Makris y Rossiter, 2002; Zhou y cols., 2007). Es posible sugerir la presencia quercetina considerando los bajos errores al comparar la masa exacta teórica con la experimental.

Los posibles ácidos fenólicos simples como el ferúlico y *trans*-cafeico se detectaron tras 2 horas de calentamiento. La identificación de estos compuestos podría deberse a que de acuerdo con la literatura, estos ácidos hidroxinámicos están presentes mayoritariamente en todas las plantas, en donde se encuentran generalmente unidos a moléculas de glucosa, por lo que con 2 horas de calentamiento se consigue la hidrólisis del enlace glucosídico y obtienen los fenólicos simples en forma libre (Mattila y Hellström, 2007).

Finalmente, se identificó que la vitexina también posiblemente se encuentra en nopal y se logró extraerla después de 4 horas de someter el nopal a una hidrólisis ácida, lo que puede explicarse por el hecho de que se trata de un flavonoide naturalmente glucosilado en donde el azúcar está unido al flavonoide mediante un enlace C-glucosídico en el carbono 5 del núcleo del flavonoide. Lo anterior pudo deberse a las características estructurales del mismo, así, la saturación en el heterociclo aunado a la C-glucosidación en el anillo A disminuye su actividad antioxidante y mantiene su integridad durante el proceso de extracción, debido a que no es un donante de hidrógeno tan eficaz; por otro lado, se sabe que el glucósido atenúa la prooxidación del flavonoide (Rice-Evans y cols., 1996; Heim y cols., 2002).

Los resultados obtenidos sugirieron que en los cladodios de nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. cultivar Atlixco están presentes las agliconas isoramnetina, kaempferol y quercetina. Lo cual es consistente con lo reportado en estudios realizados con diferentes variedades de nopal producido en México, donde se destaca que la isoramnetina es el flavonol predominante (Santos-Zea y cols., 2011; Antunes- Ricardo y cols., 2014).

Por otro lado, en cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L) Mill. cultivares Surfarina, Mucaredda y Sanguigna producidos en Italia se ha mencionado a la isoramnetina y al kaempferol como los principales flavonoides presentes (Ginestra y cols., 2009). Así mismo, en cladodios *Opuntia ficus-indica* cultivares Farawala y Shamia cultivados en Egipto, la isoramnetina ha sido reportada como la principal aglicona (Moussa-Ayoub y cols., 2014).

Con respecto a lo que se reporta en la revisión publicada en especies de *Opuntia* por Stintzing y Carlie (2005) referente a la presencia de las agliconas taxifolina y miricetina en

Opuntia robusta Wendl. y *Opuntia dillenii* respectivamente, no fueron detectadas en *Opuntia ficus-indica* Mill. cultivar Atlixco, lo cual podría deberse bien a la baja estabilidad de estas agliconas dada principalmente por un mayor número de sustituyentes OH en el anillo B, aunque existe la posibilidad de que no se encuentren presentes.

8. CONCLUSIONES

1. Se estableció que el nopal deber ser liofilizado para facilitar el manejo de la muestra y mejorar el proceso de extracción.
2. El aumento de la temperatura combinado con el uso de metanol acidificado facilitó la obtención de los posibles compuestos fenólicos.
3. La hidrólisis ácida (65°C, 2 h de calentamiento) permitió la extracción de posibles flavonoides y ácidos fenólicos simples.
4. El proceso de purificación fue una etapa crucial para la obtención y posterior identificación de los posibles flavonoides presentes en el nopal, dado que permitió eliminar compuestos de interferencia, siendo la fracción 3 del proceso de purificación 1 la que resultó ser más conveniente para el análisis de los compuestos de interés.
5. En los cladodios de nopal cultivar Atlixco probablemente están presentes los flavonoides agliconas como isoramnetina, kaempferol y quercetina, además flavonoides glucosilados como la vitexina y los ácidos fenólicos simples *trans*-cafeico y ferúlico.

9. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos se sugiere:

Confirmar la identidad de los flavonoides kaempferol, isoramnetina, quercetina, vitexina y los ácidos fenólicos simples *trans*-cafeico y ferúlico; para ello se propone agregar a las muestras los estándares correspondientes y posteriormente realizar su análisis por espectrometría de masas.

Identificar los compuestos fenólicos en diferentes cultivares de nopal *Opuntia ficus-indica* siguiendo la metodología propuesta, con la finalidad de elucidar si estos pueden ser empleados como huella digital para la denominación de origen.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-García, B., Garmón-Lobato, S., Berrueta, L.A., Gallo, B.I., Vicente, F., 2012. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 99, pp.213–224.
- Aires, A., Carvalho, R., Saavedra, M.J., 2017. Reuse potential of vegetable wastes (broccoli, green bean and tomato) for the recovery of antioxidant phenolic acids and flavonoids. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(1), pp.98–107.
- Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., Valéro, J.R., 2011. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(August 2010), pp.227–249.
- Antunes- Ricardo, M., Moreno-García, B., Gutiérrez-Urbe, J., Aráiz-Hernández, D. & Serna-Saldivar, S., Alvarez, M., 2014. Induction of Apoptosis in Colon Cancer Cells Treated with Isorhamnetin Glycosides from *Opuntia Ficus-indica* Pads. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(4), pp.331–336.
- Astello-García, M.G., Cervantes, I., Nair, V., Santos-Díaz, M.S., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., Cisneros-Zevallos, L., Barba de la Rosa, A.P., 2015. Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, pp.119–130.
- Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A., Aruoma, O.I., 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), pp.1553–1561.
- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), pp.191–203.
- Bensadón, S., Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S.G., Goñi, I., 2010. By-Products of *Opuntia ficus-indica* as a Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), pp.210–216.

- Biesaga, M., Pyrzyńska, K., 2013. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry*, 136(1), pp.46–54.
- Biesaga, M., 2011. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18), pp.2505–2512. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.059>.
- Cartaya, O., Reynaldo, I., 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), pp.5–14.
- Chauhan, S.P., Sheth, N.R., Jivani, N.P., Rathod, I.S., Shah, P.I., 2010. Biological actions of *Opuntia* species. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1(2), p.146. Available at: <http://www.sysrevpharm.org/text.asp2010/1/2/146/75064>
- Chougui, N., Tamendjari, A., Hamidj, W., Hallal, S., Barras, A. & Richard, T., Lariat, R., 2013. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. *Food Chemistry*, 139(1–4), pp.796–803. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.054>.
- Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Sylvain, J.F., Lacroix, M., 2016. Analyzing Cranberry Bioactive Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutritional*, 50 (9), 872-888.
- Dicko, M.H., Gruppen, H., Traoré, A.S., Voragen, A.G.J., Van Berkel, W.J.H., 2006. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(April), pp.21–38.
- El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbij, M.S., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., Cherkaoui-Malki, M., 2014. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), pp.14879–14901.
- Ginestra, G., Parker, M.L., Bennett, R.N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, R.B., Bisignano, G., Faulds, C.B., Waldron, K.W., 2009. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), pp.10323–10330.
- Granato, D., Santos Sousa, J., Laércio Galvao, M., Domingos Sávio, N., 2016. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total

- content of phenolic compounds in food matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 80, pp.266–279. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.010>.
- 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), pp.525–532.
- Guzmán-Loayza, D., Chávez, J., 2007. Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Revista de Sociedad Química de Perú*, 73, pp.41–45.
- Harris, D.C. 2013. *Análisis químico cuantitativo*. Ed. Reverté. 518 p.
- Heim, H. E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure - activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, pp.572–584.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Venema, D.P., 1992. Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, pp.1591–1598.
- Hounsome, N, Hounsome B., Tomos, D., Edwards-Jones, G., 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*, 73(4), pp.48–65.
- Hoffman, E., Stroobant, V. 2007. *Mass Spectrometry principles and applications*. Ed. Wiley. 43-55 p.
- Krishnamachari, V., Levine, L.H., Paré, P.W., 2002. Flavonoid oxidation by the radical generator AIBN: A unified mechanism for quercetin radical scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), pp.4357–4363.
- Kuti, J.O., 2004. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chemistry*, 85(4), pp.527–533.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Avallone, L., Menichini, F., 2012. Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona*

- cherimola Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25(2), pp.179–184. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2011.09.002>.
- Maini, S., Hodgson, H.L., Krol, E.S., 2012. The UVA and aqueous stability of flavonoids is dependent on B-ring substitution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(28), pp.6966–6976.
- Makris, D.P. & Rossiter, J.T., 2002. An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. *Food Chemistry*, 77(2), pp.177–185.
- March, R.E. & Miao, X.S., 2004. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry*, 231(2–3), pp.157–167.
- Martínez-Flórez. S., González-Gallego.J., Culebras.J.M., TuñónM.J., 2002. 3338. *Los flavonoides propiedades y antioxidantes*, pp.271–278.
- Mattila, P., Hellström, J., 2007. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), pp.152–160.
- Miean, K.H., Mohamed, S., 2001. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp.3106–3112.
- Moon, J.K., Shibamoto, T., 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components Antioxidant Assays for Plant and Food Components. , 57(January), pp.1655–1666.
- Moussa-ayoub, T. E., El-samahy, S.K., Kroh, L.W., Rohn, S., 2011. Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. *Food Chemistry*, 124(3), pp.1177–1184. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.032>.
- Moussa-Ayoub, T.E., Jaeger, H., Youssef, K., Knorr, D., El-Samahy, S., Kroh, L.W., Rohn, S., 2016. Technological characteristics and selected bioactive compounds of *Opuntia dillenii* cactus fruit juice following the impact of pulsed electric field pre-treatment. *Food Chemistry*, 210, pp.249–261. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.115>.

- Moussa-Ayoub, T.E., El-Hady, El-Sayed.A. A., Omran, H.T., El-Samahy,S.K., Kroh, L.W., Rohn,S., 2014. Influence of cultivar and origin on the flavonol profile of fruits and cladodes from cactus *Opuntia ficus-indica*. *Food Research International*, 64, pp.864–872.
- Mustafa, R.A., Hamid, A.A., Mohamed, S., Bakar, F.A., 2010. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Journal of Food Science*, 75(1).
- Naczka, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), pp.95–111.
- Naczka, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), pp.1523–1542.
- Nuutila, A.M., Kammiovirta, K., Oksman-Caldentey., H.H., 2002. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76, pp.519–525.
- Oniszczyk, A., Olech, M., 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction and LC-ESI–MS/MS analysis of phenolic acids from *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*. *Industrial Crops and Products*, 83, pp.359–363. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669016300164>.
- Oniszczyk, A., Podgórski, R., 2015. Influence of different extraction methods on the quantification of selected flavonoids and phenolic acids from *Tilia cordata* inflorescence. *Industrial Crops and Products*, 76, pp.509–514. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.003>.
- Olsen, E.D., 1990. Métodos ópticos de análisis. Ed Reverté. 95 p.
- Pérez Méndez, L., Tejera Flores, F., Darias Martín, J., Rodríguez Rodríguez, E, M., Díaz Romero, C., 2015. Physicochemical characterization of cactus pads from *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica*. *Food Chemistry*, 188, pp.393–398. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.011>.

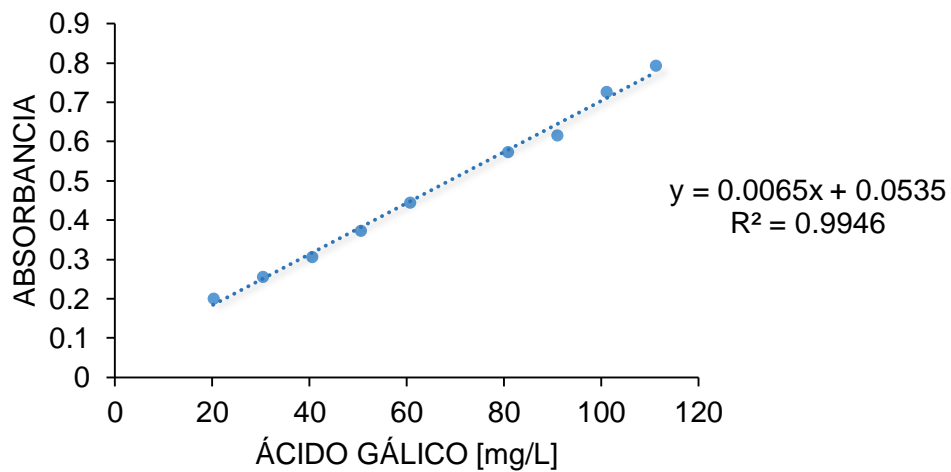
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A., 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), pp.76–89.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), pp.933–956.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), pp.152–159. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138597010182>.
- de Rijke, E., Out, P., Niessen, W., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), pp.31–63.
- Rodríguez-Fuentes H., 2009. Cultivo orgánico del nopal. Ed. Trillas. México. 13 p.
- Routray, W., Orsat, V., 2012. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids : A Review. *Food Bioprocess Technol* (2012), 5, pp.409–424.
- Sáenz, C., Sepúlveda, E. y Matsuhiro, B., 2004. Opuntia spp. mucilage's: A functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments*, 57(3), pp.275–290.
- Sagar, B., Kedare, R., Singh, P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), pp.412–422.
- Sani, I., Iqbal, S., Chan, K., Ismail, M., 2012. Effect of Acid and Base Catalyzed Hydrolysis on the Yield of Phenolics and Antioxidant Activity of Extracts from Germinated Brown Rice (GBR). *Molecules*, pp.7584–7594.
- Santos-Zea, L., Gutierrez-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), pp.7054–7061.
- Simonovska, Breda., Vovk, Irena., Andrenšek, Samo., Valentová, Katerina., Ulrichová, J., 2003. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and

- tubers. *Journal of Chromatography A*, 1016(1), pp.89–98.
- Stalikas, C.D., 2007. Review Extraction , separation , and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, pp.3268–3295.
- Stintzing, F.C. y Carle, R., 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(2), pp.175–194.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao,L., Oomah, B.D., 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), pp.4113–4117. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/jf9801973>.
- Ventura-Aguilar. 2013. Efecto del envasado en atmósferas modificadas en la capacidad antioxidante de dos cultivares de nopal verdura.Tesis de doctorado.63 p.
- Ventura-Aguilar, R.I., Rivera-Cabrera, F., Méndez-Iturbide, D., Pelayo- Zaldívar, C., Bosquez-Molina, E., 2013. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems of minimally processed cactus stems (*Opuntia ficus-indica* Mill.) packaged under modified atmospheres. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(12), pp.2603–2612.
- Vermerris, W., Nicholson, R., 2008. *Phenolic Compound Biochemistry*, USA: Springer.
- De Villiers, A., Venter, P., Pasch, H., 2015. Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1430, pp.16–78. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.077>.
- Watson, R., Preedy, V., 2010. *Bioactive Foods in Promoting Health* primera., London.
- Zhou, A., Kikandi, S., Sadik, O.A., 2007. Electrochemical degradation of quercetin: Isolation and structural elucidation of the degradation products. *Electrochemistry Communications*, 9(9), pp.2246–2255.

11. ANEXOS

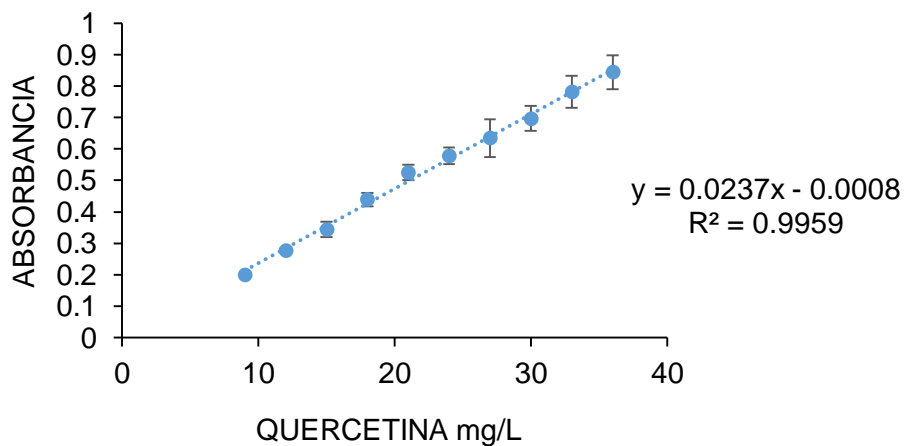
ANEXO A. Curva tipo empleada para la determinación de fenoles totales

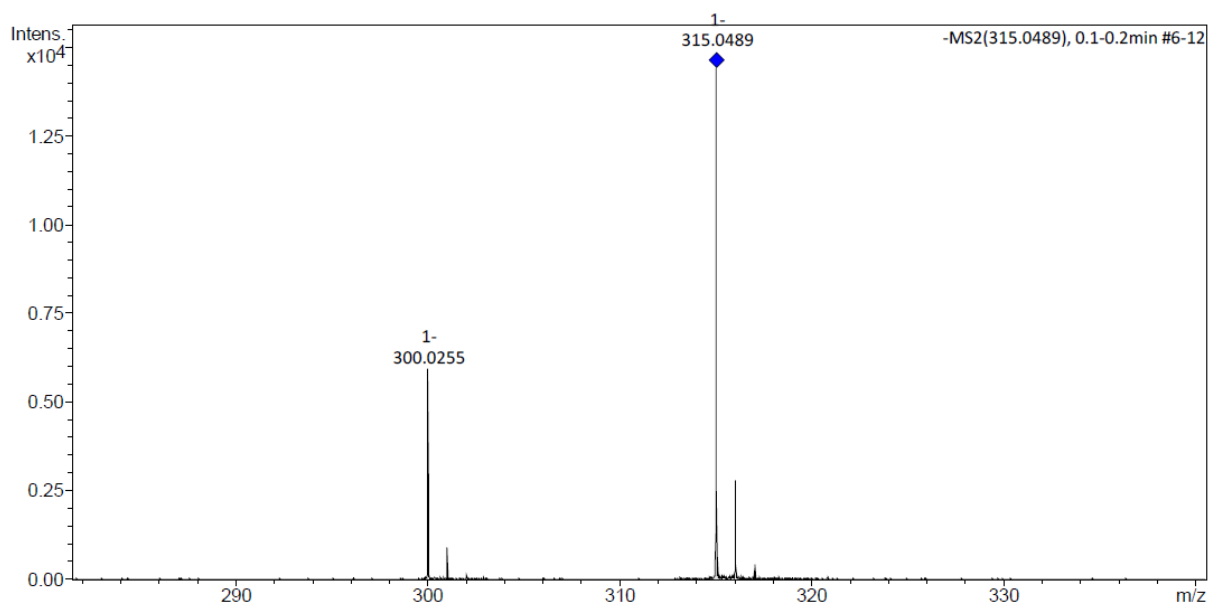
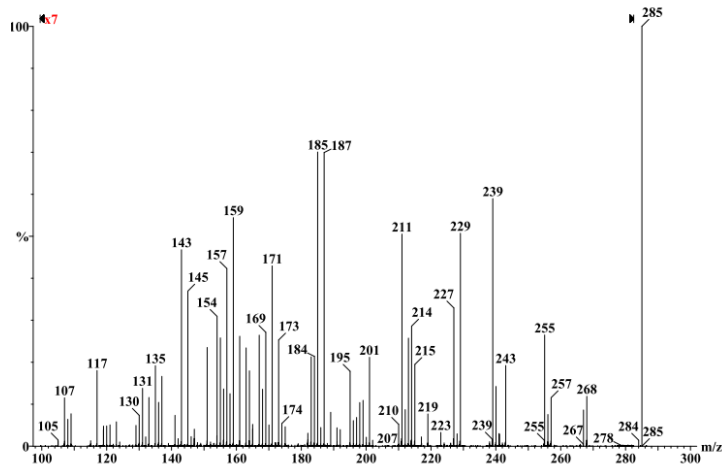
CURVA ESTÁNDAR DE FENOLES TOTALES



ANEXO B. Curva tipo empleada para la determinación de flavonoides totales

CURVA ESTÁNDAR FLAVONOIDES TOTALES



ANEXO C. Espectro de ms:ms experimental del ion molecular 315**ANEXO D. Espectro de masas de los productos iónicos del kaempferol [M-H]⁻**

ANEXO E. Análisis estadístico de fenoles totales en evaluación de tiempos de calentamiento

DCA para el contenido de fenoles totales en extractos hidrolizados de nopal, buscando establecer la diferencia significativa con respecto a los tiempos de calentamiento durante la extracción con hidrólisis ácida.

ANOVA

Fenoles Totales

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	12187.102	3	4062.367	45.391	.002
Dentro de grupos	357.986	4	89.496		
Total	12545.088	7			

fenoles

HSD Tukey^a

thidrolisis	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
10.00	2	74.1930	
30.00	2	111.1210	
40.00	2		160.8935
20.00	2		170.8710
Sig.		.057	.731

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.

ANEXO F. Análisis estadístico de flavonoides totales en evaluación de tiempos de calentamiento

DCA para el contenido de flavonoides totales en extractos hidrolizados de nopal, buscando establecer la diferencia significativa con respecto a los tiempos de calentamiento durante la extracción con hidrólisis ácida

ANOVA

Flavonoides Totales

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	147.262	4	36.815	27.021	.001
Dentro de grupos	6.812	5	1.362		
Total	154.074	9			

FLAVONOIDES

HSD Tukey^a

TIEMPO	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
10	2	6.1485		
40	2		12.4420	
50	2		12.4820	
30	2		13.3055	
20	2			18.2130
Sig.		1.000	.938	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.000.